



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

Karolina Domingues

O córtex infralímbico e as respostas sexualmente dimórficas de ratos no teste do nado forçado: implicações para o mecanismo de ação dos antidepressivos.

Florianópolis

2019

Karolina Domingues

O córtex infralímbico e as respostas sexualmente dimórficas de ratos no teste do nado forçado: implicações para o mecanismo de ação dos antidepressivos.

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação
em Farmacologia da Universidade Federal de
Santa Catarina para a obtenção do título de
Doutora em Farmacologia
Orientador: Profa. Dra. Cilene Lino de Oliveira

Florianópolis

2019

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

Domingues, Karolina
O córtex infralímbico e as respostas sexualmente
dimórficas de ratos no teste do nado forçado : implicações
para o mecanismo de ação dos antidepressivos. / Karolina
Domingues ; orientadora, Cilene Lino de Oliveira, 2020.
87 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós
Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. diferenças sexuais. 3.
antidepressivo. 4. córtex infralímbico. I. Lino de Oliveira,
Cilene. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

Karolina Domingues

O córtex infralímbico e as respostas sexualmente dimórficas de ratos no teste do nado forçado: implicações para o mecanismo de ação dos antidepressivos.

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

Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza
Instituição UNESP-Araraquara

Profa. Dra. Manuella Kaster
Instituição UFSC

Prof. Dr. Leandro Bertoglio
Instituição UFSC

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

Rui Daniel Schroder Prediger
Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Profa. Dra. Cilene Lino de Oliveira
Orientador(a)

Florianópolis, 2020.

Este trabalho é dedicado à minha avó Albertina

*1940 †2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os amigos e colegas que contribuíram de alguma maneira para a elaboração deste trabalho. À minha orientadora por todos estes anos de companheirismo e direcionamento. Inaê e Laís que participaram somente do primeiro ano de experimentos, mas cuja ajuda foi imprescindível. Patrick, Natália, Ana e Tamires pela ajuda na realização dos experimentos, pelas cervejas quase sempre necessárias e “stickers”. Ao Fernando Melleu que além da ajuda científica e técnica também forneceu o apoio moral e intelectual que possibilitou a execução deste trabalho. À professora Áurea Elizabeth Linder por gentilmente nos ceder seu laboratório. Ao professor Anicleto Poli pela ajuda na execução do HPLC. Ao professor Pádua pela lupa usada para tirar as fotos de confirmação de cânula. Ao professor Newton Canteras (ICB-USP) pelo microscópio de fluorescência. Ao professor Leandro que gentilmente nos cedeu o muscimol fluorescente. À equipe LAMEB, pelo apoio e disponibilidade. Ao professor Marino pelos ensinamentos. Aos meus pais e avós, porque sem eles não teria chegado até aqui. E principalmente às agências de fomento CAPES e CNPq, especialmente neste momento crítico para a ciência brasileira.

“The Road goes ever on and on
Down from the door where it began.
Now far ahead the Road has gone,
And I must follow, if I can,
Pursuing it with eager feet,
Until it joins some larger way
Where many paths and errands meet.
And whither then? I cannot say”

— J.R.R. Tolkien, *The Fellowship of the Ring*

RESUMO

A maior parte dos antidepressivos atuais é da classe dos inibidores seletivos de recaptção de serotonina (5-HT) (ISRS). Os ISRS inibem o transportador de 5HT (SERT) poucos minutos após o tratamento, contudo o aumento da disponibilidade extracelular da 5-HT e os efeitos clínicos aparecem após tratamento contínuo. Uma explicação coerente para este intervalo é a dessensibilização dos receptores inibitórios do tipo 1A (5-HT_{1A}) pré-sinápticos cuja ativação impediria a liberação da 5-HT nas aferências dos neurônios serotoninérgicos. Após a dessensibilização dos 5-HT_{1A} pré-sinápticos, a 5-HT se acumularia em áreas de projeção, como o córtex infralímbico (IL), inibindo sua atividade pela interação com 5-HT_{1A} pós-sinápticos que então, promoveria os efeitos antidepressivos ou comportamentais. A maioria dos dados formando este arcabouço teórico foi obtida em indivíduos do sexo masculino, entretanto existem evidências em humanos e animais que os efeitos dos ISRS são sexualmente dimórficos. Em nosso laboratório observou-se que ratos Wistar tiveram respostas sexualmente dimórficas ao tratamento crônico com fluoxetina (FLX), um ISRS, no teste de nado forçado (TNF): o tempo de imobilidade dos ratos machos diminuiu enquanto das fêmeas permaneceu inalterado ou aumentou. No presente trabalho estudou-se a hipótese de que a neurotransmissão serotoninérgica no IL de ratos Wistar fosse sexualmente dimórfica, explicando assim as repostas distintas entre machos e fêmeas ao tratamento com o ISRS. Primeiro investigou-se *ex vivo* a capacidade do SERT do encéfalo de ratos machos e fêmeas de captar 5-HT e ser inibido pela FLX. Em seguida investigou-se sua participação na regulação da imobilidade no TNF de ratos de ambos os sexos. Para investigar se as ações dos ligantes dos receptores 5-HT_{1A} infundidos no IL eram inibitórias ou excitatórias comparou-se seus efeitos aos do agonista GABA_A, muscimol. A capacidade do SERT de captar 5-HT e de ser inibido por FLX foram similares nos encéfalos de machos e fêmeas. A infusão do agonista 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT, no IL reduziu mais o tempo de imobilidade dos ratos machos no TNF do que das fêmeas. O antagonista 5-HT_{1A}, WAY100635 infundido no IL preveniu os efeitos do 8-OH-DPAT intra-IL nos machos enquanto reduziu *per se* o tempo de imobilidade das fêmeas no TNF. O muscimol intra-IL reduziu igualmente o tempo de imobilidade no TNF dos ratos machos e fêmeas. Assim, concluiu-se que 1- as repostas sexualmente dimórficas dos ratos no TNF foram independentes da função do SERT; 2- a inibição do IL foi necessária e suficiente para diminuir a imobilidade no TNF nos ratos machos e fêmeas; 3- a inibição do IL via ativação de 5-HT_{1A} parece maior nos machos que nas fêmeas; 4- a influência tônica da 5-HT sobre o IL parece maior em fêmeas que em machos. Os dados sugerem que a sensibilidade dos receptores 5-HT_{1A} do IL dos machos é maior que das fêmeas. Diferentes características dos 5-HT_{1A} no IL de machos e fêmeas poderiam explicar repostas dimórficas aos ISRS no TNF.

Palavras-chave: Teste no nado forçado, SERT, serotonina, diferenças sexuais

ABSTRACT

Most of antidepressants used nowadays are from the family of selective serotonin (5-HT) reuptake inhibitors (SSRI). The SSRIs inhibit the transport protein (SERT) a few minutes after treatment. However, the increase of the extracellular availability of 5-HT and the clinical effects only appear after chronic treatment. An explanation for this effect is the desensitization of the pre-synaptic inhibitory receptor type 1A (5-HT_{1A}), whose activation would stop the liberation of 5-HT from the 5-HT neurons afferences. After the desensitization of the pre-synaptic 5-HT_{1A}, 5-HT levels would increase in the projection areas, like the infralimbic cortex (IL), inhibiting its activity by the interaction with post-synaptic 5-HT_{1A} which, then, would promote the behavioral antidepressant effects. Most data that form this theoretical background was performed in male subjects. However, there are evidence that the effects of SSRI treatment are sexually dimorphic. In our lab we observed that Wistar rats had different behavioral responses to the chronic treatment with fluoxetine (FLX), a SSRI, according to sex in the forced swimming test: The immobility time of males was decreased after treatment, while in females, it remained unaltered or slightly increased. In the present work, we studied the hypothesis that the serotonergic neurotransmission in IL of Wistar rats was sexually dimorphic, so explaining the different responses between males and females after SSRI treatment. First, we investigated *ex vivo* the capacity of SERT to uptake 5-HT and be inhibited by FLX in male and female brains. Then, we quantified the expression of 5-HT_{1A} receptors and its part in the regulation of immobility in the forced swimming test (FST). To investigate if the inhibition of the IL was necessary to the behavior, males and females received muscimol, a GABA_A agonist, infusion in this region. Regarding SERT, its capacity to uptake 5-HT and be inhibited by FLX was similar in males and females. The expression of 5-HT_{1A} varied slightly, but its influence on the immobility in the FST was sexually dimorphic. The infusion of 8-OH-DPAT, a 5-HT_{1A} agonist, in the IL reduced immobility time in males, but not as much in females. The antagonist of 5-HT_{1A}, WAY100635 prevented the effects of 8-OH-DPA in males, while slightly reducing immobility in females *per se*. Infusion of muscimol equally reduced immobility time in both males and females. Then, we can conclude that: 1- the sexually dimorphic responses in the FST were independent of SERT function; 2- The inhibition of IL was necessary and sufficient to decrease immobility in the FST in both males and females; 3- The inhibition of IL via activation of 5-HT_{1A} seem bigger in males than in females; 4- The tonic influence of 5-HT on IL seems bigger in females than in males. Our data suggest that the sensibility os 5-HT_{1A} in the IL of males is bigger than in females. Different characteristics os 5-HT_{1A} in the IL of males and females may explain the sexually dimorphic effects of SSRIS in the FST.

Key-words: Forced swimming test, serotonergic system, serotonin, sex differences

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Moléculas de Clorpromazina e Imipramina, respectivamente	28
Figura 2 - Meta-análise dos tamanhos de efeito para as inibições do IL e PL	22
Figura 3 - Foto da infusão bilateral	32
Figura 4 - Concentração de serotonina no córtex frontal e hipocampo de ratos machos e fêmeas.	33
Figura 5 - Concentração de serotonina no córtex frontal e hipocampo de ratos machos e fêmeas	34
Figura 6 - Duração de imobilidade no TNF de ratos machos e fêmeas.	35
Figura 7 - Fotomicrografia e painéis do atlas indicando a localização dos sítios de injeção.....	35
Figura 8 - Tempo de imobilidade no TNF de ratos machos e fêmeas.	37
Figura 9 - Fotomicrografia e painéis do atlas indicando a localização dos sítios de injeção.....	38
Figura 10 - Tempo de imobilidade de machos submetidos ao TNF.....	39
Figura 11 - Tempo de imobilidade de fêmeas submetidas ao TNF5.	40
Figura 12 - Fotomicrografia e painéis do atlas indicando a localização dos sítios de injeção.....	41
Figura 13 - Fotomicrografias de fluorescência mostrando o sítio de injeção e espalhamento do muscimol fluorescente.	42
Figura 14 - Desenho esquemático da hipótese da diferente localização dos receptores 5-HT1A no CPFM de machos e fêmeas	52
Figura 15 - Desenho esquemático da hipótese da atuação do WAY100635 via receptor dopaminérgico D4 em fêmeas.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HIAA: ácido 5-hidróxiindol acético

5-HT: 5-hidróxitriptamina

CPFm: córtex pré-frontal medial

IL: Córtex infralímbico

iMAO: Inibidores da enzima monoamina oxidase

IRN: Inibidores da recaptção de noradrenalina

ISRS: Inibidores seletivos da recaptção de serotonina

MAO: Enzima monoamina oxidase

PL: Córtex prélímbico

SERT: Transportador de serotonina

TC: Antidepressivos tricíclicos

TNF: Teste do nado forçado

TNF-r: Teste do nado forçado repetido

TPH: Triptofano hidroxilase

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	28
1.1.	Antidepressivos E TESTES PREDITIVOS	28
1.2.	Sistema serotoninérgico encefálico e inibição cortical decorrente do tratamento crônico com ISRS.	17
3.	Objetivos	25
3.1.	Geral	25
3.2.	Específicos.....	25
3.	Estratégia de ação e desenho experimental	25
4.	Materiais e métodos	27
4.1.	Animais.....	27
4.2.	Fármacos e vias de administração	27
4.3.	Teste do Nado Forçado.....	28
4.4.	Ensaio de captação	28
4.5.	Cromatografia líquida de alta eficácia com detecção eletroquímica .	29
4.6.	Perfusão	30
4.7.	Histologia	30
4.8.	Cirurgia estereotáxica para implantação de cânula guia.....	31
4.10.	Análise estatística	32
5.	Resultados.....	32
5.1.	Captação de 5-HT <i>in vitro</i>.....	32
5.2.	Inibição da captação de 5-HT <i>in vitro</i>.....	33
5.3.	Inibição GABAérgica do córtex infralímbico.....	34
5.3.1.	Comportamento.....	34
5.3.2.	Posicionamento de cânula-guia.....	35
5.4.	Inibição serotoninérgica do córtex infralímbico.....	36
5.4.1.	Comportamento.....	36
5.4.2.	Posicionamento de cânula-guia.....	37
5.5.	Curva concentração resposta da inibição serotoninérgica do córtex infralímbico.....	37
5.5.1.	Comportamento.....	37

5.5.2.	Posicionamento de cânula-guia.....	40
5.5.5.	Espalhamento de infusão.....	40
6.	Discussão.....	41
7.	Limitações do estudo.....	49
8.	Conclusões.....	50
	REFERÊNCIAS.....	54
	APÊNDICE A	67
	ANEXO A	86

1. INTRODUÇÃO

1.1. ANTIDEPRESSIVOS E TESTES PREDITIVOS

Os primeiros antidepressivos foram desenvolvidos na década de 60 a partir de observações clínicas de seus efeitos em humanos. Nessa época, pacientes psicóticos eram tratados com clorpromazina, um fármaco neuroléptico de eficácia clínica comprovada. No mesmo período foi realizada uma modificação na molécula de clorpromazina, surgindo a imipramina, que foi desenvolvida com o objetivo de ser um antipsicótico mais efetivo (LÓPEZ-MUÑOZ e ALAMO, 2009). No entanto, quando a imipramina foi administrada em pacientes psicóticos não foram observadas melhorias neste quadro clínico. Já em pacientes psicóticos que apresentavam sintomas depressivos houve uma reversão desses sintomas (LÓPEZ-MUÑOZ e ALAMO, 2009). Foi observado que o mecanismo de ação da imipramina envolvia o aumento dos níveis de monoaminas no sistema nervoso central (SNC), postulando assim o possível envolvimento do sistema monoaminérgico nesta patologia (SCHILDKRAUT e KETY, 1967; NESTLER e HYMAN, 2010).

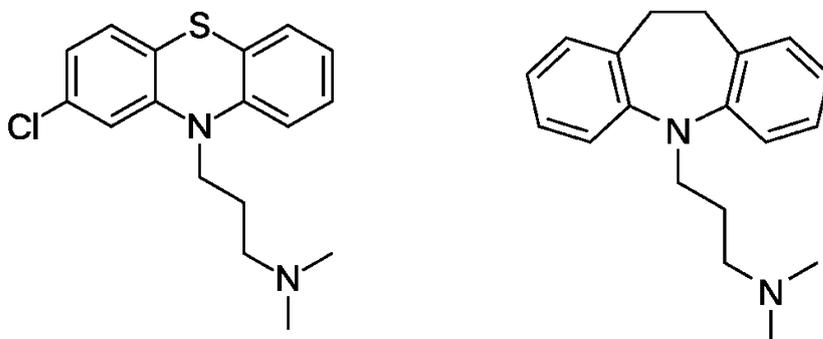


Figura 1 - Moléculas de Clorpromazina e Imipramina, respectivamente

Observações clínicas também mostraram que a depleção de monoaminas por uso crônico de altas doses de reserpina, um inibidor do transporte vesicular de monoaminas utilizado para o tratamento da hipertensão arterial, gerava sintomas depressivos nestes indivíduos (FREIS, 1954).

Com base nos mecanismos de ação destes fármacos se elaborou a hipótese monoaminérgica da depressão (SCHILDKRAUT e KETY, 1967). O transtorno estaria então caracterizado por redução dos níveis encefálicos de monoaminas e os fármacos antidepressivos atuariam aumentando estes níveis e revertendo o

transtorno (SCHILDKRAUT e KETY, 1967). Assim, os fármacos antidepressivos típicos utilizados na clínica agem sobre o sistema monoaminérgico, sendo classificados como: 1) inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ISRS), 2) de noradrenalina (IRN), 3) inibidores seletivos da recaptção de serotonina e noradrenalina (ISRSN), 4) antidepressivos tricíclicos (inibem a recaptção de serotonina e noradrenalina - TC) e 5) inibidores da enzima monoamina-oxidase (iMAO) (SHELTON, 2003). Os ISRS costumam ser os fármacos de primeira escolha para início de tratamento devido à sua baixa toxicidade e alta tolerabilidade (RUSH *et al.*, 2006).

A identificação dos mecanismos de ação de fármacos com potencial atividade antidepressiva bem como o estudo das bases neurobiológicas da depressão, envolve manipulações neuroquímicas do tecido nervoso tornando imprescindível o uso dos modelos e testes em animais, uma vez que por razões éticas e técnicas torna-se inviável o estudo em humanos. Os testes em animais na área da psicofarmacologia consistem em testes comportamentais que avaliam diferentes aspectos do comportamento do animal experimental que podem ser modificados por diferentes tipos de manipulações. Um exemplo é o teste do nado forçado (TNF).

O TNF foi criado em 1977 por Porsolt, e foi desenvolvido como teste preditivo para a atividade de antidepressivos (PORSOLT *et al.*, 1977; PORSOLT *et al.*, 1978). Em ratos, este teste consiste em um pré-teste de 15 minutos, considerado como um indutor do comportamento de imobilidade, seguido de um teste de 5 minutos 24 horas após o pré-teste. Este protocolo preconiza que o tratamento com antidepressivos tricíclicos reduz o tempo de imobilidade destes animais no teste (PORSOLT *et al.*, 1977; PORSOLT *et al.*, 1978). No entanto, por este protocolo original não detectar o efeito dos ISRS foram feitas modificações como o aumento da coluna de água e a avaliação também dos comportamentos ativos (nado e escalada), além do comportamento de imobilidade (DETKE e LUCKI, 1995; DETKE *et al.*, 1997). Nesta modificação foi possível detectar o efeito redutor de imobilidade dos ISRS. Sendo assim é esperado que qualquer substância com potencial atividade antidepressiva reduza o comportamento de imobilidade no TNF.

No entanto, tanto a versão original quanto a modificada do TNF permitiam detectar somente os efeitos agudos das drogas antidepressivas, além de necessitarem de altas doses dos fármacos para detecção do efeito esperado. Por

esta razão mais uma modificação deste teste foi proposta (MEZADRI *et al.*, 2011), o teste do nado forçado repetido (TNF-r).

Neste protocolo o animal é exposto às duas primeiras sessões (pré-teste e teste) da mesma maneira que nos protocolos anteriores, porém a sessão teste de 5 minutos é repetida no 7° (reteste 1) e no 14° (reteste 2) dias após o pré-teste. O tratamento farmacológico é iniciado 1h antes do teste e segue diariamente até o último dia experimental. Nesta modificação é possível avaliar os efeitos agudos e crônicos do tratamento em um mesmo grupo de animais.

No TNF-r foi observado que a imobilidade dos ratos tende a aumentar ao longo das repetições (MEZADRI *et al.*, 2011; POSSAMAI *et al.*, 2015), enquanto que o tratamento com antidepressivos impede este aumento (POSSAMAI *et al.*, 2015). A dose de 2,5 mg/Kg é a dose efetiva do ISRS fluoxetina no TNF-r padronizada em nosso laboratório para ratos machos e publicada anteriormente (POSSAMAI *et al.*, 2015; DOMINGUES *et al.*, 2019).

1.2. SISTEMA SEROTONINÉRGICO ENCEFÁLICO E INIBIÇÃO CORTICAL DECORRENTE DO TRATAMENTO CRÔNICO COM ISRS.

A serotonina (5-HT) é um neurotransmissor produto da conversão do aminoácido triptofano após uma cascata de síntese que se inicia pela enzima triptofano hidroxilase (TPH) nos terminais axonais dos neurônios denominados serotonérgicos ou serotoninérgicos (BOGDANSKI *et al.*, 1957; UDENFRIEND, 1964). No encéfalo, os corpos celulares dos neurônios serotonérgicos estão presentes principalmente nos núcleos da rafe (dorsal e mediano). Estes neurônios mandam projeções para várias regiões do encéfalo, entre elas o córtex frontal e o hipocampo (AZMITIA e SEGAL, 1978). Apesar de ambos os núcleos inervarem as regiões citadas, essa inervação é um pouco distinta, sendo o hipocampo inervado pelo núcleo mediano da rafe e o córtex frontal inervado pelo núcleo dorsal (AZMITIA e SEGAL, 1978). Nas áreas de projeção dos núcleos da rafe a 5-HT pronta é armazenada em vesículas no terminal axonal e fica disponível para liberação por exocitose na fenda sináptica (UDENFRIEND, 1964). Uma vez na fenda sináptica a 5-HT pode se ligar a receptores pré e pós-sinápticos, desencadeando efeitos sobre os próprios neurônios serotonérgicos ou outros neurônios que expressam receptores de 5-HT, ou pode ser

recaptada de volta para o interior do neurônio pelo transportador de serotonina (SERT) (KOEHLER *et al.*, 2016).

Os receptores de 5-HT estão classificados em subtipos de 1 a 7. Com exceção do receptor 5-HT₃, um canal iônico controlado por ligante, todos os outros subtipos são receptores acoplados à proteína G. Dentro desta grande variedade de receptores, destaca-se neste trabalho o receptor 5-HT_{1A}, acoplado à proteína G inibitória. Os receptores 5-HT_{1A} estão localizados nas membranas pré e pós-sinápticas da sinapse serotoninérgica e regulam a liberação de 5-HT pelos neurônios serotoninérgicos (autorreceptores) ou a função de seus neurônios pós-sinápticos (heterorreceptores) (ANTYPA *et al.*, 2013; REYNOLDS *et al.*, 2014).

A interação de 5-HT com os autorreceptores 5-HT_{1A} reduz a liberação de 5-HT pela pré-sinapse dos neurônios serotoninérgicos (CZACHURA e RASMUSSEN, 2000). Os neurônios das áreas de projeção, como o córtex ou hipocampo, são inibidos pela interação de 5-HT com os heterorreceptores 5-HT_{1A} (ADRIEN *et al.*, 1989). No córtex de ratos, por exemplo, os receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, e 5-HT_{2C} estão altamente expressos (PAZOS *et al.*, 1985; PAZOS e PALACIOS, 1985; POMPEIANO *et al.*, 1992; 1994), predominantemente em neurônios piramidais e em menor quantidade (20 a 30%) nos interneurônios GABAérgicos (SANTANA *et al.*, 2004). A 5-HT recaptada da fenda sináptica via SERT retorna ao interior do neurônio serotoninérgico e é metabolizada pela enzima MAO em ácido 5-hidróxiindol acético (5-HIAA), ou retorna às vesículas (CHASE e MURPHY, 1973; HERVÁS e ARTIGAS, 1998).

Os ISRS são inibidores seletivos da proteína transportadora de serotonina, o SERT (FULLER *et al.*, 1974) impedindo assim que a 5-HT seja recaptada e degradada no citoplasma do terminal neuronal pela MAO, aumentando sua disponibilidade na fenda sináptica. Assim, os efeitos terapêuticos dos ISRS são atribuídos ao aumento da quantidade de 5-HT no meio extracelular, contudo o tratamento agudo com ISRS já produz um aumento relevante de 5-HT extracelular tanto nos núcleos da rafe quanto no córtex frontal (CELADA e ARTIGAS, 1993) sem, no entanto, produzir os efeitos clínicos que necessitam de tratamento crônico (ANDREWS *et al.*, 2015). Uma das primeiras evidências para explicar o efeito tardio dos antidepressivos foi obtida por CELADA e ARTIGAS (1993). Estes autores relataram que o aumento de 5-HT extracelular após o tratamento agudo com ISRS inibia a liberação de mais neurotransmissor por ativação de autoreceptores

inibitórios pré-sinápticos 5-HT_{1A}. Assim, ao serem ativados pelo aumento inicial de 5-HT extracelular, a ativação dos receptores 5-HT_{1A} inibe a liberação de mais 5-HT, impedindo que o aumento seja expressivo o suficiente para exercer seus efeitos.

O tratamento crônico com antidepressivos promove a dessensibilização e internalização dos autorreceptores inibitórios pré-sinápticos 5-HT_{1A}. (LE POUL *et al.*, 1995; HERVÁS e ARTIGAS, 1998; LE POUL *et al.*, 2000; ARTIGAS *et al.*, 2006; DESCARRIES e RIAD, 2012; RIAD *et al.*, 2017), cessando a inibição da liberação do neurotransmissor. A inibição da liberação causa então, aumento expressivo de 5-HT extracelular, proporcionando assim o aparecimento de seus efeitos terapêuticos/comportamentais (HERVÁS e ARTIGAS, 1998; ARTIGAS *et al.*, 2006; HONIG *et al.*, 2009; GAYNES *et al.*, 2012; SIESSER *et al.*, 2012). É interessante notar que essa internalização não parece ocorrer com os heterorreceptores 5-HT_{1A} (MOCHIZUKI *et al.*, 2002; BOUAZIZ *et al.*, 2014; RIAD *et al.*, 2017).

Além da dessensitização dos autorreceptores 5-HT_{1A}, a inibição da atividade do SERT também pode ser relevante para o efeito do tratamento crônico com antidepressivos. De fato, o tratamento crônico com fluoxetina produz redução da densidade de SERT em diversas áreas corticais e do sistema límbico de ratos (KOVAČEVIĆ *et al.*, 2010). Também ocorre a internalização de SERT nos corpos celulares do núcleo dorsal da rafe (DESCARRIES e RIAD, 2012) acompanhado de um aumento da atividade desses neurônios serotoninérgicos dos núcleos da rafe (indicada pelo aumento da razão 5-HIAA/5-HT) (SHANNON *et al.*, 1986).

A lesão dos neurônios serotoninérgicos presentes nos núcleos da rafe resulta em uma diminuição de 70% da 5-HT nas áreas de projeção, como o córtex (SOUBRIE *et al.*, 1986). A ativação dos receptores 5-HT_{1A} corticais inibe a atividade dos neurônios piramidais das camadas II e III (KRNJEVIĆ e PHILLIS, 1963; LEGGE *et al.*, 1966; ROBERTS e STRAUGHAN, 1967; SCHILDKRAUT e KETY, 1967; JOHNSON *et al.*, 1969; JORDAN *et al.*, 1972; SHARMA, 1977; SZABADI *et al.*, 1977; DESCARRIES e JASPER, 1979; BRADSHAW *et al.*, 1983; LAKOSKI e AGHAJANIAN, 1985). Assim, a inibição da atividade cortical pela 5-HT pode ser um mecanismo que contribui para os efeitos comportamentais do tratamento com os ISRS.

Em relação ao comportamento, as lesões de neurônios serotoninérgicos do núcleo mediano da rafe produzem um efeito ansiogênico que é atenuado pelo tratamento com fluoxetina (PEREIRA *et al.*, 2019). A depleção de 5-HT nos núcleos da rafe

induzido pela injeção de 5,7-dihidroxitriptamina aboliu o efeito de redução de imobilidade causado pelo tratamento com o agonista 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT no teste de nado forçado (TNF) (CERVO e SAMANIN, 1991). Já a injeção de 8-OH-DPAT intracórtex infralímbico (IL) e pré-límbico (PL), sub-regiões do córtex pré-frontal medial (CPFm), também causaram redução de imobilidade no TNF (SARTIM *et al.*, 2016) assim como a injeção de muscimol, um agonista GABA_A (SLATTERY *et al.*, 2011). Essas evidências parecem indicar que a ativação dos núcleos da rafe resultaria em uma transmissão inibitória do CPFm (SHANNON *et al.*, 1986; PUIG *et al.*, 2004; YIN *et al.*, 2017).

A inibição cortical seria necessária para a mudança comportamental observada em testes como o TNF em ratos tratados com antidepressivos (SLATTERY *et al.*, 2011). Assim, seria esperada uma mudança de estratégia passiva (animal controle) para uma estratégia ativa no animal que teve seu IL inibido ou recebeu tratamento crônico com antidepressivos. É importante ressaltar que propostas recentes afirmam que o comportamento de imobilidade pode ser considerado como uma resposta adaptativa e que reflete uma mudança de estratégia comportamental (MOLENDIJK e DE KLOET, 2015). Desta maneira, tanto o tratamento com antidepressivos como a inibição do CPFm favoreceriam estratégias ativas em detrimento das passivas. O CPFm é uma região que está bastante envolvida com mudança de estratégia ou flexibilidade comportamental (RAGOZZINO *et al.*, 1999; DELATOUR e GISQUET-VERRIER, 2000). Portanto, seria interessante estudar qual seria o papel do CPFm no comportamento dos animais submetidos ao TNF, teste que é amplamente usado para o estudo de antidepressivos.

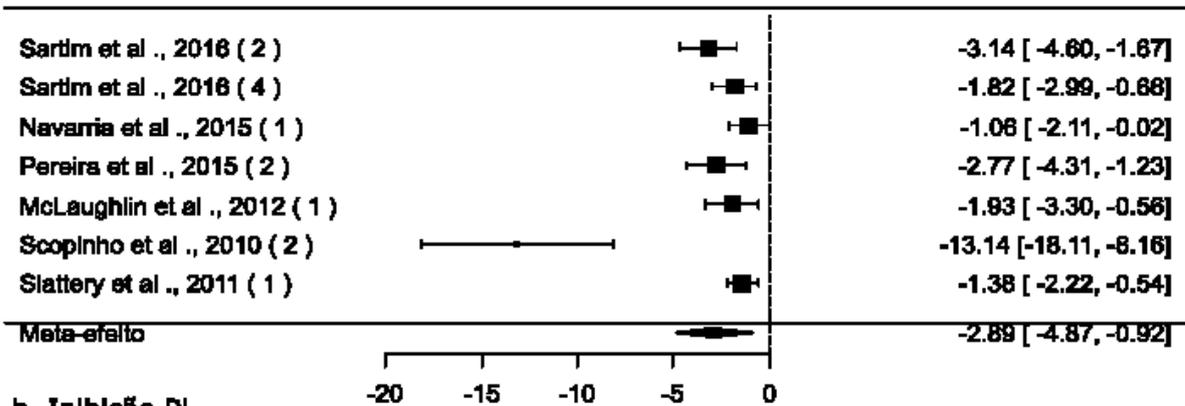
O CPFm pode ser subdividido em 3 regiões de acordo com suas características citoarquitetônicas: Cingulado anterior (Cg), IL e PL (KRETTEK e PRICE, 1977; VAN EDEN e UYLINGS, 1985; HEIDBREDER e GROENEWEGEN, 2003). Essas subdivisões também têm diferentes características funcionais. Lesões no Cg aumentam as respostas de medo condicionado (MORGAN e LEDOUX, 1995). Já lesões na parte ventral dos córtices PL ou IL aumentam a resistência à extinção no medo condicionado (MORGAN *et al.*, 1993) e também aumentam comportamentos relacionados à ansiedade (HEIDBREDER *et al.*, 1996). A inativação do PL, mas não do IL, por tetrodotoxina bloqueou o restabelecimento da procura por cocaína induzida por estresse (CAPRILES *et al.*, 2003). Em animais submetidos ao

paradigma de esquiva passiva mostrou-se que, durante a sessão de treinamento, enquanto as lesões eletrolíticas no PL aumentavam a latência para esquivar do choque, as lesões no IL não produziam efeito comportamental (JINKS e MCGREGOR, 1997). Já durante a sessão teste, essas mesmas lesões não geraram efeito comportamental quando aplicadas do PL, porém diminuíram a latência para a esquiva quando aplicadas no IL (JINKS e MCGREGOR, 1997).

Em paradigmas de desamparo aprendido observa-se que os animais podem apresentar diferentes tipos de estratégias comportamentais, podendo ser ativas ou passivas. Por exemplo no TNF, que em condições controle os ratos tendem a permanecer mais tempo imóveis (estratégia passiva) do que em movimento (e.g. nado, escalada, estratégia ativa). Os dados apresentados no parágrafo anterior sugerem que a mudança do nado para a imobilidade e vice-versa, no TNF, pode estar sob controle do CPFm. Conforme proposto por Slattery e cols (2011) o tratamento com antidepressivos no TNF parece inibir o CPFm de forma a promover mudanças de estratégia quando comparados com animais que não receberam tratamento com antidepressivos. Todavia, a relação de causa-efeito entre a inibição da atividade do CPFm e a estratégia comportamental observada no TNF necessita de maior investigação.

Desta maneira, realizamos uma busca sistemática da literatura na base de dados PubMed com o objetivo de relacionar manipulações do CPFm com o comportamento de ratos no TNF. Esta busca resultou em 64 artigos (para o protocolo completo de revisão ver Apêndice I, ou <https://osf.io/wfsv6/>), dos quais 7 estudos realizaram intervenções de inibição do IL e 11 do PL (para resultados completos desta revisão incluindo outras manipulações do CPFm e outras sub-regiões ver Apêndice A, ou <https://osf.io/wfsv6/>). Os artigos foram divididos em subgrupos de acordo com as sub-regiões. Uma meta-análise dos dados extraídos desta revisão sistemática mostrou que a inibição, tanto do IL quanto do PL, reduz o tempo de imobilidade no TNF (Figura 2).

a. Inibição IL



b. Inibição PL

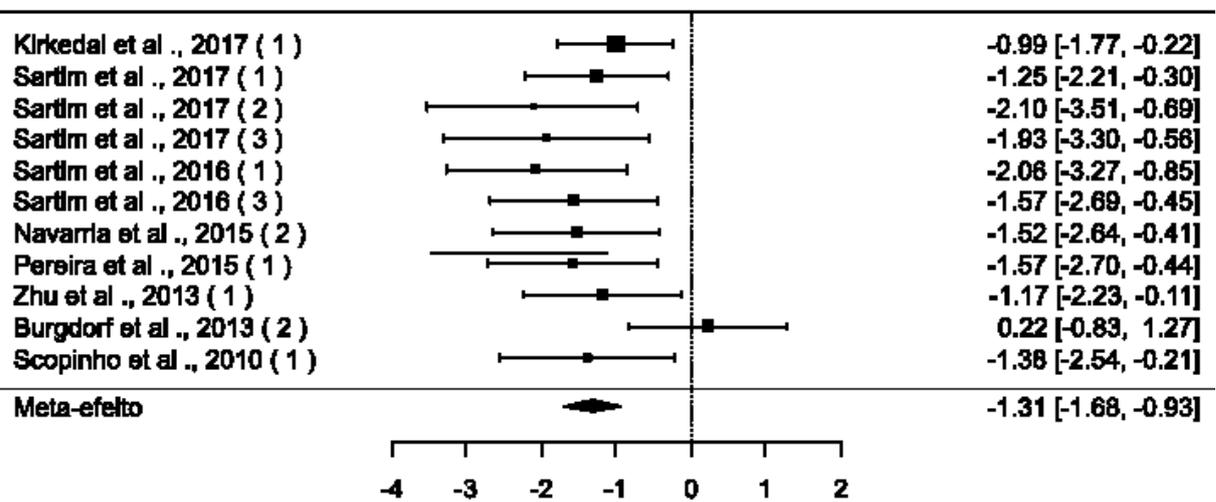


Figura 2 - Meta-análise dos tamanhos de efeito para as inibições do IL e PL. Efeito estimado IL (a) = -2,8942, $p = 0,0040$. Efeito estimado PL (b) = -1,3091, $p < 0,0001$). Os quadrados representam o tamanho de efeito, as barras horizontais representam o intervalo de confiança. A linha pontilhada vertical representa o zero, ou seja, a ausência de efeito. Estudos localizados à esquerda da linha pontilhada mostraram diminuição do tempo de imobilidade, enquanto estudos localizados à direita da linha pontilhada mostraram aumento do tempo de imobilidade. O losango representa o meta-efeito do grupo

Deste modo, os dados presentes na literatura e extraídos após uma busca exaustiva sobre o efeito da inibição da atividade dos córtices IL e PL sobre o comportamento de ratos no TNF parecem ir ao encontro da hipótese proposta por Slattery e cols. (2011). É interessante notar que todos os estudos encontrados na literatura, independente da manipulação ou sub-região do CPFm foram realizados

exclusivamente em machos, deixando em aberto se esse efeito também está presente em fêmeas ou se essas áreas do CPFm apresentam dimorfismo sexual quanto à circuitaria envolvida no controle do comportamento observado do TNF.

1.3. Diferenças sexuais e a resposta ao tratamento com fluoxetina.

O estudo das diferenças de resposta ao tratamento com fármacos entre os sexos foi reconhecido como fundamental e preconizado para os ensaios pré-clínicos pela principal agência de financiamento de pesquisa dos Estados Unidos da América em uma nota lançada em 2014 (COLLINS e TABAK, 2014). Em humanos se observou que, além de as mulheres serem mais diagnosticadas com depressão do que os homens (MARCUS *et al.*, 2005), os fármacos eficazes para o tratamento deste distúrbio também diferem. Já foi relatado que as mulheres apresentam uma melhor resposta a fármacos da classe dos ISRS, enquanto os homens apresentam uma melhor resposta a fármacos da classe dos tricíclicos (HAYKAL e AKISKAL, 1999; KORNSTEIN *et al.*, 2000; MARTÉNYI *et al.*, 2001; KHAN *et al.*, 2005; YOUNG *et al.*, 2009).

Em animais experimentais existem evidências apontando para existência de dimorfismo sexual. No que diz respeito à resposta comportamental de machos no TNF a literatura parece ser bem consistente, relatando os mesmos efeitos comportamentais de redução de imobilidade após o tratamento com fluoxetina (DETKE e LUCKI, 1995; DETKE *et al.*, 1997; CRYAN *et al.*, 2005; POSSAMAI *et al.*, 2015; DOMINGUES *et al.*, 2019). No entanto, para as fêmeas, o efeito relatado tende a ser altamente heterogêneo.

No que diz respeito ao tratamento com ISRS, o efeito comportamental de redução de imobilidade só é encontrado em ratas castradas (ESTRADA-CAMARENA *et al.*, 2008; SELL *et al.*, 2008; ESTRADA-CAMARENA *et al.*, 2011; MOLINA-HERNÁNDEZ e TÉLLEZ-ALCÁNTARA, 2011; RÉCAMIER-CARBALLO *et al.*, 2012), enquanto que nas ratas íntegras, as doses normalmente efetivas para os machos parecem não exercer o efeito esperado de redução do tempo de imobilidade (LIFSCHYTZ *et al.*, 2006; CRAFT *et al.*, 2010; FLORES-SERRANO *et al.*, 2013; MCNAMARA *et al.*, 2013; MITIC *et al.*, 2013; PIC-TAYLOR *et al.*, 2015; DOMINGUES *et al.*, 2019). Nestes trabalhos, doses de 2,5; 5; 10 e 20 mg/kg de

fluoxetina (LIFSCHYTZ *et al.*, 2006; MCNAMARA *et al.*, 2013; MITIC *et al.*, 2013; PIC-TAYLOR *et al.*, 2015; DOMINGUES *et al.*, 2019) assim como doses de 0,16; 1 e 10 mg/kg de reboxetina (CRAFT *et al.*, 2010; FLORES-SERRANO *et al.*, 2013) não modificaram o comportamento de fêmeas expostas ao TNF. Em relação a outros testes comportamentais, como por exemplo, o teste de desamparo aprendido, já foi observado que as fêmeas são mais resistentes a desenvolver o comportamento de imobilidade quando comparadas aos machos (DALLA, CHRISTINA *et al.*, 2008).

Em um trabalho publicado anteriormente pelo nosso laboratório, observamos que o comportamento dos ratos tratados com veículo não difere entre sexos (DOMINGUES *et al.*, 2019). No entanto, enquanto que nos ratos machos o tratamento por 13 dias com fluoxetina 2,5 mg/kg reduziu o comportamento de imobilidade, nas fêmeas o efeito não foi observado nessa mesma dose (DOMINGUES *et al.*, 2019) ou nas doses de 1 e 5 mg/kg. E, apesar de não significativo, o tempo de imobilidade das fêmeas tratadas com fluoxetina independente da dose, aumentou. O aumento do tempo de imobilidade em ratas tratadas cronicamente com fluoxetina já foi relatado previamente (LI *et al.*, 2013).

Devido a essa diferença sexual observada no comportamento de animais tratados com ISRS, é possível que exista um dimorfismo no sistema serotoninérgico. De fato, já foram demonstradas diferenças sexuais em algumas características da função serotoninérgica em ratos (KATO, 1960; BIEGON *et al.*, 1980; CARLSSON *et al.*, 1985; CARLSSON e CARLSSON, 1988). Por exemplo, na avaliação da ligação da 5-HT aos receptores por meio do ensaio de “binding”, as fêmeas apresentaram um índice menor de ligação do que os machos (BIEGON *et al.*, 1980), principalmente a nível pré-sináptico (CARLSSON *et al.*, 1985). Os efeitos da síndrome serotoninérgica foram mais pronunciados em fêmeas tratadas tanto com pargilina, um inibidor seletivo da enzima de degradação MAO_B, como com o aminoácido precursor da serotonina, o triptofano, quando comparadas aos machos. Por outro lado, não foram observadas diferenças sexuais nas respostas ao tratamento com 8-OH-DPAT como hipotermia (BIEGON *et al.*, 1980; DICKINSON e CURZON, 1986), ou síndrome serotoninérgica (CARLSSON *et al.*, 1985). Em resumo, o sistema serotoninérgico tem vários aspectos sexualmente dimórficos que podem contribuir para as diferenças observadas nos efeitos comportamentais da fluoxetina e, conseqüentemente no efeito observado sobre a atividade do CPFm.

2. Hipótese

Com base nos dados da literatura aqui apresentados, sugerimos que as diferenças comportamentais existentes na resposta ao tratamento com fármacos ISRS seriam consequência das diferenças sexuais do sistema serotoninérgico cortical ou de partes específicas da neurotransmissão como SERT ou receptores 5-HT_{1A}.

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

Avaliar como o dimorfismo sexual do sistema serotoninérgico cortical contribui para as respostas comportamentais sexualmente dimórficas de ratos no teste de nado forçado.

3.2. ESPECÍFICOS

1. Investigar o efeito do sexo sobre a captação de 5-HT pelo córtex frontal e hipocampo de ratos.
2. Investigar o efeito do sexo sobre a inibição da captação de 5-HT por Fluoxetina no córtex e hipocampo de ratos.
3. Avaliar o efeito do sexo sobre o comportamento de ratos submetidos ao TNF após inibição GABAérgica do córtex infralímbico.
4. Avaliar o efeito do sexo sobre o comportamento de ratos submetidos ao TNF após inibição serotoninérgica do córtex infralímbico.

4. Estratégia de ação e desenho experimental

Experimento 1 – Para atingir o objetivo específico 1 foi feito o ensaio de captação de 5-HT para determinar o grau de captação dos tecidos *in vitro*: animais naïve tiveram seus encéfalos retirados e incubados (como descrito da seção 4.4) com 5-

HT, para avaliarmos possíveis diferenças sexuais quanto à captação. A hipótese é que a captação seria diferente em machos e em fêmeas.

Experimento 2 – Para atingir o objetivo específico 2 foi feito o ensaio de captação de 5-HT para determinar o grau de inibição de captação da 5-HT dos tecidos *in vitro*: animais naïve tiveram seus encéfalos retirados e incubados (como descrito da seção 4.4) com FLX seguido de 5-HT, para avaliarmos possíveis diferenças sexuais quanto à inibição da captação. A hipótese é que a inibição da captação não ocorreria nas fêmeas.

Experimento 3 – Para atingir o objetivo específico 3 foi feito o experimento de inativação cortical para determinar sua contribuição para o efeito comportamental no TNF: Os animais receberam infusão bilateral por 1 minuto do agonista GABA_A muscimol ou veículo antes da tarefa comportamental via cânula guia bilateral com alvo no córtex infra límbico. A hipótese é que a inibição cortical por muscimol provocaria efeito comportamental semelhante ao encontrado por antidepressivos em ratos machos (SLATTERY, NEUMANN, CRYAN, 2011) assim, ao inativarmos o córtex por mecanismos não serotoninérgicos, esperávamos que o efeito comportamental nas fêmeas fosse semelhante ao do macho, mostrando que a ausência de efeito encontrada na fêmea se deve a uma não-inativação cortical.

Experimento 4 – Para atingir o objetivo específico 4 foi feito o experimento de atividade do receptor 5-HT_{1A} do córtex infralímbico de ratos: Os animais receberam injeções intra córtex infralímbico de agonista 5-HT_{1A} (8-OH-DPAT, 10nmol), em outro grupo de animais foi infundido o antagonista 5-HT_{1A} (WAY 100635 30nmol) e em um terceiro grupo foi administrado o WAY100635 seguido de 8-OH-DPAT para avaliar se o antagonista seria capaz de reverter o efeito causado pelo agonista. Nossa hipótese seria de que o 8-OH-DPAT diminuísse o comportamento de imobilidade dos machos, sem alterar o das fêmeas.

Experimento 5 – Para atingir o objetivo específico 4 foi feito o experimento de curva concentração-resposta de fármacos ligantes do receptor 5-HT_{1A}: Os animais receberam infusão intra córtex IL de veículo (PBS0,01M), Muscimol fluorescente

(200pmoles), 8-OH-DPAT (nas concentrações de 3, 10 ou 30nmol) ou WAY100635 (nas concentrações de 10, 30 ou 90nmol).

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. ANIMAIS

Ratos Wistar machos e fêmeas, provenientes do Biotério Central desta Universidade, chegaram ao biotério do laboratório aos 21 dias de idade, e foram acondicionados em grupo de 2 - 3 animais por caixa (dimensões: 17 x 32 x 39cm), com água e ração (BioBase, Biotec) *ad libitum*, em ciclo claro/escuro invertido 12/12h (luzes acesas às 19hrs), com temperatura e umidade controladas. Os animais foram mantidos nestas condições de biotério até atingirem a idade experimental de 90dias. A maravalha das caixas era trocada 3x por semana (segundas, quartas e sextas) assim como a troca de água e reposição de ração. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo comitê de ética de uso de animais experimentais desta instituição (CEUA/UFSC – PP008080).

5.2. FÁRMACOS E VIAS DE ADMINISTRAÇÃO

Fluoxetina: Inibidor seletivo da recaptação de serotonina. Hidroclorato de Fluoxetina (Sigma-Aldrich) (FLX) foi administrada nos experimentos *in vitro* na concentração de 1 μ M diluída em água MilliQ.

Serotonina: 5-hidróxitriptamina na forma de Hidroclorato de 5-hidroxitriptamina (Sigma-Aldrich) foi utilizada nos experimentos *in vitro* na concentração de 1 μ M em 10 μ L dissolvida em água MilliQ.

Muscimol: Agonista GABA_A (Sigma-Aldrich) na concentração de 200 pmoles/hemisfério em infusão de 1 μ L/hemisfério por 1 minuto, diluído em solução de PBS 0,01M. Muscimol fluorescente (Thermo-Fischer) na mesma concentração.

8-OH-DPAT: Agonista de receptor 5-HT_{1A} 8-hidróxi-2 (di-n-propilamino) tetralina (Sigma-Aldrich) foi utilizado nos experimentos de inibição cortical nas concentrações de 3, 10 ou 30 nmol por hemisfério em infusão de 1 µL/hemisfério por 1 minuto, diluído em solução de PBS 0,01M.

WAY100635: Antagonista de receptor 5-HT_{1A} (TOCRIS) foi utilizado nos experimentos de inibição cortical nas concentrações de 10, 30 e 90 nmol por hemisfério em infusão de 1 uL/hemisfério por 1 minuto, diluído em solução de PBS 0,01M

5.3. TESTE DO NADO FORÇADO

Para os experimentos que envolviam teste comportamental foi utilizado o TNF modificado segundo Detke e Lucki (1995): No dia 1 do experimento comportamental os animais foram colocados em uma cuba com altura suficiente de coluna de água para que o animal não tocasse o fundo com as patas nem com a cauda (50cm de altura da coluna de água), com água a 24°C durante 15 minutos (Pré-teste). No dia 2 (24 horas após o pré-teste) os animais foram submetidos ao mesmo aparato, em uma sessão de 5 minutos, denominada de teste. As infusões foram realizadas como descrito da seção 4.10. Ao final da sessão de cada animal, a água da cuba foi trocada e a cuba higienizada antes de iniciar o próximo animal.

5.4. ENSAIO DE CAPTAÇÃO

Método adaptado de Linder *et al.* (2011). Os animais foram anestesiados com Uretana 35% na dose de 1,75 mg/kg e sacrificados por decapitação. Os encéfalos foram retirados para dissecação das estruturas necessárias. Foram dissecados córtex frontal e hipocampo. Após dissecação das estruturas elas foram colocadas em solução nutritiva (PSS: contendo NaCl 131,1 mM; KCl 4,7 mM; KH₂PO₄ 1,18 mM; MgSO₄.7H₂O 1,17 mM; NaHCO₃ 14,9 mM; Dextrose 5,5 mM; CaCl₂.2H₂O 1,6 mM e EDTA 0,03 mM (LINDER *et al.*, 2011)) a 37°C por 30 minutos. Para avaliar a

captação, após este período, os tecidos foram incubados com 5-HT (na concentração de 1 μM) ou veículo (água MilliQ) por 15 minutos.

Para avaliar a inibição da captação, os tecidos foram incubados com FLX (na concentração de 1 μM) por 30 minutos, e posteriormente incubados com 5-HT (na concentração de 1 μM) por 15 minutos. Logo após os ensaios, os tecidos foram lavados 3 vezes com solução nutritiva e congelados em microtubos contendo solução de ácido perclórico e metabissulfito a -80°C até momento da análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

5.5. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICÁCIA COM DETECÇÃO ELETROQUÍMICA

As amostras obtidas conforme descrito no item 4.5 foram descongeladas, maceradas com pistilo e colocadas em banho de ultrassom com gelo por 10 minutos, seguido de centrifugação a 14500 rpm a 4°C por 20 minutos. O sobrenadante foi retirado para outro microtubo e reservado para análise.

No momento da análise, 20 μL deste sobrenadante foi transferido do microtubo para um insert padrão do equipamento. Juntamente com a preparação das amostras foi preparada uma curva-padrão com concentrações crescentes de 5-HT e 5-HIAA (de 10 a 1000 ng/mL). Tanto as amostras quanto a curva padrão foram “contaminadas” com o padrão interno do equipamento, ácido diidróxibenzóico (DHBA) para controle da sensibilidade do eletrodo ao longo da análise.

A análise foi realizada utilizando o módulo de separação Waters e2695 composto com uma bomba quaternária, um degaseificador acoplado a um detector eletroquímico amperométrico Waters 2465. Os cromatogramas foram adquiridos e processados utilizando o software Empower®2 (Waters, Milford, MA, USA).

A fase móvel foi preparada com 90 mM de NaHPO_4 , 50 mM de ácido cítrico, 50 μM de EDTA e 1,7 mM de heptanossulfonato de sódio:acetoneitrila na razão de 90:10. O pH foi ajustado a 3.0 com NaOH concentrado. A fase móvel foi filtrada usando uma membrada de acetato de celulose na espessura de 0,4 μm (Merck Millipore, Billerica, MA, USA). Esta solução foi degaseificada sob vácuo em banho de ultrassom.

A fase móvel foi injetada no equipamento no fluxo de 0,3 mL/minuto por fase reversa utilizando uma coluna C18 (150 mm de comprimento x 2 mm de diâmetro interno compactada com partículas de 4 µM; Synergi Hydro RP, Phenomenex, Torrance, CA, USA). A coluna foi mantida a 35°C durante a análise.

As amostras e a curva padrão foram acondicionadas no carrossel do equipamento que era mantido numa câmara a 4°C. As amostras passaram pela coluna de separação (C18) e foram detectadas em um eletrodo eletroquímico de Ag/AgCl (ISAAC) operando em corrente contínua de 400 mV. A análise de cada amostra/ponto da curva padrão tinha uma duração de 20 minutos.

Os picos das amostras foram identificados via comparação dos tempos de retenção em relação com os padrões. As áreas dos picos foram integradas para quantificação das amostras via regressão linear dos dados da curva padrão. Os valores obtidos estão expressos em ng/mg de tecido.

5.6. PERFUSÃO

Os animais foram anestesiados com Uretana 35% na dose de 1,75 mg/Kg, e sacrificados por perfusão intracardíaca de 200 mL de solução heparinizada de sacarose 9,25% seguido de 200 mL de solução de paraformaldeído (PFA) 4%. Após perfundidos, os encéfalos foram retirados e armazenados em solução de PFA 4% por 24 horas; após este período os encéfalos foram transferidos para uma solução de Sacarose 30% em PBS 0,1M e armazenados a 4°C para posterior microtomia.

5.7. HISTOLOGIA

Para confirmação do posicionamento de cânula-guia, os encéfalos foram seccionados em vibrátomo (VIBRATOME®) em secções de 100 µm. As secções foram montadas em lâminas previamente gelatinizadas e coradas com Giemsa, desidratadas com bateria de álcool e Xilol, cobertas com meio de montagem DPX e lamínula e levadas ao microscópio óptico (Olympus BX 2) para análise do sítio de injeção.

Para observação do espalhamento da injeção, os encéfalos foram seccionados em micrótomo de congelamento em secções de 50 µm. As secções foram montadas

em lâminas previamente gelatinizadas, cobertas com meio de montagem Prolong® Gold (Invitrogen) e lamínula, e observadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX 41).

5.8. CIRURGIA ESTEREOTÁXICA PARA IMPLANTAÇÃO DE CÂNULA GUIA

Os animais foram anestesiados com uma mistura de Cetamina (80 mg/kg) e Xilazina (8 mg/kg) e adaptados ao aparelho estereotáxico para serem submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas bilaterais direcionadas ao córtex infralímbico (coordenadas AP +3 mm do bregma; ML \pm 0,6 mm; DV 4,5 mm).

As cânulas-guia foram fixadas utilizando acrílico dentário. Todas as infusões locais foram administradas com estas coordenadas. Um grupo (sham) também foi submetido ao procedimento cirúrgico, mas não receberam as infusões com o objetivo de descartar possíveis efeitos causados pela cirurgia *per se*.

5.9. INFUSÕES

Dez minutos antes da sessão teste do TNF, os animais foram retirados individualmente da caixa-moradia, imobilizados com um pano com a finalidade de receber infusão bilateral de Veículo (PBS), muscimol ou muscimol fluorescente (200 pmoles/uL/hemisfério), 8-OHDPAT (3, 10 ou 30 nmol/uL/hemisfério) ou WAY100635 (10, 30 e 90 nmol/uL/hemisfério) 10 minutos antes do teste.

Quinze minutos antes da sessão teste do TNF, os animais foram retirados individualmente da caixa-moradia, imobilizados com um pano com a finalidade de receber infusão bilateral de WAY100635 (30 nmol/uL/hemisfério) seguido, 5 minutos após de 8-OHDPAT (10 nmol/uL/hemisfério) e 10 minutos após a infusão o animal foi submetido à sessão teste.

As infusões foram realizadas com o auxílio de uma bomba de infusão Insight®, no volume de 1 μ L por hemisfério e um fluxo de 1 μ L por minuto. Após a infusão foi resguardado o tempo de 30s para evitar o refluxo da solução infundida no momento da retirada da agulha injetora.



Figura 3 - Foto da infusão bilateral

5.10. Análise estatística

Todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e ao teste de homogeneidade de variância de Levene. Os dados das concentrações de 5-HT não apresentaram distribuição normal então foram analisados utilizando o teste de Mann-Whitney. Os dados da função do SERT também não apresentaram distribuição normal, então foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis. Todos os dados comportamentais apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variância, sendo então submetidos a testes estatísticos paramétricos. Os dados comportamentais da inibição do IL por muscimol foram analisados por uma ANOVA de duas vias seguida de um post-hoc de Dunnett. Os dados das inibições serotoninérgicas foram analisados por ANOVA de uma via (cada sexo) seguida de post hoc de Tukey. Diferenças significativas foram consideradas quando o $p < 0,05$. Todos os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média (EPM).

6. Resultados

6.1. Captação de 5-HT *in vitro*

O conteúdo do neurotransmissor serotonina (5-HT) no córtex frontal de ratos machos e fêmeas mostrou-se similar em condições basais (Mann-Whitney: U ($N = 5$) = 8, $p = 0,4$). A incubação, também *in vitro* deste tecido com 1 μ M de 5-HT exógena aumentou a concentração de 5-HT, tanto em machos (Kruskal-Wallis ANOVA, H ($N = 20$, $df = 3$) = 2,2, $p = 0,5$) quanto em fêmeas (Kruskal-Wallis ANOVA, H ($N = 20$, $df = 3$) = 7,6, $p = 0,054$) quando comparados com veículo; no entanto, esta diferença não foi estatisticamente significativa (fig. 4).

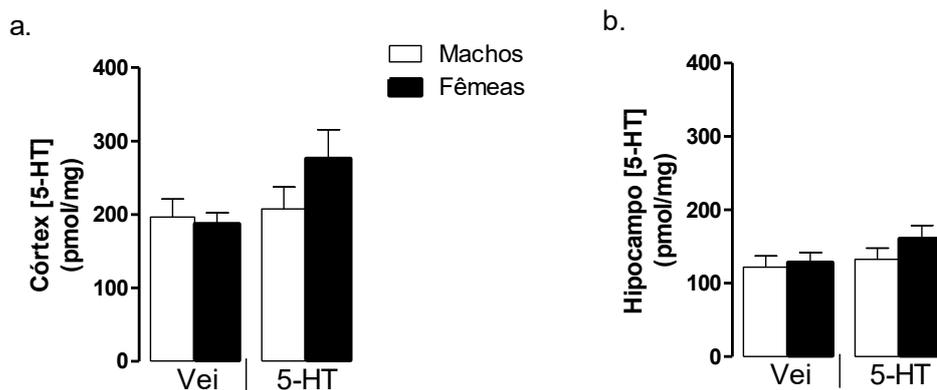


Figura 4 - Concentração de serotonina (pmol/mg de tecido) no córtex frontal (a) e hipocampo (b) de ratos machos (barras brancas) e fêmeas (barras pretas) incubados *in vitro* com veículo (PBS) ou 5-HT 1 μ M ($n = 5$ para todos os grupos). Dados expressos pela média \pm EPM.

6.2. Inibição da captação de 5-HT *in vitro*

A pré incubação *in vitro* com fluoxetina, na concentração de 0,1 μ M, por 30 minutos, seguido de uma incubação de veículo ou 5-HT exógena na concentração

de 1 uM, mostrou que após o tratamento com fluoxetina não há diferença do grupo que recebeu a incubação de 5-HT em relação ao grupo veículo tanto em machos (Kruskal-Wallis: $H(3, N = 20) = 2,187359$; $p = 0,5344$) e em fêmeas (Kruskal-Wallis: $H(3, N = 15) = 0,000000$ $p = 1,000$) (fig.5).

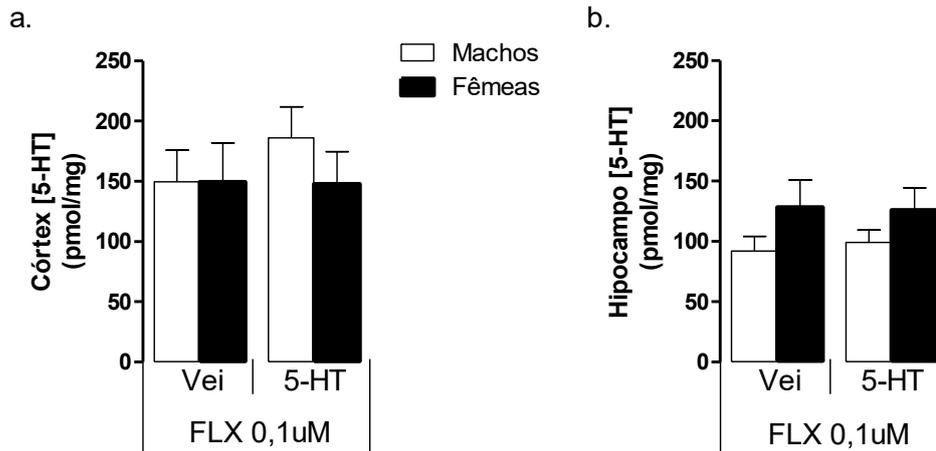


Figura 5 - Concentração de serotonina no córtex frontal (a) e hipocampo (b) de ratos machos (barras brancas) e fêmeas (barras pretas). Estruturas incubadas com FLX 0.1 uM seguido de veículo (PBS 0,1M) ou 5-HT 1 uM ($n = 5$ para todos os grupos). Dados expressos pela média \pm EPM.

6.3. Inibição GABAérgica do córtex infralímbico

6.3.1. Comportamento

A inibição do IL via $GABA_A$ após a infusão de muscimol observamos uma redução do tempo de imobilidade no TNF tanto em machos (Fig. 6a; $n = 10$, ANOVA de uma via: $F(3, 21) = 5,8437$, $p = 0,00458$; post-hoc de Dunnet: $p = 0,0056$), quanto em fêmeas (Fig. 6b; $n = 9$, ANOVA de uma via: $F(3, 25) = 8,9754$, $p = 0,0003$; post-hoc de Dunnet: $p = 0,0003$) quando comparados aos animais que receberam infusão de veículo.

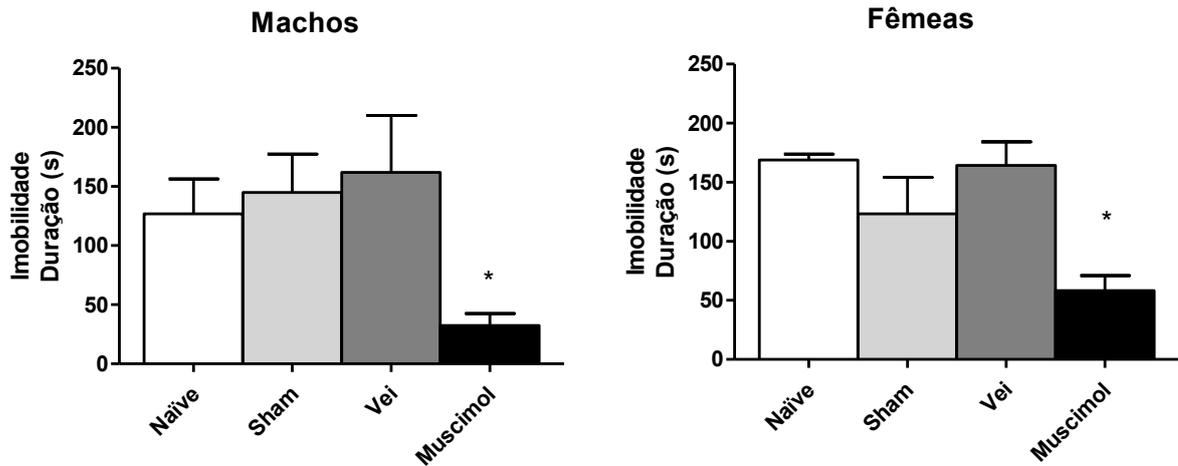


Figura 6 - Duração de imobilidade no TNF de ratos machos (a) e fêmeas (b). Barras brancas: animais naïve (machos $n = 5$, fêmeas $n = 6$). Barras cinza claro: animais sham (machos $n = 5$, fêmeas $n = 5$). Barras cinza escuro: animais que receberam infusão por 1min de 1 μ L por hemisfério de veículo (PBS; machos $n = 5$, fêmeas $n = 9$). Barras pretas: animais que receberam infusão por 1 min de 1 μ L por hemisfério de muscimol (200 pmoles; machos $n = 10$, fêmeas $n = 9$). ANOVA de uma via. Dados expressos como média \pm EPM. * $=p>0,05$ em relação ao grupo Vei.

6.3.2. Posicionamento de cânula guia

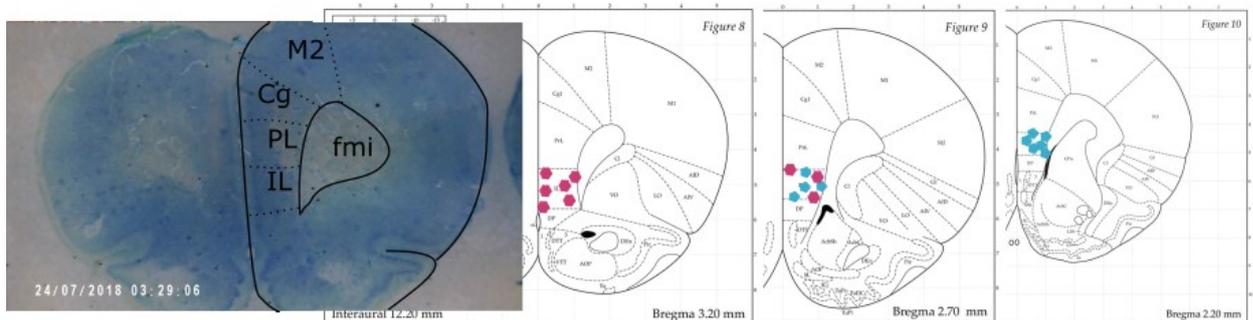


Figura 7 - Fotomicrografia e painéis do atlas indicando a localização dos sítios de injeção. Em rosa: sítio de injeção em fêmeas. Em azul: sítios de injeção em machos. Painéis adaptados de Paxinos e Watson (2006)

6.4. Inibição serotoninérgica do córtex infralímbico

6.4.1. Comportamento

Tanto a injeção de Muscimol ($n = 8$; ANOVA fatorial: $F(6, 87) = 11,871$, $p < 0,000001$; post-hoc de Dunnet: $p = 0,00001$), quanto a de 8-OH-DPAT ($n = 8$; ANOVA fatorial: $F(6, 87) = 11,871$, $p < 0,000001$; post-hoc de Dunnet: $p = 0,00001$) intra IL causaram uma diminuição significativa do tempo de imobilidade de ratos no TNF (fig. 8) quando comparados ao grupo veículo. A inibição do IL pelo Muscimol em fêmeas também gerou uma diminuição significativa de imobilidade no TNF quando comparadas ao grupo veículo ($n = 7$; ANOVA fatorial: $F(6, 87) = 11,871$, $p < 0,00001$; post-hoc de Dunnet: $p = 0,0027$), no entanto, a inibição via 5-HT_{1A} com 8-OH-DPAT não foi capaz de gerar o efeito de redução do tempo de imobilidade observado nos machos (fig. 8; $n = 10$; ANOVA fatorial: $F(6, 87) = 11,871$, $p < 0,00001$; post-hoc de Dunnet: $p = 0,053$).

A redução do tempo de imobilidade gerada pela injeção de 8-OH-DPAT no IL de machos foi revertida com uma pré-injeção, também intra IL, do antagonista de 5-HT_{1A} (WAY100637) (fig. 8; $n = 8$; ANOVA fatorial: $F(6, 87) = 11,871$, $p < 0,00001$; post-hoc de Dunnet: $p = 0,07$).

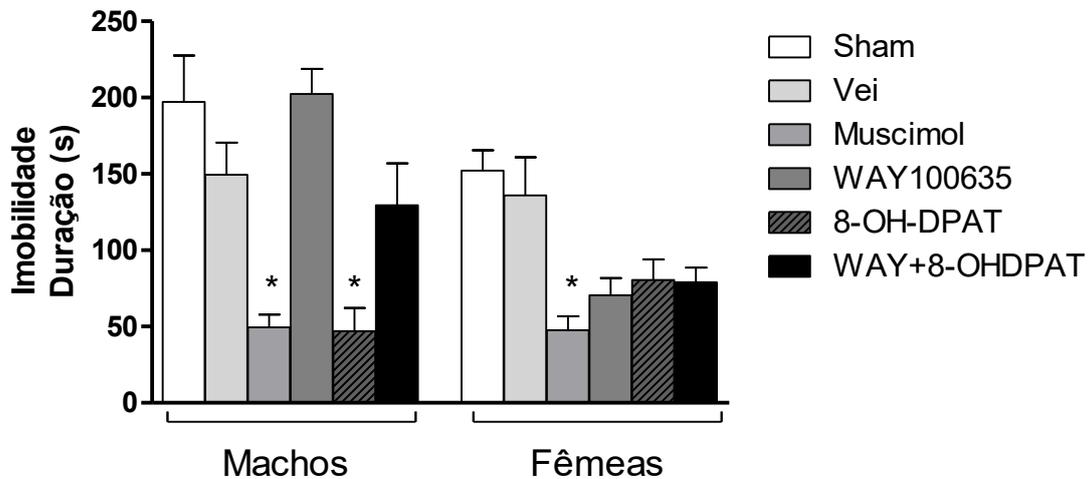


Figura 8 - Tempo de imobilidade no TNF de ratos machos e fêmeas. Barras brancas: animais sham (machos $n = 9$, fêmeas $n = 7$). Barras cinza claro: animais que receberam infusão por 1min de $1\mu\text{L}$ por hemisfério de veículo (PBS; machos $n = 6$, fêmeas $n = 7$). Barras cinza médio: animais que receberam infusão por 1 min de $1\mu\text{L}$ por hemisfério de muscimol (na dose de 200pmoles ; machos $n = 8$, fêmeas $n = 7$). Barras cinza escuro: animais que receberam infusão por 1 min de $1\mu\text{L}$ por hemisfério de WAY100635 (na dose de $30\text{ nmol}/\mu\text{L}$; machos $n = 8$, fêmeas $n = 7$). Barras brancas pontilhadas: animais que receberam infusão por 1 min de $1\mu\text{L}$ por hemisfério de 8-OH-DPAT (na dose de $10\text{ nmol}/\mu\text{L}$; machos $n = 8$, fêmeas $n = 10$). Barras pretas pontilhadas: animais que receberam infusão por 1 minuto de $1\mu\text{L}$ de WAY100635 (na dose de $30\text{ nmol}/\mu\text{L}$; machos $n = 8$, fêmeas $n = 8$) e, 5 min após, uma infusão por 1 min de $1\mu\text{L}$ por hemisfério de 8-OH-DPAT (na dose de $10\text{ nmol}/\mu\text{L}$). Dados expressos como média \pm EPM. ANOVA fatorial, * = $p < 0,05$ em relação ao grupo veil.

6.4.2. Posicionamento de cânula-guia

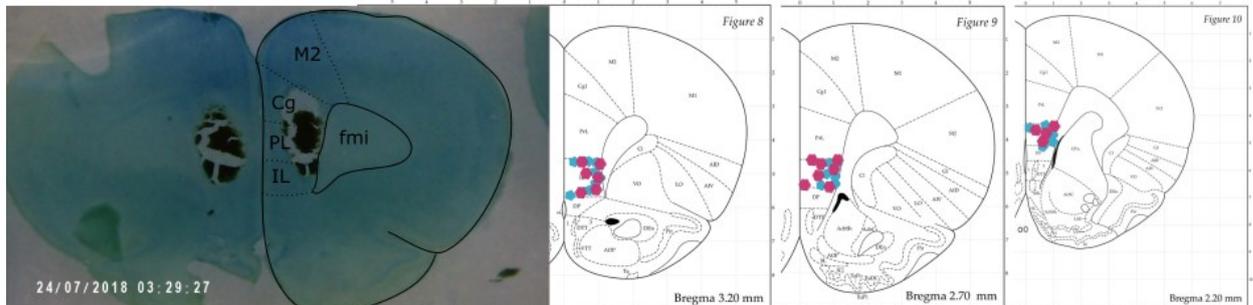


Figura 9 - Fotomicrografia e painéis do atlas indicando a localização dos sítios de injeção. Em rosa: sítio de injeção em fêmeas. Em azul: sítio de injeção em machos. Painéis adaptados de Paxinos e Watson (2006)

6.5. Curva concentração resposta de inibição serotoninérgica do córtex infralímbico

6.5.1. Comportamento

Para os machos, tanto a infusão de Muscimol quanto a infusão de 8-OH-DPAT na dose de 10 nmol foram capazes de reduzir o tempo de imobilidade no TNF quando comparados ao grupo veículo (ANOVA de uma via: $F(8, 33) = 4,0215$, $p = 0,00201$. Post-hoc Tukey: muscimol: $n = 3$, $p = 0,026$; 8-OH-DPAT10nmol: $n = 5$, $p = 0,0017$; fig. 10).

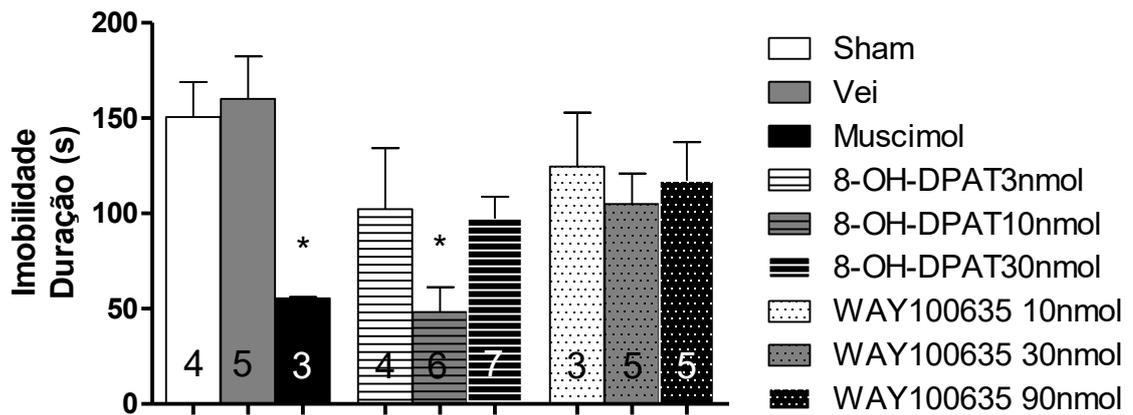


Figura 10 - Tempo de imobilidade de machos submetidos ao TNF. Barra branca: animais sham, n = 4. Barra cinza: Animais que receberam infusão de veículo (PBS 0,01M), n = 5. Barra preta: animais que receberam infusão de muscimol fluorescente (200 pmoles), n = 3. Barra branca listrada: animais que receberam infusão de 8-OH-DPAT (3 nmol), n = 4. Barra cinza listrada: animais que receberam infusão de 8-OH-DPAT (10 nmol), n = 6. Barra preta listrada: animais que receberam infusão de 8-OH-DPAT (30 nmol), n = 7. Barra branca pontilhada: animais que receberam infusão de WAY100635 (10 nmol), n = 3. Barra cinza pontilhada: animais que receberam infusão de WAY100635 (30 nmol), n = 5. Barra preta pontilhada: animais que receberam infusão de WAY100635 (90 nmol), n = 5. Anova de uma via com post-hoc de Tukey. Dados expressos como média \pm EPM. * = $p < 0,05$ em relação ao grupo vei.

Para as fêmeas, somente o muscimol foi capaz de reduzir significativamente o tempo de imobilidade quando comparadas ao grupo veículo (ANOVA de uma via: $F(8, 37) = 2,6821$, $p = 0,01968$. Post-hoc de Tukey: $p = 0,05$; $n = 3$; fig. 11).

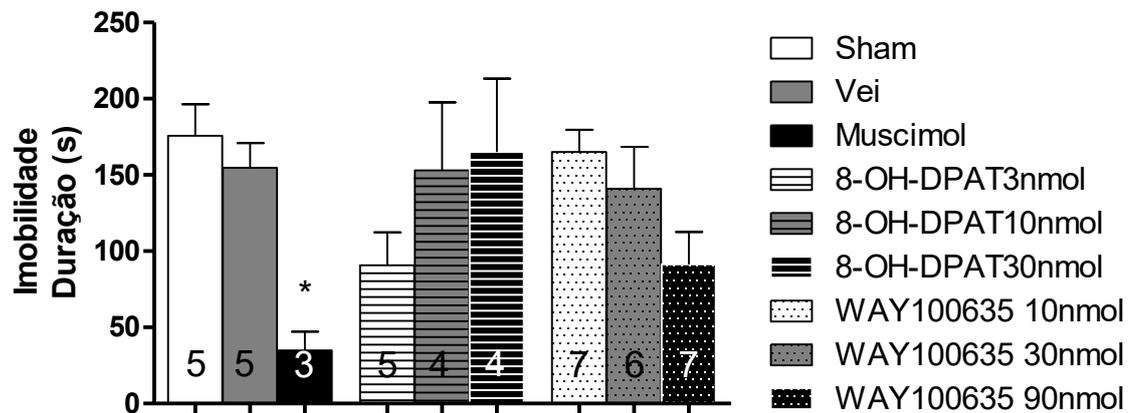


Figura 11 - Tempo de imobilidade de fêmeas submetidas ao TNF. Barra branca: animais sham, n = 5. Barra cinza: Animais que receberam infusão de veículo (PBS 0,01M), n = 5. Barra preta: animais que receberam infusão de muscimol fluorescente (200 pmoles), n = 3. Barra branca listrada: animais que receberam infusão de 8-OH-DPAT (3 nmol), n = 5. Barra cinza listrada: animais que receberam infusão de 8-OH-DPAT (10 nmol), n = 4. Barra preta listrada: animais que receberam infusão de 8-OH-DPAT (30 nmol), n = 4. Barra branca pontilhada: animais que receberam infusão de WAY100635 (10 nmol), n = 7. Barra cinza pontilhada: animais que receberam infusão de WAY100635 (30 nmol), n = 6. Barra preta pontilhada: animais que receberam infusão de WAY100635 (90nmol), n = 7. Anova de uma via com post-hoc de Tukey. Dados expressos como média \pm EPM. * = $p < 0,05$ em relação ao grupo vei.

6.5.2. Posicionamento de cânula-guia

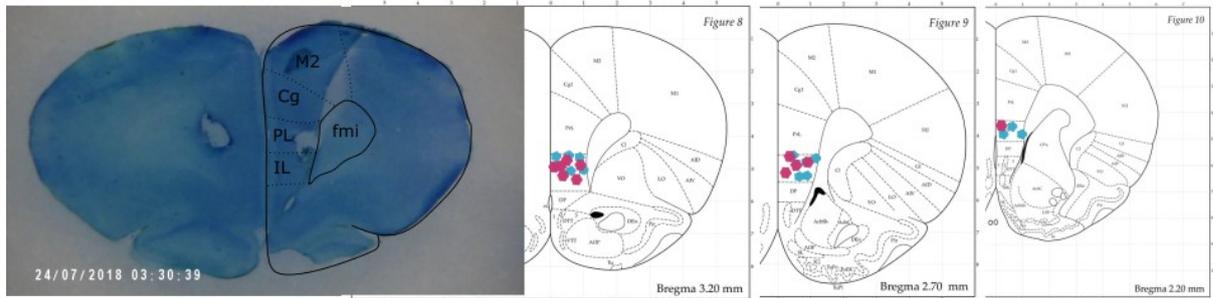


Figura 12 - Fotomicrografia e painéis do atlas indicando a localização dos sítios de injeção. Em rosa: sítio de injeção em fêmeas. Em azul: sítio de injeção em machos. Painéis adaptados de Paxinos e Watson (2006)

6.5.3. Espalhamento da infusão

De uma maneira geral, utilizando nossos protocolos de infusão e cirurgia estereotáxica a dispersão do fármaco ficou restrita ao córtex IL (Fig. 13, painel H). A figura abaixo (fig. 13) ilustra 1 caso representativo da posição do posicionamento da cânula-guia e da dispersão do fármaco. No total, 6 animais (3 machos e 3 fêmeas) foram infundidos com muscimol fluorescente a fim de determinar a dispersão do fármaco.

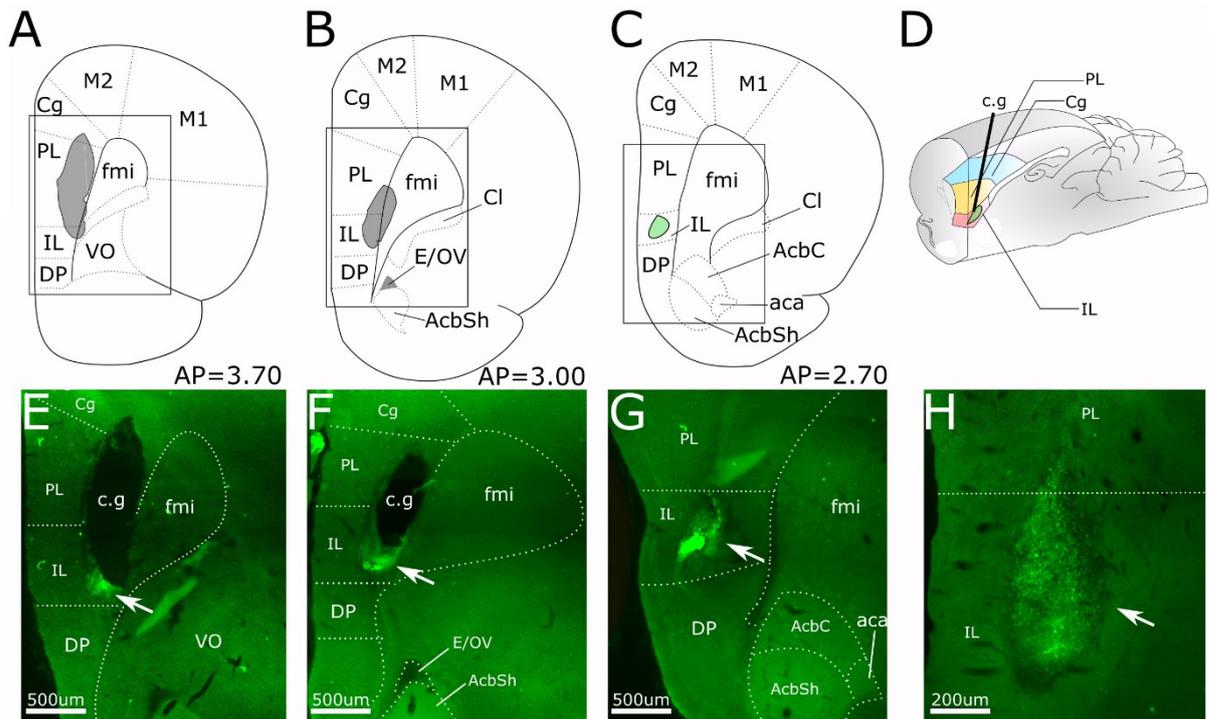


Figura 13 - Fotomicrografias de fluorescência (E – H) mostrando o sítio de injeção e espalhamento do muscimol fluorescente. A flecha branca indica a marcação da injeção. Painéis de A a C mostram o desenho esquemático correspondendo às fotomicrografias. Painel D mostra uma representação 3D do cérebro do rato com as 3 regiões que compreendem o CFPm, c.g indica o posicionamento da cânula-guia e a marcação em verde mostra a difusão da injeção. DP- córtex peduncular dorsal; IL- infralímbico; PL- pré-límbico; CG- cíngulato; fmi- fórceps menor do corpo caloso; M1- córtex motor primário; M2- córtex motor secundário; VO- córtex orbital ventral; Cl- claustro; E/OV- ventrículo olfatório; AcbSh- concha do núcleo accumbens; AcbC- núcleo accumbens; aca- porção anterior da comissura anterior.

7. Discussão

Os principais resultados deste trabalho indicam que há dimorfismo sexual na neurotransmissão serotoninérgica no CPFm de ratos. Este dimorfismo pode ser caracterizado por menor sensibilidade dos heterorreceptores 5-HT_{1A} ao neurotransmissor 5-HT no córtex IL das fêmeas. A menor sensibilidade dos heterorreceptores 5-HT_{1A} pode tornar o CPFm das fêmeas menos susceptível a inibição que dos ratos machos. Uma menor inibição do CPFm das fêmeas as

tornaria menos sensíveis aos efeitos dos tratamentos que inibem esta região encefálica. Consequentemente, a redução da imobilidade decorrente da inibição de sub-regiões do CPFm estaria prejudicada nos organismos com este tipo de hipossensibilidade, que em nosso experimento foram as ratas. Assim, parece plausível que a hipossensibilidade de receptores 5-HT_{1A} corticais seja responsável pela incapacidade de alguns tratamentos de reverter os sintomas do estresse inescapável em animais de laboratório ou da depressão em humanos. A seguir discute-se a contribuição de cada experimento para as conclusões do estudo.

No presente trabalho mostramos que a incubação *in vitro* do córtex frontal de ratos com 5-HT exógena aumentou a concentração de 5-HT nos tecidos igualmente em machos e em fêmeas, sugerindo que a função do SERT é semelhante em ambos os sexos. Visto que a pré-incubação dos tecidos com FLX 0,1 µM inibiu a captação da 5-HT exógena de forma semelhante em machos e fêmeas, inferiu-se que o sistema de recaptção e de inibição da recaptção não parece ser responsável pelas diferenças sexuais observadas no TNF após o tratamento sistêmico com fluoxetina *in vivo* (DOMINGUES *et al.*, 2019).

Em ratos, diferenças sexuais na resposta ao tratamento com fluoxetina já foram observadas *in vivo*, sendo o efeito comportamental canônico de diminuição da imobilidade após tratamento com antidepressivos só foi observado em machos, enquanto que o tratamento com antidepressivos não foi capaz de exercer um efeito estatisticamente significativo sobre o comportamento das fêmeas íntegras (LIFSCHYTZ *et al.*, 2006; FERNÁNDEZ-GUASTI *et al.*, 2017; DOMINGUES *et al.*, 2019). *In vitro* a Fluoxetina inibe a recaptção de 5-HT rapidamente (FULLER *et al.*, 1974). Assim, seria de se esperar que repostas comportamentais sexualmente dimórficas fossem acompanhadas de dimorfismo do sistema de recaptção no encéfalo, como já se observou em outros tecidos (LINDER *et al.*, 2011)

Em preparações isoladas de veias e artérias de ratos foi observada uma diferença sexual no sistema de transporte de 5-HT (LINDER *et al.*, 2011) nas quais veias de machos *knockout* para o SERT continuaram captando 5-HT enquanto as fêmeas *knockout* não. Desta maneira, os autores sugerem que o transporte de 5-HT não é dependente exclusivamente do SERT nos machos, podendo também ser captada por outros transportadores de monoaminas (e.g. DAT ou NET). No entanto, como demonstrado neste trabalho, o transporte de 5-HT no encéfalo parece ser mais

dependente de SERT, visto que a captação foi inibida após a incubação *in vitro* com FLX. Porém, não observamos diferença sexual nos conteúdos de 5-HT no córtex desses animais, indo de encontro ao observado na literatura (CARLSSON e CARLSSON, 1988) onde, apesar de não significativa, as fêmeas apresentavam uma quantidade maior de 5-HT do que os machos nesta região. Em outros estudos, outras regiões encefálicas como o tronco encefálico e córtices límbicos apresentaram conteúdos de 5-HT sexualmente dimórficos (CARLSSON e CARLSSON, 1988). No entanto, os dados do presente estudo apontam que córtex frontal não possui quantidades basais de 5-HT ou funcionamento de SERT sexualmente dimórficos.

É interessante notar que o córtex frontal recebe projeções serotoninérgicas diretamente do NDR (AZMITIA e SEGAL, 1978). Também já foi demonstrado que a estimulação elétrica do núcleo dorsal da rafe (NDR) aumenta a liberação de 5-HT no CPFm (PUIG *et al.*, 2004; PUIG e GULLEDGE, 2011). Esse aumento de 5-HT no CPFm causa uma diminuição dos disparos dos neurônios piramidais (PUIG *et al.*, 2004) que poderia resultar da ativação dos receptores serotoninérgicos inibitórios 5-HT_{1A} pós-sinápticos. Já foi relatado aumento da atividade dos neurônios serotoninérgicos da rafe após o tratamento sistêmico com fármacos antidepressivos (KUMARNSIT *et al.*, 2007; KARANGES *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2018), este efeito resulta em uma diminuição da imobilidade no TNF. Por sua vez, a depleção de 5-HT após o tratamento com a toxina 5,7-diidroxitriptamina aumenta o tempo de imobilidade no TNF (KOSTOWISKI e KRZASCIK, 2003) assim como a inibição GABAérgica do NDR em camundongos (XIAO *et al.*, 2017). Como a estimulação elétrica do NDR promove liberação de serotonina no CPFm (PUIG *et al.*, 2004) e redução da imobilidade no TNF (Xiao *et al.*, 2017) pode-se inferir uma relação entre os dois eventos.

A relação sugerida seria que a redução da liberação de 5-HT aumentaria a imobilidade no TNF, efeito oposto ao que se espera após o tratamento com antidepressivos, enquanto o aumento da atividade dos neurônios da rafe reduziria a imobilidade no TNF. Assim, a ativação da rafe advinda do tratamento com antidepressivos, resultaria num aumento da liberação de 5-HT em áreas de projeção, como por exemplo o CPFm, inibindo esta região e gerando o efeito

comportamental de diminuição de imobilidade observado no TNF (SLATTERY *et al.*, 2011).

De fato, os dados aqui apresentados mostram que a inibição GABAérgica do córtex IL com infusão de Muscimol, um agonista GABA_A, reduziu significativamente o tempo de imobilidade tanto de machos quanto de fêmeas (fig. 6). Nossas observações do comportamento de ratos machos no TNF após a infusão de muscimol parecem estar de acordo com a literatura (HAMANI, DIWAN, ISABELLA, *et al.*, 2010; SLATTERY *et al.*, 2011). Também em machos, outras manipulações que levam à perda de função do IL (inativação química com cloreto de cobalto (SCOPINHO *et al.*, 2010) ou inibição por outras vias de neurotransmissão como a via canabinóide (MCLAUGHLIN *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2015; SARTIM *et al.*, 2016)) parecem ter um efeito semelhante no comportamento de imobilidade no TNF. É importante ressaltar que não foram encontrados dados na literatura em que essas manipulações tenham sido feitas em fêmeas. No entanto, os dados presentes neste trabalho sugerem que a inibição do IL, ao menos pela administração de um agonista GABA_A, resulta em um efeito comportamental semelhante em fêmeas e em machos de redução do tempo de imobilidade no TNF (fig. 6).

Desta maneira, podemos sugerir que apesar do efeito comportamental sexualmente dimórfico observado após o tratamento sistêmico com fluoxetina em um estudo prévio (DOMINGUES *et al.*, 2019), a inibição do IL parece ser importante para a mudança de estratégia comportamental (nado vs. imobilidade) durante o TNF em ambos os sexos. Uma vez que a Fluoxetina age primariamente sobre os níveis de 5-HT, podemos sugerir que existe um dimorfismo na circuitaria serotoninérgica inibitória nesta região. No presente trabalho observamos que a infusão no IL de 8-OH-DPAT, um agonista do receptor inibitório 5-HT_{1A}, reduziu o tempo de imobilidade de machos no TNF, na concentração de 10nmol (figs. 8 e 10) como também já havia sido demonstrado na literatura (SARTIM *et al.*, 2016). Este efeito comportamental foi inibido pela infusão de WAY100635, um antagonista deste mesmo receptor (fig. 8), mostrando que a redução do tempo de imobilidade parece ser mediada por este receptor.

De fato, já foi relatado que os heteroreceptores 5-HT_{1A} de neurônios piramidais do córtex pré-frontal parecem suprimir os potenciais de ação (YIN *et al.*, 2017) destes neurônios. Os dados da literatura, bem como os apresentados no presente

trabalho, nos permitem sugerir que o efeito comportamental observado no TNF após a infusão de 8-OH-DPAT em machos, estaria ocorrendo através do agonismo dos heteroreceptores 5-HT_{1A} presentes no CPFm, promovendo assim a inibição desta região encefálica. No entanto, no presente trabalho foi observado apenas um efeito pequeno e inconsistente do 8-OH-DPAT infundido no IL das fêmeas testadas no TNF (figs. 8 e 11). Vale lembrar que no que diz respeito à distribuição dos receptores 5-HT_{1A} no córtex de ratos machos, eles estão predominantemente presentes em neurônios piramidais (POMPEIANO *et al.*, 1992), e em menor quantidade em interneurônios GABAérgicos (SANTANA *et al.*, 2004).

Quanto à densidade de receptores 5-HT_{1A} no córtex foi relatada uma maior densidade de receptores 5-HT_{1A} corticais nos machos quando comparados com as fêmeas (ZOHAR *et al.*, 2015). Deste modo, a ausência de efeito comportamental observado após a infusão de 8-OH-DPAT no IL de fêmeas não parece ser devido a diferenças de densidade destes receptores.

Contudo, é possível que exista uma diferença em relação ao tipo neuronal em que estes receptores estão localizados. Por exemplo, em machos estes receptores inibitórios podem ser encontrados tanto em interneurônios GABAérgicos (AMARGÓS-BOSCH *et al.*, 2004; SANTANA *et al.*, 2004) quanto glutamatérgicos (AMARGÓS-BOSCH *et al.*, 2004; ALBERT e VAHID-ANSARI, 2018) no CPFm. É interessante notar que já foi relatado, utilizando a técnica de auto-radiografia, uma ligação maior do 8-OH-DPAT aos receptores 5-HT_{1A} pós-sinápticos no córtex de fêmeas de camundongo quando comparadas aos machos (SCHILLER *et al.*, 2006). Assim, pode-se sugerir que os receptores 5-HT_{1A} pós-sinápticos das fêmeas estejam presentes em maior número em interneurônios GABAérgicos, o que resultaria na inibição desses interneurônios, que por sua vez não seriam capazes de exercer sua atividade inibitória no CPFm, o que poderia explicar a falta de efeito comportamental após a infusão de 8-OH-DPAT. No córtex de ratos machos o 8-OH-DPAT parece se ligar igualmente em receptores 5-HT_{1A} pré e pós-sinápticos (HALL *et al.*, 1985). Portanto, também é possível especular sobre um possível dimorfismo sexual na localização desses receptores. Contudo, nossos dados não permitem a confirmação destas hipóteses, fazendo-se necessários experimentos futuros direcionados a responder essas questões.

Já foi relatado que o estresse e ansiedade são capazes de aumentar a liberação de 5-HT na fenda sináptica (FUJINO *et al.*, 2002; REX *et al.*, 2005), é possível que frente a uma ameaça moderada, a 5-HT liberada aja de forma a reprimir uma hiperatividade do sistema, promovendo uma estratégia passiva de enfrentamento (e.g. imobilidade) via receptores 5-HT_{1A} (PRICE *et al.*, 2009; MCCABE *et al.*, 2010; PUIG e GULLEDGE, 2011; CARHART-HARRIS e NUTT, 2017). Já foi demonstrado em ratos da linhagem Sprague-Dawley, diferenças sexuais em relação ao tempo de imobilidade no TNF (COLOM-LAPETINA *et al.*, 2017). Nestes animais foi observado que os machos apresentavam um maior tempo de imobilidade do que as fêmeas. Este maior tempo de imobilidade se correlacionou negativamente com a expressão de c-fos no CPFm. Ou seja, animais com maior tempo de imobilidade apresentavam um menor número de neurônios c-fos positivos no CPFm (COLOM-LAPETINA *et al.*, 2017). Desta maneira, os autores sugerem que esta região teria um papel na modulação das diferenças sexuais em relação a respostas ativas versus passivas no TNF (COLOM-LAPETINA *et al.*, 2017). No entanto, isso parece não ocorrer da mesma maneira para fêmeas. No presente trabalho, não foi observado efeito comportamental significativo no TNF após infusão de 8-OH-DPAT, um agonista de receptor 5-HT_{1A}, independente da dose nas fêmeas (figs. 8 e 11).

A sinalização pós-sináptica via 5-HT_{1A} parece ser capaz de moderar a ansiedade e o estresse, além de promover diferentes estratégias de enfrentamento (MIYAZAKI *et al.*, 2012; CARHART-HARRIS e NUTT, 2017). Já foi demonstrado que camundongos knock-out para o receptor 5-HT_{1A} apresentam comportamentos relacionados à depressão e ansiedade mais exacerbados que os tipos selvagens (HEISLER *et al.*, 1998; RAMBOZ *et al.*, 1998). Além disso, é interessante notar que o estresse pode causar uma desregulação dos 5HT_{1A} pós-sinápticos (BERTON *et al.*, 1997; LÓPEZ *et al.*, 1999), Também já foram relatadas diferenças sexuais na regulação de receptores 5-HT_{1A} na resposta do eixo HPA e NDR após estresse agudo (GOEL *et al.*, 2014).

Já em relação a estratégias de enfrentamento, o receptor 5-HT_{1A} pós-sináptico estaria mediando estratégias passivas (PUGLISI-ALLEGRA e ANDOLINA, 2015; CARHART-HARRIS e NUTT, 2017) enquanto o receptor 5-HT_{2A} pós-sináptico estaria mediando estratégias ativas (PUGLISI-ALLEGRA e ANDOLINA, 2015). Vale ressaltar que essas modulações de estratégias opostas podem estar diretamente

envolvidas com as ações opostas exercidas por esses receptores, sendo o 5-HT_{1A} inibitório e o 5-HT_{2A} excitatório (ARANEDA e ANDRADE, 1991; FLETCHER *et al.*, 2007; CARHART-HARRIS e NUTT, 2017). Porém, esse efeito diferencial dos receptores de 5-HT, onde o 1_A mediará estratégias passivas e o 2_A mediará estratégias ativas parece ser o oposto do que ocorre no teste do TNF, onde o receptor 5-HT_{1A} estaria favorecendo estratégias ativas, em detrimento das passivas (SARTIM *et al.*, 2016). No entanto, não encontramos na literatura dados que mostrem a relação do receptor 5-HT_{2A} com o comportamento no TNF. Ainda assim, esse mecanismo pode não ocorrer em fêmeas, visto que nem o tratamento crônico com fluoxetina (DOMINGUES *et al.*, 2019) nem a inibição com 8-OH-DPAT (dados presentes neste trabalho, figs. 8 e 11) parecem exercer uma mudança importante no comportamento de fêmeas submetidas ao TNF.

Outra possível explicação para a diferença sexual observada após a infusão de 8-OH-DPAT no IL seria que em fêmeas este fármaco poderia estar agindo em outros receptores, os quais também podem apresentar uma expressão sexualmente dimórfica. Apesar de ser considerado um agonista seletivo do receptor 5-HT_{1A} (LEJEUNE *et al.*, 1997; DE VRY *et al.*, 1998), também já foi observada a ação do 8-OH-DPAT em outros receptores serotoninérgicos, como 5-HT₇ (RUAT *et al.*, 1993; SHEN *et al.*, 1993), 5-HT_{1D} (NAPIER *et al.*, 1999), 5-HT_{5A} (MATTHES *et al.*, 1993), 5-HT_{1F} (ADHAM *et al.*, 1993), 5-HT_{2A} (KNIGHT *et al.*, 2004), 5-HT_{2B} (KNIGHT *et al.*, 2004), 5-HT_{2C} (KNIGHT *et al.*, 2004), 5-HT_{1B} (DOMENECH *et al.*, 1997). A sua capacidade de agir também em outros receptores pode explicar a ausência de efeito observada para a dose maior de 8-OH-DPAT (30nmol) utilizada neste trabalho. Além disso, 8-OH-DPAT também é capaz de se ligar a receptores excitatórios 5-HT_{2A} (KNIGHT *et al.*, 2004), e estes receptores também estão altamente expressos do CPFm (PAZOS *et al.*, 1985; PAZOS e PALACIOS, 1985; POMPEIANO *et al.*, 1992; 1994), sendo assim é possível que essa dose maior tenha perdido sua seletividade e, juntamente, sua capacidade de inibição do IL.

No presente trabalho também observamos que o WAY100635 teve um efeito de redução de imobilidade pronunciado, ainda que não significativo, somente nas fêmeas. É interessante notar que além de ser um antagonista de receptores 5-HT_{1A} (NEWMAN-TANCREDI *et al.*, 1998) este composto também é um agonista de receptores dopaminérgicos D₄ (AL HUSSAINY *et al.*, 2011). O receptor

dopaminérgico D₄ é altamente expresso no córtex de ratos (DEFAGOT *et al.*, 1997), tanto nos neurônios piramidais quanto nos interneurônios GABAérgicos (WEDZONY *et al.*, 2000). A ativação destes receptores em neurônios piramidais do CPF resulta numa diminuição dos disparos destes neurônios (ZHONG e YAN, 2014), tendo então um efeito inibitório sobre esta região.

DALLA, C *et al.* (2008) mostraram dimorfismo sexual na atividade dopaminérgica no CPF após o TNF. Especificamente, machos apresentaram um menor tempo de imobilidade do que as fêmeas, além de uma maior atividade dopaminérgica dada pelo turnover de dopamina. Além disso, também foi observado dimorfismo sexual em relação à expressão de receptores dopaminérgicos D₁ e D₂ no córtex de ratos (ORENDAIN-JAIME *et al.*, 2016), sendo uma maior expressão de D₁ e menor expressão de D₂ nas fêmeas quando comparadas com os machos. Desta maneira, é possível que também haja uma diferença na expressão do receptor D₄, o que poderia explicar o efeito de redução de imobilidade observado neste trabalho para as fêmeas (fig. 8). É possível que as fêmeas possuam uma maior densidade de receptores D₄ nos neurônios piramidais em relação aos machos, o que poderia explicar a redução de imobilidade observada em fêmeas (ainda que não significativa) após a infusão intra-IL do WAY100635. Contudo, mais experimentos seriam necessários para avaliar o papel do receptor D₄ no comportamento de ratos no TNF.

No trabalho de Dalla e cols. (2008) também foi observado que após o TNF os machos da linhagem Sprague-Dawley apresentavam maior atividade dopaminérgica no CPF do que as fêmeas e, isto se refletia, em uma diferença sexual também no comportamento dos animais submetidos ao TNF. No referido estudo, os machos apresentaram menor tempo de imobilidade quando comparados às fêmeas (DALLA, C *et al.*, 2008). No nosso trabalho, não observamos diferenças sexuais basais os animais da linhagem Wistar (DOMINGUES *et al.*, 2019). Também há a possibilidade que o ciclo estral e a flutuação hormonal afetassem o comportamento das fêmeas no TNF trazendo variabilidade aos resultados. Contudo, um trabalho anterior do nosso laboratório observou efeitos negligenciáveis do ciclo estral sobre o comportamento de imobilidade no TNF (DOMINGUES *et al.*, 2018). Além do mais, já foi observado que os dados obtidos em fêmeas, na verdade, são menos variáveis do que os machos (BECKER *et al.*, 2016; BEERY, 2018) em diferentes experimentos comportamentais utilizados na pesquisa em neurociências.

É interessante notar que um fator crítico na diferenciação encefálica, no que diz respeito a diferenças sexuais, é a sinalização epigenética resultante de um pico de testosterona que ocorre entre o dia gestacional 17 e o dia pós-natal 10 nos machos (MCCARTHY *et al.*, 2009). Desta forma, podemos supor que, no que diz respeito aos testes comportamentais que envolvem estratégias de enfrentamento, o desenvolvimento diferencial tenha um peso maior nas diferenças sexuais da circuitaria encefálica do que a flutuação hormonal das fêmeas na fase adulta.

Em humanos, vale ressaltar que as mulheres são mais diagnosticadas com depressão do que homens (MARCUS *et al.*, 2005). Também já foi observado que no que diz respeito ao transtorno depressivo maior, homens e mulheres compartilham somente 10% dos genes alterados (LABONTÉ *et al.*, 2017). Se a susceptibilidade das mulheres à depressão reflete um mecanismo biológico, a hipossensibilidade dos receptores 5-HT_{1A} corticais seria uma explicação plausível. Também existe uma diferença sexual em relação às classes de medicamentos que geram melhor resposta, sendo as mulheres mais responsivas ao tratamento com ISRS e os homens mais responsivos ao tratamento com tricíclicos (HAYKAL e AKISKAL, 1999; KORNSTEIN *et al.*, 2000; MARTÉNYI *et al.*, 2001; KHAN *et al.*, 2005; YOUNG *et al.*, 2009). No presente estudo não se utilizou tratamento com antidepressivos de nenhuma classe impedindo qualquer especulação sobre o tema. Porém, reuniu-se evidências que agonistas 5-HT_{1A} infundidos no IL tiveram efeitos similares aos dos antidepressivos no FST em ratos machos, mas não em fêmeas. Considerando que os efeitos dos antidepressivos ISRSs e tricíclicos sobre o comportamento e humor podem ser mediados por receptores 5-HT_{1A} corticais (HERVÁS e ARTIGAS, 1998; ARTIGAS *et al.*, 2006; HONIG *et al.*, 2009; DESCARRIES e RIAD, 2012; GAYNES *et al.*, 2012; SARTIM *et al.*, 2016; RIAD *et al.*, 2017), dados do presente estudo poderiam ter repercussão translacional. Assim, especula-se que a eficácia do tratamento com antidepressivos poderia estar prejudicada em pacientes que apresentassem hipossensibilidade dos receptores 5-HT_{1A} corticais. Tal situação de hipossensibilidade de receptores 5-HT_{1A}, poderia resultar em uma hiperexcitabilidade cortical, e a resistência ao efeito antidepressivo poderia ser contornada pela associação do tratamento padrão com compostos inibidores da atividade cortical como por exemplo, agonistas GABA_A.

Deste modo a investigação sistemática das diferenças sexuais da circuitaria cortical em humanos poderia gerar um melhor entendimento da fisiopatologia e auxiliar na pesquisa e desenvolvimento de novos tratamentos farmacológicos.

8. Limitações do estudo

É possível que certas diferenças sexuais existentes no sistema serotoninérgico no IL tenham sido mascaradas pela abrangência da dissecação de estruturas encefálicas usadas para a avaliação das quantidades de 5-HT e função do SERT. Apesar de os experimentos terem sido direcionados para o IL, a dissecação para os ensaios *in vitro* não foi limitada ao IL, mas sim coletado todo o CPFm.

Também é possível que alguns efeitos comportamentais tenham sido mascarados no experimento da curva concentração resposta do 8-OH-DPAT e WAY100635 devido ao tamanho de amostra inferior ao do experimento que o antecedeu.

9. Conclusões

De acordo com os dados aqui apresentados, pode-se afirmar que:

1- Tanto a quantidade basal de 5-HT quanto a função de SERT, captação de 5-HT e sensibilidade à fluoxetina, foi similar no encéfalo (córtex e hipocampo) de ratos machos e fêmeas indicando a ausência de dimorfismo sexual no sistema de transporte de 5-HT cortical.

2- A inibição do IL com um agonista GABAérgico foi suficiente para reduzir a imobilidade de ratos machos e fêmeas no TNF abaixo do controle indicando a ausência de dimorfismo sexual nos receptores GABA_A corticais.

3- A infusão de uma dose do agonista 5-HT_{1A} no IL foi suficiente para reduzir a imobilidade de ratos machos no TNF abaixo do controle indicando uma inibição dose-dependente da função cortical.

4- O efeito comportamental do agonista 5-HT_{1A} infundido no IL foi revertido pelo pré-tratamento do local com um antagonista do mesmo receptor reforçando sua participação no controle do comportamento dos ratos machos no TNF.

5- A infusão de várias doses do agonista ou do antagonista dos receptores 5-HT_{1A} no IL afetou pouco o tempo de imobilidade das ratas no TNF indicando pequena participação dos receptores 5-HT_{1A} no controle do comportamento das fêmeas no TNF.

6- A neurotransmissão mediada por heteroreceptores 5-HT_{1A} tem características sexualmente dimórficas.

Diante das afirmações acima especulamos que as respostas sexualmente dimórficas dos ratos ao agonista 5-HT_{1A} no TNF poderiam ser explicadas por 1- diferenças na localização dos receptores 5-HT_{1A} corticais nos machos e fêmeas ou por 2- variação nos tipos de receptores envolvidos no controle cortical do comportamento em machos e fêmeas.

Assim, a localização dos heteroreceptores 5-HT_{1A} no CPFm dos machos poderiam ser nos neurônios piramidais enquanto os das fêmeas estariam nos interneurônios GABAérgicos (fig. 14). Alternativamente, os neurônios piramidais das fêmeas poderiam ter maior expressão de receptores D₄, em detrimento de 5-HT_{1A}, que os dos ratos machos (fig. 15).

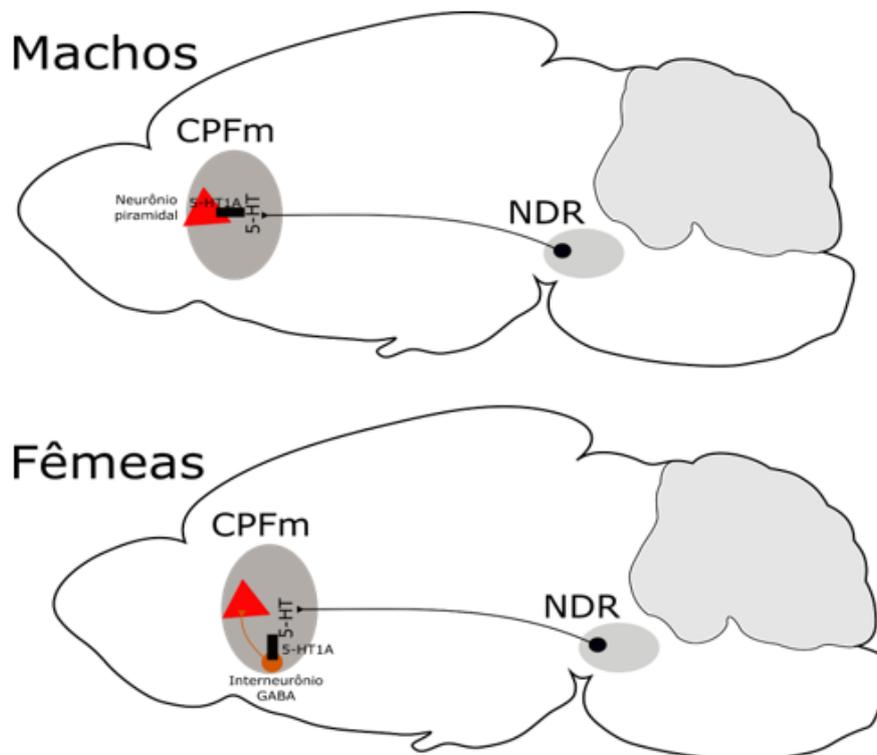


Figura 14 - Desenho esquemático da hipótese da diferente localização dos receptores 5-HT_{1A} no CPFm de machos e fêmeas

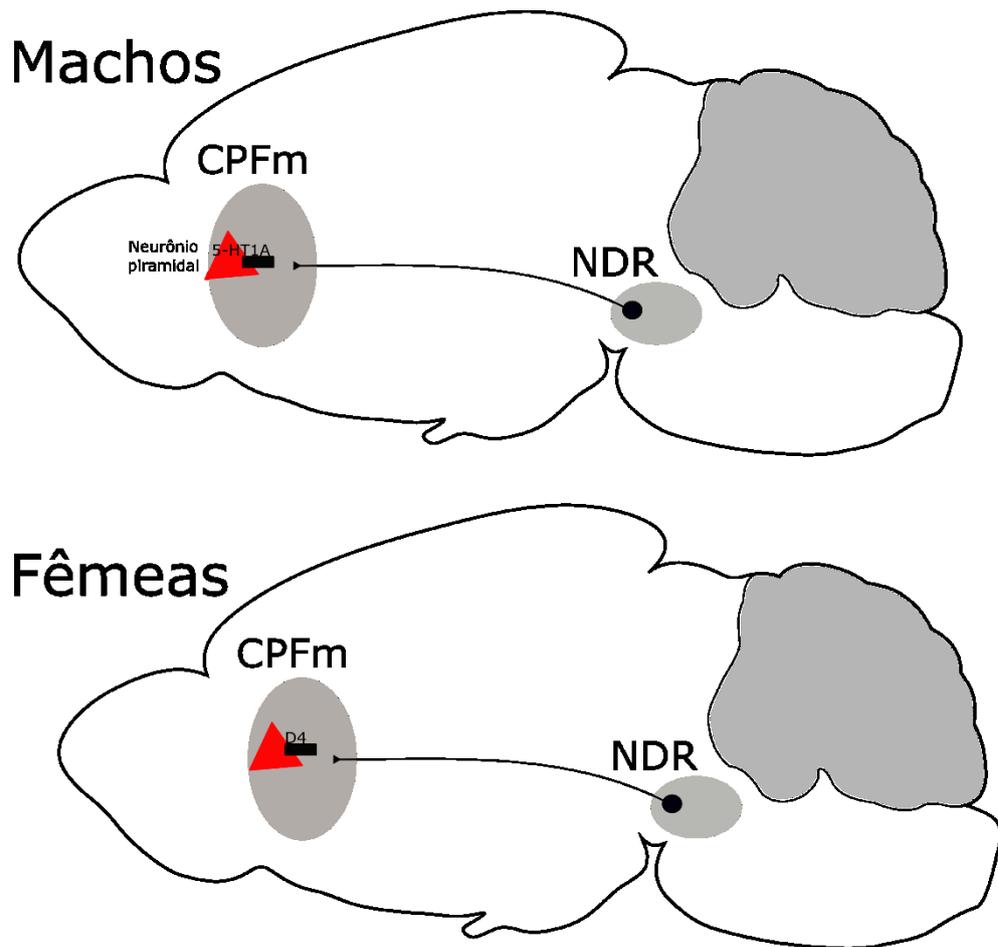


Figura 15 - Desenho esquemático da hipótese da atuação do WAY100635 via receptor dopaminérgico D4 em fêmeas.

REFERÊNCIAS

- ADHAM, N.; KAO, H.-T.; SCHECTER, L.; BARD, J.; OLSEN, M.; URQUHART, D.; DURKIN, M.; HARTIG, P. R.; WEINSHANK, R. L.; BRANCHEK, T. A. Cloning of another human serotonin receptor (5-HT_{1F}): a fifth 5-HT₁ receptor subtype coupled to the inhibition of adenylate cyclase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 2, p. 408-412, 1993.
- ADRIEN, J.; LANFUMEY, L.; GOZLAN, H.; FATTACCINI, C.; HAMON, M. Biochemical and electrophysiological evidence for an agonist action of CM 57493 at pre-and postsynaptic 5-hydroxytryptamine_{1A} receptors in brain. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 248, n. 3, p. 1222-1230, 1989.
- AL HUSSAINY, R.; VERBEEK, J.; VAN DER BORN, D.; BRAKER, A. H.; LEYSEN, J. E. E.; KNOL, R. J.; BOOIJ, J.; HERSCHEID, J. D. Design, Synthesis, Radiolabeling, and in Vitro and in Vivo Evaluation of Bridgehead Iodinated Analogues of N-{2-[4-(2-Methoxyphenyl) piperazin-1-yl] ethyl}-N-(pyridin-2-yl) cyclohexanecarboxamide (WAY-100635) as Potential SPECT Ligands for the 5-HT_{1A} Receptor. **Journal of medicinal chemistry**, v. 54, n. 10, p. 3480-3491, 2011.
- ALBERT, P. R.; VAHID-ANSARI, F. The 5-HT_{1A} receptor: signaling to behavior. **Biochimie**, 2018.
- AMARGÓS-BOSCH, M.; BORTOLOZZI, A.; PUIG, M. V.; SERRATS, J.; ADELL, A.; CELADA, P.; TOTH, M.; MENGOD, G.; ARTIGAS, F. Co-expression and in vivo interaction of serotonin_{1A} and serotonin_{2A} receptors in pyramidal neurons of prefrontal cortex. **Cerebral Cortex**, v. 14, n. 3, p. 281-299, 2004.
- ANDREWS, P. W.; BHARWANI, A.; LEE, K. R.; FOX, M.; THOMSON JR, J. A. Is serotonin an upper or a downer? The evolution of the serotonergic system and its role in depression and the antidepressant response. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 51, p. 164-188, 2015.
- ANTYPA, N.; SERRETTI, A.; RUJESCU, D. Serotonergic genes and suicide: a systematic review. **European neuropsychopharmacology**, v. 23, n. 10, p. 1125-1142, 2013.
- ARANEDA, R.; ANDRADE, R. 5-Hydroxytryptamine₂ and 5-hydroxytryptamine_{1A} receptors mediate opposing responses on membrane excitability in rat association cortex. **Neuroscience**, v. 40, n. 2, p. 399-412, 1991.
- ARTIGAS, F.; ADELL, A.; CELADA, P. Pindolol augmentation of antidepressant response. **Current drug targets**, v. 7, n. 2, p. 139-147, 2006.
- AZMITIA, E. C.; SEGAL, M. An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 179, n. 3, p. 641-667, 1978.
- BECKER, J. B.; PRENDERGAST, B. J.; LIANG, J. W. Female rats are not more variable than male rats: a meta-analysis of neuroscience studies. **Biology of sex differences**, v. 7, n. 1, p. 34, 2016.
- BEERY, A. K. Inclusion of females does not increase variability in rodent research studies. **Current Opinion in Behavioral Sciences**, v. 23, p. 143-149, 2018.
- BERTON, O.; AGUERRE, S.; SARRIEAU, A.; MORMEDE, P.; CHAOULOFF, F. Differential effects of social stress on central serotonergic activity and emotional reactivity in Lewis and spontaneously hypertensive rats. **Neuroscience**, v. 82, n. 1, p. 147-159, 1997.

- BIEGON, A.; BERCOVITZ, H.; SAMUEL, D. Serotonin receptor concentration during the estrous cycle of the rat. **Brain research**, v. 187, n. 1, p. 221-225, 1980.
- BOGDANSKI, D. F.; WEISSBACH, H.; UDENFRIEND, S. The distribution of serotonin, 5 - hydroxytryptophan decarboxylase, and monoamine oxidase in brain. **Journal of neurochemistry**, v. 1, n. 3, p. 272-278, 1957.
- BOUAZIZ, E.; EMERIT, M. B.; VODJDANI, G.; GAUTHERON, V.; HAMON, M.; DARMON, M.; MASSON, J. Neuronal phenotype dependency of agonist-induced internalization of the 5-HT_{1A} serotonin receptor. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 1, p. 282-294, 2014.
- BRADSHAW, C.; STOKER, M.; SZABADI, E. Comparison of the neuronal responses to 5-hydroxytryptamine, noradrenaline and phenylephrine in the cerebral cortex: effects of haloperidol and methysergide. **Neuropharmacology**, v. 22, n. 6, p. 677-685, 1983.
- BURGOS-ROBLES, A.; BRAVO-RIVERA, H.; QUIRK, G. J. Prelimbic and infralimbic neurons signal distinct aspects of appetitive instrumental behavior. **PloS one**, v. 8, n. 2, p. e57575, 2013.
- CAPRILES, N.; RODAROS, D.; SORGE, R. E.; STEWART, J. A role for the prefrontal cortex in stress- and cocaine-induced reinstatement of cocaine seeking in rats. **Psychopharmacology**, v. 168, n. 1-2, p. 66-74, 2003.
- CARHART-HARRIS, R.; NUTT, D. Serotonin and brain function: a tale of two receptors. **Journal of Psychopharmacology**, v. 31, n. 9, p. 1091-1120, 2017.
- CARLSSON, M.; CARLSSON, A. A regional study of sex differences in rat brain serotonin. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 12, n. 1, p. 53-61, 1988.
- CARLSSON, M.; SVENSSON, K.; ERIKSSON, E.; CARLSSON, A. Rat brain serotonin: biochemical and functional evidence for a sex difference. **Journal of neural transmission**, v. 63, n. 3-4, p. 297-313, 1985.
- CELADA, P.; ARTIGAS, F. Monoamine oxidase inhibitors increase preferentially extracellular 5-hydroxytryptamine in the midbrain raphe nuclei. A brain microdialysis study in the awake rat. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 347, n. 6, p. 583-590, 1993.
- CERVO, L.; SAMANIN, R. Effect of chronic treatment with 8-OH-DPAT in the forced swimming test requires the integrity of presynaptic serotonergic mechanisms. **Psychopharmacology**, v. 103, n. 4, p. 524-528, 1991.
- CHANG, C. H.; CHEN, M. C.; QIU, M. H.; LU, J. Ventromedial prefrontal cortex regulates depressive-like behavior and rapid eye movement sleep in the rat. **Neuropharmacology**, v. 86, p. 125-132, 2014.
- CHASE, T. N.; MURPHY, D. L. Serotonin and central nervous system function. **Annual review of pharmacology**, v. 13, n. 1, p. 181-197, 1973.
- CHIKEN, S.; NAMBU, A. Mechanism of deep brain stimulation: inhibition, excitation, or disruption? **The Neuroscientist**, v. 22, n. 3, p. 313-322, 2016.

COLLINS, F. S.; TABAK, L. A. NIH plans to enhance reproducibility. **Nature**, v. 505, n. 7485, p. 612-613, 2014.

COLOM-LAPETINA, J.; BEGLEY, S. L.; JOHNSON, M. E.; BEAN, K. J.; KUWAMOTO, W. N.; SHANSKY, R. M. Strain-dependent sex differences in a long-term forced swim paradigm. **Behavioral neuroscience**, v. 131, n. 5, p. 428, 2017.

CRAFT, R.; KOSTICK, M.; ROGERS, J.; WHITE, C.; TSUTSUI, K. Forced swim test behavior in postpartum rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 96, n. 4, p. 402-412, 2010.

CRYAN, J. F.; PAGE, M. E.; LUCKI, I. Differential behavioral effects of the antidepressants reboxetine, fluoxetine, and moclobemide in a modified forced swim test following chronic treatment. **Psychopharmacology**, v. 182, n. 3, p. 335-344, 2005.

CZACHURA, J. F.; RASMUSSEN, K. Effects of acute and chronic administration of fluoxetine on the activity of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus of the rat. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 362, n. 3, p. 266-275, 2000.

DALLA, C.; ANTONIOU, K.; KOKRAS, N.; DROSSOPOULOU, G.; PAPATHANASIOU, G.; BEKRIS, S.; DASKAS, S.; PAPADOPOULOU-DAIFOTI, Z. Sex differences in the effects of two stress paradigms on dopaminergic neurotransmission. **Physiology & behavior**, v. 93, n. 3, p. 595-605, 2008.

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, 2008.

DE VRIES, R. B.; HOOIJMANS, C. R.; LANGENDAM, M. W.; VAN LUIJK, J.; LEENAARS, M.; RITSKES - HOITINGA, M.; WEVER, K. E. A protocol format for the preparation, registration and publication of systematic reviews of animal intervention studies. **Evidence - based Preclinical Medicine**, v. 2, n. 1, p. 1-9, 2015.

DE VRY, J.; SCHOHE-LOOP, R.; HEINE, H.-G.; GREUEL, J. M.; MAULER, F.; SCHMIDT, B.; SOMMERMEYER, H.; GLASER, T. Characterization of the aminomethylchroman derivative BAYx 3702 as a highly potent 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor agonist. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 284, n. 3, p. 1082-1094, 1998.

DEFAGOT, M. C.; MALCHIODI, E. L.; VILLAR, M. J.; ANTONELLI, M. C. Distribution of D4 dopamine receptor in rat brain with sequence-specific antibodies. **Molecular Brain Research**, v. 45, n. 1, p. 1-12, 1997.

DELATOUR, B. T.; GISQUET-VERRIER, P. Functional role of rat prelimbic-infralimbic cortices in spatial memory: evidence for their involvement in attention and behavioural flexibility. **Behavioural brain research**, v. 109, n. 1, p. 113-128, 2000.

DESCARRIES, L.; JASPER, H. H. Modulatory role for biogenic amines in the cerebral cortex. Microiontophoretic studies. **Brain research**, v. 160, n. 2, p. 217-229, 1979.

DESCARRIES, L.; RIAD, M. Effects of the antidepressant fluoxetine on the subcellular localization of 5-HT_{1A} receptors and SERT. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 367, n. 1601, p. 2416-2425, 2012.

- 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.
- DETKE, M. J.; LUCKI, I. Detection of serotonergic and noradrenergic antidepressants in the rat forced swimming test: the effects of water depth. **Behavioural brain research**, v. 73, n. 1-2, p. 43-46, 1995.
- DICKINSON, S.; CURZON, G. 5-Hydroxytryptamine-mediated behaviour in male and female rats. **Neuropharmacology**, v. 25, n. 7, p. 771-776, 1986.
- DOMENECH, T.; BELETA, J.; PALACIOS, J. Characterization of human serotonin 1D and 1B receptors using [3H]-GR-125743, a novel radiolabelled serotonin 5HT1D/1B receptor antagonist. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 356, n. 3, p. 328-334, 1997.
- DOMINGUES, K.; LIMA, F. B.; LINDER, A. E.; MELLEU, F. F.; POLI, A.; SPEZIA, I.; SUMAN, P. R.; THEINDL, L. C.; LINO DE OLIVEIRA, C. Sexually dimorphic responses of rats to fluoxetine in the forced swimming test are unrelated to the function of the serotonin transporter in the brain. **Synapse**, 2019.
- DOMINGUES, K.; SPEZIA, I.; THEINDL, L. C.; SUMAN, P. R.; LIMA, F. B.; DE OLIVEIRA LINO, C. Repeated forced-swimming test in intact female rats: behaviour, oestrous cycle and enriched environment. **Behavioural pharmacology**, 2018.
- ESTRADA-CAMARENA, E.; LÓPEZ-RUBALCAVA, C.; HERNÁNDEZ-ARAGÓN, A.; MEJÍA-MAURIES, S.; PICAZO, O. Long-term ovariectomy modulates the antidepressant-like action of estrogens, but not of antidepressants. **Journal of Psychopharmacology**, v. 25, n. 10, p. 1365-1377, 2011.
- ESTRADA-CAMARENA, E.; RIVERA, N. V.; BERLANGA, C.; FERNÁNDEZ-GUASTI, A. Reduction in the latency of action of antidepressants by 17 β -estradiol in the forced swimming test. **Psychopharmacology**, v. 201, n. 3, p. 351, 2008.
- FERNÁNDEZ-GUASTI, A.; OLIVARES-NAZARIO, M.; REYES, R.; MARTÍNEZ-MOTA, L. Sex and age differences in the antidepressant-like effect of fluoxetine in the forced swim test. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 152, p. 81-89, 2017.
- FLETCHER, P. J.; TAMPAKERAS, M.; SINYARD, J.; HIGGINS, G. A. Opposing effects of 5-HT 2A and 5-HT 2C receptor antagonists in the rat and mouse on premature responding in the five-choice serial reaction time test. **Psychopharmacology**, v. 195, n. 2, p. 223-234, 2007.
- FLORES-SERRANO, A. G.; VILA-LUNA, M. L.; ÁLVAREZ-CERVERA, F. J.; HEREDIA-LÓPEZ, F. J.; GÓNGORA-ALFARO, J. L.; PINEDA, J. C. Clinical doses of citalopram or reboxetine differentially modulate passive and active behaviors of female Wistar rats with high or low immobility time in the forced swimming test. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 110, p. 89-97, 2013.
- FREIS, E. D. Mental depression in hypertensive patients treated for long periods with large doses of reserpine. **New England Journal of Medicine**, v. 251, n. 25, p. 1006-1008, 1954.
- FUJINO, K.; YOSHITAKE, T.; INOUE, O.; IBII, N.; KEHR, J.; ISHIDA, J.; NOHTA, H.; YAMAGUCHI, M. Increased serotonin release in mice frontal cortex and hippocampus induced by acute physiological stressors. **Neuroscience letters**, v. 320, n. 1-2, p. 91-95, 2002.

- FULLER, R. W.; PERRY, K. W.; MOLLOY, B. B. Effect of an uptake inhibitor on serotonin metabolism in rat brain: studies with 3-(p-trifluoromethylphenoxy)-N-methyl-3-phenylpropylamine (Lilly 110140). **Life sciences**, v. 15, n. 6, p. 1161-1171, 1974.
- GAYNES, B. N.; WARDEN, D.; TRIVEDI, M. H.; WISNIEWSKI, S. R.; FAVA, M.; JOHN RUSH, A. What Did STAR☆ D Teach Us? Results From a Large-Scale, Practical, Clinical Trial for Patients With Depression. **Focus**, v. 10, n. 4, p. 510-517, 2012.
- GOEL, N.; INNALA, L.; VIAU, V. Sex differences in serotonin (5-HT) 1A receptor regulation of HPA axis and dorsal raphe responses to acute restraint. **Psychoneuroendocrinology**, v. 40, p. 232-241, 2014.
- HALL, M.; MESTIKAWY, S. E.; EMERIT, M.; PICHAT, L.; HAMON, M.; GOZLAN, H. [3H] 8 - hydroxy - 2 - (di - n - propylamino) tetralin binding to pre - and postsynaptic 5 - hydroxytryptamine sites in various regions of the rat brain. **Journal of neurochemistry**, v. 44, n. 6, p. 1685-1696, 1985.
- HAMANI, C.; DIWAN, M.; ISABELLA, S.; LOZANO, A. M.; NOBREGA, J. N. Effects of different stimulation parameters on the antidepressant-like response of medial prefrontal cortex deep brain stimulation in rats. **Journal of psychiatric research**, v. 44, n. 11, p. 683-687, 2010.
- HAMANI, C.; DIWAN, M.; MACEDO, C. E.; BRANDÃO, M. L.; SHUMAKE, J.; GONZALEZ-LIMA, F.; RAYMOND, R.; LOZANO, A. M.; FLETCHER, P. J.; NOBREGA, J. N. Antidepressant-like effects of medial prefrontal cortex deep brain stimulation in rats. **Biological psychiatry**, v. 67, n. 2, p. 117-124, 2010.
- HAYKAL, R. F.; AKISKAL, H. S. The long-term outcome of dysthymia in private practice: clinical features, temperament, and the art of management. **The Journal of clinical psychiatry**, v. 60, n. 8, p. 508-518, 1999.
- HEIDBREDER, C. A.; GROENEWEGEN, H. J. The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 27, n. 6, p. 555-579, 2003.
- HEIDBREDER, C. A.; THOMPSON, A. C.; SHIPPENBERG, T. S. Role of extracellular dopamine in the initiation and long-term expression of behavioral sensitization to cocaine. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 278, n. 2, p. 490-502, 1996.
- HEISLER, L. K.; CHU, H.-M.; BRENNAN, T. J.; DANAOK, J. A.; BAJWA, P.; PARSONS, L. H.; TECOTT, L. H. Elevated anxiety and antidepressant-like responses in serotonin 5-HT_{1A} receptor mutant mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 25, p. 15049-15054, 1998.
- HERVÁS, I.; ARTIGAS, F. Effect of fluoxetine on extracellular 5-hydroxytryptamine in rat brain. Role of 5-HT autoreceptors. **European journal of pharmacology**, v. 358, n. 1, p. 9-18, 1998.
- HIGGINS, J. P.; THOMPSON, S. G.; DEEKS, J. J.; ALTMAN, D. G. Measuring inconsistency in meta-analyses. **BMJ: British Medical Journal**, v. 327, n. 7414, p. 557, 2003.
- HONIG, G.; JONGSMA, M. E.; VAN DER HART, M. C.; TECOTT, L. H. Chronic citalopram administration causes a sustained suppression of serotonin synthesis in the mouse forebrain. **PLoS one**, v. 4, n. 8, p. e6797, 2009.
- HOOVER, W. B.; VERTES, R. P. Projections of the medial orbital and ventral orbital cortex in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 519, n. 18, p. 3766-3801, 2011.

HURLEY, K. M.; HERBERT, H.; MOGA, M. M.; SAPER, C. B. Efferent projections of the infralimbic cortex of the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 308, n. 2, p. 249-276, 1991.

JINKS, A. L.; MCGREGOR, I. S. Modulation of anxiety-related behaviours following lesions of the prelimbic or infralimbic cortex in the rat. **Brain research**, v. 772, n. 1-2, p. 181-190, 1997.

JOHNSON, E.; ROBERTS, M.; STRAUGHAN, D. W. The responses of cortical neurones to monoamines under differing anaesthetic conditions. **The Journal of physiology**, v. 203, n. 2, p. 261-280, 1969.

JORDAN, L.; FREDERICKSON, R.; PHILLIS, J.; LAKE, N. Microelectrophoresis of 5-hydroxytryptamine: a clarification of its action on cerebral cortical neurones. **Brain research**, v. 40, n. 2, p. 552-558, 1972.

KARANGES, E. A.; RAMOS, L.; DAMPNEY, B.; SURAEV, A. S.; LI, K. M.; MCGREGOR, I. S.; HUNT, G. E. Contrasting regional Fos expression in adolescent and young adult rats following acute administration of the antidepressant paroxetine. **Brain research bulletin**, v. 121, p. 246-254, 2016.

KATO, R. Serotonin content of rat brain in relation to sex and age. **Journal of neurochemistry**, v. 5, n. 2, p. 202-202, 1960.

KHAN, A.; BRODHEAD, A. E.; SCHWARTZ, K. A.; KOLTS, R. L.; BROWN, W. A. Sex differences in antidepressant response in recent antidepressant clinical trials. **Journal of clinical psychopharmacology**, v. 25, n. 4, p. 318-324, 2005.

KNIGHT, A. R.; MISRA, A.; QUIRK, K.; BENWELL, K.; REVELL, D.; KENNETT, G.; BICKERDIKE, M. Pharmacological characterisation of the agonist radioligand binding site of 5-HT 2A, 5-HT 2B and 5-HT 2C receptors. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 370, n. 2, p. 114-123, 2004.

KOEHLER, S.; CIERPINSKY, K.; KRONENBERG, G.; ADLI, M. The serotonergic system in the neurobiology of depression: Relevance for novel antidepressants. **Journal of Psychopharmacology**, v. 30, n. 1, p. 13-22, 2016.

KORNSTEIN, S. G.; SCHATZBERG, A. F.; THASE, M. E.; YONKERS, K. A.; MCCULLOUGH, J. P.; KEITNER, G. I.; GELENBERG, A. J.; DAVIS, S. M.; HARRISON, W. M.; KELLER, M. B. Gender differences in treatment response to sertraline versus imipramine in chronic depression. **American Journal of Psychiatry**, v. 157, n. 9, p. 1445-1452, 2000.

KOVAČEVIĆ, T.; SKELIN, I.; DIKSIC, M. Chronic fluoxetine treatment has a larger effect on the density of a serotonin transporter in the Flinders Sensitive Line (FSL) rat model of depression than in normal rats. **Synapse**, v. 64, n. 3, p. 231-240, 2010.

KRETTEK, J.; PRICE, J. The cortical projections of the mediodorsal nucleus and adjacent thalamic nuclei in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 171, n. 2, p. 157-191, 1977.

KRNJEVIĆ, K.; PHILLIS, J. Ionophoretic studies of neurones in the mammalian cerebral cortex. **The Journal of physiology**, v. 165, n. 2, p. 274-304, 1963.

KUMARNSIT, E.; VONGVATCHARANON, U.; KEAWPRADUB, N.; INTASARO, P. Fos-like immunoreactivity in rat dorsal raphe nuclei induced by alkaloid extract of *Mitragyna speciosa*. **Neuroscience letters**, v. 416, n. 2, p. 128-132, 2007.

LABONTÉ, B.; ENGMANN, O.; PURUSHOTHAMAN, I.; MENARD, C.; WANG, J.; TAN, C.; SCARPA, J. R.; MOY, G.; LOH, Y.-H. E.; CAHILL, M. Sex-specific transcriptional signatures in human depression. **Nature medicine**, v. 23, n. 9, p. 1102, 2017.

LAKOSKI, J. M.; AGHAJANIAN, G. Effects of ketanserin on neuronal responses to serotonin in the prefrontal cortex, lateral geniculate and dorsal raphe nucleus. **Neuropharmacology**, v. 24, n. 4, p. 265-273, 1985.

LE POUL, E.; BONI, C.; HANOUN, N. M.; LAPORTE, A.-M.; LAARIS, N.; CHAUVEAU, J.; HAMON, M.; LANFUMEY, L. Differential adaptation of brain 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors and 5-HT transporter in rats treated chronically with fluoxetine. **Neuropharmacology**, v. 39, n. 1, p. 110-122, 2000.

LE POUL, E.; LAARIS, N.; DOUCET, E.; LAPORTE, A.-M.; HAMON, M.; LANFUMEY, L. Early desensitization of somato-dendritic 5-HT_{1A} autoreceptors in rats treated with fluoxetine or paroxetine. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 352, n. 2, p. 141-148, 1995.

LEGG, K.; RANDIĆ, M.; STRAUGHAN, D. The pharmacology of neurones in the pyriform cortex. **British journal of pharmacology and chemotherapy**, v. 26, n. 1, p. 87-107, 1966.

LEJEUNE, F.; NEWMAN-TANCREDI, A.; AUDINOT, V.; MILLAN, M. Interactions of (+)- and (-)-8- and 7-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin at human (h) D₃, hD₂ and h serotonin_{1A} receptors and their modulation of the activity of serotonergic and dopaminergic neurones in rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 280, n. 3, p. 1241-1249, 1997.

LEPACK, A. E.; FUCHIKAMI, M.; DWYER, J. M.; BANASR, M.; DUMAN, R. S. BDNF release is required for the behavioral actions of ketamine. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 18, n. 1, 2015.

LI, Y.; RAABY, K. F.; SÁNCHEZ, C.; GULINELLO, M. Serotonergic receptor mechanisms underlying antidepressant-like action in the progesterone withdrawal model of hormonally induced depression in rats. **Behavioural brain research**, v. 256, p. 520-528, 2013.

LIFSCHYTZ, T.; SHALOM, G.; LERER, B.; NEWMAN, M. E. Sex-dependent effects of fluoxetine and triiodothyronine in the forced swim test in rats. **European neuropsychopharmacology**, v. 16, n. 2, p. 115-121, 2006.

LINDER, A. E.; DAVIS, R. P.; BURNETT, R.; WATTS, S. W. Function of the serotonin transporter in vasculature of the female rat: comparison with the male. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, v. 38, n. 5, p. 314, 2011.

LÓPEZ-MUÑOZ, F.; ALAMO, C. Monoaminergic neurotransmission: the history of the discovery of antidepressants from 1950s until today. **Current pharmaceutical design**, v. 15, n. 14, p. 1563-1586, 2009.

LÓPEZ, J. F.; LIBERZON, I.; VÁZQUEZ, D. M.; YOUNG, E. A.; WATSON, S. J. Serotonin 1A receptor messenger RNA regulation in the hippocampus after acute stress. **Biological psychiatry**, v. 45, n. 7, p. 934-937, 1999.

MARCUS, S. M.; YOUNG, E. A.; KERBER, K. B.; KORNSTEIN, S.; FARABAUGH, A. H.; MITCHELL, J.; WISNIEWSKI, S. R.; BALASUBRAMANI, G. K.; TRIVEDI, M. H.; RUSH, A. J. Gender differences in

depression: findings from the STAR* D study. **Journal of affective disorders**, v. 87, n. 2-3, p. 141-150, 2005.

MARTÉNYI, F.; DOSENBAACH, M.; MRAZ, K.; METCALFE, S. Gender differences in the efficacy of fluoxetine and maprotiline in depressed patients: a double-blind trial of antidepressants with serotonergic or norepinephrinergic reuptake inhibition profile. **European neuropsychopharmacology**, v. 11, n. 3, p. 227-232, 2001.

MATTHES, H.; BOSCHERT, U.; AMLAIKY, N.; GRAILHE, R.; PLASSAT, J.; MUSCATELLI, F.; MATTEI, M.; HEN, R. Mouse 5-hydroxytryptamine_{5A} and 5-hydroxytryptamine_{5B} receptors define a new family of serotonin receptors: cloning, functional expression, and chromosomal localization. **Molecular pharmacology**, v. 43, n. 3, p. 313-319, 1993.

MCCABE, C.; MISHOR, Z.; COWEN, P. J.; HARMER, C. J. Diminished neural processing of aversive and rewarding stimuli during selective serotonin reuptake inhibitor treatment. **Biological psychiatry**, v. 67, n. 5, p. 439-445, 2010.

MCCARTHY, M. M.; AUGER, A. P.; BALE, T. L.; DE VRIES, G. J.; DUNN, G. A.; FORGER, N. G.; MURRAY, E. K.; NUGENT, B. M.; SCHWARZ, J. M.; WILSON, M. E. The epigenetics of sex differences in the brain. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 41, p. 12815-12823, 2009.

MCLAUGHLIN, R. J.; HILL, M. N.; BAMBICO, F. R.; STUHR, K. L.; GOBBI, G.; HILLARD, C. J.; GORZALKA, B. B. Prefrontal cortical anandamide signaling coordinates coping responses to stress through a serotonergic pathway. **European neuropsychopharmacology**, v. 22, n. 9, p. 664-671, 2012.

MCNAMARA, R. K.; ABLE, J. A.; LIU, Y.; JANDACEK, R.; RIDER, T.; TSO, P.; LIPTON, J. W. Omega-3 fatty acid deficiency does not alter the effects of chronic fluoxetine treatment on central serotonin turnover or behavior in the forced swim test in female rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 114, p. 1-8, 2013.

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.

MITIC, M.; SIMIC, I.; DJORDJEVIC, J.; RADOJCIC, M. B.; ADZIC, M. Gender-specific effects of fluoxetine on hippocampal glucocorticoid receptor phosphorylation and behavior in chronically stressed rats. **Neuropharmacology**, v. 70, p. 100-111, 2013.

MIYAZAKI, K.; MIYAZAKI, K. W.; DOYA, K. The role of serotonin in the regulation of patience and impulsivity. **Molecular neurobiology**, v. 45, n. 2, p. 213-224, 2012.

MOCHIZUKI, D.; HOKONOHARA, T.; KAWASAKI, K.; MIKI, N. Repeated administration of milnacipran induces rapid desensitization of somatodendritic 5-HT_{1A} autoreceptors but not postsynaptic 5-HT_{1A} receptors. **Journal of Psychopharmacology**, v. 16, n. 3, p. 253-260, 2002.

MOLENDIJK, M. L.; DE KLOET, E. R. Immobility in the forced swim test is adaptive and does not reflect depression. **Psychoneuroendocrinology**, v. 62, p. 389-391, 2015.

MOLINA-HERNÁNDEZ, M.; TÉLLEZ-ALCÁNTARA, N. P. Fluoxetine, 17- β estradiol or folic acid combined with intra-lateral septal infusions of neuropeptide Y produced antidepressant-like actions in ovariectomized rats forced to swim. **Peptides**, v. 32, n. 12, p. 2400-2406, 2011.

MORGAN, M. A.; LEDOUX, J. E. Differential contribution of dorsal and ventral medial prefrontal cortex to the acquisition and extinction of conditioned fear in rats. **Behavioral neuroscience**, v. 109, n. 4, p. 681, 1995.

MORGAN, M. A.; ROMANSKI, L. M.; LEDOUX, J. E. Extinction of emotional learning: contribution of medial prefrontal cortex. **Neuroscience letters**, v. 163, n. 1, p. 109-113, 1993.

NAPIER, C.; STEWART, M.; MELROSE, H.; HOPKINS, B.; MCHARG, A.; WALLIS, R. Characterisation of the 5-HT receptor binding profile of eletriptan and kinetics of [3 H] eletriptan binding at human 5-HT $_1$ B and 5-HT $_1$ D receptors. **European journal of pharmacology**, v. 368, n. 2-3, p. 259-268, 1999.

NAVARRIA, A.; WOHLER, E. S.; VOLETI, B.; OTA, K. T.; DUTHEIL, S.; LEPACK, A. E.; DWYER, J. M.; FUCHIKAMI, M.; BECKER, A.; DRAGO, F. Rapid antidepressant actions of scopolamine: role of medial prefrontal cortex and M1-subtype muscarinic acetylcholine receptors. **Neurobiology of disease**, v. 82, p. 254-261, 2015.

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

NEWMAN-TANCREDI, A.; VERRIELE, L.; CHAPUT, C.; MILLAN, M. Labelling of recombinant human and native rat serotonin 5-HT $_1$ A receptors by a novel, selective radioligand, [3 H]-S 15535: definition of its binding profile using agonists, antagonists and inverse agonists. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 357, n. 3, p. 205-217, 1998.

ORENDAIN-JAIME, E. N.; ORTEGA-IBARRA, J. M.; LÓPEZ-PÉREZ, S. J. Evidence of sexual dimorphism in D1 and D2 dopaminergic receptors expression in frontal cortex and striatum of young rats. **Neurochemistry international**, v. 100, p. 62-66, 2016.

PAZOS, A.; CORTES, R.; PALACIOS, J. Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. II. Serotonin-2 receptors. **Brain research**, v. 346, n. 2, p. 231-249, 1985.

PAZOS, A.; PALACIOS, J. Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. I. Serotonin-1 receptors. **Brain research**, v. 346, n. 2, p. 205-230, 1985.

PEREIRA, A.; CARVALHO, M.; PADOVAN, C. Both serotonergic and noradrenergic systems modulate the development of tolerance to chronic stress in rats with lesions of the serotonergic neurons of the median raphe nucleus. **Behavioural brain research**, v. 357, p. 39-47, 2019.

PEREIRA, V. S.; ROMANO, A.; WEGENER, G.; JOCA, S. R. Antidepressant-like effects induced by NMDA receptor blockade and NO synthesis inhibition in the ventral medial prefrontal cortex of rats exposed to the forced swim test. **Psychopharmacology**, v. 232, n. 13, p. 2263-2273, 2015.

PIC-TAYLOR, A.; DA MOTTA, L. G.; DE MORAIS, J. A.; JUNIOR, W. M.; SANTOS, A. D. F. A.; CAMPOS, L. A.; MORTARI, M. R.; VON ZUBEN, M. V.; CALDAS, E. D. Behavioural and neurotoxic effects of ayahuasca infusion (*Banisteriopsis caapi* and *Psychotria viridis*) in female Wistar rat. **Behavioural processes**, v. 118, p. 102-110, 2015.

POMPEIANO, M.; PALACIOS, J. M.; MENGOD, G. Distribution and cellular localization of mRNA coding for 5-HT_{1A} receptor in the rat brain: correlation with receptor binding. **Journal of Neuroscience**, v. 12, n. 2, p. 440-453, 1992.

_____. Distribution of the serotonin 5-HT₂ receptor family mRNAs: comparison between 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. **Molecular Brain Research**, v. 23, n. 1-2, p. 163-178, 1994.

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

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.

POSSAMAI, F.; DOS SANTOS, J.; WALBER, T.; MARCON, J. C.; DOS SANTOS, T. S.; DE OLIVEIRA, C. L. Influence of enrichment on behavioral and neurogenic effects of antidepressants in Wistar rats submitted to repeated forced swim test. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 58, p. 15-21, 2015.

PRICE, J.; COLE, V.; GOODWIN, G. M. Emotional side-effects of selective serotonin reuptake inhibitors: qualitative study. **The British Journal of Psychiatry**, v. 195, n. 3, p. 211-217, 2009.

PUGLISI-ALLEGRA, S.; ANDOLINA, D. Serotonin and stress coping. **Behavioural brain research**, v. 277, p. 58-67, 2015.

PUIG, M. V.; ARTIGAS, F.; CELADA, P. Modulation of the activity of pyramidal neurons in rat prefrontal cortex by raphe stimulation in vivo: involvement of serotonin and GABA. **Cerebral Cortex**, v. 15, n. 1, p. 1-14, 2004.

PUIG, M. V.; GULLEDGE, A. T. Serotonin and prefrontal cortex function: neurons, networks, and circuits. **Molecular neurobiology**, v. 44, n. 3, p. 449-464, 2011.

RAGOZZINO, M. E.; WILCOX, C.; RASO, M.; KESNER, R. P. Involvement of rodent prefrontal cortex subregions in strategy switching. **Behavioral neuroscience**, v. 113, n. 1, p. 32, 1999.

RAMBOZ, S.; OOSTING, R.; AMARA, D. A.; KUNG, H. F.; BLIER, P.; MENDELSON, M.; MANN, J. J.; BRUNNER, D.; HEN, R. Serotonin receptor 1A knockout: an animal model of anxiety-related disorder. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 24, p. 14476-14481, 1998.

RAMOS-HRYB, A. B.; HARRIS, C.; AIGHEWI, O.; LINO-DE-OLIVEIRA, C. How would publication bias distort the estimated effect size of prototypic antidepressants in the forced swim test? **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, 2018.

RÉCAMIER-CARBALLO, S.; ESTRADA-CAMARENA, E.; REYES, R.; FERNÁNDEZ-GUASTI, A. Synergistic effect of estradiol and fluoxetine in young adult and middle-aged female rats in two models of experimental depression. **Behavioural brain research**, v. 233, n. 2, p. 351-358, 2012.

REX, A.; VOIGT, J.; FINK, H. Anxiety but not arousal increases 5 - hydroxytryptamine release in the rat ventral hippocampus in vivo. **European Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 5, p. 1185-1189, 2005.

REYNOLDS, G. P.; MCGOWAN, O. O.; DALTON, C. F. Pharmacogenomics in psychiatry: the relevance of receptor and transporter polymorphisms. **British journal of clinical pharmacology**, v. 77, n. 4, p. 654-672, 2014.

RIAD, M.; KOBERT, A.; DESCARRIES, L.; BOYE, S.; ROMPRÉ, P.-P.; LACAÏLLE, J.-C. Chronic fluoxetine rescues changes in plasma membrane density of 5-HT_{1A} autoreceptors and serotonin transporters in the olfactory bulbectomy rodent model of depression. **Neuroscience**, v. 356, p. 78-88, 2017.

ROBERTS, M.; STRAUGHAN, D. Excitation and depression of cortical neurones by 5 - hydroxytryptamine. **The Journal of physiology**, v. 193, n. 2, p. 269-294, 1967.

RUAT, M.; TRAIFFORT, E.; LEURS, R.; TARDIVEL-LACOMBE, J.; DIAZ, J.; ARRANG, J.-M.; SCHWARTZ, J.-C. Molecular cloning, characterization, and localization of a high-affinity serotonin receptor (5-HT₇) activating cAMP formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 18, p. 8547-8551, 1993.

RUSH, A. J.; TRIVEDI, M. H.; WISNIEWSKI, S. R.; STEWART, J. W.; NIERENBERG, A. A.; THASE, M. E.; RITZ, L.; BIGGS, M. M.; WARDEN, D.; LUTHER, J. F. Bupropion-SR, sertraline, or venlafaxine-XR after failure of SSRIs for depression. **New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 12, p. 1231-1242, 2006.

SANTANA, N.; BORTOLOZZI, A.; SERRATS, J.; MENGOD, G.; ARTIGAS, F. Expression of serotonin_{1A} and serotonin_{2A} receptors in pyramidal and GABAergic neurons of the rat prefrontal cortex. **Cerebral Cortex**, v. 14, n. 10, p. 1100-1109, 2004.

SARTIM, A.; GUIMARÃES, F.; JOCA, S. Antidepressant-like effect of cannabidiol injection into the ventral medial prefrontal cortex—Possible involvement of 5-HT_{1A} and CB₁ receptors. **Behavioural brain research**, v. 303, p. 218-227, 2016.

SCHILDKRAUT, J. J.; KETY, S. S. Biogenic amines and emotion. **Science**, v. 156, n. 3771, p. 21-30, 1967.

SCHILLER, L.; JÄHKEL, M.; OEHLER, J. The influence of sex and social isolation housing on pre- and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors. **Brain research**, v. 1103, n. 1, p. 76-87, 2006.

SCOPINHO, A. A.; SCOPINHO, M.; LISBOA, S. F.; DE AGUIAR CORREA, F. M.; GUIMARÃES, F. S.; JOCA, S. R. L. Acute reversible inactivation of the ventral medial prefrontal cortex induces antidepressant-like effects in rats. **Behavioural brain research**, v. 214, n. 2, p. 437-442, 2010.

SELL, S. L.; CRAFT, R. M.; SEITZ, P. K.; STUTZ, S. J.; CUNNINGHAM, K. A.; THOMAS, M. L. Estradiol-sertraline synergy in ovariectomized rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 33, n. 8, p. 1051-1060, 2008.

SHANNON, N.; GUNNET, J.; MOORE, K. A comparison of biochemical indices of 5 - hydroxytryptaminergic neuronal activity following electrical stimulation of the dorsal raphe nucleus. **Journal of neurochemistry**, v. 47, n. 3, p. 958-965, 1986.

SHARMA, J. Microiontophoretic application of some monoamines and their antagonists to cortical neurones of the rat. **Neuropharmacology**, v. 16, n. 2, p. 83-88, 1977.

SHELTON, R. C. Classification of antidepressants and their clinical implications. **Primary Care Companion. J Clin Psychol**, v. 5, p. 27-32, 2003.

- SHEN, Y.; MONSMA, F.; METCALF, M.; JOSE, P.; HAMBLIN, M.; SIBLEY, D. Molecular cloning and expression of a 5-hydroxytryptamine₇ serotonin receptor subtype. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 24, p. 18200-18204, 1993.
- SIESSER, W. B.; SACHS, B. D.; RAMSEY, A. J.; SOTNIKOVA, T. D.; BEAULIEU, J.-M.; ZHANG, X.; CARON, M. G.; GAINETDINOV, R. R. Chronic SSRI treatment exacerbates serotonin deficiency in humanized Tph2 mutant mice. **ACS chemical neuroscience**, v. 4, n. 1, p. 84-88, 2012.
- SLATTERY, D. A.; NEUMANN, I. D.; CRYAN, J. F. Transient inactivation of the infralimbic cortex induces antidepressant-like effects in the rat. **Journal of Psychopharmacology**, v. 25, n. 10, p. 1295-1303, 2011.
- SOUBRIE, P.; MARTIN, P.; EL MESTIKAWY, S.; THIEBOT, M.; SIMON, P.; HAMON, M. The lesion of serotonergic neurons does not prevent antidepressant-induced reversal of escape failures produced by inescapable shocks in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 25, n. 1, p. 1-6, 1986.
- SZABADI, E.; BRADSHAW, C.; BEVAN, P. Excitatory and depressant neuronal responses to noradrenaline, 5-hydroxytryptamine and mescaline: the role of the baseline firing rate. **Brain research**, v. 126, n. 3, p. 580-583, 1977.
- UDENFRIEND, S. Amino acid decarboxylation steps in the biosynthesis of norepinephrine, serotonin, and histamine. In: (Ed.). **Vitamins & Hormones**: Elsevier, v.22, 1964. p.445-450. ISBN 0083-6729.
- VAN EDEN, C.; UYLINGS, H. Cytoarchitectonic development of the prefrontal cortex in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 241, n. 3, p. 253-267, 1985.
- VERTES, R. P. Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. **Synapse**, v. 51, n. 1, p. 32-58, 2004.
- WEDZONY, K.; CHOCYK, A.; MACKOWIAK, M.; FIJAL, K.; CZYRAK, A. Cortical localization of dopamine D4 receptors in the rat brain-immunocytochemical study. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 51, n. 2, 2000.
- XIAO, J.; SONG, M.; LI, F.; LIU, X.; ANWAR, A.; ZHAO, H. Effects of GABA microinjection into dorsal raphe nucleus on behavior and activity of lateral habenular neurons in mice. **Experimental neurology**, v. 298, p. 23-30, 2017.
- YIN, L.; RASCH, M. J.; HE, Q.; WU, S.; DOU, F.; SHU, Y. Selective modulation of axonal sodium channel subtypes by 5-HT_{1A} receptor in cortical pyramidal neuron. **Cerebral Cortex**, v. 27, n. 1, p. 509-521, 2017.
- YOUNG, E. A.; KORNSTEIN, S. G.; MARCUS, S. M.; HARVEY, A. T.; WARDEN, D.; WISNIEWSKI, S. R.; BALASUBRAMANI, G.; FAVA, M.; TRIVEDI, M. H.; RUSH, A. J. Sex differences in response to citalopram: a STAR*D report. **Journal of psychiatric research**, v. 43, n. 5, p. 503-511, 2009.
- ZHANG, H.; LI, K.; CHEN, H.-S.; GAO, S.-Q.; XIA, Z.-X.; ZHANG, J.-T.; WANG, F.; CHEN, J.-G. Dorsal raphe projection inhibits the excitatory inputs on lateral habenula and alleviates depressive behaviors in rats. **Brain Structure and Function**, v. 223, n. 5, p. 2243-2258, 2018.

ZHONG, P.; YAN, Z. Distinct physiological effects of dopamine D4 receptors on prefrontal cortical pyramidal neurons and fast-spiking interneurons. **Cerebral Cortex**, v. 26, n. 1, p. 180-191, 2014.

ZOHAR, I.; DOSORETZ-ABITTAN, L.; SHOHAM, S.; WEINSTOCK, M. Sex dependent reduction by prenatal stress of the expression of 5HT1A receptors in the prefrontal cortex and CRF type 2 receptors in the raphe nucleus in rats: reversal by citalopram. **Psychopharmacology**, v. 232, n. 9, p. 1643-1653, 2015.

APÊNDICE A

Revisão sistemática e meta-análise

Metodologia

O protocolo na íntegra de nossa revisão sistemática está publicado na plataforma *Open Science Framework* (OSF) (Domingues e Lino de Oliveira, 2018, <https://osf.io/wfsv6/>). E foi desenvolvido com base no formato da plataforma *Systematic Review Center for Laboratory animal Experimentation* (SYRCLE).

A busca foi realizada na plataforma PubMed utilizando a ferramenta de pesquisa avançada (*Advanced search*: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) com operadores booleanos, e as palavras chave foram definidas de acordo com publicações e protocolos anteriores do nosso grupo, publicados na plataforma SYRF (RAMOS-HRYB *et al.*, 2018) (protocolo na íntegra disponível em: <https://drive.google.com/file/d/0B30wfjnG6aEQRTdBRnFPRWIOcFU/view>), assim como as palavras chave utilizadas nos artigos de interesse (quadro 1)

Quadro 1 – Estratégia de busca

	Palavras-chave
Para o teste comportamental	<i>forced swimming test OR forced swimming tests OR forced swimming test, fst OR fst OR forced swim OR Porsolt test OR Porsolt tests.</i>
Para a população	<i>"rodentia"[MeSH Terms] OR mice[Tiab] OR mus[Tiab] OR mouse[Tiab] OR murine[Tiab] OR woodmouse[tiab] OR rats[Tiab] OR rat[Tiab] OR murinae[Tiab] OR muridae[Tiab] OR cottonrat[tiab] OR cottonrats[tiab] OR rodentia[Tiab] OR rodent[Tiab] OR rodents[Tiab].</i>

Para a região encefálica	<i>medial prefrontal cortex OR medial pre frontal cortex OR medial PFC OR mPFC OR infralimbic córtex OR ventromedial pré-frontal cortex OR ventromedial PFC OR vmPFC or Cingulate cortex</i>
--------------------------	---

Palavras-chave utilizadas para a busca na base de dados

Também foram selecionados trabalhos a partir de 1977, visto que o TNF começou a ser utilizado deste ano em diante (PORSOLT *et al.*, 1977), até a presente data (dezembro, 2018). Essa busca inicial, retornou com um total de 216 artigos.

Apesar de serem utilizadas as palavras chave que definem tanto ratos, quanto camundongos, o interesse deste trabalho é somente em estudos utilizando ratos. A filtragem foi feita pelos critérios de inclusão e exclusão, pois foi detectado que, ao usar somente as palavras chave para “rato”, surgiam trabalhos utilizando camundongo, e utilizando as palavras chave para “camundongo” também surgiam trabalhos de rato. Então para evitar perdas, a seleção de trabalhos com ratos (de qualquer linhagem e sexo) foi realizada após a busca. Foram selecionados somente os trabalhos utilizando ratos, visto que o protocolo do TNF difere entre as espécies sendo, nos ratos duas sessões e nos camundongos apenas uma.

Foram incluídos estudos com qualquer desenho experimental, que tenham feito manipulação no CPFm (inibição, ativação) e avaliado o comportamento no TNF. Foram excluídos estudos que utilizassem modelos experimentais de patologias, tratamento intra-peritoneal (i.p), ou que não avaliassem o comportamento.

Da busca realizada na data 20/12/2018 resultou em 220 artigos (Fig. 1). Deste total, após uma análise criteriosa dos títulos, “*abstracts*” e textos na íntegra foram aplicados os critérios de inclusão e exclusão definidos previamente com base na pergunta para esta revisão, esta fase foi encerrada com 39 artigos para análise de qualidade seguindo a tabela do grupo CAMARADES (DE VRIES *et al.*, 2015).

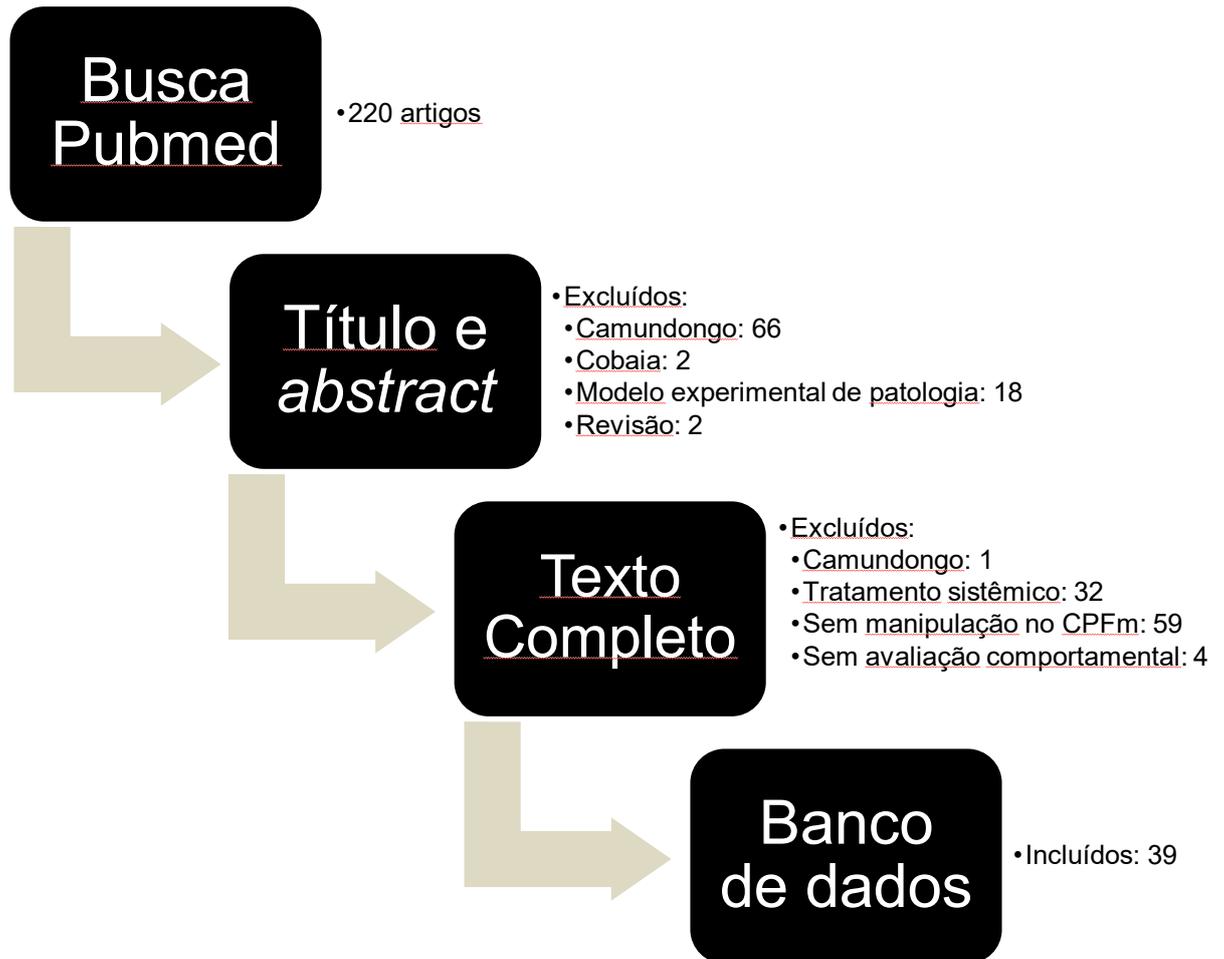


Figura 1. Fluxograma da revisão sistemática, aplicando os critérios de inclusão e exclusão, primeiramente ao título e *abstract*, e depois ao texto completo

A extração dos dados (média, erro, desvio padrão, número de animais, etc) para a meta-análise foi feita do texto quando, e se, estes valores forem fornecidos ou usando a ferramenta de medição do Adobe Acrobat Reader® para extração dos dados das imagens dos gráficos. Quando somente for fornecido uma faixa de número de animais usados e não o número exato para cada grupo, será usado a mediana dessa faixa, arredondada para baixo se a mediana não for um número inteiro.

Os 39 artigos finais (que correspondem a 64 estudos, visto que alguns artigos apresentavam mais de um experimento independente) foram submetidos à Meta-análise utilizando o Modelo de efeitos variáveis (*Random-Effects Model*), utilizando o programa R® (software livre, disponível em: <https://www.r-project.org/>) com o pacote de análise específico para meta-análise, “Metafor” (livre uso e acesso, download

disponível em: <http://www.metafor-project.org>). A análise do tamanho de efeito foi realizada pelo “g” de Hedges:

$$g = \frac{X1 - X2}{SD}$$

Sendo, X1 = média do grupo experimental; X2 = média do grupo controle; SD = desvio padrão combinado, calculado por:

$$SD = \sqrt{\frac{(n1 - 1).SD1^2 + (n2 - 1).SD2^2}{n1 + n2 - 2}}$$

Sendo, n1 = número de animais do grupo experimental, SD1² = desvio padrão do grupo experimental ao quadrado; n2 = número de animais do grupo controle; SD2² = desvio padrão do grupo controle ao quadrado.

Resultados

O resultado da aplicação do Modelo de efeitos variáveis (número de estudos analisados, k = 63) nos mostra que existe um efeito relatado na literatura, que aponta para a redução do comportamento de imobilidade (efeito estimado = -0,7656) (Fig. 2), e que este efeito é significativo (p = <0,0001). No entanto, a análise apontou uma alta heterogeneidade nos estudos (HIGGINS *et al.*, 2003) (I² = 84,03%). Tal heterogeneidade poderia ser fruto de diferenças entre fatores dos estudos e desenhos experimentais. De fato, dentro desta análise total, os estudos diferem principalmente entre região encefálica manipulada: Córtex infralímbico (IL), córtex prélimbico (PL), córtex pré-frontal medial (CPFm), córtex pré-frontal ventromedial (CPFvm), cíngulo anterior (acg), e tipo de manipulação (ativação, inibição, lesão). Desta maneira, estes estudos não são comparáveis entre si.

Sendo assim, foi realizada uma meta-análise estratificada a fim de estudar a influência de cada manipulação nas diferentes regiões encefálicas estudadas. Os estudos foram divididos em subgrupos, definidos pelas diferentes sub-regiões avaliadas: IL, PL, CPFm, CPFvm e acg. Esta divisão foi realizada de acordo com as definições dos autores de cada artigo. Os estudos de cada região também foram divididos quanto às manipulações realizadas (excitatórias, inibitórias ou desconhecidas). Esta divisão foi realizada de acordo com as discussões dos autores de cada artigo, ou sobre o efeito individual do receptor de interesse no estudo.

Foram aplicados aos subgrupos o mesmo modelo estatístico para avaliação do efeito observado sobre o comportamento de imobilidade no TNF.

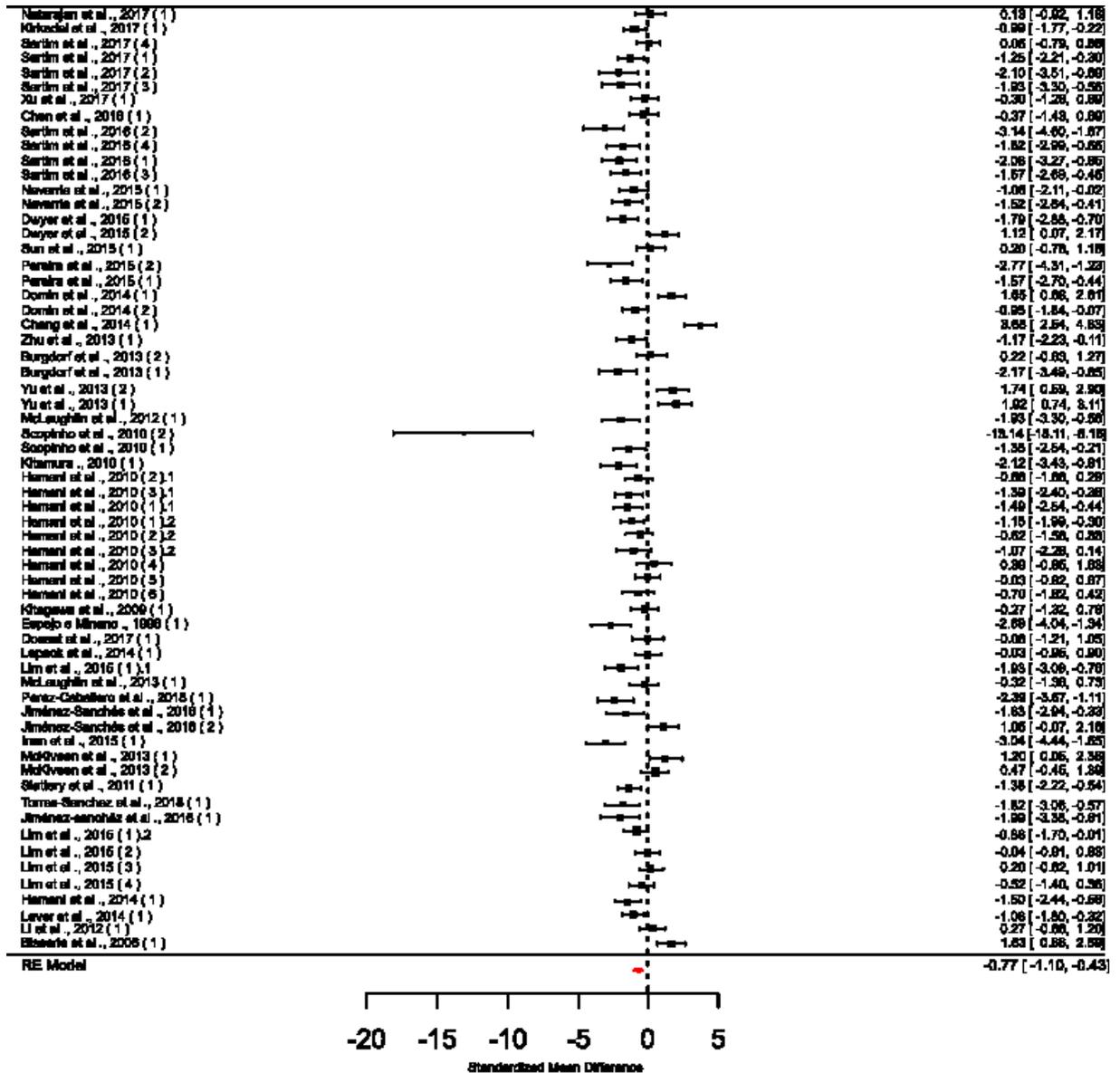
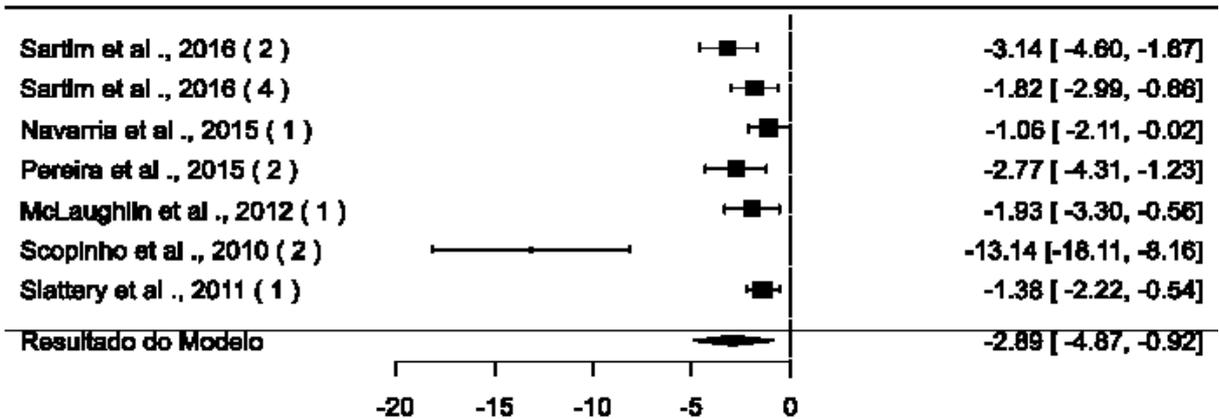
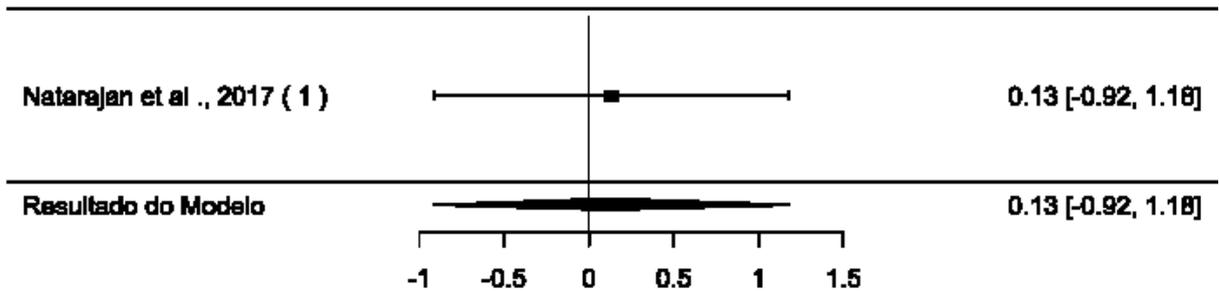


Figura A1. Forest Plot e resultado da meta-análise estratificada com aplicação do modelo de efeitos aleatórios. Mostrando os efeitos observados para cada estudo individual (quadrados pretos) com seus respectivos intervalos de confiança (linhas horizontais) e o efeito da meta análise total (losango vermelho). Estudos localizados à esquerda da linha pontilhada (aqui representando o 0, ou seja, ausência de efeito) indicam manipulações que diminuíram o tempo de imobilidade, e estudos localizados à direita da linha pontilhada indicam manipulações que aumentaram o tempo de imobilidade.

a. Inibição IL



b. Ativação IL



c. Desconhecido IL

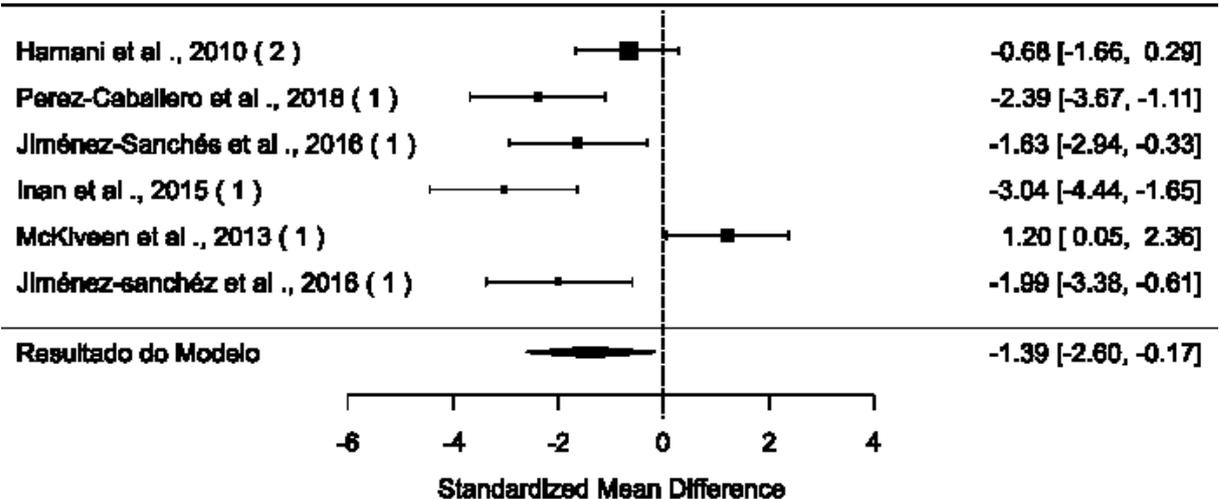


Figura A2. Forest Plot e resultado da meta-análise estratificada com aplicação do modelo de efeitos aleatórios. Mostrando os efeitos observados para cada estudo individual (quadrados pretos) com seus respectivos intervalos de confiança (linhas horizontais) e o efeito da meta análise de cada subgrupo (losangos pretos). Estudos localizados à esquerda das linhas pontilhadas (aqui representando o 0, ou seja, ausência de efeito) indicam manipulações que diminuíram o tempo de imobilidade, e estudos localizados à direita das linhas pontilhadas indicam manipulações que aumentaram o tempo de imobilidade.

Para o subgrupo de inibição do IL (fig. 3a) (número de estudos analisados, $k = 7$), podemos observar um efeito de redução de imobilidade (efeito estimado = $-2,8942$) e que este efeito é significativo ($p = 0,0040$). No entanto, ainda é observada uma alta heterogeneidade entre os estudos (HIGGINS *et al.*, 2003) ($I^2 = 93,49\%$). Esta heterogeneidade pode ser influenciada pelo estudo cujo resultado no forest plot (Fig. 2) se encontra mais afastado dos outros (SCOPINHO *et al.*, 2010). O que, além de conferir heterogeneidade à análise, pode exercer uma influência no efeito total do modelo, induzindo um erro do tipo 1. Desta maneira, foi feita a análise de “*leave-one-out*” para testar a influência de um estudo individual do resultado do subgrupo (Fig. 3).

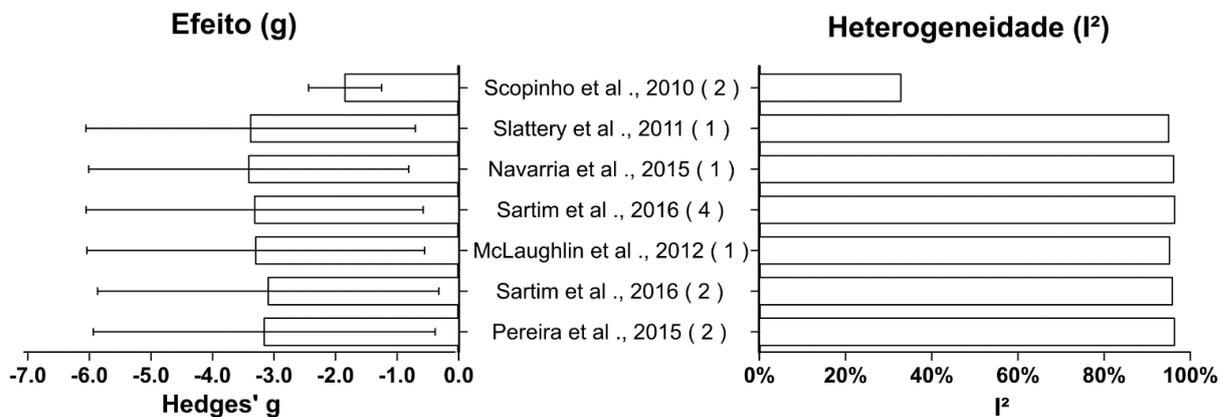


Figura A3. Teste “*leave-one-out*”. Efeito (G de Hedges) versus Heterogeneidade. As barras à direita representam o tamanho de efeito (representado pelo G de Hedges) na ausência do estudo localizado na mesma linha ao centro, e as barras à esquerda a porcentagem de heterogeneidade (I^2) nas mesmas condições.

A fig. 4 é representação gráfica da análise “*leave-one-out*”, e pode-se observar que, ao retirar o primeiro estudo (SCOPINHO *et al.*, 2010), a heterogeneidade deste subgrupo foi reduzida, podendo ser considerada baixa (HIGGINS *et al.*, 2003), ao passo que a retirada dos outros estudos não contribuiu para uma redução da heterogeneidade..

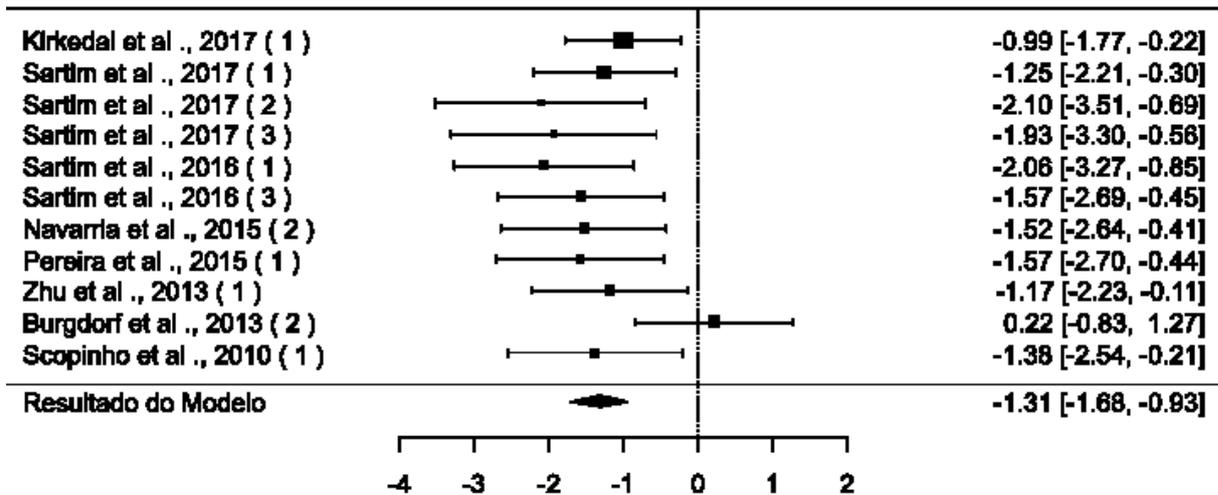
Assim, ao ser retirado o estudo de Scopinho *et al* (2010), a heterogeneidade da amostra foi reduzida ($I^2 = 32,8842\%$), para um nível considerado baixo (HIGGINS *et al.*, 2003). Também foi observado que, apesar desta exclusão, o efeito de redução de

imobilidade se mantém (efeito estimado = -1,8484) e também se mantém significativa ($p < 0,00001$). Desta forma, pode-se concluir que, após esta análise, não há variabilidade entre os estudos, e eles podem ser agrupados.

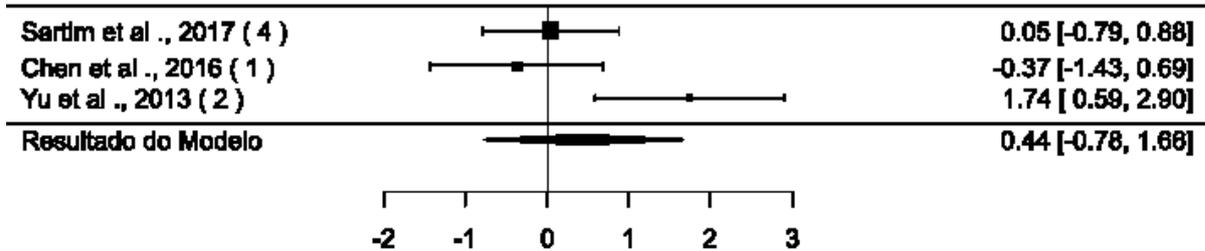
Para o subgrupo ativação do IL (fig. 3b) (número de trabalhos analisados, $k = 1$), foi observado um efeito de aumento da imobilidade (efeito estimado = 0,1319), porém, este efeito não é significativo ($p = 0,8067$). E visto que temos somente 1 trabalho (NAVARRIA *et al.*, 2015), não há heterogeneidade.

Para o subgrupo efeito desconhecido no IL (fig. 3c) (número de trabalhos analisados, $k = 6$), foi observado um efeito de redução de imobilidade (efeito estimado = -1,3856), e este efeito é significativo ($p = 0,0256$). Foi observada também uma alta heterogeneidade (HIGGINS *et al.*, 2003) ($I^2 = 82,85\%$), o que pode ser derivado de manipulações variadas realizadas pelos diferentes estudos. De fato, as manipulações podem ser tanto inibitórias como excitatórias, desta forma, a alta heterogeneidade deste grupo é esperada, no entanto os resultados não são comparáveis.

a. Inibição PL



b. Ativação PL



c. Efeito desconhecido PL

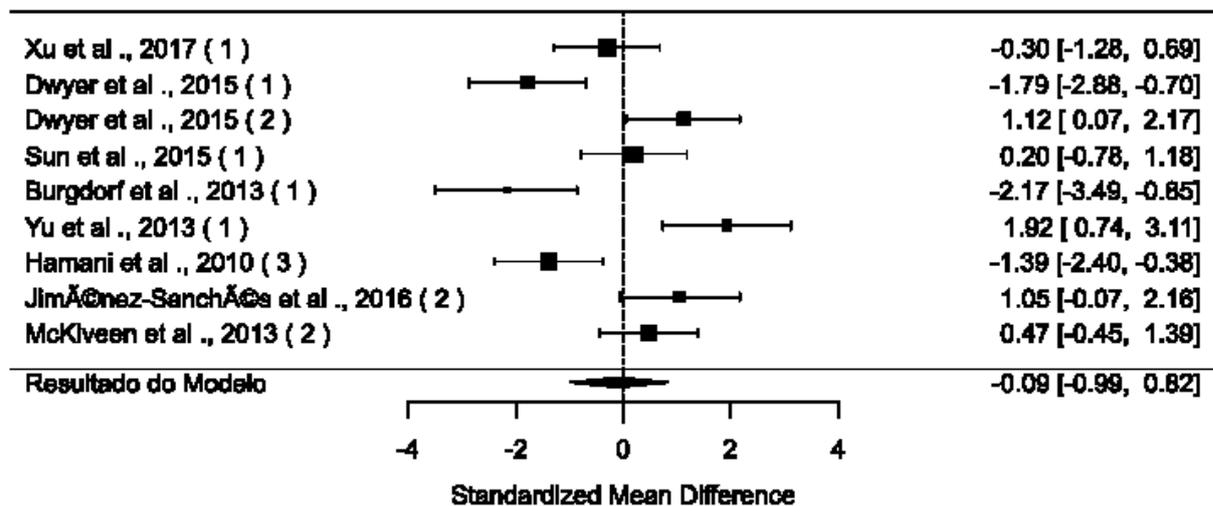


Figura A4. Forest Plot e resultado da meta-análise estratificada com aplicação do modelo de efeitos aleatórios. Mostrando os efeitos observados para cada estudo individual (quadrados pretos) com seus respectivos intervalos de confiança (linhas horizontais) e o efeito da meta análise de cada subgrupo (losangos pretos). Estudos localizados à esquerda das linhas pontilhadas (aqui representando o 0, ou seja, ausência de efeito) indicam manipulações que diminuíram o tempo de imobilidade, e estudos

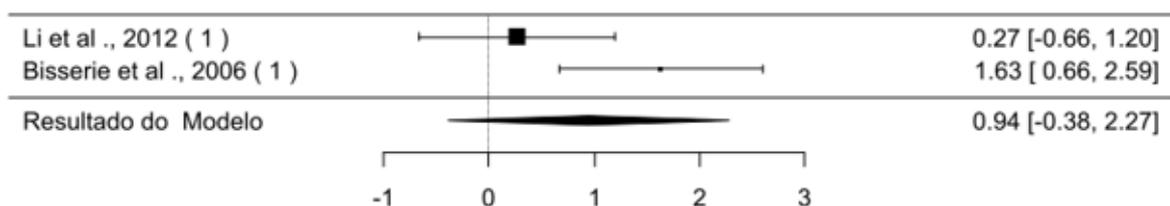
localizados à direita das linhas pontilhadas indicam manipulações que aumentaram o tempo de imobilidade.

Para o subgrupo inibição do PL (fig. 5a) (número de trabalhos analisados, $k = 11$), foi observado um efeito de redução de imobilidade (efeito estimado = -1,3091) e que este efeito é significativo ($p = <0,0001$). Foi observada também uma baixa heterogeneidade (HIGGINS *et al.*, 2003) ($I^2 = 22,67\%$), mostrando que os estudos não são variáveis, e podem ser agrupados.

Para o subgrupo ativação do PL (fig. 5b) (número de trabalhos analisados, $k = 3$), foi observado um efeito de diminuição de imobilidade (efeito estimado = -1,3091), porém este efeito não é significativo ($p = 0,4786$). Foi observada também uma alta heterogeneidade (HIGGINS *et al.*, 2003) ($I^2 = 77,12\%$), porém não fomos capazes de atribuir a um estudo específico.

Para o subgrupo efeito desconhecido no PL (fig. 5c) (número de trabalhos analisados, $k = 9$), foi observado um efeito de diminuição de imobilidade (efeito estimado = -0,0883), porém este efeito não é significativo ($p = 0,8484$). Foi observada também uma alta heterogeneidade (HIGGINS *et al.*, 2003) ($I^2 = 84,68\%$), De fato, as manipulações podem ser tanto inibitórias como excitatórias, desta forma, a alta heterogeneidade deste grupo é esperada.

a. inibição acg



b. Efeito desconhecido acg

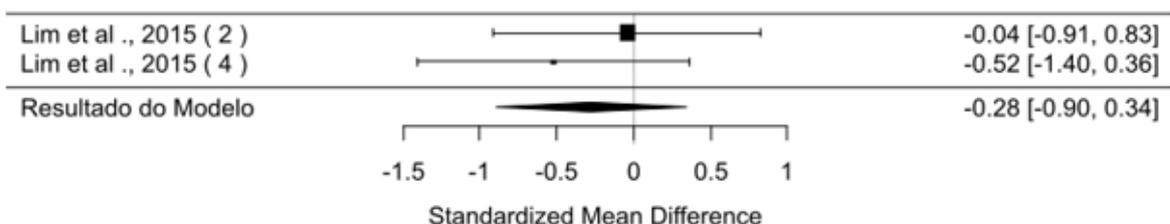


Figura A5. Forest Plot e resultado da meta-análise estratificada com aplicação do modelo de efeitos aleatórios. Mostrando os efeitos observados para cada estudo individual (quadrados pretos) com seus respectivos intervalos de confiança (linhas horizontais) e o efeito da meta análise de cada subgrupo

(losangos pretos). Estudos localizados à esquerda das linhas pontilhadas (aqui representando o 0, ou seja, ausência de efeito) indicam manipulações que diminuíram o tempo de imobilidade, e estudos localizados à direita das linhas pontilhadas indicam manipulações que aumentaram o tempo de imobilidade.

Para o subgrupo inibição do acg (fig. 6a) (número de trabalhos analisados, $k = 2$), foi observado um efeito de aumento de imobilidade (efeito estimado = 0,9445), porém, este efeito não é significativo ($p = 0,1636$). Foi observada uma heterogeneidade média (HIGGINS *et al.*, 2003) ($I^2 = 74,63\%$).

Não houve casos para os subgrupos ativação do acg.

Para o subgrupo efeito desconhecido do acg (fig. 6b) (número de trabalhos analisados, $k = 2$), foi observado um efeito de diminuição de imobilidade (efeito estimado = -0,2774), porém, este efeito não é significativo ($p = 0,3797$). Foi observada uma heterogeneidade igual a zero (0,0%)

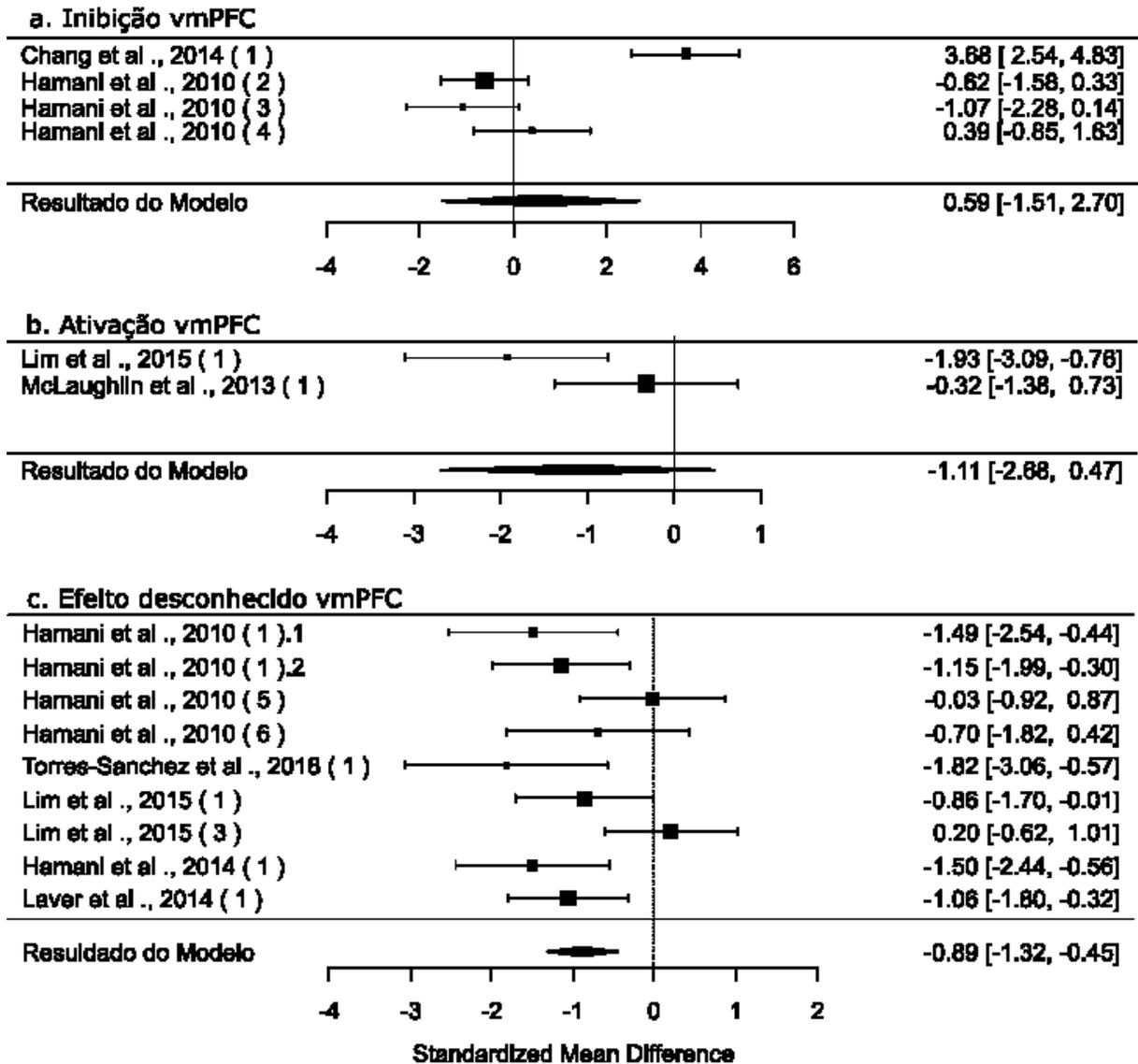


Figura A6. Forest Plot e resultado da meta-análise estratificada com aplicação do modelo de efeitos aleatórios. Mostrando os efeitos observados para cada estudo individual (quadrados pretos) com seus respectivos intervalos de confiança (linhas horizontais) e o efeito da meta análise de cada subgrupo (losangos pretos). Estudos localizados à esquerda das linhas pontilhadas (aqui representando o 0, ou seja, ausência de efeito) indicam manipulações que diminuíram o tempo de imobilidade, e estudos localizados à direita das linhas pontilhadas indicam manipulações que aumentaram o tempo de imobilidade.

Para o subgrupo de inibição do vmPFC (fig.7a) (número de trabalhos analisados, $k = 4$), foi observado um efeito de aumento de imobilidade (efeito estimado = 0,5907), porém este efeito não é significativo ($p = 0,5824$). Foi observada uma alta heterogeneidade (HIGGINS *et al.*, 2003) ($I^2 = 92,82\%$). Devido a esta alta

heterogeneidade, foi novamente feita uma análise de “leave one out”. Somente um dos estudos (CHANG *et al.*, 2014) é responsável por acrescentar heterogeneidade à amostra, no entanto, a retirada dele não torna o resultado do modelo estatisticamente significativo, desta maneira mantivemos a análise original.

Para o subgrupo de ativação do vmPFC (fig. 7b) (número de trabalhos analisados, $k = 2$), foi observado um efeito de diminuição de imobilidade (efeito estimado = -1,1057), porém este efeito não é significativo ($p = 0,1682$). Foi observada também, uma heterogeneidade média (HIGGINS *et al.*, 2003) ($I^2 = 75,06\%$).

Para o subgrupo de efeito desconhecido no vmPFC (fig.7c) (número de trabalhos analisados $k = 9$), foi observado um efeito de diminuição do tempo de imobilidade (efeito estimado = -0,8859), e este efeito é significativo ($p < 0,0001$). Foi observada uma heterogeneidade média (HIGGINS *et al.*, 2003) ($I^2 = 50,23\%$). Este efeito significativo observado pode ser devido ao grande número de estudos que utilizam estimulação elétrica profunda, que foi colocada nesta categoria por não se saber seu efeito sobre a atividade dos neurônios da região alvo (CHIKEN e NAMBU, 2016).

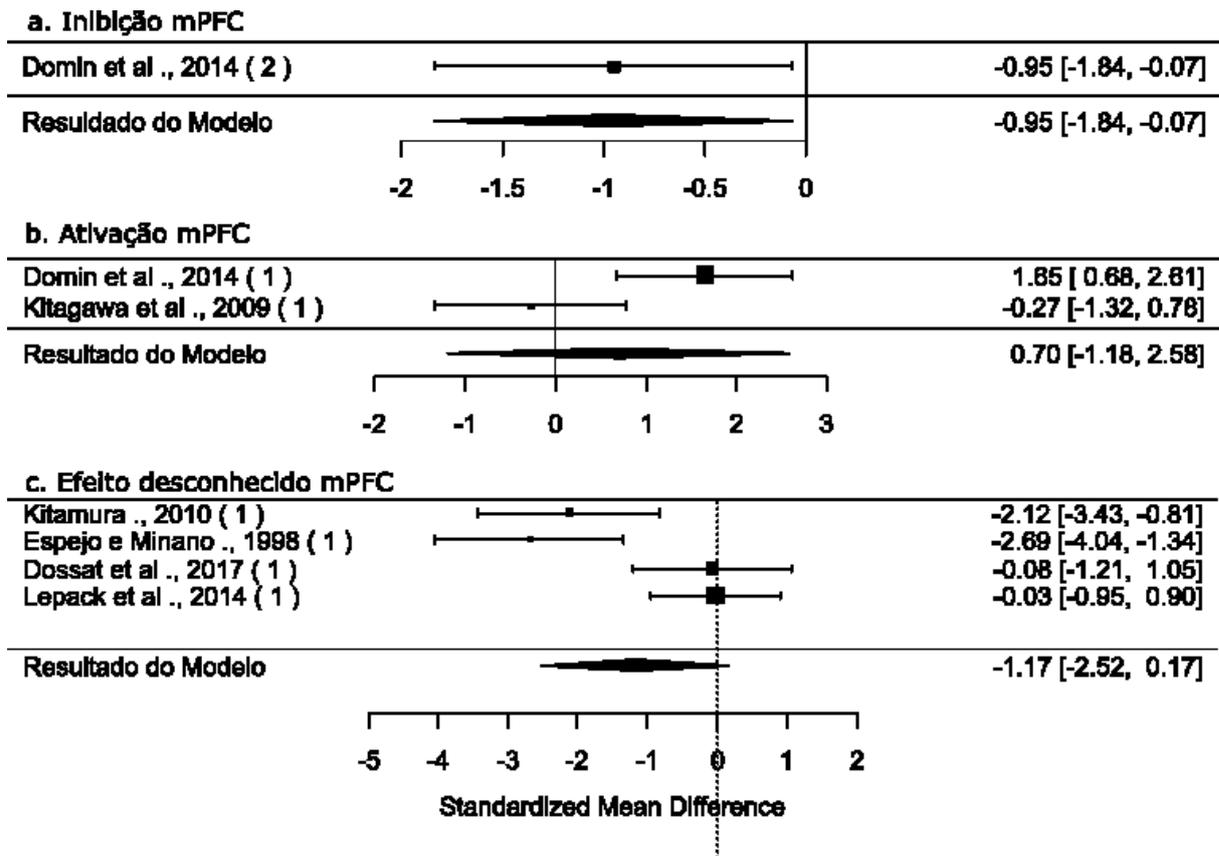


Figura A7. Forest Plot e resultado da meta-análise estratificada com aplicação do modelo de efeitos aleatórios. Mostrando os efeitos observados para cada estudo individual (quadrados pretos) com seus respectivos intervalos de confiança (linhas horizontais) e o efeito da meta análise de cada subgrupo (losangos pretos). Estudos localizados à esquerda das linhas pontilhadas (aqui representando o 0, ou seja, ausência de efeito) indicam manipulações que diminuíram o tempo de imobilidade, e estudos localizados à direita das linhas pontilhadas indicam manipulações que aumentaram o tempo de imobilidade.

Para o subgrupo de inibição do mPFC (fig. 8a) (número de trabalhos analisados, $k = 1$), foi observado um efeito de diminuição do tempo de imobilidade (efeito estimado = -0,9531), e este efeito é significativo ($p = 0,0342$).

Para o subgrupo de ativação do mPFC (fig. 8b) (número de trabalhos analisados, $k = 2$), foi observado um efeito de aumento do tempo de imobilidade (efeito estimado = 0,6982), porém este efeito não é significativo ($p = 0,4664$).

Para o subgrupo de efeito desconhecido no mPFC (fig. 8c) (número de trabalhos analisados, $k = 4$), foi observado um efeito de diminuição do tempo de imobilidade (efeito estimado = -1,1702), porém este efeito não é significativo ($p = 0,0881$).

Como tanto o subgrupo de inibição do IL, quanto o subgrupo de inibição do PL mostraram um efeito significativo de redução de imobilidade, foi feito um teste t (Fig. 4) para comparar os tamanhos de efeito (G de Hedges) e observar se existiria uma diferença estatística entre seus tamanhos de efeito, que poderia apontar para uma maior importância de uma das regiões em gerar a resposta comportamental de redução de imobilidade (Fig. 4). Foi observado que apesar do efeito da inibição do IL sobre a redução do comportamento de imobilidade no TNF ser maior do que o efeito da inibição do PL sobre este mesmo comportamento, não há diferença estatística significativa.

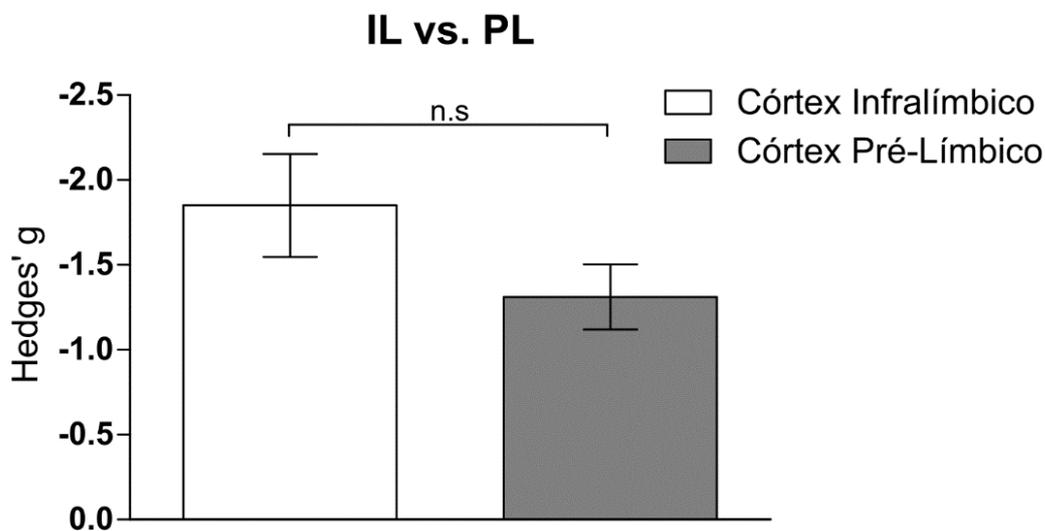


Figura A8. Teste t dos tamanhos de efeito das inibições do IL e do PL.

Sendo assim, a literatura leva à conclusão de que a inibição, tanto do IL como do PL é capaz de promover a redução do tempo de imobilidade no TNF. Desta maneira, podemos também supor que ambas as regiões fazem parte da circuitaria de flexibilidade comportamental que causa a mudança de uma estratégia passiva, para uma estratégia ativa.

Discussão

O resultado da presente revisão sistemática e meta-análise mostra que, de acordo com a literatura científica utilizada, a inibição do IL e do PL, sub-regiões do

CPFm, promovem um efeito de redução do tempo de imobilidade em ratos submetidos ao TNF.

O tamanho de efeito observado no trabalho de Scopinho *et al* e que causou com que ele fosse excluído na análise “leave one out” pode ser devido ao tipo de manipulação utilizada, no caso inibição por cloreto de cobalto (CoCl₂), que como é uma manipulação de inibição total, efeito rápido e recuperação rápida, gerou um tamanho de efeito maior que as outras manipulações que são mais discretas e de efeito mais lento.

Dentro da literatura analisada, as manipulações consideradas como desconhecidas no CPFm, acabaram revelando um efeito significativo de redução do tempo de imobilidade. Este efeito observado se deve ao fato de que a maior parte das manipulações incluídas neste subgrupo se referem à metodologia de “estimulação cerebral profunda” que, apesar de não ser possível caracterizar seu efeito sobre as regiões como inibição ou ativação (CHIKEN e NAMBU, 2016), ela parece ter um efeito estatisticamente significativo de redução do tempo de imobilidade no TNF. O mesmo se aplica ao efeito desconhecido no CPFvm.

Para a inibição do CPFvm não foi observado efeito significativo sobre o comportamento de imobilidade. No entanto podemos observar grande discrepância entre os 2 artigos utilizados (que correspondem a 4 estudos), esta discrepância pode ser devido a diferenças de metodologia, visto que CHANG *et al.* (2014) causou uma lesão excitotóxica com ácido ibotênico (66 – 99nL a 5%) nesta região, e HAMANI, DIWAN, MACEDO, *et al.* (2010) utilizou lesão induzida por rádio frequência, lesão excitotóxica induzida por ácido ibotênico (2,5µg em 0,5µL) e injeção de muscimol (50ng, imediatamente antes o pré-teste). O resultado discrepante em relação à lesão excitotóxica pode ser resultado de diferenças de dose.

O fato de a injeção de muscimol do estudo 4 (fig. 7a) de HAMANI, DIWAN, MACEDO, *et al.* (2010) não ter causado um efeito significativo de redução do tempo de imobilidade, pode ser devido ao momento da injeção, visto que SLATTERY *et al.* (2011) observou que a injeção de muscimol no IL (sub-região do CPFvm) só causa efeito do tempo de imobilidade no teste do nado forçado quando injetado antes da sessão de teste. Como HAMANI, DIWAN, MACEDO, *et al.* (2010) utilizou uma injeção imediatamente antes da sessão pré-teste, não seria esperado que o muscimol causasse um efeito sobre o comportamento de imobilidade.

Além disso, o CPF_{vm} (composto pelas regiões IL e PL) apresentam em suas subdivisões características citoarquitetônicas, hodológicas e funcionais distintas (HURLEY *et al.*, 1991; VERTES, 2004; HOOVER e VERTES, 2011; BURGOS-ROBLES *et al.*, 2013). Sendo assim, os protocolos de inibição/lesão utilizados nos estudos aqui analisados englobaram ambas as regiões, sendo um dos motivos de variabilidade, uma vez que este efeito envolve interação entre estas regiões e seus locais de projeção, tornando o resultado inconclusivo.

A ativação de sub-regiões ou do CPF_{vm} como um todo não parece ter influência sobre o comportamento de imobilidade no TNF.

Nos estudos presentes nesta análise nos quais não foi possível definir a sub-região manipulada, bem como, a natureza da manipulação também não permitem conclusões esclarecedoras sobre a circuitaria e seus efeitos sobre o comportamento de imobilidade no TNF.

Dot-Blot

Metodologia

Os animais foram anestesiados com Uretana 35% na dose de 1,75mg/Kg e sacrificados por decapitação. Os encéfalos foram retirados e córtex e hipocampo foram dissecados e congelados em microtubos a -80°C até o momento da análise.

O tampão RIPA (MARCA) foi adicionado aos microtubos contendo as amostras num volume de 150µL. Os tecidos foram então macerados com pistilo, centrifugados 2x por 10min a 10.000 rpm a 4°C. Os sobrenadantes foram coletados para outro microtubo para dosagem de proteínas por BCA e quantificação de receptor.

Para a quantificação de proteínas totais pelo método de BCA foi utilizado o kit Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoFischer). A curva-padrão de proteínas foi preparada utilizando o padrão disponível no kit e a faixa de concentração final ia de 0 (branco) a 2000µg/mL. Em uma microplaca de 96 poços foi pipetado 25µL de cada ponto da curva padrão e de cada amostra. Depois foi adicionado 200µL do Reagente de Trabalho. A placa foi incubada a 37°C por 30 minutos em estufa. Após este tempo, a placa foi retirada da estufa e lida no leitor de placa TECAN® no comprimento de onda de 562nm. Foi feita uma regressão linear da curva padrão, e calculada a concentração de proteínas totais de cada amostra.

A concentração de proteínas de cada amostra foi normalizada utilizando tampão RIPA para posterior análise por dot-blot.

O posicionamento de cada amostra foi sorteado usando um gerador de números aleatórios. Para o dot-blot as amostras foram pipetadas (3µL) em triplicata sob vácuo na membrana de nitrocelulose utilizando um sistema para dot-blot contendo 96 poços. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com solução de BSA em TBS a 10% por 1h. Após este período, o vácuo era novamente ligado para remoção do excesso de líquido e a membrana foi lavada 3x com TBS. Esta membrana foi então incubada com os anticorpos primários específicos para 5-HT_{1A} (Chemicon) na concentração 1:1000 por 40 minutos. Após este período o vácuo foi ligado para remoção do excesso de líquido e a membrana foi lavada 3x com TBS. Foi então incubado o anticorpo secundário HRP anti-rabbit para marcação (ThermoFischer)

por 40 minutos. Após este período a membrana foi lavada 3x com TBS, retirada do sistema e mantida em banho de TBS até a revelação.

Esta marcação foi revelada com ECL (Thermofischer ELC-plus) por 5 minutos e a quimioluminescência foi lida no equipamento Chemidoc BioRad®.

Quantificação de 5-HT_{1A}

Não foi observada diferença estatisticamente significativa na densidade de receptor 5-HT_{1A} entre machos e fêmeas Naïve (Teste-t: df=7; p=0,88).

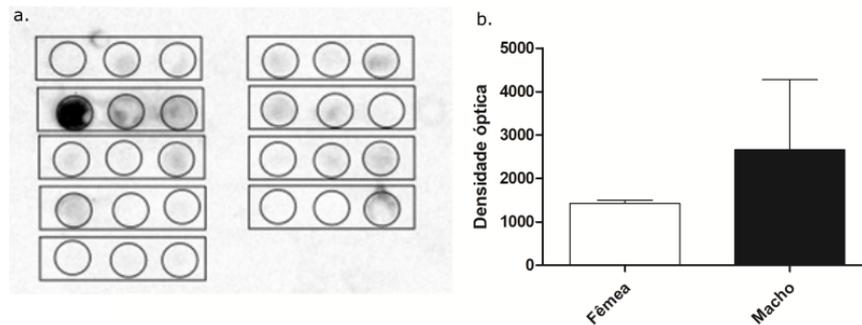


Figura A9 - Dot-blot. a- Marcação quimioluminescente na membrana de nitrocelulose; b- Gráfico de densidade óptica do receptor 5-HT_{1A} em fêmeas (barras brancas, n=4) e machos (barras pretas, n=5)

ANEXO A