



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

Patrick Remus Suman

**O ESTRESSE NO INÍCIO DA VIDA E O DIMORFISMO SEXUAL NA RESPOSTA  
DE RATOS ADULTOS À FLUOXETINA**

Florianópolis

2021

Patrick Remus Suman

**O ESTRESSE NO INÍCIO DA VIDA E O DIMORFISMO SEXUAL NA RESPOSTA  
DE RATOS ADULTOS À FLUOXETINA**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do grau de Doutor em Farmacologia.  
Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cilene Lino de Oliveira

Florianópolis

2021

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

SUMAN, PATRICK REMUS

O ESTRESSE NO INÍCIO DA VIDA E O DIMORFISMO SEXUAL NA  
RESPOSTA DE RATOS ADULTOS À FLUOXETINA / PATRICK REMUS  
SUMAN ; orientadora, Cilene Lino de Oliveira, 2021.

116 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós  
Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Estresse. 3. Comportamento. 4.  
Fluoxetina. 5. Privação maternal. I. Lino de Oliveira,  
Cilene. II. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

Patrick Remus Suman

**Título: O estresse no início da vida e o dimorfismo sexual na resposta de ratos adultos à Fluoxetina**

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

Profa. Dra. Deborah Suchecki

Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)

Prof. Dr. Rui Daniel Schröder Prediger

Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Profa. Dra. Fernanda Barbosa Lima

Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

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

---

Prof. Dr. Rui Daniel Schröder Prediger

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Profa. Dra. Cilene Lino de Oliveira

Orientador(a)

Florianópolis, 2021

Este trabalho é dedicado a todos que foram  
afetados pela pandemia da COVID-19

## **AGRADECIMENTOS**

À toda minha família e amigos pela compreensão e apoio.

À Universidade Federal de Santa Catarina, pelo ensino e suporte nesse período de pós-graduação,

À Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cilene Lino de Oliveira, por toda a orientação nos meus primeiros passos nesta jornada acadêmica.

Aos colegas de laboratório de Neurobiologia do Comportamento, pelo suporte técnico-científico-emocional: Karol, Fabiola, Tamires, Juliana, Fabiani e aos demais que passaram por esses quase 7 anos de convívio.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Farmacologia da UFSC, especialmente a Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Fernanda B Lima pelo apoio no desenvolvimento do protocolo de acasalamento e obtenção da prole dos ratos usados neste trabalho.

Aos colegas do Departamento de Farmacologia da UFSC. Em especial as colegas, Leticia, Lucilene, Roberta, Ana e todos que não foram citados, mas que contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos colegas do departamento de Fisiologia da UFSC. Em especial as colegas, Flaviano e Elisa que ajudaram a desenvolver os primeiros protocolos dos experimentos usados nesta tese.

Ao LAMEB, biotério central e todos os técnicos-administrativos da UFSC pelo apoio na realização deste trabalho.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

A banca avaliadora deste trabalho que contribui para melhorar a qualidade da versão final da tese.

*“...from so simple a beginning endless forms most beautiful and most wonderful have been, and are being, evolved.”*

*(Charles Darwin., On the Origin of the Species)*

## RESUMO

Os fármacos da classe dos inibidores seletivos de recaptação de serotonina, na clínica desde os anos 1950, são usados principalmente no tratamento de depressão e ansiedade. Embora eficazes, uma parcela dos pacientes tratados com estes fármacos não responde ao tratamento. Sabe-se que o estresse no início da vida pode acarretar consequências na vida adulta do indivíduo e, na hipótese deste trabalho, poderia contribuir para a resistência ao tratamento com os fármacos antidepressivos como a fluoxetina (FLX). Para desvendar a relação entre o estresse no início da vida e a resistência ao tratamento com a FLX, neste trabalho padronizamos um modelo de privação materna em ratos e uma bateria de testes para avaliar seus comportamentos. Aplicando as condições experimentais padronizadas, analisamos a resposta comportamental de ratos machos e fêmeas ao tratamento com FLX. Durante a etapa de padronização observou-se os ratos em uma bateria de testes composta pela sequência de nado forçado (TNF), alimentação suprimida pela novidade (ASN) e preferência por sacarose (PS) ou em cada um dos testes feitos de forma independente. Os comportamentos dos ratos dos dois sexos nos testes independentes assemelharam-se aos da bateria de testes que foi então aplicada nos próximos experimentos. Quando privados da progenitora por 24 h, entre o nono e décimo dia pós-natal, os ratos machos adultos ficaram mais tempo imóveis no TNF do que os machos não privados da progenitora. Em contraste, as fêmeas adultas privadas da progenitora ficaram menos tempo imóveis no TNF do que as fêmeas não privadas. Sejam machos ou fêmeas, os ratos privados ou não privados das progenitoras se comportaram de forma semelhante nos outros testes da bateria. O tratamento oral com FLX na dose 2,5 mg/kg/dia, em comparação ao veículo (sacarose, 10%), não mudou o comportamento dos ratos machos em nenhum teste da bateria. Já nas fêmeas, a FLX na dose 2,5 mg/kg/dia, comparada a sacarose, diminuiu o tempo de imobilidade no TNF quando as ratas foram privadas da progenitora no início da vida. Nos demais testes da bateria, as fêmeas do grupo FLX e sacarose, privadas das progenitoras ou não, se comportaram de forma semelhante. Na dose de 10 mg/kg/dia, uma única administração da FLX reduziu o tempo de imobilidade no TNF dos ratos machos, privados das progenitoras ou não. Porém, esse efeito desapareceu após 14 dias de administração. Paradoxalmente, FLX 10 mg/kg/dia por 7 dias aumentou a latência dos ratos machos para comer no teste de ASN. Nenhum efeito importante da FLX 10 mg/kg/dia foi observado nos ratos machos testados na PS. Nas ratas privadas ou não privadas das progenitoras, a FLX na dose 10 mg/kg pouco mudou o comportamento das fêmeas na bateria de testes quando comparada a sacarose. Os dados apresentados nesta tese corroboram a noção que o estresse no início da vida afeta o comportamento dos ratos na vida adulta com repercussões sobre a efetividade do tratamento com a FLX. Os dados também indicam que, a resposta ao estresse inescapável foi o domínio do comportamento dos ratos machos e fêmeas adultos mais afetado pela privação materna em comparação ao hedônico ou de esquivar. Além disso, os dados sugerem que a relação entre a privação materna e a resposta ao tratamento com FLX na vida adulta é dose-dependente e sexualmente dimórfica.

**PALAVRAS-CHAVE:** Estresse. Comportamento. Fluoxetina. privação materna. Sexo. Ratos.



## ABSTRACT

In practice since the 1950s, the selective serotonin reuptake inhibitors are used mainly in the treatment of depression and anxiety. Although effective, a portion of patients treated with these drugs does not respond to treatment. It is known that stress at the beginning of life can have consequences on the individual's adult life and, in the hypothesis of this work, it could contribute to resistance to treatment with antidepressant drugs such as fluoxetine (FLX). To unveil the relationship between early life stress and resistance to treatment with FLX, in this work, we standardized a model of maternal deprivation in rats and a battery of tests to assess their behaviour. Applying the standardized experimental conditions, we analyzed male and female rats' behavioural response to treatment with FLX. During the standardization stage, rats were observed in a battery of tests composed of the forced swimming sequence (TNF), suppressed feeding by novelty (ASN) and preference for sucrose (PS) or in each of the tests done independently. The rats of both sexes' behaviours in the independent tests were like those of the test battery that was then applied in the next experiments. When deprived of the parent for 24 h, between the ninth and tenth postnatal day, adult male rats were more immobile in the TNF than non-deprived males of the parent. In contrast, adult females deprived of the parent were less immobile in TNF than non-deprived females. Whether male or female, the parents' deprived or non-deprived rats behaved similarly in the other battery tests. Oral treatment with FLX at a dose of 2.5 mg/kg/day, compared to the vehicle (sucrose, 10%), did not change male rats' behaviour in any battery test. In females, FLX at a dose of 2.5 mg/kg/day, compared to sucrose, decreased the immobility time in TNF when the rats were deprived of the parent in early life. In the other battery tests, females in the FLX and sucrose group, deprived of their parents or not, behaved similarly. At a dose of 10 mg/kg/day, a single administration of FLX reduced the immobility time in TNF of male rats, deprived of their parents or not. However, this effect disappeared after 14 days of administration. Paradoxically, FLX 10 mg/kg/day for seven days increased male rats' latency to eat in the ASN test. No significant effect of FLX 10 mg/kg/day was observed in the male rats tested in PS. In the private or non-private females, FLX at a dose of 10 mg/kg/day little changed the females' behaviour in the test battery compared to sucrose. The data presented in this thesis corroborate the notion that early life stress affects rats' behaviour in adulthood with repercussions on treatment effectiveness with FLX. The data also indicate that the inescapable stress response was the behavioural domain of adult male and female rats more affected by maternal deprivation than hedonic or avoidance. The data suggest that the relationship between maternal deprivation and response to FLX treatment in adulthood is dose-dependent and sexually dimorphic.

**KEYWORDS:** Stress. Behavioural. Fluoxetine. Maternal deprivation. Sex. Rats.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: A relação entre o papel do estresse a eficácia dos antidepressivos monoaminérgicos no tratamento da depressão. ....	25
Figura 2: Protocolo de acasalamento .....	34
Figura 3: Desenho Experimental do Experimento 1 .....	39
Figura 4: Desenho Experimental do Experimento 2 .....	40
Figura 5: Desenho experimental do Experimento 3 .....	42
Figura 6: Desenho experimental do Experimento 4 .....	43
Figura 7: Tempo de imobilidade no TNF, latência para comer no ASN e porcentagem do consumo de sacarose no PS no experimento 1 .....	51
Figura 8: Tempo de imobilidade no TNF, latência para comer no ASN e porcentagem do consumo de sacarose no PS no experimento 2 .....	56
Figura 9: Tempo de imobilidade no TNF, latência para comer no ASN e porcentagem do consumo de sacarose no PS no experimento 3 .....	64
Figura 10: Tempo de imobilidade no TNF, latência para comer no ASN e porcentagem do consumo de sacarose no PS no experimento 4 .....	75
Figura 11: Comparação entre genitores machos e fêmeas nos testes comportamentais .....	77
Figura 12: Comparação entre genitoras privadas x não privadas nos testes comportamentais .....	78

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultados da ANOVA duas vias do TNF experimento 1.....	47
Tabela 2: Resultados da ANOVA duas vias do ASN experimento 1.....	48
Tabela 3: Resultados da ANOVA duas vias do PS experimento 1.....	48
Tabela 4: Tamanhos de efeito do experimento 1.....	50
Tabela 5: Resultados da ANOVA duas vias do TNF experimento 2.....	53
Tabela 6: Resultados da ANOVA duas vias do ASN experimento 2.....	53
Tabela 7: Resultados da ANOVA duas vias do PS experimento 2.....	54
Tabela 8: Tamanhos de efeito do experimento 2.....	55
Tabela 9: Resultados da ANOVA três vias do TNF experimento 3.....	58
Tabela 10: Resultados da ANOVA três vias do ASN experimento 3.....	59
Tabela 11: Resultados da ANOVA três vias do PS experimento 3. ....	61
Tabela 12: Tamanhos de efeito do experimento 3.....	63
Tabela 13: Resultados da ANOVA três vias do TNF experimento 4.....	66
Tabela 14: Resultados da ANOVA duas vias do TNF experimento 4.....	67
Tabela 15: Resultados da ANOVA três vias do ASN experimento 4.....	69
Tabela 16: Resultados da ANOVA três vias do PS experimento 4. ....	70
Tabela 17: Resultados da ANOVA três vias do TNF2 experimento 4.....	71
Tabela 18: Resultados da ANOVA com medidas repetidas do experimento 4.....	72
Tabela 19: Tamanhos de efeito do experimento 4.....	74
Tabela 20: Tamanhos de efeito do experimento 5.....	79

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT: 5-hidróxitriptamina

5HT<sub>1A</sub>: Receptor de serotonina do subtipo 1a

5HT<sub>2A</sub>: Receptor de serotonina do subtipo 2a

ACTH: Hormônio adrenocorticotrófico

ASN: Alimentação suprimida pela novidade

BT: Bateria de testes

CORT: Cortisol

CPFdl: Córtex pré-frontal dorso lateral

CPFvm: Córtex pré-frontal ventro medial

CRH: Hormônio liberador de corticotropina

EPM: Erro padrão da média

FLX: Fluoxetina

HPA: Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal

iMAO: Inibidor da monoaminas oxidase

ISRS: Inibidores seletivos da recaptção de serotonina

MAO: Enzima monoamina oxidase

NP: Animais não privados

P: Animais privados

PN: Pós-natal

PS: Preferência pela sacarose

SERT: Transportador de serotonina

SNC: Sistema Nervoso Central

SNS: Sistema Nervoso Simpático

TI: Teste individual

TPH2: Triptofano Hidroxilase-2

TNF: Teste do nado forçado

TNF2: Teste do nado forçado segunda apresentação

VEI: Veículo

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
1.1. O MECANISMO DE AÇÃO DOS FÁRMACOS ANTIDEPRESSIVOS .....	17
1.2. O ESTRESSE E A RESISTÊNCIA AO TRATAMENTO COM ANTIDEPRESSIVOS .....	21
1.3. O ESTRESSE NO INÍCIO DA VIDA E A RESISTÊNCIA AO TRATAMENTO COM ANTIDEPRESSIVOS EM MODELOS ANIMAIS.....	25
1.4. PRIVAÇÃO MATERNAL .....	28
<b>2. HIPÓTESE</b> .....	<b>31</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>31</b>
3.1 OBJETIVO GERAL: .....	31
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	31
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>32</b>
4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS .....	32
4.1.1. Condições de alojamento. ....	32
4.1.2. Obtenção de proles.....	33
4.1.3. Eutanásia .....	34
4.2. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS .....	35
4.2.1. Privação materna.....	35
4.2.2 Tratamentos Farmacológicos .....	35
4.2.3 Teste do nado forçado .....	36
4.2.4. Alimentação suprimida pela novidade .....	37
4.4.5. Preferência pela sacarose .....	38
4.3. DESENHO EXPERIMENTAL.....	38
4.3.1. Experimento 1 – Padronização do protocolo dos testes comportamentais .....	38
4.3.2. Experimento 2 – Padronização do protocolo de privação materna.....	39

4.3.3. Experimento 3 - Estudo do efeito do tratamento com FLX 2,5 mg/kg sobre os comportamentos dos ratos machos e fêmeas, privados ou não das progenitoras no início da vida.....	40
4.3.4. Experimento 4 – Estudo do efeito do tratamento com FLX 10 mg/kg sobre os comportamentos dos ratos machos e fêmeas, privados ou não das progenitoras no início da vida.....	42
4.3.5. Experimento 5 – Estudo do efeito da privação maternal sobre o comportamento das progenitoras: comparação com os genitores. ....	43
4.3.6. Medidas para reduzir vieses experimentais.....	44
4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>46</b>
5.1. EXPERIMENTO 1 – PADRONIZAÇÃO DO PROTOCOLO DOS TESTES COMPORTAMENTAIS .....	46
5.2. EXPERIMENTO 2 – EFEITO DO ESTRESSE.....	52
5.3. EXPERIMENTO 3 – EFEITO DA DOSE DE 2,5 MG/KG DE FLX.....	57
5.4. EXPERIMENTO 4 – EFEITO DA DOSE DE 10 MG/KG DE FLX.....	65
5.5. EXPERIMENTO 5 - EFEITO DO ESTRESSE NOS GENITORES.....	76
<b>6.DISSCUSSÃO .....</b>	<b>79</b>
6.1. A ESCOLHA DO TIPO DE PROTOCOLO DOS TESTES COMPORTAMENTAIS.....	80
6.2 O EFEITO DO ESTRESSE NO INÍCIO DA VIDA NO COMPORTAMENTO BASAL DOS ANIMAIS ADULTOS.....	83
6.3 RESPOSTA COMPORTAMENTAL DOS RATOS AO TRATAMENTO COM FLX 2,5 MG/KG .....	87
6.4 RESPOSTA COMPORTAMENTAL DOS RATOS AO TRATAMENTO COM FLX 10 MG/KG .....	90
6.5 O EFEITO DA SEPARAÇÃO MATERNAL SOBRE O COMPORTAMENTO DOS GENITORES.....	94
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E LIMITAÇÕES DO ESTUDO .....</b>	<b>96</b>

<b>8. CONCLUSÃO .....</b>	<b>97</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>98</b>



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. O MECANISMO DE AÇÃO DOS FÁRMACOS ANTIDEPRESSIVOS

Os fármacos antidepressivos são utilizados na clínica desde a década de 1950, principalmente no tratamento de transtornos psiquiátricos como a depressão e a ansiedade, e correspondem aos psicofármacos mais utilizados na clínica na última década (GURURAJAN; REIF; CRYAN *et al.*, 2019; HILLHOUSE; PORTER, 2015). Embora associados a depressão do humor, os antidepressivos também são utilizados para o tratamento de outras condições como a ansiedade, dor crônica, ejaculação precoce, cessação do tabagismo e no tratamento de enxaqueca (GOTZSCHE; DINNAGE, 2020; SCHNEIDER; PATTERSON; JIMENEZ, 2019). Assim, apesar de terem também efeitos ansiolíticos e analgésicos, estes compostos são tradicionalmente chamados de antidepressivos.

Os primeiros antidepressivos foram descobertos por acaso, durante o desenvolvimento de fármacos inicialmente testados para outras patologias como, por exemplo, a tuberculose (BRODIE; SHORE; PLETSCHER, 1956; KUHN, 1957; MULLER; PRYOR; GIBBONS *et al.*, 1955; PLETSCHER; SHORE; BRODIE, 1956; ZELLER; BARSKY, 1952). Na mesma época, a partir de observações empíricas de sintomas depressivos em pacientes tratados com o anti-hipertensivo reserpina (ACHOR; HANSON; GIFFORD, 1955), postulou-se que a depleção dos níveis de monoaminas no sistema nervoso central (SNC) poderia explicar a depressão do humor. A reserpina inibe o transportador vesicular de monoaminas diminuindo os níveis de monoaminas cerebrais (ACHOR; HANSON; GIFFORD, 1955). Os sintomas depressivos apresentados pelos pacientes tratados com a reserpina desapareciam após o término do tratamento ou eram revertidos pela terapia de repouso ou de choques elétricos (MULLER; PRYOR; GIBBONS *et al.*, 1955). Algumas substâncias que também atenuavam os sintomas depressivos, em pacientes tratados com reserpina, se comprovaram, mais tarde, efetivas no restabelecimento dos níveis de monoaminas no SNC (AXELROD, 1972; SULSER; BICKEL; BRODIE, 1964).

KUHN (1957) observou que a reversão dos efeitos da reserpina pelo composto G22355 – atualmente, o fármaco imipramina [um antidepressivo tricíclico inibidor da recaptação de serotonina e noradrenalina] –, dependia da disponibilidade e da quantidade de catecolaminas. Em ratos com níveis de catecolaminas depletados, a imipramina não demonstrava efeito na reversão da sedação promovida pela reserpina.

Da mesma forma, verificou-se que ocorria a prevenção da sedação induzida, nos ratos, pela reserpina pelo pré-tratamento com inibidores da enzima monoaminoxidase (MAO) ou com imipramina (ACHOR; HANSON; GIFFORD, 1955; KUHN, 1957; SCHILDKRAUT, 1965). Compostos inibidores da MAO que revertiam os sintomas depressivos causados pela reserpina aumentavam os níveis de norepinefrina em ratos (SCHILDKRAUT, 1965; SCHILDKRAUT; KETY, 1967). Estudos posteriores mostraram que o uso da imipramina auxiliava na melhora da neurotransmissão da serotonina e noradrenalina no SNC (AXELROD, 1972; SULSER; SOROKO, 1965). Assim, a relação entre o aumento da neurotransmissão monoaminérgica e o efeito antidepressivo originou a “teoria monoaminérgica para a depressão”. Essa teoria contribuiu para o surgimento das primeiras linhas de pesquisa farmacológicas com a descoberta de antidepressivos que, até então, era puramente empírica (SCHILDKRAUT, 1965; SCHILDKRAUT; KETY, 1967). Além disso, os compostos antidepressivos foram então classificados dentro de categorias farmacológicas de acordo com sua ação sobre a neurotransmissão monoaminérgica.

Ao longo do tempo se observou que os antidepressivos aumentavam a concentração sináptica de neurotransmissores monoaminérgicos impedindo a metabolização por dois mecanismos: inibindo a recaptção das monoaminas ou inibindo diretamente a atividade da enzima MAO (iMAO). São exemplos de classes de inibidores de recaptção: os inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ISRSs), da recaptção de noradrenalina (ISRN), duais, entre outros, que, conseqüentemente, aumentam a concentração destes neurotransmissores na fenda sináptica (HAMON; BOURGOIN, 2006; WILLNER; SCHEEL-KRUGER; BELZUNG, 2013). São exemplos de classes de iMAO os inibidores irreversíveis, de ação longa e não seletivos entre MAO-A e MAO-B (e.g. fenelzina, isocarboxazida), os inibidores reversíveis de ação curta e seletivos para a MAO-A (e.g. moclobemida) (JOHNSTON, 1968; YODIM; EDMONDSON; TIPTON, 2006)

Apesar de úteis para o tratamento da depressão e outros transtornos, os fármacos antidepressivos baseados em mecanismos monoaminérgicos possuem várias limitações (CRAWFORD; LEWIS; NUTT *et al.*, 2014; HERZOG; BECKMANN; LIEB *et al.*, 2018; WHISKEY; TAYLOR, 2013; WILLNER; BELZUNG, 2015). Os ISRSs, apesar de melhor tolerados do que os antidepressivos tricíclicos, apresentam efeitos colaterais como insônia, dor de cabeça, ansiedade e disfunção sexual (CRAWFORD; LEWIS; NUTT *et al.*, 2014; GOLDSTEIN; GOODNICK, 1998). Já os inibidores de

recaptação de noradrenalina, por sua vez, apresentam efeitos cardiovasculares, além de disfunção sexual, insônia e suor excessivo (WHISKEY; TAYLOR, 2013). Além disso, a terapêutica com os antidepressivos monoaminérgicos apresenta duas limitações adicionais: 1-latência longa entre início do tratamento e a eficácia terapêutica e 2- resistência ao tratamento. Estas limitações podem interferir na adesão dos pacientes aos tratamentos (AKIL; GORDON; HEN *et al.*, 2018).

A demora entre o início do tratamento e a resposta terapêutica, entre 3-6 semanas, é fenômeno comum a todas as categorias de antidepressivos monoaminérgicos e resultam da ação a nível cerebral (COPLAN; GOPINATH; ABDALLAH *et al.*, 2014; HERZOG; BECKMANN; LIEB *et al.*, 2018). De forma geral, ao serem administrados de forma aguda, os antidepressivos inibem os transportadores que fazem a recaptação das monoaminas, aumentando as concentrações destes neurotransmissores na fenda sináptica (CELADA; ARTIGAS, 1993). O aumento é temporário pois os neurotransmissores atuam sobre autorreceptores inibitórios que inibem a própria liberação (LE POUL; LAARIS; DOUCET *et al.*, 1995). Com o tempo, os autorreceptores inibitórios se dessensibilizam e permitem a liberação sustentada das monoaminas no compartimento extracelular (HERVAS; ARTIGAS, 1998). Este mecanismo está bem caracterizado para os ISRSs como a fluoxetina (MORRISSETTE; STAHL, 2014).

Os ISRSs, quando administrados de forma aguda, aumentam as concentrações de serotonina (5-HT) na fenda sináptica, pois inibem o transportador de serotonina (SERT) (FULLER; PERRY; MOLLOY, 1974; ROBINSON, 2018). O aumento de 5-HT livre na fenda sináptica ativa os autorreceptores inibitórios pré-sinápticos 5HT<sub>1A</sub> que inibem a liberação e diminuem a disponibilidade da 5-HT extracelular (CELADA; ARTIGAS, 1993; RACAGNI; POPOLI, 2008; SHARP; BARNES, 2020). Quando o ISRS é administrado cronicamente ocorre a dessensibilização e, conseqüentemente, a internalização dos autorreceptores, favorecendo a liberação de 5-HT na fenda sináptica e, assim, promovendo os efeitos desejáveis para o tratamento dos transtornos de humor (CELADA; ARTIGAS, 1993; DELGADO; CHARNEY; PRICE *et al.*, 1990).

A resistência ao tratamento é também comum a todas as categorias de antidepressivos, porém, a taxa de pacientes resistentes ao tratamento varia entre os compostos (RUBERTO; JHA; MURROUGH, 2020). As taxas de resposta para os antidepressivos comumente utilizados são entre 50% e 70% (CRAWFORD; LEWIS;

NUTT *et al.*, 2014; LEVINSTEIN; SAMUELS, 2014; WHISKEY; TAYLOR, 2013; WILLNER; SCHEEL-KRUGER; BELZUNG, 2014). Existem muitas razões potenciais para explicar a resistência ao tratamento com antidepressivos, dentre elas estão problemas de diagnóstico e aderência ao tratamento dos transtornos psiquiátricos.

O diagnóstico dos transtornos psiquiátricos é complexo e envolve diversos conjuntos de sintomas que são, em sua maior parte, subjetivos e individualizados (LEVINSTEIN; SAMUELS, 2014). Como mencionado anteriormente, a terapêutica com os antidepressivos monoaminérgicos apresenta limitações que prejudica a aderência ao tratamento, que pode ser confundida com resistência ao tratamento (WILLNER; SCHEEL-KRUGER; BELZUNG, 2013). Embora os problemas de diagnóstico e aderência ao tratamento possam contribuir para a eficácia parcial do tratamento com antidepressivos (OLBERT; RASMUSSEN; GALA *et al.*, 2016), é possível que a ausência de resposta também seja consequência de particularidades do organismo do paciente, e a resistência pode ter várias origens, como por exemplo, os níveis de estresse, metabolismo ou genética (MODA-SAVA; MURDOCK; PAREKH *et al.*, 2019; PEREIRA; JOCA; HARVEY *et al.*, 2019; WILLNER; SCHEEL-KRUGER; BELZUNG, 2013).

Estima-se que entre 30% a 50% dos pacientes não se beneficiam do tratamento com um antidepressivo (BEYELER, 2019). Na clínica existem alguns estudos que estabelecem protocolos que são seguidos para a contestação da resistência ao tratamento, como por exemplo, o “*The Massachusetts General Hospital classification*” e o “*The STAR\*D trial*” (HAGG; BRENNER; REUTFORS *et al.*, 2020; WILLNER; BELZUNG, 2015). A definição de resistência varia de acordo com o protocolo. Pode ser interpretada como um efeito clínico inadequado, incluindo a não resposta depois de pelo menos duas tentativas com fármacos antidepressivos diferentes ou de classes diferentes com tempo de tratamento adequado e acompanhamento médico eficiente (HAGG; BRENNER; REUTFORS *et al.*, 2020; RUBERTO; JHA; MURROUGH, 2020). Dentre as principais causas aventadas estão fatores genéticos, a ocorrência de mais de um episódio depressivo durante a vida e fatores relacionados ao neurodesenvolvimento (WILLNER; SCHEEL-KRUGER; BELZUNG, 2014).

Os fatores genéticos associados a eficácia ao tratamento parecem estar relacionados também à gravidade dos sintomas depressivos (ALQAHTANI; KUMARAPPAN; KUMAR *et al.*, 2020). Alguns genes específicos como, por exemplo,

para a expressão da enzima Triptofano Hidroxilase-2 (TPH-2), que tem sua função na regulação da serotonina cerebral, parecem estar envolvidos nestes processos. Um polimorfismo no gene que expressa esta enzima foi relacionado à gravidade dos sintomas depressivos, bem como à redução na eficácia ao tratamento com antidepressivos (ZHOU; ROY; LIPSKY *et al.*, 2005). Conforme já exposto, o mecanismo de ação dos antidepressivos depende da ativação dos receptores 5HT<sub>1A</sub>. Verificou-se que um polimorfismo funcional do HTR1A, C-1019G (rs6295), na região promotora está associado à farmacogenética antidepressiva e, embora os mecanismos ainda não estejam claros, podem ser relacionados à falta de eficácia ao tratamento com ISRS (ZHAO; HUANG; LI *et al.*, 2012).

No caso específico da depressão do humor, apresentar mais de um episódio depressivo durante a vida também parece estar relacionado a resistência ao tratamento (Figura 1). O nível de estresse necessário para desencadear um novo episódio parece diminuir em relação ao número de episódios que o paciente apresenta. Ou seja, quanto mais episódios depressivos um paciente apresentar ao longo da vida, menor será o nível de estresse necessário para desencadeá-los (WILLNER; SCHEEL-KRUGER; BELZUNG, 2014). O estresse, particularmente no início da vida, como causas da resistência ao tratamento com antidepressivos, será abordado nos próximos capítulos.

## 1.2. O ESTRESSE E A RESISTÊNCIA AO TRATAMENTO COM ANTIDEPRESSIVOS

O conceito de estresse permeia nossa cultura em vários níveis. Na sociedade atual o estresse pode ser relacionado a exigências cotidianas, dificuldade em lidar com situações, ao acúmulo de tarefas e normalmente é acompanhado de emoções negativas (CATHOMAS; MURROUGH; NESTLER *et al.*, 2019; MCEWEN, 2017). Frequentemente, a palavra estresse está associada a uma resposta de “alarme” ou “luta ou fuga” a uma ameaça, ou seja, uma resposta aguda e adaptativa a um estímulo ambiental ameaçador (MCEWEN; AKIL, 2020). Mas, nos últimos anos, a ciência em geral e a neurociência, em particular, expandiu o conceito de estresse em muitas dimensões. Descobriu-se, por exemplo, que o estresse não gera necessariamente respostas biológicas deletérias, mas também desencadeia um conjunto de mecanismos tipicamente adaptativos favoráveis a sobrevivência (HODES; EPPERSON, 2019; MCEWEN, 2013; MCEWEN; AKIL, 2020).

Estímulos estressantes, ou estressores, podem ser considerados “benéficos” (eustresse) ou “maléficos” (distresse) e desencadeiam respostas que favorecem ou desfavorecem o bem estar do organismo, respectivamente (MCEWEN, 2017). Poderiam ser chamados de “eustressores” os estímulos ou situações que exigem do organismo o enfrentamento de desafios ou riscos. Porém, estes são associados a emoções prazerosas e interpretados como compensadores ou positivos, tais como desafios intelectuais, exercícios físicos, entre outros (LAZARUS, 1985; MCEWEN, 2017). Seriam exemplos de “eustressores” os desafios intelectuais, exercícios físicos voluntários, entre outros. Por outro lado, “distressores” seriam estímulos ou situações deletérias ao organismo e associados a emoções desagradáveis, tais como exercícios extenuantes, ataque de predadores e violência (FOLKMAN; LAZARUS, 1985; LAZARUS, 1985; MCEWEN; AKIL, 2020). Em vertebrados, tanto os eustressores como os distressores ativam os sistemas responsáveis por gerar a situação de “alarme” ou de “luta ou fuga”, porém, variam na forma como afetam os sistemas que promovem as emoções associadas aos estímulos (SLATTERY; CRYAN, 2017). Neste trabalho focaremos nos mecanismos ativados por distressores e, para fins de padronização, deste ponto em diante, os termos estressores ou distressores serão tratados como sinônimos.

Os organismos dos vertebrados se adaptam física e psicologicamente por meio da ativação dos mecanismos biológicos que os preparam para responder às demandas das situações agudas de estresse (MCEWEN, 2017). Em uma situação interpretada pelo organismo como “alarmante” ou “distressora”, o hipotálamo secreta o hormônio liberador de corticotropina (CRH), que através do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) induz a produção de cortisol (ou corticosterona em roedores) a partir do córtex adrenal (eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, HPA) (RINCON-CORTES; HERMAN; LUPIEN *et al.*, 2019). Embora popularmente conhecido como “hormônio do estresse”, o cortisol (CORT) tem papel fisiológico mais amplo do que na adaptação ao estresse. O cortisol também é um dos muitos mediadores da alostase, o processo ativo de adaptação ao ambiente e às experiências consideradas “estressantes” ou “não-estressantes”, e atua no controle do metabolismo e do ritmo circadiano, por exemplo (MCEWEN, 2019).

A ativação do eixo HPA paralela ao do sistema nervoso simpático (SNS) leva os efeitos dos estressores a vários órgãos periféricos, incluindo a liberação de

epinefrina a partir da adrenal. A ativação temporária do eixo HPA e do SNS promovem as respostas do corpo necessárias para a reação de "luta ou fuga" tais como aumento de alerta, da glicemia, da pressão arterial e do fluxo sanguíneo para a musculatura esquelética (MCEWEN, 2017; MCEWEN; AKIL, 2020). Assim, as respostas agudas de "luta ou fuga" favorecem a sobrevivência e arrefecem quando a situação estressante é resolvida ou desaparece. Na impossibilidade da solução da situação estressante ou do desaparecimento do estressor, o eixo HPA e o SNS podem permanecer ativos por longo tempo, mantendo glicemia e pressão arterial altas, alto fluxo sanguíneo esquelético e baixo fluxo para outros órgãos (MCEWEN; AKIL, 2020). Portanto, embora as respostas agudas ao estressor favoreçam a sobrevivência, a ativação contínua do sistema de "luta ou fuga" pode trazer prejuízos ao organismo (CATHOMAS; MURROUGH; NESTLER *et al.*, 2019). Além dos desgastes trazidos, por exemplo, ao metabolismo e ao sistema cardiovascular, a ativação constante do sistema de "alarme" pode danificar áreas vulneráveis do cérebro (WILLNER; SCHEEL-KRUGER; BELZUNG, 2014).

Os danos encefálicos desencadeados por estressores têm sido associados a origem de vários transtornos neuropsiquiátricos. Existem evidências que em indivíduos depressivos ocorre um aumento de fluxo sanguíneo na região do córtex pré-frontal ventro medial (CPFvm) e uma redução do fluxo no córtex pré-frontal dorso lateral (CPF-dl), resultando nos sintomas da depressão como por exemplo apatia, ansiedade, tensão e ruminação (WILLNER; SCHEEL-KRUGER; BELZUNG, 2013; 2014). Além disso, a frequente ativação do eixo HPA resulta na liberação também frequente de glicocorticoides que, quando liberados cronicamente, são neurotóxicos (SOUSA; MADEIRA; PAULA-BARBOSA, 1998). No hipocampo, por exemplo, altas concentrações de glicocorticoide pode reduzir o volume das células granulares causando atrofia intensa dos dendritos apicais em células piramidais nessa região (MAGARINOS; MCEWEN; FLUGGE *et al.*, 1996; MCEWEN, 1999; SOUSA; ALMEIDA, 2002).

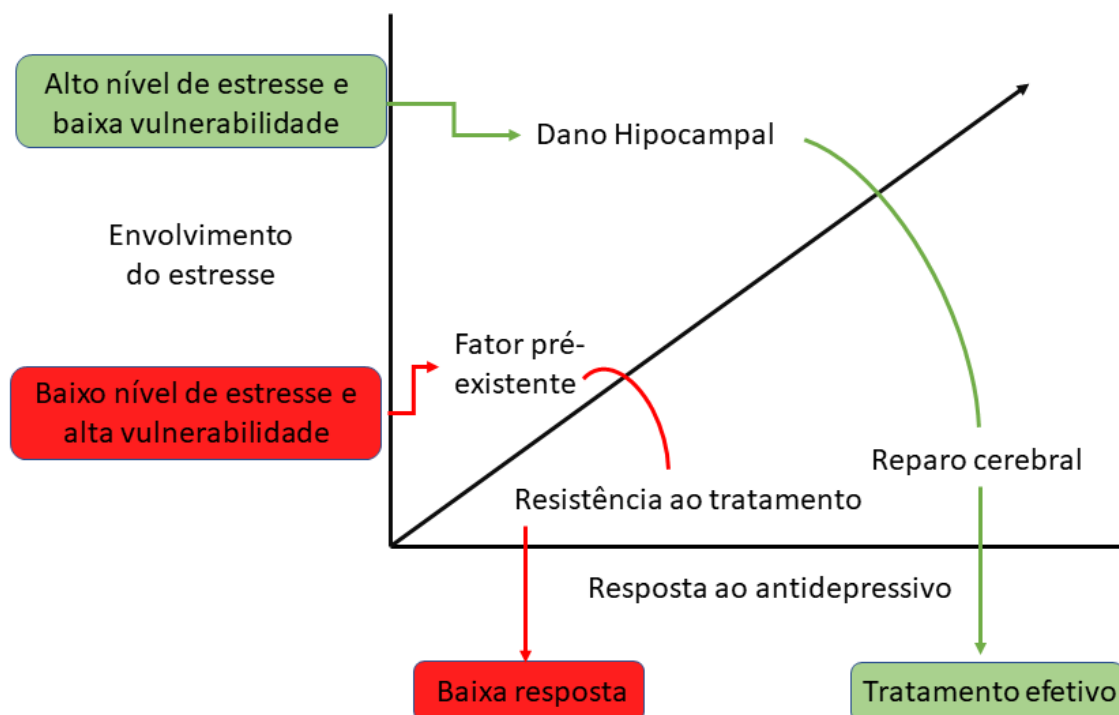
Além do papel chave na etiologia dos transtornos psiquiátricos, os estressores podem também modificar as respostas dos organismos ao tratamento antidepressivo (CALDARONE; ZACHARIOU; KING, 2015). A figura 1 ilustra graficamente a relação hipotética entre 1-os níveis de estresse sob os quais os organismos se encontram e; 2- os níveis de resposta ao tratamento antidepressivo em organismos vulneráveis a

patologia promovida pelos estressores. Neste contexto, os antidepressivos são eficazes quando promovem a reparação das estruturas danificadas pelo estresse, como o hipocampo, por exemplo, em indivíduos pouco vulneráveis ao dano encefálico e suas consequências. No entanto, na presença de fatores de vulnerabilidade ao dano encefálico, que podem ser constitucionais e/ou consequentes a episódios anteriores de depressão, os organismos desenvolverão transtornos em um nível mais baixo de exposição ao estressor, causando mais dano ao hipocampo e, assim, diminuindo a resposta ao tratamento com antidepressivos (WILLNER; SCHEEL-KRUGER; BELZUNG, 2014).

Os riscos associados a exposição aos estressores e o caráter invasivo dos estudos neurobiológicos dificultam a obtenção de dados que revelem detalhes da relação causal entre estressores, vulnerabilidade a transtornos mentais e resistência ao tratamento antidepressivo em humanos. As evidências que existem são indiretas e foram obtidas em estudos de imagem, observacionais em humanos ou animais (ARNONE; MCKIE; ELLIOTT et al., 2013; CALDARONE; ZACHARIOU; KING, 2015; KENDLER; THORNTON; GARDNER, 2000; LEVINSTEIN; SAMUELS, 2014). Assim, uma das formas de estudar a relação causa-efeito entre o estresse e suas consequências é em modelos animais. Embora limitados, os modelos animais fornecem informações detalhadas sobre os mecanismos pelos quais os estressores promovem consequências comportamentais (MATTHEWS; CHRISTMAS; SWAN et al., 2005).



Figura 1: A relação entre o papel do estresse e a eficácia dos antidepressivos monoaminérgicos no tratamento da depressão.



Fonte: Adaptado de Willner; Scheel-Kruger; Belzung (2014)

Neste estudo, o interesse é estudar se a exposição ao estresse em um período crítico do desenvolvimento pode criar um perfil de alta vulnerabilidade aos transtornos comportamentais e de baixa resposta ao tratamento com antidepressivos de um indivíduo na vida adulta. O assunto será abordado no próximo capítulo.

### 1.3. O ESTRESSE NO INÍCIO DA VIDA E A RESISTÊNCIA AO TRATAMENTO COM ANTIDEPRESSIVOS EM MODELOS ANIMAIS.

Estressores aplicados a animais de laboratório geram mudanças comportamentais e que podem ser homólogas a aspectos dos distúrbios neuropsiquiátricos, podendo ser usados para a compreensão da psicopatologia humana (WILLNER, 1990; 2017). Embora mimetizar transtornos neuropsiquiátricos de humanos em animais seja extremamente desafiador, dada a natureza subjetiva de muitos sintomas e a falta de biomarcadores, os “modelos animais de estresse” são

ferramentas úteis nas pesquisas (HARRO, 2019; KRISHNAN; NESTLER, 2011; MAXIMINO; VAN DER STAAY, 2019; NESTLER; HYMAN, 2010). Dado que o estresse desencadeia diversos transtornos neuropsiquiátricos em humanos (MCEWEN; AKIL, 2020; RUSSO; CHARNEY, 2013), a exposição a estressores que geram comportamentos aberrantes em animais de laboratório são considerados “modelos animais de estresse”.

Os estressores usados nos modelos animais de estresse podem variar em tipo, duração, frequência e intensidade (GURURAJAN; REIF; CRYAN *et al.*, 2019; SLATTERY; CRYAN, 2017). Com relação ao tipo, os estímulos podem ser classificados como, por exemplo, físicos ou psicológicos, variáveis ou monótonos, imprevisíveis e inescapáveis, na vida adulta ou na vida perinatal (CAMPOS; FOGACA; AGUIAR *et al.*, 2013; KOOLHAAS; BARTOLOMUCCI; BUWALDA *et al.*, 2011; SLATTERY; CRYAN, 2017; WILLNER, 2017). Independente do tipo, os estressores podem ser apresentados ao organismo de forma aguda ou crônica (WANG; TIMBERLAKE; PRALL *et al.*, 2017; WILLNER, 2017) e, nesta última condição, de maneira contínua ou intermitente (CAMPOS; FOGACA; AGUIAR *et al.*, 2013; PORSOLT, 1997). Em termos de intensidade, os estressores podem ser classificados como leves, moderados ou intensos (CAMPOS; FOGACA; AGUIAR *et al.*, 2013). Em animais de laboratório é difícil definir se o estressor é puramente físico ou psicológico, porém, as demais características que dependem de como o estressor é aplicado, podem ser controladas pelo experimentador. Os protocolos de aplicação de estressores podem usar uma única categoria ou uma combinação de estímulos, dependendo da resposta que se espera mimetizar.

As respostas dos animais de laboratório aos estressores podem ser averiguadas por testes comportamentais (SILBERMAN; ACOSTA; ZORRILLA ZUBILETE, 2016; WILLNER; BELZUNG, 2015). As definições de “modelo animal” e “teste comportamental” são, às vezes, compreensivelmente confundidas. Um “modelo animal” requer tanto uma manipulação (por exemplo, exposição ao estresse crônico), quanto uma leitura (por exemplo, o tempo que o animal permanece imóvel no teste do nado forçado após o protocolo de estresse crônico). Já um “teste comportamental” se refere meramente a uma leitura do comportamento em uma situação estruturada, por exemplo, o tempo de imobilidade no teste do nado forçado (SLATTERY; CRYAN, 2017). Assim, os protocolos de “modelos animais de estresse” também envolvem a

escolha de um “teste comportamental” associado, dependendo da resposta que se espera medir.

Como visto no capítulo anterior, o estresse também desencadeia alterações moleculares em animais de laboratório. De fato, uma revisão sistemática seguida de meta-análise, observou que ratos que foram submetidos ao protocolo de estresse crônico imprevisível, apresentavam expressão alterada de receptores 5-HT<sub>1A</sub> principalmente no córtex frontal e dos receptores 5-HT<sub>2A</sub> em todo o córtex e no hipotálamo dos roedores (LAGES; ROSSI; KRAHE *et al.*, 2021). Estas alterações podem estar relacionadas a redução do efeito no tratamento com ISRSs. Como mencionado no primeiro capítulo desta introdução, os efeitos dos ISRSs sobre o comportamento e o humor são em parte dependentes da integridade do sistema serotoninérgico (CELADA; ARTIGAS, 1993; DELGADO; CHARNEY; PRICE *et al.*, 1990)

Os períodos pré- e pós-natal são críticos para o desenvolvimento do sistema nervoso de humanos e animais (SILBERMAN; ACOSTA; ZORRILLA ZUBILETE, 2016). Durante o período perinatal, o encéfalo é particularmente sensível às remodelações induzidas por fatores ambientais. Experiências adversas no início da vida, tais como estresse ou qualidade inferior dos cuidados maternos, podem ter consequências prejudiciais de longa duração para um indivíduo (PARK; SEO; LEE *et al.*, 2018). Este fenômeno, muitas vezes referido como 'programação de início da vida', é observado em várias espécies (ANDERSEN, 2015). Em humanos, o estresse no início da vida é associado com um risco aumentado de doenças neuropsiquiátricas e podem estar associados à resistência a antidepressivos (MACCARI; KRUGERS; MORLEY-FLETCHER *et al.*, 2014; TALAROWSKA, 2020).

Neste trabalho estudamos se a exposição ao estresse em um período crítico do desenvolvimento pode criar um perfil de alta vulnerabilidade aos transtornos comportamentais e de baixa resposta ao tratamento com antidepressivos de um animal de laboratório na vida adulta (LOPIZZO; MAZZELLI; ZONCA *et al.*, 2020; MCEWEN; AKIL, 2020; YANO; MATSUZAKI; IWASA *et al.*, 2019). Em decorrência deste objetivo, foi escolhido um “modelo animal de estresse perinatal”.

#### 1.4. PRIVAÇÃO MATERNAL

De forma geral, os protocolos de estresse perinatal aplicados a animais de laboratório promovem alterações que perduram durante a vida (JANETSIAN-FRITZ; TIMME; TIMM *et al.*, 2018). Dentre elas, parece estar a resistência aos efeitos do tratamento com os antidepressivos na vida adulta (ZHANG; WANG; WANG *et al.*, 2015). As evidências indicam que a redução do cuidado materno, bem como outros estresses antes do desmame, podem ser os fatores que desencadeiam tal processo (GODOY; UMEOKA; RIBEIRO *et al.*, 2018).

Tais adaptações neurais ao ambiente são cumulativas ao longo da vida útil e a função cerebral em qualquer momento posterior da vida é resultado de experiências que ocorrem antes da concepção, durante a gestação e durante o desenvolvimento pós-natal (COLOM-LAPETINA; BEGLEY; JOHNSON *et al.*, 2017). Foi observado que, nos primeiros dias de vida, o cérebro é sensível a estímulos externos, sejam eles positivos, como por exemplo a interação da genitora com a prole ou negativos, como o estresse ou a privação maternal (CALDARONE; ZACHARIOU; KING, 2015).

Estudos com animais sugerem que experiências adversas ou estresse materno durante o período perinatal resultam em alterações fisiológicas e comportamentais na prole (BRUNTON; RUSSELL, 2011; YANO; MATSUZAKI; IWASA *et al.*, 2019). Para exemplificar, ratas adultas submetidas a privação maternal no início da vida, responderam com aumento da distância percorrida no teste do campo aberto (BURKE; LLORENTE; MARCO *et al.*, 2013). Em ratos filhotes (PN 12-16), foi relatada uma diminuição na locomoção, *rearing* (exploração vertical) e *grooming* (Autolimpeza) após a privação maternal (ELLENBROEK; DERKS; PARK, 2005). Em machos, mas não em fêmeas, foi observado um aumento significativo no tempo gasto explorando os braços abertos do labirinto, sugerindo assim um efeito ansiolítico da privação maternal (BURKE; LLORENTE; MARCO *et al.*, 2013; LLORENTE-BERZAL; FUENTES; GAGLIANO *et al.*, 2011). No trabalho de GIRARDI; ZANTA e SUCHECKI (2014) foi observado aumento de ansiedade e de esquiva social em ratos adolescentes privados da genitora no DP9 por 24 horas. Além das alterações comportamentais, os animais de laboratório submetidos à privação maternal apresentam alterações fisiológicas, como aumento do ACTH e corticosterona (LEVINE; HUCHTON; WIENER *et al.*, 1991; VIVEROS; DIAZ; MATEOS *et al.*, 2010), e resposta aumentada do ACTH a estímulos estressantes (SUCHECKI;

MOZAFFARIAN; GROSS *et al.*, 1993) e redução do peso corporal e metabolismo energético (ELLENBROEK; DERKS; PARK, 2005).

Existem diferentes tipos de protocolos de estresse perinatal em animais. Desenvolvido por LEVINE (1957) o *Early handling paradigm*, consiste em uma manipulação diária da prole, por 2 ou 3 semanas, e uma separação da genitora por no máximo 15 minutos. Essa manipulação promove o aumento do cuidado da genitora com a prole, levando a uma resposta neuroendócrina aguda na prole (MEANEY; VIAU; BHATNAGAR *et al.*, 1991; SCHMIDT; WANG; MEIJER, 2011). Uma questão crítica em relação a este paradigma é a escolha do controle apropriado ou grupo de comparação. Historicamente, no paradigma de tratamento precoce, os animais que foram submetidos ao protocolo são comparados a filhotes não manipulados, ou seja, ninhadas que não são expostas a qualquer intervenção. Todavia, esse procedimento também pode ser considerado um grupo experimental, já que a falta de qualquer estímulo externo também afeta o comportamento de cuidado materno (SCHMIDT; WANG; MEIJER, 2011).

Outro modelo animal de estresse no início da vida é o “modelo de separação maternal”. Proposto por SCHAPIRO; GELLER e EIDUSON (1962), nesse modelo se faz uma separação prolongada da genitora e a ninhada e tem como objetivo reduzir a quantidade de cuidado materno com a prole, modelando assim a negligência emocional e física (PRYCE; FELDON, 2003). As metodologias aplicadas são altamente variáveis, não apenas no tempo e duração da separação, mas também no que diz respeito à temperatura (quente ou fria), tipo de separação (genitora ou ninhada retirada da gaiola), ou isolamento (filhotes separados isoladamente ou toda a ninhada) (ABELAIRA; REUS; QUEVEDO, 2013; MACCARI; KRUGERS; MORLEY-FLETCHER *et al.*, 2014).

Similar à separação, a privação maternal consiste na remoção da genitora por um período mais curto, de 24h por uma única vez, e pode ser aplicada em diferentes momentos durante o desenvolvimento pós-natal (STANTON; GUTIERREZ; LEVINE, 1988). Este modelo ganhou força na investigação dos efeitos de curto e longo prazo do estresse no início da vida quando muitas alterações fisiológicas foram observadas (MARCO; LLORENTE; LOPEZ-GALLARDO *et al.*, 2015). A privação maternal por 24h promove, a curto prazo, a interrupção do cuidado maternal, que nos primeiros dias de vida é fator importante para manutenção da prole (KUHN; SCHANBERG, 1998).

Na privação maternal, o fator nutricional é afetado pois a prole não se alimenta durante o período de privação, promovendo uma hipoglicemia (ELLENBROEK; COOLS, 2002). Outro fator estressante, que faz parte de alguns protocolos de privação maternal é a diminuição da temperatura corporal, uma vez que a prole nos primeiros dias de vida não tem termorregulação (MARCO; LLORENTE; LOPEZ-GALLARDO *et al.*, 2015). Essa diminuição na temperatura se associa a hipoglicemia e desencadeia a liberação de corticosterona, resultado da adaptação fisiológica para a sobrevivência da prole (KUHN; SCHANBERG, 1998; SUCHECKI; MOZAFFARIAN; GROSS *et al.*, 1993; VAN OERS; DE KLOET; LEVINE, 1999).

A privação maternal também pode alterar a expressão de receptores serotoninérgicos, no córtex e no hipocampo, dos animais submetidos a este protocolo. Observou-se que a privação maternal promoveu um aumento na expressão do gene do receptor de serotonina 5HT<sub>2A</sub> no córtex e do receptor 5HT<sub>1A</sub> na área CA1 do hipocampo em desenvolvimento (VÁZQUEZ; LÓPEZ; VAN HOERS *et al.*, 2000). O tratamento prévio com desipramina, um antidepressivo tricíclico, evitou a regulação positiva induzida pela privação materna do receptor 5-HT 1B e a resposta adrenocortical aumentada observada nestes animais (VÁZQUEZ; ESKANDARI; ZIMMER *et al.*, 2002). No entanto, estas alterações parecem estar relacionadas a cronologia da privação materna, e não a privação em si, uma vez que a alteração da expressão destes receptores é dependente do dia PN que o animal foi privado da genitora (LIMON-MORALES; SORIA-FREGOZO; ARTEAGA-SILVA *et al.*, 2014; VÁZQUEZ; ESKANDARI; ZIMMER *et al.*, 2002; VÁZQUEZ; LÓPEZ; VAN HOERS *et al.*, 2000)

A longo prazo, a privação maternal altera os parâmetros fisiológicos e comportamentais, como visto acima. No entanto, ainda não é claro o envolvimento destas alterações na resistência ao tratamento com antidepressivos (AKIL; GORDON; HEN *et al.*, 2018; RUBERTO; JHA; MURROUGH, 2020; WILLNER; BELZUNG, 2015). Assim, o protocolo de estresse por “privação maternal” em ratos parece ser um “modelo animal de estresse perinatal” adequado para o presente estudo. O dia PN escolhido para se fazer a privação maternal foi o PN9 porque se observou que neste dia ocorre a maturação das conexões cerebrais entre córtex e hipocampo (JANETSIAN-FRITZ; TIMME; TIMM *et al.*, 2018), que estão envolvidas com o efeito dos antidepressivos no cérebro como visto nos capítulos anteriores.

## **2. HIPÓTESE**

O estresse no início da vida pode alterar as respostas dos indivíduos adultos aos estressores, tornando-os resistentes aos efeitos do tratamento com fármacos antidepressivos, como a fluoxetina, quando comparados aos animais que não sofreram estresse.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1 OBJETIVO GERAL:**

Avaliar como a privação maternal pode modificar o comportamento de machos e fêmeas, criando um perfil de resistência ao tratamento com fluoxetina.

### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Padronizar os procedimentos de obtenção dos ratos usados no desenvolvimento do projeto.
- Padronizar os testes comportamentais a serem usados no desenvolvimento do projeto.
- Padronizar o protocolo de privação maternal usados no desenvolvimento do projeto.
- Investigar o efeito da privação maternal sobre o comportamento dos ratos dos dois sexos na vida adulta.
- Investigar se a privação maternal afeta o efeito da fluoxetina sobre o comportamento dos ratos adultos dos dois sexos.
- Investigar o efeito da privação maternal sobre o comportamento das progenitoras.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

#### 4.1.1. Condições de alojamento.

Ratos Wistar, machos (genitores, n=18) e fêmeas (genitoras, n=26) provenientes do Biotério Central da UFSC, foram utilizados como progenitores (exceto experimento 1). Os ratos utilizados como progenitores chegaram ao laboratório com 21 dias pós-natal (PN) e foram alocados ao biotério de acordo com o sexo, onde permaneceram até o início dos acasalamentos.

Os ratos provenientes do acasalamento (n=80 machos e n=80 fêmeas) descrito no item 4.1.2, foram alocados ao biotério de acordo com o sexo, após desmame (21 dias) onde permaneceram até o início dos testes comportamentais (100 dias $\pm$ 2). Para o experimento 1, os animais foram obtidos do projeto de CELLA (2018) que avaliava as genitoras desses animais como objeto de estudo. Suas proles (n total= 64 ratos; n=32 machos e n=32 fêmeas) seriam descartadas, sendo assim, foram reaproveitadas para este primeiro experimento.

Todos os animais foram mantidos em área climatizada com temperatura de 21 $\pm$  2 graus Celsius com exaustão e acesso a água e ração *ad libitum* em ciclo claro/escuro de 12 h (luzes apagadas 6:00 h e ligadas às 18:00 h). Os animais foram divididos em grupos de 3-5 animais nas caixas-padrão (gaiolas plásticas, 50 x 30 x 10 cm com o piso coberto de serragem) e permaneceram neste ambiente pelos dias anteriores ao início do teste e durante o experimento comportamental.

A limpeza das caixas era realizada três vezes por semana, sempre nos mesmos dias e horários e pelo mesmo experimentador. Consistia na troca da maravalha e raspagem dos resíduos da caixa. A água era trocada, e a comida era conferida, três vezes por semana, ou quando necessário. A conferência de água e comida era realizada diariamente. A caixa era trocada a cada 15 dias para lavagem e, os animais eram realocados para caixas limpas originárias do laboratório de Neurobiologia do Comportamento (LabNeC – CCB – UFSC). Todos os procedimentos realizados no biotério, eram realizados seguindo os Procedimentos Operacionais Padrão, estabelecidos pelo laboratório. Todos os protocolos e procedimentos experimentais em animais de laboratório foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC – PP8080-2017.



#### 4.1.2. Obtenção de proles

Para a realização deste trabalho foram gerados 5 lotes de ratos machos e fêmeas da linhagem Wistar no biotério do laboratório de Neurobiologia do Comportamento. Para o acasalamento, foram utilizados ratos com idade entre 65 e 80 dias, sendo as fêmeas com peso  $\geq 180$  gramas e os machos entre 250 e 350 gramas oriundos do Biotério Central da UFSC como descrito no item 4.1.1.

Cada prole foi obtida em um processo que consistiu das seguintes etapas: 1- pareamento; 2-acasalamento; 3- gestação; 4-nascimento e 5-desmame (Figura 2). O pareamento consistia na transferência dos animais para a sala de acasalamento onde as gaiolas eram “pareadas”, de modo que, as gaiolas das fêmeas e dos machos ficassem lado a lado até o dia do acasalamento. Entre 6 a 7 dias depois do pareamento, um macho e duas a três fêmeas eram alocados em uma única caixa de acasalamento. Vinte e quatro horas após o acasalamento era examinada a presença de *plug* copulatório no lavado vaginal. As fêmeas que apresentavam o *plug* copulatório eram separadas em uma nova caixa e a data registrada como dia 1 da gestação. As fêmeas que não apresentavam o *plug* copulatório permaneciam na caixa de acasalamento.

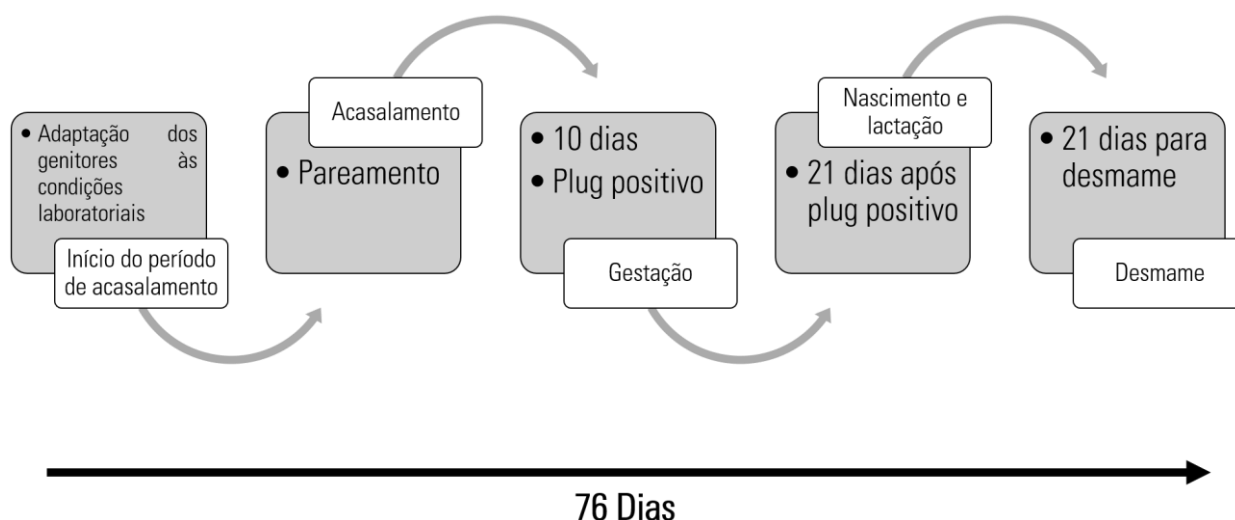
Para o primeiro lote de animais, o procedimento foi repetido durante 10 dias consecutivos e se o *plug* copulatório não fosse detectado até o 5º dia de acasalamento o macho era substituído por outro. Do segundo lote em diante, a partir de pequenos ajustes no protocolo de acasalamento, o tempo requerido para o aparecimento do *plug* copulatório foi inferior a 5 dias. Em todos os lotes, as fêmeas prenhas eram mantidas no biotério de fêmeas em caixas com 2-3 fêmeas, até o nono dia de gestação e, eram separadas para caixas individuais, a partir do décimo dia de gestação e transferidas para o biotério de genitoras, onde permaneciam até o desmame. Os dados podem ser encontrados em (SUMAN, 2020).

No dia do nascimento, a sexagem era realizada e o tamanho da prole de cada genitora era ajustado para 8 animais, sendo, 4 machos e 4 fêmeas. Em todos os lotes, a genitora e a prole eram mantidas em área climatizada com temperatura de  $21 \pm 2$  graus Celsius com exaustão e acesso a água e ração *ad libitum* em ciclo claro/escuro de 12 h (luzes apagadas 6:00 h e ligadas às 18:00 h) até o desmame.

Após desmame, no dia 21 PN, as genitoras e a prole foram acomodadas em biotérios distintos para cada sexo, de acordo com o item 4.1.1, até a idade apropriada

para cada experimento (descritos nos itens 4.3.3). As planilhas de acompanhamento do processo de obtenção das proles podem ser encontradas em <https://osf.io/hjre8/> (SUMAN, 2020).

Figura 2: Protocolo de acasalamento



#### 4.1.3. Eutanásia

Os animais adultos foram anestesiados com Uretana (35%, Sigma, U 2500) em uma sala próxima à sala de animais e distante do local de eutanásia (para evitar o contato olfativo com solvente ou sangue). Os animais adultos foram levados para a sala da perfusão sob nível profundo de anestesia (ausência completa de reflexos de endireitamento e pinçamento das patas) quando e onde os procedimentos foram realizados. Sob anestesia, a eutanásia foi realizada por dessangramento e perfusão intracardíaca com solução salina seguida de solução de formaldeído 4% para fixação ou, alternativamente, por decapitação por guilhotinagem para obtenção de amostras de material fresco. Para o experimento 4 o método de anestesia foi Ketamina + Xilazina. Para os animais recém-nascidos, o protocolo consistiu em decapitação usando uma tesoura cirúrgica.

## 4.2. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

### 4.2.1. Privação maternal

O protocolo utilizado na experiência foi adaptado de ELLENBROEK, B. A.; VAN DEN KROONENBERG, P. T. e COOLS, A. R. (1998). As ratas prenhas eram mantidas em caixas individuais desde o décimo dia de gestação até o dia do parto. Após o parto, a genitora e a prole permaneciam juntos até o nono dia PN. O protocolo de privação maternal era realizado por 24 horas a partir do nono até o décimo dia PN. Este momento para a privação maternal, entre o 9º e 10º dias PN, foi selecionado por ser a janela temporal quando ocorre a maturação das conexões córtex-hipocampo, objeto de interesse deste estudo (JANETSIAN-FRITZ; TIMME; TIMM *et al.*, 2018; MARCO; LLORENTE; LOPEZ-GALLARDO *et al.*, 2015). Durante o período de privação maternal, os filhotes permaneciam na caixa-casa e a genitora era retirada para outro biotério. A prole permanecia sob aquecimento constante durante o período de privação maternal. O aquecimento era feito utilizando uma placa de calor posicionada abaixo da caixa. Ao final da sessão de privação maternal, a genitora era devolvida a caixa-casa e eram observados os primeiros comportamentos da genitora voltados ao cuidado com a prole. As planilhas de com o registro dos comportamentos da genitora podem ser encontradas em <https://osf.io/hjre8/> (SUMAN, 2020).

### 4.2.2 Tratamentos Farmacológicos

O fármaco utilizado foi o Hidroclorato de Fluoxetina (FLX) da marca Sigma (F3518) administrado por via oral, por ingestão espontânea (SCHLEIMER; JOHNSTON; HENDERSON, 2005) nas doses de 2,5 mg/kg (CRYAN; VALENTINO; LUCKI, 2005; DOMINGUES; LIMA; LINDER *et al.*, 2020; MEZADRI; BATISTA; PORTES *et al.*, 2011) e 10 mg/kg (LI; WU; YU *et al.*, 2018; SONG; SUN; JI *et al.*, 2018). A administração foi realizada de forma cega ao experimentador. Um segundo experimentador sorteava e fazia a codificação da solução que seria administrada aos animais. Somente após análise estatística, os tratamentos eram revelados.

A FLX foi administrada por ingestão espontânea diariamente por 14 dias. O protocolo de ingestão espontânea foi baseado em SCHLEIMER; JOHNSTON e HENDERSON (2005) e DOMINGUES; LIMA; LINDER *et al.* (2020) e consistia no treinamento dos animais, por 7 dias, antes do início do tratamento, a ingerir espontaneamente uma solução de sacarose 10%. O treinamento era realizado na sala

de experimentação onde o tratamento seria posteriormente administrado. Os animais eram apresentados pela grade da caixa-viveiro a uma seringa, contendo 1mL da solução. O treinamento diário só terminaria quando o animal bebe-se todo o volume da seringa. No dia do início do tratamento a FLX era diluída na solução de sacarose 10% e administrada aos animais.

Tanto no experimento 3 quanto no 4, os ratos de todos os grupos experimentais foram testados no nado forçado 1h após a primeira dose, no teste de alimentação suprimida pela novidade, 1h após a sétima dose e no teste de preferência pela sacarose após 14 administrações. No experimento 4, para avaliação dos efeitos crônicos da FLX, os ratos receberam 15 doses de fluoxetina antes de serem testados em um teste adicional do nado forçado que ocorreu após o término da “bateria de testes”.

#### 4.2.3 Teste do nado forçado

O teste do nado forçado (TNF) em ratos consistiu na inserção do animal à uma cuba cilíndrica com coluna de água suficiente para que o animal não encoste as patas e a cauda no fundo da cuba durante uma sessão de pré-teste e outra de teste (DETKE; RICKELS; LUCKI, 1995). O pré-teste consiste em uma exposição à situação descrita acima por 15 minutos, no dia experimental 1, enquanto o teste de 5 minutos ocorria 24 horas depois, no dia experimental 2.

Tanto a sessão de pré-teste, quanto a de teste, foram gravadas por uma câmera posicionada acima da cuba para posterior análise dos comportamentos, pelo software EthoWatcher (CRISPIM JUNIOR; PEDERIVA; BOSE *et al.*, 2012). Todos os vídeos eram codificados para que o analisador não soubesse qual era o fármaco ou se havia passado por protocolo de privação maternal, e os seguintes comportamentos eram quantificados:

- Imobilidade: Determinada pela ausência de movimentos exceto pequenos e ocasionais movimentos, provavelmente necessários para a manutenção da cabeça fora da água. O corpo do animal pode se deslocar pelo cilindro em razão do movimento da água ou pela própria inércia.

- Escalada: O dorso do animal se encontra perpendicular à linha da água e os membros anteriores apresentam movimentos sincrônicos ou alternados ao longo do

eixo longitudinal do corpo, podendo, ou não, estar em contato com as extremidades do cilindro.

- Nado: Determinado pelo movimento horizontal das patas dianteiras do animal gerando deslocamento do corpo pela superfície da água. O corpo do animal pode deslocar-se ao longo do eixo longitudinal (direita ou esquerda), adiante (focinho) ou para trás (cauda).

- Mergulho: Determinado pelo dorso, as orelhas e o focinho abaixo da linha da água.

Se no experimento houvesse tratamento farmacológico (Experimentos 3 e 4), o fármaco seria administrado 1 hora antes da sessão teste. Em todas as sessões a altura da coluna (50cm) e a temperatura da água ( $25^{\circ}\text{C}\pm 1$ ) foram controladas. Ao término da sessão, o animal era cuidadosamente seco com pano seco e macio, e retornava para a gaiola-viveiro onde, após 7 dias, era realizado o teste subsequente.

Todos os comportamentos foram avaliados, mas somente o tempo de imobilidade será apresentado. Os dados brutos estão disponíveis em <https://osf.io/hjre8/>

#### 4.2.4. Alimentação suprimida pela novidade

O teste de alimentação suprimida pela novidade (ASN) em ratos consistiu na inserção do rato em uma arena, onde o animal nunca esteve previamente. No teste se quantifica a latência (s) para o rato se aproximar e comer a ração em um ambiente novo e potencialmente perigoso, depois de um período de privação de alimento (24 horas) (BLASCO-SERRA; GONZALEZ-SOLER; CERVERA-FERRI *et al.*, 2017). A latência para começar a comer (definido como o rato sentado e mordendo o *pellet* com o uso das patas dianteiras) foi registrada por um período de 5 minutos, podendo ser estendida até 10 minutos, caso o animal não comesse nos 5 minutos iniciais (SANTARELLI; SAXE; GROSS *et al.*, 2003). O alimento dos ratos era retirado da caixa viveiro 24 horas antes da sessão teste.

No momento do teste, um único *pellet* de ração era colocado no centro da arena de teste e o animal era colocado em um canto da caixa. As medidas da arena eram de 80cm x 80cm. Todos os animais eram acomodados por pelo menos 1 hora antes na sala de experimentação e a iluminação e os ruídos eram controlados para todos os animais. A temperatura nesta sala era de  $21\pm 2$  graus Celsius. Todos os vídeos eram codificados para que o analisador não soubesse qual era o fármaco ou se havia

passado por protocolo de privação maternal. O teste foi gravado por uma câmera posicionada acima da arena, e uma câmera posicionada à frente da arena para posterior análise dos comportamentos, pelo software EthoWatcher (CRISPIM JUNIOR; PEDERIVA; BOSE *et al.*, 2012).

#### 4.4.5. Preferência pela sacarose

O teste de preferência pela sacarose (PS) em ratos consistiu na quantificação do volume de sacarose consumido em relação ao volume de água consumido em um período de 24 horas. Durante o teste PS os ratos foram acondicionados pelo período de 24 horas em caixas individuais, contendo duas garrafas, uma com 300mL de água e outra com 300mL de solução contendo 2% de sacarose (BRENES; FORNAGUERA, 2009; TAKATSU-COLEMAN; PATTI; ZANIN *et al.*, 2013). Para prevenir um possível efeito de preferência por algum dos lados da caixa, as garrafas foram invertidas após um período de 12 horas.

O consumo de sacarose foi calculado como a porcentagem de consumo da solução de sacarose em relação ao total de líquido consumido (água + sacarose) (BRENES; FORNAGUERA, 2009). Para a quantificação do consumo da sacarose, foi utilizada a mesma vidraria calibrada, para todos os experimentos. Neste experimento não houve a realização da gravação do teste.

### 4.3. DESENHO EXPERIMENTAL

#### 4.3.1. Experimento 1 – Padronização do protocolo dos testes comportamentais

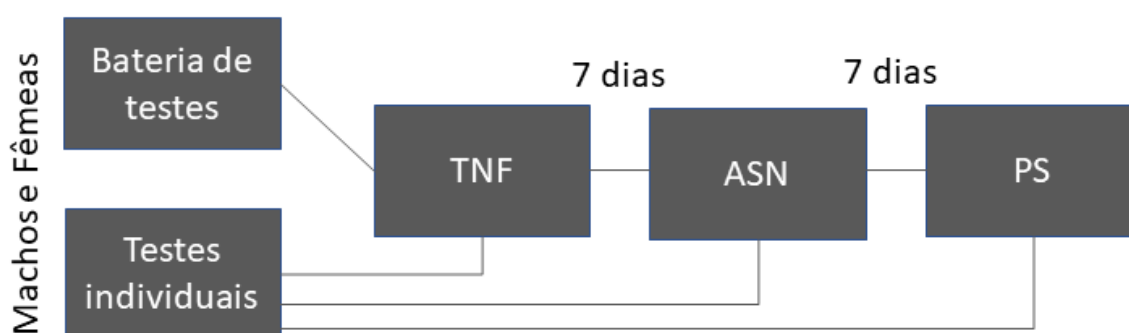
O objetivo deste estudo piloto foi padronizar as condições experimentais para os testes comportamentais. Além disso, se investigou a viabilidade de se usar uma “bateria de testes” para avaliar os comportamentos dos animais nos diferentes experimentos subsequentes. A “bateria de testes” poderia reduzir a quantidade de animais experimentais necessários para se investigar o efeito das diferentes intervenções do estudo sobre o comportamento dos ratos. Para tanto, planejou-se comparar os resultados obtidos em estudos no quais os ratos foram submetidos a uma “bateria de testes” ou a testes independentes (Figura 3). A ordem dos testes da “bateria de testes” foi escolhida baseada no fato que o TNF avalia o efeito agudo do tratamento com FLX, enquanto ASN e PS avaliam o efeito do tratamento crônico com

FLX já pensando no andamento do projeto. Assim, os ratos machos ou fêmeas foram alocados em quatro grupos experimentais:

- Grupo “bateria de testes” (BT): todos os animais foram avaliados nos seguintes testes comportamentais aplicados na seguinte ordem: nado forçado (TNF), alimentação suprimida pela novidade (ASN) e preferência pela sacarose (PS). Os testes foram realizados em dias separados por uma semana de intervalo (descritos no item 4.2).
- Grupo TNF: os animais foram avaliados apenas pelo TNF.
- Grupo ASN: os animais foram avaliados apenas ao ASN.
- Grupo PS: os animais foram avaliados apenas ao PS.

Os animais do grupo experimental foram testados com 100 dias de idade e não passaram por nenhum tratamento farmacológico ou estresse prévio.

Figura 3: Desenho Experimental do Experimento 1



#### 4.3.2. Experimento 2 – Padronização do protocolo de privação maternal

O objetivo deste experimento foi padronizar as condições dos procedimentos de “privação maternal” além de investigar quais parâmetros dos testes comportamentais são afetados por este estresse. Avaliamos então, se a resposta à privação maternal, poderia ser diferente em ratos machos e fêmeas. Para isso, foi utilizado o protocolo comportamental validado no experimento anterior, que avalia diferentes respostas dos animais frente uma “bateria de testes” (Figura 4).

Assim, os ratos machos ou fêmeas foram alocados em dois grupos experimentais:

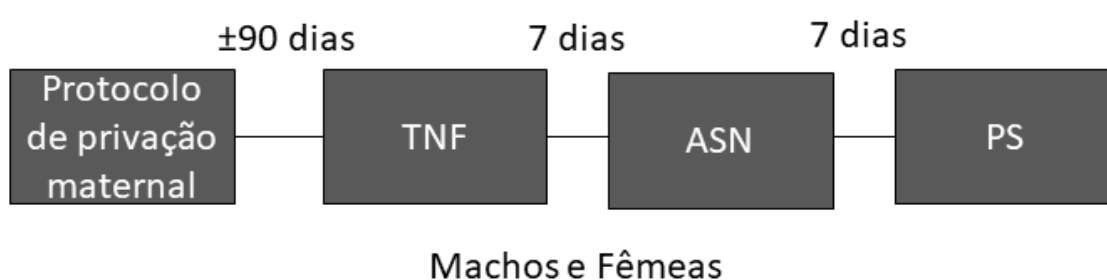
- Grupo controle (não privados, NP): todos os ratos foram mantidos em condições padrão de criação da prole.
- Grupo privação maternal (privados, P): todos os ratos passaram pelo processo de privação maternal como descrito no item 4.2.1.

Para esse experimento, os animais foram obtidos por criação própria (descritos no item 4.1.2). O protocolo de privação maternal realizado está descrito no item 4.2.1 e foi utilizado em todos os experimentos seguintes. Neste experimento os animais dos grupos NP e P de ambos os sexos tinham idade de  $100 \pm 2$  dias quando ingressaram na linha do tempo da “bateria de testes” padronizada no experimento 1. Resumindo, a “bateria de testes” foi aplicada da seguinte maneira (Figura 4):

- 1: dia experimental 1: pré-teste do TNF;
- 2: dia experimental 2: teste do TNF;
- 3: dia experimental 7: teste de ASN;
- 4: dia experimental 14: teste de PS.

Ao final de cada teste comportamental, os animais retornavam as respectivas caixa-viveiros e permaneciam nas condições padrão até o próximo teste comportamental. Nesse experimento, os animais não passaram por nenhum tipo de tratamento farmacológico.

Figura 4: Desenho Experimental do Experimento 2



4.3.3. Experimento 3 - Estudo do efeito do tratamento com FLX 2,5 mg/kg sobre os comportamentos dos ratos machos e fêmeas, privados ou não das progenitoras no início da vida.

O objetivo deste experimento foi avaliar os animais que passaram pelo protocolo de privação maternal (4.2.1) e qual a resposta ao tratamento com FLX 2,5 mg/kg na “bateria de testes”, comparando-os com animais que não passaram por



nenhum tipo de estresse. A privação materna foi feita de acordo com a padronização feita no experimento 2. A avaliação do comportamento foi feita com a “bateria de testes” padronizada no experimento 1. Além disso, buscamos investigar se o tratamento com o fármaco poderia reverter as consequências da privação materna sobre o comportamento dos animais. O tratamento com a FLX 2,5 mg/kg foi por via oral–foi diária, sempre no mesmo horário, e sendo feito por um experimentador treinado (ver descrição detalhada no item 4.2.2). O desenho experimental é descrito na Figura 5.

Assim, os ratos machos ou fêmeas foram alocados em quatro grupos experimentais:

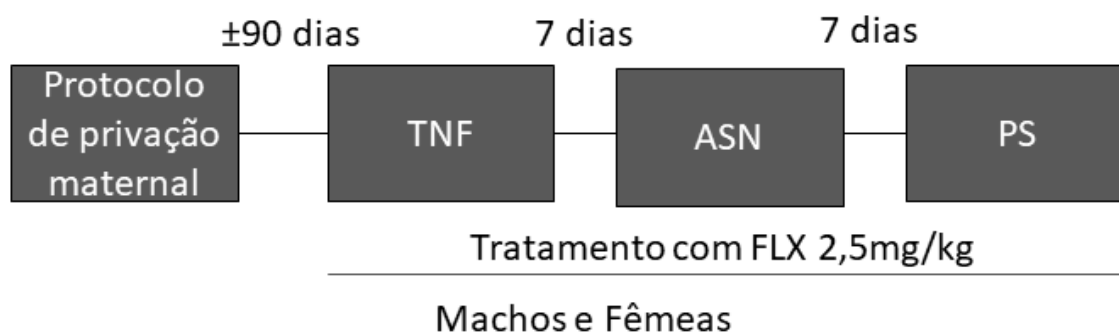
- Grupo controle NP (não privados, NP e não tratados, NT): todos os ratos foram mantidos em condições padrão de criação da prole e não receberam o tratamento farmacológico.

- Grupo controle P (privados, P e não tratados, NT): todos os ratos passaram pelo processo de privação materna como descrito no item 4.2.1 e não receberam o tratamento farmacológico.

- Grupo tratado NP (não privados, NP e tratados, FLX): todos os ratos foram mantidos em condições padrão de criação da prole e receberam o tratamento farmacológico.

- Grupo tratado P (privados, P e tratados, FLX): todos os ratos foram mantidos em condições padrão de criação da prole e receberam o tratamento farmacológico.

Figura 5: Desenho experimental do Experimento 3



4.3.4. Experimento 4 – Estudo do efeito do tratamento com FLX 10 mg/kg sobre os comportamentos dos ratos machos e fêmeas, privados ou não das progenitoras no início da vida.

O objetivo deste experimento foi avaliar os animais que passaram pelo protocolo de privação materna (4.2.1) e qual a resposta ao tratamento com FLX 10 mg/kg na “bateria de testes”, comparando-os com animais que não passaram por nenhum tipo de estresse. A privação materna foi feita de acordo com a padronização feita no experimento 2. A avaliação do comportamento foi feita com a “bateria de testes” padronizada no experimento 1. Além disso, buscamos investigar se o tratamento com o fármaco poderia reverter as consequências da privação materna sobre o comportamento dos animais. O tratamento com a FLX 10 mg/kg foi por via oral–foi diária, sempre no mesmo horário, e sendo feito por um experimentador treinado (ver descrição detalhada no item 4.2.2). O desenho experimental é descrito na Figura 6. Neste experimento foi realizada uma segunda sessão de TNF, 15 dias após o início do tratamento para avaliação do efeito crônico da FLX.

Assim, os ratos machos ou fêmeas foram alocados em quatro grupos experimentais:

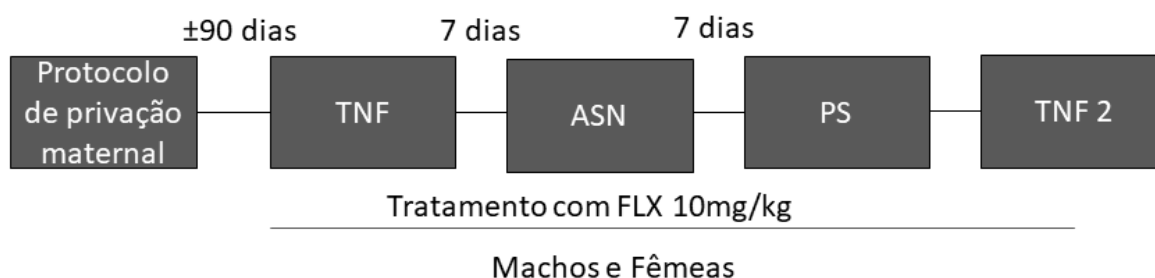
- Grupo controle NP (não privados, NP e não tratados, NT): todos os ratos foram mantidos em condições padrão de criação da prole e não receberam o tratamento farmacológico.

- Grupo controle P (privados, P e não tratados, NT): todos os ratos passaram pelo processo de privação materna como descrito no item 4.2.1 e não receberam o tratamento farmacológico.

- Grupo tratado NP (não privados, NP e tratados, FLX): todos os ratos foram mantidos em condições padrão de criação da prole e receberam o tratamento farmacológico.

- Grupo tratado P (privados, P e tratados, FLX): todos os ratos foram mantidos em condições padrão de criação da prole e receberam o tratamento farmacológico.

Figura 6: Desenho experimental do Experimento 4



4.3.5. Experimento 5 – Estudo do efeito da privação maternal sobre o comportamento das progenitoras: comparação com os genitores.

O objetivo deste experimento foi avaliar a influência da privação maternal, sobre o comportamento das ratas progenitoras. O protocolo comportamental utilizado sobre os genitores, ratos machos ou fêmeas consistiu na bateria de testes descrita a seguir. Sete dias após a retirada de prole, os genitores foram submetidos ao TNF, seguido pelo ASN 7 dias após e o PS 14 dias após. A influência do protocolo de privação maternal nas genitoras foi avaliada nas fêmeas que foram submetidas ao protocolo de privação maternal. Para fins de comparação, as fêmeas que foram mantidas em condições normais de criação foram submetidas a mesma bateria de testes. Fêmeas e machos foram testados nos mesmos dias e com idade próxima à da prole 1, totalizando 14 dias de experimento. Embora tenha sido intitulado “Experimento 5”, estes procedimentos foram realizados durante o curso dos experimentos 2 – 4.

Assim, os ratos machos ou fêmeas foram alocados em três grupos experimentais:

- Grupo de genitores machos: todos os ratos foram mantidos em condições padrão de biotério e passaram por experiência de cópula.

- Grupo fêmeas (não privadas, NP): todas as ratas foram mantidas em condições padrão de biotério e passaram por experiência de cópula, gestação, parto, amamentação.

- Grupo fêmeas (privadas, P): todas as ratas foram mantidas em condições padrão de biotério e passaram por experiência de cópula, gestação, parto, amamentação e separação maternal.

#### 4.3.6. Medidas para reduzir vieses experimentais

Os ratos foram alocados para cada grupo experimental por sorteio usando um gerador de números aleatórios (random.org), i.e., aleatoriamente. Os tratamentos, a coleta e análise dos dados foram feitos de forma “cega”, ou seja, o experimentador não sabia quais eram os grupos experimentais e qual era o tratamento. Uma única pessoa, que não fosse o experimentador, realizava o sorteio e aleatorização e tinha acesso aos tratamentos (MACLEOD; LAWSON MCLEAN; KYRIAKOPOULOU *et al.*, 2015; MUNAFÒ; NOSEK; BISHOP *et al.*, 2017). Os grupos experimentais e tratamentos só foram revelados após análise estatística. Todos os protocolos experimentais utilizaram ratos machos e fêmeas de acordo com as diretrizes do NIH (CLAYTON; COLLINS, 2014). O número de animais utilizados foi estimado após experimento piloto considerando o poder de efeito de 80% e erro do tipo I de 0,05 (BUTTON; IOANNIDIS; MOKRYSZ *et al.*, 2013).

#### 4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados das análises descritivas, normalidade e variância foram analisados no *software* Statistica®. Os tamanhos de efeito foram calculados através de linguagem de programação R (R CORE TEAM, 2019), com o uso do *software* livre RSTUDIO, utilizando o pacote Meta (SCHWARZER, 2007). Todos os gráficos foram construídos no *software* Graphpad Prism 7®.

A análise estatística foi definida *a priori*, baseada no desenho experimental traçado no projeto da tese. Para estimar o número de animais utilizados, realizamos o cálculo do poder e tamanho da amostra, considerando o poder de efeito de 80% e erro do tipo I de 0,05.

Todos os dados passaram pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e a determinação de homogeneidade de variância pelo teste de Levene. Os dados dos experimentos 1 e 2 foram analisados usando ANOVA de 2 vias univariada. Para os experimentos 3 e 4 foi utilizado ANOVA de 3 vias univariada. Excepcionalmente no experimento 4, uma ANOVA com medidas repetidas foi realizada para inferência do efeito do tratamento crônico de FLX no TNF. O experimento 5 foi analisado por um teste t de *student*. A análise *post hoc* utilizada foi o teste de Duncan para todos os experimentos.

Os tamanhos de efeito dos fatores da ANOVA foram estimados pelo cálculo do *partial eta squared* ( $\eta^2$ ) (LAKENS, 2013). COHEN (1988) define os tamanhos de efeito como pequenos ( $\eta^2 = 0,01$ ), médios ( $\eta^2 = 0,06$ ) e grandes ( $\eta^2 = 0,14$ ).

Para cada experimento, a diferença média normalizada (Hedge's g) foi calculada para estimar o tamanho do efeito (*Effect Size* ou g) de cada intervenção (experimento 1: bateria de testes; experimento 2: privação materna; experimento 3: tratamento com FLX 2,5 mg/kg; experimento 4: tratamento com FLX 10 mg/kg (BUTTON; IOANNIDIS; MOKRYSZ *et al.*, 2013; RAMOS-HRYB; BAHOR; MCCANN *et al.*, 2019).

Os tamanhos de efeito foram arbitrariamente definidos como “muito pequeno” (0.01-0.2); “pequeno” (0.2-0.5); “médio” (0.5-0.8); “grande” (0.8-1.2); “muito grande” (1.2-2); “enorme” (2-acima 2) (SAWILOWSKY, 2009). A magnitude da heterogeneidade foi arbitrariamente definida como “muito pequena” (0-25%);

“pequena” (25-50%); “moderada” (50-75%); “alta” (>75%) (HIGGINS; THOMPSON; DEEKS *et al.*, 2003). O tamanho do efeito estimado foi considerado "estatisticamente significativo" quando o intervalo de confiança de 95% (IC 95%) é sobressalente ao efeito nulo, e "inconclusivo" quando o IC 95% se sobrepõe ao efeito nulo (NAKAGAWA; CUTHILL, 2007).

## 5. RESULTADOS

Os dados de todos os experimentos, serão apresentados na forma de média  $\pm$  erro padrão média (média  $\pm$  EPM), e de tamanho do efeito (*Partial eta squared* ou Hedges'g  $\pm$  IC 95%) para todos os experimentos. As diferenças estatísticas das condições experimentais serão representadas por um asterisco (\*), enquanto, as diferenças sexuais serão representadas por uma cerquilha (#). As análises estatísticas foram descritas no item 4.4.

### 5.1. EXPERIMENTO 1 – PADRONIZAÇÃO DO PROTOCOLO DOS TESTES COMPORTAMENTAIS

Neste experimento, analisou-se a influência do tipo de protocolo de testes comportamentais sobre o comportamento dos ratos. Dois tipos de protocolos foram aplicados sobre ratos machos ou fêmeas: 1-bateria de testes, 2- testes independentes. Para avaliação da influência dos fatores “sexo” (machos ou fêmeas), e “tipo de protocolo” (bateria de testes ou testes independentes), ou interação entre os fatores sobre o comportamento dos ratos, em cada teste comportamental (TNF ou ASN ou PS) escolheu-se a ANOVA de duas vias (fatores: sexo e tipo de protocolo) univariada (teste comportamental específico). De forma geral, a influência do “sexo” e do “tipo de protocolo” sobre o comportamento dos ratos variou em magnitude e significância entre os testes comportamentais.

No TNF (Figura 7A), os ratos machos do grupo “bateria de testes” apresentaram menor tempo de imobilidade (média  $\pm$  EPM: 42,50  $\pm$  9,06) do que os machos do grupo “testes independentes” (média  $\pm$  EPM: 86,90  $\pm$  8,28). De forma oposta, as ratas do grupo “testes independentes” apresentaram média menor (média  $\pm$  EPM: 76,22  $\pm$  14,82) de tempo de imobilidade no TNF do que fêmeas do grupo “bateria de testes” (média  $\pm$  EPM: 85,74  $\pm$  13,73). Apesar das variações nas médias de tempo de imobilidade no TNF entre os grupos de ratos, os efeitos dos fatores “sexo”, “tipo de protocolo” e a interação entre eles variaram de pequeno a médio e

foram inconclusivos (Tabela 1). Em virtude da ausência de significância estatística da interação entre os fatores não há análise post hoc.

Tabela 1: Resultados da ANOVA duas vias do TNF

<b>Fatores (níveis)</b>	<b>SS</b>	<b>df</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>	<b><math>\eta^2p</math></b>
Sexo (macho ou fêmea)	2048	1;28	2048	1,04	0,316	0,037
Tipo de protocolo (bateria ou teste independentes)	2349	1;28	2349	1,20	0,284	0,042
Interação entres os fatores “Tipo de protocolo” e “Sexo”	5614	1;28	5614	2,86	0,102	0,096

Abreviaturas: SS: Soma dos quadrados; df: graus de liberdade; MS: média dos quadrados;  $\eta^2p$ = eta quadrado parcial

No ASN (Figura 7B), a latência para alimentação dos ratos machos do grupo “testes independentes” foi menor (média  $\pm$  EPM: 159,25  $\pm$  13,52) que do grupo “bateria de testes” (média  $\pm$  EPM: 185,75  $\pm$  26,43), enquanto as latências das fêmeas dos dois grupos experimentais foram maiores que dos machos, porém similares entre si (“testes independentes”, média  $\pm$  EPM: 241,25  $\pm$  10,98; “bateria de testes”, média  $\pm$  EPM: 245  $\pm$  18,94). A análise estatística revela que o efeito do fator sexo sobre as latências para alimentação dos ratos foi grande e significativo (Tabela 2). Em contraste, os efeitos do “tipo do protocolo” ou da interação entre os fatores foram pequenos e inconclusivos (Tabela 2). Em virtude da ausência de significância estatística da interação entre os fatores não há análise post hoc.

Tabela 2: Resultados da ANOVA duas vias da ASN

<b>Fatores (níveis)</b>	<b>SS</b>	<b>df</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>	<b><math>\eta^2p</math></b>
Sexo (macho ou fêmea)	39903	1;28	39903	8,931	0,006#	0,242
Tipo de protocolo (bateria ou teste independentes)	1830	1;28	1830	0,410	0,527	0,014
Interação entres os fatores “Tipo de protocolo” e “Sexo”	1035	1;28	1035	0,232	0,634	0,008

Abreviaturas: SS: Soma dos quadrados; df: graus de liberdade; MS: média dos quadrados;  $\eta^2p$ = eta quadrado parcial; # = efeito significativo do fator sexo.

No PS (Figura 7C), a preferência por sacarose dos ratos machos do grupo “testes independentes” foi menor (média  $\pm$  EPM: 69,94%  $\pm$  0,03) que do grupo “bateria de testes” (média  $\pm$  EPM: 80,54%  $\pm$  0,03). Nas fêmeas, as preferências por sacarose dos dois grupos experimentais foram maiores que dos machos, porém similares entre si (“testes independentes”, média  $\pm$  EPM: 89,20%  $\pm$  0,01; “bateria de testes”, média  $\pm$  EPM: 92,16%  $\pm$  0,01). A análise estatística confirma efeito grande e significativo do fator sexo sobre a preferência por sacarose dos ratos (Tabela 3). Os efeitos do “tipo do protocolo” ou a interação entre fatores sobre a preferência por sacarose dos ratos foram pequenos e não-significantes (Tabela 3). Em virtude da ausência de significância estatística da interação entre os fatores não há análise post hoc.

Tabela 3: Resultados da ANOVA duas vias da PS

<b>Fatores (níveis)</b>	<b>SS</b>	<b>df</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>	<b><math>\eta^2p</math></b>
Sexo (macho ou fêmea)	1907	1;28	1907	9,188	0,005#	0,247
Tipo de protocolo (bateria ou teste independentes)	367	1;28	367	1,768	0,194	0,059
Interação entres os fatores “Tipo de protocolo” e “Sexo”	117	1;28	117	0,564	0,459	0,020

Abreviaturas: SS: Soma dos quadrados; df: graus de liberdade; MS: média dos quadrados;  $\eta^2p$ = eta quadrado parcial. # = efeito significativo do fator sexo.



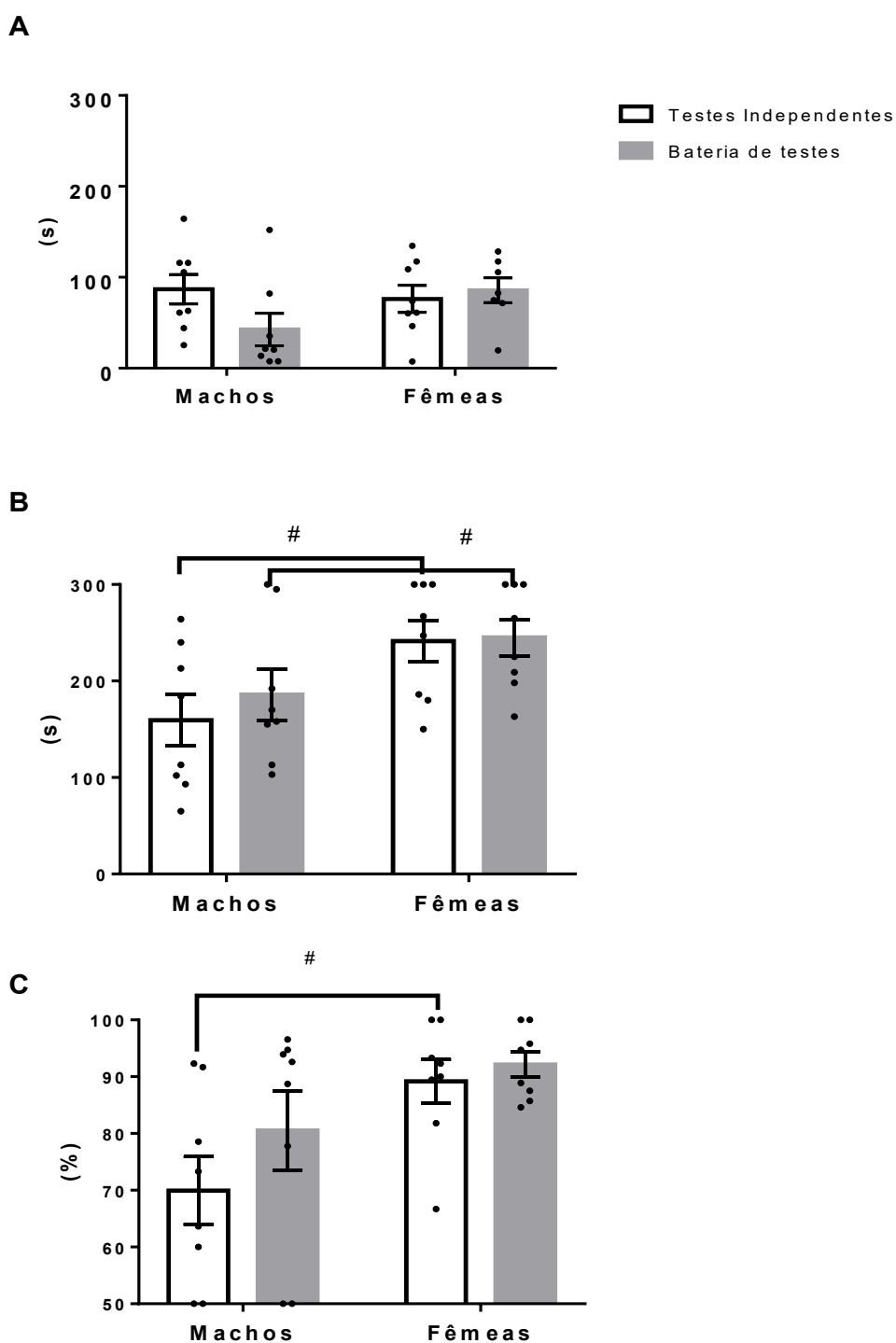
Além dos testes de significância estatística também se avaliou a relevância dos efeitos pela análise da direção (positiva ou negativa) e tamanho (muito pequeno, pequeno, médio, grande ou muito grande, de acordo com SAWILOWSKY, 2009) do efeito de cada intervenção específica. Neste experimento 1, estimou-se para cada grupo de ratos (machos ou fêmeas) o tamanho do efeito dos “tipos de protocolos” sobre as medidas feitas nos testes comportamentais (Tabela 4). A métrica do tamanho de efeito foi o cálculo de Hedges'g +/- IC 95%, no qual as medidas dos “testes independentes” foram subtraídas das medidas das “baterias de testes” (para mais detalhes veja a sessão de Análise estatística). Portanto, os valores de Hedges'g negativos representam valores mais baixos dos desfechos na “bateria de testes” do que nos “testes independentes”. A interpretação é oposta no caso de valores de Hedges'g positivos. Valores de Hedges'g nulos representam ausência de diferença entre os “tipos de protocolo”. O tamanho de efeito do “tipo de protocolo” foi grande e negativo nos machos, e pequeno e positivo nas fêmeas submetidas ao TNF. No ASN, o tamanho de efeito do “tipo de protocolo” nos machos, foi pequeno e positivo, e muito pequeno e positivo nas fêmeas. No PS, o tamanho de efeito do “tipo de protocolo” foi positivo em machos e fêmeas, porém, médio nos machos e pequeno nas fêmeas. Os valores são apresentados na tabela 4.

Tabela 4: Tamanho de efeito por grupo experimental

<b>Sexo</b>	<b>Protocolo</b>	<b>Teste</b>	<b>Hedges' g</b>	<b>Tamanho do efeito</b>	<b>IC 95%</b>
M	BT x TI	TNF	-0,8680	grande	[-1,9074; 0,1714]
F	BT x TI	TNF	0,2295	pequeno	[-0,7548; 1,2137]
M	BT x TI	ASN	0,3339	pequeno	[-0,6551; 1,3229]
F	BT x TI	ASN	0,0617	muito pequeno	[-0,9186; 1,0420]
M	BT x TI	PS	0,5461	médio	[-0,4578; 1,5500]
F	BT x TI	PS	0,3163	pequeno	[-0,6718; 1,3044]

Abreviaturas: ASN = Alimentação suprimida pela novidade; BT = Bateria de testes; F= fêmeas (ratas); IC 95%= intervalo de confiança 95%; M= machos (ratos); PS = Preferência pela sacarose; TI= testes independentes; TNF = Teste do nado forçado.

Figura 7: Tempo de imobilidade no TNF, latência para comer no ASN e porcentagem do consumo de sacarose no PS no experimento 1



Legenda: A –Tempo de imobilidade em segundos (s) no teste de nado forçado (TNF). B- Latência para comer em segundos (s) no teste de alimentação suprimida pela novidade (ASN). C- Porcentagem do consumo de sacarose (%) no teste de preferência pela sacarose (PS). Barras representam média  $\pm$  EPM dos grupos testes independentes (brancas) ou bateria de testes (cinza); n=8/grupo. # = denota o efeito significativo do fator sexo, ANOVA de duas vias,  $p < 0,05$  (para os valores da ANOVA veja as tabelas 1, 2 e 3)

## 5.2. EXPERIMENTO 2 – EFEITO DO ESTRESSE

Neste experimento, analisou-se a influência da privação maternal sobre o comportamento dos ratos adultos. As duas condições aplicadas sobre ratos machos ou fêmeas foram: 1-condições controle, sem privação maternal ou “não privados”; 2-com privação maternal ou “privados”. Para avaliação da influência dos fatores “sexo” (machos ou fêmeas) e “condição experimental” (sem ou com privação maternal), ou a interação entre os fatores sobre o comportamento dos ratos em cada teste comportamental (TNF ou ASN ou PS), escolheu-se a ANOVA de duas vias (fatores: sexo e condição experimental) univariada (teste comportamental específico). De forma geral, a influência do “sexo” e da “condição experimental” sobre o comportamento dos ratos variou em magnitude e significância entre os testes comportamentais.

No TNF (Figura 8A), os ratos machos do grupo “privados” (P) apresentaram tempo de imobilidade maior (média  $\pm$  EPM:  $144,95 \pm 12,24$ ) que a dos demais grupos (média  $\pm$  EPM: machos do grupo “não privados” (NP):  $75,51 \pm 14,05$ ; fêmeas do grupo “não privadas” (NP):  $99,18 \pm 17,20$ ; fêmeas do grupo “privadas” (P):  $59,67 \pm 10,04$ ). A análise estatística revelou que os efeitos do fator sexo (Tabela 5) e da interação entre os fatores “sexo” e “condição experimental” (Tabela 5) foram grandes e estatisticamente significantes. A análise *post hoc* indicou diferenças significantes entre os machos do grupo “privados” (P) e as fêmeas do mesmo grupo (*post-hoc* MS = 1180,9, df = 27, p=0,02), e os machos do grupo “não privados” (NP) (*post-hoc* MS = 1180,9, df = 27, p=0,001). O tempo de imobilidade das fêmeas do grupo “privadas” (P), também diferiu significativamente das fêmeas do grupo “não privadas” (NP) (*post-hoc* MS = 1180,9, df = 27, p=0,01). O fator “condição experimental”, afetou pouco o tempo imobilidade dos ratos no TNF (Tabela 5).

Tabela 5: Resultados da ANOVA duas vias do TNF

Fatores (níveis)	SS	df	MS	F	p	$\eta^2p$
Sexo (macho ou fêmea)	8346	1; 28	8346	7,067	0,013#	0,207
Condição experimental (privados ou não privados)	604	1; 28	604	0,511	0,481	0,019
Interação entres os fatores “condição experimental” e “sexo”	25605	1; 28	25605	21,682	< ,001*	0,445

Abreviaturas: SS: Soma dos quadrados; df: graus de liberdade; MS: média dos quadrados;  $\eta^2p$ = eta quadrado parcial. # = efeito significativo do fator sexo. \* efeito significativo da interação entre os fatores

Para o ASN (Figura 8B), machos do grupo “não privado” (NP) apresentaram latência maior (média  $\pm$  EPM: 300  $\pm$  0,0) do que machos do grupo “privado” (P) (média  $\pm$  EPM: 288  $\pm$  11,34). A latência para alimentação das fêmeas “não privadas” (NP), foi menor (média  $\pm$  EPM: 260  $\pm$  24,49) do que a latência das fêmeas do grupo que passou pela privação maternal (P) (média  $\pm$  EPM: 268,25  $\pm$  31,75). A análise estatística mostrou que o efeito do fator “sexo” foi médio e não afetou a latência para alimentação dos ratos. Os fatores “condição experimental” ou a interação entre fatores apresentam efeitos pequenos e não afetaram a latência para alimentação dos ratos (Tabela 6). Em virtude da ausência de significância estatística da interação entre os fatores não há análise post hoc.

Tabela 6: Resultados da ANOVA duas vias do ASN

Fatores (níveis)	SS	df	MS	F	p	$\eta^2p$
Sexo (macho ou fêmea)	2907,0	1; 28	2907,0	3,1184	0,088	0,100
Condição experimental (privados ou não privados)	34,0	1; 28	34,0	0,0365	0,850	0,001
Interação entres os fatores “condição experimental” e “sexo”	175,8	1; 28	175,8	0,1886	0,667	0,007

Abreviaturas: SS: Soma dos quadrados; df: graus de liberdade; MS: média dos quadrados;  $\eta^2p$ = eta quadrado parcial

Para o PS (Figura 8C), os machos “não privados” (NP) apresentaram preferência semelhante (média  $\pm$  EPM: 91,72  $\pm$  3,30) ao grupo de machos “privados” (P) (média  $\pm$  EPM: 92,60  $\pm$  2,99). Em relação às fêmeas, quando “não privadas” (NP), as ratas apresentaram preferência menor (média  $\pm$  EPM: 95,81  $\pm$  0,65) do que quando submetidas ao protocolo de privação maternal (P) (média  $\pm$  EPM: 97,60  $\pm$  1,04). A análise estatística revela que o efeito dos fatores “sexo”, fator “condição experimental” ou a interação entre eles foi de pequeno a médio e não alterou a preferência por sacarose dos ratos. Os valores das análises estão descritos na tabela 7. Em virtude da ausência de significância estatística da interação entre os fatores não há análise post hoc.

Tabela 7: Resultados da ANOVA duas vias da PS

<b>Fatores (níveis)</b>	<b>SS</b>	<b>df</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>	<b><math>\eta^2p</math></b>
Sexo (macho ou fêmea)	444,1	1; 28	444,1	3,168	0,086	0,102
Condição experimental (privados ou não privados)	22,7	1; 28	22,7	0,162	0,691	0,006
Interação entres os fatores “condição experimental” e “sexo”	560,6	1; 28	560,6	3,999	0,055	0,125

Abreviaturas: SS: Soma dos quadrados; df: graus de liberdade; MS: média dos quadrados;  $\eta^2p$ = eta quadrado parcial

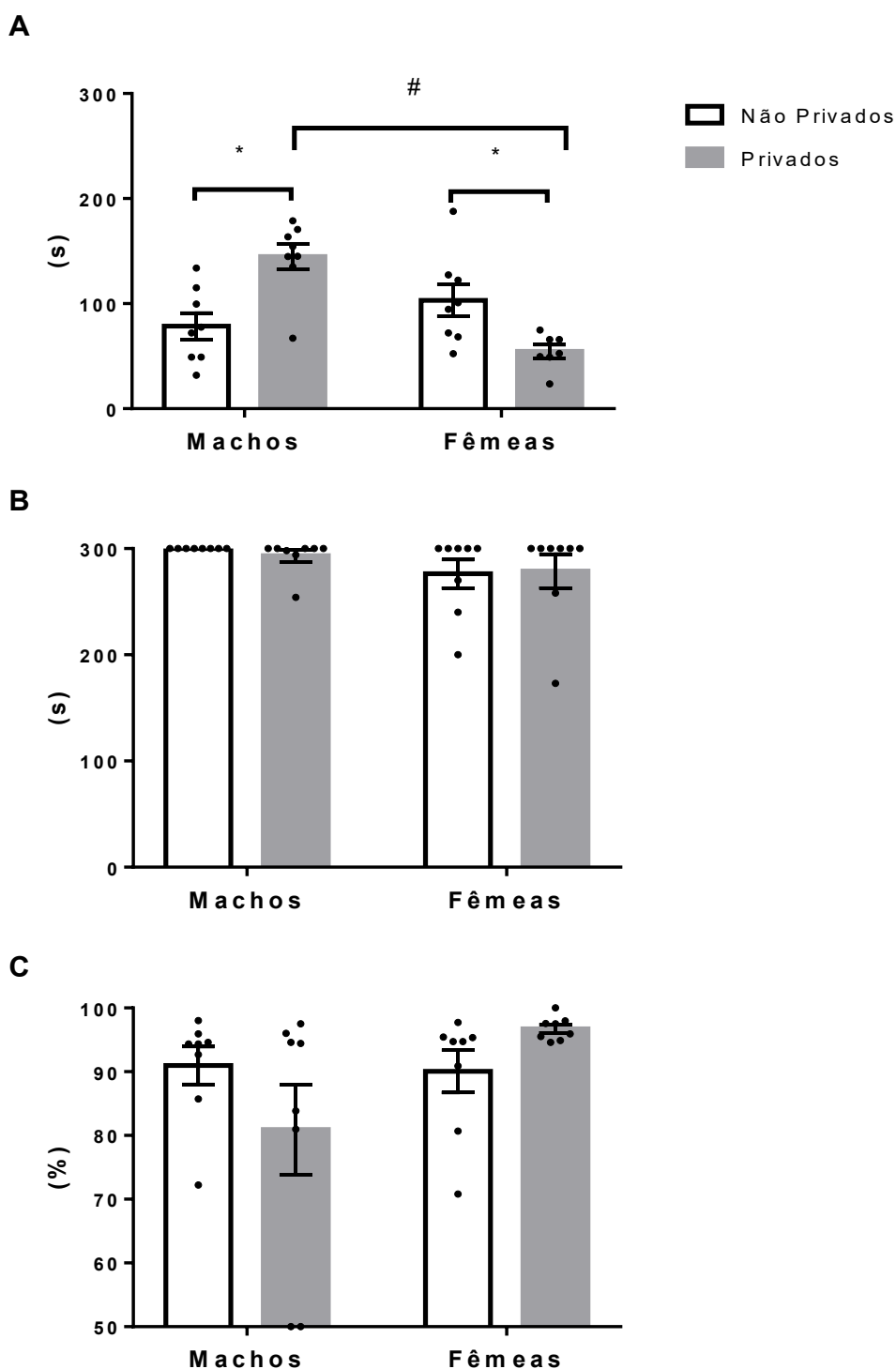
Calculamos o tamanho do efeito da "condição experimental" (i.e privados x não privados) sobre os desfechos dos testes comportamentais, como descrito no item 4.4.1. A métrica do tamanho de efeito foi o cálculo de Hedges'g +/- IC 95%, no qual as medidas dos “privados” foram subtraídas das medidas das “não privados” (para mais detalhes veja a sessão de Análise estatística). Portanto, os valores de Hedges'g negativos, representam valores mais baixos dos desfechos na condição experimental “privados” do que “não privados” e a interpretação é oposta no caso de valores positivos. Valores de Hedges'g nulos representam ausência de diferença entre os tipos de “condição experimental”. O tamanho do efeito da condição experimental foi muito grande e positivo nos machos, e muito grande e negativo para fêmeas submetidas ao TNF. No ASN, o tamanho de efeito da condição experimental foi nulo nos machos e muito pequeno e positivo nas fêmeas. No PS, a condição experimental tem efeito médio e negativo nos machos, e grande e positivo nas fêmeas. Os valores são descritos na tabela 8.

Tabela 8: Tamanho de efeito por grupo experimental

<b>Sexo</b>	<b>Protocolo</b>	<b>Teste</b>	<b>Hedges' g</b>	<b>Tamanho do efeito</b>	<b>IC 95%</b>
M	P x NP	TNF	1,7910	Muito grande	[0,5780; 3,0039]
F	P x NP	TNF	-1,1288	Grande	[-2,2074; -0,0503]
M	P x NP	ASN	0,0	Nulo	[0,0]
F	P x NP	ASN	0,0596	Muito pequeno	[-0,9207; 1,0398]
M	P x NP	PS	-0,620	Médio	[-1,6307; 0,3907]
F	P x NP	PS	0,9286	Grande	[-0,1191; 1,9763]

Abreviaturas: ASN = Alimentação suprimida pela novidade; F= fêmeas (ratas); IC 95%= intervalo de confiança 95%; M= machos (ratos); NP = Não privados; P = Privados; PS = Preferência pela sacarose; TNF = Teste do nado forçado.

Figura 8: Tempo de imobilidade no TNF, latência para comer no ASN e porcentagem do consumo de sacarose no PS no experimento 2



Legenda: A –Tempo de imobilidade em segundos (s) no teste de nado forçado (TNF). B- Latência para comer em segundos (s) no teste de alimentação suprimida pela novidade (ASN). C- Porcentagem do consumo de sacarose (%) no teste de preferência pela sacarose (PS). Barras representam média ± EPM dos grupos não privados (brancas) ou privados (cinza); n=8/grupo. \* = denota o efeito significativo da privação # = denota o efeito significativo do fator sexo, ANOVA de duas vias,  $p < 0,05$  (para os valores da ANOVA veja as tabelas 5, 6 e 7)



### 5.3. EXPERIMENTO 3 – EFEITO DA DOSE DE 2,5 MG/KG DE FLX

Neste experimento, analisou-se a influência da privação maternal sobre o comportamento dos ratos adultos e a resposta ao tratamento com fluoxetina (FLX) 2,5 mg/kg nos comportamentos dos animais. As condições aplicadas sobre ratos machos ou fêmeas foram: 1-condições controle, sem privação maternal não tratados; 2-condições controle, sem privação maternal tratados; 3- com privação maternal não tratados; 4- com privação maternal tratados. Para avaliação da influência dos fatores “sexo” (machos ou fêmeas), “condição experimental” (sem ou com privação maternal) e tratamento (não tratados e tratados), ou a interação entre os fatores sobre o comportamento dos ratos em cada teste comportamental (TNF ou ASN ou PS) escolheu-se a ANOVA de três vias (fatores: sexo, condição experimental e tratamento) univariada (teste comportamental específico). De forma geral, a influência do “sexo”, “condição experimental” e do “tratamento” sobre o comportamento dos ratos variou em magnitude e significância entre os testes comportamentais.

Para o TNF (Figura 9A), o tempo de imobilidade dos machos, da condição experimental “não privados” (NP), tratados com FLX 2,5 mg/kg, foi menor (média  $\pm$  EPM: 109,24  $\pm$  17,84) do que os ratos que receberam veículo (VEI) (média  $\pm$  EPM: 143,17  $\pm$  11,37). Nos machos da condição experimental “privados” (P), os animais que receberam FLX apresentaram maior tempo de imobilidade (média  $\pm$  EPM: 143,55  $\pm$  12,01) do que os animais que receberam VEI (média  $\pm$  EPM de 131,89  $\pm$  13,74). As fêmeas da condição experimental “não privadas” (NP), que foram tratadas com FLX, apresentaram maior tempo de imobilidade (média  $\pm$  EPM: 102,18  $\pm$  18,49) do que as fêmeas que receberam VEI (média  $\pm$  EPM: 97,45  $\pm$  21,47). As fêmeas da condição experimental “privadas” (P), que foram tratadas com FLX, apresentaram redução do tempo de imobilidade (média  $\pm$  EPM: 79,38  $\pm$  14,19) em relação às fêmeas do mesmo grupo que receberam VEI (média  $\pm$  EPM: 150,37  $\pm$  11,18).

A análise estatística revelou que a interação entre os fatores “sexo”, “condição experimental” e “tratamento”, teve efeito médio e foi estatisticamente significativa (Tabela 9). Os machos “privados” (P), tratados com FLX, são estatisticamente diferentes das fêmeas “privadas” (P) tratadas com FLX (*post-hoc*; MS = 1761,5, df = 49,000, p=0,01). Ainda, há diferença no tratamento entre fêmeas “privadas” e “não privadas” (*post-hoc*; MS = 1761,5, df = 49,000, p= 0,007). O fator “sexo” apresenta efeito médio e diferença estatisticamente significativa (Tabela 9), onde machos

“privados” são diferentes de fêmeas “privadas”. Os demais fatores e as interações entre fatores não apresentaram diferenças significantes e os valores são apresentados na tabela 9.

Tabela 9: Resultados da ANOVA três vias do TNF

<b>Fatores (níveis)</b>	<b>SS</b>	<b>df</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>	<b><math>\eta^2p</math></b>
Sexo (macho ou fêmea)	83421	1; 49	8342,1	4,7844	0,034#	0,089
Condição experimental (privados ou não privados)	22999	1; 49	2299,9	1,3190	0,256	0,026
Tratamento (CTRL x FLX)	67590	1; 49	6759,0	3,8765	0,055	0,073
Interação entres os fatores “condição experimental” e “tratamento”	815,4	1; 49	815,4	0,4677	0,497	0,009
Interação entres os fatores “tratamento” e “sexo”	1704,9	1; 49	1704,9	0,9778	0,328	0,020
Interação entres os fatores “condição experimental” e “sexo”	31,9	1; 49	31,9	0,0183	0,893	0,000
Interação entre os fatores “Tratamento”, “Condição experimental” e “Sexo”	12618,9	1; 49	12618,9	7,2373	0,010*	0,129

Abreviaturas: SS: Soma dos quadrados; df: graus de liberdade; MS: média dos quadrados;  $\eta^2p$ = eta quadrado parcial. CTRL = Veículo; FLX = Fluoxetina; # = efeito significativo do fator sexo. \* efeito significativo da interação entre os fatores

No ASN (Figura 9B), os machos “não privados” (NP), tratados com VEI, apresentaram menor latência (média  $\pm$  EPM: 281,25  $\pm$  14,51) do que os machos “privados” (P) tratados com VEI (média  $\pm$  EPM: 292,25  $\pm$  7,06). Os machos “não privados” (NP) tratados com FLX, apresentaram menor latência (média  $\pm$  EPM: 273,42  $\pm$  19,05) do que os machos “privados” (P) tratados com FLX (média  $\pm$  EPM: 279,75  $\pm$  13,41). As fêmeas do grupo que não foi submetido a privação maternal (NP), tratadas com FLX, apresentaram menor latência (média  $\pm$  EPM: 269  $\pm$  18,34) em relação às fêmeas “não privadas” (NP) tratadas com VEI (média  $\pm$  EPM: 287,50  $\pm$  6,12). As fêmeas do grupo “privadas” (P) tratadas com FLX, apresentaram maior tempo de latência (média  $\pm$  EPM: 293,12  $\pm$  9,72) em relação às fêmeas “privadas” (P) tratadas com VEI (média  $\pm$  EPM: 277,5  $\pm$  16,14). A análise estatística mostra que não houve diferenças significativas entres os fatores. Os valores são apresentados na tabela 10.

Tabela 10: Resultados da ANOVA três vias do ASN

<b>Fatores (níveis)</b>	<b>SS</b>	<b>df</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>	<b><math>\eta^2p</math></b>
Sexo (macho ou fêmea)	45,3	1; 49	45,3	0,03226	0,858	0,001
Condição experimental (privados ou não privados)	1239,8	1; 49	1239,8	0,88387	0,352	0,018
Tratamento (CTRL x FLX)	224,9	1; 49	224,9	0,16033	0,691	0,003
Interação entres os fatores “condição experimental” e “tratamento”	1113,7	1; 49	1113,7	0,79402	0,377	0,016
Interação entres os fatores “tratamento” e “sexo”	499,4	1; 49	499,4	0,35603	0,553	0,007
Interação entres os fatores “condição experimental” e “sexo”	11,4	1; 49	11,4	0,00814	0,928	0,000
Interação entre os fatores “Tratamento”, “Condição experimental” e “Sexo”	1761,5	1; 49	1761,5	1,25583	0,268	0,025

Abreviaturas: SS: Soma dos quadrados; df: graus de liberdade; MS: média dos quadrados;  $\eta^2p$ = eta quadrado parcial; CTRL = Veículo; FLX = Fluoxetina.

No PS (Figura 9C), os ratos tratados com FLX apresentam maior preferência, tanto em machos “privados” (P) (média  $\pm$  EPM: 81,82%  $\pm$  4,29), quanto “não privados” (NP) (média  $\pm$  EPM: 81,04%  $\pm$  4,69), em relação aos animais que receberam VEI, respectivamente. (P: média  $\pm$  EPM: 75,96%  $\pm$  7,66; NP: média  $\pm$  EPM: 70,96%  $\pm$  7,82). As fêmeas que foram tratadas com FLX do grupo “não privadas” (NP) apresentaram maior preferência (média  $\pm$  EPM: 89,31%  $\pm$  3,24), do que as fêmeas “não privadas” que receberam VEI (média  $\pm$  EPM: 83,12%  $\pm$  5,8324). Em relação às fêmeas que passaram por “privação” (P) e foram tratadas com FLX, a preferência foi menor (média  $\pm$  EPM: 94,80%  $\pm$  1,22:) do que as fêmeas “privadas”, tratadas com FLX (média  $\pm$  EPM: 96,29%  $\pm$  1,22).

A análise estatística mostrou que o fator “sexo” apresentou efeito grande e foi estatisticamente significativo. Machos do grupo “não privados” (NP), que receberam VEI, têm menor preferência a sacarose que fêmeas NP, que receberam VEI e são estatisticamente diferentes (*post-hoc*, MS = 216,70, df = 49, p=0,04). Machos “privados” (P), que receberam VEI, apresentam menor porcentagem de preferência em relação às fêmeas “privadas” (P), sendo estatisticamente diferentes (*post-hoc*, MS = 216,70, df = 49, p=0,007). Os demais fatores não apresentaram diferenças estatísticas e são apresentados na tabela 11.

Tabela 11: Resultados da ANOVA três vias do PS

<b>Fatores (níveis)</b>	<b>SS</b>	<b>df</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>	<b><math>\eta^2p</math></b>
Sexo (macho ou fêmea)	2468,457	1; 49	2468,457	11,391	0,001#	0,189
Condição experimental (privados ou não privados)	517,889	1; 49	517,889	2,38989	0,129	0,047
Tratamento (CTRL x FLX)	61,969	1; 49	61,969	0,28597	0,595	0,006
Interação entres os fatores “condição experimental” e “tratamento”	0,538	1; 49	0,538	0,00248	0,960	0,000
Interação entres os fatores “tratamento” e “sexo”	458,431	1; 49	458,431	2,11551	0,152	0,041
Interação entres os fatores “condição experimental” e “sexo”	147,054	1; 49	147,054	0,67861	0,414	0,014
Interação entre os fatores “Tratamento”, “Condição experimental” e “Sexo”	72,165	1; 49	72,165	0,33302	0,567	0,007

Abreviaturas: SS: Soma dos quadrados; df: graus de liberdade; MS: média dos quadrados;  $\eta^2p$ = eta quadrado parcial Abreviaturas: SS: Soma dos quadrados; df: graus de liberdade; MS: média dos quadrados;  $\eta^2p$ = eta quadrado parcial; CTRL = Veículo; FLX = Fluoxetina; # = efeito significativo do fator sexo

No experimento 3, calculamos o tamanho do efeito do tratamento com FLX, sobre os desfechos dos testes comportamentais, como descrito no item 4.4.1. Os dados são apresentados como tamanho de efeito (Hedges'g) e intervalo de confiança 95%. Os valores de Hedges'g negativos representam valores mais baixos dos desfechos no grupo experimental "tratado" do que nos "não tratados", e a interpretação é oposta no caso de valores positivos. Valores de Hedges'g nulos representam ausência de diferença entre o tratamento. Os valores estão descritos na tabela 12.

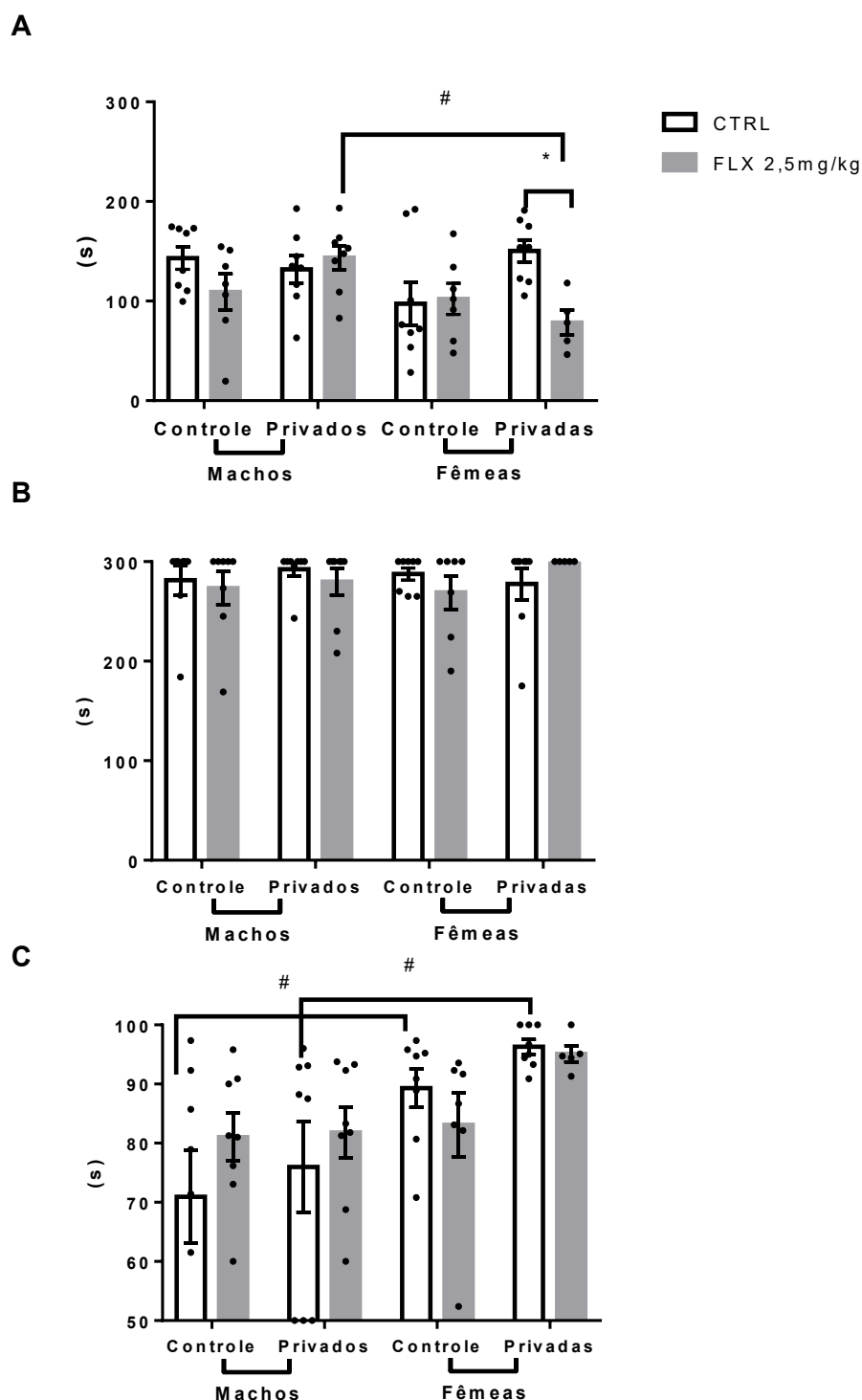
No TNF, no grupo de ratos machos "não privados" (NP), o tamanho de efeito da fluoxetina foi médio e negativo. Nos ratos machos que foram "privados" (P) o tamanho de efeito da fluoxetina foi pequeno e positivo. Nas fêmeas "não privadas" (NP) o tamanho de efeito da fluoxetina foi muito pequeno e positivo. Nas fêmeas "privadas" (P), o tamanho de efeito da fluoxetina, foi enorme e negativo. No ASN, nos machos do grupo de animais "não privados" (NP), o tamanho de efeito da fluoxetina foi muito pequeno e negativo. Nos machos que foram "privados" (P), o tamanho de efeito da fluoxetina foi pequeno e negativo. Nas fêmeas "não privadas" (NP), o tamanho de efeito da fluoxetina foi médio e negativo. Nas fêmeas do grupo que passou pela "privação" (P), o tamanho de efeito da fluoxetina foi pequeno e positivo. No PS, nos machos "não privados" (NP), o tamanho de efeito da fluoxetina foi médio e positivo. Nos machos do grupo "privação" (P), o tamanho de efeito da fluoxetina foi pequeno e positivo. Nas fêmeas do grupo "não privadas" (NP) o tamanho de efeito da fluoxetina foi muito pequeno e negativo. Nas fêmeas do grupo "privadas" (P) o tamanho de efeito da fluoxetina foi muito pequeno e negativo.

Tabela 12: Tamanho de efeito por grupo experimental

<b>Sexo</b>	<b>Condição experimental</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Teste</b>	<b>Hedges g</b>	<b>Tamanho de efeito</b>	<b>Intervalo de confiança</b>
M	Privado	FLX x VEI	TNF	0,3019	Pequeno	[0,6854; 1,2893]
M	Não privado	FLX x VEI	TNF	-0,7942	Médio	[1,8242; 0,2358]
F	Privado	FLX x VEI	TNF	-2,2318	Enorme	[3,6080; 0,8556]
F	Não privado	FLX x VEI	TNF	0,0822	Muito pequeno	[0,9328; 1,0971]
M	Privado	FLX x VEI	ASN	-0,3897	Pequeno	[1,3819; 0,6026]
M	Não privado	FLX x VEI	ASN	-0,1609	Muito pequeno	[1,1429; 0,8212]
F	Privado	FLX x VEI	ASN	0,4209	Pequeno	[-0,5734; 1,4152]
F	Não privado	FLX x VEI	ASN	-0,5266	Médio	[-1,5645; 0,5112]
M	Privado	FLX x VEI	PS	0,3162	Pequeno	[-0,6718; 1,3043]
M	Não privado	FLX x VEI	PS	0,5318	Médio	[-0,4709; 1,5345]
F	Privado	FLX x VEI	PS	-0,0460	Muito pequeno	[0,9847; 0,9753]
F	Não privado	FLX x VEI	PS	-0,0856	Muito pequeno	[1,0193; 1,0094]

Abreviaturas: ASN = Alimentação suprimida pela novidade; F= fêmeas (ratas); FLX = Fluoxetina; IC 95%= intervalo de confiança 95%; M= machos (ratos); NP = Não privados; P = Privados; PS = Preferência pela sacarose; TNF = Teste do nado forçado.; VEI = Veículo.

Figura 9: Tempo de imobilidade no TNF, latência para comer no ASN e porcentagem do consumo de sacarose no PS no experimento 3





#### 5.4. EXPERIMENTO 4 – EFEITO DA DOSE DE 10 MG/KG DE FLX

Neste experimento, analisou-se a influência da privação maternal sobre o comportamento dos ratos adultos, e a resposta ao tratamento com FLX 10 mg/kg, nos comportamentos dos animais. As condições aplicadas sobre ratos machos ou fêmeas foram: 1-condições controle, sem privação maternal não tratados; 2- condições controle, sem privação maternal tratados; 3- com privação maternal não tratados; 4- com privação maternal tratados. Para avaliação da influência dos fatores “sexo” (machos ou fêmeas), “condição experimental” (sem ou com privação maternal), tratamento (não tratados e tratados), ou interação entre os fatores sobre o comportamento dos ratos em cada teste comportamental (TNF ou ASN ou PS) escolheu-se a ANOVA de três vias (fatores: sexo, condição experimental e tratamento) univariada (teste comportamental específico). De forma geral, a influência do “sexo”, “condição experimental” e do “tratamento” sobre o comportamento dos ratos, variou em magnitude e significância, entre os testes comportamentais.

Para o TNF (Figura 10A), o tempo de imobilidade dos machos “não privados” (NP), tratados com FLX 10 mg/kg (média  $\pm$  EPM: 66,11  $\pm$  14,83) foi menor do que o grupo de animais (NP) que receberam VEI (média  $\pm$  EPM: 107,34  $\pm$  20,46). Nos machos “privados” (P), os animais que receberam FLX apresentaram menor tempo de imobilidade (média  $\pm$  EPM: 47,17  $\pm$  12,3), do que os animais que receberam VEI (média  $\pm$  EPM de 73,55  $\pm$  15,47). As fêmeas do grupo “não privadas” (NP), que foram tratadas com FLX 10 mg/kg, apresentaram maior tempo de imobilidade (média  $\pm$  EPM: 89,99  $\pm$  25,86), do que as fêmeas que receberam VEI (média  $\pm$  EPM: 65,30  $\pm$  29,41). As fêmeas do grupo “privadas” (P), que foram tratadas com FLX, apresentaram redução do tempo de imobilidade (média  $\pm$  EPM: 49,50  $\pm$  23,50) em relação às fêmeas do mesmo grupo que receberam VEI (média  $\pm$  EPM: 96,44  $\pm$  20,29).

A Anova de três vias não detectou diferenças entre os grupos e nem interação os fatores (Tabela 13).

Tabela 13: Resultados da ANOVA três vias do TNF

Fatores (níveis)	SS	df	MS	F	p	$\eta^2p$
Sexo (macho ou fêmea)	837	1; 56	837	0,293	0,590	0,005
Condição experimental (privados ou não privados)	3332	1; 56	3332	1,167	0,285	0,020
Tratamento (CTRL x FLX)	4621	1; 56	4621	1,619	0,209	0,028
Interação entres os fatores “condição experimental” e “sexo”	2277	1; 56	2277	0,798	0,376	0,014
Interação entres os fatores “tratamento” e “sexo”	4520	1; 56	4520	1,584	0,213	0,028
Interação entres os fatores “tratamento” e “condição experimental”	2752	1; 56	2752	0,964	0,330	0,017
Interação entre os fatores “Tratamento”, “Condição experimental” e “Sexo”	6749	1; 56	6749	2,364	0,130	0,041

Abreviaturas: SS: Soma dos quadrados; df: graus de liberdade; MS: média dos quadrados;  $\eta^2p$ = eta quadrado parcial; CTRL = Veículo; FLX = Fluoxetina

Embora não tenha sido detectado o efeito do tratamento na análise de três vias, observa-se redução do tempo de imobilidade nos machos tratados, com tamanho de efeito médio. Por este motivo, realizamos uma análise separando os animais por sexo. Ao analisarmos os resultados dos machos separadamente das fêmeas, o tamanho do efeito do fator “tratamento”, com FLX 10 mg/kg foi grande e estatisticamente significativo, reduzindo o tempo de imobilidade dos machos. A análise *post-hoc* revela que os ratos da condição experimental “não privados” (NP), tratados com FLX, reduziram significativamente o tempo de imobilidade, em comparação aos animais que receberam VEI (*post-hoc*, MS = 2059,7, df = 28, p=0,02). Nos machos privados (P), embora exista redução no tempo de imobilidade nos animais tratados com FLX, não há diferença estatisticamente significativa. Em relação às fêmeas não houve diferença. Os valores são apresentados na tabela 14.

Tabela 14: Resultados da ANOVA duas vias do TNF

Sexo	Fatores (níveis)	SS	df	MS	F	p	$\eta^2p$
Machos	Condição experimental (privados ou não privados)	5559,0	1; 28	5559,0	2,698	0,1116	0,087
	Tratamento (CTRL x FLX)	9140,6	1; 28	9140,6	4,437	0,0442*	0,136
	Interação entres os fatores “tratamento” e “condição experimental”	440,8	1; 28	440,8	0,214	0,647	0,007
Fêmeas	Condição experimental (privados ou não privados)	50,1	1; 28	50,1	0,013	0,907	0,0004
	Tratamento (CTRL x FLX)	0,3	1	0,3	0,000	0,993	0,000
	Interação entres os fatores “tratamento” e “condição experimental”	9059,7	1	9059,7	2,482	0,126	0,081

Abreviaturas: SS: Soma dos quadrados; df: graus de liberdade; MS: média dos quadrados;  $\eta^2p$ = eta quadrado parcial; CTRL = Veículo; FLX = Fluoxetina; \* efeito significativo do tratamento

No ASN (Figura 10B), os machos da condição experimental “não privados” (NP), que foram tratados com FLX, apresentam latência maior (média  $\pm$  EPM: 512,12  $\pm$  45,22) do que os machos que receberam VEI (média  $\pm$  EPM: 335,12  $\pm$  39,97). Os machos da condição experimental “privados” (P), que foram tratados com FLX, apresentam latência maior (média  $\pm$  EPM: 515  $\pm$  44,52) do que os machos que receberam VEI (média  $\pm$  EPM: 331,5  $\pm$  47,04). As fêmeas da condição experimental “não privadas” (NP), que foram tratadas com FLX, apresentam redução de latência (média  $\pm$  EPM: 323,16  $\pm$  63,38) em relação às fêmeas que receberam VEI (média  $\pm$  EPM: 391,87  $\pm$  65,74). As fêmeas da condição experimental “privadas” (P), que receberam FLX, apresentam aumento da latência (média  $\pm$  EPM: 376,24  $\pm$  74,59) em relação às fêmeas que receberam VEI (média  $\pm$  EPM: 268,75  $\pm$  22,09).

A análise estatística revelou que o efeito entre a interação entre os fatores “tratamento” e “sexo”, o efeito foi médio e foi observada diferença estatisticamente significativa (Tabela 14). Os dados dos machos tratados com FLX são estatisticamente diferentes das fêmeas e estes apresentam aumento da latência para comer, tanto no

grupo de animais da condição experimental “não privados” (NP) (*post-hoc*, MS = 19921, df = 56, p= 0,02), quanto no grupo de animais da condição experimental “privados” (P) (*post-hoc*, MS = 19921, df = 56, p=0,03). Os fatores “sexo”, e “tratamento” apresentam efeito médio e diferenças estatisticamente significantes (Tabela 14). Em relação ao sexo, as fêmeas apresentam menor latência para comer. Já o tratamento com FLX aumenta a latência para comer de machos “não privados” (NP) e “privados” (P), em relação aos animais que receberam VEI. Os demais fatores não apresentam diferenças estatísticas e os valores são apresentados na tabela 15.

Tabela 15: Resultados da ANOVA três vias do ASN

Fatores (níveis)	SS	df	MS	F	p	$\eta^2p$
Sexo (macho ou fêmea)	101363	1; 56	101363	5,088	0,028#	0,083
Condição experimental (privados ou não privados)	8213	1; 56	8213	0,412	0,523	0,007
Tratamento (CTRL x FLX)	137178	1; 56	137178	6,886	0,011*	0,110
Interação entres os fatores “condição experimental” e “sexo”	7943	1; 56	7943	0,399	0,530	0,007
Interação entres os fatores “tratamento” e “sexo”	122938	1; 56	122938	6,171	0,016*	0,099
Interação entres os fatores “tratamento” e “condição experimental”	14072	1; 56	14072	0,706	0,404	0,012
Interação entre os fatores “Tratamento”, “Condição experimental” e “Sexo”	11157	1; 56	101363	0,560	0,457	0,010

Abreviaturas: SS: Soma dos quadrados; df: graus de liberdade; MS: média dos quadrados;  $\eta^2p$ = eta quadrado parcial; CTRL = Veículo; FLX = Fluoxetina; # = efeito significativo do fator sexo. \* efeito significativo da interação entre os fatores

No PS (Figura 10C), os machos da condição experimental “não privados” (NP), que foram tratados com FLX, apresentam menor preferência (média  $\pm$  EPM: 79,06%  $\pm$  8,91) em relação aos machos que receberam VEI (média  $\pm$  EPM: 84,01%  $\pm$  4,37). Os machos da condição experimental “privados” (P), que foram tratados com FLX, apresentam maior preferência (média  $\pm$  EPM: 85,64%  $\pm$  5,51) em relação aos machos que receberam VEI (média  $\pm$  EPM: 72,02%  $\pm$  4,61). As fêmeas da condição experimental “não privadas” (NP), que foram tratadas com FLX, apresentam menor preferência (média  $\pm$  EPM: 90,14%  $\pm$  4,37) em relação às fêmeas que receberam VEI (média  $\pm$  EPM: 92,31%  $\pm$  2,24). As fêmeas da condição experimental “privadas” (P), que foram tratadas com FLX, apresentam menor preferência (média  $\pm$  EPM: 87,29%  $\pm$  3,06) em relação às fêmeas que receberam VEI (média  $\pm$  EPM: 97,78%  $\pm$  0,96).

O fator “sexo” apresenta efeito grande e diferença estatisticamente significativa (Tabela 16). Os demais fatores ou a interação entre eles não apresentaram diferenças estatísticas e os valores estão apresentados na tabela 16.

Tabela 16: Resultados da ANOVA três vias do PS

<b>Fatores (níveis)</b>	<b>SS</b>	<b>df</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>	<b><math>\eta^2p</math></b>
Sexo (macho ou fêmea)	1899,61	1; 56	1899,61	11,04375	0,002#	0,165
Condição experimental (privados ou não privados)	92,82	1; 56	92,82	0,53961	0,466	0,010
Tratamento (CTRL x FLX)	4,56	1; 56	4,56	0,02652	0,871	0,000
Interação entres os fatores “condição experimental” e “sexo”	1,40	1; 56	1,40	0,00814	0,928	0,000
Interação entres os fatores “tratamento” e “sexo”	231,20	1; 56	231,20	1,34414	0,251	0,023
Interação entres os fatores “tratamento” e “condição experimental”	162,36	1; 56	162,36	0,94388	0,335	0,017
Interação entre os fatores “Tratamento”, “Condição experimental” e “Sexo”	595,79	1; 56	595,79	3,46373	0,068	0,058

Abreviaturas: SS: Soma dos quadrados; df: graus de liberdade; MS: média dos quadrados;  $\eta^2p$ = eta quadrado parcial. CTRL = Veículo; FLX = Fluoxetina; # = efeito significativo do fator sexo.

No TNF2 (Figura 10D) os machos da condição experimental “não privados” (NP), que receberam FLX, apresentaram menor tempo de imobilidade (média  $\pm$  EPM: 113,16  $\pm$  21,89) do que machos NP que receberam VEI (média  $\pm$  EPM: 120,70  $\pm$  25,69). Os machos da condição experimental “privados” (P), que receberam FLX, apresentaram menor tempo de imobilidade (média  $\pm$  EPM: 90,52  $\pm$  24,87) do que o grupo de animais que receberam VEI (média  $\pm$  EPM: 105,69  $\pm$  20,88). As fêmeas da condição experimental “não privadas” (NP), que receberam FLX, apresentaram maior tempo de imobilidade (média  $\pm$  EPM: 139,80  $\pm$  21,78) em relação às fêmeas que receberam VEI (média  $\pm$  EPM: 117,05  $\pm$  34,69). As fêmeas da condição experimental “privadas” (P), que receberam FLX, apresentaram menor tempo de imobilidade (média  $\pm$  EPM: 114,60  $\pm$  21,83) em relação às fêmeas que receberam VEI (média  $\pm$  EPM de 176,9  $\pm$  21,70). A análise estatística não apresenta nenhuma diferença entre grupos e nem a interação entre os fatores e os valores são apresentados na tabela 17.

Tabela 17: Resultados da ANOVA três vias do TNF2

<b>Fatores (níveis)</b>	<b>SS</b>	<b>df</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>	<b><math>\eta^2p</math></b>
Sexo (macho ou fêmea)	12984,08	1; 56	12984,08	2,88388	0,095	0,053
Condição experimental (privados ou não privados)	8,38	1; 56	8,38	0,00186	0,966	0,000
Tratamento (CTRL x FLX)	3596,73	1; 56	3596,73	0,79886	0,376	0,015
Interação entres os fatores “condição experimental” e “sexo”	4852,31	1; 56	4852,31	1,07774	0,304	0,020
Interação entres os fatores “tratamento” e “sexo”	263,26	1; 56	263,26	0,05847	0,810	0,001
Interação entres os fatores “tratamento” e “condição experimental”	7972,34	1; 56	7972,34	1,77073	0,189	0,033
Interação entre os fatores “Tratamento”, “Condição experimental” e “Sexo”	5565,75	1; 56	5565,75	1,23620	0,271	0,023

Abreviaturas: SS: Soma dos quadrados; df: graus de liberdade; MS: média dos quadrados;  $\eta^2p$ = eta quadrado parcial; CTRL = Veículo; FLX = Fluoxetina

A análise estatística com medidas repetidas realizada para a inferência do tratamento crônico, apresentou diferença entre a primeira (TNF) e segunda (TNF2) apresentação dos animais ao TNF. Em síntese, os ratos apresentam aumento do tempo de imobilidade no TNF2 em relação ao TNF. Não foram observadas diferenças nas outras condições experimentais e nem a interação entre os fatores. Os valores são apresentados na tabela 18

Tabela 18: Resultados da ANOVA com medidas repetidas entre TNF e TNF2

Fatores (níveis)	SS	df	MS	F	p	$\eta^2p$
Repetição (TNF e TNF2)	55071	1; 52	55071	39,414	< ,001*	0,431
MR "Sexo"	1558	1; 52	1558	1,115	0,296	0,021
MR "Condição experimental"	511	1; 52	511	0,366	0,548	0,007
MR "Tratamento"	640	1; 52	640	0,458	0,502	0,009
MR "Sexo" e "Condição experimental"	147	1; 52	147	0,105	0,747	0,002
MR "Sexo" e "Tratamento"	2109	1; 52	2109	1,509	0,225	0,028
MR "Condição experimental" e "Tratamento"	518	1; 52	518	0,371	0,545	0,007
MR "Sexo", "Condição experimental" e "Tratamento"	320	1; 52	320	0,229	0,634	0,004

Abreviaturas: SS: Soma dos quadrados; df: graus de liberdade; MS: média dos quadrados;  $\eta^2p$ = eta quadrado parcial; MR = Medidas repetidas \* = efeito significativo entre a primeira e segunda apresentação ao TNF

No experimento 4, calculamos o tamanho do efeito do tratamento com FLX (Tabela 19), na dose de 10 mg/kg, sobre os desfechos dos testes comportamentais, como descrito no item 4.6.1. Os dados serão apresentados como tamanho de efeito (Hedges's) e intervalo de confiança 95%. Os valores de Hedges'g negativos representam valores mais baixos dos desfechos na condição experimental "tratamento" do que nos "não tratados" e a interpretação é oposta no caso de valores positivos. Valores de Hedges'g nulos representam ausência de diferença entre o "tratamento". Os valores são descritos na tabela 19.

No TNF, nos machos do grupo "não privados" (NP), o efeito do tratamento com FLX foi médio e negativo. Nos machos do grupo "privados" (P) o efeito do tratamento com FLX foi médio e negativo. Nas fêmeas do grupo "não privadas" (NP) o efeito do tratamento com FLX foi pequeno e positivo. Nas fêmeas que foram "privadas" (P) o efeito do tratamento com FLX foi grande e negativo.

No ASN, nos machos que não foram privados (NP), o efeito do tratamento com FLX foi muito grande e positivo. Nos machos que foram privados (P) o efeito do tratamento com FLX foi muito grande e positivo. Nas fêmeas que não foram privadas



(NP) o efeito do tratamento com FLX foi pequeno e negativo. Nas fêmeas que foram privadas (P) o efeito do tratamento com FLX foi grande e positivo.

No PS, nos machos que não foram privados (NP), o efeito do tratamento com FLX foi pequeno e negativo. Nos machos que foram “privados” (P), o efeito do tratamento com FLX foi grande e positivo. Nas fêmeas que foram “privadas” (P), o efeito do tratamento com FLX foi médio e negativo. Nas fêmeas que não foram privadas (NP), o efeito do tratamento com FLX foi muito pequeno e negativo.

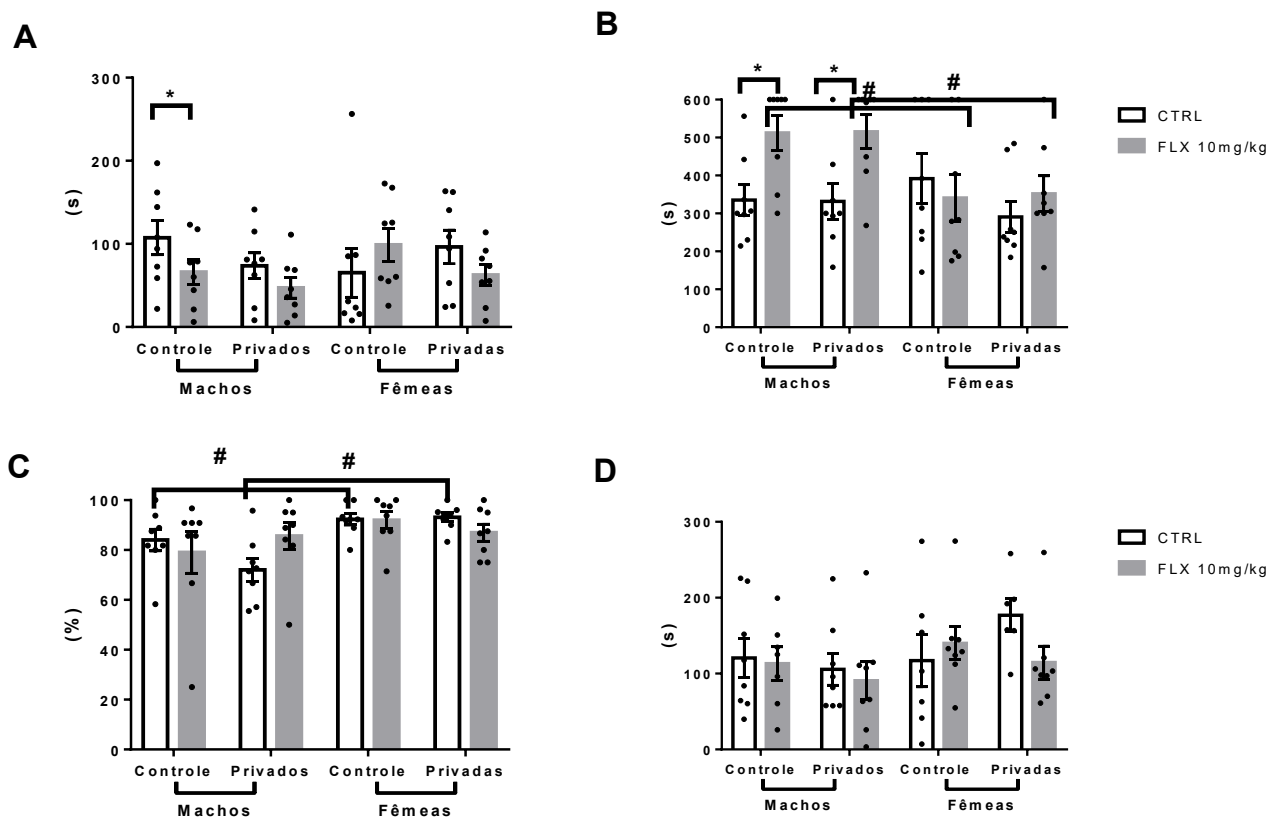
No TNF2, nos machos que não foram privados (NP), o efeito do tratamento com FLX foi muito pequeno e negativo. Nos machos que foram privados (P) o efeito do tratamento com FLX foi pequeno e negativo. Nas fêmeas que não foram privadas (NP) o efeito do tratamento com FLX foi pequeno e positivo. Nas fêmeas que foram privadas (P) o efeito do tratamento com FLX foi médio e negativo.

Tabela 19: Tamanho de efeito por grupo experimental

Sexo	Condição experimental	Tratamento	Teste	Hedges g	Tamanho de efeito	Intervalo de confiança
M	Privado	FLX x VEI	TNF	-0,6308	Médio	[-1,6426; 0,3810]
M	Não privado	FLX x VEI	TNF	-0,7709	Médio	[-1,7980; 0,2562]
F	Privado	FLX x VEI	TNF	-0,8458	Grande	[-1,8823; 0,1907]
F	Não privado	FLX x VEI	TNF	0,3158	Pequeno	[-0,6722; 1,3039]
M	Privado	FLX x VEI	ASN	1,3393	Muito grande	[0,2230; 2,4556]
M	Não privado	FLX x VEI	ASN	1,3863	Grande	[0,2610; 2,5117]
F	Privado	FLX x VEI	ASN	0,8886	Grande	[-0,1535; 1,9308]
F	Não privado	FLX x VEI	ASN	-0,3768	Pequeno	[-1,3682; 0,6147]
M	Privado	FLX x VEI	PS	0,8942	Grande	[-0,1488; 1,9371]
M	Não privado	FLX x VEI	PS	-0,2484	Pequeno	[-1,2334; 0,7366]
F	Privado	FLX x VEI	PS	-0,7647	Médio	[-1,7911; 0,2617]
F	Não privado	FLX x VEI	PS	-0,0475	Muito pequeno	[-1,0277; 0,9326]]
M	Privado	FLX x VEI	TNF2	-0,2242	Pequeno	[-1,2082; 0,7599]
M	Não privado	FLX x VEI	TNF2	-0,0925	Muito pequeno	[-1,0732; 0,8882]
F	Privado	FLX x VEI	TNF2	-0,5898	Médio	[-1,5977; 0,4180]
F	Não privado	FLX x VEI	TNF2	0,2515	Pequeno	[-0,7336; 1,2366]

Abreviaturas: ASN = Alimentação suprimida pela novidade; F= fêmeas (ratas); FLX = Fluoxetina; IC 95%= intervalo de confiança 95%; M= machos (ratos); NP = Não privados; P = Privados; PS = Preferência pela sacarose; TNF = Teste do nado forçado; TNF2 = Teste do nado forçado 2; VEI = Veículo.

Figura 10: Tempo de imobilidade no TNF, latência para comer no ASN e porcentagem do consumo de sacarose no PS no experimento 4



Legenda: A –Tempo de imobilidade em segundos (s) no teste de nado forçado (TNF). B- Latência para comer em segundos (s) no teste de alimentação suprimida pela novidade (ASN). C- Porcentagem do consumo de sacarose (%) no teste de preferência pela sacarose (PS). Barras representam média  $\pm$  EPM dos grupos controle (brancas) ou tratados com FLX (cinza); n=8/grupo. \* denota o efeito do tratamento # = denota o efeito significativo do fator sexo, ANOVA de duas vias,  $p < 0,05$  (para os valores da ANOVA veja as tabelas 13, 14, 15 e 16)

## 5.5. EXPERIMENTO 5 - EFEITO DO ESTRESSE NOS GENITORES

Para avaliar a existência de diferenças sexuais entre os comportamentos emitidos pelos ratos e ratas dos grupos de progenitores, foi feita a “bateria de testes” comportamentais (i.e. TNF, ASN e PS), sete dias após o desmame da prole. Este experimento foi realizado ao decorrer da obtenção das 4 proles geradas para a realização dos experimentos 2-4. Ao total foram 26 fêmeas e 18 machos. O primeiro acasalamento contou com 8 fêmeas e 6 machos. O segundo, terceiro e quarto acasalamento contaram com 6 fêmeas e 4 machos cada. As análises foram realizadas com todos os animais, ou seja,  $n=26$  para fêmeas e  $n=18$  para machos, para a avaliação da diferença sexual, e apenas as fêmeas para a avaliação do efeito do estresse ( $n= 13$  privadas e  $n=13$  não privadas).

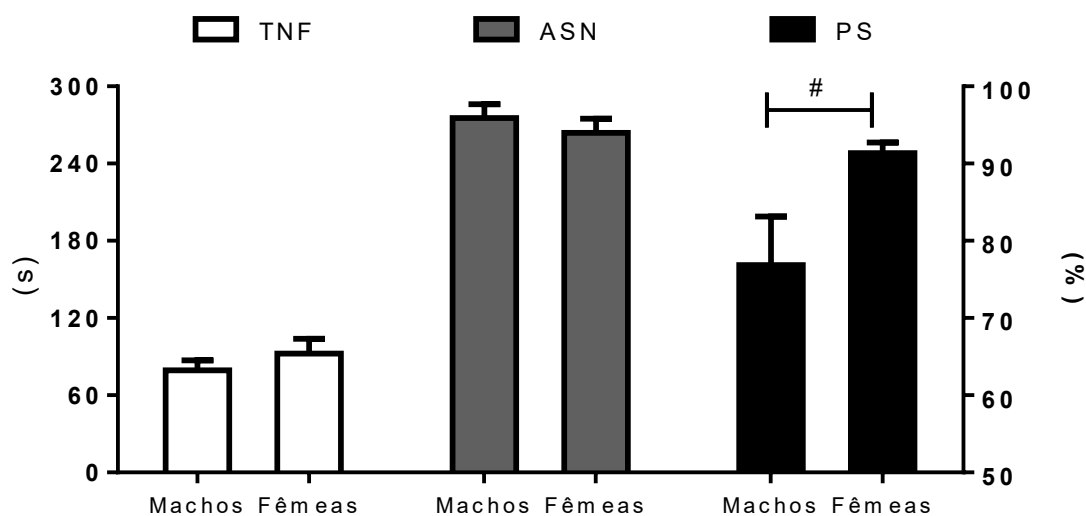
Neste experimento, analisou-se a influência do tipo de protocolo de testes comportamentais sobre o comportamento dos ratos utilizados como progenitores. O protocolo comportamental utilizado no experimento 1 foi aplicado sobre ratos machos ou fêmeas. Para avaliação da influência do fator “sexo” (machos ou fêmeas) escolheu-se o teste *t* de *student*

No TNF (Figura 11), os machos apresentaram menor tempo de imobilidade (média  $\pm$  EPM:  $79,26 \pm 7,98$ ) do que as fêmeas (média  $\pm$  EPM:  $92,45 \pm 11,35$ ). A análise estatística não mostrou diferenças ( $t = 0,9389$ ,  $df = 39$ ,  $p=0,355$ ) entre machos e fêmeas.

No ASN (Figura 11), machos apresentaram maior latência para se alimentar (média  $\pm$  EPM:  $275,31 \pm 10,86$ ) do que fêmeas (média  $\pm$  EPM:  $263,92 \pm 11,05$ ). A análise estatística não mostrou diferenças ( $t= -0,697$ ,  $df = 39$ ,  $p=0,489$ ) entre machos e fêmeas.

No PS (Figura 11) as fêmeas apresentam maior preferência (média  $\pm$  EPM:  $91,36 \pm 1,35$ ) em relação aos machos (média  $\pm$  EPM:  $76,87 \pm 6,27$ ). A análise estatística mostrou diferenças ( $t= 2,752$ ,  $df = 39$ ,  $p = 0,008$ ) entre machos e fêmeas.

Figura 11: Comparação entre genitores machos e fêmeas nos testes comportamentais



Legenda: TNF = Tempo de imobilidade (s), ASN = latência para comer (s) e PS: porcentagem da preferência pela sacarose (%). Barras representam média  $\pm$  EPM. M = Machos (n= 18) e F = Fêmeas (n= 26) ANOVA; # diferenças sexuais ( $p < 0,05$ )

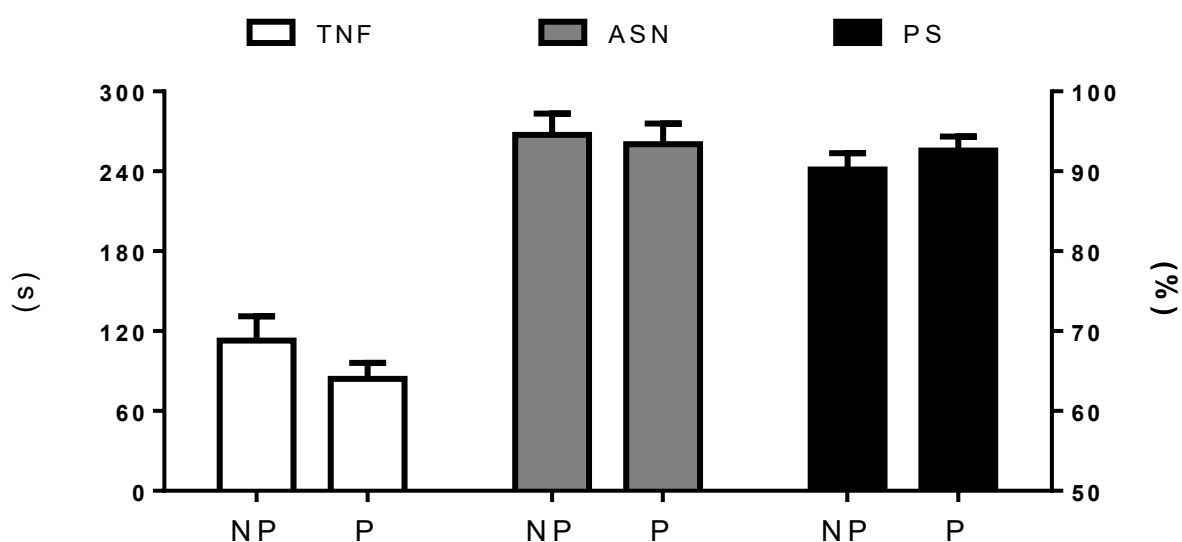
Além da diferença sexual, neste experimento se analisou a influência da privação materna sobre o comportamento dos ratos que foram utilizados como genitores. As duas condições aplicadas sobre ratos fêmeas foram: 1-condições controle, sem privação materna; 2- com privação materna. Para avaliação da influência do fator “condição experimental” (sem privação materna ou com privação materna) sobre o comportamento dos ratos em todos os testes comportamentais (TNF e ASN e PS) foi utilizado o teste t de *student*.

No TNF (Figura 12), as fêmeas não privadas apresentaram tempo de imobilidade maior (média  $\pm$  EPM:  $112,96 \pm 18,12$ ) do que as fêmeas que foram submetidas ao protocolo de privação materna (média  $\pm$  EPM:  $84,21 \pm 11,98$ ). A análise estatística não apresentou diferença significativa ( $t = 1,822$ ,  $df = 23$ ,  $p = 0,088$ ) entre os grupos controle e privado.

No ASN (Figura 12), as fêmeas não privadas apresentaram maior latência para comer (média  $\pm$  EPM:  $267,30 \pm 16,14$ ) do que as fêmeas privadas (média  $\pm$  EPM:  $260,25 \pm 15,65$ ). A análise estatística não apresentou diferença significativa ( $t = 0,312$ ,  $df = 23$ ,  $p = 0,757$ ) entre os grupos controle e privado.

No PS (Figura 12), as fêmeas que não foram submetidas ao protocolo de privação maternal apresentaram redução da preferência (média  $\pm$  EPM: 90,22  $\pm$  2,05) em relação às fêmeas que foram submetidas ao protocolo de privação maternal (média  $\pm$  EPM: 92,59  $\pm$  1,75). A análise estatística não apresentou diferença significativa ( $t = -0,872$ ,  $df = 23$ ,  $p=0,392$ ) entre os grupos controle e privado.

Figura 12: Comparação entre genitoras privadas x não privadas nos testes comportamentais



Legenda: TNF = Tempo de imobilidade (s), ASN = latência para comer (s) e PS: porcentagem da preferência pela sacarose (%). Barras representam média  $\pm$  EPM. NP = não privadas (n= 13) e P = privadas (n= 13)

No experimento 5 calculamos o tamanho do efeito da "condição experimental" sobre os desfechos dos testes comportamentais, como descrito no item 4.4.1. Os dados serão apresentados como tamanho de efeito (Hedges'g e intervalo de confiança 95%). Os valores de Hedges'g negativos representam valores mais baixos dos desfechos na condição experimental "privadas" do que "não privadas", e a interpretação é oposta no caso de valores positivos. Valores de Hedges'g nulos representam ausência de diferença entre os tipos de "condição experimental". Os valores estão descritos na tabela 20.

Tabela 20: Tamanhos de efeito por grupo e por teste

Sexo	Condição experimental	Teste	Hedges g	Tamanho de efeito	Intervalo de confiança
Fêmeas	P x NP	TNF	-0,84	Grande	[-1,85; 0,17]
Fêmeas	P x NP	ASN	-0,12	Muito pequeno	[-0,91; 0,66]
Fêmeas	P x NP	PS	0,34	Pequeno	[-0,45; 1,13]

Grupos: FP = Fêmeas privadas, FNP = Fêmeas não privadas. Valores em Hedges' g e intervalo de confiança 95%.

## 6.DISSCUSSÃO

Este trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos do estresse no início da vida sobre os comportamentos de ratos machos e fêmeas em resposta a situações adversas e ao tratamento com a fluoxetina, um antidepressivo ISRS. A hipótese deste trabalho é que os ratos dos dois sexos, quando estressados no início da vida serão, na idade adulta, mais susceptíveis aos efeitos deletérios dos estressores e mais resistentes aos efeitos benéficos da fluoxetina.

Para se atingir os objetivos deste trabalho, no experimento 1 foi feita a escolha entre dois tipos de protocolos para os testes comportamentais a serem aplicados nas próximas etapas. O protocolo de teste comportamental escolhido foi uma “bateria de testes” composto pelo teste de nado forçado seguido pelo teste de alimentação suprimida pela novidade e, finalmente, pelo teste de preferência pela sacarose. Em todos os experimentos usando a “bateria de testes” houve um intervalo de sete dias entre os testes comportamentais. Excepcionalmente, no experimento 4 houve uma sessão extra de nado forçado um dia após o final da “bateria de testes” padrão para avaliação dos efeitos crônicos da FLX.

No experimento 2 padronizaram-se as condições necessárias para se obter proles e aplicar um protocolo de privação maternal, no qual a prole seria privada da presença da genitora entre os dias 9 e 10<sup>o</sup> PN por 24h. Neste experimento, o efeito do estresse no início da vida sobre o comportamento dos ratos adultos, machos ou fêmeas, foi avaliado com a “bateria de testes” padronizada no experimento 1.

Nos experimentos 3 e 4 avaliou-se os efeitos do tratamento com a fluoxetina sobre o comportamento de ratos adultos, machos ou fêmeas, estressados ou não, com os métodos padronizados nos experimentos 1 e 2. No experimento 3, a dose de fluoxetina testada foi de 2,5 mg/kg enquanto no experimento 4 a dose foi de 10 mg/kg. Nos dois experimentos, a fluoxetina foi administrada por via oral diariamente por 14 dias. Tanto no experimento 3 quanto no 4, os ratos de todos os grupos experimentais foram testados no nado forçado após a primeira dose, no teste de alimentação suprimida pela novidade após a sétima dose e no teste de preferência pela sacarose após 14 administrações. No experimento 4, os ratos receberam 15 doses de fluoxetina antes de serem testados em um teste adicional do nado forçado que ocorreu após o término da “bateria de testes”. Os resultados de cada experimento serão discutidos de forma independente nos tópicos a seguir e, uma discussão sistemática será apresentada ao final.

#### 6.1. A ESCOLHA DO TIPO DE PROTOCOLO DOS TESTES COMPORTAMENTAIS.

O experimento 1 teve como objetivo padronizar o protocolo de testes comportamentais e verificar se a “bateria de testes” seria adequada para avaliar o comportamento dos ratos nos experimentos subsequentes. Para isso, comparou-se os desfechos comportamentais do TNF, ASN ou PS aplicados a grupos independentes ou pareados de ratos machos ou fêmeas. A necessidade dessa comparação, com testes independentes ou pareados, justifica-se pelo fato de que, em uma “bateria de testes” comportamentais, os procedimentos de um teste poderiam afetar o resultado no teste subsequente (PAYLOR; SPENCER; YUVA-PAYLOR; PIEKE-DAHL, 2006). Uma vez que a repetição em um intervalo pequeno pode alterar o resultado do teste subsequente (PAYLOR; SPENCER; YUVA-PAYLOR *et al.*, 2006) padronizamos este protocolo com os testes a cada 7 dias.

Neste experimento, a magnitude e a significância estatística da influência de fatores, como sexo dos ratos (machos ou fêmeas) ou do tipo de protocolo (“testes independentes” ou “bateria de testes”) sobre os desfechos comportamentais, variaram de teste para teste (TNF, ASN ou PS). Por exemplo, no TNF as influências dos fatores “sexo” ou do “tipo de protocolo” foram pequenas e não-significantes, muito embora caiba mencionar tais ocorrências. Ainda que, a influência da interação entre os fatores “sexo” e “tipo de protocolo” tenha tido magnitude média, as diferenças também não foram significantes. Apesar da ausência de significância estatística entre os grupos



experimentais, chama-se a atenção para as diferenças entre as médias de tempo de imobilidade dos ratos machos alocados para os grupos “testes independentes” e “bateria de testes”.

É importante notar que, conquanto os ratos machos tenham sido alocados para grupos experimentais diferentes, os procedimentos a que foram submetidos eram idênticos, já que o TNF era o primeiro teste da “bateria de testes”. Ressaltamos que a alocação de ratos para os grupos deu-se de maneira aleatória em todos os experimentos, pelo mesmo experimentador e ao mesmo tempo para todos os grupos, portanto, um viés de seleção não explica a diferença entre os grupos de ratos machos. Essa diferença de média entre os grupos de ratos machos poderia ser explicada pela variação individual entre os machos, já observada em estudos anteriores da literatura (BOGDANOVA; KANEKAR; D'ANCI *et al.*, 2013; EINAT; EZER; KARA *et al.*, 2018; ENRIQUEZ-CASTILLO; ALAMILLA; BARRAL *et al.*, 2008), e poderia estar envolvida com a variação da expressão de BDNF no córtex cerebral (SEQUEIRA-CORDERO; MORA-GALLEGOS; CUENCA-BERGER *et al.*, 2014). Fatores como feromônios ou odores também podem contribuir para essa variação (ABEL, 1991; GUTIERREZ-GARCIA; CONTRERAS; MENDOZA-LOPEZ *et al.*, 2007).

Os testes ASN e PS demonstram resultado diverso: a influência do “sexo” sobre o comportamento dos ratos foi grande e significativa, enquanto o “tipo de protocolo” ou a interação entre fatores tiveram efeitos pequenos e não-significantes. De fato, a diferença sexual na latência dos animais para alimentação já foi anteriormente descrita na literatura, e as fêmeas apresentaram maior latência para alimentação do que machos (BURKE; COPPINGER; DEEVER *et al.*, 2016). É possível que a latência mais alta nas ratas seja decorrente da maior mobilidade apresentada pelas fêmeas em vários testes quando comparadas aos machos (GORE-LANGTON; WERNER; SPEAR, 2020; KOKRAS; DALLA, 2014). Assim, mesmo tendo o contato com o alimento, as fêmeas poderiam preferir a exploração do ambiente. O inverso ocorre com os machos que exploram menos o ambiente durante o teste (GREINER; PETROVICH, 2020; KOKRAS; DALLA, 2014). Por outro lado, alimentos palatáveis, como a sacarose, podem provocar maior ativação do circuito de recompensa em fêmeas do que em machos e, acredita-se que, essa ativação seja a causa da maior preferência observada nas fêmeas no teste PS (SINCLAIR; HILDEBRANDT; CULBERT *et al.*, 2017).

Importante ressaltar que os comportamentos das fêmeas, nos “testes independentes” ou na “bateria de testes”, mostraram-se menos variáveis do que dos machos neste experimento. Embora seja comum a expectativa de associação entre o ciclo estral das fêmeas e a variabilidade de resultado nos estudos, uma metanálise realizada por BECKER; PRENDERGAST e LIANG (2016) mostrou que ratas não são mais variáveis do que os ratos. Isso vale para medidas comportamentais, eletrofisiológicas, neuroquímicas e histológicas, mesmo quando se leva em consideração a fase do ciclo. Por este motivo, em nossos experimentos, não se estratificou os grupos de fêmeas de acordo com o ciclo estral, uma vez que a manipulação diária das fêmeas poderia interferir e mascarar as respostas da ratas ao estresse (KOKRAS; DALLA, 2014), ponto que será foco principal dos nossos próximos experimentos. Diante das pequenas diferenças observadas entre os dois tipos de protocolos para se aferir os comportamentos dos animais experimentais, decidiu-se usar a “bateria de testes” nos experimentos subsequentes.

As baterias de testes são projetadas e padronizadas para avaliar uma série de desfechos diferentes que incluem, por exemplo, os aspectos motores, somatossensoriais, autonômicos e comportamentais, além do estado físico de roedores (IRWIN, 1968; JACKSON; AUTHIER; BROHMANN *et al.*, 2019; ROSS, 2000). Ademais, a bateria de testes pode ser considerada uma estratégia para redução do uso de animais em pesquisa, pois permite avaliar os efeitos de diferentes intervenções sobre um único grupo de roedores e diminuir a variabilidade dos dados (SHAW; SCHMELZ, 2017). Na psicofarmacologia, diferentes protocolos de bateria de testes avaliam os comportamentos de ansiedade, memória, além do efeito do estresse e a resposta ao tratamento com fármacos (BLOKLAND; TEN OEVER; VAN GORP *et al.*, 2012; BURKE; COPPINGER; DEEVER *et al.*, 2016; KAZAVCHINSKY; DAHAN; EINAT, 2020). A forma como o protocolo foi pensado também possibilita avaliarmos efeitos dos tratamentos agudos e crônicos no mesmo animal, pois no TNF detectamos os efeitos agudos e no ASN e PS avaliamos os efeitos crônicos.

Em conclusão, o experimento 1 mostra que passar por bateria de testes, com um intervalo de 7 dias, parece não alterar o comportamento do teste subsequente, ou essa interferência pode ter sido diluída entre um teste e outro. O tamanho de efeito da bateria de testes é pequeno para fêmeas e machos. Dessa forma, justifica-se a

necessidade de avaliar, como exposto abaixo, os comportamentos após modelo animal de estresse.

## 6.2 O EFEITO DO ESTRESSE NO INÍCIO DA VIDA NO COMPORTAMENTO BASAL DOS ANIMAIS ADULTOS.

Logo depois da padronização do desenho experimental no experimento 1, padronizou-se as condições para usar o modelo animal de privação materna a fim de avaliar a influência do estresse. Esse modelo possibilita avaliar os efeitos do estresse no início da vida, na idade adulta dos animais, objetivo proposto na tese. O protocolo consiste em privação materna por 24h, entre o 9º e 10º PN, onde a genitora é removida e a prole permanece na caixa-viveiro aquecida (ELLENBROEK, B. A.; VAN DEN KROONENBERG, P. T. J. M.; COOLS, A. R., 1998). Este modelo foi o escolhido porque, neste momento específico, ocorre a maturação das conexões cerebrais entre córtex e hipocampo (JANETSIAN-FRITZ; TIMME; TIMM *et al.*, 2018), que estão envolvidas com o efeito dos antidepressivos no cérebro.

Neste experimento, desenvolveu-se e padronizou-se os procedimentos para obtenção dos ratos experimentais usando protocolo adaptado de CELLA (2018). A decisão de obter os animais experimentais no próprio laboratório veio da percepção que, acompanhar a vida dos animais desde o início, ajudaria a discriminar a influência da separação materna das demais influências sobre o comportamento dos animais. Neste trabalho, o processo para obtenção dos ratos experimentais envolveu várias etapas listadas a seguir: 1-adaptação dos genitores as condições laboratoriais; 2-cópula; 3- manutenção das ratas prenhas; 4- parto; 5-amamentação; 6-avaliação do cuidado maternal; 7-separação materna; 8-desmame; 9-manutenção dos ratos machos e fêmeas até o momento dos experimentos da vida adulta.

Em todos os passos descritos acima existem procedimentos que podem afetar o comportamento dos ratos experimentais na vida adulta. Já se observou que a qualidade de vida dos genitores pode afetar o desenvolvimento e o comportamento da prole (KOTT; MOONEY-LEBER; LI *et al.*, 2018). Durante os procedimentos da cópula a interação social pode gerar estresse entre os genitores e, conseqüentemente, afetar o comportamento da prole na vida adulta (SICKMANN; ARENTZEN; DYRBY *et al.*, 2015; ZOUBOVSKY; HOSEUS; TUMUKUNTALA *et al.*, 2020). Neste trabalho, os genitores apresentavam, antes e depois da cópula, uma

aparência saudável e peso corporal compatíveis com condições de bem-estar adequadas. Assim, não esperamos que o estresse sobre genitores possam ser responsáveis por transtornos comportamentais de suas proles na vida adulta.

As condições da vida da rata prenha e o parto parecem ser fatores importantes para o desenvolvimento da prole (BOSCH; MUSCH; BREDEWOLD *et al.*, 2007). Os cuidados maternos durante o período anterior ao desmame são importantes para o desenvolvimento da prole (BRUNTON, 2013; BRUNTON; RUSSELL, 2011). Neste estudo os cuidados maternos foram inspecionados qualitativamente e diariamente, com o uso do protocolo adaptado de LIU; DIORIO; DAY *et al.* (2000). Essa avaliação indica que o cuidado maternal nas presentes condições foi satisfatório para todas as proles. Todas as genitoras refizeram o ninho e permaneceram em postura denominada *crouching* ou cifose fisiológica, na qual sua coluna fica arqueada, facilitando a amamentação e o contato com a prole, imediatamente após serem realocadas na caixa-viveiro. No presente trabalho observamos que, após protocolo de privação maternal, nenhuma das genitoras apresentou evidências de estresse, uma vez que os cuidados maternos, após o protocolo foram satisfatórios. Desta maneira, não esperamos que adversidades durante a prenhez, o parto ou o cuidado maternal respondam por comportamentos aberrantes das proles na vida adulta.

Já foi observado que cuidados maternos insuficientes podem produzir modificações comportamentais nos ratos adultos, tais como déficits cognitivos e emocionais (SCHMIDT; BRAUN; BRANDWEIN *et al.*, 2018), bem como perdas de capacidade de aprendizagem e memória (MARCO; VALERO; DE LA SERNA *et al.*, 2013), demonstrando que a ativação excessiva do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), no início da vida pode contribuir para os efeitos duradouros do estresse (DE KLOET; CLAESSENS; KENTROP, 2014; HUIZINK; MULDER; BUITELAAR, 2004). De acordo com VAN OERS; DE KLOET e LEVINE (1999) os aspectos específicos de cuidados maternos influenciam a longo prazo na regulação do eixo HHA, indicando que as interações entre mãe e recém-nascido são fundamentais para a expressão de comportamentos em ambos. Alterações da relação genitora-prole podem influenciar no desenvolvimento neurofisiológico e comportamental da prole desde seu nascimento até a vida adulta (FLEMING; O'DAY; KRAEMER, 1999).

De fato, a manipulação diária da prole atenua a atividade do eixo HHA e a reatividade emocional na idade adulta, um efeito que pode ser imitado pelo reforço

dos cuidados maternos (DE KLOET; CLAESSENS; KENTROP, 2014). O resultado oposto é alcançado sob condições de privação maternal, por exemplo (DE KLOET; CLAESSENS; KENTROP, 2014; VAN OERS; DE KLOET; LEVINE, 1999). Ainda, cabe destacar o papel do estresse precoce em reduzir a neurogênese e promover a inibição comportamental em ratos, alterações passíveis de serem revertidas com o uso de antidepressivos (GOBINATH; WORKMAN; CHOW *et al.*, 2016; MANIAM; ANTONIADIS; YOUNGSON *et al.*, 2015).

Durante o período de privação maternal os filhotes foram mantidos em temperatura ( $33\pm 1^{\circ}\text{C}$ ), luz e umidade controlados. Estas condições estão de acordo com a literatura (BURKE; LLORENTE; MARCO *et al.*, 2013; MARCO; LLORENTE; LOPEZ-GALLARDO *et al.*, 2015; MIRAGAIA; DE OLIVEIRA WERTHEIMER; CONSOLI *et al.*, 2018) e são importantes para a manutenção da temperatura corpórea, uma vez que os ratos não possuem termorregulação nesta idade (HENNESSY; LI; LOWE *et al.*, 1980). A genitora era removida da caixa-viveiro e mantida em uma caixa individual na mesma sala da prole durante o período de privação maternal (ELLENBROEK; DERKS; PARK, 2005). Após o período de privação maternal a genitora foi realocada para a caixa-viveiro onde a prole permaneceu até o desmame, sendo posteriormente avaliada em testes comportamentais.

Em síntese, a privação maternal promoveu comportamentos distintos, com grande tamanho de efeito, em machos e fêmeas no TNF, mas não nos outros testes.

Enquanto machos privados apresentam tempo de imobilidade maior em comparação aos não privados, fêmeas privadas apresentam comportamento oposto, ou seja, menor tempo de imobilidade em comparação às fêmeas não privadas. A análise estatística apresenta diferença sexual entre animais privados, indicando que o protocolo de privação maternal promove efeitos distintos de acordo com o sexo do animal. O efeito da privação maternal foi muito grande tanto para machos quanto para fêmeas, no entanto a direção do efeito foi distinta. Nos machos, a privação maternal promoveu o aumento do tempo de imobilidade. Já nas fêmeas, o efeito da privação foi em direção contrária, e a resposta ao estresse foi de redução de imobilidade. De fato, as diferenças sexuais no TNF já foram relatadas na literatura, e a direção da diferença na resposta ao estresse, difere entre os estudos (GARCIA-CABRERIZO; LEDESMA-CORVI; BIS-HUMBERT *et al.*, 2020; KOKRAS; ANTONIOU; MIKAIL *et al.*, 2015; KOKRAS; DALLA, 2014). No trabalho de HENN; ZANTA; GIRARDI *et al.* (2020),

utilizando o mesmo protocolo de privação maternal empregado neste trabalho, fêmeas jovens que foram privadas, também responderam ao TNF com redução do tempo de imobilidade.

No trabalho de DE GUZMAN; MEDINA; SAULSBERY *et al.* (2020) ratos machos, que passaram por protocolo de estresse no início da vida, diferente do modelo usado nesta tese, também apresentam aumento de imobilidade em comparação aos animais do grupo controle. No trabalho de FRANCIS-OLIVEIRA; SHIEH; VILAR HIGA *et al.* (2020), fêmeas que foram expostas ao protocolo de separação maternal apresentaram menor número de receptores serotoninérgicos 5HT<sub>1A</sub> no giro denteado do hipocampo e diferenças comportamentais em relação aos machos com aumento do tempo de imobilidade no TNF. Essas diferenças comportamentais podem estar relacionadas com a expressão de receptores serotoninérgicos 5HT<sub>1A</sub>. Cabe salientar que o protocolo (separação maternal) do trabalho de FRANCIS-OLIVEIRA; SHIEH; VILAR HIGA *et al.* (2020) é diferente do protocolo utilizado nesta tese.

DIMATELIS; VERMEULEN; BUGARITH *et al.* (2016) observaram que fêmeas submetidas ao protocolo de separação maternal, responderam com redução ao tempo de imobilidade, como neste trabalho. Além disso, esses autores sugerem que os efeitos comportamentais da separação maternal em fêmeas, podem envolver a via de transdução de sinal MAPK/ERK, uma vez que foram encontradas diferenças na expressão da proteína p-ERK no hipocampo das fêmeas submetidas ao protocolo de separação maternal (DIMATELIS; VERMEULEN; BUGARITH *et al.*, 2016).

No ASN, diferentemente do experimento 1, não foram observadas diferenças sexuais. Essa resposta pode ser em virtude da condição experimental. Dados da literatura mostram que, os ratos machos privados da progenitora entre 9 e 10 dias pós-natal tendem a ter locomoção mais baixa que os não privados, explicando em partes o aumento da latência para se alimentar (BURKE; LLORENTE; MARCO *et al.*, 2013). É importante ressaltar que, entre o experimento 1 e 2 foram realizadas mudanças no biotério do laboratório, sendo o experimento 1 realizado no antigo biotério e o experimento 2 no novo. Essa alteração de alocação talvez tenha sido uma das causas do desaparecimento destes efeitos. Embora o aparato comportamental tenha sido o mesmo, testes comportamentais podem ser sensíveis ao local de experimentação (BLASCO-SERRA; GONZALEZ-SOLER; CERVERA-FERRI *et al.*,

2017; BOGDANOVA; KANEKAR; D'ANCI *et al.*, 2013). A origem dos animais também pode ter influência, uma vez que os animais usados no experimento 1 não foram criados pelo experimentador (como descrito no item 4.1.2). Apenas a partir das proles do experimento 2 teve início a colônia própria de animais. Diferente do TNF, o efeito da privação maternal foi pequeno tanto para machos quanto para fêmeas, mas parece ter contribuído para o aumento da latência nos machos.

No PS embora não tenha diferença estatística, o estresse parece diminuir a preferência de machos pela sacarose quando comparados com as fêmeas que passaram pelo mesmo protocolo. Porém, os efeitos da privação maternal sobre a preferência por sacarose, redução nos machos e aumento nas fêmeas, foram muito pequenos. Dados da literatura com animais que passaram por protocolo de estresse no início da vida (i.e., separação maternal) mostram que o consumo reduzido de sacarose em comparação com os controles não diferiu entre machos e fêmeas (ANDERSEN, 2015; FRANCIS-OLIVEIRA; SHIEH; VILAR HIGA *et al.*, 2020; MATTHEWS; HALL; WILKINSON *et al.*, 1996). No presente estudo, os grupos controle, também não apresentam diferença entre os sexos, de acordo com dados já publicados na literatura (BURKE; COPPINGER; DEEVER *et al.*, 2016).

Em conclusão, o estresse no início da vida parece promover comportamentos distintos em machos e fêmeas no TNF, com tamanho de efeito grande. Porém, no ASN e no PS, o estresse teve efeito pequeno na resposta dos animais ao teste. Embora pequeno, o efeito do estresse parece aumentar a latência dos machos para se alimentar, e reduzir a preferência pela sacarose nos machos.

### 6.3 RESPOSTA COMPORTAMENTAL DOS RATOS AO TRATAMENTO COM FLX 2,5 MG/KG

O experimento 3, utiliza o protocolo do experimento 1, com a condição experimental do experimento 2, e adiciona o tratamento crônico com FLX 2,5 mg/kg. Trabalhos anteriores do laboratório mostram que esta dose de FLX, no teste do nado forçado repetido, reduz o tempo de imobilidade em ratos machos, mas não em fêmeas, quando administrada de forma crônica. A redução do tempo de imobilidade era observada em machos no reteste 2, 14 dias após o início do tratamento (MEZADRI; BATISTA; PORTES *et al.*, 2011). No trabalho de DOMINGUES; LIMA; LINDER *et al.* (2020), os machos tratados com esta dose também apresentavam

resposta após 14 dias, no entanto as fêmeas não respondiam ao tratamento. Além disso, essa dose já foi utilizada na literatura (CRYAN; PAGE; LUCKI, 2005). Assim, neste experimento não se esperava encontrar efeitos comportamentais do tratamento com FLX 2,5 mg/kg nos TNF ou ASN, mas sim no PS.

Após tratamento agudo no TNF, diferentemente do trabalho de DOMINGUES; LIMA; LINDER *et al.* (2020), não houve diferença entre os machos controle e tratados. O tamanho de efeito do tratamento com FLX 2,5 mg/kg sobre o tempo de imobilidade dos machos no TNF da condição experimental “não privados” foi médio. Já para os machos da condição experimental “privados” o tamanho do efeito FLX 2,5 mg/kg sobre o tempo de imobilidade no TNF foi pequeno, assim como dados publicados na literatura (LI; YAN; ZHU *et al.*, 2017). Essa diminuição do tamanho do efeito da FLX 2,5 mg/kg indica que a privação materna pode diminuir a resposta dos ratos machos ao tratamento com o fármaco. Nas fêmeas que não passaram pela privação materna, o tempo de imobilidade no TNF foi semelhante nos grupos tratados ou não com FLX 2,5 mg/kg e, de fato, o tamanho do efeito do tratamento foi muito pequeno, indo de acordo com o observado no trabalho de DOMINGUES; LIMA; LINDER *et al.* (2020).

Entretanto, nas fêmeas que passaram por privação materna, o tratamento com FLX 2,5 mg/kg reduziu o tempo de imobilidade no TNF quando comparado ao veículo. Na literatura, os poucos trabalhos que avaliam o comportamento de ratas fêmeas, após um protocolo de estresse sob tratamento com ISRS, relatam ausência ou pequeno efeito do tratamento sobre o tempo de imobilidade no TNF (LU; HO; LIU *et al.*, 2017; MAHMOUD; WAINWRIGHT; CHAITON *et al.*, 2016; OVERGAARD; LIEBLICH; RICHARDSON *et al.*, 2018; WORKMAN; GOBINATH; KITAY *et al.*, 2016). O tamanho de efeito do tratamento com FLX 2,5 mg/kg sobre o tempo de imobilidade das fêmeas no TNF foi grande no nosso experimento e podemos aventar duas possibilidades para explicá-lo. Neste estudo, as fêmeas não passaram por ovariectomia, diferente dos trabalhos encontrados na literatura (OVERGAARD; LIEBLICH; RICHARDSON *et al.*, 2018). Aqui, o protocolo de estresse foi diferente dos protocolos de estresse utilizados nos trabalhos publicados na literatura que foram o protocolo de estresse crônico (LU; HO; LIU *et al.*, 2017), tratamento crônico com corticosterona (OVERGAARD; LIEBLICH; RICHARDSON *et al.*, 2018; WORKMAN; GOBINATH; KITAY *et al.*, 2016) ou separação materna (MASROUR; PEERI; AZARBAYJANI *et al.*, 2018).



Além do baixo número de estudos que avaliam fêmeas, impossibilitando uma comparação mais profunda dos resultados obtidos, outra possibilidade que pode ser aventada, é a influência da administração da solução veículo ao grupo. Em virtude de o método de administração de drogas, ser a ingestão espontânea (SCHLEIMER; JOHNSTON; HENDERSON, 2005), a solução veículo utilizada foi sacarose 10%. Tanto o manuseio, quanto a solução podem estar influenciando na resposta das fêmeas frente ao teste (GORE-LANGTON; WERNER; SPEAR, 2020). Diferente do experimento 2, as fêmeas privadas que receberam veículo, apresentam maior tempo de imobilidade do que as fêmeas não privadas.

Após tratamento por 7 dias com FLX 2,5 mg/kg, avaliamos o comportamento dos animais no ASN. Não foram observadas diferenças nem entre grupos de ratos tratados e não tratados com o fármaco ou entre os sexos. Os resultados apresentados aqui demonstram que a FLX nesta dose parece não ser efetiva em modificar o comportamento dos ratos, mesmo após 7 dias de tratamento. O ASN necessita de tratamento crônico para demonstrar o efeito do tratamento com os antidepressivos (BLASCO-SERRA; GONZALEZ-SOLER; CERVERA-FERRI *et al.*, 2017) e, por este motivo, é o segundo teste avaliado neste trabalho. De fato, os tamanhos de efeito descritos na tabela 3, mostram que a FLX teve um efeito pequeno na resposta dos animais ao teste. Desta forma, podemos suspeitar que a dose de FLX 2,5 mg/kg foi inefetiva neste teste. Nota-se um aumento da latência nos animais que receberam VEI, assim como no experimento 2, nos machos, tanto “não privados” (média  $\pm$  EPM: 281,25  $\pm$  14,51) quanto “privados” (média  $\pm$  EPM: 292,25  $\pm$  7,06), indicando que a manipulação diária destes animais e a administração de VEI pode influenciar neste resultado. As latências para comer tanto dos grupos privados da genitora quanto os grupos não privados foram similares e independente do sexo dos ratos.

Após o tratamento por 14 dias com FLX 2,5 mg/kg, os animais foram submetidos ao teste de PS e, observou-se influência do sexo dos ratos, tanto de animais “privados” quanto “não privados” da genitora. Os ratos machos apresentam menor preferência pela sacarose do que fêmeas. Embora observe-se uma tendência de aumento da preferência com o tratamento com a FLX nos machos dos grupos “não privados” e “privados”, não houve diferença estatística entre os grupos em relação aos animais que receberam VEI. O tamanho de efeito da FLX 2,5 mg/kg sobre a preferência pela sacarose, de fato, foi muito pequeno (dados descritos na tabela 3,

item 5.3). Em relação às fêmeas “não privadas” da genitora, houve uma redução da preferência no grupo tratado com FLX. Nas fêmeas do grupo privado da genitora os resultados foram similares. O grupo das fêmeas “privadas” da genitora, apresenta preferência alta no grupo controle e se mantém igual no grupo que recebeu FLX, mostrando que a privação em fêmeas parece não afetar o comportamento de redução da preferência pela sacarose, ao menos neste protocolo. Os dados do trabalho de RECAMIER-CARBALLO; ESTRADA-CAMARENA; REYES *et al.* (2012), em ratas que foram ovariectomizadas e passaram por protocolo de estresse crônico imprevisível, mostram que a eficácia da FLX em ratas, parece ser dependente da idade. Enquanto os animais jovens (2 a 4 meses) precisaram de 3 semanas de tratamento, os animais mais velhos (12 a 14 meses) responderam ao tratamento em apenas uma semana. Neste trabalho, o tratamento foi realizado por 14 dias, em ratos de 100 dias, e talvez o tempo de tratamento pode ter sido pequeno. Além disso, nossas ratas não eram ovariectomizadas (RECAMIER-CARBALLO; ESTRADA-CAMARENA; REYES *et al.*, 2012).

Em conclusão, no experimento 3, a administração de 2,5 mg de FLX não parece ser eficaz em reduzir o tempo de imobilidade nos machos. A interação dos fatores, sexo, condição experimental e tratamento, parece ser responsável pela redução do tempo de imobilidade nas fêmeas privadas, tratadas com FLX 2,5 mg/kg. O baixo número de estudos com fêmeas impossibilita a comparação mais robusta com dados da literatura. No ASN e no PS o tratamento parece não ser efetivo.

#### 6.4 RESPOSTA COMPORTAMENTAL DOS RATOS AO TRATAMENTO COM FLX 10 MG/KG

Para melhor entendermos os resultados obtidos até o momento realizamos uma revisão sistemática seguida de metanálise, que também serviu de ferramenta para a escolha da dose mais efetiva para os passos seguintes (dados em fase final de manuscrito e não apresentados). Importante ressaltar que mesmo uma revisão sistemática, pode omitir alguns trabalhos. Essa falha pode ser relacionada com a escolha das palavras-chave utilizadas na busca, por exemplo que é realizada *a priori* e de forma arbitrária (MACLEOD; LAWSON MCLEAN; KYRIAKOPOULOU *et al.*, 2015; SENA; CURRIE; MCCANN *et al.*, 2014). Logo, no experimento 4 utilizamos a dose de 10 mg/kg demonstrada como mais efetiva no TNF, teste que apresentou a maior influência do estresse até o momento.

Neste experimento esperávamos que o grupo de animais machos não estressados respondessem ao tratamento com FLX 10 mg/kg com diminuição do tempo de imobilidade no TNF, uma vez que seriam os animais “controle” do experimento, e que, de acordo com a literatura se mostram como os mais responsivos ao tratamento com ISRS (GLOMBIK; SLUSARCZYK; TROJAN *et al.*, 2017; GRIEBEL; SIMIAND; SERRADEIL-LE GAL *et al.*, 2002; LI; WU; YU *et al.*, 2018; WORKMAN; GOBINATH; KITAY *et al.*, 2016). Diferentemente dos experimentos anteriores, também conduzimos um segundo TNF após 15 dias de tratamento com a FLX10 mg/kg para avaliar se os animais responderiam também ao tratamento crônico com o fármaco.

Após receberem FLX 10 mg/kg, por via oral 1 h antes do TNF, os ratos machos “não privados” reduziram o tempo de imobilidade em relação ao grupo controle, conforme esperado. Os machos “privados” que foram tratados com FLX, apresentaram redução do tempo de imobilidade em relação aos animais do grupo controle, embora não tenha sido detectada a significância estatística.

Considerado o padrão da apresentação de dados na farmacologia e neurociências, o valor de p vem sendo discutido nos últimos tempos, e muitas vezes é interpretado de forma absoluta como eficaz ou não eficaz (LAKENS; ADOLFI; ALBERS *et al.*, 2018). Segundo a Associação Brasileira de Estatística (ABE), seguindo as normas da Sociedade Portuguesa de Estatística (SPE), o valor de p é a probabilidade de se obter uma estatística de teste igual ou mais extrema que aquela observada em uma amostra, sob a hipótese nula (MARTINS, 2005).

Uma alternativa para avaliação dos dados é o tamanho de efeito. Esta é uma medida padronizada da magnitude de um efeito observado (COHEN, 1992; FIELD; GILLET, 2010), e que também pode ser interpretada como uma medida da força do relacionamento entre duas variáveis em uma população estatística (FIELD; GILLET, 2010). Por este motivo, avaliamos o tamanho de efeito de cada intervenção feita nos experimentos desta tese. Quando avaliamos os dados desta forma podemos atribuir, arbitrariamente, o quão robusto é esse resultado, se pequeno, médio ou grande, através do valor encontrado. Grupos com tamanho de efeito entre 0.2-0.5 podem ser considerados pequenos, já grupos com tamanho de efeito entre 0.5-0.8 podem ser considerados médios, e trabalhos com efeito entre 0.8-1.2 podem ser considerados

de grande tamanho de efeito (COHEN, 1992; ESPIRITO SANTO; DANIEL, 2015; SAWILOWSKY, 2009).

Ao observarmos os resultados desta forma, visualizamos que o efeito da FLX 10 mg/kg sobre o tempo de imobilidade no TNF é médio tanto nos ratos machos “privados” quanto “não privados” da genitora na vida precoce. Apesar de médio, o tamanho do efeito foi menor nos animais “privados” ( $g=-0,63$ ) do que nos animais “não privados” ( $g=-0,77$ ), mostrando que a FLX 10 mg/kg foi eficaz em reverter os efeitos do estresse nos machos dos dois grupos, porém seu efeito foi menor nos estressados. Esse resultado vai de acordo com o observado na metanálise, que mostra que o estresse diminui o tamanho de efeito dos ISRS (Dados não apresentados). Isso reforça que, embora considerada a medida padrão, o valor de  $p$  pode muitas vezes estar escondendo o efeito do tratamento.

Em relação às fêmeas, no TNF não foram observadas diferenças no tratamento com o fármaco, tanto no grupo de animais “não privados” quanto no grupo de animais “privados”. Nas fêmeas “privadas”, o tamanho da redução do tempo de imobilidade feito pela FLX 10 mg/kg foi grande ( $g=-0,84$ ). Nas fêmeas “não privadas”, o tratamento com FLX aumentou o tempo de imobilidade em relação ao grupo controle, similar aos resultados apresentados por WORKMAN; GOBINATH; KITAY *et al.* (2016) na mesma dose. De fato, ao analisarmos os tamanhos de efeito, nota-se que o efeito do tratamento, no aumento do tempo de imobilidade no grupo de fêmeas “não privadas” é pequeno. O TNF é um dos testes mais usados para a predição de efeitos antidepressivos em roedores de laboratório (CRYAN; VALENTINO; LUCKI, 2005). Padronizado e extensamente utilizado em ratos ou camundongos machos, o TNF pode não detectar muito bem o efeito de antidepressivos em fêmeas. Como consequência, os estudos pré-clínicos podem estar em descompasso com os estudos clínicos e poderia explicar, pelo menos em parte, a menor eficácia do tratamento, especialmente em mulheres (DALLA; PITYCHOUTIS; KOKRAS *et al.*, 2010; MORRISON, 2020)

Como já descrito anteriormente, no experimento 4, optamos por realizar um segundo TNF para avaliar o efeito do tratamento crônico com FLX após 15 dias. Observou-se uma redução no tamanho de efeito da FLX tanto em machos quanto em fêmeas. Surpreendentemente, o grupo de machos “não privados” que receberam FLX e reduziram o tempo de imobilidade no primeiro teste não responderam ao tratamento

no segundo TNF. Nota-se um aumento na variabilidade em todos os grupos de animais, tanto machos quanto fêmeas, explicando em partes o resultado. Em trabalhos anteriores com roedores, submetidos ao TNF, já foi observado que existiam subgrupos tanto em ratos (ENRIQUEZ-CASTILLO; ALAMILLA; BARRAL *et al.*, 2008) quanto em camundongos (SUMAN; ZERBINATTI; THEINDL *et al.*, 2018) com respostas distintas ao tratamento com antidepressivos.

No trabalho de DOMINGUES; LIMA; LINDER *et al.* (2020), embora em doses diferentes, quando submetidos ao segundo TNF no protocolo de teste do nado forçado repetido, os animais também tiveram grande variabilidade, e as fêmeas respondiam com aumento do tempo de imobilidade. Observamos resposta parecida no grupo de fêmeas “não privadas” quando tratadas com FLX e, assim como no experimento 3, os animais do grupo de fêmeas “privadas” tratadas com FLX responderam com redução do tempo de imobilidade que, embora não significante, apresenta tamanho de efeito grande. Especula-se que esta variação na resposta dos animais nesta segunda exposição possa ser relacionada a um aprendizado adquirido no primeiro TNF, e a variabilidade possa ser a resposta individual de cada animal frente ao paradigma inescapável (EINAT; EZER; KARA *et al.*, 2018; MOLENDIJK; DE KLOET, 2015).

Após tratamento por 7 dias com FLX 10 mg/kg os animais foram testados no ASN. Após o tratamento com o fármaco houve o aumento da latência para comer, tanto em machos privados quanto não privados. É interessante notar que, os ratos machos, que receberam apenas veículo, têm latência parecida independente da condição experimental (i.e. “não privados” ou “privados”) dando indícios que o tratamento com FLX tenha sido responsável por este aumento da latência. Em outro trabalho, machos que foram submetidos ao protocolo de estresse crônico imprevisível, também aumentam a latência para o consumo de comida num teste de ASN (STEDENFELD; CLINTON; KERMAN *et al.*, 2011). No trabalho de MIRAGAIA; DE OLIVEIRA WERTHEIMER; CONSOLI *et al.* (2018) animais que foram submetido a privação materna no PN3, exclusivamente, apresentaram aumento na latência para comer no ASN, tanto em machos quanto em fêmeas, mesmo privados de comida por 48 h. Isto sugere que o dia em que a PM é realizada é um fator para a resposta dos animais frente ao teste, uma vez que esse efeito não foi observado em animais submetidos a privação materna no PN11 e testados na adolescência (MIRAGAIA; DE

OLIVEIRA WERTHEIMER; CONSOLI *et al.*, 2018) ou quando adultos (CABBIA; CONSOLI; SUCHECKI, 2018)

Em relação ao efeito do tratamento no PS, os dados são similares ao experimento 3. Não foram observadas diferenças entre os grupos e nem entre os sexos, apenas diferenças sexuais entre os animais dos grupos privados que receberam veículo. O tamanho de efeito da FLX foi muito pequeno para machos “não privados” e “privados” e para fêmeas “não privadas” e “privadas”. Esses dados sugerem que o fator sexo foi mais importante para o resultado do que os fatores, estresse e tratamento. No trabalho de AMODEO; GREENFIELD; HUMPHREY *et al.* (2015), os resultados mostram que a FLX na dose de 10 mg/kg, também apresentou pequeno efeito, em relação ao grupo VEI, e não foi observado aumento na preferência de sacarose. No trabalho de XING; HE; HOU *et al.* (2013) onde ratos da linhagem Sprague-dawley, após protocolo de estresse crônico foram, tratados com venlafaxina, também se observou diferença apenas no fator sexo. Neste mesmo trabalho se observa um aumento não significativo na preferência a sacarose tanto em machos quanto em fêmeas (XING; HE; HOU *et al.*, 2013)

Em conclusão, o tratamento com 10 mg/kg de FLX foi eficaz em reverter o efeito do estresse nos machos e parece reverter o efeito nas fêmeas “privadas”. Nos demais testes não foi observado efeito da FLX indicando que o tratamento crônico parece não ser efetivo tanto no ASN, quanto no PS nesta bateria de testes.

## 6.5 O EFEITO DA SEPARAÇÃO MATERNA SOBRE O COMPORTAMENTO DOS GENITORES

Existem evidências que o estado de saúde, bem-estar e nutricional dos genitores pode afetar o desenvolvimento da prole (ZOUBOVSKY; HOSEUS; TUMUKUNTALA *et al.*, 2020). Para obter indícios sobre a qualidade de vida e bem-estar dos genitores e genitoras avaliamos seus comportamentos na bateria de testes. Neste experimento foi possível apreciar se os comportamentos variaram de maneira sexualmente dimórfica e se a privação materna afetou o comportamento das genitoras. Nenhuma droga foi administrada aos genitores ou genitoras, assim, apenas o comportamento basal foi analisado.

Ao compararmos a imobilidade de genitores e genitoras no TNF, incluindo fêmeas submetidas ao protocolo de privação materna, não observamos diferença

estatística no comportamento, assim como no experimento 1. Porém, diferente do experimento 1, no ASN não foi observada diferença entre machos e fêmeas, assim como no experimento 2. No PS, observamos o único efeito estatisticamente significativo, onde, assim como no experimento 1, fêmeas apresentam maior porcentagem de preferência em relação aos machos. Esses dados parecem ir de encontro aos dados publicados na literatura (KOKRAS; DALLA, 2014; XING; HE; HOU *et al.*, 2013)

Ao analisarmos as genitoras e os efeitos do estresse, observamos que existe uma redução com tamanho de efeito grande, porém não significativa, do tempo de imobilidade no TNF nas fêmeas que foram submetidas ao protocolo de privação maternal. Isso indica que, de fato, existe efeito similar aos efeitos da prole de fêmeas submetidas ao protocolo. Isso sugere que as respostas das genitoras ao TNF, após o protocolo de privação maternal também são alteradas, com a redução do tempo de imobilidade, porém, em menor magnitude do que as fêmeas da prole. Em relação ao ASN e PS, as fêmeas “privadas” respondem de maneira similar às fêmeas “não privadas”. De fato, o tamanho do efeito da privação pode ser considerado muito pequeno ou pequeno, respectivamente.

Estes resultados são similares aos observados no experimento 2, onde nas proles, as fêmeas que foram submetidas ao protocolo de privação maternal, responderam com redução do tempo de imobilidade no TNF, e no ASN e PS responderam de maneira similar ao grupo controle “não privado” (ver figuras 9 e 13). Os machos que foram submetidos ao acasalamento, apresentam resultados similares ao experimento 1 no TNF e PS, porém, apresentaram latência maior no ASN.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E LIMITAÇÕES DO ESTUDO

No presente trabalho buscamos reduzir o viés da melhor forma possível, buscando os resultados mais robustos e confiáveis. Foi realizada a aleatorização dos grupos experimentais quanto ao tratamento ou estresse. Todos os experimentos foram realizados de forma “cega”, ou seja, o experimentador não sabia qual era o grupo experimental ao qual o animal pertencia, exceto o sexo do animal. Todos os experimentos foram registrados em vídeo e analisados de forma “cega” pelo experimentador, e os grupos só foram revelados após análise estatística. Essas medidas buscam aumentar a reprodutibilidade e robustez dos experimentos científicos (BEGLEY; IOANNIDIS, 2015; MUNAFÒ; NOSEK; BISHOP *et al.*, 2017).

Como limitações, a falta de análises complementares, como a quantificação dos parâmetros moleculares, por exemplo, dos receptores serotoninérgicos, poderia reforçar os entendimentos dos dimorfismos sexuais e as respostas dos ratos ao estresse. De fato, as amostras já foram processadas e serão analisadas assim que possível. Pretendemos analisar a expressão proteica de receptores 5HT<sub>1a</sub>, além da neurogênese hipocampal, quantificando a expressão de DCX. Análises preliminares indicam uma diferença no número de novos neurônios no hipocampo, porém não realizamos a quantificação neste material.



## 8. CONCLUSÃO

De acordo com a revisão sistemática realizada previamente, este é o primeiro trabalho que avalia os efeitos deste protocolo da privação maternal em fêmeas e o efeito do tratamento da FLX nas doses de 2,5 e 10 mg/kg.

Ao analisarmos os dados dos experimentos, por cada teste comportamental, é possível observar que, o TNF foi o teste mais sensível às manipulações experimentais, seja pelo tipo de protocolo para testes comportamentais, a privação maternal ou o tratamento com FLX. Ao analisarmos todos os dados do ASN, é possível observar que este teste foi menos variável e menos sensível as manipulações experimentais do que o TNF, independentemente da condição experimental. Em todos os experimentos e grupos, observa-se uma dispersão dos dados muito similar entre os grupos. No PS observa-se maior dispersão dos valores nos machos do que nas fêmeas, que apresentam maior preferência à sacarose demonstrando que o fator sexual foi mais sensível as manipulações do que os fatores privação e tratamento, indicando dimorfismo sexual no comportamento.

Por fim, a presente tese traz novos dados sobre as diferenças sexuais e o comportamento de ratos submetidos ao protocolo de privação maternal e apresenta uma nova bateria de testes desenhada para avaliar os efeitos do estresse e do efeito do tratamento com ISRS. Novos estudos, alterando os testes comportamentais, ou o tempo entre estes, são necessários para avaliar o efeito do estresse e do tratamento com FLX.

## REFERÊNCIAS

ABEL, E. J. Alarm Substance Emitted by Rats in the Forced-Swim Test Is a Low Volatile Pheromone. **Physiology & Behavior**, 50, p. 723-727, 1991.

ABELAIRA, H. M.; REUS, G. Z.; QUEVEDO, J. Animal models as tools to study the pathophysiology of depression. **Braz J Psychiatry**, 35 Suppl 2, p. S112-120, 2013.

ACHOR, R. W.; HANSON, N. O.; GIFFORD, R. W., Jr. Hypertension treated with *Rauwolfia serpentina* (whole root) and with reserpine; controlled study disclosing occasional severe depression. **J Am Med Assoc**, 159, n. 9, p. 841-845, Oct 29 1955.

AKIL, H.; GORDON, J.; HEN, R.; JAVITCH, J. *et al.* Treatment resistant depression: A multi-scale, systems biology approach. **Neurosci Biobehav Rev**, 84, p. 272-288, Jan 2018.

ALQAHTANI, A. M.; KUMARAPPAN, C.; KUMAR, V.; SRINIVASAN, R. *et al.* Understanding the genetic aspects of resistance to antidepressants treatment. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, 24, n. 14, p. 7784-7795, 2020.

AMODEO, L. R.; GREENFIELD, V. Y.; HUMPHREY, D. E.; VARELA, V. *et al.* Effects of acute or repeated paroxetine and fluoxetine treatment on affective behavior in male and female adolescent rats. **Psychopharmacology (Berl)**, 232, n. 19, p. 3515-3528, Oct 2015.

ANDERSEN, S. L. Exposure to early adversity: Points of cross-species translation that can lead to improved understanding of depression. **Dev Psychopathol**, 27, n. 2, p. 477-491, May 2015.

ARNONE, D.; MCKIE, S.; ELLIOTT, R.; JUHASZ, G. *et al.* State-dependent changes in hippocampal grey matter in depression. **Mol Psychiatry**, 18, n. 12, p. 1265-1272, Dec 2013.

AXELROD, J. Biogenic amines and their impact in psychiatry. **Semin Psychiatry**, 4, n. 3, p. 199-210, Aug 1972.

BECKER, J. B.; PRENDERGAST, B. J.; LIANG, J. W. Female rats are not more variable than male rats: a meta-analysis of neuroscience studies. **Biol Sex Differ**, 7, p. 34, 2016.

BEGLEY, C. G.; IOANNIDIS, J. P. Reproducibility in science: improving the standard for basic and preclinical research. **Circ Res**, 116, n. 1, p. 116-126, Jan 2 2015.

BEYELER, A. Do antidepressants restore lost synapses? **Science**, 364, n. 6436, 2019.

BLASCO-SERRA, A.; GONZALEZ-SOLER, E. M.; CERVERA-FERRI, A.; TERUEL-MARTI, V. *et al.* A standardization of the Novelty-Suppressed Feeding Test protocol in rats. **Neurosci Lett**, 658, p. 73-78, Sep 29 2017.

BLOKLAND, A.; TEN OEVER, S.; VAN GORP, D.; VAN DRAANEN, M. *et al.* The use of a test battery assessing affective behavior in rats: order effects. **Behav Brain Res**, 228, n. 1, p. 16-21, Mar 1 2012.

BOGDANOVA, O. V.; KANEKAR, S.; D'ANCI, K. E.; RENSHAW, P. F. Factors influencing behavior in the forced swim test. **Physiol Behav**, 118, p. 227-239, Jun 13 2013.

BOSCH, O. J.; MUSCH, W.; BREDEWOLD, R.; SLATTERY, D. A. *et al.* Prenatal stress increases HPA axis activity and impairs maternal care in lactating female offspring: implications for postpartum mood disorder. **Psychoneuroendocrinology**, 32, n. 3, p. 267-278, Apr 2007.

BRENES, J. C.; FORNAGUERA, J. The effect of chronic fluoxetine on social isolation-induced changes on sucrose consumption, immobility behavior, and on serotonin and dopamine function in hippocampus and ventral striatum. **Behav Brain Res**, 198, n. 1, p. 199-205, Mar 2 2009.

BRODIE, B. A.; SHORE, P. A.; PLETSCHER, A. Serotonin-releasing activity limited to Rauwolfia alkaloids with tranquilizing action. **Science**, 123, n. 3205, p. 992-993, Jun 1 1956.

BRUNTON, P. J. Effects of maternal exposure to social stress during pregnancy: consequences for mother and offspring. **Reproduction**, 146, n. 5, p. R175-189, 2013.

BRUNTON, P. J.; RUSSELL, J. A. Neuroendocrine control of maternal stress responses and fetal programming by stress in pregnancy. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, 35, n. 5, p. 1178-1191, Jul 1 2011.

BURKE, N. N.; COPPINGER, J.; DEEVER, D. R.; ROCHE, M. *et al.* Sex differences and similarities in depressive- and anxiety-like behaviour in the Wistar-Kyoto rat. **Physiol Behav**, 167, p. 28-34, Dec 1 2016.

BURKE, N. N.; LLORENTE, R.; MARCO, E. M.; TONG, K. *et al.* Maternal deprivation is associated with sex-dependent alterations in nociceptive behavior and neuroinflammatory mediators in the rat following peripheral nerve injury. **J Pain**, 14, n. 10, p. 1173-1184, Oct 2013.

BUTTON, K. S.; IOANNIDIS, J. P.; MOKRYSZ, C.; NOSEK, B. A. *et al.* Power failure: why small sample size undermines the reliability of neuroscience. **Nat Rev Neurosci**, 14, n. 5, p. 365-376, May 2013.

CABBIA, R.; CONSOLI, A.; SUCHECKI, D. Association of 24 h maternal deprivation with a saline injection in the neonatal period alters adult stress response and brain monoamines in a sex-dependent fashion. **Stress**, 21, n. 4, p. 333-346, Jul 2018.

CALDARONE, B. J.; ZACHARIOU, V.; KING, S. L. Rodent models of treatment-resistant depression. **Eur J Pharmacol**, 753, p. 51-65, Apr 15 2015.

CAMPOS, A. C.; FOGACA, M. V.; AGUIAR, D. C.; GUIMARAES, F. S. Animal models of anxiety disorders and stress. **Braz J Psychiatry**, 35 Suppl 2, p. S101-111, 2013.

CATHOMAS, F.; MURROUGH, J. W.; NESTLER, E. J.; HAN, M. H. *et al.* Neurobiology of Resilience: Interface Between Mind and Body. **Biol Psychiatry**, 86, n. 6, p. 410-420, Sep 15 2019.

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 Schmiedebergs Arch Pharmacol**, 347, n. 6, p. 583-590, Jun 1993.

CELLA, E. **Efeitos da administração de dexametasona durante o período gestacional em parâmetros de comportamento materno, emocional, memória e cognição no pós-parto de ratas.** 2018. 78 f. - Programa de Pós-Graduação Multicêntrico de Ciências Fisiológicas, UFSC.

CLAYTON, J. A.; COLLINS, F. S. Policy: NIH to balance sex in cell and animal studies. **Nature**, 509, n. 7500, p. 282-283, May 15 2014.

COHEN, J. **Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences.** 2nd ed. Lawrence Erlbaum Associates, 1988. 0-8058-0283-5.

COHEN, J. A power primer. **Psychol Bull**, 112, n. 1, p. 155-159, Jul 1992.

COLOM-LAPETINA, J.; BEGLEY, S. L.; JOHNSON, M. E.; BEAN, K. J. *et al.* Strain-dependent sex differences in a long-term forced swim paradigm. **Behav Neurosci**, 131, n. 5, p. 428-436, Oct 2017.

COPLAN, J. D.; GOPINATH, S.; ABDALLAH, C. G.; BERRY, B. R. A neurobiological hypothesis of treatment-resistant depression - mechanisms for selective serotonin reuptake inhibitor non-efficacy. **Front Behav Neurosci**, 8, p. 189, 2014.

CRAWFORD, A. A.; LEWIS, S.; NUTT, D.; PETERS, T. J. *et al.* Adverse effects from antidepressant treatment: randomised controlled trial of 601 depressed individuals. **Psychopharmacology (Berl)**, 231, n. 15, p. 2921-2931, Aug 2014.

CRISPIM JUNIOR, C. F.; PEDERIVA, C. N.; BOSE, R. C.; GARCIA, V. A. *et al.* ETHOWATCHER: validation of a tool for behavioral and video-tracking analysis in laboratory animals. **Comput Biol Med**, 42, n. 2, p. 257-264, Feb 2012.

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

CRYAN, J. F.; VALENTINO, R. J.; LUCKI, I. Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. **Neurosci Biobehav Rev**, 29, n. 4-5, p. 547-569, 2005.

DALLA, C.; PITYCHOUTIS, P. M.; KOKRAS, N.; PAPADOPOULOU-DAIFOTI, Z. Sex differences in animal models of depression and antidepressant response. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, 106, n. 3, p. 226-233, Mar 2010.

DE GUZMAN, R. M.; MEDINA, J.; SAULSBERY, A. I.; WORKMAN, J. L. Rotated nursing environment with underfeeding: a form of early-life adversity with sex- and age-dependent effects on coping behavior and hippocampal neurogenesis. **Physiology & Behavior**, 2020.

DE KLOET, E. R.; CLAESSENS, S. E.; KENTROP, J. Context modulates outcome of perinatal glucocorticoid action in the brain. **Front Endocrinol (Lausanne)**, 5, p. 100, 2014.

DELGADO, P. L.; CHARNEY, D. S.; PRICE, L. H.; AGHAJANIAN, G. K. *et al.* Serotonin function and the mechanism of antidepressant action. Reversal of antidepressant-induced remission by rapid depletion of plasma tryptophan. **Arch Gen Psychiatry**, 47, n. 5, p. 411-418, May 1990.

DETKE, M. J.; RICKELS, M.; LUCKI, I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. **Psychopharmacology (Berl)**, 121, n. 1, p. 66-72, Sep 1995.

DIMATELIS, J. J.; VERMEULEN, I. M.; BUGARITH, K.; STEIN, D. J. *et al.* Female rats are resistant to developing the depressive phenotype induced by maternal separation stress. **Metab Brain Dis**, 31, n. 1, p. 109-119, Feb 2016.

DOMINGUES, K.; LIMA, F. B.; LINDER, A. E.; MELLEU, F. F. *et al.* 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**, 74, n. 1, p. e22130, Jan 2020.

EINAT, H.; EZER, I.; KARA, N. Z.; BELZUNG, C. Individual responses of rodents in modelling of affective disorders and in their treatment: prospective review. **Acta Neuropsychiatr**, 30, n. 6, p. 323-333, Dec 2018.

ELLENBROEK, B. A.; COOLS, A. R. Early maternal deprivation and prepulse inhibition: The role of the postdeprivation environment. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 73, p. 177-184, 2002.

ELLENBROEK, B. A.; DERKS, N.; PARK, H. J. Early maternal deprivation retards neurodevelopment in Wistar rats. **Stress**, 8, n. 4, p. 247-257, Dec 2005.

ELLENBROEK, B. A.; VAN DEN KROONENBERG, P. T.; COOLS, A. R. The effects of an early stressful life event on sensorimotor gating in adult rats. **Schizophr Res**, 30, n. 3, p. 251-260, Apr 10 1998.

ELLENBROEK, B. A.; VAN DEN KROONENBERG, P. T. J. M.; COOLS, A. R. The effects of an early stressful life event on sensorimotor gating in adult rats. **Schizophrenia Research**, 30, p. 215-260, 1998.

ENRIQUEZ-CASTILLO, A.; ALAMILLA, J.; BARRAL, J.; GOURBIERE, S. *et al.* Differential effects of caffeine on the antidepressant-like effect of amitriptyline in female rat subpopulations with low and high immobility in the forced swimming test. **Physiol Behav**, 94, n. 3, p. 501-509, Jun 9 2008.

ESPIRITO SANTO, H.; DANIEL, F. B. Calcular e apresentar tamanhos do efeito em trabalhos científicos (1): As limitações do  $p < 0,05$  na análise de diferenças de médias de dois grupos. **Revista Portuguesa de Investigação Comportamental e Social**, 1, n. 1, p. 3-16, 2015.

FIELD, A. P.; GILLETT, R. How to do a meta-analysis. **Br J Math Stat Psychol**, 63, n. Pt 3, p. 665-694, Nov 2010.

FLEMING, A. S.; O'DAY, D. H.; KRAEMER, G. W. Neurobiology of mother-infant interactions: experience and central nervous system plasticity across development and generations. **Neurosci Biobehav Rev**, 23, n. 5, p. 673-685, May 1999.

FOLKMAN, S.; LAZARUS, R. S. If it changes it must be a process: study of emotion and coping during three stages of a college examination. **J Pers Soc Psychol**, 48, n. 1, p. 150-170, Jan 1985.

FRANCIS-OLIVEIRA, J.; SHIEH, I. C.; VILAR HIGA, G. S.; BARBOSA, M. A. *et al.* Maternal Separation induces changes in TREK-1 and 5HT1A expression in brain areas involved in the stress response in a sex-dependent way. **Behav Brain Res**, p. 112909, Sep 16 2020.

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 Sci**, 15, n. 6, p. 1161-1171, Sep 15 1974.

GARCIA-CABRERIZO, R.; LEDESMA-CORVI, S.; BIS-HUMBERT, C.; GARCIA-FUSTER, M. J. Sex differences in the antidepressant-like potential of repeated electroconvulsive seizures in adolescent and adult rats: Regulation of the early stages of hippocampal neurogenesis. **Eur Neuropsychopharmacol**, Nov 4 2020.

GIRARDI, C. E.; ZANTA, N. C.; SUCHECKI, D. Neonatal stress-induced affective changes in adolescent Wistar rats: early signs of schizophrenia-like behavior. **Front Behav Neurosci**, 8, p. 319, 2014.

GLOMBIK, K.; SLUSARCZYK, J.; TROJAN, E.; CHAMERA, K. *et al.* Regulation of insulin receptor phosphorylation in the brains of prenatally stressed rats: New insight into the benefits of antidepressant drug treatment. **Eur Neuropsychopharmacol**, 27, n. 2, p. 120-131, Feb 2017.

GOBINATH, A. R.; WORKMAN, J. L.; CHOW, C.; LIEBLICH, S. E. *et al.* Maternal postpartum corticosterone and fluoxetine differentially affect adult male and female offspring on anxiety-like behavior, stress reactivity, and hippocampal neurogenesis. **Neuropharmacology**, 101, p. 165-178, Feb 2016.

GODOY, L. D.; UMEOKA, E. H. L.; RIBEIRO, D. E.; SANTOS, V. R. *et al.* Multimodal early-life stress induces biological changes associated to psychopathologies. **Horm Behav**, 100, p. 69-80, Apr 2018.

GOLDSTEIN, B. J.; GOODNICK, P. J. Selective serotonin reuptake inhibitors in the treatment of affective disorders--III. Tolerability, safety and pharmacoeconomics. **J Psychopharmacol**, 12, n. 3 Suppl B, p. S55-87, 1998.

GORE-LANGTON, J. K.; WERNER, D. F.; SPEAR, L. P. The Effects of Age, Sex, and Handling on Behavioral Parameters in the Multivariate Concentric Square Field(TM) Test. **Physiol Behav**, p. 113243, Nov 4 2020.

GOTZSCHE, P. C.; DINNAGE, O. What have antidepressants been tested for? A systematic review. **Int J Risk Saf Med**, May 21 2020.

GREINER, E. M.; PETROVICH, G. D. The effects of novelty on food consumption in male and female rats. **Physiol Behav**, 223, p. 112970, Sep 1 2020.

GRIEBEL, G.; SIMIAND, J.; SERRADEIL-LE GAL, C.; WAGNON, J. *et al.* Anxiolytic- and antidepressant-like effects of the non-peptide vasopressin V1b receptor antagonist, SSR149415, suggest an innovative approach for the treatment of stress-related disorders. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 99, n. 9, p. 6370-6375, Apr 30 2002.

GURURAJAN, A.; REIF, A.; CRYAN, J. F.; SLATTERY, D. A. The future of rodent models in depression research. **Nat Rev Neurosci**, 20, n. 11, p. 686-701, Nov 2019.

GUTIERREZ-GARCIA, A. G.; CONTRERAS, C. M.; MENDOZA-LOPEZ, M. R.; GARCIA-BARRADAS, O. *et al.* Urine from stressed rats increases immobility in receptor rats forced to swim: role of 2-heptanone. **Physiol Behav**, 91, n. 1, p. 166-172, May 16 2007.

HAGG, D.; BRENNER, P.; REUTFORS, J.; LI, G. *et al.* A register-based approach to identifying treatment-resistant depression-Comparison with clinical definitions. **PLoS One**, 15, n. 7, p. e0236434, 2020.

HAMON, M.; BOURGOIN, S. Pharmacological profile of antidepressants: a likely basis for their efficacy and side effects? **European Neuropsychopharmacology**, 16, p. S625-S632, 2006.

HARRO, J. Animal models of depression: pros and cons. **Cell Tissue Res**, 377, n. 1, p. 5-20, Jul 2019.

HENN, L.; ZANTA, N. C.; GIRARDI, C. E. N.; SUCHECKI, D. Chronic Escitalopram Treatment Does Not Alter the Effects of Neonatal Stress on Hippocampal BDNF Levels, 5-HT1A Expression and Emotional Behaviour of Male and Female Adolescent Rats. **Molecular Neurobiology**, 2020.

HENNESSY, M. B.; LI, J.; LOWE, E. L.; LEVINE, S. Maternal behavior, pup vocalizations, and pup temperature changes following handling in mice of 2 inbred strains. **Dev Psychobiol**, 13, n. 6, p. 573-584, Nov 1980.

HERVAS, I.; ARTIGAS, F. Effect of fluoxetine on extracellular 5-hydroxytryptamine in rat brain. Role of 5-HT autoreceptors. **Eur J Pharmacol**, 358, n. 1, p. 9-18, Sep 25 1998.

HERZOG, D. P.; BECKMANN, H.; LIEB, K.; RYU, S. *et al.* Understanding and Predicting Antidepressant Response: Using Animal Models to Move Toward Precision Psychiatry. **Front Psychiatry**, 9, p. 512, 2018.



HIGGINS, J. P.; THOMPSON, S. G.; DEEKS, J. J.; ALTMAN, D. G. Measuring inconsistency in meta-analyses. **BMJ**, 327, n. 7414, p. 557-560, Sep 6 2003.

HILLHOUSE, T. M.; PORTER, J. H. A brief history of the development of antidepressant drugs: from monoamines to glutamate. **Exp Clin Psychopharmacol**, 23, n. 1, p. 1-21, Feb 2015.

HODES, G. E.; EPPERSON, C. N. Sex Differences in Vulnerability and Resilience to Stress Across the Life Span. **Biol Psychiatry**, 86, n. 6, p. 421-432, Sep 15 2019.

HUIZINK, A. C.; MULDER, E. J.; BUITELAAR, J. K. Prenatal stress and risk for psychopathology: specific effects or induction of general susceptibility? **Psychol Bull**, 130, n. 1, p. 115-142, Jan 2004.

IRWIN, S. Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. **Psychopharmacologia**, 13, n. 3, p. 222-257, Sep 20 1968.

JACKSON, S. J.; AUTHIER, S.; BROHMANN, H.; GOODY, S. M. G. *et al.* Neurofunctional test batteries in safety pharmacology - Current and emerging considerations for the drug development process. **J Pharmacol Toxicol Methods**, 100, p. 106602, Nov - Dec 2019.

JANETSIAN-FRITZ, S. S.; TIMME, N. M.; TIMM, M. M.; MCCANE, A. M. *et al.* Maternal deprivation induces alterations in cognitive and cortical function in adulthood. **Transl Psychiatry**, 8, n. 1, p. 71, Mar 27 2018.

JOHNSTON, J. P. Some observations upon a new inhibitor of monoamine oxidase in brain tissue. **Biochemical Pharmacology**, 17, n. 7, p. 1285-1297, 1968.

KAZAVCHINSKY, L.; DAHAN, S.; EINAT, H. Exploring test batteries for depression- and anxiety-like behaviours in female and male ICR and black Swiss mice. **Acta Neuropsychiatr**, p. 1-10, May 7 2020.

KENDLER, K. S.; THORNTON, L. M.; GARDNER, C. O. Stressful life events and previous episodes in the etiology of major depression in women: an evaluation of the "kindling" hypothesis. **Am J Psychiatry**, 157, n. 8, p. 1243-1251, Aug 2000.

KOKRAS, N.; ANTONIOU, K.; MIKAIL, H. G.; KAFETZOPOULOS, V. *et al.* Forced swim test: What about females? **Neuropharmacology**, 99, p. 408-421, Dec 2015.

KOKRAS, N.; DALLA, C. Sex differences in animal models of psychiatric disorders. **Br J Pharmacol**, 171, n. 20, p. 4595-4619, Oct 2014.

KOOLHAAS, J. M.; BARTOLOMUCCI, A.; BUWALDA, B.; DE BOER, S. F. *et al.* Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept. **Neurosci Biobehav Rev**, 35, n. 5, p. 1291-1301, Apr 2011.

KOTT, J. M.; MOONEY-LEBER, S. M.; LI, J.; BRUMMELTE, S. Elevated stress hormone levels and antidepressant treatment starting before pregnancy affect maternal care and litter characteristics in an animal model of depression. **Behav Brain Res**, 348, p. 101-114, Aug 1 2018.

KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. Animal models of depression: molecular perspectives. **Curr Top Behav Neurosci**, 7, p. 121-147, 2011.

KUHN, C. M.; SCHANBERG, S. M. Responses to maternal separation: mechanisms and mediators **Int J Dev Neurosci**, 16, p. 261-270, 1998.

KUHN, R. [Treatment of depressive states with an iminodibenzyl derivative (G 22355)]. **Schweiz Med Wochenschr**, 87, n. 35-36, p. 1135-1140, Aug 31 1957.

LAGES, Y. V. M.; ROSSI, A. D.; KRAHE, T. E.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Effect of chronic unpredictable mild stress on the expression profile of serotonin receptors in rats and mice: a meta-analysis. **Neurosci Biobehav Rev**, Jan 29 2021.

LAKENS, D. Calculating and reporting effect sizes to facilitate cumulative science: a practical primer for t-tests and ANOVAs. **Front Psychol**, 4, p. 863, Nov 26 2013.

LAKENS, D.; ADOLFI, F. G.; ALBERS, C. J.; ANVARI, F. *et al.* Justify your alpha. **Nature Human Behaviour**, 2, n. 3, p. 168-171, 2018.

LAZARUS, R. S. The psychology of stress and coping. **Issues Ment Health Nurs**, 7, n. 1-4, p. 399-418, 1985.

LE POUL, E.; LAARIS, N.; DOUCET, E.; LAPORTE, A. *et al.* Early desensitization of somato dendritic 5 HT 1A autoreceptors in rats treated with fluoxetine or paroxetine. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol** 352, p. 141-148, 1995.

LEVINE, S. Infantile experience and resistance to physiological stress. **Science**, 126, n. 3270, p. 405, Aug 30 1957.

LEVINE, S.; HUCTION, D. M.; WIENER, S. G.; ROSENFELD, P. Time course of the effect of maternal deprivation on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the infant rat. **Developmental Psychobiology**, 24, n. 8, p. 547-558, 1991.

LEVINSTEIN, M. R.; SAMUELS, B. A. Mechanisms underlying the antidepressant response and treatment resistance. **Front Behav Neurosci**, 8, p. 208, 2014.

LI, X.; WU, T.; YU, Z.; LI, T. *et al.* Apocynum venetum leaf extract reverses depressive-like behaviors in chronically stressed rats by inhibiting oxidative stress and apoptosis. **Biomed Pharmacother**, 100, p. 394-406, Apr 2018.

LI, Y.; YAN, J.; ZHU, X.; ZHU, Y. *et al.* Dilated Virchow-Robin spaces in the hippocampus impact behaviors and effects of anti-depressant treatment in model of depressed rats. **J Affect Disord**, 219, p. 17-24, Sep 2017.

LIMON-MORALES, O.; SORIA-FREGOZO, C.; ARTEAGA-SILVA, M.; VAZQUEZ-PALACIOS, G. *et al.* Altered expression of 5-HT1A receptors in adult rats induced by neonatal treatment with clomipramine. **Physiol Behav**, 124, p. 37-44, Jan 30 2014.

LIU, D.; DIORIO, J.; DAY, J. C.; FRANCIS, D. D. *et al.* Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. **Nat Neurosci**, 3, n. 8, p. 799-806, Aug 2000.

LLORENTE-BERZAL, A.; FUENTES, S.; GAGLIANO, H.; LOPEZ-GALLARDO, M. *et al.* Sex-dependent effects of maternal deprivation and adolescent cannabinoid treatment on adult rat behaviour. **Addict Biol**, 16, n. 4, p. 624-637, Oct 2011.

LOPIZZO, N.; MAZZELLI, M.; ZONCA, V.; BEGNI, V. *et al.* Alterations in 'inflammatory' pathways in the rat prefrontal cortex as early biological predictors of the long-term negative consequences of exposure to stress early in life. **Psychoneuroendocrinology**, 2020.

LU, Y.; HO, C. S.; LIU, X.; CHUA, A. N. *et al.* Chronic administration of fluoxetine and pro-inflammatory cytokine change in a rat model of depression. **PLoS One**, 12, n. 10, p. e0186700, 2017.

MACCARI, S.; KRUGERS, H. J.; MORLEY-FLETCHER, S.; SZYF, M. *et al.* The consequences of early-life adversity: neurobiological, behavioural and epigenetic adaptations. **J Neuroendocrinol**, 26, n. 10, p. 707-723, Oct 2014.

MACLEOD, M. R.; LAWSON MCLEAN, A.; KYRIAKOPOULOU, A.; SERGHIOU, S. *et al.* Risk of Bias in Reports of In Vivo Research: A Focus for Improvement. **PLoS Biol**, 13, n. 10, p. e1002273, Oct 2015.

MAGARINOS, A. M.; MCEWEN, B. S.; FLUGGE, G.; FUCHS, E. Chronic psychosocial stress causes apical dendritic atrophy of hippocampal CA3 pyramidal neurons in subordinate tree shrews. **J Neurosci**, 16, n. 10, p. 3534-3540, May 15 1996.

MAHMOUD, R.; WAINWRIGHT, S. R.; CHAITON, J. A.; LIEBLICH, S. E. *et al.* Ovarian hormones, but not fluoxetine, impart resilience within a chronic unpredictable stress model in middle-aged female rats. **Neuropharmacology**, 107, p. 278-293, Aug 2016.

MANIAM, J.; ANTONIADIS, C. P.; YOUNGSON, N. A.; SINHA, J. K. *et al.* Sugar Consumption Produces Effects Similar to Early Life Stress Exposure on Hippocampal Markers of Neurogenesis and Stress Response. **Front Mol Neurosci**, 8, p. 86, 2015.

MARCO, E. M.; LLORENTE, R.; LOPEZ-GALLARDO, M.; MELA, V. *et al.* The maternal deprivation animal model revisited. **Neurosci Biobehav Rev**, 51, p. 151-163, Apr 2015.

MARCO, E. M.; VALERO, M.; DE LA SERNA, O.; AISA, B. *et al.* Maternal deprivation effects on brain plasticity and recognition memory in adolescent male and female rats. **Neuropharmacology**, 68, p. 223-231, May 2013.

MARTINS, M. E. G. **INTRODUÇÃO À PROBABILIDADE E À ESTATÍSTICA** Sociedade Portuguesa de Estatística, Junho de 2005 2005. 972-8890-03-6.

MASROUR, F. F.; PEERI, M.; AZARBAYJANI, M. A.; HOSSEINI, M. J. Voluntary Exercise During Adolescence Mitigated Negative the Effects of Maternal Separation Stress on the Depressive-Like Behaviors of Adult Male Rats: Role of NMDA Receptors. **Neurochem Res**, 43, n. 5, p. 1067-1074, May 2018.

MATTHEWS, K.; CHRISTMAS, D.; SWAN, J.; SORRELL, E. Animal models of depression: navigating through the clinical fog. **Neurosci Biobehav Rev**, 29, n. 4-5, p. 503-513, 2005.

MATTHEWS, K.; HALL, F. S.; WILKINSON, L. S.; ROBBINS, T. W. Retarded acquisition and reduced expression of conditioned locomotor activity in adult rats following repeated early maternal separation: effects of prefeeding, d-amphetamine, dopamine antagonists and clonidine. **Psychopharmacology (Berl)**, 126, n. 1, p. 75-84, Jul 1996.

MAXIMINO, C.; VAN DER STAAY, F. J. Behavioral models in psychopathology: epistemic and semantic considerations. **Behav Brain Funct**, 15, n. 1, p. 1, Mar 1 2019.

MCEWEN, B. S. Stress and hippocampal plasticity. **Annu Rev Neurosci**, 22, p. 105-122, 1999.

MCEWEN, B. S. The Brain on Stress: Toward an Integrative Approach to Brain, Body, and Behavior. **Perspect Psychol Sci**, 8, n. 6, p. 673-675, Nov 2013.

MCEWEN, B. S. Neurobiological and Systemic Effects of Chronic Stress. **Chronic Stress (Thousand Oaks)**, 1, Jan-Dec 2017.

MCEWEN, B. S. What Is the Confusion With Cortisol? **Chronic Stress (Thousand Oaks)**, 3, Jan-Dec 2019.

MCEWEN, B. S.; AKIL, H. Revisiting the Stress Concept: Implications for Affective Disorders. **J Neurosci**, 40, n. 1, p. 12-21, Jan 2 2020.

MEANEY, M. J.; VIAU, V.; BHATNAGAR, S.; BETITO, K. *et al.* Cellular mechanisms underlying the development and expression of individual differences in the hypothalamic-pituitary-adrenal stress response. **J Steroid Biochem Mol Biol**, 39, n. 2, p. 265-274, Aug 1991.

MEZADRI, T. J.; BATISTA, G. M.; PORTES, A. C.; MARINO-NETO, J. *et al.* Repeated rat-forced swim test: reducing the number of animals to evaluate gradual effects of antidepressants. **J Neurosci Methods**, 195, n. 2, p. 200-205, Feb 15 2011.

MIRAGAIA, A. S.; DE OLIVEIRA WERTHEIMER, G. S.; CONSOLI, A. C.; CABBIA, R. *et al.* Maternal Deprivation Increases Anxiety- and Depressive-Like Behaviors in an Age-Dependent Fashion and Reduces Neuropeptide Y Expression in the Amygdala and Hippocampus of Male and Female Young Adult Rats. **Front Behav Neurosci**, 12, p. 159, 2018.

MODA-SAVA, R. N.; MURDOCK, M. H.; PAREKH, P. K.; FETCHO, R. N. *et al.* Sustained rescue of prefrontal circuit dysfunction by antidepressant-induced spine formation. **Science**, 364, n. 6436, Apr 12 2019.

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

MORRISON, K. E. Animal models built for women's brain health: progress and potential. **Front Neuroendocrinol**, p. 100872, Sep 19 2020.

MORRISSETTE, D. A.; STAHL, S. M. Modulating the serotonin system in the treatment of major depressive disorder. **CNS Spectr**, 19 Suppl 1, p. 57-67; quiz 54-57, 68, Dec 2014.

MULLER, J. C.; PRYOR, W. W.; GIBBONS, J. E.; ORGAIN, E. S. Depression and anxiety occurring during Rauwolfia therapy. **J Am Med Assoc**, 159, n. 9, p. 836-839, Oct 29 1955.

MUNAFÒ, M. R.; NOSEK, B. A.; BISHOP, D. V. M.; BUTTON, K. S. *et al.* A manifesto for reproducible science. **Nature Human Behaviour**, 1, n. 1, 2017.

NAKAGAWA, S.; CUTHILL, I. C. Effect size, confidence interval and statistical significance: a practical guide for biologists. **Biol Rev Camb Philos Soc**, 82, n. 4, p. 591-605, Nov 2007.

NESTLER, E. J.; HYMAN, S. E. Animal models of neuropsychiatric disorders. **Nat Neurosci**, 13, n. 10, p. 1161-1169, Oct 2010.

OLBERT, C. M.; RASMUSSEN, A.; GALA, G. J.; TUPLER, L. A. Treatment outcome variation between depression symptom combinations in the STAR\*D study. **J Affect Disord**, 201, p. 1-7, Sep 1 2016.

OVERGAARD, A.; LIEBLICH, S. E.; RICHARDSON, R.; GALEA, L. A. M. *et al.* Paroxetine blunts the corticosterone response to swim-induced stress and increases depressive-like behavior in a rat model of postpartum depression. **Psychoneuroendocrinology**, 89, p. 223-228, Mar 2018.

PARK, S. W.; SEO, M. K.; LEE, J. G.; HIEN, L. T. *et al.* Effects of maternal separation and antidepressant drug on epigenetic regulation of the brain-derived neurotrophic factor exon I promoter in the adult rat hippocampus. **Psychiatry Clin Neurosci**, 72, n. 4, p. 255-265, Apr 2018.

PAYLOR, R.; SPENCER, C. M.; YUVA-PAYLOR, L. A.; PIEKE-DAHL, S. The use of behavioral test batteries, II: effect of test interval. **Physiol Behav**, 87, n. 1, p. 95-102, Jan 30 2006.

PEREIRA, V. S.; JOCA, S. R. L.; HARVEY, B. H.; ELFVING, B. *et al.* Esketamine and Rapastinel, but not Imipramine, have antidepressant-like effect in a treatment-resistant animal model of depression. **Acta Neuropsychiatr**, p. 1-23, Jun 24 2019.

PLETSCHER, A.; SHORE, P. A.; BRODIE, B. B. Serotonin as a mediator of reserpine action in brain. **J Pharmacol Exp Ther**, 116, n. 1, p. 84-89, Jan 1956.

PORSOLT, R. D. Historical perspective on CMS model. **Psychopharmacology (Berl)**, 134, n. 4, p. 363-364; discussion 371-367, Dec 1997.

PRYCE, C. R.; FELDON, J. Long-term neurobehavioural impact of the postnatal environment in rats: manipulations, effects and mediating mechanisms. **Neurosci Biobehav Rev**, 27, n. 1-2, p. 57-71, Jan-Mar 2003.

R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. R Foundation for Statistical Computing, 2019.

RACAGNI, G.; POPOLI, M. Cellular and molecular mechanisms in the long-term action of antidepressants. **Dialogues Clin Neurosci**, 10, n. 4, p. 385-400, 2008.

RAMOS-HRYB, A. B.; BAHOR, Z.; MCCANN, S.; SENA, E. *et al.* Protocol for a systematic review and meta-analysis of data from preclinical studies employing forced swimming test: an update. **BMJ Open Science**, 3, n. 1, 2019.

RECAMIER-CARBALLO, S.; ESTRADA-CAMARENA, E.; REYES, R.; FERNANDEZ-GUASTI, A. Synergistic effect of estradiol and fluoxetine in young adult and middle-aged female rats in two models of experimental depression. **Behav Brain Res**, 233, n. 2, p. 351-358, Aug 1 2012.

RINCON-CORTES, M.; HERMAN, J. P.; LUPIEN, S.; MAGUIRE, J. *et al.* Stress: Influence of sex, reproductive status and gender. **Neurobiol Stress**, 10, p. 100155, Feb 2019.

ROBINSON, E. Psychopharmacology: From serendipitous discoveries to rationale design, but what next? **Brain and Neuroscience Advances**, 2, 2018.

ROSS, J. F. ECOs, FOBs, and UFOs: making sense of observational data. **Toxicol Pathol**, 28, n. 1, p. 132-136, Jan-Feb 2000.

RUBERTO, V. L.; JHA, M. K.; MURROUGH, J. W. Pharmacological Treatments for Patients with Treatment-Resistant Depression. **Pharmaceuticals (Basel)**, 13, n. 6, Jun 4 2020.

RUSSO, S. J.; CHARNEY, D. S. Next generation antidepressants. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 110, n. 12, p. 4441-4442, Mar 19 2013.

SANTARELLI, L.; SAXE, M.; GROSS, C.; SURGET, A. *et al.* Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. **Science**, 301, n. 5634, p. 805-809, Aug 8 2003.

SAWILOWSKY, S. S. New Effect Size Rules of Thumb. **Journal of Modern Applied Statistical Methods**, 8, n. 2, p. 597-599, 2009.

SCHAPIRO, S.; GELLER, E.; EIDUSON, S. Neonatal adrenal cortical response to stress and vasopressin. **Proc Soc Exp Biol Med**, 109, p. 937-941, Apr 1962.

SCHILDKRAUT, J. J. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. **Am J Psychiatry**, 122, n. 5, p. 509-522, Nov 1965.

SCHILDKRAUT, J. J.; KETY, S. S. Biogenic amines and emotion. **Science**, 156, n. 3771, p. 21-37, Apr 7 1967.

SCHLEIMER, S. B.; JOHNSTON, G. A.; HENDERSON, J. M. Novel oral drug administration in an animal model of neuroleptic therapy. **J Neurosci Methods**, 146, n. 2, p. 159-164, Aug 15 2005.

SCHMIDT, M.; BRAUN, K.; BRANDWEIN, C.; ROSSETTI, A. C. *et al.* Maternal stress during pregnancy induces depressive-like behavior only in female offspring and correlates to their hippocampal Avp and Oxt receptor expression. **Behav Brain Res**, 353, p. 1-10, Nov 1 2018.

SCHMIDT, M. V.; WANG, X. D.; MEIJER, O. C. Early life stress paradigms in rodents: potential animal models of depression? **Psychopharmacology (Berl)**, 214, n. 1, p. 131-140, Mar 2011.

SCHNEIDER, J.; PATTERSON, M.; JIMENEZ, X. F. Beyond depression: Other uses for tricyclic antidepressants. **Cleve Clin J Med**, 86, n. 12, p. 807-814, Dec 2019.

SCHWARZER, G. meta: An R Package for Meta-Analysis. **R News**, 7, p. 40-45, 2007.

SENA, E. S.; CURRIE, G. L.; MCCANN, S. K.; MACLEOD, M. R. *et al.* Systematic reviews and meta-analysis of preclinical studies: why perform them and how to appraise them critically. **J Cereb Blood Flow Metab**, 34, n. 5, p. 737-742, May 2014.

SEQUEIRA-CORDERO, A.; MORA-GALLEGOS, A.; CUENCA-BERGER, P.; FORNAGUERA-TRIAS, J. Individual differences in the forced swimming test and neurochemical kinetics in the rat brain. **Physiol Behav**, 128, p. 60-69, Apr 10 2014.

SHARP, T.; BARNES, N. M. Central 5-HT receptors and their function; present and future. **Neuropharmacology**, p. 108155, Jun 6 2020.

SHAW, R. C.; SCHMELZ, M. Cognitive test batteries in animal cognition research: evaluating the past, present and future of comparative psychometrics. **Anim Cogn**, 20, n. 6, p. 1003-1018, Nov 2017.

SICKMANN, H. M.; ARENTZEN, T. S.; DYRBY, T. B.; PLATH, N. *et al.* Prenatal stress produces sex-specific changes in depression-like behavior in rats: implications for increased vulnerability in females. **J Dev Orig Health Dis**, 6, n. 5, p. 462-474, Oct 2015.

SILBERMAN, D. M.; ACOSTA, G. B.; ZORRILLA ZUBILETE, M. A. Long-term effects of early life stress exposure: Role of epigenetic mechanisms. **Pharmacol Res**, 109, p. 64-73, Jul 2016.



SINCLAIR, E. B.; HILDEBRANDT, B. A.; CULBERT, K. M.; KLUMP, K. L. *et al.* Preliminary evidence of sex differences in behavioral and neural responses to palatable food reward in rats. **Physiol Behav**, 176, p. 165-173, Jul 1 2017.

SLATTERY, D. A.; CRYAN, J. F. Modelling depression in animals: at the interface of reward and stress pathways. **Psychopharmacology (Berl)**, 234, n. 9-10, p. 1451-1465, May 2017.

SONG, Y.; SUN, R.; JI, Z.; LI, X. *et al.* Perilla aldehyde attenuates CUMS-induced depressive-like behaviors via regulating TXNIP/TRX/NLRP3 pathway in rats. **Life Sci**, 206, p. 117-124, Aug 1 2018.

SOUSA, N.; ALMEIDA, O. F. Corticosteroids: sculptors of the hippocampal formation. **Rev Neurosci**, 13, n. 1, p. 59-84, 2002.

SOUSA, N.; MADEIRA, M. D.; PAULA-BARBOSA, M. M. Effects of corticosterone treatment and rehabilitation on the hippocampal formation of neonatal and adult rats. An unbiased stereological study. **Brain Res**, 794, n. 2, p. 199-210, Jun 1 1998.

STANTON, M. E.; GUTIERREZ, Y. R.; LEVINE, S. Maternal deprivation potentiates pituitary-adrenal stress responses in infant rats. **Behav Neurosci**, 102, n. 5, p. 692-700, Oct 1988.

STEDENFELD, K. A.; CLINTON, S. M.; KERMAN, I. A.; AKIL, H. *et al.* Novelty-seeking behavior predicts vulnerability in a rodent model of depression. **Physiol Behav**, 103, n. 2, p. 210-216, May 3 2011.

SUCHECKI, D.; MOZAFFARIAN, D.; GROSS, G.; ROSENFELD, P. *et al.* Effects of maternal deprivation on the ACTH stress response in the infant rat. **Neuroendocrinology**, 57, n. 2, p. 204-212, 1993.

SULSER, F.; BICKEL, M. H.; BRODIE, B. B. THE ACTION OF DESMETHYLIMIPRAMINE IN COUNTERACTING SEDATION AND CHOLINERGIC EFFECTS OF RESERPINE-LIKE DRUGS. **J Pharmacol Exp Ther**, 144, p. 321 - 330, 1964.

SULSER, F.; SOROKO, F. On the role of rate of brain norepinephrine release in the antibenzoquinolizine action of desipramine. **Psychopharmacologia**, 8, n. 3, p. 191-200, Sep 6 1965.

SUMAN, P. R. Privação maternal e a resposta a antidepressivos em ratos machos e fêmeas. OSF 2020.

SUMAN, P. R.; ZERBINATTI, N.; THEINDL, L. C.; DOMINGUES, K. *et al.* Failure to detect the action of antidepressants in the forced swim test in Swiss mice. **Acta Neuropsychiatr**, 30, n. 3, p. 158-167, Jun 2018.

TAKATSU-COLEMAN, A. L.; PATTI, C. L.; ZANIN, K. A.; ZAGER, A. *et al.* Short-term social isolation induces depressive-like behaviour and reinstates the retrieval of an aversive task: mood-congruent memory in male mice? **J Psychiatry Neurosci**, 38, n. 4, p. 259-268, Jul 2013.

TALAROWSKA, M. Epigenetic Mechanisms in the Neurodevelopmental Theory of Depression. **Depress Res Treat**, 2020, p. 6357873, 2020.

VAN OERS, H. J.; DE KLOET, E. R.; LEVINE, S. Persistent effects of maternal deprivation on HPA regulation can be reversed by feeding and stroking, but not by dexamethasone. **J Neuroendocrinol**, 11, n. 8, p. 581-588, Aug 1999.

VÁZQUEZ, D. M.; ESKANDARI, R.; ZIMMER, C. A.; LEVINE, S. *et al.* Brain 5-HT receptor system in the stressed infant rat implications for vulnerability to substance abuse. **Psychoneuroendocrinology**, 27, p. 245-272, 2002.

VÁZQUEZ, D. M.; LÓPEZ, J. F.; VAN HOERS, H.; WATSON, S. J. *et al.* Maternal deprivation regulates serotonin 1A and 2A receptors in the infant rat. **Brain Research**, 855, n. 1, p. 76-82, 2000.

VIVEROS, M. P.; DIAZ, F.; MATEOS, B.; RODRIGUEZ, N. *et al.* Maternal deprivation induces a rapid decline in circulating leptin levels and sexually dimorphic modifications in hypothalamic trophic factors and cell turnover. **Horm Behav**, 57, n. 4-5, p. 405-414, Apr 2010.

WANG, Q.; TIMBERLAKE, M. A., 2nd; PRALL, K.; DWIVEDI, Y. The recent progress in animal models of depression. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, 77, p. 99-109, Jul 3 2017.

WHISKEY, E.; TAYLOR, D. A review of the adverse effects and safety of noradrenergic antidepressants. **J Psychopharmacol**, 27, n. 8, p. 732-739, Aug 2013.

WILLNER, P. Animal models of depression: An overview. **Pharmacology & Therapeutics**, 45, n. 3, p. 425-455, 1990.

WILLNER, P. The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage. **Neurobiol Stress**, 6, p. 78-93, Feb 2017.

WILLNER, P.; BELZUNG, C. Treatment-resistant depression: are animal models of depression fit for purpose? **Psychopharmacology (Berl)**, 232, n. 19, p. 3473-3495, Oct 2015.

WILLNER, P.; SCHEEL-KRUGER, J.; BELZUNG, C. The neurobiology of depression and antidepressant action. **Neurosci Biobehav Rev**, 37, n. 10 Pt 1, p. 2331-2371, Dec 2013.

WILLNER, P.; SCHEEL-KRUGER, J.; BELZUNG, C. Resistance to antidepressant drugs: the case for a more predisposition-based and less hippocampocentric research paradigm. **Behav Pharmacol**, 25, n. 5-6, p. 352-371, Sep 2014.

WORKMAN, J. L.; GOBINATH, A. R.; KITAY, N. F.; CHOW, C. *et al.* Parity modifies the effects of fluoxetine and corticosterone on behavior, stress reactivity, and hippocampal neurogenesis. **Neuropharmacology**, 105, p. 443-453, Jun 2016.

XING, Y.; HE, J.; HOU, J.; LIN, F. *et al.* Gender differences in CMS and the effects of antidepressant venlafaxine in rats. **Neurochem Int**, 63, n. 6, p. 570-575, Nov 2013.

YANO, K.; MATSUZAKI, T.; IWASA, T.; MAYILA, Y. *et al.* The influence of psychological stress in early life on sexual maturation and sexual behavior in male and female rats. **Reproductive Medicine and Biology**, 2019.

YOUDIM, M. B.; EDMONDSON, D.; TIPTON, K. F. The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. **Nat Rev Neurosci**, 7, n. 4, p. 295-309, Apr 2006.

ZELLER, E. A.; BARSKY, J. In vivo inhibition of liver and brain monoamine oxidase by 1-Isonicotinyl-2-isopropyl hydrazine. **Proc Soc Exp Biol Med**, 81, n. 2, p. 459-461, Nov 1952.

ZHANG, Y.; WANG, Y.; WANG, L.; BAI, M. *et al.* Dopamine Receptor D2 and Associated microRNAs Are Involved in Stress Susceptibility and Resistance to Escitalopram Treatment. **Int J Neuropsychopharmacol**, 18, n. 8, Mar 3 2015.

ZHAO, X.; HUANG, Y.; LI, J.; MA, H. *et al.* Association between the 5-HT1A receptor gene polymorphism (rs6295) and antidepressants: a meta-analysis. **Int Clin Psychopharmacol**, 27, n. 6, p. 314-320, Nov 2012.

ZHOU, Z.; ROY, A.; LIPSKY, R.; KUCHIPUDI, K. *et al.* Haplotype-based linkage of tryptophan hydroxylase 2 to suicide attempt, major depression, and cerebrospinal fluid 5-hydroxyindoleacetic acid in 4 populations. **Arch Gen Psychiatry**, 62, n. 10, p. 1109-1118, Oct 2005.

ZOUBOVSKY, S. P.; HOSEUS, S.; TUMUKUNTALA, S.; SCHULKIN, J. O. *et al.* Chronic psychosocial stress during pregnancy affects maternal behavior and neuroendocrine function and modulates hypothalamic CRH and nuclear steroid receptor expression. **Transl Psychiatry**, 10, n. 1, p. 6, Jan 16 2020.