

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINE MANEIRA

TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA MODIFICADO: COMPARAÇÃO ENTRE AS  
DIFERENTES FORMAS DE ANÁLISE UTILIZADAS

CURITIBA

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINE MANEIRA

TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA MODIFICADO: COMPARAÇÃO ENTRE AS  
DIFERENTES FORMAS DE ANÁLISE UTILIZADAS

Trabalho apresentado como requisito à  
obtenção do grau de Biomédico no curso de  
graduação de Biomedicina, Setor de  
Ciências Biológicas da Universidade Federal  
do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Maria A. B. F. Vital

CURITIBA

2014

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais, Vilson e Sandra, por estarem sempre ao meu lado, me apoiando e me dando forças para continuar. Sem vocês não chegaria até aqui.

Obrigada por todo carinho, incentivo e paciência.

Ao meu namorado, Leonardo, por toda paciência e todo apoio que sempre demonstrou com tanto amor.

As colegas de laboratório, Ronise e Taysa, por toda ajuda. Agradeço por terem disponibilizado seu tempo para me ensinar e me auxiliar sempre que precisei.

Aos funcionários do setor de farmacologia, em especial a Silvia, pelo auxílio e ensinamentos.

A minha orientadora Maria Vital, pela orientação, paciência e incentivo.

*"Quando uma criatura humana desperta para um grande sonho e sobre ele lança toda a força de sua alma, todo o universo conspira a seu favor".*

*Johann Goethe*

## RESUMO

A depressão é um problema de saúde mundial que afeta a sociedade como um todo. Modelos animais preditivos para a ação de antidepressivos têm sido extensivamente utilizados no desenvolvimento de novos compostos terapêuticos e para o entendimento dos substratos neurais envolvidos no comportamento depressivo. O modelo mais utilizado é o teste de natação forçada, na sua forma modificada. Duas maneiras de analisar os comportamentos executados neste teste vem sendo utilizadas, por frequência e por tempo. A fim de comparar esses métodos de análise, o presente estudo realizou o teste de natação forçada modificado, utilizando antidepressivos (imipramina, fluoxetina e reboxetina) com ações já conhecidas. Os resultados de ambas as formas de análise foram comparados sob a forma de porcentagem, mostrando que independente do método utilizado, o padrão comportamental e o resultado final será o mesmo. Assim, o teste se mostra reproduzível entre laboratórios, mesmo que a análise seja diferente.

Palavras-chave: Depressão. Antidepressivos. Teste de natação forçada. Frequência. Tempo.

## **ABSTRACT**

Depression is a worldwide health problem that affects society as a whole. Animal models predictive of antidepressant action have been used extensively in the development of novel therapeutic compounds and for understanding the neural substrates underlying depressive behavior. The most widely used model is the forced swimming test, in its modified form. Two ways to analyze the behaviors performed in this test has been used, frequency and time. To compare these methods of analysis, the present study performed the modified forced swimming test using antidepressants (imipramine, fluoxetine and reboxetine) with known actions. The results of both types of analysis were compared in the form of percentage, showing that regardless of the method used, the behavioral pattern and the end result is the same. Thus, the test shows reproducible between laboratories, even if the analysis is different.

Keywords: Depression. Antidepressants. Forced swimming test. Frequency. Time.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>7</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>9</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	9
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
<b>3 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>10</b>
<b>4 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>11</b>
4.1 O TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA.....	11
4.2 O TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA MODIFICADO.....	12
4.3 VANTAGENS E DESVANTAGENS DO TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA.....	15
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
5.1 ANIMAIS.....	16
5.2 DROGAS.....	16
5.3 TESTE DO CAMPO ABERTO.....	16
5.4 TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA MODIFICADO.....	17
5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	18
<b>6 RESULTADOS.....</b>	<b>19</b>
6.1 TESTE DO CAMPO ABERTO.....	19
6.2 TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA MODIFICADO.....	19
6.2.1 Análise dos comportamentos por tempo.....	19
6.2.2 Análise dos comportamentos por frequência.....	21
6.2.3 Comparação entre as formas de análise.....	22
<b>7 DISCUSSÃO.....</b>	<b>23</b>
<b>8 CONCLUSÃO.....</b>	<b>25</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>26</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A depressão é uma grave desordem de humor, comum na sociedade moderna (CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2002; KENNEDY, 2006). De acordo com a Organização Mundial da Saúde, a depressão é um problema mental mundial que afeta cerca de 121 milhões de pessoas (ROSENZWEIG-LIPSON et al., 2007). Segundo a "*American Psychiatric Association*", é uma doença heterogênea, uma vez que manifesta sintomas psicológicos, comportamentais e fisiológicos (CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2002; ROSENZWEIG-LIPSON et al., 2007).

Essa desordem tem sérias implicações em termos de qualidade de vida (KENNEDY, 2006; ROSENZWEIG-LIPSON et al., 2007), além de gerar diversos encargos econômicos devido a perda de trabalho e custos com planos de saúde (ROSENZWEIG-LIPSON et al., 2007). Devido a isso, é de extrema importância estudos que visem entender a patologia da doença, bem como a procura por tratamentos mais eficazes.

Existem dois tipos distintos de síndrome depressiva: depressão unipolar, quando as alterações de humor ocorrem sempre na mesma direção, e distúrbio bipolar, no qual a depressão se alterna com mania (NASH; NUTT, 2007; RANG et al., 2011).

Os principais sintomas da depressão unipolar são o humor deprimido ou anedonia (ou seja, a perda de prazer nas atividades diárias normais). Além destes, os pacientes também relatam comprometimento cognitivo (retardo do pensamento e da ação, falta de concentração e perda de memória), pensamentos disfuncionais (sentimento de culpa, inutilidade e ideação suicida), distúrbios do apetite ou mudança de peso, perda da libido e distúrbios do sono (WILLNER et al., 2013).

A causa da depressão continua desconhecida, mas a principal teoria bioquímica que tenta explicar o que leva a depressão é a hipótese das monoaminas, introduzida há quase 50 anos. Essa hipótese diz que a depressão pode ser causada pela transmissão monoaminérgica funcionalmente deficiente (noradrenalina, serotonina e/ou dopamina), em certos locais do cérebro (RANG et

al., 2011; WILLNER; SCHEEL-KRÜGER; BELZUNG, 2013), como no córtex pré-frontal, amígdala e hipocampo (RANG et al., 2011). Outras teorias mais recentes têm sido desenvolvidas para suprir os déficits da teoria monoaminérgica na sua forma simples. Essas teorias recentes envolvem mecanismos neuroendócrinos, efeitos tróficos e neuroplasticidade (JOCA; PADOVAN; GUIMARÃES, 2003; RANG et al., 2011).

Como para a maioria das doenças, o uso de animais é essencial para o desenvolvimento de terapias efetivas. Várias tentativas têm sido feitas para criar modelos animais da depressão ou, pelo menos, que os sintomas depressivos e os critérios para a sua avaliação sejam bem estabelecidos (CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2002; PETIT-DEMOULIERE; CHENU; BOURIN, 2005). Os modelos comumente utilizados são diversos e foram desenvolvidos com base nos comportamentos em consequência do estresse (como o teste de natação forçada), drogas, lesões ou manipulações genéticas (CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2002).

O teste de natação forçada, modelo mais utilizado devido a sua rapidez, facilidade, reprodutibilidade e especificidade, foi o teste que auxiliou na descoberta dos primeiros antidepressivos (PETIT-DEMOULIERE; CHENU; BOURIN, 2005). A maioria das drogas antidepressivas disponíveis atualmente agem através das monoaminas (noradrenalina, dopamina e principalmente serotonina), tentando suprir o déficit destas, como estabelecido na hipótese monoaminérgica (HAMON; BOURGOIN, 2006; NASH; NUTT, 2007).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar se as diferentes formas de análises dos comportamentos no teste de natação forçada, frequência e tempo, geram resultados desiguais.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o comportamento dos animais após a administração de antidepressivos por tempo;
- Avaliar o comportamento dos animais após a administração de antidepressivos por frequência;
- Comparar os resultados obtidos em cada forma de análise;
- Confirmar a reprodutibilidade do teste independente do método de pontuação utilizado.

### **3 JUSTIFICATIVA**

Visto a gravidade da depressão e a prevalência com que afeta a população, torna-se necessário uma boa validação do teste mais utilizado no estudo desta doença. Para os fins a que se destina o teste, ele deve ser reprodutível entre laboratórios. Por isso, é importante analisar se as formas de análise (tempo ou frequência) interferem no resultado do teste.

## 4 REVISÃO DA LITERATURA

### 4.1 O TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA

O teste de natação forçada (TNF) foi originalmente descrito por Porsolt et al. (1977) e é atualmente o modelo animal mais utilizado em laboratórios para se avaliar o potencial de fármacos com atividade antidepressiva (CRYAN; VALENTINO; LUCKI, 2005; CRYAN; PAGE; LUCKI, 2005; MEZADRI et al., 2011). O protocolo desenvolvido por Porsolt et al. (1977) era um novo método comportamental para induzir o estado depressivo em roedores (PETIT-DEMOULIERE; CHENU; BOURIN, 2005; CALIL; MARCONDES, 2006). O teste foi desenvolvido primeiramente em ratos e depois em camundongos, seguindo protocolos um pouco diferenciados,

O procedimento clássico para ratos usa dois dias de protocolo e consiste em colocar o animal em um cilindro com água, a 25°C, em uma profundidade de 15 cm (CALIL; MARCONDES, 2006), sem chance de escape por 15 minutos (chamada sessão pré-teste). 24 horas após essa sessão, o animal é exposto a mesma condição por um período de cinco minutos (chamada sessão teste) (MEZADRI et al., 2011). Quando a sessão começa, o rato nada ativamente e com o passar do tempo sua atividade diminui e se começa a observar a imobilidade (CALIL; MARCONDES, 2006). O pré-teste é considerado então um estressor, uma sessão sensibilizadora, que visa induzir um estado de desespero comportamental, uma vez que os animais tornam-se progressivamente mais imóveis (DETKE; LUCKI, 1996; CRYAN; PAGE; LUCKI, 2005). Essa sensibilização faz com que os animais expostos ao pré-teste apresentem menor tempo de latência para imobilidade, além de permanecerem por mais tempo nesta postura imóvel, quando comparados a ratos que não foram expostos a essa sessão (CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2002; VIEIRA et al., 2008). Em uma segunda exposição, os ratos permanecem imóveis por cerca de 75% dos cinco minutos de teste (PORSOLT et al., 1978; JEFFERYS; FUNDER, 1994; BARROS; FERIGOLO, 1998).

A adoção deste comportamento imóvel é interpretada como um desespero comportamental ou humor depressivo, situação na qual os animais perdem a

vontade de manter o esforço frente a uma situação inevitável (PETIT-DEMOULIERE; CHENU; BOURIN, 2005).

Os animais são julgados imóveis quando fazem somente pequenos movimentos necessários para manter a cabeça fora da água (PORSOLT et al., 1978; BORSINI; MELI, 1988; DETKE; JOHNSON; LUCKI, 1997).

Contudo, se fármacos antidepressivos são administrados entre os períodos de pré-teste e teste (tratamentos subagudos administrados 23,5, cinco e uma hora antes do teste), eles reduzem o tempo de imobilidade na sessão teste, ou seja, fazem com que os ratos permaneçam mais ativos (DETKE; LUCKI, 1996; CRYAN; LUCKI, 2000a; VIEIRA et al., 2008; MEZADRI et al., 2011).

A análise do comportamento do animal é na sessão teste. No protocolo original, se analisa o tempo total de imobilidade durante os 5 minutos de teste (PORSOLT et al., 1978).

O TNF tradicional é sensível as principais classes de drogas antidepressivas (DETKE; LUCKI, 1996). Porém, não é confiável para a detecção de inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) (CRYAN; LUCKI, 2000a, 2000b).

#### 4.2 O TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA MODIFICADO

A fim de aumentar a sensibilidade do TNF para detectar os ISRS, algumas modificações foram feitas (DETKE; RICKELS; LUCKI, 1995; CRYAN; LUCKI, 2000b).

Entre as modificações realizadas está o aumento na profundidade da água, que passou de 15-18 cm para 25-30 cm (CRYAN; VALENTINO; LUCKI, 2005). A altura da água utilizada anteriormente permitia que os ratos encostassem no fundo do cilindro, enquanto que maiores profundidades tornam o rato mais ativo (DETKE; LUCKI, 1996) e não permitem que os animais desenvolvam adaptações comportamentais (CRYAN; VALENTINO; LUCKI, 2005).

Além disso, a técnica de observação também foi modificada, para que uma descrição mais completa dos comportamentos fosse realizada (CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2002). Tradicionalmente somente a imobilidade era pontuada, mas as modificações fizeram com que comportamentos ativos, como natação e escalada, também fosse distinguidos e pontuados (CRYAN; VALENTINO; LUCKI, 2005).

Os comportamentos analisados no TNF modificado estão representados na figura 1 e incluem a imobilidade (quando não há nenhuma atividade adicional além da necessária para manter a cabeça fora da água), natação (movimentos, usualmente horizontais, através do tanque que incluem cruzar os quadrantes do cilindro) e escalada (movimentos das patas dianteiras para cima, usualmente direcionados para as paredes do cilindro) (CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2002; CRYAN; VALENTINO; LUCKI, 2005).

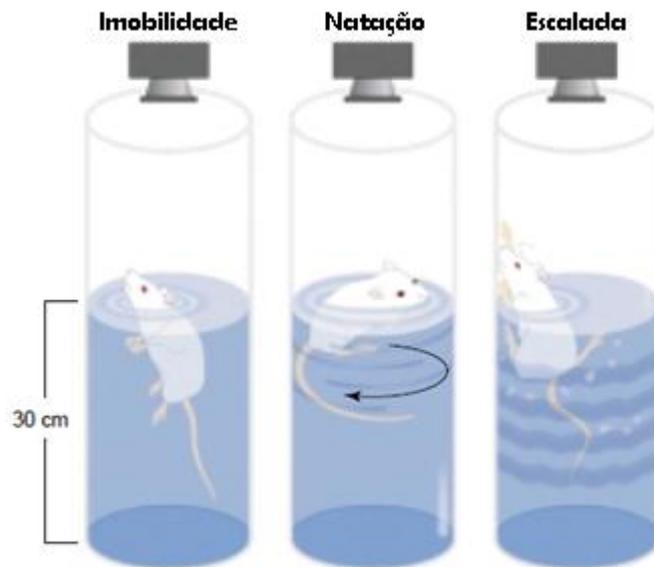


FIGURA 1 - COMPORTAMENTOS NO TNF. Representação dos principais comportamentos que podem ser desenvolvidos quando ratos são expostos a condições específicas no TNF.  
 FONTE: adaptado de CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2002.

Para se avaliar todos os comportamentos ativos, uma nova técnica de análise teve que ser desenvolvida. Ao invés de mensurar a duração total da imobilidade, o novo procedimento analisa a frequência dos comportamentos a cada cinco

segundos (CRYAN; VALENTINO; LUCKI, 2005). Durante toda a sessão teste (300 segundos), os comportamentos proeminentes a cada cinco segundos são pontuados, fechando 60 pontuações.

Após as modificações, os diferentes tipos de antidepressivos foram reavaliados, a fim de se validar as melhorias realizadas (PETIT-DEMOULIERE; CHENU; BOURIN, 2005). O teste modificado demonstrou então que as drogas ISRS e agonistas de receptores 5-HT, como a fluoxetina, atuam reduzindo a imobilidade e aumentando a natação (DETKE; LUCKI, 1996; CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2002; CRYAN; VALENTINO; LUCKI, 2005). Já as drogas com efeitos seletivos na transmissão catecolaminérgica, como a reboxetina, reduzem a imobilidade e aumentam a escalada (CRYAN; PAGE; LUCKI, 2002). Os antidepressivos com efeitos duais, serotoninérgicos e noradrenérgicos, como a imipramina, apresentam um perfil comportamental misturado no TNF modificado (CRYAN; VALENTINO; LUCKI, 2005; CRYAN; PAGE; LUCKI, 2005).

Esses resultados demonstram que o TNF modificado pode ser utilizado para distinguir drogas com efeitos terapêuticos comuns, mas que atuam em sistemas neurotransmissores diferentes (FIGURA 2) (DETKE; LUCKI, 1996).

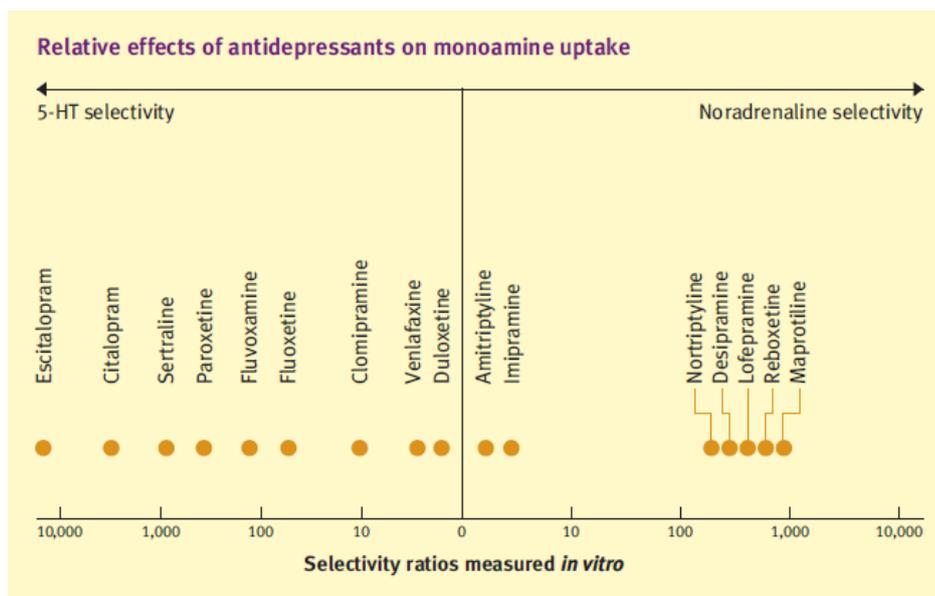


FIGURA 2 - EFEITOS RELATIVOS DOS ANTIDEPRESSIVOS NA RECAPTAÇÃO DE MONOAMINAS. Representação da seletividade por sistemas serotoninérgicos ou noradrenérgicos de antidepressivos já conhecidos.

FONTE: NASH; NUTT, 2007.

### 4.3. VANTAGENS E DESVANTAGENS DO TNF

A grande vantagem que o TNF é a fácil aplicação do método. Além disso, o teste apresenta baixo custo, alta confiabilidade, é relativamente específico para os antidepressivos e seu uso não é restrito a apenas alguns laboratórios (DETKE; JOHNSON; LUCKI, 1997; CRYAN; LUCKI, 2000b; CRYAN; VALENTINO; LUCKI, 2005; PETIT-DEMOULIERE; CHENU; BOURIN, 2005; CRYAN; PAGE; LUCKI, 2005). Devido a essas características, o TNF é o método mais comumente utilizado para a triagem de antidepressivos.

A maior desvantagem apresentada pelo TNF é a detecção incerta dos efeitos dos ISRS (CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2002; CRYAN; VALENTINO; LUCKI, 2005). No teste tradicional, essa classe de drogas se apresenta como um falso negativo e acaba limitando a aplicação do teste e o rastreamento de novos compostos terapêuticos (DETKE; LUCKI, 1996). Este problema foi superado através das modificações realizadas (CRYAN; VALENTINO; LUCKI, 2005).

Outra desvantagem é que o TNF é baseado na resposta motora do animal, ou seja, mudanças na atividade motora podem afetar o resultado (VIEIRA et al., 2008). Resultados falso-positivos podem aparecer quando estimulantes psicomotores (como cafeína e anfetamina) são administrados, uma vez que eles reduzem a imobilidade (CRYAN; VALENTINO; LUCKI, 2005; VIEIRA et al., 2008). Devido a isto, testes que avaliam a atividade motora, como o campo aberto, são usualmente empregados junto com o TNF. No teste do campo aberto os compostos antidepressivos não alteram ou tendem a reduzir a atividade locomotora, enquanto estimulantes psicomotores aumentam a locomoção (VIEIRA et al., 2008).

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 ANIMAIS

40 ratos machos Wistar, provenientes do biotério central da Universidade Federal do Paraná (UFPR), pesando entre 280-300g foram usados nos experimentos. Os animais foram mantidos em uma sala com temperatura controlada ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), ciclo claro-escuro de 12 horas e com livre acesso a água e comida. Todos os experimentos estavam de acordo com a Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

### 5.2 DROGAS

Os animais receberam injeções intraperitoneais de fluoxetina (20 mg/kg; n = 10), reboxetina (10 mg/kg; n = 10), imipramina (15 mg/kg; n = 10) ou veículo (salina isotônica; 0,9% NaCl; n = 10). As doses de fluoxetina e reboxetina foram baseadas em resultados anteriores de Cryan, Markou e Lucki (2002) e a de imipramina nos resultados de Porsolt, Anton e Blavet (1978).

As drogas foram administradas 23,5, cinco e uma hora antes da sessão teste de nado forçado (DETKE; LUCKI, 1996; CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2002) .

### 5.3 TESTE DO CAMPO ABERTO

O teste do campo aberto consiste em um aparato circular dividida em quadrantes. Os animais foram colocados individualmente no centro deste aparato e

foram deixados explorar livremente por cinco minutos. Três parâmetros motores foram avaliados: frequência locomotora (número de quadrantes cruzados pelo animal), frequência de levantar (número de vezes que o animal fica apoiado nas patas traseiras) e tempo de imobilidade (segundos no qual o animal não apresenta nenhum movimento). O campo aberto foi limpo com um solução de álcool 5% entre cada animal para eliminar possíveis viés devidos aos odores dos ratos anteriores.

O campo aberto foi realizado antes da sessão teste de natação. Os animais eram retirados da arena após os cinco minutos e já eram colocados logo em seguida no tanque para o TNF.

O objetivo deste teste foi confirmar que todos os resultados obtidos no TNF são devidos a ação das drogas como antidepressivos e que as mesmas não agem como estimulantes psicomotores.

#### 5.4 TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA MODIFICADO

O teste foi conduzido em duas sessões (pré-teste e teste). Na primeira sessão, os ratos foram colocados individualmente em um cilindro (20 x 20 x 40 cm) contendo água a uma temperatura de  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , em uma profundidade de 25 cm por 15 minutos. Depois dessa sessão treino, os animais foram secados e colocados em suas caixas. 24 horas depois do pré-teste, os animais foram forçados a nadar por cinco minutos, nas mesmas condições. A sessão teste foi filmada para que os comportamentos pudessem ser quantificados. A água foi trocada a cada animal testado para evitar a interferência de odores dos outros animais e de temperatura.

Os comportamentos de cada animal foram pontuados de duas formas: por frequência (quantas vezes o comportamento proeminente iniciou no intervalo de 5 segundos) e por tempo (duração total do comportamento durante os cinco minutos de teste). Os resultados obtidos foram então transformados em porcentagens para posterior comparação entre as duas formas de pontuação.

Os parâmetros observados foram: imobilidade, que foi definida como ausência de movimentos, consistindo em apenas pequenos movimentos necessários para manter a cabeça fora da água; natação, definido como grandes movimentos com as patas dianteiras, incluindo a passagem para outros quadrantes; e escalada, sendo movimentos vigorosos com as patas dianteiras dentro e fora da água, usualmente direcionados às paredes do cilindro (CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2002).

Após os cinco minutos da sessão teste de natação, os animais foram eutanasiados utilizando hidrato de cloral 20%.

## 5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste do campo aberto foi analisado por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido do teste de Newman-Keuls. Já no TNF, as pontuações por tempo e por frequência, foram analisadas por ANOVA de uma via, seguido do teste de Newman-Keuls, enquanto as porcentagens foram analisadas por ANOVA de duas vias.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 TESTE DO CAMPO ABERTO

Como pode ser visto na tabela 1, a frequência de locomoção e a frequência de levantar obtidas após a administração dos antidepressivos não apresentaram diferenças significativas entre nenhum dos grupos.

O parâmetro tempo de imobilidade apresentou diferença significativa apenas entre os grupos salina e imipramina ( $P < 0,05$ ).

TABELA 1 - DESEMPENHO MOTOR DO ANIMAL NO TESTE DO CAMPO ABERTO.

GRUPOS	Frequência de locomoção	Frequência de levantar	Tempo de imobilidade
Salina	106,8 ± 15,96	36,30 ± 9,45	5,30 ± 1,82
Imipramina	101,0 ± 10,78	41,50 ± 4,57	7,80 ± 2,39 *
Fluoxetina	104,2 ± 10,87	37,10 ± 6,50	4,90 ± 1,63
Reboxetina	111,0 ± 15,94	41,70 ± 6,68	4,70 ± 2,0

Os valores são expressos em MÉDIA±ERRO PADRÃO DA MÉDIA (n=10 por grupo). Diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) estão representadas pelo \*, comparadas ao grupo salina .

### 6.2 TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA MODIFICADO

#### 6.2.1 Análise dos comportamentos por tempo

Como mostrados na figura 3A, imipramina e fluoxetina aumentaram significativamente o tempo que o animal permanece nadando durante os cinco minutos da sessão, quando comparados ao grupo salina. Já a reboxetina reduziu, de maneira significativa, o tempo de natação.

O comportamento de escalada (FIGURA 3B) não apresentou diferença significativa entre os grupos salina, imipramina e fluoxetina. Reboxetina mostrou um aumento significativo do tempo de escalada quando comparada ao grupo salina.

Todas as drogas reduziram significativamente o tempo de imobilidade quando comparadas ao grupo salina (FIGURA 3C).

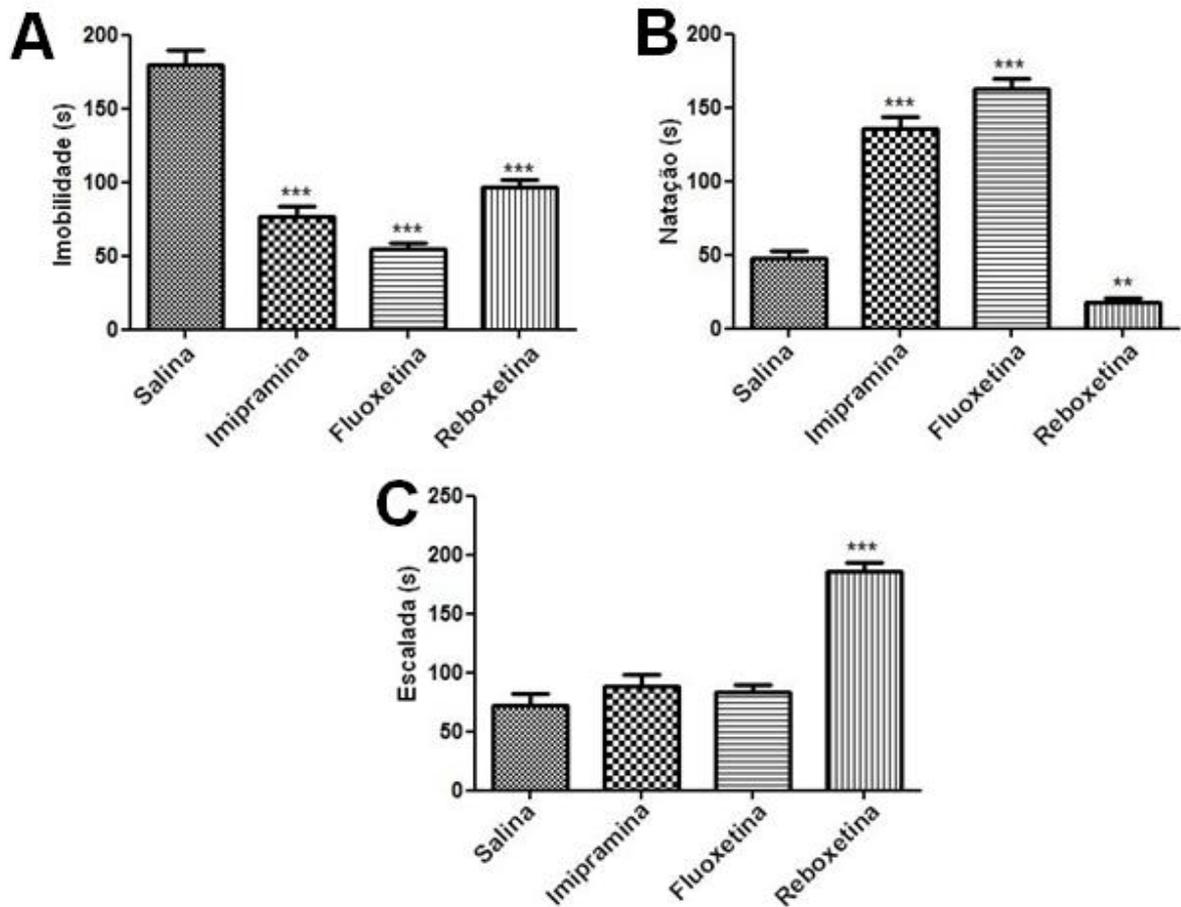


FIGURA 3 - COMPORTAMENTO NO TNF APÓS ANÁLISE POR TEMPO. Análise dos comportamentos (A) tempo de imobilidade, (B) tempo de natação e (C) tempo de escalada no TNF após a administração de antidepressivos ou salina. Os valores são expressos em MÉDIA±ERRO PADRÃO DA MÉDIA (n=10 por grupo). Sendo \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001 comparado com o grupo salina.

## 6.2.2 Análise dos comportamentos por frequência

Os grupos fluoxetina e imipramina aumentaram significativamente a frequência de natação quando comparados ao grupo salina. Reboxetina apresentou uma redução, também significativa, na frequência de natação quando comparada ao grupo salina (FIGURA 4A).

O único grupo que apresentou diferença significativa na frequência de escalada, quando comparado ao grupo salina, foi o grupo reboxetina (FIGURA 4B).

A frequência de imobilidade foi reduzida de maneira significativa por todas as drogas administradas, quando comparadas ao grupo salina (FIGURA 4C).

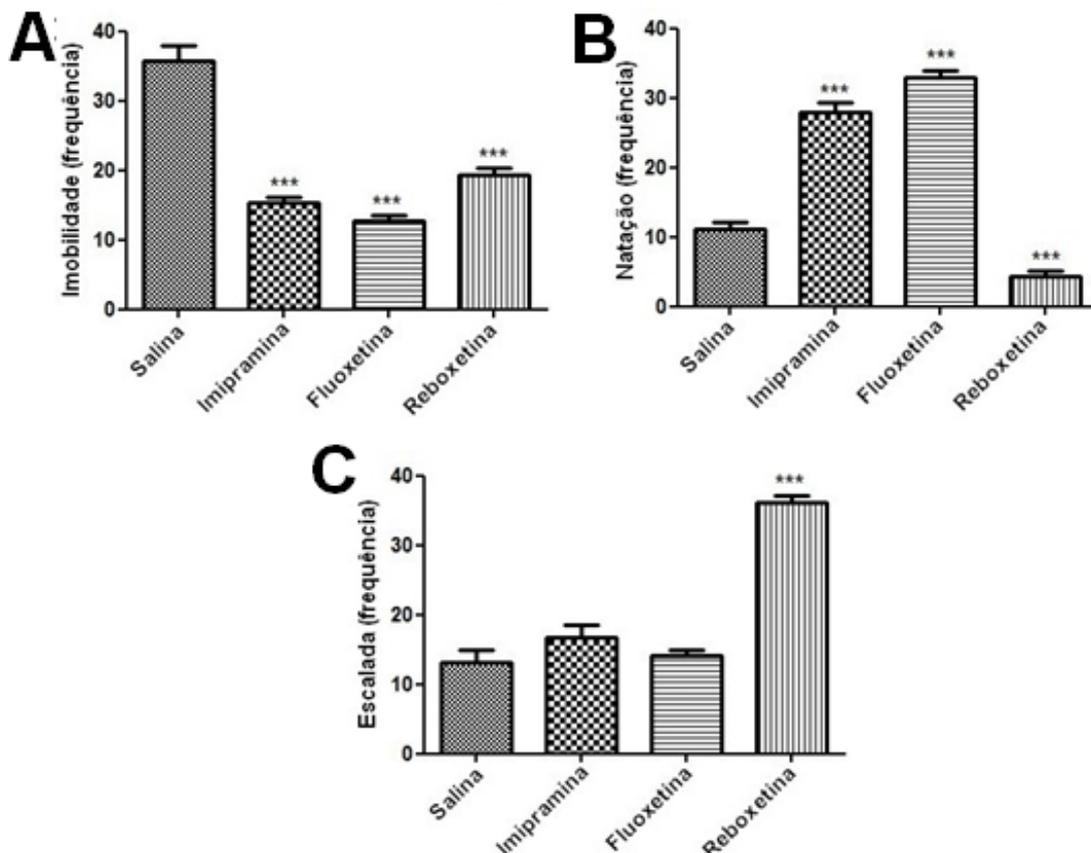


FIGURA 4 - COMPORTAMENTO NO TNF APÓS ANÁLISE POR FREQUÊNCIA. Análise dos comportamentos (A) frequência de imobilidade, (B) frequência de natação e (C) frequência de escalada no TNF após a administração de antidepressivos ou salina. Os valores são expressos em MÉDIA±ERRO PADRÃO DA MÉDIA (n=10 por grupo). Sendo \*\* p<0,01 e \*\*\* p<0,001 comparado ao grupo salina

### 6.2.3 Comparação entre as formas de análise

Para comparar as análises de tempo e frequência, os resultados foram transformados em porcentagens (considerando 300 segundos e 60 pontuações como 100%). A comparação, neste caso, não foi entre as drogas administradas, mas sim entre as formas de pontuações (tempo ou frequência).

Nenhum dos grupos apresentou diferença significativa devido a forma de análise utilizada (FIGURA 5).

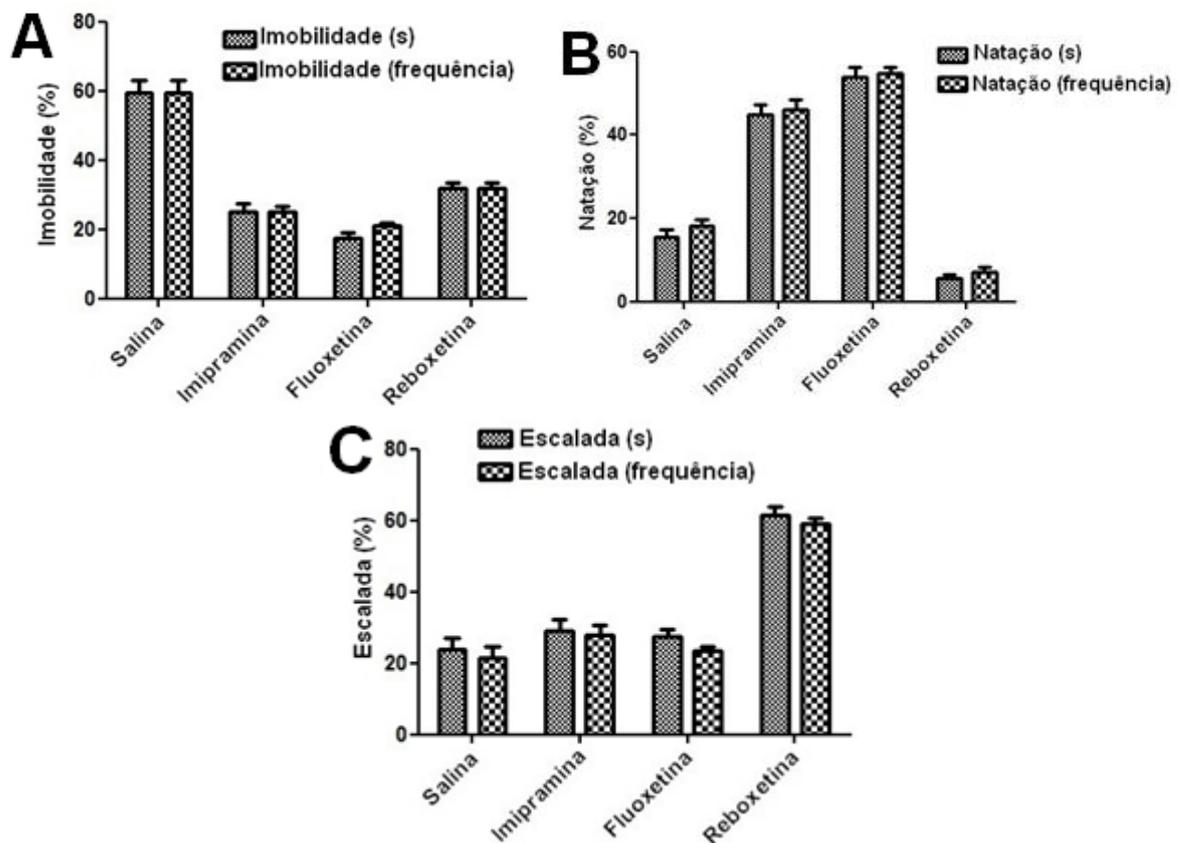


FIGURA 5 - COMPARAÇÃO DAS FORMAS DE ANÁLISE. Comparação entre as duas formas de análise comumente utilizadas, tempo ou frequência. (A) imobilidade, (B) natação e (C) escalada no TNF após a administração de antidepressivos ou salina. Os valores são expressos em MÉDIA±ERRO PADRÃO DA MÉDIA (n=10 por grupo).

## 7 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no teste do campo aberto confirmam que as drogas administradas não são estimulantes psicomotores e que os resultados obtidos no TNF são devidos à ações nos sistemas de neurotransmissores envolvidos na depressão.

Neste estudo, apesar da reboxetina ter reduzido o tempo e a frequência de natação, ela se mostra como um bom antidepressivo, uma vez que reduziu significativamente o tempo e a frequência de imobilidade. Já a imipramina, aumentou significativamente o tempo e a frequência de natação, contudo, apesar de ser um antidepressivo dual, seu principal metabólito (desipramina) possui seletividade noradrenérgica. Ou seja, a imipramina deveria ter apresentado diferença no parâmetro de escalada. Esse resultado pode ser justificado pelo aumento no tempo de imobilidade do animal no teste do campo aberto, podendo ser devido a um efeito sedativo da droga. Sendo assim, o animal pode não ter feito o comportamento de escalada, uma vez que este exige mais da capacidade motora do animal e sob sedação, esta capacidade fica comprometida.

Apesar do TNF ser o teste mais amplamente utilizado para a avaliar a atividade antidepressiva de drogas (CRYAN; VALENTINO; LUCKI, 2005), o estado de desespero comportamental desenvolvido pelo animal pode não ser devido ao humor depressivo do animal. A imobilidade pode ser vista como uma resposta adaptativa a uma situação inevitável que aumenta as chances de sobrevivência do rato (PETIT-DEMOULIERE; CHENU; BOURIN, 2005; CALIL; MARCONDES, 2006).

As correlações clínicas também devem ser consideradas com muito cuidado, uma vez que o efeito antidepressivo observado no animal é rápido e na clínica leva cerca de quatro semanas para aparecer (PETIT-DEMOULIERE; CHENU; BOURIN, 2005). Para este aparecimento rápido dos efeitos nos animais, são necessárias altas doses dos antidepressivos (MEZADRI et al., 2011), o que também difere na clínica.

Mesmo o TNF sendo um teste já bem estabelecido, alguns laboratórios analisam os padrões comportamentais de maneiras diferentes, alguns por tempo e outros por frequência. Essas análises diferentes poderiam ser responsáveis por resultados desiguais entre laboratórios. Este estudo foi de grande relevância, uma vez que demonstrou que alterações nos resultados não são devidas as formas de análise, podendo o laboratório utilizar a pontuação mais conveniente. Isso confirma a reprodutibilidade do teste entre laboratórios.

## **8 CONCLUSÃO**

Em resumo, independente de como o TNF for analisado, podendo ser pontuado por tempo ou por frequência, os resultados obtidos não devem ser diferentes, desde que as drogas administradas e o protocolo seguido sejam os mesmos. Como não há divergência entre as formas de análise, o teste se mostra ainda mais eficaz e reprodutível entre laboratórios.

## REFERÊNCIAS

BARROS, H. M.; FERIGOLO, M. Ethopharmacology of imipramine in the forced-swimming test: gender differences. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 23, n. 2, p. 279–86, 1998.

BORSINI, F.; MELI, A. Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? **Psychopharmacology**, v. 94, n. 2, p. 147–60, 1988.

CALIL, C. M.; MARCONDES, F. K. The comparison of immobility time in experimental rat swimming models. **Life sciences**, v. 79, n. 18, p. 1712–9, 2006.

CRYAN, J. F.; LUCKI, I. 5-HT<sub>4</sub> receptors do not mediate the antidepressant-like behavioral effects of fluoxetine in a modified forced swim test. **European Journal of Pharmacology**, v. 409, n. 3, p. 295–299, 2000a.

CRYAN, J. F.; LUCKI, I. Antidepressant-like behavioral effects mediated by 5-Hydroxytryptamine(2C) receptors. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 295, n. 3, p. 1120–6, 2000b.

CRYAN, J. F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends in pharmacological sciences**, v. 23, n. 5, p. 238–45, 2002.

CRYAN, J. F.; PAGE, M. E.; LUCKI, I. Noradrenergic lesions differentially alter the antidepressant-like effects of reboxetine in a modified forced swim test. **European journal of pharmacology**, v. 436, n. 3, p. 197–205, 2002.

CRYAN, J. F.; PAGE, M. E.; LUCKI, I. Differential behavioral effects of the antidepressants reboxetine, fluoxetine, and moclobemide in a modified forced swim test following chronic treatment. **Psychopharmacology**, v. 182, n. 3, p. 335–44, 2005.

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

DETKE, M. J.; JOHNSON, J.; LUCKI, I. Acute and chronic antidepressant drug treatment in the rat forced swimming test model of depression. **Experimental and clinical psychopharmacology**, v. 5, n. 2, p. 107–12, 1997.

DETKE, M. J.; LUCKI, I. Detection of serotonergic and noradrenergic antidepressants in the rat forced swimming test: the effects of water depth. **Behavioural brain research**, v. 73, n. 1-2, p. 43–6, 1996.

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

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

JEFFERYS, D.; FUNDER, J. The effect of water temperature on immobility in the forced swimming test in rats. **European journal of pharmacology**, v. 253, n. 1-2, p. 91–4, 1994.

JOCA, S. R. L.; PADOVAN, C. M.; GUIMARÃES, F. S. Estresse, depressão e hipocampo. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 25, n. Supl II, p. 46–51, 2003.

KENNEDY, S. H. A review of antidepressant treatments today. **European Neuropsychopharmacology**, v. 16, p. S619–S623, 2006.

MEZADRI, T. J.; BATISTA, G. M.; PORTES, A. C.; MARINO-NETO, J.; LINO-DE-OLIVEIRA, C. Repeated rat-forced swim test: reducing the number of animals to evaluate gradual effects of antidepressants. **Journal of neuroscience methods**, v. 195, n. 2, p. 200–5, 2011. Elsevier B.V.

NASH, J.; NUTT, D. Antidepressants. **Psychiatry**, v. 6, n. 7, p. 289–294, 2007.

PETIT-DEMOULIERE, B.; CHENU, F.; BOURIN, M. Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. **Psychopharmacology**, v. 177, n. 3, p. 245–55, 2005.

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

RANG, H. P; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R.J.; HENDERSON, G. **Rang & Dale: farmacologia**. 7 edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. Seção 4: O sistema nervoso, p. 564-582.

ROSENZWEIG-LIPSON, S.; BEYER, C. E.; HUGHES, Z. A; et al. Differentiating antidepressants of the future: efficacy and safety. **Pharmacology & therapeutics**, v. 113, n. 1, p. 134–53, 2007.

VIEIRA, C.; LIMA, T. C. M. DE; CAROBREZ, A. D. P.; LINO-DE-OLIVEIRA, C. Frequency of climbing behavior as a predictor of altered motor activity in rat forced swimming test. **Neuroscience letters**, v. 445, n. 2, p. 170–3, 2008.

WILLNER, P.; SCHEEL-KRÜGER, J.; BELZUNG, C. The neurobiology of depression and antidepressant action. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 37, n. 10 Pt 1, p. 2331–71, 2013. Elsevier Ltd.