



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

EDUARDO VIGNOTO FERNANDES

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL E ANÁLISE
COMPORTAMENTAL DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS A
NATAÇÃO FORÇADA E TRATADOS COM FLUOXETINA**

EDUARDO VIGNOTO FERNANDES

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL E ANÁLISE
COMPORTAMENTAL DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS A
NATAÇÃO FORÇADA E TRATADOS COM FLUOXETINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Patologia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Emerson José Venancio

Londrina
2012

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

F363a Fernandes, Eduardo Vignoto.
Avaliação da resposta imune humoral e análise comportamental de ratos
Wistar submetidos a natação forçada e tratados com fluoxetina / Eduardo
Vignoto Fernandes. – Londrina, 2012.
94 f. : il.

Orientador: Emerson José Venâncio.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual
de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em
Patologia Experimental, 2012.

Inclui bibliografia.

1. Imunoglobulinas – Teses. 2. Antidepressivos – Teses. 3. Fluoxetina –
Teses. 4. Stress (Psicologia) – Teses. 5. Rato como animal de laboratório – Teses. 6.
Patologia experimental – Teses. I. Venâncio, Emerson José. II. Estanislau,
Célio Roberto. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. IV. Título.

CDU 616-092

EDUARDO VIGNOTO FERNANDES

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL E ANÁLISE
COMPORTAMENTAL DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS A
NATAÇÃO FORÇADA E TRATADOS COM FLUOXETINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Patologia Experimental.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Emerson José Venancio
Universidade Estadual de Londrina

Profa. Dra. Estefânia Gastaldello Moreira
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Junior
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 24 de fevereiro de 2012.

Dedico este trabalho primeiramente a meus pais João Fernandes Filho e Vera Lúcia Vignoto Fernandes por serem pessoas muito especiais na minha vida e ao meu irmão Ricardo Vignoto Fernandes por ser meu companheiro de todas as horas. Também a minha namorada Ana Claudia Bansi por ser meu amor.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Emerson José Venancio, por ser um profissional que tem a consciência dos verdadeiros valores da ciência, sabendo a importância de constituir equipes multidisciplinares e principalmente por aceitar-me como orientando.

À Profa. Dra. Solange de Paula Ramos, pela enorme colaboração profissional e principalmente por ser uma amiga muito querida.

Ao Prof. Dr. Célio Estanislau, pela enorme dedicação e comprometimento profissional na realização desse estudo.

Agradeço a Profa. Dra. Estefânia Gastaldello Moreira e ao Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Junior pela participação na banca examinadora. Também a Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano, pela participação na banca de qualificação e por aceitar ser suplente nesta defesa.

Agradeço aos meus companheiros de laboratório e demais estagiários, que colaboraram muito com a parte metodológica e desenvolvimento do atual trabalho.

Ao Prof. Dr. Fábio Goulart de Andrade, por ser um excelente profissional e um grande amigo.

Aos amigos de república (Fernando, Guilherme e Ricardo) pelo enorme companheirismo e parceria todos esses anos.

A minha namorada Ana Claudia Bansi, por ser uma pessoa muito especial por quem me apaixono mais e mais a cada dia.

A minha avó Ana Maria Zefiro por ser uma guerreira que me mostrou o quão uma pessoa pode ser prestativa, amiga, carinhosa e educadora, sempre cultivando a família a cima de tudo. Agradeço todos os meus tios e primos, pois sem eles grande parte da minha infância não teria sentido.

Aos meus maravilhosos pais, sempre dando força, incentivo e compreensão frente a minha enorme dedicação na busca incessante pelo conhecimento.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que me ajudaram e me ajudam todos os dias.

Também aos amigos que não citei, pois são tantos que resolvi não colocar nomes e deixar algum de fora, algo que seria frente a tantas pessoas queridas ao meu redor.

Agradeço também a CAPES pelo financiamento através de uma bolsa de estudos a mim concedida.

“Seja a mudança que você quer ver no mundo.”

Dalai Lama

FERNANDES, Eduardo Vignoto. **Avaliação da resposta imune humoral e análise comportamental de ratos Wistar submetidos a natação forçada e tratados com fluoxetina**. 2012. 94 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

RESUMO

A fluoxetina é amplamente utilizada para tratamento de transtornos comportamentais. O teste do nado forçado é um modelo experimental de estudo da depressão em ratos, no qual drogas antidepressivas revertem o comportamento passivo de flutuação em repetidas imersões em água. O objetivo deste estudo foi verificar os efeitos da fluoxetina no comportamento do teste do nado forçado e sobre a imunidade. Primeiramente, foi investigado o efeito do teste de nado forçado em relação ao tratamento com fluoxetina (30mg/kg) ou salina, durante 11 dias. Neste estudo os animais tratados com fluoxetina apresentaram menor produção de anticorpos anti-hemácias e tempo de flutuação, e maior tempo de nado. Os resultados sugerem que a fluoxetina atenua o desespero comportamental e modula a produção de anticorpos. A seguir, foi analisado o efeito da fluoxetina na imunidade e no comportamento em ratos Wistar submetidos a natação forçada. Ratos Wistar machos (n=72) foram distribuídos em oito grupos (estressados salina não imunizados, stressados salina imunizados, stressados fluoxetina não imunizados, stressados fluoxetina imunizados, não stressados salina não imunizados, não stressados salina imunizados, não stressados fluoxetina não imunizados, não stressados fluoxetina imunizados). Os animais foram submetidos ao estresse de nado forçado e receberam i.p. 10 mg/kg/dia de fluoxetina ou salina trinta minutos após o término da sessão de nado forçado, do primeiro até o 24^a dia de estudo. No 5^o, 10^o e 25^o dia de estudo, ao terminarem o teste de nado forçado, foi coletado aproximadamente 1 mL de sangue por punção cardíaca em tubos, contendo 50 µL de EDTA 5%, após os testes de nado. No 5^o e 20^o dia os animais pertencentes aos grupos imunizados foram inoculados i.p. com 250 µL de solução de hemácia de carneiro a 2,5%. A avaliação da produção de anticorpos (IgM, IgG2a e IgG1) foi avaliado por ELISA. Para análise comportamental, os animais foram filmados durante os primeiros cinco minutos do 1^o e 25^o dia do experimento. Analisando-se o tempo que os animais flutuam, nadam e escalam no cilindro. Em relação à produção de anticorpos foi observado um efeito imunossupressor da fluoxetina sobre a produção de IgG1, IgM e IgG2a. O IgG1, também foi suprimido pelo estresse. Entretanto, a interação destes fatores, reverteu a imunossupressão observada, apenas para o IgG1. A fluoxetina promoveu o aumento do tempo de flutuação e redução de tempo de escalada, sugerindo que o tratamento não teve efeito na redução do estresse crônico neste protocolo. Concluímos que a droga não diminuiu o comportamento de estresse dos animais em protocolo de estresse crônico. A droga utilizada isoladamente apresenta efeito supressor sobre a imunidade humoral, mas não inibe a produção de anticorpos quando associada ao estresse.

Palavras-chave: Anticorpos. Fluoxetina. Massa corporal. Estresse.

FERNANDES, Eduardo Vignoto. **Evaluation of the humoral immune response and behavioral analysis of Wistar rats submitted to forced swimming and treated with fluoxetine**. 2011. 94 p. Dissertation (Master's Degree in Experimental Pathology) – State University of Londrina, Londrina, 2011.

ABSTRACT

Fluoxetine is widely used for the treatment of behavioral disorders. The forced swimming test is an experimental model of depression in rats, in which antidepressant drugs reverse the passive behavior of fluctuation during repeated immersions in water. The objectives of this study were to investigate the effects of fluoxetine in the behavior of forced swimming and immunity. First, it was investigated the effect of forced swimming test in relation to treatment with fluoxetine (n=5, 30mg/kg) or saline (n=5), during 11 days. In this study. In This study, animals treated with fluoxetine showed lower production of antibodies anti-erythrocytes and time of flotation, and increased swimming time. The results suggested that fluoxetine attenuate despair behavior and downmodulate the production of antibodies. Next, we examined the effect of fluoxetine on immunity and behavior in rats submitted to forced swimming test. Male Wistar rats (n=72) were divided into eight groups (stressed saline non-immunized, stressed saline immunized, stressed fluoxetine non-immunized, stressed fluoxetine immunized, non-stressed saline non-immunized, non-stressed saline immunized, non-stressed fluoxetine non-immunized, non-stressed fluoxetine immunized). The animals were submitted to stress by means of forced-swimming test and received i.p. 10 mg/kg/day of fluoxetine or saline 30 minutes after test, from first to 24th day of the study. On the 5th, 10th and 25th day of study, 1 mL of blood was collected by cardiac puncture in tubes containing 50 mL of 5%EDTA, after swimming test. In the 5th and 20th days the immunized animals were inoculated with a solution of sheep erythrocyte to 2.5% (i.p., 250 ml). The production of antibodies (IgM, IgG1 and IgG2a) was assessed by ELISA. For behavioral analysis, animals were filmed during the first five minutes of the 1st and 25th day of the experiment for analyzes of the floating, swimming and climbing times. The fluoxetine impaired the production of IgG1, IgG2a and IgM. IgG1 was also decreased by stress. However, the fluoxetine treatment in stressed animals did not decrease the production IgG1 antibody in animals. Fluoxetine increased floating and reduced climbing time, suggesting that the treatment did not have effects in this chronic stress protocol. We concluded that fluoxetine alone did not inhibit stress behavior in animals submitted to the protocol of chronic stress. Fluoxetine alone also has suppressive effects on humoral immunity, but it did not inhibit antibody production when it was associated to chronic stress.

Keywords: Antibodies. Fluoxetine. Body mass. Stress.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADTs	Antidepressivos Tricíclicos
APCs	Antigen-Presenting Cell
BCR	B-cell Receptor
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor
CD	Cluster of Differentiation
CRH	Corticotropin Releasing Hormone
ERS	Estimulantes da Recaptura de Serotonina
FC	Fração Constante
FST	Forced Swimming Test
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IFN-γ	Interferon-gama
IgA	Imunoglobulina A
IgD	Imunoglobulina D
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL-1	Interleucina 1
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-5	Interleucina 5
IL-10	Interleucina 10
IMAO	Inibidores de Monoaminoxidase
ISRD	Inibidores Seletivos de Recaptura de Dopamina
ISRN	Inibidores Seletivos de Recaptura de Noradrenalina
IRSA	Inibidores de Recaptura de Serotonina e Antagonistas Alfa-2
ISRS	Inibidores Seletivos da Recaptura de Serotonina
ISRSN	Inibidores Seletivos da Recaptura de Serotonina e Noradrenalina
MAP	Mitogen-Activated Protein
MHC	Major Histocompatibility Complex
NE	Noradrenalina

NK	Natural Killer
ODV	O-desmetilvenlafaxina
SGA	Síndrome Geral da Adaptação
SNC	Sistema Nervoso Central
TC	T Citotóxica
TCD4	Linfócitos T CD4
TCD8	Linfócitos T CD8
TH	T Helper
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral-alfa
5-HT	Hydroxytryptophan (Serotonina)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	SISTEMA IMUNOLÓGICO	12
1.2	ESTRESSE	15
1.3	DEPRESSÃO	16
1.3.1	Antidepressivos	18
1.3.2	Modelos Animais	20
1.3.3	Modelos Animais de Depressão	21
1.3.3.1	Teste de nado forçado	22
1.3.3.2	Teste de nado forçado adaptado	23
1.3.3.3	Bulbectomia olfatória	24
1.3.3.4	Desamparo aprendido	25
1.3.3.5	Outros modelos	26
1.4	ESTRESSE, DEPRESSÃO E ALTERAÇÕES IMUNOLÓGICAS	26
1.5	ANTIDEPRESSIVOS E ALTERAÇÕES IMUNOLÓGICAS	28
2	OBJETIVOS	30
2.1	OBJETIVO GERAL	30
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
	REFERÊNCIAS	31
	APÊNDICES	38
	APÊNDICE A - Artigo submetido ao periódico Psicologia: Teoria e Pesquisa	39
	APÊNDICE B - Capítulo a ser publicado no livro “Antidepressant”	61
	ANEXOS	78
	ANEXO A - Normas para publicação no periódico, Psicologia: Teoria e Pesquisa	79
	ANEXO B - Instruções aos autores do capítulo	87
	ANEXO C - Carta de aceite do capítulo	91
	ANEXO D - Comitê de Ética em Experimentação Animal	93

1 INTRODUÇÃO

1.1 SISTEMA IMUNOLÓGICO

O sistema imune é responsável pela defesa do hospedeiro contra invasões de patógenos e tem mecanismos de imunidade que podem ser divididos em dois tipos. A imunidade inata é a primeira linha de defesa contra infecções, ela está presente no indivíduo antes do contato com o antígeno e sua resposta é imediata, entretanto, esta resposta não aumenta ou se reduz frente a infecções repetidas. A imunidade adaptativa passa a atuar após o contato com o antígeno, apresenta um repertório de especificidade muito maior do que a imunidade inata e a cada infecção pelo mesmo patógeno são geradas células de memória, que maximizam a resposta imune no próximo contato com o mesmo patógeno (JANEWAY et al., 2007).

As células que constituem o sistema imune são classificadas de acordo com suas funções e por seus receptores de superfícies celulares (grupo de diferenciação ou CD), os principais constituintes celulares do sistema imune são os linfócitos, fagócitos mononucleares (monócitos/macrófagos), neutrófilos, eosinófilos, basófilos e mastócitos, sendo os linfócitos as únicas células capazes de realizar o reconhecimento específico dos antígenos (ABBAS; LICHTMAN, 2005). Os constituintes celulares do sistema imune originam-se na medula óssea, a partir de células tronco e, dependendo do tipo celular, podem sofrer os processos de maturação e diferenciação em outros órgãos ou tecidos. Por exemplo, os linfócitos T sofrem os processos de maturação e diferenciação no timo, sob a ação de hormônios tímicos, enquanto os linfócitos B passam por estes processos na própria medula óssea ou em outros tecidos, dependendo da espécie animal (SZAKAL et al., 1989). As células de defesa estão em constante circulação pelos órgãos e tecidos do organismo, devido à capacidade de se ligarem ao endotélio por meio de interações moleculares específicas, permitindo com isso, uma maior eficácia na busca e destruição dos agentes nocivos ao hospedeiro (JANEWAY et al., 2007).

Existem dois tipos básicos de imunidade adaptativa: humoral e a celular, as quais estão diretamente relacionadas com os linfócitos B e os linfócitos T citotóxicos. Os linfócitos B são células produtoras de anticorpos (imunoglobulinas), protegendo o organismo da invasão de patógenos e toxinas, enquanto os linfócitos T

citotóxicos são células capazes de destruir outras células e são responsáveis pela hipersensibilidade tardia, rejeição de transplantes, defesa contra células cancerígenas e patógenos intracelulares como os vírus (ROITT et al., 2004).

Os linfócitos B apresentam receptores específicos (BCR) para os antígenos em sua membrana. Estes receptores são moléculas de imunoglobulinas, geralmente das classes IgM e IgD. Quando uma célula B encontra um antígeno alvo, ela diferencia-se em uma célula produtora de anticorpos, denominada plasmócito (ABBAS; LICHTMAN, 2005). Existem cinco classes de imunoglobulinas em mamíferos (IgG, IgA, IgM, IgE, IgD) que são produzidas em resposta as infecções por bactérias, vírus, parasitas, agentes da poeira, entre outros. Após o primeiro contato com o antígeno específico, são produzidas células B de memória, que responderão mais rápida e eficazmente as repetidas exposições do mesmo antígeno (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Os linfócitos T são divididos em duas populações principais: células T auxiliares (T *helper*, Th) e células T citotóxicas (Tc), a diferenciação entre os linfócitos Th e os linfócitos Tc é feita pela detecção de glicoproteínas específicas para cada classe de linfócito. A glicoproteína CD4 está presente nas células Th e a CD8 nas células Tc. Em relação ao reconhecimento antigênico, existem dois tipos principais de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC), as de classe I e II, sendo que as de classe I são responsáveis por apresentar antígenos para os linfócitos CD8+ e as do MHC II para os linfócitos CD4+ (ABBAS; LICHTMAN, 2005). Os linfócitos TH podem ainda ser subdivididos em populações conforme o padrão de citocinas produzidas: TH1 (resposta celular) produtores de interleucina-2 (IL-2) e interferon-gama (IFN- γ), TH2 (resposta humoral) produtores de interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5) e interleucina-10 (IL-10) (JANEWAY et al., 2007). Os linfócitos T CD8+ desempenham uma atividade citotóxica vital para o organismo, destruindo células ou agentes que não são reconhecidos pelo próprio organismo como próprios, ex. células infectadas por vírus, células tumorais ou células provenientes de tecido de enxerto (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

As células *Natural Killer* (NK) representam outro tipo de células do sistema imune. Essas células não apresentam marcadores para células T e nem para células B, razão pela qual foram originalmente chamadas de células nulas, as células NK possuem habilidade de matar certas células tumorais, células infectadas por vírus, bem como células recobertas por anticorpos (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Os níveis de células NK podem ser influenciados pela idade, nível de atividade física, gênero, e uma variedade de fatores da saúde em geral como depressão aguda, a baixa atividade NK em pacientes com câncer está diretamente associada com o desenvolvimento de metástases à distância e há evidências de que possa, inclusive, ser um marcador, de doenças metastáticas ocultas (ZORRILLA et al., 2001).

Os neutrófilos são as células de defesa mais numerosas na corrente circulatória. Eles são ativados por citocinas e apresentam como principal função a fagocitose. Os eosinófilos apresentam grande número de lisossomas e desempenham funções similares aos neutrófilos. Os basófilos expressam receptores de superfície específicos para uma classe de anticorpos denominados IgE, sendo células importantes nas respostas imunes contra determinados antígenos que induzem a síntese de altos níveis de IgE, como antígenos parasitários, além de estarem também envolvidos nas reações anafiláticas e alérgicas. Além dos basófilos do sangue, nos tecidos, são encontrados os mastócitos. Ambos apresentam receptores de alta afinidade para IgE. A interação dos antígenos com as moléculas de IgE ativam os basófilos e os mastócitos para secretarem o conteúdo de seus grânulos, os quais são mediadores químicos para a hipersensibilidade imediata (ROITT et al., 2004).

Os monócitos são um tipo celular de extrema importância para o hospedeiro, elas são, junto com os neutrófilos, importantes mediadores da imunidade inata, mas também participam da imunidade adaptativa principalmente por atuarem como células apresentadoras de antígenos (APCs) aos linfócitos. Além do sangue, essas células são encontradas por todo corpo, entretanto, ao saírem da corrente sanguínea em direção aos locais de atuação específicos mudam suas conformações, tamanhos e denominações, ex. macrófagos (tecidos conjuntivo), osteoclastos (células ósseas) e micróglia (sistema nervoso central) (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Além do envolvimento direto no combate aos agentes nocivos ao hospedeiro, o sistema imune atua em eventos de natureza psíquica, dessa forma, indivíduos acometidos por situações estressantes, podem gerar estímulos nervosos responsáveis por deprimir ou ativar o sistema imunológico (CORTEZ; SILVA, 2007). Em pacientes portadores do vírus HIV foi evidenciado que o estresse apresenta

intima relação com a quantidade de linfócitos T CD4+ circulantes (LEITE et al., 2007).

1.2 ESTRESSE

A palavra estresse surgiu do latim e atualmente tem sido utilizada para designar opressão, desconforto e adversidade (CHRISTOPHORO; WAIDMAN, 2002). Segundo Rey (1999) estresse é a resposta do organismo aos efeitos nocivos exercido por fatores físicos e psíquicos. Para Stacciarini e Tróccoli (2001), sendo categorizado como algo negativo que acarreta em prejuízo no desempenho global do indivíduo. Segundo Carrasco e Van de Kar (2003) o estresse é definido por respostas organizadas do indivíduo, utilizadas na tentativa de elevar sua expectativa de vida, sendo concebida por alterações nas funções autônomas, secreção de múltiplos hormônios e mudanças comportamentais. Murofuse e cols. (2005) relataram que a palavra estresse está muito difundida no contexto atual como a causa ou a explicação da grande maioria dos eventos que afligem a sociedade contemporânea.

O termo estresse foi introduzido pela primeira vez na área da saúde por Hans Selye (1936). Ele caracterizou como Síndrome Geral da Adaptação (SGA) todas as reações sistêmicas não específicas que surgem durante uma exposição crônica e intensa a um agente estressor (ex. pressão no trabalho e má alimentação), diferente das reações adaptativas específicas (como a hipertrofia muscular ocasionada pelo exercício físico realizado de maneira periódica) e das reações imunológicas (CORTEZ; SILVA, 2007).

Segundo Camelo e Angerami (2004), Selye dividiu a SGA em três fases. Fase de Alarme: o indivíduo apresenta comportamento de fuga ou agressão ao estressor, entendido como uma situação saudável ao estresse, caracterizada por sintomas como taquicardia, tensão muscular crônica, dor de cabeça, sensação de esgotamento (cansaço excessivo), pressão no peito e extremidades frias; Fase de Resistência: o organismo altera seus parâmetros de normalidade e concentra a reação interna em um determinado órgão-alvo, acarretando em manifestação de sintomas de domínio psicossocial como ansiedade, medo, isolamento social, roer unhas, oscilação do apetite e impotência sexual; Fase de Exaustão: acarretada pelo

excesso de atividades e pelo alto consumo de energia, na qual, ocasiona em falência do órgão mobilizado e no surgimento de doenças no indivíduo.

De acordo com Nahas (2006), os sintomas mais comuns relacionados ao estresse são: dores no corpo, tensão muscular, herpes, afecções da mucosa bucal (aftas), gripes e resfriados, falta ou excesso de apetite, podendo dar origem a dores de cabeça. Lipp (1994) relata que os principais sintomas psicológicos presentes nos indivíduos estressados são: ansiedade, tensão, angústia, insônia, alienação, dificuldades interpessoais, dúvidas quanto a si próprio, preocupação excessiva, incapacidade de concentrar-se, dificuldade de relaxar, ira e hipersensibilidade emotiva.

Na sociedade moderna, o estresse tem sido considerado como um dos maiores causadores da depressão, isso tem sido observado porque aproximadamente 60% dos indivíduos apresentam depressão após uma situação de grande estresse, condição que surge principalmente de problemas psicossociais (pressão no trabalho, perda de emprego, dívidas, entre outros) e susceptibilidade genética (KENDLER et al., 1995; POST, 1992). Autry et al (2009) trabalhando com camundongos relatam que a diferença entre gênero é outra condição relevante para o surgimento ou não do estado depressivo, pois, ao compararem animais de ambos os sexos *knockout* para o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), observaram que apenas as fêmeas apresentavam depressão.

1.3 DEPRESSÃO

A depressão é caracterizada como uma desordem mental, na qual, o indivíduo apresenta tristeza, pessimismo, dificuldade de pensar ou concentrar-se, alterações no apetite, sonolência diurna e insônia à noite, sensação de desespero e desenvolvimento de pensamentos suicidas (REY, 1999; BALDESSARINI, 2005). Fatores estressantes diários, como o trânsito turbulento, pouco sono e falta de lazer, além das grandes jornadas de trabalho e a poluição ambiental, predispõem o surgimento dos sintomas depressivos (STACCIARINI; TRÓCCOLI, 2001).

Para diagnosticar a depressão, além da experiência profissional, são necessários vários procedimentos: anamnese com o indivíduo e familiares, exame psiquiátrico, exame clínico, avaliação neurológica, especificidade e dose adequada de medicamentos, respeitando o agravo clínico, exames laboratoriais e

neuroimagem (STELA et al., 2002). Valentini e col. (2004) mostraram que grande parte dos médicos clínicos gerais do Sistema Único de Saúde têm dificuldades para identificar pacientes com depressão. De acordo com os mesmos autores, as características relacionadas ao exercício da medicina, como idade, sexo, anos de exercício da profissão ou tempo prévio de trabalho no centro de saúde, não se relacionaram com o nível de conhecimento relacionado à depressão.

A partir da década de 70, estudos têm mostrado que a depressão pode acometer indivíduos de todas as idades, desde crianças (CUNHA et al., 2005) à idosos (ALMEIDA; ALMEIDA, 1999). Segundo Almeida (2006) sintomas depressivos podem manifestar-se em qualquer pessoa nos mais variados momentos de suas vidas. Em alguns países desenvolvidos, a incidência da depressão nos indivíduos pode chegar a 21% (WONG; LICINIO, 2001). No Brasil, os índices de depressão na população são inferiores, mas alarmantes, estimando-se uma prevalência de 2 a 12% de brasileiros acometidos por esse mal (ALMEIDA-FILHO et al., 1997). Em relação ao gênero a depressão ocorre mais em mulheres que nos homens, na proporção de 3:1 respectivamente (OLIVEIRA et al., 2001).

Lawery et al. (2001) relatam que a doença (depressão) não deve ser confundida aos estados sentimentais ou momentos depressivos vivenciados pelas pessoas no seu cotidiano (fatores do trabalho ou pessoais), pois a verdadeira depressão em alguns casos apresenta-se tão forte que o indivíduo é incapaz de libertar-se por si próprio, havendo a necessidade do tratamento medicamentoso. A depressão é frequentemente associada há perdas (ex. perda da saúde física, da sensação de bem-estar, de familiares, de emprego, de tempo, entre outras perdas). Além disso, a depressão no indivíduo é dependente da personalidade e da predisposição genética (KIMMEL, 2000). Os indivíduos que apresentam dificuldades de tomar iniciativas, que assumem muitas responsabilidades e aqueles que não expõem sentimentos negativos, apresentam maior suscetibilidade à depressão (GUIMARÃES, 2002). A predisposição genética da depressão tem íntima relação à personalidade individual, na qual, a pessoa realiza e chama para si ações estressantes e de alto risco ambiental, o que pode aumentar as chances do surgimento da depressão (MARGIS et al., 2003).

1.3.1 Antidepressivos

O uso de antidepressivos no tratamento de pacientes com depressão iniciou-se no fim dos anos 50. Desde então, houve um grande avanço no tratamento e no entendimento dos possíveis mecanismos relacionados à depressão (DEITOS et al., 1999). Somente duas classes de antidepressivos eram conhecidas até a década de 80, os tricíclicos (ADTs) e os inibidores de monoaminoxidase (IMAO). Apesar de eficazes, os antidepressivos pertencentes a essas classes induzem inúmeros efeitos indesejáveis e apresentam baixo índice terapêutico. Nos últimos 30 anos, foram introduzidas no mercado novas classes de antidepressivos que apresentam efeitos indesejáveis mais aceitáveis. Os inibidores seletivos da recaptção de serotonina, como por ex. a fluoxetina, fazem parte dessa nova geração de drogas antidepressivas. Eles inibem seletivamente a recaptção de serotonina, resultando na potencialização da neurotransmissão serotoninérgica (MORENO et al., 1999). O grande diferencial dos antidepressivos atuais está na sua maior seletividade de ação (GORENSTEIN; SCAVONE, 2007).

Atualmente, a principal forma de tratamento dos pacientes com depressão é a farmacoterapia mas 30 a 35% dos pacientes são refratários à ela. Acredita-se que parte dessa refratariedade esteja relacionada à prescrição inadequada pelo médico. Não existe um antidepressivo que seja o padrão ouro e, assim, não há regras para a prescrição e a mesma ocorre de maneira empírica (BLUMENTHAL et al., 1999; BALDESSARINI, 2005). Dessa forma, muitos estudos têm buscado correlacionar os sinais clínicos mais relevantes apresentados por cada paciente e a melhor resposta a cada antidepressivo, numa tentativa de tornar a escolha do antidepressivo menos empírica (LIMA et al., 2004).

Os antidepressivos podem ser classificados de acordo com suas estruturas químicas e/ou mecanismos de ação em: inibidores da monoaminoxidase (IMAO), tricíclicos (ADTs), inibidores seletivos de recaptura de serotonina (ISRS) e inibidores seletivos de recaptura de NE (ISRN) (BEZCHLIBNYK-BUTLER; JEFFRIES, 1999).

A MAO é uma enzima mitocondrial encontrada principalmente no encéfalo e fígado que catalisa a desaminação oxidativa de aminas biogênicas, como dopamina, noradrenalina e 5-HT. Existem duas formas de MAO: tipo A, responsável por metabolizar 5-HT, adrenalina, noradrenalina, tiramina e dopamina; e a tipo B, a

qual oxida a feniletilamina, benzilamina, triptamina e dopamina (GORENSTEIN; SCAVONE, 2007). A redução na atividade da MAO resulta em aumento na disponibilidade desses neurotransmissores, o que tem sido relacionado à ação antidepressiva dos fármacos da classe dos IMAO (MORENO et al., 1999). Vale ressaltar que a ação antidepressiva é atribuída à inibição da MAO-A (WARD; AZZARO, 2005).

Os IMAO são divididos em inibidores reversíveis e irreversíveis da enzima (KRISHNAN, 2002). Os primeiros IMAO utilizados clinicamente produzem inibição irreversível e não seletiva da MAO tipo A e B e, quando interrompido o tratamento, a atividade da MAO é normalizada quando ocorre síntese de nova enzima. Mais recentemente foram introduzidos IMAO reversíveis e seletivos para a MAO-A, como a moclobemida e a brofaromina (GORENSTEIN; SCAVONE, 2007).

Os antidepressivos tricíclicos (ADT) inibem, primariamente, a recaptação NE e 5-HT. Aminas terciárias são inibidoras mais potentes da recaptura de 5-HT, enquanto as secundárias, da de NE. Apesar do aumento de disponibilidade do neurotransmissor acontecer após a primeira administração, os efeitos clínicos ocorrem de duas a três semanas após o início do tratamento (GORENSTEIN; SCAVONE, 2007). Tal latência parece coincidir com a ocorrência de subsensibilidade dos receptores α_2 e β -adrenérgicos, serotoninérgicos e dopaminérgicos. O tratamento repetido também resulta em aumento na produção de AMPc e alteração na atividade de proteínas-quinases. Fatores de transcrição que regulam a expressão gênica neural são também afetados, assim como os fatores neurotróficos (GORENSTEIN; SCAVONE, 2007).

Os ISRS inibem seletivamente a recaptação de 5-HT e apresentam maior segurança e perfil de efeitos indesejáveis mais toleráveis do que os IMAO e ADT. Os diferentes fármacos pertencentes a essa classe são estruturalmente distintos e a inibição de recaptação de serotonina é variada (GOODNICK; GOLDSTEIN, 1998). No tratamento agudo com ISRS, os auto-receptores inibitórios 5-TH_{1A}, localizados nos corpos celulares dos neurônios serotoninérgicos dos núcleos de rafe, estão expostos a uma concentração mais elevada de 5-HT em função do bloqueio da recaptação. Em consequência, há diminuição no disparo neural e na liberação de 5-HT. No tratamento prolongado, ocorre dessensibilização desses receptores, levando ao aumento da liberação de 5-HT, que se correlaciona temporalmente com a melhora clínica (GORENSTEIN; SCAVONE, 2007). Apesar de

terem menos efeitos colaterais os ISRS, podem resultar em boca seca, sudorese, anorexia, cefaléia, diarreia, sonolência e insônia (CORDIOLI et al., 2000).

Entre os antidepressivos atípicos, a venlafaxina e seu metabólito ativo o-desmetilvenlafaxina (ODV) são inibidores seletivos da recaptação de serotonina e noradrenalina, havendo uma superioridade para a recaptura de serotonina. A nefazodona e a trazodona são antagonistas de receptores 5-HT_{2A} e alfa-2 adrenérgico (GORENSTEIN; SCAVONE, 2007). A administração crônica de nefazodona leva à dessensibilização de receptores 5-HT_{2A}(FEIGHNER, 1999). A bupropiona inibe seletivamente a recaptura de dopamina e de noradrenalina (mais fracamente).

A reboxetina é o primeiro composto comercializado da classe dos inibidores seletivos da recaptação de noradrenalina (IRNA). Não tem efeitos significativos sobre receptores colinérgicos, histamínicos, α 1-adrenérgicos (MORENO et al., 1999).

A literatura tem dado ênfase na relação entre antidepressivos e a resposta imunológica, principalmente na alteração do padrão das citocinas pró para as antiinflamatórias (Th1 e Th2), condição considerada protetora, pois as células neuronais necessitam de fatores como o neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) para proliferarem (VISMARI et al., 2008). Núñez et al. (2006) mostraram que camundongos submetidos ao estresse sonoro crônico reduziram a atividade de suas células NK, situação que foi revertida pelo tratamento diário com fluoxetina na concentração de 2 mg/kg. Kubera et al. (2011) ao tratarem camundongos C57BL/6J de ambos os gêneros com 10 mg/kg de fluoxetina ou desipramina e os infundirem com melanoma B16F10, constataram que essas drogas influenciaram negativamente o desenvolvimento deste tumor nos machos, condição não relacionada ao maior tempo de sobrevivência dos mesmos em relação às fêmeas.

1.3.2 Modelos Animais

O propósito primário de um modelo animal é aumentar a compreensão de um fenômeno humano (GEYER; MARKOU, 1995). Para atingir esse propósito, os autores apontam uma quantidade de critérios que o modelo deve atender. Ele deve ter confiabilidade, ou seja, a variável em estudo deve ser observada consistentemente e com estabilidade (tais atributos podem ser

observados, por exemplo, quando resultados são replicados em diferentes laboratórios). A validade preditiva é atingida na medida em que o modelo torna possíveis previsões sobre o fenômeno humano modelado. Quanto à validade de construto, avalia-se a capacidade do modelo de permitir o estudo do fenômeno a que ele se propõe a modelar. A validade convergente diz respeito à concordância de um modelo com outros modelos destinados a investigação do mesmo fenômeno. Por outro lado, validade discriminativa é atribuída ao modelo que é capaz de emular aspectos do fenômeno de interesse que outros modelos não são capazes de igualaremular. A validade de face se constitui no grau com que se assemelham o comportamento apresentado pelo animal e as características da condição humana em estudo. O modelo é provido de validade etiológica se forem evidentes paralelos entre a etiologia no modelo animal e na condição humana de interesse. Estabelecida a validade etiológica, os autores ressaltam, o modelo pode tornar-se extremamente útil no desenvolvimento de tratamentos. Os diversos modelos animais divergem no quanto atendem a esses critérios de validade, alguns atendem mais, outros menos. É importante ressaltar que o atendimento a todos esses critérios de validade não constitui condição *sine qua non* para que um modelo possa ser útil. Pode-se mesmo falar que é mais importante o atendimento a alguns dos critérios do que a outros. Nesse sentido, Geyer e Markou (1995) defendem que a confiabilidade e a validade preditiva são critérios necessários e suficientes para justificar o uso de um modelo animal na pesquisa. Os outros critérios de validade podem ser estabelecidos em pesquisas subseqüentes. Pode ser até que nenhum dos outros critérios seja atendido, ainda assim o modelo poderá ser, em algum grau, informativo.

1.3.3 Modelos Animais de Depressão

Uma quantidade de desafios deve ser superada no estabelecimento de um modelo animal de depressão. Existe muita controvérsia sobre quais seriam, por exemplo, os principais processos subjacentes à depressão. Alguém pode supor que seja o desenvolvimento de desamparo – quando o comportamento assume um caráter de passividade, sendo que o indivíduo torna-se incapaz de fugir de experiências aversivas (MAIER; WATKINS, 2005). Outros certamente defenderão que uma característica fundamental da depressão é a anedonia. Em não havendo consenso sobre quais são os principais processos que definem a depressão, torna-

se impossível haver um modelo animal que, indiscutivelmente, os reproduz e, portanto, atende satisfatoriamente o critério de validade de construto. Da mesma forma, são diversos os fatores que tem sido proposto estarem envolvidos na etiologia da depressão. Alguns deles são: o estresse repetido, a perda de um cuidador na infância, uso prolongado de algumas drogas de abuso, fator genético (constatado pela presença de depressão em parentes de primeiro grau) etc. À medida que não há consenso sobre um fator etiológico primordial da depressão, não é possível haver um modelo animal que consensualmente contempla a validade etiológica.

Apesar de haver ainda muita controvérsia sobre aspectos fundamentais da depressão, houve progresso com a descrição de critérios diagnósticos objetivos para a identificação do transtorno no *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. Assim, por exemplo, não haverá o diagnóstico de episódio depressivo maior a menos que um dos sintomas (dentre outros, no mínimo, quatro) seja humor deprimido ou perda do interesse ou do prazer (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 1994). Assim, a validade de face de um modelo de depressão pode ser perseguida pela replicação de critérios diagnósticos constantes naquele manual. No entanto, esses próprios critérios apresentam ambigüidades. Assim, podem caracterizar a depressão tanto a perda como o ganho de peso, a insônia ou a hipersonia, a agitação ou o retardo psicomotor. Existem outros critérios diagnósticos que constituem problemas para o desenvolvimento de modelos animais de depressão por serem aspectos que não podem ser replicados com animais. Por exemplo, sentimentos de inutilidade ou culpa e ideação suicida.

Não obstante todos os desafios que se apresentam no desenvolvimento de modelos animais de depressão, uma quantidade de modelos tem sido desenvolvida. Tais modelos tem contribuído para o estudo de potenciais tratamentos e na investigação de diversos aspectos comportamentais, endócrinos, imunológicos e neurobiológicos da depressão.

1.3.3.1 Teste de nado forçado

O teste de nado forçado (FST) foi desenvolvido por Porsolt et al. (1977), sendo aplicado inicialmente em ratos e posteriormente em camundongos. Este modelo é muito utilizado para avaliar a atividade antidepressiva pré-clínica.

Sua grande utilização decorre principalmente pela sua fácil execução, fidedignidade dos resultados em vários laboratórios e sua habilidade em detectar a ação de quase todas as classes de antidepressivos existentes na atualidade (BORSINI; MELI, 1988). Esse teste é baseado na observação dos ratos, quando colocados na água, sendo analisado o tempo em que eles apresentam comportamentos ativos ou passivos no cilindro, após 24 horas do pré-teste os animais são novamente testados e observa-se que a imobilidade acontece mais rapidamente ou por mais tempo em relação ao primeiro contato dos animais com o nado, na qual, o tempo que os animais permaneçam flutuando relaciona-se diretamente com o aumento da depressão (PORSOLT et al., 1977).

Com base nas diferentes formas de comportamento observado é possível analisar o estado emocional e avaliar a efetividade ou não de medicamentos que tendem a diminuir os níveis de depressão ocasionados por essa forma de estresse (BARROS; FERIGOLO, 1998). Tratando-se de um teste que induz a depressão, vários autores têm investigado os efeitos de antidepressivos no comportamento de ratos e camundongos (ROGÓZ et al., 2008; MENEZES et al., 2008). No entanto, a grande desvantagem do teste de nado forçado tradicional é que ele não é confiável, porque a altura da água não cobre completamente o animal e ele apóia as patas traseiras no fundo do cilindro, essa ação dificulta a detecção dos efeitos dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS), que são os medicamentos antidepressivos mais prescritos na atualidade (LUCKI, 1997).

1.3.3.2 Teste de nado forçado adaptado

Para aumentar a sensibilidade do teste de nado forçado tradicional e fazer com que os animais testados respondessem aos antidepressivos inibidores da recaptação de serotonina, foi elevado o nível da água, que inicialmente era de 15-18 cm para 30 cm, na qual, os animais perdem contato com o fundo do cilindro (LUCKI, 1997).

Com essa alteração, os pesquisadores começaram a distinguir três comportamentos principais demonstrados pelos animais durante o teste: escalada, animal na posição vertical, realizando movimentos bruscos com as patas dianteiras, tirando-as para fora da superfície da água e raspando-as na parede do cilindro; natação, o animal geralmente mantém o corpo na horizontal, deslocando-se por todo

o cilindro; imobilidade ou flutuação define-se quando o animal não apresenta nenhuma atividade adicional, nessa ação os ratos realizam movimentos suaves para manter a cabeça/nariz fora da água.

Com o aumento na profundidade da água observa-se durante o experimento um menor tempo de imobilidade dos animais, pois, nesse modelo os animais não têm contato com a parte inferior do cilindro, desse modo a grande vantagem do teste de nado forçado adaptado revela que agentes catecolaminérgicos diminuem o tempo de imobilidade e aumento da escalada, efetivando dessa maneira os efeitos dos medicamentos inibidores da recaptação de serotonina, como a fluoxetina (CRYAN; LUCKI, 2000).

Uma possível desvantagem em utilizar o teste de nado forçado adaptado em relação aos antidepressivos, é que para os animais a droga apresenta respostas agudas e para os pacientes as respostas antidepressivas aos mesmos medicamentos podem demorar semanas para efetivarem-se, entretanto, tem sido demonstrado que doses de medicamentos antidepressivos inativos agudamente, apresentam efeitos antidepressivos normais quando administrados por períodos crônicos nos animais testados com o nado adaptado (DETKE et al., 1997). Através disso muitos autores têm utilizado esse modelo de depressão para comprovar a efetividade de antidepressivos (MOLINA-HERNANDEZ et al., 2001; STOGNER; HOLMES, 2000).

1.3.3.3 Bulbectomia olfatória

A remoção bilateral dos bulbos olfatórios de ratos e camundongos resulta em comportamentos complexos de cunho neuroquímico, neuroendócrino e neuroimune, que estão intimamente relacionados com a depressão (KELLY et al., 1997). Para muitos pesquisadores o modelo de bulbectomia é um teste obscuro, porque a lógica para sua utilização como um modelo animal tem sido frequentemente questionada com base na construção de sua validade etiológica (WILLNER, 1990). Entretanto, esse modelo apresenta-se como um dos melhores testes para identificar a ação dos antidepressivos em doses repetidas, sendo reprodutivo em vários laboratórios (KELLY et al., 1997).

A mudança comportamental mais observada pela técnica de bulbectomia é a resposta hiperativa imediata, que é revertida quase que

exclusivamente pelo tratamento crônico com antidepressivos, os motivos para esse tratamento crônico não são totalmente compreendidos (CRYAN et al., 1998). Estudos têm mostrado que as respostas hiperativas podem estar relacionadas ao aumento do comportamento defensivo ou nas alterações do comportamento motivacional (PRIMEAUX; HOLMES, 1999). Além disso, foi mostrado que os antidepressivos, fluoxetina, amitriptilina, desipramina e buspirona, aumentam a habituação à novidade em ratos bulboctemizados, e que seus efeitos não estão relacionados a perda do olfato (MAR et al., 2000).

Outros trabalhos têm focado as alterações neuroquímicas e fisiológicas que podem ser mais sensíveis aos comportamentos antidepressivos. Muito interesse tem sido colocado no sistema serotoninérgico como a hiperinervação do córtex frontal, e alterações estressoras pela atividade 5-HT mediadas, observadas após a bulbectomia (CONNOR et al., 1999). Além disso, o aumento do glutamato estriado, liberado durante a nova exposição induzida por hipersensibilidade tem demonstrado que essa ação apresenta um papel modulatório na resposta antidepressiva (HO et al., 2000). Tem sido sugerido que as mudanças estruturais correlacionam-se pouco com aquelas observadas em pacientes deprimidos (WRYNN et al., 2000). Slotki et al. (1999) compararam os efeitos comportamentais e bioquímicos da bulbectomia em ratos jovens e velhos, sendo sugerido que este teste pode ser um modelo animal útil para testar a terapêutica como as intervenções de depressão geriátrica.

1.3.3.4 Desamparo aprendido

O desamparo aprendido baseia-se no fato de que após repetidos choques incontroláveis, os animais demonstram deficiência em escapar que são revertidas pelos agentes antidepressivos, os déficits comportamentais são sensíveis a uma ampla variedade de antidepressivos cujo efeito é demonstrado em curto período de tratamento, entretanto, a principal desvantagem desse modelo é que a maior parte da depressão, não persiste 2-3 dias depois de encerradas as sessões de choque incontrolável (VOLLMAYR; HENN, 2001).

1.3.3.5 Outros modelos

Outros modelos destinados a designar estado depressivo em ratos e camundongos são: o teste do antagonismo dos efeitos da reserpina, o teste de suspensão da cauda e o teste de estresse moderado crônico. O primeiro consiste em observar nos ratos os efeitos da reserpina, como a ptose palpebral, hipotermia e acinesia. O segundo é efetuado em camundongos, o avaliador suspende o animal pela cauda por cinco minutos e as observações nesse experimento assemelham-se ao teste de nado forçado, pois a frustração em não conseguir escapar dessa situação faz que o animal fique imóvel. O terceiro modelo é realizado pela exposição de ratos a pequenos estressores imprevisíveis, por um período de dias ou semanas. Esses modelos têm finalidade de desenvolver estados depressivos que são prevenidos ou tratados com drogas antidepressivas (TEIXEIRA-SILVA et al., 2005).

1.4 ESTRESSE, DEPRESSÃO E ALTERAÇÕES IMUNOLÓGICAS

O estresse e a depressão além de desencadearem alterações psíquicas, estão intimamente ligados a alterações do sistema imune (ALTENBURG et al., 2002). O estresse crônico é tipicamente associado com a supressão do sistema imune, incluindo a menor eficácia do organismo no combate às doenças infecciosas e na redução do tempo da cicatrização de feridas (ROBLES et al., 2005). Segerstrom e Miller (2004) em estudo de revisão dos últimos 30 anos sobre o estresse e o sistema imune humano, concluíram que os estressores crônicos associam-se com uma maior imunossupressão sistêmica. Freire-Garabal et al. (1997) estudando camundongos observaram que os animais estressados apresentaram queda no peso do timo e redução da quantidade de células tímicas. No entanto, outros autores observaram que os animais estressados foram capazes de desenvolver respostas imunes eficientes contra bactérias (ALTENBURG et al., 2002). Baldwin et al. (1995) relataram que o teste de nado forçado não alterou o número de linfócitos na primeira semana de experimento, mas, próximo a quarta semana os animais apresentaram aumento do número de linfócitos circulantes. Segundo Pedersen e Hoffman-Goetz (2000), ratos submetidos ao estresse agudo pelo nado forçado apresentam aumento do número de neutrófilos circulantes.

Modelos animais usados para induzir depressão leve têm sido utilizados para alterar os parâmetros imunológicos incluindo o aumento na produção de IL-1 (KUBERA et al., 1996). Seidel et al. (1995) observaram que pacientes depressivos apresentam aumento acentuado na produção de interferon o que significa relação direta com o aumento da resposta inflamatória. Robles et al. (2005) apontam que o estresse crônico e a depressão podem melhorar efetivamente certas respostas imunológicas como a produção de citocinas pró-inflamatórias, que regulam a resposta imunológica do organismo contra infecções e lesões. Entretanto, um estudo mostrou que camundongos submetidos ao estresse suprimem o sistema imune, condição observada pela redução na proliferação celular e produção de citocinas pró-inflamatórias (células TCD4+, IFN- γ e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α)), fato que acarretou em maior susceptibilidade dos camundongos no combate ao linfoma singênico e conseqüentemente diminuição da sobrevivência desses animais (FRINCK et al., 2009a). Segundo Miller (2010) quando o indivíduo desenvolve depressão por qualquer motivo, essa condição reflete diretamente no sistema imunológico, suprimindo principalmente as células T (aumento da apoptose e diminuição na proliferação), comprometendo de forma direta e/ou indireta a vulnerabilidade do hospedeiro frente aos microorganismos patogênicos (ex. vírus, bactérias e fungos).

Em relação aos mecanismos de ação das citocinas, a literatura tem mostrado que elas apresentam papéis semelhantes quando comparadas a alguns neurotransmissores clássicos de canais de cálcio, ativação dos sistemas intracelulares do segundo mensageiro e estimulação das vias *mitogen-activated protein* (MAP) quinase. A indução de mediadores neuroquímicos, como prostaglandinas, também é responsável por alguns efeitos centrais das citocinas (ANISMAN et al., 2008). No entanto, os mecanismos das citocinas responsáveis pelos sintomas depressivos ainda não foram totalmente elucidados, mas possíveis sistemas candidatos têm sido propostos, na qual, citocinas pró-inflamatórias tem influenciado os neurotransmissores centrais e fatores de crescimento, que são apontados na causa da depressão (ex. CRH, 5-HT e BDNF), estas citocinas também podem afetar as vias enzimáticas envolvidas na produção de espécies reativas de oxigênio e de outros fatores neurodegenerativos (CHURCHILL et al. 2006).

1.5 ANTIDEPRESSIVOS E ALTERAÇÕES IMUNOLÓGICAS

Os antidepressivos atuais apresentam compostos específicos que atuam em regiões distintas do sistema nervoso central, assim, ao administrar antidepressivos em ratos ou camundongos é esperado melhora dos sintomas depressivos, ação observada pela redução no tempo de flutuação (comportamento passivo) e aumento no escalar e/ou nadar (comportamento ativo) quando submetidos ao teste de nado forçado, nesse caso, o aumento mais acentuado do escalar e/ou nadar são dependentes de qual droga será ministrada (CRYAN; LUCKI, 2000). Page et al. (1999) observaram redução no tempo do flutuar e aumento do nadar em ratos tratados com fluoxetina. Cryan e Lucki (2000) comparando a fluoxetina e a reboxetina verificaram que ambas às drogas desencadearam queda no tempo de flutuação, entretanto a primeira droga aumenta o tempo do nadar e a segunda o tempo do escalar de ratos.

Frinck et al. (2008) trabalhando com camundongos portadores de câncer e os tratando com fluoxetina observaram que esse antidepressivo apresenta relação direta com o aumento da produção de citocinas anti-tumorais (IFN- γ e TNF- α), resultando na menor taxa de crescimento tumoral e conseqüentemente no maior tempo de sobrevivência dos animais tratados com essa droga. Fazzino et al. (2009) verificaram que o uso de fluoxetina em ratos desencadeou aumento dos linfócitos TCD8⁺ e diminuição dos TCD4⁺ durante três semanas de uso contínuo do antidepressivo. Em camundongos foi observado que o estresse crônico acarreta diminuição dos linfócitos TCD4⁺ e manutenção dos linfócitos TCD8⁺, no entanto, quando tratados com fluoxetina esses animais conseguiram restabelecer os valores iniciais de linfócitos TCD4⁺ (FRINCK et al., 2009b). Segundo Freire-Garabal et al. (1997) os camundongos estressados e tratados com fluoxetina apresentaram maior quantidade de linfócitos circulantes que os seus respectivos controles (estressados e não tratados com fluoxetina). Kook et al. (1995) em estudo observaram que indivíduos depressivos apresentavam menores níveis de células NK circulantes que os indivíduos saudáveis, no entanto, quando os pacientes depressivos foram submetidos ao tratamento com fluvoxamina, verificou-se aumento significativo das NK circulantes.

Raedler (2011) em artigo de revisão sobre os mecanismos inflamatórios das desordens da depressão maior mostrou que os antidepressivos

tricíclicos, os inibidores da recaptção de serotonina, os serotoninérgicos e os noradrenérgicos, normalizam os níveis séricos de proteínas e citocinas inflamatórias, incluindo IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ . Por outro lado Bah et al. (2011) ao tratarem ratos Sprague-Dawley com 10 mg/kg/dia de escitalopram (um inibidor da recaptção de serotonina) por duas semanas, verificaram que os níveis de IL-1 β e TNF- α , reduziram quando comparados aos animais tratados com salina.

Kubera et al. (2011) ao tratarem camundongos de ambos os gêneros com 10 mg/kg/dia fluoxetina ou desipramina por 14 dias, observaram que após este período dependendo do gênero cada droga apresentava um efeito nas citocinas analisadas (IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α e IFN- γ), para os machos, o tratamento com fluoxetina não modificou a produção de nenhuma destas citocinas, enquanto, o tratamento com desipramina acarretou em aumento do IL-10 e redução do IL-12 e IFN- γ , condição contrária para as fêmeas, que ao serem tratadas com fluoxetina aumentam o IL-10 e reduziram o IL-12 e IFN- γ , já a desipramina não alterou as citocinas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar os efeitos da fluoxetina no comportamento e na imunidade humoral de ratos Wistar submetidos ao nado forçado.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a resposta imune humoral dos animais tratados ou não tratados com fluoxetina e submetidos ou não ao nado forçado.
- Analisar o comportamento dos animais tratados ou não tratados com fluoxetina e submetidos ou não ao nado forçado.
- Verificar a massa corporal dos ratos ao início e fim do experimento.
- Avaliar a massa dos órgãos linfóides (timo e baço) e da supra-renal dos ratos.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia celular e molecular**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
- ALMEIDA-FILHO, N.; MARI, J. J.; COUTINHO, E.; FRANÇA, J. F.; FERNANDES, J.; ANDREOLI, S. B.; BUSNELLO, E. D. Brazilian multicentric study of psychiatric morbidity. **The British Journal of Psychiatry**, v. 171, p. 524-529, 1997.
- ALMEIDA, O. P.; ALMEIDA, S. A. Confiabilidade da versão brasileira da escala de depressão em geriatria (GDS) versão reduzida. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 57, n. 2-B, p. 421-426, 1999.
- ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia Fundamentos Práticos**. Rio de Janeiro: ed. Guanabara Koogan, edição 1, p. 262-267, 232-239, 2006.
- ALTENBURG, A. S. P.; VENTURA, D. G.; DA-SILVA, V. A.; MALHEIROSA, L. R.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; BOZZA, P. T.; TEIXEIRA, N. A. The role of forced swim test on neutrophil leukocytosis observed during inflammation induced by LPS in rodents. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 26, p. 891– 895, 2002.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. DSM-IV-R, 1994. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**. 4th ed. APA, Washington, DC.
- ANISMAN, H.; MERALI, Z.; NEUROTRANSMITTER, S. H.; Neurotransmitter, peptide and cytokine processes in relation to depressive disorder: Comorbidity between depression and neurodegenerative disorders. **Progress in Neurobiology**, v. 85, p. 1-74, 2008.
- AUTRY, A. E.; ADACHI, M.; CHENG, P.; MONTEGGIA, L. M. Gender-Specific Impact of Brain-Derived Neurotrophic Factor Signaling on Stress-Induced Depression-Like Behavior. **Biological Psychiatry**, v. 66, p. 66-84, 2009.
- BAH, T. M.; BENDERDOURA, M.; KALOUSTIANA, S.; KARAMA, R.; ROUSSEAU, G.; GODBOUTA, R. Escitalopram reduces circulating pro-inflammatory cytokines and improves depressive behavior without affecting sleep in a rat model of post-cardiac infarct depression. **Behavioural Brain Research**, v. 225, p. 243-251, 2011.
- BALDESSARINI, R. J. Fármacos e o tratamento dos distúrbios psiquiátricos: depressão e distúrbios de ansiedade. In: GOODMAN-GILMAN, A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil Ltda, 2005. p. 339-364.
- BALDWIN, D. R.; WILCOX, Z. C.; BAYLOSIS, R. C. Impact of Differential Housing on Humoral Immunity Following Exposure to an Acute Stressor in Rats. **Physiology and Behavior**, v. 57, n. 4, p. 649-653, 1995.
- BARROS, H. M. T.; FERIGOLO, M. Ethopharmacology of imipramine in the forced-swimming test: gender differences. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, p. 279–286, 1998.

BEZCHLIBNYK-BUTLER, K. Z.; JEFFRIES, J. J. **Clinical handbook of psychotropic drugs**. Hogrefe & Huber, 1999.

BORSINI, F.; MELI, A. Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? **Psychopharmacology**. v. 94, p.147 – 160, 1988.

BLUMENTHAL, J. A.; BABYAK, M. A.; MOORE, K. A.; CRAIGHEAD, W. E.; HERMAN, S.; KHATRI, P.; WAUGH, R.; NAPOLITANO, M. A.; FORMAN, L. M.; APPELBAUM, M.; DORAISWAMY, P. M.; KRISHNAN, K. R. Effects of exercise training on older patients with major depression. **Archives of Internal Medicine**, v. 159, n. 19, p. 2349-2356, 1999.

CAMELO, S. H. H.; ANGERAMI, E. L. S. Sintomas de estresse nos trabalhadores atuantes em cinco núcleos de saúde da família. **Revista Latino-americana de Enfermagem**, v. 12, n. 1, p. 14-21, 2004.

CARRASCO, G. A.; van de KAR, L. D. Neuroendocrine pharmacology of stress. **European Journal of Pharmacology**. v. 463, p. 235-272, 2003.

CHRISTOPHORO, R.; WAIMAN, M. A. P. Stress: condições de trabalho em docente universitários. **Revista Ciência, Cuidado e Saúde Maringá**, v. 1, n. 1, p. 171-175, 2002.

CHURCHILL, L.; TAISHI, P.; WANG, M.; BRANDT, J.; CEARLEY, C.; REHMAN, A.;

KRUEGER, J. M. Brain distribution of cytokine mRNA induced by systemic administration of interleukin-1beta or tumor necrosis factor alpha. **Brain Research**, v. 1120, p. 64-73, 2006.

CONNOR, T. J.; CAI, S.; LEONARD, B. E.; ANISMAN, H.; MERALI, Z. Stressor-induced alterations in serotonergic activity in an animal model of depression. **NeuroReport**, v. 10, p. 523–528, 1999.

CORDIOLI, A. V. **Psicofármacos**: consulta rápida. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.

CORTEZ, C. M.; SILVA, D. Implicações do estresse sobre a saúde e a doença mental. **Arquivos Catarinenses de Medicina**. v. 36, n. 4, p. 96-108, 2007.

CRYAN, J. F.; McGRATH, C.; LEONARD, B. E.; NORMAN, T. R. Combining pindolol and paroxetine in an animal model of chronic antidepressant action – can early onset of action be detected? **European Journal of Pharmacology**, v. 352, n. 1, p. 23–28, 1998

CRYAN, J. F.; LUCKI, I. Antidepressant-Like Behavioral Effects Mediated by 5-Hydroxytryptamine 2C Receptors1. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 295, n. 3, p. 1120-1126, 2000.

CUNHA, B. F. V.; BUZAID, A.; WATANABE, C. E.; ROMANO, B. W. Depressão na infância e adolescência: Revisão bibliográfica. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v. 3, Supl. A, p. 1-8, 2005.

DEITOS, F.; COPETTE, F. R.; PASQUALOTTO, A. C.; SEGAT, F. M.; SANTOS, R. P.; GUILLANDE, S. Antidepressivos e seus efeitos colaterais, quais são e como reconhecê-los. **Revista Brasileira de Clínica Terapêutica**, v.25, n. 2, p. 63-70, 1999.

DETKE, M. J.; JENNIE, J.; IRWIN, L. Acute and chronic antidepressant drug treatment in the rat forced swimming test model of depression. **Experimental and Clinical Psychopharmacology**, v. 5, n. 2, p. 107-112, 1997.

FAZZINO, F.; URBINA, M., CEDEÑO, N.; LIMA, L. Fluoxetine treatment to rats modifies serotonin transporter and cAMP in lymphocytes, CD4+ and CD8+ subpopulations and interleukins 2 and 4. **International Immunopharmacology**, v. 9, p. 463–467, 2009.

FEIGHNER, J. P. Mechanism of Action of Antidepressant Medications. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 60, n. 4, p. 4-11, 1999.

FREIRE-GARABAL, M.; NLIFIEZ, M. J.; LOSADA, C.; PEREIRO, D.; RIVEIRO, M. P.; GONZALEZ-PATIAO, E.; MAYAN, J. M.; REY-MENDEZ, M. Effects of fluoxetine on the immunosuppressive response to stress in mice. **Life Sciences**, v. 60, n. 26, p. 403-413, 1997.

FRICK, L. R.; BARREIRO ARCOS, M. L.; RAPANELLI, M.; ZAPPIA, M. P.; BROCCO, M.; MONGINI, C.; GENARO, A. M.; CREMASCHI, G. A. Chronic restraint stress impairs T-cell immunity and promotes tumor progression in mice. **Stress: The International Journal on the Biology of Stress**, v. 12, n. 2, p. 134 – 143, 2009a.

FRICK, L. R.; RAPANELLI, M.; CREMASCHI, G. A.; GENARO, A. M. Fluoxetine directly counteracts the adverse effects of chronic stress on T cell immunity by compensatory and specific mechanisms. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 23, p. 36–40, 2009b.

FRICK, L. R.; PALUMBO, M. L.; ZAPPIA, M. P.; BROCCO, M. A.; CREMASCHI, G. A.; GENARO, A. M. Inhibitory effect of fluoxetine on lymphoma growth through the modulation of antitumor T-cell response by

serotonin-dependent and independent mechanisms. **Biochemical Pharmacology**, v.75, p. 1817-1826, 2008.

GEYER, M. A.; MARKOU, A. Animal models of psychiatric disorders. In: BLOOM, F. E.; KUPFER, D. J. **Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress**. New York, Raven Press, Ltd., 1995, p. 787–798.

GOODNICK, P.J.; GOLDSTEIN, B. J. Selective serotonin reuptake inhibitors in affective disorders-I: Basic pharmacology. **Journal of Psychopharmacology**, v. 12, n. 3, p.3-20, 1998.

GORENSTEIN, C.; SCAVONE, C. Antidepressivos. In: DELUCIA, R.; OLIVEIRA-FILHO, R. M.; PLANETA, C. S.; GALLACCI, M.; AVELLAR, M. C. W. (Org.) **Farmacologia Integrada**. 3. ed. Rio de Janeiro: REVINTER, 2007. p. 226-232.

GUIMARÃES, D. T. **Dicionário de Termos Médicos e de Enfermagem**. São Paulo: Rideel, 2002.

HO, Y. J.; CHANG, Y. C.; LIU, T. M.; TAI, M. Y.; WONG, C. S.; TSAI, Y. F. Striatal glutamate release during novelty exposure-induced hyperactivity in olfactory bulbectomized rats. **Neuroscience Letters**, v. 287, p. 117–120, 2000.

HORST, W. D.; PRESKORN, S. H. Mechanism of action and clinical characteristics of three atypical antidepressants: venlafaxine, nefazodone, bupropion. **Journal of Affective Disorders**, v. 51, p. 237-254, 1998.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. J. **Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença**. 6ª ed. São Paulo: Artmed, 2007.

KELLY, J. P.; WRYNN, A. S.; LEONARD, B. E. The olfactory bulbectomized rat as a model of depression: an update. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 74, p. 299–316, 1997.

KENDLER, K. S.; KESSLER, R. C.; WALTERS, E. E.; MACLEAN, C.; NELAE, M. C.; HESTH, A. C.; EAVES, L. J. Stressful life events, genetic liability, and onset of an episode of major depression in women. **The American Journal of Psychiatry**, v. 152, n. 6, p. 833-842, 1995.

KIMMEL, P. L. Psychosocial factors in adult end-stage renal disease patients treated with hemodialysis: correlates and outcomes. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 35, n. 4, p. 132-140, 2000.

KOOK, A. I.; MIZRUCHIN, A.; ODOPOZOV, N.; GERSHON, H.; SEGEV, Y. Depression and Immunity: The Biochemical Interrelationship between the Central Nervous System and the Immune System. **Society of Biological Psychiatry**, v. 37, p. 817-819, 1995.

KRISHNAN, K. R. R. Inibidores da Monoamino Oxidase. In: **Fundamentos de Psicofarmacologia Clínica**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 33-40.

KUBERA, M.; SYMBIRTSEV, A.; BASTA-KAIM, A.; BORYCZ, J.; ROMAN, A.; PAPP, M.; CLAEISSON, M. Effect of chronic treatment with imipramine on interleukin 1 and interleukin 2 production by splenocytes obtained from rats subjected to a chronic mild stress model of depression. **Polish Journal of Pharmacology**, v. 48, n. 5, p. 503–506, 1996.

KUBERA, M.; GRYGIER, B.; WRONA, D.; ROGÓŻ, Z.; ROMAN, A.; BASTA-KAIM, A.; BUDZISZEWSKA, B.; LESKIEWICZ, M.; JANTAS, D.; NOWAK, W.; MAES, M.; LASON, W. Stimulatory effect of antidepressant drug pretreatment on progression of B16F10 melanoma in high-active male and female C57BL/6J mice. **Journal of Neuroimmunology**, v. 240-241, p. 34-44, 2011.

LAWERYI, S.; SULLIVAN, K. C. C. H.; VOWLLER, D.; FYSON, N. **Enciclopédia da Saúde o Guia Completo da Medicina Alternativa**. São Paulo: Clube Internacional do Livro. p. 184-265, 2001.

LEITE, V. S.; MOTTA, D. D.; JUNIOR, M. S.; ARAUJO, S. M.; PUPULIN, Á. R. T. Depressão, estresse e alexitimia em pacientes com infecção pelo vírus HIV. **Acta Scientiarum: Health Science**. v. 29, n. 1, p. 67-71, 2007.

LIMA, I. V. M.; SOUGEY, E. B.; FILHO, H. P. V. Farmacogenética do tratamento da depressão: busca de marcadores moleculares de boa resposta aos antidepressivos. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 31, n. 1, p. 40-43, 2004.

LIPP, M. E. N. **Stress, hipertensão arterial e qualidade de vida**. 1.ed. São Paulo: Papyrus, 1994.

LUCKI, I. The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. **Behavioral Pharmacology**, v. 8, p.523–532, 1997.

MAIER, S. F.; WATKINS, L. R. Stressor controllability and learned helplessness: the roles of the dorsal raphe nucleus, serotonin, and corticotropin-releasing factor. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. v. 29, p. 829-841, 2005.

MAR, A.; SPREEKMEESTER, E.; ROCHFORD, J. Antidepressants preferentially enhance habituation to novelty in the olfactory bulbectomized rat. **Psychopharmacology**, v. 150, n. 1, p. 52–60, 2000.

MARGIS, R.; PICON, P.; COSNER, A. F.; SILVEIRA, R. O. Relação entre estressores, estresse e ansiedade. **Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul**. v. 25, n. 1, p. 65-74, 2003.

MENEZES, H. S.; BUENO, B. B. M.; CIULLA, L.; SCHUH, A.; LUZ, F. F.; ALVES, R. J. V.; ABEGG, M. P.; CIRINO, S. L. M. B. Antidepressant behavioral effects of duloxetine and amitriptyline in the rat forced swimming test. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 23, n. 5, p. 447-450, 2008.

MILLER, A. H. Depression and immunity: A role for T cells? **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 24, p. 1-8, 2010.

MOLINA-HERNANDEZ, M.; TELLEZ-ALCANTARA, N. P. Antidepressant-like actions of pregnancy, and progesterone in Wistar rats forced to swim. **Psychoneuroendocrinology**, v. 26, p. 479–491, 2001.

MORENO, R. A.; MORENO, D. H.; SOARES, M. B. M. Psicofarmacologia de antidepressivos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v.21, p. 24-40, 1999.

MUROFUSE, N. T.; ABRANCHES, S. S.; NAPOLEÃO, A. A. Reflexões sobre estresse e *burnout* e a relação com a enfermagem. **Revista Latino-americana de Enfermagem**. v. 13, n. 2, p. 255-261, 2005.

NAHAS, M. V. **Atividade física, saúde e qualidade de vida**: conceitos e sugestões para um estilo de vida ativo. 4.ed. Londrina: Midiograf, 2006.

NÚÑEZ, M. J.; BALBOA, J.; RODRIGO, E.; BRENLLA, J.; GONZÁLEZ-PETEIRO, M.; FREIRE-GARABAL, M. Effects of fluoxetine on cellular immune response in stressed mice. **Neuroscience Letters**, v. 396, p. 247–251, 2006.

OLIVEIRA, M. C.; FILHO, A. A. P.; SCHUCH, T.; MENDONÇA, W. L. Sinais e sintomas sugestivos de depressão em adultos com hipotireoidismo primário. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 45, n. 6, p. 570-575, 2001.

PAGE, M. E.; DETKE, M. J.; KIRBY, A. D. L. G.; LUCKI, I. Serotonergic mediation of the effects of fluoxetine, but not desipramine, in the rat forced swimming test. **Psychopharmacology**, v. 147, p.162–167, 1999.

PEDERSEN, K. B.; HOFFMAN-GOETZ, L. Exercise and the immune system: regulation, integration and adaptation. **Physiology Reviews**, v. 80, n. 3, p. 1055-1081, 2000.

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

POST, R. M. Transduction of psychosocial stress into the neurobiology of recurrent affective disorder. **American Journal of Psychology**. v. 149, n. 8, p. 999-1010, 1992.

PRIMEAUX, S. D.; HOLMES, P. V. Role of aversively motivated behavior in the olfactory bulbectomy syndrome. **Physiology and Behavior**, v. 67, p. 41–47, 1999.

RAEDLER, T. J. Inflammatory mechanisms in major depressive disorder. **Current Opinion in Psychiatry**, v. 24, p. 519-525, 2011.

REY, L. **Dicionário de termos técnicos de medicina e saúde**. 1.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1999.

ROBLES, T. F.; GLASER, R.; KIECOLT-GLASER, J. K. A New Look at Chronic Stress, Depression, and Immunity. **Current Directions in Psychological Science**. v. 14, n. 2, p. 111-115, 2005.

ROGÓŻ, Z.; SKUZA, G.; LEŚKIEWICZ, M.; BUDZISZEWSKA, B. Effects of co-administration of fluoxetine or tianeptine with metyrapone on immobility time and plasma corticosterone concentration in rats subjected to the forced swim test. **Pharmacological Reports**, v. 60, p. 880–888, 2008.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. 6.ed. São Paulo: Manole, 2004.

SEGERSTROM, S. C.; MILLER, G. E. Psychological Stress and the Human Immune System: A Meta-Analytic Study of 30 Years of Inquiry. **Psychopharmacology Bulletin**, v. 130, n. 4, p. 601–630, 2004.

SEIDEL, A.; AROLT, V.; HUNSTIGER, M.; RINK, L.; BEHNISCH, A.; KIRCHNER, H. Cytokine production and serum proteins in depression. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 41, p. 534–538, 1995.

SELYE, H. A Syndrome produced by diversal nocuous agents. **Nature**, p. 13-32, 1936.

STACCIARINI, J. M. R.; TRÓCCOLI, B. T. O estresse na atividade ocupacional do enfermeiro. **Revista Latino-americana de Enfermagem**, v. 9, n. 2, p. 17-25, 2001.

STELLA, F.; GOBBI, S.; CORAZZA, D. I.; COSTA, J. L. R. Depressão no Idoso: Diagnóstico, Tratamento e Benefícios da Atividade Física, **Revista Motriz**, v. 8, n. 3, p. 91-98, 2002.

STOGNER, K. A.; HOLMES, P. V. Neuropeptide- Y exerts antidepressant-like effects in the forced swim test in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 387, n. 2, p. 9–10, 2000.

SZAKAL, A. K.; KOSCO, M. H.; TEW, J. G. Microanatomy of lymphoid tissue during humoral immune responses: structure function relationships. **Annual Review of Immunology**, v.7, p. 91-109, 1989.

TEIXEIRA-SILVA, F.; QUEIROGA, M. N. G.; VARELA, R. W. B.; FECHINE, M. F. Métodos para Avaliar Drogas Antidepressivas. In: ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**. 1.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p. 262-274.

VALENTINI, W.; LEVAV, I.; KOHN, R.; MIRANDA, C. T.; MELLO, A. A. F.; MELLO, M. F.; RAMOS, C. P. Treinamento de clínicos para o diagnóstico e tratamento da depressão. **Revista de Saúde Pública**, v. 38, n. 4, p. 522-528, 2004.

VISMARI, L.; ALVES, G. J.; PALERM-NETO, J. Depressão, antidepressivos e sistema imune: um novo olhar sobre um velho problema. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 35, n. 5, p.196-204, 2008.

VOLLMAYR, B.; HENN, F. A. Learned helplessness in the rat: improvements in validity and reliability. **Brain Research Protocols**, v. 8, p.1–7, 2001.

WARD, H. E.; AZZARO, A. J. Drogas usadas nos distúrbios de humor. In: CRAIG, C. R.; STITZEL, R. E. **Farmacologia modernar: com aplicações clínicas**. 6. ed. Rio de Janeiro: GUANABARA KOOGAN, 2005. p. 361-371.

WILLNER, P. Animal models of depression: an overview. **Pharmacology and Therapeutics**. v. 45, p. 425–455, 1990.

WONG, M.; LICINIO, J. Research and treatment approaches to depression. **Nature Reviews Neuroscience**, v.2, .343–351, 2001.

WRYNN, A. S.; SWEENEYA, C. P. M.; FRANCONIC, F.; LEMAIRE, L.; POULIQUEND, D.; HERLIDOUÉ, S.; LEONARD, B. E.; GANDONA, J. M.; CERTAINESE, J. D. An *in-vivo* magnetic resonance imaging study of the olfactory bulbectomized rat model of depression. **Brain Research**, v. 879, p. 193–199, 2000.

ZORRILLA, E. P.; LUBORSKY, L.; MCKAY, J. R.; ROSENTHAL, R.; HOULDIN, A.; TAX, A.; MCCORKLE, R.; SELIGMAN, D. A.; SCHMIDT, K. The relationship of depression and stressors to immunological assays: a meta-analytic review. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 15, n. 3, p. 199–226, 2001.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Artigo submetido ao periódico Psicologia: Teoria e Pesquisa

Título pleno: Efeito imunomodulador e comportamental da fluoxetina sobre ratos Wistar submetidos ao nado forçado

Título abreviado: Imunomodulação por Fluoxetina

Título em Inglês: Immunomodulatory effect of fluoxetine on behavioral and Wistar rats submitted to forced swimming

RESUMO

A fluoxetina é uma droga com ação no comportamento e sobre diversos sistemas do organismo. Neste estudo verificamos os efeitos da fluoxetina na imunidade e no comportamento de ratos Wistar submetidos ao nado forçado e tratados com três doses de 10mg/kg de fluoxetina ou com solução salina por 12 dias. No 5º dia os ratos foram imunestimulados com hemácias de carneiro 2,5% e no 12º dia as sessões de nado forçado foram filmadas para avaliação comportamental. Amostras de plasma foram coletadas no 5º e 12º dia. Os animais tratados com fluoxetina apresentaram menor produção de anticorpos anti-hemácias e tempo de flutuação, e maior tempo de nado. Os resultados sugerem que a fluoxetina atenua o desespero comportamental e modula a produção de anticorpos, $P < 0,05$.

Palavras-chave: imunidade humoral, massa corporal, nado forçado e fluoxetina.

ABSTRACT

Fluoxetine is a drug with action on behavior and on various body systems. In this study, we verified the effects of fluoxetine on immunity and the behavior of Wistar rats submitted to forced swimming and treated with three doses of 10mg/kg of fluoxetine or saline for 12 days. On day 5th the rats were immunized with red blood cell and 12th day forced swimming sessions were videotaped for behavioral assessment. Plasma samples were collected at 5th and 12th days. The animals treated with fluoxetine had lower total production of antibodies and time of flotation, and increased swim time. The results suggest that fluoxetine attenuates the behavioral despair and modulates the production of antibodies, $P < 0,05$.

Keywords: antibody, body weight, forced swimming and fluoxetine.

Introdução

A depressão é um transtorno do humor de alta prevalência e que envolve risco de morte, pois parte das pessoas acometidas tentam ou mesmo chegam a realizar suicídio (Rey, 1999; Baldessarini, 2005). Fatores estressantes diários como o trânsito turbulento, pouco sono e falta de lazer, além das grandes jornadas de trabalho e a poluição ambiental, predisõem à depressão (Stacciarini & Tróccoli, 2001).

Além das alterações psicológicas, a depressão modula o sistema imunológico (Altenburg & cols., 2002). Robles, Glaser e Kiecolt-Glaser (2005) apontam que a depressão tem relação direta na produção de citocinas pró-inflamatórias, na defesa do hospedeiro contra microrganismos patogênicos e nas lesões. Diversos estudos encontraram evidências de que o indivíduo depressivo apresenta níveis elevados de citocinas como a interleucina 2 (IL-2), interleucina 6 (IL-6) e interferon-alfa (IFN- α) (Seidel & cols., 1995; Vismari, Alves & Palerm-Neto., 2008) e supressão das células T (aumento da apoptose e diminuição na proliferação celular), comprometendo de forma direta e/ou indireta a imunidade do hospedeiro frente aos microorganismos (Miller, 2010).

O uso de antidepressivos no tratamento de pacientes com depressão iniciou-se no fim dos anos 50, desde então houve grande avanço no tratamento e na compreensão dos possíveis mecanismos relacionados à depressão (Deitos & cols., 1999). Somente duas classes de antidepressivos eram conhecidas até a década de 80, os tricíclicos (ADTs – Antidepressivos tricíclicos) e os inibidores de monoaminoxidase (IMAO), apesar de eficazes, eram inespecíficos e acarretavam inúmeros efeitos colaterais (Moreno, Moreno & Soares, 1999). Nos últimos 20 anos, novas classes de antidepressivos foram descobertas. Os inibidores seletivos da recaptação de serotonina pertencem a essa nova geração de drogas antidepressivas, sendo a fluoxetina a droga mais prescrita para o tratamento da depressão e

ansiedade, devido sua eficácia, segurança e tolerabilidade (Leite & cols., 2007; Egeland, Warner-Schmidt, Greengard & Svenningsson., 2010).

A investigação experimental da depressão em humanos é, em grande parte, eticamente inviável. Assim, modelos animais de depressão têm sido desenvolvidos para esse fim (Willner, 1991). O teste de nado forçado é um modelo muito utilizado para avaliar a atividade antidepressiva pré-clínica e os efeitos das drogas antidepressivas (Porsolt, Le Pichon & Jalfre., 1977). Sua grande utilização decorre principalmente pela fácil execução, fidedignidade dos resultados em vários laboratórios e sua habilidade em detectar a ação de quase todas as classes de antidepressivos existentes na atualidade (Borsini & Meli, 1988).

Modelos animais de estresse/depressão têm mostrado alterações no sistema imune, incluindo o aumento na produção de IL-1 e do número de neutrófilos circulantes e menor resistência a infecção por bactérias (Kubera & cols., 1996; Pedersen & Hoffman-Goetz, 2000; Altenburg & cols., 2002; Robles & cols., 2005; Miller, 2010). Camundongos transgênicos para o comportamento depressivo, a catalepsia, inoculados com hemácias de carneiro (HC) apresentaram menores quantidades de células formadoras de plaquetas e linfócitos T específicos para o antígeno, quando comparado aos seus progenitores, sem este distúrbio (Alperina, Kulikov, Popova & Idova, 2007). Loskutova, Idova e Gevorgyan (2007) trabalhando com ratos Wistar com alto nível de ansiedade, também verificaram que após cinco dias da inoculação com HC, apresentam menores concentrações de linfócitos T específicos.

Neste trabalho analisamos o efeito da fluoxetina em relação às alterações imunológicas (resposta imune humoral), na variação da massa corporal e no comportamento de ratos Wistar submetidos ao estresse crônico de nado forçado por doze dias, na qual os animais receberam três doses diárias de fluoxetina. A produção de anticorpo foi avaliada sete dias após os ratos serem inoculados com hemácia de carneiro.

Materiais e Métodos

Animais

Os procedimentos experimentais foram realizados em conformidade com o Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina, projeto nº 6977, processo nº 16828/2010.

Foram utilizados 10 ratos Wistar machos, com massa corporal entre 250 - 300 gramas, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina.

Os animais foram divididos randomicamente em dois grupos de 5 animais: grupo fluoxetina (GF) e grupo salina (GS). Ambos os grupos foram submetidos ao teste de nado forçado e sensibilizados com hemácia de carneiro no quinto dia de estudo.

O experimento foi conduzido no biotério do Departamento de Psicologia Geral e Análise do Comportamento do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina, os ratos foram mantidos em gaiolas de polipropileno (40 cm x 34 cm x 17 cm) com cinco animais por gaiola. A água e a ração foram disponibilizadas *ad libitum* para os animais durante todo o experimento (exceto durante a realização dos testes). A temperatura do biotério foi mantida em aproximadamente 25°C, sendo estabelecido um ciclo de 12 horas de claro/escuro (luz a partir das 7:00 da manhã). A massa corporal dos animais foi mensurada diariamente antes da realização dos testes, para o delineamento da quantidade que cada animal iria receber de droga ou salina.

Protocolo de Nado Forçado

O modelo de nado forçado foi realizado de acordo com o proposto por Lucki (1997). Os animais realizaram o teste de nado forçado em cilindros de plástico preto (50 cm de altura e 22 cm de diâmetro) com água na profundidade de 30 cm e temperatura média de $25 \pm 2^\circ\text{C}$,

os testes foram realizados individualmente por 15 minutos em 12 dias consecutivos, das 12:00 às 14:00 horas. Ao terminar o teste cada animal era retirado do cilindro e enxugado com toalha. Entre as seções, a água do cilindro recém utilizado era escoada e o cilindro higienizado com álcool.

Aplicação de Fluoxetina

Após o primeiro contato dos animais com o teste de nado forçado (pré-teste), os ratos receberam intraperitonealmente (i.p.) três doses diárias de 10mg/kg de fluoxetina ou salina (23h30min; 5h; e 1h) antes do próximo teste de nado forçado. Processo que foi realizado por doze dias consecutivos (1º ao 12º).

Avaliação Comportamental

Para análise comportamental, os animais foram filmados com filmadora digital acoplada ao teto do biotério durante os primeiros cinco minutos do 2º e 12º dia de teste. Após a realização dos testes as imagens foram arquivadas em computador, analisando-se o tempo que os animais flutuam, nadam e escalam o cilindro. Os tempos gasto nos seguintes comportamentos foram mensurados: flutuação (completa imobilidade ou movimentos suaves, apenas o suficiente para manter o nariz/cabeça acima da superfície da água); escalada (movimentos vigorosos com as patas dianteiras acima da superfície da água ou contra a parede do cilindro); natação (tempo em que o animal se movimenta dentro do cilindro com o corpo na horizontal, sem quebrar a superfície da água com as patas dianteiras, também foi considerado nado quando o animal manteve o corpo abaixo da superfície da água). As gravações comportamentais foram analisadas por um observador treinado e os resultados foram considerados fidedignos após nova avaliação, com índices de concordância superiores a 0,85 ou inferiores a 1,15.

Imunização

No 5º dia de estudo, ao terminarem o teste de nado forçado, todos os animais foram sedados por inalação não letal de éter etílico. A seguir foi realizada a coleta de 500 µL de sangue por punção cardíaca de cada animal, após a coleta os animais foram inoculados i.p. com 250 µL de solução de HC a 2,5%. O sangue coletado foi armazenado em tubos plásticos de 1,5 ml, contendo EDTA 5%.

Sacrifício

No 12º dia de estudo, após terminarem o teste de nado forçado, os animais foram sedados por inalação de dose não letal de éter etílico, sendo coletado por punção cardíaca aproximadamente 1,5 ml de sangue, em tubos plásticos contendo EDTA 5%. Após esse procedimento, os animais foram sacrificados por inalação de dose letal de éter etílico.

Hemaglutinação

Inicialmente, sangue de carneiro foi coletado em tubos de vidro com solução de *Alsever* (Glicose 20,5g; Citrato de sódio 8 g; Cloreto de sódio 4,2 g, água destilada q.s.p. 1000 ml e ácido cítrico para ajuste do pH em 6.1) v/v. Posteriormente esse sangue foi centrifugado a 2000 rpm por 5min em temperatura ambiente (TA). Após a centrifugação foi descartada a camada leucocitária e o sobrenadante. As hemácias foram suspendidas em PBS 1X pH 7,2 e centrifugadas novamente a 2000 rpm por 5 min. Procedimento que foi repetido por mais duas vezes.

Para a determinação dos títulos de anticorpos totais anti-hemácia, as amostras de plasma foram inativadas a 56°C por 30 minutos e diluídas serialmente (fator 2) em placas de microtitulação com fundo em U. Para isso, foram aplicados 25µl de PBS 1X em doze poços. Então, no 1º poço foi aplicado 25 µl de plasma inativado. Após homogenização, 25µl foram

transferidos para o 2º poço e assim sucessivamente até o 11º poço. O 12º poço serviu como o controle negativo e não recebeu amostra de plasma.

Para a determinação dos títulos de anticorpos da classe IgG, as amostras de plasma, previamente inativadas, foram incubadas com igual volume de 0.2 M 2-mercaptoetanol preparado em PBS 1X pH 7.2 por 30 minutos a 37°C. A seguir os processos de diluição e divisão do plasma foram os mesmos descritos acima.

Após a diluição das amostras foi adicionado 25µl de hemácia de carneiro a 2% e a microplaca foi incubada por 2 horas a TA e 22 horas a 4°C. O título foi considerado como a maior diluição em que se observa uma aglutinação positiva das hemácias.

Análises Estatísticas

Após constatação da normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, os resultados obtidos foram agrupados em valores de média e erro-padrão utilizando-se do programa estatístico Statistica 5.0[®]. Foi utilizado Teste *t Student* para comparar os grupos em relação à massa corporal, e Anova Two Way para comparar os grupos nos vários momentos (pré e pós) e entre si em relação à produção de anticorpo anti-hemácia de carneiro e análise comportamental, seguido do teste de *post hoc* de Tukey HSD quando constatadas diferenças. O índice de significância mínimo adotado foi de $P < 0.05$.

Resultados

A Figura 1 mostra os valores na produção de anticorpos totais anti-hemácias dos animais salina e fluoxetina. O teste de Anova Two Way mostrou que não houve efeito da fluoxetina ($F[1,8] = 0,595$, $P > 0,05$), e houve efeito da repetição de sessões ($F[1,8] = 25,928$, $P < 0,001$), não existindo interação entre estes fatores ($F[1,8] = 0,595$, $P > 0,05$). Na comparação entre os momentos pré e pós imunização, o teste de Tukey HSD mostrou

aumento na produção de anticorpos totais anti-hemácias apenas no grupo controle. Os anticorpos totais detectados eram predominantemente da classe IgM, uma vez que as reações de hemaglutinação na presença de 2-mercaptoetanol foram todas negativas (Dados não mostrados).

Figura 1

Houve uma mudança significativa na massa corporal dos animais salina e fluoxetina (Figura 2). O teste *t* para amostras independentes mostrou diferença entre os grupos ($t[8]=7,355; P<0,001$).

Figura 2

Na figura 3 são mostrados os tempos do comportamento de Escalar. A Anova mostrou que houve efeito da fluoxetina ($F[1,8] = 9,115, P<0,05$) e da repetição de sessões ($F[1,8] = 25,617, P<0,001$), entretanto, não existiu interação entre estes fatores ($F[1,8] = 0,502, P>0,05$). Na comparação entre o segundo e o 12º dia, o teste de Tukey HSD mostrou queda apenas no tempo do grupo controle enquanto o grupo fluoxetina não alterou seu tempo.

Figura 3

Sobre a variável tempo de nado, a análise estatística mostrou que não houve efeito da fluoxetina ($F[1,8] = 0,612, P>0,05$) e nem da repetição de sessões ($F[1,8] = 2,708, P>0,05$), entretanto existiu interação entre estes fatores ($F[1,8] = 31,619, P<0,001$) (Figura 4). Na comparação entre o segundo e o 12º dia, o teste de Tukey HSD mostrou queda apenas no tempo do grupo controle enquanto o grupo fluoxetina não alterou seu tempo. O teste ainda mostrou que, quando os grupos são comparados no 12º dia, o fluoxetina nadou mais.

Figura 4

A Figura 5 mostra as durações do comportamento de flutuar. A Anova mostrou efeito da fluoxetina ($F[1,8] = 6,420, P<0,05$) e da repetição de sessões ($F[1,8] = 92,404, P<0,001$) e interação entre estes fatores ($F[1,8] = 76,101, P<0,001$). Na comparação entre o segundo e o 12º dia, o teste de Tukey HSD mostrou aumento apenas no grupo controle e não no grupo fluoxetina. O teste ainda mostrou que, quando os grupos são comparados no 12º dia, o fluoxetina flutuou menos.

Figura 5

Discussão

O presente estudo investigou os efeitos da administração crônica de fluoxetina sobre a produção de anticorpos anti-hemácias, a massa corporal e o comportamento em ratos submetidos diariamente ao teste do nado forçado, um modelo animal de depressão. Os resultados mostraram que a fluoxetina leva a supressão da produção de anticorpos, perda de massa corporal e atenuação ou reversão das alterações comportamentais. No presente estudo o tratamento com fluoxetina suprimiu a produção de anticorpos anti-hemácias de carneiro, sendo a maioria da classe IgM, fato confirmado pelo tratamento com 2-mercaptoetanol. Kennedy e cols. (2005) ao submeterem ratos ao estresse agudo intenso de contenção, verificaram que o mesmo foi capaz de suprimir a produção de anticorpos das classes IgM e IgG2a, produzidos através da resposta imune celular padrão Th1, entretanto, esse estresse não alterou a produção de anticorpos IgG1, relacionado a resposta imune humoral padrão Th2. Baldwin, Wilcox e Bayliss (1995), ao submeterem ratos a um regime de estresse que pode ser considerado subcrônico (nado forçado por 3-5 dias) após a imunização intraperitoneal com 1mL hemácia de carneiro 10%, não observaram diferença na produção de anticorpos entre ratos estressados e não estressados. Com exceção desse último estudo, no qual se usou uma grande quantidade de antígeno, os demais (incluído o presente estudo) indicam que a produção de anticorpos é sensível ao estresse e ao tratamento crônico com fluoxetina. Por outro lado, em camundongos portadores de artrite reumatóide e tratados por sete dias com fluoxetina (10 ou 25 mg/kg/dia) não foi observado alteração nos níveis de anticorpos (IgG1 e IgG2a) anti-colágeno (Sacre, Medghalchi, Gregory, Brennan & Williams., 2010).

Ação imunossupressora da fluoxetina pode não ser restrita apenas na produção de anticorpos. Pellegrino e Bayer (2002) observaram que a proliferação *in vitro* dos linfócitos de ratos, que receberam fluoxetina intraperitonealmente (5mg/kg) duas horas antes de serem

sacrificados. foi menor que seus respectivos controles, mostrando um papel imunossupressor desse antidepressivo para os linfócitos. Fazzino, Urbina, Cedeño e Lima (2009) verificaram que o uso de fluoxetina em ratos desencadeou aumento dos linfócitos TCD8+ e diminuição dos TCD4+ durante três semanas de uso contínuo do antidepressivo. Por outro lado, a fluoxetina pode ter um efeito imunoestimulador em algumas situações. Em camundongos foi observado que o estresse crônico de contenção acarreta diminuição dos linfócitos TCD4+ e manutenção dos linfócitos TCD8+, no entanto, quando tratados com fluoxetina esses animais conseguiram restabelecer os valores iniciais de linfócitos TCD4+ (Frick, Rapanelli, Cremaschi & Genaro., 2009). Segundo Freire-Garabal e cols. (1997) os camundongos estressados e tratados com fluoxetina apresentaram maior quantidade de linfócitos circulantes que os seus respectivos controles (estressados e não tratados com fluoxetina).

A ação imunomoduladora da fluoxetina provavelmente envolve a modulação da produção de citocinas. Pacientes com depressão maior apresentavam valores de IL-6 altos e após o tratamento por 8 semanas com fluoxetina a quantidade de IL-6 circulante voltou ao estado normal (Nishida & cols, 2002). Frick e cols. (2008), trabalhando com camundongos com câncer e os tratando com fluoxetina, observaram que esse antidepressivo apresenta relação direta com o aumento da produção de citocinas anti-tumorais (IFN- γ e TNF- α), resultando na menor taxa de crescimento tumoral e conseqüentemente no maior tempo de sobrevivência dos animais tratados com essa droga. Por outro lado, Roumestan e cols. (2007) verificaram efeito anti-inflamatório da fluoxetina (5, 10, 15 e 20mg/kg) ao tratarem camundongos trinta minutos antes da inoculação com LPS, foi observado uma redução de até 60% nos níveis de TNF-alfa e 50% na mortalidade, quando comparados ao controle. Sacre e cols. (2010) também observaram um efeito anti-inflamatório da fluoxetina em camundongos portadores de artrite reumatóide tratados com 25mg/kg por sete dias, fato confirmado pela redução dos níveis de IL-12 e redução dos danos articulares. Por outro lado, alguns estudos

têm falhado em mostrar uma relação entre a fluoxetina e a modulação da produção de citocinas (Kubera & cols., 2004; Maes & cols., 1995; Jazayeri & cols., 2010).

Existem relatos de que a administração crônica dessa droga provoca perda de peso (Wellman, Jones & Miller, 2003) ou previne seu ganho (Gutiérrez & cols., 2002). No presente estudo, a administração de fluoxetina por 12 dias levou a uma perda de peso quando comparada a inoculação de salina. Por outro lado, em outro estudo a administração oral crônica de fluoxetina preveniu perdas de peso provocadas por estresse de contenção (Zafir & Banu, 2007). É importante considerar que os procedimentos dos dois estudos se diferem quanto ao grau de estresse gerado. Ou seja, enquanto o estresse provocado por 15 min/dia de nado forçado não levou a perda de massa no presente estudo (houve ganho de 15 g), naquele estudo a submissão a 4 h de contenção causou perda de massa. Portanto, a contenção pode ser mais estressante que o nado forçado. Juntos, os dois estudos indicam dois efeitos aparentemente opostos da fluoxetina: na presença de um estressor severo que provoca redução de massa, a droga previne tais perdas; enquanto na presença de um estressor moderado, a droga leva a perda de massa, o que sugere um efeito anoréxico. Em favor de efeito anoréxico da fluoxetina, existem também estudos que mostram reduções de massa corporal provocadas pela administração crônica de fluoxetina em humanos obesos (Wise, 1992; Guimarães, 2006).

Os antidepressivos atuais apresentam compostos específicos que atuam em regiões distintas do sistema nervoso central, assim, ao administrar antidepressivos em ratos ou camundongos é esperado melhora dos sintomas depressivos, ação observada pela redução no tempo de flutuação (comportamento passivo) e aumento no escalar e/ou nadar (comportamento ativo) quando submetidos ao teste de nado forçado, nesse caso, o aumento mais acentuado do escalar e/ou nadar são dependentes de qual droga foi ministrada (Cryan & Lucki, 2000). Page, Detke, Kirby e Lucki (1999) observaram redução no tempo do flutuar e aumento do nadar em ratos tratados com fluoxetina. Carr, Schechter e Lucki (2010) utilizando

em ratos 20mg/kg de fluoxetina três vezes antes do teste de nado forçado obtiveram resultados similares. Cryan e Lucki (2000) comparando a fluoxetina e a reboxetina verificaram que ambas às drogas desencadearam queda no tempo de flutuação, entretanto a primeira droga aumenta o tempo do nadar e a segunda o tempo do escalar de ratos.

Em nosso experimento, os resultados obtidos são muito similares aos achados da literatura que relacionam o teste de nado forçado como modelo de estresse/depressão e seus efeitos no comportamento dos ratos. A redução no escalar do grupo salina justifica-se pela influência do protocolo de estresse e a manutenção no tempo do grupo fluoxetina é promovida pelo efeito da droga. Em relação ao nadar, os animais do grupo controle apresentaram uma redução no tempo gasto com o nadar, enquanto o tempo do grupo fluoxetina, mesmo não se alterando estatisticamente, diferiu dos animais salina fato que justifica a influência da droga no controle comportamental. Ao mensurar o tempo no flutuar é evidenciado tanto os efeitos do estresse quanto da droga nos diferentes grupos, pois em nosso estudo os animais aparentemente estressados aumentaram o tempo de imobilidade e os animais fluoxetina não alteraram esse comportamento, observando-se diferenças entre os grupos.

Neste estudo foi observado que os animais tratados com fluoxetina e submetidos por doze dias de sessões ao teste de nado forçado apresentaram redução na massa corporal e não modificando a produção de anticorpos anti-hemácias quando comparados ao momento pré imunização. Em relação às análises comportamentais, foi observado que o tratamento com fluoxetina é capaz de reverter o estado depressivo dos ratos. A modulação da produção de anticorpos pela fluoxetina pode ter importantes implicações para o tratamento da depressão em humanos.

REFERÊNCIAS

- Alperina, E. L., Kulikov, A. V., Popova, N. K., & Idova, G. V. (2007). Immune Response in Mice of a New Strain ASC (Antidepressants Sensitive Catalepsy). *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, *144*, 221-223.
- Altenburg, A. S. P., Ventura, d. G., Da-Silva, V. A., Malheirosa, L. R., Castro-Faria-Neto, H. C., Bozza, P. T., & Teixeira, N. A. (2002). The role of forced swim test on neutrophil leukocytosis observed during inflammation induced by LPS in rodents. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *26*, 891– 895.
- Baldessarini, R. J. (2005). Fármacos e o tratamento dos distúrbios psiquiátricos: depressão e distúrbios de ansiedade. Em A, Goodman-Gilman (Org.), *As Bases Farmacológicas da Terapêutica* (10^a ed) (pp. 339-164) Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil Ltda.
- Baldwin, D. R., Wilcox, Z. C., & Bayliss, R. C. (1995). Impact of Differential Housing on Humoral Immunity Following Exposure to an Acute Stressor in Rats. *Physiology and Behavior*, *57*, 649-653.
- Borsini, F., & Meli, A. (1988). Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? *Psychopharmacology*, *94*, 147–160.
- Carr, G. V., Schechter, L. E., & Lucki, I. (2010). Antidepressant and anxiolytic effects of selective 5-HT₆ receptor agonists in rats. *Psychopharmacology*, DOI 10.1007/s00213-010-1798-7.
- Cryan, J. F., & Lucki, I. (2000). Antidepressant-Like Behavioral Effects Mediated by 5-Hydroxytryptamine 2C Receptors1. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *295*, 1120-1126.
- Deitos, F., Copette, F. R., Pasqualotto, A. C., Segat, F. M., Santos, R. P., & Guilandete, S. (1999). Antidepressivos e seus efeitos colaterais, quais são e como reconhecê-los. *Revista Brasileira de Clínica Terapêutica*, *25*, 63-70.
- Egeland, M., Warner-Schmidt, J., Greengard, P., & Svenningsson, P. (2010). Neurogenic effects of fluoxetine are attenuated in p11 (S100A10) knockout mice. *Biological Psychiatry*, *67*, 1048-1056.
- Fazzino, F., Urbina, M., Cedeño, N., & Lima, L. (2009). Fluoxetine treatment to rats modifies serotonin transporter and cAMP in lymphocytes, CD4⁺ and CD8⁺ subpopulations and interleukins 2 and 4. *International Immunopharmacology*, *9*, 463–467.
- Freire-Garabal, M., Nlifiez, M. J., Losada, C., Pereiro, D., Riveiro, M. P., Gonzalez-Patiao, E., Mayan, J. M., & Rey-Mendez, M. (1997). Effects of fluoxetine on the immunosuppressive response to stress in mice. *Life Sciences*, *60*, 403-413.
- Frick, L. R., Rapanelli, M., Cremaschi, G. A., & Genaro, A. M. (2009). Fluoxetine directly counteracts the adverse effects of chronic stress on T cell immunity by compensatory and specific mechanisms. *Brain, Behavior, and Immunity*, *23*, 36–40.

- Frick, L. R., Palumbo, M. L., Zappia, M. P., Brocco, M. A., Cremaschi, G. A., & Genaro, A. M. (2008). Inhibitory effect of fluoxetine on lymphoma growth through the modulation of antitumor T-cell response by serotonin-dependent and independent mechanisms. *Biochemical Pharmacology*, *75*, 1817-1826.
- Guimarães, C. (2006). *Tolerabilidade e eficácia da fluoxetina na redução de parâmetros antropométricos e metabólicos em mulheres obesas*. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- Gutiérrez, A., Saracíbar, G., Casis, L., Echevarría, E., Rodríguez, V. M., Macarulla, M. T., Abecia, L. C., & Portillo, M. P. (2002). Effects of fluoxetine administration on neuropeptide Y and orexins in obese Zucker rat hypothalamus. *Obesity Research*, *10*, 532-540.
- Jazayeri, S., Keshavarz, S. A., Tehrani-Doost, M., Djalali, M., Osseini, M., Amini, H., Chamari, M., & Djazayeri, A. (2010). Effects of eicosapentaenoic acid and fluoxetine on plasma cortisol, serum interleukin-1beta and interleukin-6 concentrations in patients with major depressive disorder. *Psychiatry Research*, *178*, 112-115.
- Kennedy, S. L., Nickerson, M., Campisi, J., Johnson, J. D., Smith, T. P., Sharkey, C., & Fleshner, M. (2005). Splenic norepinephrine depletion following acute stress suppresses in vivo antibody response. *Journal of Neuroimmunology*, *165*, 150-160.
- Kubera, M., Kenis, G., Bosmans, E., Kajta, M., Basta-Kaim, A., Scharpe, S., Budziszewska, B., & Maes, M. (2004). Stimulatory effect of antidepressants on the production of IL-6. *International Immunopharmacology*, *4*, 185-192.
- Kubera, M., Symbirtsev, A., Basta-Kaim, A., Borycz, J., Roman, A., Papp, M., & Claesson, M. (1996). Effect of chronic treatment with imipramine on interleukin 1 and interleukin 2 production by splenocytes obtained from rats subjected to a chronic mild stress model of depression. *Polish Journal of Pharmacology*, *48*, 503-506.
- Leite, C. E., Nunes, F. B., Pires, M. G. S., Lunardelli, A., Lhullier, F. R., Martins, M. R., & Oliveira, J. R. (2007). Influência do uso continuado de fluoxetina nas dosagens séricas de prolactina em mulheres. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, *39*, 283-285.
- Loskutova, L. V., Idova, G. V., & Gevorgyan, M. M. (2007). Immune Response in Wistar Rats with High and Low Level of Situational Anxiety. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, *144*, 706-708.
- Lucki, I. (1997). The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. *Behavioural Pharmacology*, *8*, 523-532.
- Maes, M., Meltzer, H. Y., Bosmans, E., Bergmans, R., Vandoolaeghe, E., Ranjan, R., & Desnyder, R. (1995). Increased plasma concentrations of interleukin-6, soluble interleukin-6, soluble interleukin-2 and transferrin receptor in major depression. *Journal of Affective Disorders*, *34*, 301-309.
- Miller, A. H. (2010) Depression and immunity: A role for T cells? *Brain, Behavior and Immunity*. *24*, 1-8.
- Moreno, R. A., Moreno, D. H., & Soares, M. B. M. (1999). Psicofarmacologia de antidepressivos. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, *21*, 24-40.

- Nishida, A., Hisaoka, K., Zensho, H., Uchitomi, Y., Morinobu, S., & Yamawaki, S. (2002). Antidepressant drugs and cytokines in mood disorders. *International Immunopharmacology*, 2, 1619–1626.
- Page, M. E., Detke, M. J., Kirby, A. D. L. G., & Lucki, I. (1999). Serotonergic mediation of the effects of fluoxetine, but not desipramine, in the rat forced swimming test. *Psychopharmacology*, 147, 162–167.
- Pedersen, K. B., & Hoffman-Goetz, L. (2000). Exercise and the immune system: regulation, integration and adaptation. *Physiology Reviews*, 80, 1055-1081.
- Pellegrino, T. C., & Bayer, B. M. (2002). Role of Central 5-HT₂ Receptors in Fluoxetine-Induced Decreases in T Lymphocyte Activity. *Brain, Behavior, and Immunity*, 16, 87–103.
- Porsolt, R.D., Le Pichon, M., & Jalfre, M. (1977). Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, 266, 730–732.
- Rey, L. (1999) *Dicionário de termos técnicos de medicina e saúde*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.
- Robles, T. F., Glaser, R., & Kiecolt-Glaser, J. K. (2005). A New Look at Chronic Stress, Depression, and Immunity. *Current Directions in Psychological Science*, 14, 111-115.
- Roumestan, C., Michel, A., Bichon, F., Portet, K., Detoc, M., Henriquet, C., Jaffuel, D., & Mathieu, M. (2007). Anti-inflammatory properties of desipramine and fluoxetine. *Respiratory Research*, 8, 1-11.
- Sacre, S., Medghalchi, M., Gregory, B., Brennan, F., & Williams, R. (2010). Fluoxetine and Citalopram Exhibit Potent Antiinflammatory Activity in Human and Murine Models of Rheumatoid Arthritis and Inhibit Toll-like Receptors. *Arthritis and rheumatism*, 62, 683–693.
- Seidel, A., Arolt, V., Hunstiger, M., Rink, L., Behnisch, A., & Kirchner, H. (1995). Cytokine production and serum proteins in depression. *Scandinavian Journal of Immunology*, 41, 534–538.
- Stacciarini, J. M. R., & Tróccoli, B. T. (2001) O estresse na atividade ocupacional do enfermeiro. *Revista Latino-americana de Enfermagem*, 9, (2), 17-25.
- Vismari, L., Alves, G. J., & Palerm-Neto, J. (2008). Depressão, antidepressivos e sistema imune: um novo olhar sobre um velho problema. *Revista de Psiquiatria Clínica*, 35, 196-204.
- Wellman, P. J., Jones, S. L., & Miller, D. K. (2003). Effects of preexposure to dexfenfluramine, phentermine, dexfenfluramine–phentermine, or fluoxetine on sibutramine-induced hypophagia in the adult rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 75, 103-114.
- Willner, P. (1991). Behavioural models in psychopharmacology. Em P. Willner (Org.) *Behavioural models in psychopharmacology: theoretical, industrial, and clinical perspectives*. (pp. 3-18) Cambridge: Cambridge University Press.
- WISE, S. D. (1992). Clinical studies with fluoxetine in obesity. *American Journal of Clinical Nutrition*. 55, 181S-184S.

Zafir, A., & Banu, N. (2007). Antioxidant potential of fluoxetine in comparison to Curcuma longa in restraint-stressed rats. *European Journal of Pharmacology*, 572, 23–31.

Figuras e Legendas

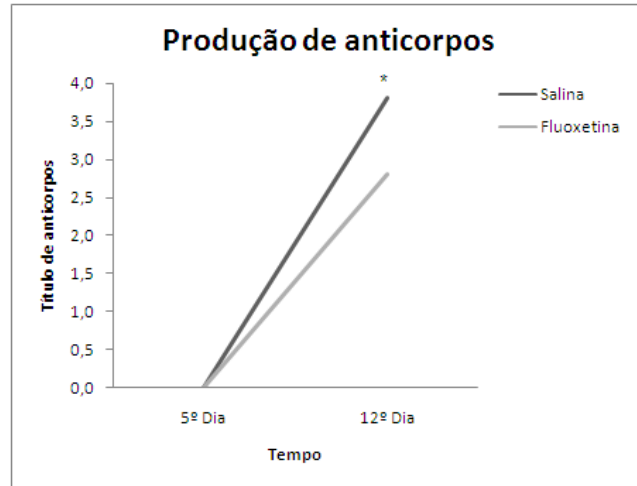


Figura 1. Variação na produção média de anticorpos totais dos ratos salina e fluoxetina sete dias após a imunização ($p < 0,05$).

*Diferença entre o momento inicial e final $p < 0,05$.

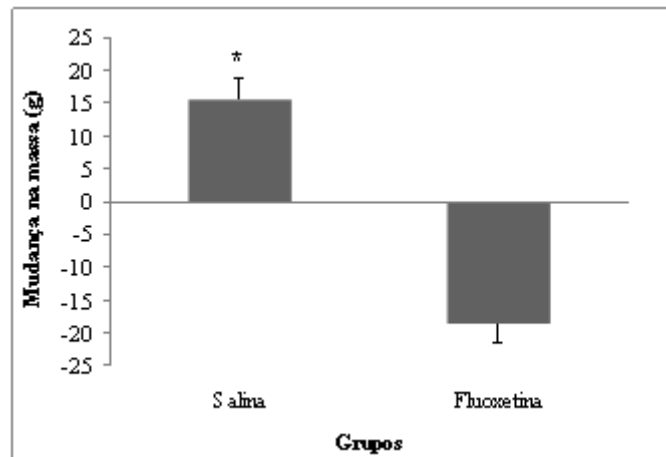


Figura 2. Variação na massa corporal média dos animais salina e fluoxetina durante o período de nado forçado ($p < 0,05$).

*Diferença entre os grupos ($p < 0,001$, teste t de Student).

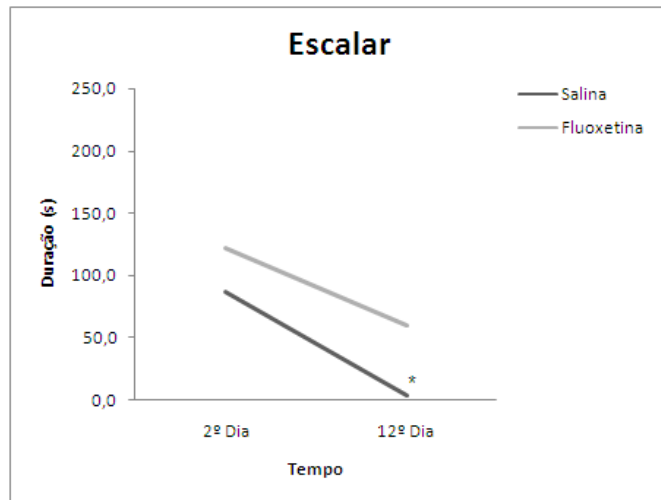


Figura 3: Tempo no escalar dos animais salina e fluoxetina, sob exposição aguda e crônica ao teste de nado forçado.
*Diferença entre o momento inicial e final $p < 0.05$.

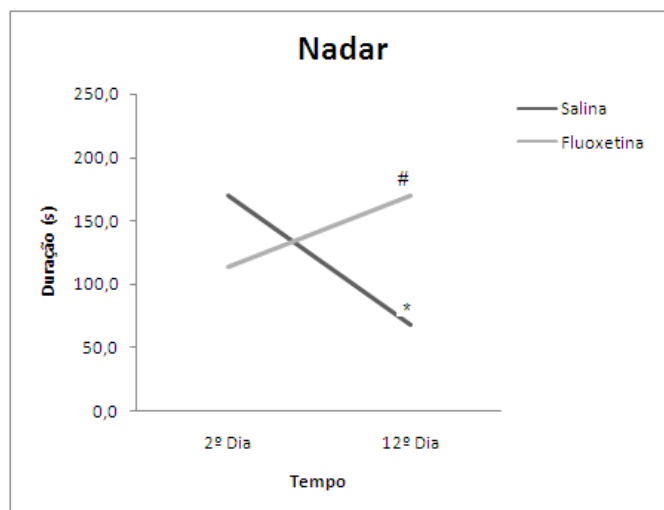


Figura 4: Tempo no nadar dos animais salina e fluoxetina, submetidos ao teste de nado forçado agudo e crônico.
*Diferença entre o momento inicial e final $p < 0.01$ (Tukey HSD).
#Diferença entre o grupo salina e fluoxetina no momento final $p < 0.01$ (Tukey HSD).

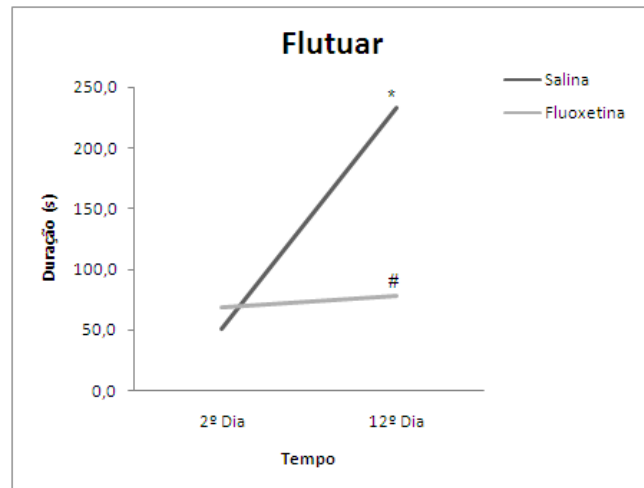


Figura 5: Tempo no flutuar dos animais salina e fluoxetina, sob exposição aguda e crônica ao teste de nado forçado.

*Diferença entre o momento inicial e final $p < 0.001$ (Tukey HSD).

#Diferença entre o grupo salina e fluoxetina no momento final $p < 0.001$ (Tukey HSD).

APÊNDICE B

Capítulo a ser publicado no livro “Antidepressant”

Chapter number

Behavioral and humoral immune response of rats chronically treated with fluoxetine and submitted to repeated forced swimming sessions

Eduardo Vignoto Fernandes, Emerson José Venancio & Célio Estanislau

*State University of Londrina
Brasil*

1. Introduction

The term stress was introduced into the biomedical field by Hans Selye (1936) in reference to a General Adaptation Syndrome which would consist of all non-specific systemic reactions that occur during an intense and chronic exposure to a stressor (e.g., pressure at work and poor diet). This syndrome would be different from the specific adaptive reactions (such as muscle hypertrophy caused by exercise performed on a regular basis) and immune responses (Selye, 1936).

A study evaluating occupational stress in nurses presented the most common symptoms involved: a feeling of fatigue, headache or muscle pain due to tension (neck and shoulders), decreased sexual interest, a feeling of discouragement in the morning, sleep difficulties, upset stomach or stomach pain, muscle tremors, feeling short of breath or shortness of breath, decreased appetite, tachycardia when under pressure, sweating and flushing (Stacciarini & Tróccoli, 2004). The main psychological symptoms present in people with stress are anxiety, tension, insomnia, alienation, interpersonal difficulties, self-doubt, excessive worry, inability to concentrate, difficulty relaxing, anger and emotional hypersensitivity (Lipp, 1994).

Stress has been considered one of the biggest causes of depression. After a situation of great stress, approximately 60% of individuals develop depression. Psychosocial problems (work pressure, job loss, debt, etc.) can also be preconditions for its emergence (Kendler et al. 1995; Post, 1992).

Major depression is a mood disorder whose prevalence throughout life, depending on the population, is estimated at between 0.9 to 18% and involves a significant risk of death (Waraich et al., 2004). It is estimated that men and women with depression are 20.9 and 27 times, respectively, more likely to commit suicide than those without depression (Briley & Lépine, 2011).

Multiple environmental factors have been associated with the etiology of depression. Adverse events during childhood and everyday stress are described as important factors for the development of depression (Kessler, 1997). Children with a history of sexual abuse, living in troubled homes or who receive little attention from parents have a high risk of becoming depressed adults (Kessler, 1997). Stressful events such as the loss of a loved one, job loss, or partner separation are factors associated with the onset of depression (Kessler, 1997). Individual personality is also a predisposing factor to depression, as evidenced by the higher frequency of depression in people with a tendency to be sad when they experience a stressful event (Fava & Kendler, 2000). Gender is strongly associated with depression; studies have shown that depression is on average twice as common in women as in men (Bromet et al., 2011). Interestingly, however, a decrease in the female/male proportion of depression has been observed in young adults (18 to 24 years), possibly due to greater gender equality in today's society (Seedat et al., 2009). Besides environmental factors, individual genetic characteristics also contribute to susceptibility to depression (Jabber et al., 2008).

In addition to the psychological changes associated with depression, immune system changes are often found in depressed individuals (Altenburg et al., 2002). Several studies have indicated that stress and depression involve the individual in a chronic process that results in host defense failure against microorganisms and a higher likelihood of developing certain cancers. These alterations are probably associated with profound changes in the functioning of the immune system of individuals suffering from depression (Reiche et al., 2004; Irwin et al., 2011). Epidemiological and experimental evidence shows that changes in the defense capability of the individual are related to decreased proliferative capacity of peripheral blood lymphocytes stimulated with mitogens "in vitro" (Schleifer et al., 1985; Schleifer et al., 1996), a decrease in the cytotoxic activity of natural killer cells (NK) (Schleifer et al., 1996; Calabrese et al., 1987; Nunes et al., 2002), the suppression of T-cell activity due to increased apoptosis

and decreased cell proliferation in response to antigens (Szuster-Ciesielski et al., 2008; Schleifer et al., 1984). Moreover, imbalance in cytokine levels is often observed, such as increased levels of interleukin 2 (IL-2), interleukin 6 (IL-6) and interferon-alpha (IFN- α) (Seidel et al. 1995; Vismari et al., 2008). The results have been conflicting regarding humoral immune response and immunoglobulin levels in the blood. A significant increase in IgM levels in patients with depression was observed by Kronfol (1989) and Song et al. (1994), although other studies have been unable to detect significant changes in immunoglobulin levels in the peripheral blood of patients with depression (Bauer et al., 1995; Nunes et al., 2002). These changes in the immune system probably directly and/or indirectly compromise host immunity against microorganisms (Miller, 2010). On the other hand, the immune system changes observed in individuals with depression may not be caused by changes in the central nervous system of these individuals but instead may be directly related to the origin of such changes, including the development of a pro-inflammation state directly related to the onset of a depressive state, which is suggested by the hypothesis that macrophages act as a cause of depression (Miller, 2010). This hypothesis is related to an increased secretion of proinflammatory cytokines such as interleukin 1 (IL-1), interferon-alpha (IFN- α), and the resulting change in production of corticotrophin-releasing factor (CRF) and adenocorticotrophic hormone (ACTH) (Smith, 1991).

Importantly, animal models of stress and depression have shown immune system changes, including increased production of IL-1, the number of circulating neutrophils and lowered resistance to infection by bacteria. Mice that had been transgenically modified to exhibit a depressive type of behavior (catalepsy) and were inoculated with sheep red blood cells (SRBC) had lower amounts of platelet-forming cells and antigen-specific T lymphocytes than their parents without this disorder. In rats with high levels of anxiety, lower concentrations of specific T lymphocytes were also found five days after inoculation with SRBC (Kubera et al., 1996; Pedersen & Hoffman-Goetz, 2000; Altenburg et al., 2002; Robles et al., 2005; Alperin et al., 2007; Loskutov et al., 2007; Miller, 2010).

Because this disorder severely compromises the functioning of individuals, several alternative treatments for depression have been proposed, including psychotherapy and pharmacotherapy, as well as a combination of both types. The use of antidepressant drugs for treating patients with depression began in the late 1950s. Since then, many drugs with potential antidepressants have been made available and significant advances have been made in understanding their possible mechanisms of action (Stahl, 1997). Only two classes of antidepressants were known until the 80's: tricyclic antidepressants and monoamine oxidase inhibitors. Both, although effective, were nonspecific and caused numerous side effects (Lichtman et al., 2009). Over the past 20 years, new classes of antidepressants have been discovered: selective serotonin reuptake inhibitors, selective serotonin/norepinephrine reuptake inhibitors, serotonin reuptake inhibitors and alpha-2 antagonists, serotonin reuptake stimulants, selective norepinephrine reuptake inhibitors, selective dopamine reuptake inhibitors and alpha-2 adrenoceptor antagonists (Bezchlibnyk-Butler & Jeffries, 1999). Serotonin reuptake inhibitors belong to this new generation of antidepressant drugs; fluoxetine is the most commonly prescribed drug for treating depression and anxiety because of its efficacy, safety and tolerability (Egeland et al., 2010).

Despite the current extensive use of antidepressant drugs, few studies have investigated the effects of antidepressant drugs on the immune system (Janssen et al., 2010). Experimental and clinical evidence suggests that changes in the immune system in patients with depression can be reversed by the use of antidepressant drugs (Leonard, 2001).

In animal models the use of fluoxetine has been associated with significant changes in immunity. Laudenslager & Clarke (2000) inoculated rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) with tetanus toxoid and found increased levels of IgG anti-tetanus. When analyzing the effect of the antidepressant desipramine (a tricyclic antidepressant) and fluoxetine, it was observed that animals treated with these antibodies showed higher plasma levels than those treated with saline.

Some studies with mice have discovered information about the effects of fluoxetine on humoral immune response. Kubera et al. (2000) observed that continuous administration of fluoxetine in C57BL/6 mice for four weeks results in decreased IL-4 production and in increased IL-6 and IL-10 production. Genaro et al. (2000) found that fluoxetine has an inhibitory action on the proliferation of B lymphocytes induced by lipopolysaccharide (LPS) or anti-IgM. On the other hand, fluoxetine increases the proliferative action of B lymphocytes, being stimulated by suboptimal concentrations of anti-IgM. In an experimental model of depression in BALB/c, Edgar et al. (2002) observed a decrease in lymphoproliferative response induced by mitogens (phytohemagglutinin and concavalina A), an increase in the proliferative response of B lymphocytes to lipopolysaccharide (LPS) and that the chronic administration of fluoxetine reverses these immune changes.

The experimental investigation of depression in humans is largely ethically unfeasible. Thus, animal models of depression have been developed for this purpose, such as the olfactory bulbectomy, learned helplessness, restraint stress and forced swimming (Willner, 1990). Forced swimming is a widely used model for preclinical evaluation of the possible effects of antidepressant drugs (Porsolt et al., 1977). Its widespread use is mainly due to

its ease of implementation, the reliability of its results confirmed in various laboratories and its ability to detect the action of almost all classes of currently available antidepressants (Borsini & Meli, 1988).

In this study we evaluated the humoral immune response of rats chronically submitted to a model of stress/depression, i.e., forced swimming for twenty-five days and daily treatment with fluoxetine. Antibody production was assessed five days after the rats were inoculated with sheep red blood cells and, after the last day of forced swimming, the animals were euthanized and the adrenal glands, thymus and spleen were removed and weighed.

A growing number of people are diagnosed with stress and depression, for which antidepressant drugs are increasingly prescribed. Although many of their effects on individuals are known, there have been few studies reporting the effects of antidepressants on human and/or animal immune systems, especially regarding humoral immunity. Although experimental, this study has great social significance principally due to the large number of people vaccinated annually who are also undergoing regular treatment with antidepressants. The objective of this study was to evaluate the humoral immune response of Wistar rats submitted to forced swimming and treated with fluoxetine.

2. METHODOLOGY

2.1 Animals and experimental groups

A sample of 72 male Wistar rats with a body mass of about 300 grams was obtained from the Central Vivarium of the State University of Londrina's Center of Biological Sciences for use in the experiment.

The experiment was conducted at the vivarium of the Department of General Psychology and the Behavior Analysis Center of Biological Sciences of the State University of Londrina. The rats were housed in polypropylene cages (40 cm x 34 cm x 17 cm) with up to six animals per cage. Water and feed were provided ad libitum throughout the experiment, the vivarium temperature was maintained at approximately 25°C and a 12 hour light/dark cycle was established (light from 7:00 am). The animals' body weight was measured daily before the forced swimming session.

In order to study the effects of chronic forced swimming, chronic fluoxetine treatment and an immunization protocol, roughly half of the animals were submitted to chronic forced swimming sessions and the rest were kept in the vivarium. Each of these groups was subdivided and treated chronically with fluoxetine or saline. Again, each of the four groups was subdivided with part of the animals submitted to the immunization protocol and the other part not. Thus, the following eight groups were involved in the procedure: control saline not immunized (Ctl-Sal-n-Im, n=10); control saline immunized (Ctl-Sal-Im, n=10); control fluoxetine not immunized (Ctl-Fxt-n-Im, n=9); control fluoxetine immunized (Ctl-Fxt-Im, n=9); swimming saline not immunized (Swm-Sal-n-Im, n=10); swimming saline immunized (Swm-Sal-Im, n=10); swimming fluoxetine not immunized (Swm-Fxt-n-Im, n=7); swimming fluoxetine immunized (Swm-Fxt-Im, n=7).

The experimental procedures were approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Universidade Estadual de Londrina, Project No. 6977, Case No. 16828/2010.

2.2 Protocol of forced swimming

The forced swimming model was performed in accordance with Lucki (1997) to evaluate the acute effect. In the current study, forced swimming sessions were performed daily for twenty-five days and the behavior of the animals was rated on the first and last day. Forced swimming was performed in a black plastic cylinder (50 cm high and 22 cm in diameter) in which the water was 30 cm deep and kept at $25 \pm 2^\circ\text{C}$. The sessions were performed individually for 15 minutes between 12 and 2 pm. At the end of the session, each animal was removed from the cylinder and dried. The cylinder was cleaned and the water replaced between use by different groups.

2.3 Fluoxetine: dilution and application

We used the drug Daforin® (fluoxetine hydrochloride 20mg/ml, EMS S / A) diluted 1:2 in saline solution for the experiment. Thirty minutes after the end of each forced swimming session, the animals received 10mg/kg/day of fluoxetine or saline intraperitoneally (ip). The injections began at the first session (pretest) and finished on the penultimate day of the experiment (the 24th day).

2.4 Behavioral evaluation

For behavioral analysis, the animals were filmed during the first five minutes of the 1st and the 25th session of forced swimming. After the tests, the videos were stored on a computer for further analysis.

The amount of time the animals spent in the following behaviors was recorded: floating (complete immobility or faint movements, i.e., the minimum necessary to keep the nose/head above the surface), climbing (vigorous movements with forepaws above the surface or against the cylinder wall) and swimming (horizontal movement without the front legs breaking the surface of the water). The behavioral data were recorded by a trained observer (minimal intra-observer agreement: 0.85).

2.5 Blood collection and immunization

On days 5, 10 and 25 of the study at the end of the forced swimming session, all animals were sedated by non-lethal inhalation of ethyl ether and approximately 1 mL of blood was collected by cardiac puncture. The collected blood was stored in 1.5 ml plastic tubes containing 50 μ L of 5% EDTA. On days 5 and 20 the animals belonging to subgroups Ctl-Sal-Im, Ctl-Fxt-Im, Swm-Sal-Im and Swm-Fxt-Im, were inoculated i.p. with a 250 μ l solution of 2.5% sheep red blood cells.

2.6 Preparation of antigen

The following protocol was used to extract proteins from sheep erythrocytes: the sheep red blood cells were centrifuged in test tubes at a speed of 1000g for 15 minutes. The cell pellet was then suspended in saline, centrifuged at 1000g for 15 minutes and the leukocyte layer was removed (this process was repeated twice more). After the third wash, the supernatant was removed and 30 ml of Tris-EDTA [5 mM buffer 2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol/hydrochloric acid (Tris-HCL), pH 7.6, containing 1 mM Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)] was added for analysis of RBCs. The tubes were subjected to centrifugation at 25000g for 30 minutes (this process was repeated until the supernatant had turned pink). The contents of the tubes were then filtered through cheesecloth and underwent a final wash with Tris-EDTA. The pellet obtained was suspended in 0.1% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) in Phosphate Buffered Saline (PBS) at a volume three times that of the pellet. The suspension was dialyzed for 24 hours at room temperature and the PBS/SDS solution was changed at least twice. Aliquots of the suspension were stored at -20°C. The protein suspension dosage followed Bradford (1976).

2.7 Sacrifice

On the 25th day of study, after finishing the forced swimming test, the animals were again non-lethally sedated by inhalation of ethyl ether for blood collection, after which the animals were sacrificed by lethal ethyl ether inhalation. The spleen, thymus and adrenal glands of each rat were subsequently removed to assess the relative weight.

2.8 ELISA

To assess the production of antibodies (IgM, IgG1 and IgG2a), an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) containing 100 μ l of a solution of 2.5 mg/ml sheep erythrocyte proteins obtained in the above-described manner was added to each well. The plasma was diluted 1:100. The dilutions of peroxidase conjugated anti-IgM, anti-IgG1 (manufactured by Zymed) and anti-IgG2a (produced by BETHYL) were 1:10000, 1:20000 and 1:5000, respectively.

ELISA was conducted according to the following protocol: first, the 96-well plates were coated with 100 μ l of the antigen diluted in carbonate-bicarbonate pH 9.6 and incubated overnight at 4°C. The plates were then washed 3 times with PBS-Tween 0.05% and blocked with 150 μ l of PBS-milk 5% in each well for 1 h at 25°C. After 3 washes with PBS-Tween 0.05%, plasma samples diluted in PBS-1% milk (100 μ l of 1:100 diluted sample per well) were incubated for 1 h at 25°C. The plates were then washed 3 times with PBS-Tween 0.05% and the conjugate (100 μ l of conjugate diluted in PBS-milk 1% per well) anti-IgM, anti-IgG1, or anti-IgG2a was incubated for 1 h at 25°C, washed 3 times with PBS-Tween 0.05%, and then the substrate (sodium acetate buffer 0.1 M pH 5, containing TMBZ - tetramethylbenzidine of 1% and H₂O₂ - hydrogen peroxide 0.005%) was added (100 μ l of substrate/well). After incubation in the dark for 15 minutes at 25°C, 50 μ l of 1N H₂SO₄ was added per well. Reading was performed in a microplate reader at 450 nm.

2.9 Statistical analysis

Statistical analysis was performed with Statistica 5.0®. To evaluate homogeneity and normality, the Levene and Kolmogorov-Smirnov tests were used. To evaluate antibody production (IgM, IgG1 IgG2a), four-way repeated-measures ANOVA was performed including the effects of the swimming sessions (Ctl X Swm), fluoxetine treatment (sal X fxt), immunization (n-Im X Im) and repeated measurement factor of blood sampling time (preImmunization X after the 1st immunization X after the 2nd immunization). Behavioral comparisons were also

performed by means of four-way ANOVAs, but with a different repeated-measures factor (Session 1 x Session 25). Repeated-measures comparisons of the following masses were conducted: body (fluctuation), spleen, adrenal gland and thymus. Therefore, the above described remaining factors were analyzed in three-way ANOVAs run for this purpose. When interactions of main effects were found to be significant, Tukey post hoc tests were applied. The significance level was set at $P < 0.05$.

3. Results

Figure 1a shows the production values of IgM antibody groups. The results show no effects for stress ($F [1.64] = 0,348, P > 0.05$), but effects for immunization ($F [1.64] = 20,050, P < 0.001$), drug ($F [1, 64] = 6,673, P < 0.05$), time ($F [2.128] = 32,208, P < 0.001$), interaction between immunization and time ($F [2.128] = 21,710, P < 0.001$), drug and time ($F [2.128] = 7383, P < 0.001$) and immunization, drug and time ($F [2.128] = 9268, P < 0.001$). Comparing the pre, post1 and post2 immunization periods, the Tukey test showed that there was an increase in IgM production only for the Ctl-Sal-Sal-Swm and Im-Im groups. We observed that only animals treated with saline responded to inoculation with sheep red blood cells, while fluoxetine inhibited the production of antibodies.

The production of IgG2a antibody (Figure 1b) appeared to be similar to the values observed for IgM. Four-way ANOVA showed no stress effect ($F [1.64] = 1,188, P > 0.05$), but effects for immunization ($F [1.64] = 26,326, P < 0.001$), drug ($F [1.64] = 7,139, P < 0.05$), time ($F [2.128] = 25,483, P < 0.001$), immunization and drug interaction ($F [1.64] = 7,814, P < 0.01$), immunization and time ($F [2.128] = 25,734, P < 0.001$), drug and time ($F [2.128] = 6,578, P < 0.001$) and immunization, drug and time ($F [2.128] = 6630, P < 0.01$). In the pre, post1 and post2 immunization periods, the Tukey test showed increased production of IgG2a only in Ctl-Sal-Im and Swm-Sal-Im. Only non-stressed animals treated with saline responded to inoculation with sheep red blood cells, while fluoxetine inhibited the production of antibodies.

Figure 1c shows the production values for IgG1 antibody groups. There were no effects for stress ($F [1.64] = 0,404, P > 0.05$) drug ($F [1.64] = 0.001, P > 0.05$), but effects for immunization ($F [1.64] = 48,908, P < 0.001$), time ($F [2.128] = 81,116, P < 0.001$), interaction between stress and drug ($F [1.64] = 9,370, P < 0.01$), immunization and time ($F [2.128] = 67,428, P < 0.001$), stress, immunization and drug ($F [1.64] = 11,223, P < 0.01$), stress, drug and time ($F [2.128] = 18,953, P < 0.001$) and stress, immunization, drug and time ($F [2.128] = 20,187, P < 0.001$). Comparing the pre, post1 and post2 immunization periods, an increase in IgG1 production was observed only for the Ctl-Sal-Im and Swm-Fxt-Im groups. It was observed that stress and fluoxetine in isolation inhibit the production of IgG1, but that stress and drugs together interacted to cause antibody production similar to that of the control group (Ctl-Sal-Im).

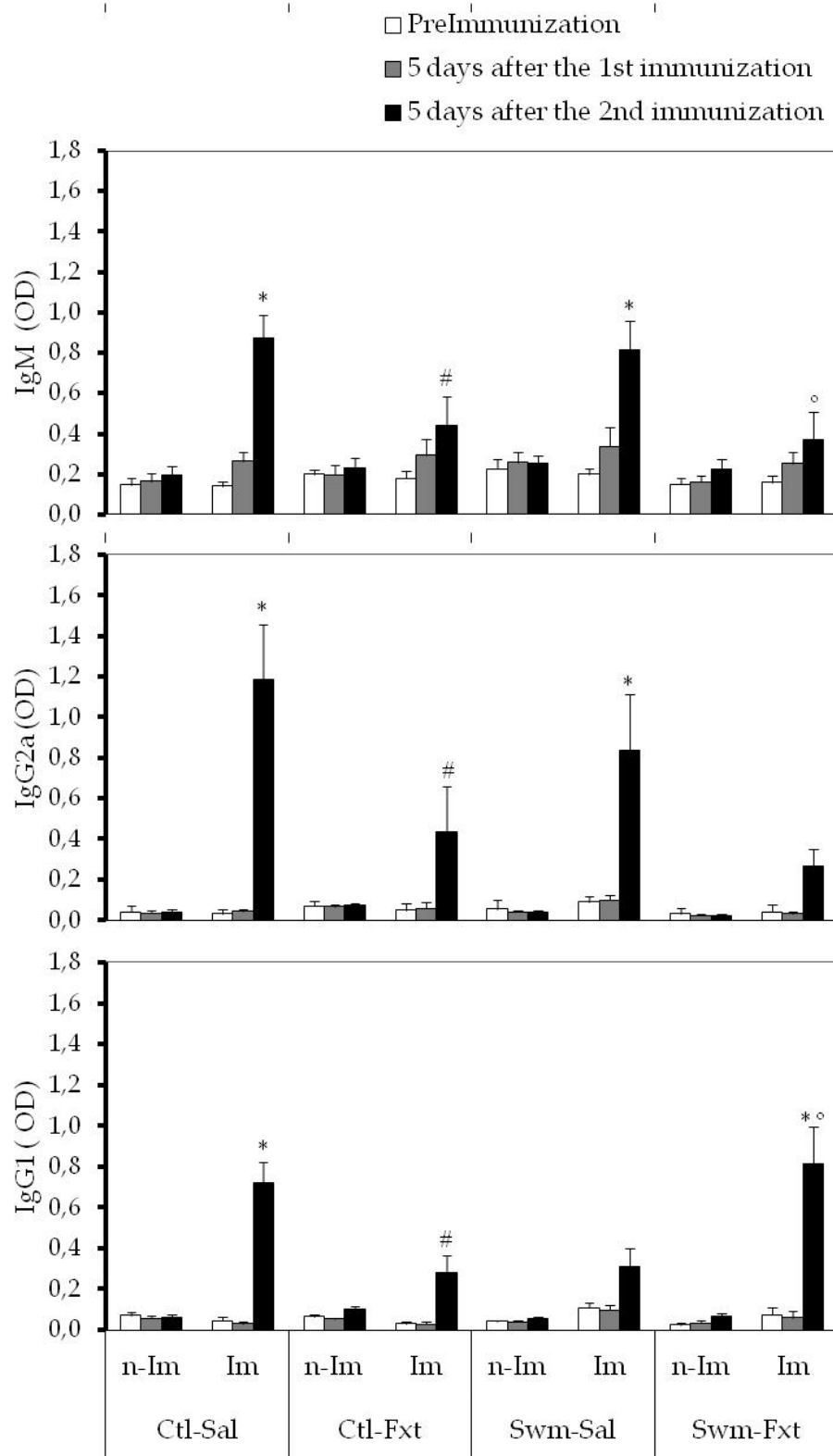


Fig. 1. Variation (mean \pm SEM) in the production of antibody. We analyzed the variation in the production of antibodies (IgM, IgG2a and IgG1) at three different points in time (pre-immunization, five days after the first immunization and 5 days after the second immunization). Fluoxetine was responsible for suppressing the production of IgM (a) and IgG2a (b). In relation to IgG1 (c), the administration of only stress and fluoxetine impaired antibody production. However, the interaction between these variables did not impair production. *Unlike the pre-immunization and 5 days after the first immunization ($P < 0.001$); #Different from Ctl-Sal-Im 5 days after the second immunization ($P < 0.001$); ^oUnlike Swm-Sal-Im 5 days after the second immunization ($P < 0.002$).

The variation in rat body mass was not altered by immunization ($F [1.64] = 0.34, P > 0.05$), although stress ($F [1.64] = 19,948, P < 0.001$) and drug effects ($F [1.64] = 111,595, P < 0.001$) were observed. There was no significant interaction between variables. Intergroup comparison revealed that fluoxetine was responsible for reducing body mass (Figure 2).

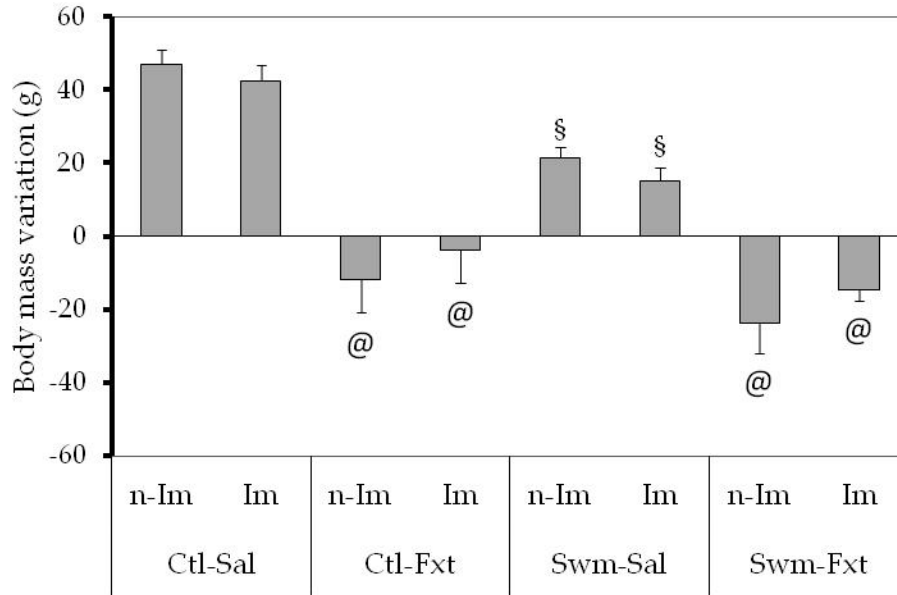


Fig. 2. Variation (mean \pm SEM) in body mass. It was observed that both fluoxetine and swimming resulted in reduced body mass. @ Unlike the saline group that underwent the same treatment ($P < 0.05$); § Different from the control group that underwent the same treatment ($P < 0.05$).

There was no stress ($F [1.64] = 2,660, P > 0.05$) or immunization effect ($F [1.64] = 0,373, P > 0.05$) on the relative mass of the adrenal glands. There was a significant effect for drug ($F [1.64] = 38,558, P < 0.001$) and interaction between drugs and immunization ($F [1.64] = 2,479, P < 0.05$). The Tukey test showed an increase in relative mass of the adrenal group Swm Fxt-n-Im compared to its control Swm-Salt-n-Im (Table 1).

There was no stress effect on the relative mass of the spleen ($F [1.64] = 0,728, P > 0.05$), but there was a drug effect ($F [1.64] = 19,534, P < 0.001$, Table 1). Nevertheless, there was no significant difference between groups in post hoc comparisons.

There was no stress ($F [1.64] = 0,276, P > 0.05$) or immunization effect ($F [1.64] = 0,704, P > 0.05$) on relative thymus mass, but a drug effect ($F [1.64] = 32,504, P < 0.001$) and an interaction between stress and drug ($F [1.64] = 7,535, P < 0.05$) was detected. It was observed that the drug reduced the relative mass of the thymus in unstressed animals treated with fluoxetine (Table 1).

Organ	Control				Swim			
	Saline		Fluoxetine		Saline		Fluoxeti	
	n-Im	Im	n-Im	Im	n-Im	Im	n-Im	
Adrenals	6.6 \pm 0.6	7.6 \pm 0.3	9.7 \pm 0.7	10.0 \pm 0.8	6.9 \pm 0.8	7.7 \pm 0.8	13.1 \pm 1.6	
Spleen	158.4 \pm 3.4	150.4 \pm 5.6	222. \pm 27. 2 \pm 7	206.8 \pm 26. 8	143.4 \pm 5.2	164.0 \pm 7.6	202. \pm 20. 0 \pm 5	18
Thymus	66.2 \pm 4.3	71.5 \pm 3.8	36.0 \pm 7.3	36.1 \pm 5.0	54.9 \pm 5.1	57.4 \pm 5.7	42.1 \pm 7.9	4

Table 1. Relative mass of the adrenal glands, spleen and thymus of rats at the end of the experiment. It was observed that fluoxetine was responsible for changing the relative mass of the three organs analyzed, with the adrenal glands and thymus increased and the spleen reduced ($P < 0.05$). Measure ($\alpha = 0.001\%$).

Figure 3a shows the duration of floating behavior. Statistical analysis showed no effects for immunization ($F [1.30] = 0,078, P > 0.05$) or drug ($F [1.30] = 1.099, P > 0.05$) but effects for time ($F [1.30] = 30.010, P < 0.001$). An interaction between factors occurred only with drug and time ($F [1.30] = 5.989, P < 0.05$). Comparing the 1st and the 25th session, a reduction was observed only in the nonimmunized, drug treated group. There was also a distinction observed between the Fxt-n-Im and Sal-n-Im groups at the 25th session.

For swimming, statistical analysis revealed no effects for immunization ($F [1.30] = 0.208, P > 0.05$), drug ($F [1.30] = 0.861, P > 0.05$), time ($F [1.30] = 0.563, P > 0.05$) or interaction of factors (Figure 3b).

Figure 3c shows the time of analyzed behaviors. There were no effects for immunization ($F [1.30] = 0.081, P > 0.05$) or drug ($F [1.30] = 0.091, P > 0.05$) and effects for time ($F [1.30] = 32.243, P < 0.001$). There was an interaction between drug and time ($F [1.30] = 5.338, P < 0.05$). Comparing the 1st and 25th sessions, an increase in climbing time was detected in the Fxt-Im group.

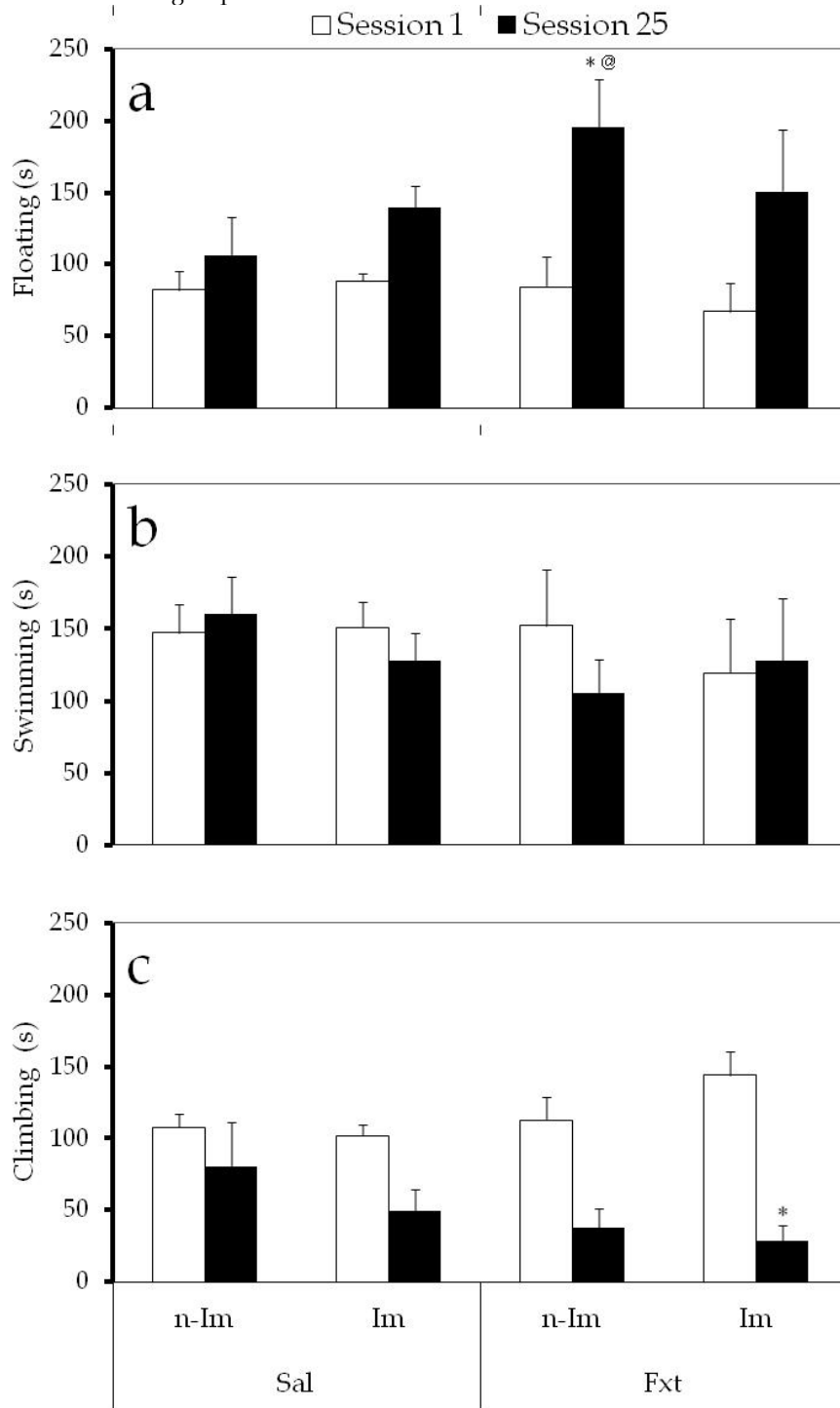


Fig. 3. Variation in the time of analyzed behaviors. Fluoxetine treatment increased floating (a) and reduced climbing (c) behavior between Session 1 and 25; no alteration was found in swimming behavior (b). The animals treated with saline did not show significant alterations in behavior between sessions. *, significant difference compared to Session 1 ($P < 0.01$). @, significant difference in the same session compared to the saline group that had been otherwise submitted to the same treatment ($P < 0.05$).

3. Discussion

The current study investigated the effects of chronic stress and the administration of the drug fluoxetine on humoral immune response. It assessed primary and secondary immune response against sheep red blood cells, variation in body mass and the relative mass of the adrenal glands, thymus and spleen, as well as the behavior of rats subjected to a daily forced swimming protocol, which is an model used to assess depression-like behavior in rodents.

In general, stress is considered to be an immunosuppressant. Elenkov & Chrousos (1999) conducted an extensive review on the influence of stress on the immune system and found that acute stress produced subacute or chronic immunosuppressive activity on cellular immune response. On the other hand, stress also was found to have an immunostimulating effect on humoral immune response. Another literature review Segerstrom & Miller (2004) that included research from the last 30 years on the effects of stress on immune function in men and women found no relationship between acute and subacute stress regarding modulation of humoral immune response. Nevertheless, it was observed that stress is associated with chronic immunosuppression in that it lowered antibody capacity against an influenza virus.

The ability of stress to inhibit cellular immune response (Th1) is probably related glucocorticoid and catecholamine suppression of pro-inflammatory cytokines, IL-12, IFN- γ and TNF- α (Elenkov & Chrousos, 1999). Regarding the suppression of cellular immune response, several studies have shown that stress can cause a predisposition to autoimmune diseases (rheumatoid arthritis and type 1 diabetes), allergies (asthma, food allergies and emphysema), and some types of cancer, including Kaposi's sarcoma and Epstein-Barr virus associated B-cell lymphomas (Reiche et al., 2004).

On the other hand, the modulation of humoral immune response by stress is a controversial topic in the literature because studies differ regarding the possible modulation. Baldwin et al. (1995) submitted rats to a stress regime that can be considered subchronic (forced swimming for 3-5 days, 60 minutes each session) and found no differences in the production of anti-sheep red blood cells between stressed and unstressed rats. Besides studies that have found no increase, others have observed a decrease. Kennedy et al. (2005) submitted rats to acute restraint stress and found that it did not alter the production of IgG1 (Th2) but suppressed the production of IgM and IgG2a (Th1) antibodies. Stanojevic et al. (2003) verified the effects of shock stress for five days in rats and, after immunization with bovine serum albumin (BSA), found that there was suppressed production of IgG anti-BSA compared to controls upon second exposure to the antigen. Hawley et al. (2006) showed that stress caused by high social competition in birds involves a lower production of anti-sheep erythrocytes. Rammal et al. (2010) found that anxious mice produced fewer IgA and IgE antibodies than their nonanxious counterparts, and when both groups were subjected to restraint stress, it appears that all studied antibodies (IgA, IgE and IgG) were suppressed in both groups. On the other hand, Guéguinou et al. (2011) analyzed the natural antibodies of mice subjected to a rotational velocity model (2 and 3 G-force) for 21 days and found an increase in IgG levels of animals subjected to 2Gs. Thus, it can be inferred that the type and length of exposure to the stressor has a direct relationship with the modulated production or elimination of certain antibodies.

In our study, the chronic stress of forced swimming did not interfere in the production of antibody classes IgM and IgG2a, although the production of IgG1 was suppressed. These results are similar to those of Kennedy et al. (2005). The modulation of IgG1 antibody production in mice suggests a suppression of the Th1-type response, which in rats is associated with the production of antibodies to this class of immunoglobulins. On the other hand, the results suggest that the Th2 immune response is not affected by forced swimming since we did not observe a change in the levels of IgG2a- class antibodies. It is important to note that the production of antibodies in response to an antigen derived from a complex network of cellular interactions that involve the production of molecules with opposite effects, such as cytokine IFN- γ in mice, which has a stimulating effect on cellular immune response and IgG1 antibody production as well as an inhibiting effect on humoral immune response and the production of IgG2a antibody, whereas IL-4 has the opposite effect. The fact that the forced swimming model results in the removal of IgG1 antibodies from production suggests that, by mechanisms not yet understood, stress results in the modulation of signals involved in Th1 response without changing the Th2 response. Whereas there is an antagonistic relationship between IFN- γ and IL-4, these results suggest that the stress-modulated molecular mechanism does not directly involve the main molecules responsible for modulation of antibody production. Recent studies have shown that the role of neurotransmitters in immune system function may be more important than previously considered (Rosas-Ballina et al., 2011).

Besides the relationship between stress and humoral immune response, we investigated the action of fluoxetine on this relationship. Although the 25 days of forced swimming in the present study did not affect the normal production of IgM or IgG2a but inhibited IgG1, we can speculate that the chronic use of this model may stimulate cellular immune response. The administration of fluoxetine inhibited the production of all immunoglobulin classes studied, which shows its general immunosuppressive effect, both for Th1 and Th2. However, the interaction of forced swimming x fluoxetine normalized the production of IgG1. This suggests that stress alone diverts the immune response to Th1-type, while fluoxetine alone has an immunosuppressive effect on humoral

immune response. On the other hand, administration of fluoxetine in animals subjected to forced swimming can modulate the immune response to a Th2 pattern. A study about the effects of fluoxetine on humoral immune response showed that mice with rheumatoid arthritis that were treated with fluoxetine (10 or 25 mg / kg / day) for seven days had no changes in the levels of anti-collagen antibodies (IgG1 and IgG2a) (Sacre et al., 2010). This result is at odds with the findings of this study since the time/effect analysis of fluoxetine showed immunosuppression of all studied classes of antibodies after twenty-four days of treatment. These results suggest that the effect of fluoxetine depends on the physiological state of the animal. It is important to note that fluoxetine administered concomitantly with stress can have an immunostimulatory effect. Frick et al. (2009) observed that chronic restraint stress in rats causes decreases in CD4 + T lymphocytes and no change in CD8 + T lymphocyte but when treated with fluoxetine, initial values of CD4 + T cells were restored. According to Freire-Garabal et al. (1997), stressed rats treated with fluoxetine had a higher number of circulating lymphocytes than their control counterparts (stressed and not treated with fluoxetine).

The reduction in specific antibody levels observed in our study is probably related to the action of fluoxetine on the production of cytokines and B lymphocytes, the cells responsible for producing antibodies, as has been observed in other studies. Kubera et al. (2000) demonstrated that the administration of fluoxetine for more than four weeks suppresses the production of IL-4, the main stimulus for differentiating T helper cells into Th2 cells. The decrease in Th2 production may influence isotype synthesis or immunoglobulin levels. Regarding the plasma level of antibodies, Laudenslager & Clarke (2000) observed an increase in immunoglobulin class IgM and IgG and a decrease in the levels of specific IgG antibodies against the tetanus toxoid immunogen in monkeys (*Macaca mulatta*). Therefore, fluoxetine can induce an increased level of total Ig and a decreased level of specific antibodies. However, Sluzewska et al. (1995), studying depressed patients treated with fluoxetine, showed a decrease in IL-6, the cytokine responsible for the growth of B lymphocytes, which differentiate into antibody producers. Moreover, Genaro et al. (2000) observed that fluoxetine had an inhibitory effect on the proliferation of B lymphocytes that had been stimulated by LPS.

The immunosuppressive action of fluoxetine cannot be restricted to the production of antibodies. Pellegrino & Bayer (2002) observed that the *in vitro* proliferation of lymphocytes from rats that had received fluoxetine via *i.p.* (5mg/kg) was lower than their respective controls, suggesting that the antidepressant has an immunosuppressive role for lymphocytes. Fazzini et al. (2009) found that three weeks of continued fluoxetine use in rats triggered an increase in CD8 + T lymphocytes and reduced CD4 + T cells.

The immunomodulatory action of fluoxetine probably involves the participation of cytokines. Patients with major depression have high levels of IL-6, and treatment with fluoxetine for 8 weeks leads to normalization of the cytokine levels (Nishida et al., 2002). Frick et al. (2008), studying cancerous rats, observed that fluoxetine treatment has a direct relationship with increased production of anti-tumor cytokines (IFN- γ and TNF- α), which resulted in lower rates of tumor growth and, therefore, longer survival time. On the other hand, Roumestan et al. (2007) found that fluoxetine had an anti-inflammatory effect (5, 10, 15 and 20mg/kg) when rats were treated thirty minutes prior to inoculation with LPS and reported reductions of 60% in TNF- α levels and 50% in mortality compared to controls. Sacre et al. (2010) also observed that fluoxetine had an anti-inflammatory effect in rats with rheumatoid arthritis that were treated with 25mg/kg for seven days, as reflected in reduced levels of IL-12 and joint damage. On the other hand, some studies have failed to show a relationship between fluoxetine and the modulation of cytokine production (Kubera et al., 2004; Maes et al. 1995; Jazayeri et al., 2010). Grundmann et al. (2010) treated rats orally with 10mg/kg/day of fluoxetine for 21 days and observed no changes in the production of proinflammatory cytokines (IL-6 and TNF- α).

The production of pro- and anti-inflammatory cytokines due to stress plus fluoxetine is dependent on the type of stress and route of drug administration. Sprague-Dawley strain rats, after 21 days of restraint stress and chronic oral treatment with fluoxetine (10mg/kg), showed lower production of IL-6 than stressed-only animals, although TNF- α levels increased, reaching values similar to those of untreated stressed animals (Grundmann et al., 2010). On the other hand, Kubera et al. (2006) pre-treated rats with imipramine (5mg/kg) 1, 5 and 24 hours before forced swimming and found that the splenocytes of treated animals produced more IL-10 than controls (stressed and treated with vehicle), with no IFN- γ differences observed in any group. Rogoz et al. (2009) treated rats 1, 5 and 24 hours before forced swimming with 10mg/kg of fluoxetine via *i.p.* and observed that the interaction between stress and fluoxetine did not alter the splenocyte production of IL-10 or IFN- γ .

There are reports that the chronic administration of fluoxetine either causes weight loss (Wellman et al., 2003) or prevents weight gain (Gutierrez et al., 2002). In the present study, the chronic administration of fluoxetine led to a reduction in body mass when compared with saline treatment; this reduction was more pronounced when the animals were treated with the drug and subjected to forced swimming. First et al. (2011) treated rats for five weeks with fluoxetine (5mg/kg) and observed reduced body mass. However, when they were treated with the drug and submitted to chronic stress with multiple stressors, fluoxetine prevented weight loss due to this protocol. Zafir & Banu, (2007) also observed weight maintenance by chronic administration of fluoxetine in animals subjected to restraint stress. It is important to point out that the above-mentioned studies differed in the

degree of stress generated. In this study 15 min/day of forced swimming did not prevent the animals from gaining weight, but First et al. (2011), using various types of stressors for five weeks and Banu & Zafir (2007), using four hours of restraint stress, observed reduced body mass. Thus, combined multiple stressors or prolonged restraint seem to be more stressful than forced swimming. Considered jointly, these studies indicate two seemingly opposite effects of fluoxetine: in the presence of severe stressors known to induce mass reduction, the drug prevents such losses, while in the presence of mild stressors, the drug leads to weight loss, which suggests an anorexic effect. Human studies have confirmed the anorectic effect of fluoxetine in that reductions in body mass from the chronic administration of fluoxetine were observed in obese individuals (Wise, 1992).

Stress affects the mass of the adrenal glands and lymphoid organs such as the thymus and spleen. Baldwin et al. (1995) investigated the effects of forced swimming (3 to 5 days, sixty minutes per session) and found that the number of rats housed together (one or five) influenced the relative masses of the adrenal glands, spleen and thymus, the production of corticosterone and body mass. They observed that forced swimming, regardless of the type of accommodation, reduced the spleen, thymus and body mass of animals, but did not alter the production of corticosterone or the relative mass of the adrenal glands. When the animals were subjected to social isolation and forced swimming, however, there was increased corticosterone production and adrenal mass in addition to the above-mentioned effects, showing that these two models administered separately do not lead to stress, but together are stressful. Regarding the chronic effect of forced swimming, Zivkovic et al. (2005a) found that after submitting rats to 21 days of this protocol, the thymus weight of stressed animals was lower than that of non-stressed animals. In another study by the same authors (2005b), blood was collected from rats after their final swimming session for analysis of circulating corticosterone levels and it was observed that, even after 21 days of chronic forced swimming, corticosterone values remained high.

In our study, the adrenal gland mass of Wistar rats submitted to swimming (15 min daily for 25 days) did not change, which was a further similarity with the findings of Baldwin et al. (1995), i.e., body mass reduction in animals submitted to swimming. Our study differed from the above-mentioned studies in that our stress model did not lead to changes in spleen or thymus mass. Moreover, Connor et al. (1998) observed no changes in Sprague-Dawley spleen weight after acute forced swimming, which shows that, depending on the strain and stress time, body mass values may or may not vary.

Fluoxetine is also responsible for changing the mass of the adrenal glands, spleen and thymus of rodents. Garabal-Freire et al. (1997) submitted mice to a sound stressor (100 dB, 1 to 3 hours per day, four to twelve days) and observed a decrease in the number of thymic and spleen cells; this stressor also contributed to a reduction in relative thymus weight, a condition reversed by treatment with fluoxetine (5 mg/kg). Kubera et al. (2006) treated rats with three doses of imipramine 1, 5 and 24 hours before forced swimming and found that acute treatment with this drug did not alter the relative thymus weight, but did reduce spleen weight. In the present study, 24 days of fluoxetine treatment (10 mg / kg) reduced the relative thymus weight and body mass of rats and increased spleen and adrenal gland mass. Thus, either chronic treatment with fluoxetine stressed the animals or the change in relative adrenal mass is merely a reflection of the change in body mass since the adrenal glands did not necessarily increase. However, the sudden loss of body mass would have led to this apparent increase.

The currently-used antidepressants have specific compounds that act on different regions of the central nervous system, so it is expected that their use in rats or mice would lead to improvement in depression symptoms, i.e., reduced time floating (passive behavior) and increased time climbing and/or swimming (active behavior) during a forced swimming stressor (Piras et al., 2010). However, increases in climbing and/or swimming are dependent on the type of drug administered (Cryan & Lucki, 2000). Page et al. (1999) observed a reduction in floating time and an increase in swimming time in rats treated with fluoxetine. Carr et al. (2010) used fluoxetine in rats (20mg/kg) three times before forced swimming yielded similar results. Cryan & Lucki (2000) compared fluoxetine and reboxetine in a rat forced swimming model and found that both drugs led to reduced flotation time, although the former increased swimming time and the latter increased climbing time.

To investigate the effects of chronic treatment with fluoxetine (10mg/kg), Hansen et al. (2011) treated Wistar rats for 48 days with subcutaneous injections, after which the animals were subjected to forced swimming. The results showed that the floating, swimming and climbing times of treated rats were similar to those observed when fluoxetine was administered 24 hours before the test (acute effect). Pedreañez et al. (2011), studying the effects of forced swimming as a chronic stressor, carried out fifteen 30-min forced swimming sessions and found that the animals' active behavior dropped by 84 percent between the first and last session.

In our experiment, forced swimming was performed over a chronic period (twenty-five days). The results were expected to be similar to those in the literature (with test-retest separated by 24 h) or to those of Pedreañez et al. (2011) for rats subjected to chronic swimming. We found that, after the chronic treatment period, the time values were different from those observed when the test and retest were separated by 24 h. Stressed animals treated with saline had no alterations in floating, swimming or climbing times, indicating that forced swimming, when performed on a chronic basis, is not an appropriate model for investigating behavioral changes in rats. It should

be pointed out that different strains of rats exhibited different behavior in the two studies: the active behavior of Sprague-Dawley rats was reduced in Pedrañez et al. (2011) whereas, in the present study, Wistar behavior was constant throughout the protocol.

On the other hand, it was observed that animals treated with fluoxetine significantly increased floating time after treatment. Since climbing time was also reduced, we can infer that adaptation to the drug also leads to behavioral changes, contradicting expected behavior for this model of stress/depression. Two possibilities could explain this: first, chronic treatment with fluoxetine engenders passive behavior; second, their reduced body weight made them denser, which may have facilitated buoyancy and thus reduced effort expenditure.

4. Conclusion

We observed in this study that animals treated with fluoxetine and submitted to a 25 day forced swimming protocol had a reduced production of IgM and IgG2a and an increased production of IgG1. Considering the unique effect of the drug, the adrenal gland and relative spleen weight increased, while thymus weight was reduced. Drug-treated rats lost body mass compared to saline-treated rats. Regarding the analyzed behaviors, treatment with fluoxetine resulted in distinct changes in acute effect, indicating that swimming is not to be trusted as a model chronic stressor in rats. However, the alterations observed in this study may have important implications for the treatment of depression in humans since fluoxetine appears to impair the production of antibodies. Thus the indiscriminate use of this drug for non-stressed individuals must be questioned.

4. Acknowledgments

To Dr. Solange de Paula Ramos, Department of Histology, State University of Londrina, PR, Brazil, for providing materials used in much of the study and also for the supervision and guidance in animal handling and the procedures for collecting blood, sacrifice and removing organs.

To Dr. Tiemi Matsuo, Department of Statistics, State University of Londrina, PR, Brazil for help with the experimental design and statistical analysis.

To the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the scholarship granted to EVF.

5. References

- Alperina, E. L.; Kulikov, A. V.; Popova, N. K. & Idova, G. V. (2007). Immune Response in Mice of a New Strain ASC (Antidepressants Sensitive Catalepsy). *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, Vol.144, pp. 221-223, ISSN 1573-8221
- Altenburg, A. S. P.; Ventura, D. G.; Da-Silva, V. A.; Malheirosa, L. R.; Castro-Faria-Neto, H. C.; Bozza, P. T. & Teixeira, N. A. (2002) The role of forced swim test on neutrophil leukocytosis observed during inflammation induced by LPS in rodents. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, Vol.26, pp. 891-895, ISSN 0278-5846
- Baldwin, D. R.; Wilcox, Z. C. & BAYLOSIS, R. C. (1995) Impact of Differential Housing on Humoral Immunity Following Exposure to an Acute Stressor in Rats. *Physiology and Behavior*, Vol.57, No.4, pp. 649-653, ISSN 0031-9384
- Bauer, M. E.; Gauer, G. J.; Luz, C.; Silveira, R. O.; Nardi, N. B. & Von Mühlen, C. A. (1995). Evaluation of immune parameters in depressed patients. *Life Sciences*, Vol.57, pp. 665-674, ISSN 0199-9966
- Bezchlibnyk-Butler, K. Z. & Jeffries, J. J. (1999) *Clinical handbook of psychotropic drugs*. Hogrefe & Huber, ISBN 0-88937-271-3 Ashland, OH, US
- Borsini, F. & Meli, A. (1998) Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? *Psychopharmacology*, Vol.94, pp.147-160, ISSN 1432-2072
- Bromet, E.; Andrade, L. H.; Hwang, I.; Sampson, N. A.; Alonso, J.; De Girolamo, G.; De Graaf, R.; Demyttenaere, K.; Hu, C.; Iwata, N.; Karam, A. N.; Kaur, J.; Kostyuchenko, S.; Lépine, J. P.; Levinson, D.; Matschinger, H.; Mora, M. E.; Browne, M. O.; Posada-Villa, J.; Viana, M. C.; Williams, D. R. & Kessler, R. C. (2011) Cross-national epidemiology of DSM-IV major depressive episode. *BMC Medicine*, Vol.9, No.90, pp. 1-16 ISSN 1741-7015
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, Vol.7, No.72, pp. 248-254, ISSN 1096-0309
- Calabrese, J. R.; Kling, M. A. & Gold, P. W. (1987) Alterations in immunocompetence during stress, bereavement, and depression: Focus on neuroendocrine regulation. *American Journal of Psychology*, Vol. 144, pp. 1123-1134, ISSN 1939-8298

- Carr, G. V., Schechter, L. E. & Lucki, I. (2010). Antidepressant and anxiolytic effects of selective 5-HT₆ receptor agonists in rats. *Psychopharmacology*, DOI 10.1007/s00213-010-1798-7, ISSN 1432-2072
- Connor, T. J.; Kelly, J. P. & Leonard, B. E. (1998) Forced Swim Test-Induced Endocrine and Immune Changes in the Rat: Effect of Subacute Desipramine Treatment. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, Vol.59, No.1, pp. 171-177, ISSN 0091-3057
- Cryan, J. F. & Lucki, I. (2000). Antidepressant-Like Behavioral Effects Mediated by 5-Hydroxytryptamine 2C Receptors. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 295, 1120-1126, ISSN 1521-0103
- Edgar, V. A.; Cremaschi, G.; Sterin-Borda, L. & Genaro, A. M. (2002) Altered expression of autonomic neurotransmitter receptors and proliferative responses in lymphocytes from a chronic mild stress model of depression: effects of fluoxetine. *Brain, Behavior and Immunity*, Vol.16, pp. 333-350, ISSN 0889-1591
- Elenkov, I. J. & Chrousos, G. P. (1999) Stress Hormones, Th1/Th2 patterns, Pro/Anti-inflammatory Cytokines and Susceptibility to Disease. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, Vol.10, No.9, pp. 359-368, ISSN 1043-2760
- Egeland, M.; Warner-Schmidt, J.; Greengard, P. & Svenningsson, P. (2010). Neurogenic effects of fluoxetine are attenuated in p11 (S100A10) knockout mice. *Biological Psychiatry*, Vol.67, pp. 1048-1056, ISSN 0006-3223
- Fava, M. & Kendler, K. S. (2000) Major Depressive Disorder. *Neuron*, Vol.28, pp. 335-341, ISSN 0896-6273
- Fazzino, F.; Urbina, M.; Cedeño, N. & Lima, L. (2009). Fluoxetine treatment to rats modifies serotonin transporter and cAMP in lymphocytes, CD4⁺ and CD8⁺ subpopulations and interleukins 2 and 4. *International Immunopharmacology*, Vol.9, pp. 463-467, ISSN 1567-5769
- First, M.; Gil-Ad, I.; Taler, M.; Tarasenko, I.; Novak, N. & Weizman, A. (2011) The Effects of Fluoxetine Treatment in a Chronic Mild Stress Rat Model on Depression-Related Behavior, Brain Neurotrophins and ERK Expression. *Journal of Molecular Neuroscience*, in press, ISSN 1559-1166
- Freire-Garabal, M.; Nlifiez, M. J.; Losada, C.; Pereiro, D.; Riveiro, M. P.; Gonzalez-Patiao, E.; Mayan, J. M. & Rey-Mendez, M. (1997). Effects of fluoxetine on the immunosuppressive response to stress in mice. *Life Sciences*, Vol.60, pp. 403-413, ISSN 0024-3205
- Frick, L. R.; Palumbo, M. L.; Zappia, M. P.; Brocco, M. A.; Cremaschi, G. A. & Genaro, A. M. (2008). Inhibitory effect of fluoxetine on lymphoma growth through the modulation of antitumor T-cell response by serotonin-dependent and independent mechanisms. *Biochemical Pharmacology*, Vol.75, pp. 1817-1826, ISSN 0006-2952
- Frick, L. R.; Rapanelli, M.; Cremaschi, G. A. & Genaro, A. M. (2009). Fluoxetine directly counteracts the adverse effects of chronic stress on T cell immunity by compensatory and specific mechanisms. *Brain, Behavior, and Immunity*, Vol.23, pp. 36-40, ISSN 0889-1591
- Genaro, A. M.; Edgar, V. A. & Sterin-Borda, L. (2000) Differential effects of fluoxetine on murine B-cell proliferation depending on the biochemical pathways triggered by distinct mitogens. *Biochemical Pharmacology*, Vol.60, pp. 1279-1283, ISSN 0006-2952
- Guéguinou, N.; Bojados, M.; Jamon, M.; Derradji, H.; Baatout, S.; Tschirhart, E.; Fripiat, J-P. & Legrand-Frossi, C. (2011) Stress response and humoral immune system alterations related to chronic hypergravity in mice. *Psychoneuroendocrinology*, in press, ISSN 0306-4530
- Gutiérrez, A.; Saracibar, G.; Casis, L.; Echevarría, E.; Rodríguez, V. M.; Macarulla, M. T.; Abecia, L. C. & Portillo, M. P. (2002). Effects of fluoxetine administration on neuropeptide Y and orexins in obese Zucker rat hypothalamus. *Obesity Research*, Vol.10, pp. 532-540, ISSN 0306-7548
- Grundmann, O.; LV, Y.; Kelber, O. & Butterweck, V. (2010) Mechanism of St. John's wort extract (STW3-VI) during chronic restraint stress is mediated by the interrelationship of the immune, oxidative defense, and neuroendocrine system. *Neuropharmacology*, Vol.58, pp. 767-773, ISSN 0028-3908
- Hansen, F.; Oliveira, D. L.; Amaral, F. U. Í.; Guedes, F. S.; Schneider, T. J.; Tumelero, A. C.; Hansela, G. Schmidt, K. H.; Giacomini, A. C. V. V. & Torres, F. V. (2011) Effects of chronic administration of tryptophan with or without concomitant fluoxetine in depression-related and anxiety-like behaviors on adult rat. *Neuroscience Letters*, Vol.499, pp. 59-63, ISSN 0304-3940
- Hawley, D. M.; Lindström, K.; Wikelski, M. (2006) Experimentally increased social competition compromises humoral immune responses in house finches. *Hormones and Behavior*, Vol.49, pp. 417-424, ISSN 1095-6867
- Irwin, M. R.; Levin, M. J.; Carrillo, C.; Olmstead, R.; Lucko, A.; Lang, N.; Caulfield, M. J.; Weinberg, A.; Chan, I. S.; Clair, J.; Smith, J. G.; Marchese, R. D.; Williams, H. M.; Beck, D. J.; McCook, P. T.; Johnson, G. & Oxman, M. N. (2011) Major depressive disorder and immunity to varicella-zoster virus in the elderly. *Brain, Behavior and Immunity*, Vol.25, No.4, pp. 759-766, ISSN 0889-1591
- Jabbi, M.; Korff, J.; Ormel, J.; Kema, I. P. & Den Boer, J. A. (2008) Investigating the molecular basis of major depressive disorder etiology: a functional convergent genetic approach. *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol.1148, pp. 42-56, ISSN 1749-6632
- Janssen, D. G.; Caniato, R. N.; Verster, J. C. & Baune, B. T. (2010) A psychoneuroimmunological review on cytokines involved in antidepressant treatment response. *Human Psychopharmacology*, Vol.25, No.3, pp. 201-215, ISSN 1099-1077
- Jazayeri, S.; Keshavarz, S. A.; Tehrani-Doost, M.; Djalali, M.; Osseini, M.; Amini, H.; Chamari, M. & Djazayeri, A. (2010). Effects of eicosapentaenoic acid and fluoxetine on plasma cortisol, serum interleukin-1 β and

- interleukin-6 concentrations in patients with major depressive disorder. *Psychiatry Research*, Vol.178, pp. 112-115, ISSN 0165-1781
- Kendler, K. S.; Kessler, R. C.; Walters, E. E.; Maclean, C.; Nela, M. C.; Hesth, A. C. & EAVES, L. J. (1995) Stressful life events, genetic liability, and onset of an episode of major depression in women. *The American Journal of Psychiatry*, Vol.152, No.6, pp. 833-842, ISSN 1535-7228
- Kennedy, S. L.; Nickerson, M.; Campisi, J.; Johnson, J. D.; Smith, T. P.; Sharkey, C. & Fleshner, M. (2005) Splenic norepinephrine depletion following acute stress suppresses in vivo antibody response. *Journal of Neuroimmunology*, Vol.165, pp. 150-160, ISSN 0165-5728
- Kessler, R. C. (1997) The effects of stressful life events on depression. *Annual Review of Psychology*, Vol.48, pp. 191-214, ISSN 0066-4308
- Kronfol, Z. & House, J. D.; (1989) Lymphocyte mitogenesis, immunoglobulin and complement levels in depressed patients and normal controls. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, Vol.80, pp. 142-147, ISSN 1600-0447
- Kubera, M.; Symbirtsev, A.; Basta-Kaim, A.; Borycz, J.; Roman, A.; Papp, M. & Claesson, M. (1996) Effect of chronic treatment with imipramine on interleukin 1 and interleukin 2 production by splenocytes obtained from rats subjected to a chronic mild stress model of depression. *Polish Journal of Pharmacology*, Vol.48, No.5, pp. 503-506, ISSN 0301-0244
- Kubera, M.; Simbirtsev, A.; Mathison, R. & Maes, M. (2000) Effects of repeated fluoxetine and citalopram administration on cytokinerelease in C57BL/6 mice. *Psychiatry Research*, Vol.96, pp. 255-266, ISSN 0165-1781
- Kubera, M.; Kenis, G.; Bosmans, E.; Kajta, M.; Basta-Kaim, A.; Scharpe, S.; Budziszewska, B. & Maes, M. (2004). Stimulatory effect of antidepressants on the production of IL-6. *International Immunopharmacology*, Vol.4, pp. 185-192, ISSN 1567-5769
- Kubera, M.; Basta-Kaim, A.; Budziszewska, B.; Rogó, Z.; Skuza, G.; Lesiewicz, M.; Tetich, M.; Jaworska-Feil, L.; Maes, M. & Lason, W. (2006) Effect of amantadine and imipramine on immunological parameters of rats subjected to a forced swimming test. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, Vol.9, pp. 297-305, ISSN 1461-1457
- Laudenslager, M. L. & Clarke, A. S. (2000) Antidepressant treatment during social challenge prior to 1 year of age affects immune and endocrine responses in adult macaques. *Psychiatry Research*, Vol.95, pp. 25-34, ISSN 0165-1781
- Leonard, B. E. (2001) The immune system, depression and the action of antidepressants, *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, Vol.25, pp. 767-780, ISSN 0278-5846
- Lépine, J. P. & Briley, M. (2011) The increasing burden of depression. *Journal of Neuropsychiatric Disease and Treatment*, Vol.7, No.1, pp. 3-7, ISSN 1178-2021
- Lichtman, J. H.; J. Bigger, T. Jr.; Blumenthal, J. A.; Frasure-Smith, N.; Kaufmann, P.; Lespérance, F.; Mark, D. B.; Sheps, D. S.; Taylor, B. & Froelicher, E. S. (2009) Depression and Coronary Heart Disease: Recommendations for Screening, Referral, and Treatment. *Focus*, Vol.7, No.3, pp. 406-413, ISSN 1663-0459
- Lipp, M. E. N. (1994) *Stress, hipertensão arterial e qualidade de vida*. Papirus, Campinas, São Paulo.
- Loskutov, L. V.; Idova, G. V. & Gevorgyan, M. M. (2007). Immune Response in Wistar Rats with High and Low Level of Situational Anxiety. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, Vol.144, pp. 706-708, ISSN 1573-8221
- Lucki, I. (1997) The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. *Behavioural Pharmacology*, Vol.8, pp.523-532, ISSN 1473-5849
- Maes, M.; Meltzer, H. Y.; Bosmans, E.; Bergmans, R.; Vandoolaeghe, E.; Ranjan, R. & Desnyder, R. (1995). Increased plasma concentrations of interleukin-6, soluble interleukin-6, soluble interleukin-2 and transferrin receptor in major depression. *Journal of Affective Disorders*, Vol.34, pp. 301-309 ISSN 0165-0327
- Miller, A. H. (2010) Depression and immunity: A role for T cells? *Brain, Behavior, and Immunity*, Vol.24, pp. 1-8, ISSN 0889-1591
- Nishida, A.; Hisaoka, K.; Zensho, H.; Uchitomi, Y.; Morinobu, S. & Yamawaki, S. (2002). Antidepressant drugs and cytokines in mood disorders. *International Immunopharmacology*, Vol.2, pp. 1619-1626, ISSN 1567-5769
- Nunes, S. O. V.; Reiche, E. M. V.; Morimoto, H. K.; Matsuo, T.; Itano, E. N.; Xavier, E. C. D.; Yamashita, C. M.; Vieira, V. R.; Menoli, A. V.; Silva, S. S.; Costa, F. B.; Reiche, F. V.; Silva, F. L. V. & Kaminami, M. S. (2002) Immune and hormonal activity in adults suffering from depression. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, Vol.35, pp. 581-587, ISSN 1678-4510
- Page, M. E.; Detke, M. J.; Kirby, A. D. L. G. & Lucki, I. (1999). Serotonergic mediation of the effects of fluoxetine, but not desipramine, in the rat forced swimming test. *Psychopharmacology*, Vol.147, pp. 162-167, ISSN 1432-2072
- Pellegrino, T. C. & Bayer, B. M. (2002). Role of Central 5-HT₂ Receptors in Fluoxetine-Induced Decreases in T Lymphocyte Activity. *Brain, Behavior, and Immunity*, Vol.16, pp. 87-103, ISSN 0889-1591
- Pedersen, K. B.; Hoffman-Goetz, L. (2000) Exercise and the immune system: regulation, integration and adaptation. *Physiology Reviews*, Vol.80, No.3, pp. 1055-1081, ISSN 0066-4294

- Pedrañez, A.; Arcaya, J. L.; Carrizo, E.; Rincón, J.; Viera, N.; Peña, C.; Vargas, R. & Mosquera, J. (2011) Experimental depression induces renal oxidative stress in rats. *Physiology & Behavior*, in press, ISSN 0031-9384
- Piras, G.; Giorgi, O. & Corda, M. G. (2010) Effects of antidepressants on the performance in the forced swim test of two psychogenetically selected lines of rats that differ in coping strategies to aversive conditions. *Psychopharmacology*, Vol.211, pp. 403-414, ISSN 1432-2072
- Porsolt, R.D.; Le Pichon, M.; Jalfre, M. (1977) Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, Vol.266, pp.730-732, ISSN 0028-0836
- Post, R. M. (1992) Transduction of psychosocial stress into the neurobiology of recurrent affective disorder. *American Journal of Psychology*, Vol.149, No.8, pp. 999-1010, ISSN 0002-9556
- Rammal, H.; Bouayed, J.; Falla, J.; Boujedaini, N. & Soulimani, R. (2010) The Impact of High Anxiety Level on Cellular and Humoral Immunity in Mice. *Neuroimmunomodulation*, Vol.17, pp. 1-8 ISSN 1021-7401
- Reiche, E. M. V.; Nunes, S. O. V. & Marimoto, H. K. (2004) Stress, depression, the immune system, and cancer. *The Lancet Oncology*, Vol.5, pp. 617-625, ISSN 1470-2045
- Robles, T. F.; Glaser, R. & Kiecolt-Glaser, J. K. (2005) A New Look at Chronic Stress, Depression, and Immunity. *Current Directions in Psychological Science*, Vol.14, No.2, pp. 111-115, ISSN 0963-7214
- Rogóz, Z.; Kubera, M.; Rogóz, K.; Basta-Kaim, A. & Budziszewska, B. (2009) Effect of co-administration of fluoxetine and amantadine on immunoendocrine parameters in rats subjected to a forced swimming test. *Pharmacological Reports*, Vol.61, pp. 1050-1060, ISSN 1734-1140
- Rosas-Ballina, M.; Olofsson, P. S.; Ochari, M.; Valdés-Ferrer, S. I.; Levine, Y. A.; Reardon, C.; Tusche, M. W.; Pavlov, V. A.; Andersson, U.; Chavan, S.; Mak, T. W. & Tracey, K. J. (2011) Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit. *Science*, Vol.334, No.6052, pp. 98-101 ISSN 1095-9203
- Roumestan, C.; Michel, A.; Bichon, F.; Portet, K.; Detoc, M.; Henriquet, C.; Jaffuel, D. & Mathieu, M. (2007). Anti-inflammatory properties of desipramine and fluoxetine. *Respiratory Research*, Vol.8, pp. 1-11, ISSN 1465-9921
- Sacre, S.; Medghalchi, M.; Gregory, B.; Brennan, F. & Williams, R. (2010). Fluoxetine and Citalopram Exhibit Potent Antiinflammatory Activity in Human and Murine Models of Rheumatoid Arthritis and Inhibit Toll-like Receptors. *Arthritis and rheumatism*, Vol.62, pp. 683-693, ISSN 1529-0131
- Schleifer SJ, Keller SE, Meyerson AT, Raskin MJ, Davis KL, Stein M. (1984) Lymphocyte function in major depressive disorder. *Archives of General Psychiatry*, Vol.41, No.5, pp.484-486 ISSN 0003-990x
- Schleifer, S. J.; Keller, S. E.; Siris, S. G.; Davis, K. L. & Stein, M. (1985) Depression and immunity. Lymphocyte function in ambulatory depressed patients, hospitalized schizophrenic patients, and patients hospitalized for herniorrhaphy. *Archives of General Psychiatry*, Vol.43, pp. 129-133, ISSN 0003-990X
- Schleifer, S. J.; Keller, S. E.; Meyerson, A. T.; Rashkin, M. J.; Davis, K. L.; Stein, M. (1996) Lymphocyte function in major depression disorder. *Archives of General Psychiatry*, Vol.41, pp. 484-486, ISSN 0003-990X
- Seedat, S.; Scott, K. M.; Angermeyer, M. C.; Berglund, P.; Bromet, E. J.; Brugha, T. S.; Demyttenaere, K.; De Girolamo, G.; Haro, J. M.; Jin, R.; Karam, E. G.; Kovess-Masfety, V.; Levinson, D.; Medina-Mora, M. E.; Ono, Y.; Ormel, J.; Pennell, B. E.; Posada-Villa, J.; Sampson, N. A.; Williams, D. & Kessler, R. C. (2009) Cross-national associations between gender and mental disorders in the World Health Organization World Mental Health Surveys. *Archives of General Psychiatry*, Vol.66, No.7, pp. 785-795, ISSN 0003-990X
- Seegerstrom, S. C. & Miller, G. E. (2004) Psychological Stress and the Human Immune System: A Meta-Analytic Study of 30 Years of Inquiry. *Psychopharmacology Bulletin*, Vol.130, No.4, pp. 601-630, ISSN 0048-5764
- Seidel, A.; Arolt, V.; Hunstiger, M.; Rink, L.; Behnisch, A. & Kirchner, H. (1995) Cytokine production and serum proteins in depression. *Scandinavian Journal of Immunology*, Vol.41, pp. 534-538, ISSN 1365-3083
- Selye, H. A (1936) Syndrome produced by diversal nocuous agents. *Nature*, pp. 13-32, ISSN 0028-0836
- Sluzewska, A.; Rybakowski, J. K.; Laciak, M.; Mackewicz, A.; Sobieska, M. & Wiktorowicz, K.; (1995) Interleukin-6 serum levels in depressed patients before and after treatment with fluoxetine. *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol.762, pp. 474-476, ISSN 1749-6632
- Smith, R.S. (1991) The macrophage theory of depression. *Medical Hypotheses*, Vol.35, No.4, pp. 298-306, ISSN 0306-9877
- Song, C.; Dinan, T. & Leonard, B. E. (1994) Changes in immunoglobulin, complement and acute phase protein concentrations in depressed patients and normal controls. *Journal of Affective Disorders*, Vol.49, pp. 211-219 ISSN 0165-0327
- Stacciarini, J. M. R. & Tróccoli, B. T. (2004) Occupational stress and constructive thinking: health and job satisfaction. *Journal of Advanced Nursing*, Vol.46, No.5, pp. 480-487, ISSN 1365-2648
- Stahl, S. M. (1997) *Psychopharmacology of Antidepressants*. Martin Dunitz, London, England
- Stanojevic, S.; Dimitrijevic, M.; Kovacevic-Jovanovic, V.; Miletic, T.; Vujic, V.; Radulovic, J. (2003) Stress Applied During Primary Immunization Affects the Secondary Humoral Immune Response in the Rat: Involvement of Opioid Peptides. *Stress*, Vol.6, No.4, pp. 247-258, ISSN 1607-8888
- Szuster-Ciesielska, A.; Słotwińska, M.; Stachura, A.; Marmurowska-Michałowska, H.; Dubas-Slemp, H.; Bojarska-Junak, A. & Kandefler-Szerszeń, M. (2008) Accelerated apoptosis of blood leukocytes and oxidative stress

- in blood of patients with major depression. *Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry*, Vol.32, No.3, pp. 686-694 ISSN 0278-5846
- Vismari, L.; Alves, G. J. & Palerm-Neto, J. (2008) Depressão, antidepressivos e sistema imune: um novo olhar sobre um velho problema. *Revista de Psiquiatria Clínica*, Vol.35, No.5, pp.196-204, ISSN 0101-6083
- Waraich, P.; Goldner, E. M.; Somers, J. M. & Hsu, L. (2004) Prevalence and incidence studies of mood disorders: a systematic review of the literature. *Canadian Journal of Psychiatry*, Vol.49, No.2, pp. 124-138, ISSN 0703-7437
- Wellman, P. J.; Jones, S. L. & Miller, D. K. (2003). Effects of preexposure to dexfenfluramine, phentermine, dexfenfluramine-phentermine, or fluoxetine on sibutramine-induced hypophagia in the adult rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, Vol.75, pp. 103-114 ISSN 0091-3057
- Willner, P. (1992) Animal models of depression: an overview. *Pharmacology and Therapeutics*. Vol.45, pp. 425-455, ISSN 0163-7258
- Wise, S. D. (1992). Clinical studies with fluoxetine in obesity. *American Journal of Clinical Nutrition*, Vol.55, pp. 181S-184S, ISSN 1938-3207
- Zafir, A. & Banu, N. (2007). Antioxidant potential of fluoxetine in comparison to Curcuma longa in restraint-stressed rats. *European Journal of Pharmacology*, Vol.572, pp. 23-31, ISSN 0014-2999
- Zivkovic, I.; Rakina, A.; Petrovic-Djergovic, D.; Miljkovic, B. & Micic, M. (2005a) The effects of chronic stress on thymus innervations in the adult rat. *Acta histochemica*, Vol.106, pp. 449-458, ISSN 0065-1281
- Zivkovic, I.; Rakina, A.; Petrovic-Djergovic, D.; Miljkovic, B. & Micic, M. (2005b) Exposure to forced swim stress alters morphofunctional characteristics of the rat thymus. *Journal of Neuroimmunology*, vol.160, pp. 77- 86, ISSN 0165-5728

ANEXOS

ANEXO A

Normas para publicação no periódico, Psicologia: Teoria e Pesquisa

Psicologia: Teoria e Pesquisa (normas para publicação)

Forma de Apresentação dos Manuscritos

Psicologia: Teoria e Pesquisa adota as normas de publicação aseadas no *Publication Manual of the American Psychological Association* (5a edição, 2001), exceto em situações específicas onde há conflito com a necessidade de se assegurar o cumprimento da revisão cega por pares, regras do uso da língua portuguesa, normas gerais da ABNT, procedimentos internos da revista, inclusive características de infra-estrutura operacional. A omissão de informação no detalhamento que se segue implica que prevalece a orientação da APA. Os manuscritos devem ser preferencialmente redigidos em português. São aceitos manuscritos redigidos em inglês, espanhol e francês e, a critério do Conselho Editorial, em outras línguas.

A submissão dos manuscritos originais deve ser feita eletronicamente. Os arquivos de texto e de tabelas devem ser submetidos em formato Word (.doc), redigidos em espaço duplo (distância entre linhas igual a 1 cm), em fonte tipo Times New Roman, tamanho 12. A página deverá ser tamanho A4, com formatação de margens superior, inferior, esquerda e direita igual a 3 cm. No arquivo de texto, cada linha escrita não deve conter mais do que 80 caracteres. Todas as imagens (gráficos, ilustrações, fotos etc) devem ser em alta resolução (mínimo de 300dpi) e em um dos seguintes formatos: *jpeg ou gif*. Sugerimos aos autores a criação de seus gráficos e ilustrações em preto e branco, de acordo com o projeto gráfico da revista. As imagens enviadas devem ter o tamanho máximo de 2MB. Tabelas e gráficos deve vir após as referências (ou apêndices).

Para estimar a equivalência entre página impressa da publicação e página de manuscrito, o autor deve tomar como referência que 1 página impressa da revista corresponde a 3 páginas de manuscrito. A folha de rosto despersonalizada (ver item 1.1 abaixo) não deve ser numerada nem somada ao número total de páginas.

Paralelamente ao envio dos arquivos de texto, figuras e tabelas deverá haver o encaminhamento à revista de carta assinada pelo autor principal, na qual esteja explicitada a intenção de submissão ou re-submissão do trabalho para publicação. Essa carta deverá ser enviada por e-mail, com assinatura eletrônica. Em caso de trabalho de autoria múltipla, a versão final deverá ser acompanhada de carta assinada por todos os autores. Instruções para redação de carta de *acordo de publicação*, sem a qual o trabalho não entrará no prelo, deverá ser encaminhada pela revista ao autor principal.

A apresentação dos trabalhos deve seguir a seguinte ordem:

1. Texto

1.1 Folha de rosto contendo apenas:

- . Título pleno em português, não devendo exceder 12 palavras;
- . Sugestão de título abreviado para cabeçalho, não devendo exceder 4 palavras;
- . Título pleno em inglês, compatível com o título em português.

1.2 Folha contendo Resumo, em português.

O resumo deve ter o máximo de 120 palavras para trabalhos nas categorias 1, 2, 3 e 4, e o máximo

de 50 palavras para trabalhos nas categorias 5, 6 e 7. As categorias 8 e 9 não admitem resumo. Ao resumo devem-se seguir as palavras-chave para fins de indexação do trabalho. Devem ser escolhidas palavras-chave que classifiquem o trabalho com precisão adequada, que permitam que ele seja recuperado junto com trabalhos semelhantes, e que possivelmente seriam evocadas por um pesquisador efetuando levantamento bibliográfico.

No caso de relato de pesquisa, o resumo deve incluir: descrição sumária do problema investigado, características pertinentes da amostra, método utilizado para a coleta de dados, resultados e conclusões, suas implicações ou aplicações.

O resumo de uma revisão crítica ou de um estudo teórico deve incluir: tópico tratado (em uma frase), objetivo, tese ou construto sob análise, fontes usadas (observação feita pelo autor, literatura publicada) e conclusões.

1.3 *Folha contendo Abstract*, em inglês, compatível com o texto do resumo.

O *Abstract* deve obedecer às mesmas especificações para a versão em português, seguido de *keywords*, compatíveis com as palavras-chave.

1.4 *Texto* propriamente dito.

Em todas as categorias de trabalho original, o texto deve ter uma organização de reconhecimento fácil, sinalizada por um sistema de títulos e subtítulos que reflitam a organização. No caso de relatos de pesquisa, o texto deverá, obrigatoriamente, apresentar: introdução, método, resultados e discussão. As notas não bibliográficas deverão ser reduzidas a um mínimo e colocadas ao pé das páginas, ordenadas por algarismos arábicos que deverão aparecer imediatamente após o segmento de texto ao qual se refere a nota. Os locais sugeridos para inserção de figuras e tabelas deverão ser indicados no texto. As citações de autores deverão ser feitas de acordo com as normas da APA, exemplificadas no item IV. No caso de transcrição na íntegra de um texto, a transcrição deve ser delimitada por aspas e a citação do autor seguida do número da página citada. Uma citação literal com 40 ou mais palavras deve ser apresentada em bloco próprio, na mesma posição de um novo parágrafo. O tamanho da fonte deve ser 12, como no restante do texto.

1.5 *Referências*, ordenadas de acordo com as regras gerais que se seguem. Trabalhos de autoria única e do mesmo autor são ordenados por ano de publicação, o mais antigo primeiro. Trabalhos de autoria única precedem trabalhos de autoria múltipla, quando o sobrenome é o mesmo. Trabalhos em que o primeiro autor é o mesmo, mas co-autores diferem, são ordenados por sobrenome dos co-autores. Trabalhos com a mesma autoria múltipla são ordenados por data, o mais antigo primeiro. Trabalhos com a mesma autoria e a mesma data são ordenados alfabeticamente pelo título, desconsiderando a primeira palavra se for artigo ou pronome, exceto quando o próprio título contiver indicação de ordem. A formatação da lista de referências deve ser apropriada à tarefa de revisão e de editoração, com espaço duplo e tamanho de fonte 12, parágrafo normal com recuo no nome do autor, sem deslocamento das margens; grifos devem ser indicados em itálico.

1.6 *Apêndices*, apenas quando contiverem informação original importante, ou destacamento indispensável para a compreensão de alguma seção do trabalho. Recomenda-se evitar Apêndices.

2. Tabelas

O título da tabela deve ser alinhado com a largura da mesma e colocado acima dela. Na publicação impressa, a tabela não poderá exceder 17,5 cm de largura x 23,7 cm de comprimento. Sua largura deve ser limitada a 60 caracteres, para tabelas simples a ocupar uma coluna impressa, e a 125 caracteres, para tabelas complexas a ocupar duas colunas impressas, incluindo 3 caracteres de espaço entre colunas da tabela. O comprimento da tabela não deve exceder 55 linhas, incluindo título e rodapé(s). Para outros detalhamentos, especialmente em casos anômalos, o manual da APA deve ser consultado.

2. Figuras

O título da figura deve ser alinhado com a largura da mesma e colocado abaixo dela. Para assegurar qualidade de reprodução, as figuras contendo desenhos deverão ser encaminhadas em qualidade para fotografia. Como a versão publicada não poderá exceder a largura de 8,3 cm para figuras simples, e de 17,5 cm para figuras complexas, o autor deverá cuidar para que as legendas mantenham qualidade de leitura, caso redução seja necessária.

Citação no Texto

1. Citação de artigo de autoria múltipla

1.1 *Dois autores*

. O sobrenome dos autores é explicitado em todas as citações, usando "e" ou "&", conforme a seguir:

. Use "e" quando houver citação dos autores no texto e apenas a data do trabalho entre parênteses.

Ex: "O método proposto por Siqueland e Delucia (1969) ..."

. Use "&" quando a citação for colocada toda entre parênteses.

Ex: "o método foi proposto para o estudo da visão (Siqueland & Delucia, 1969)"

1.2 *De três a cinco autores*

. O sobrenome de todos os autores é explicitado na primeira citação, como acima. Da segunda citação em diante, só o sobrenome do primeiro autor é explicitado, seguido de "e cols." (ou "& cols"):

Ex: "Spielberger, Gorsuch e Lushene (1994) verificaram que" [primeira citação no texto]

Ex: "Spielberger e cols. (1994) verificaram que" [citação subsequente, primeira no parágrafo]

Ex: "Spielberg e cols. verificaram" [omite o ano em citações subsequentes dentro de um mesmo parágrafo]

. Exceção: Se a forma abreviada gerar aparente identidade de dois trabalhos em que os co-autores diferem, os co-autores são explicitados até que a ambiguidade seja eliminada.

Ex: Os trabalhos de Hayes, S. C., Brownstein, A. J., Haas, J. R. & Greenway, D. E. (1986) e

Hayes, S. C., Brownstein, A. J., Zettle, R. D., Rosenfarb, I. & Korn, Z. (1986) são assim citados: "Hayes, Brownstein, Haas e cols. (1986) e Hayes, Brownstein, Zettle e cols. (1986) verificaram que ..."

. Na seção de Referências, todos os nomes devem ser relacionados.

1.3 Seis ou mais autores

. No texto, desde a primeira citação, só o sobrenome do primeiro autor é mencionado, seguido de "e cols." (ou "& cols."), exceto se este formato gerar ambigüidade, caso em que a mesma solução indicada no item anterior deve ser utilizada.

. Na seção de Referências, todos os nomes devem ser relacionados.

2. Citações de trabalho discutido em uma fonte secundária

O texto usa como fonte um trabalho discutido em outro, sem que o original tenha sido lido (por exemplo, um estudo de Flavell, citado por Shore, 1982). No texto, use a seguinte citação:

Ex: "Flavell (conforme citado por Shore, 1982) acrescenta que os estudantes..."

Na seção de Referências, informe apenas a fonte secundária, no caso Shore (1982), utilizando o formato apropriado.

3. Citação de trabalhos clássicos reeditados

. Quando a data do trabalho é desconhecida ou muito antiga, citar o nome do autor seguido de "sem data".

Ex: "Piaget (sem data) mostrou que..." ou (Piaget, sem data).

. Em obra cuja data original é desconhecida, mas a data do trabalho lido é conhecida, citar o nome do autor seguido de "tradução" ou "versão" e data da tradução ou da versão.

Ex: "Conforme Aristóteles (tradução, 1931)" ou (Aristóteles, versão 1931).

. Quando data original e consultada são diferentes, mas conhecidas, citar autor, data do original e data da versão consultada.

Ex: "Já mostrava Pavlov (1904/1980)" ou (Pavlov, 1904/1980).

4. Citação de comunicação pessoal

. Citação de comunicação pessoal deve ser evitada, por não oferecer informação recuperável por meios convencionais. Se inevitável, deve aparecer no texto, mas não na seção de Referências. Citar autor, escrever "comunicação pessoal" e indicar data com dia, mês e ano da comunicação.

Ex: "Conforme mostra Zannon (comunicação pessoal, 30 de outubro de 1994)..." ou (Zannon, comunicação pessoal, 30 de outubro de 1994).

Seção de Referências

Organizar a seção de referências por ordem alfabética dos sobrenomes dos autores. Com o mesmo autor ou autores, organizar pela data de publicação, com as mais antigas vindo antes das mais novas. Referências com o mesmo primeiro autor, mas com diferentes segundos ou terceiros autores, devem ser organizadas por ordem alfabética dos segundos ou terceiros autores (ou quartos ou quintos...).

1. Relatório técnico

Birney, A. J., & Hall, M. M. (1981). *Early identification of children with written language disabilities* (relatório no 81-1502). Washington: National Education Association.

2. Trabalho apresentado em congresso, mas não publicado

Miguel, C., Carr, J. E., & Sidener, T. (2002, maio). *Interpolation of reinforcement and behavior during extinction*. Trabalho apresentado na Reunião Anual da Association for Behavior Analysis, Toronto, Canadá.

3. Trabalho apresentado em congresso com resumo publicado em publicação seriada regular

. Tratar como publicação em periódico, acrescentando logo após o título a indicação de que se trata de resumo.

Silva, A. A., & Engelmann, A. (1988). Teste de eficiência de um curso para melhorar a capacidade de julgamentos corretos de expressões faciais de emoções [Resumo]. *Ciência e Cultura*, 40 (7, Suplemento), 927.

4. Trabalho apresentado em congresso com resumo publicado em publicação especial

. Tratar como publicação em livro, informando sobre o evento de acordo com as informações disponíveis em capa.

Todorov, J. C., Souza, D. G., & Bori, C. M. (1992). Escolha e decisão: a teoria da maximização momentânea [Resumo]. Em Sociedade Brasileira de Psicologia (Org.), *Resumos de comunicações científicas, XXII Reunião Anual de Psicologia* (p. 66). Ribeirão Preto: SBP.

5. Teses ou dissertações não publicadas

Bohm, C. H. (2009). *Síndrome do intestino irritável: um exercício em análise funcional do comportamento*. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, Brasília.

6. Livros

. Primeira edição:

Lasch, C. (1979). *The culture of narcissism: American life in an age of diminishing expectations*. New York: Warner Books.

. Obra reeditada:

Vasconcelos, L. A. (2008). *Brincando com histórias infantis: uma contribuição da Análise do Comportamento para o desenvolvimento de crianças e jovens* (2ª ed.). Santo André: ESETec.

7. Capítulo de livro

Massimi, M. (2005). O processo de institucionalização do saber psicológico no Brasil do século XIX. Em A. M. Jacó-Vilela, A. A. L. Ferreira & F. T. Portugal (Orgs.), *História da Psicologia: rumos e percursos* (pp. 75-83). Rio de Janeiro: Nau.

Catania, C. (2000). Ten points every behavior analyst needs to remember about reinforcement. Em J. C. Leslie & D. Blackman (Eds.), *Experimental and applied analysis of human behavior* (pp. 23-37). Reno: Context Press.

8. Livro traduzido para o português

. Se a tradução em língua portuguesa de um trabalho em outra língua é usada como fonte, citar a tradução em português e indicar ano de publicação do trabalho original.

Goodal, J. (1991). *Uma janela para a vida: 30 anos com os chimpanzés da Tanzânia* (E. F. Alves, Trad.). Rio de Janeiro: Jorge Zahar (Trabalho original publicado em 1990).

. No texto, citar o ano da publicação original e o ano da tradução.

Ex: (Goodal, 1990/1991).

9. Artigo em periódico científico

. Informar o periódico e o volume. Carvalho, A. M., & Pereira, A. S. P. (2008). Qualidade em ambientes de um programa de educação pública. *Psicologia: Teoria e Pesquisa*, 24, 269-277.

. Indicar número do periódico, entre parênteses, apenas quando a paginação é reiniciada a cada número.

10. Obras antigas com reedição em data muito posterior

Pavlov, I. P. (1980). Os primeiros passos certos no caminho de uma nova investigação (R. Moreno, Trad.), *Textos Escolhidos, Coleção Os Pensadores* (pp. 3-14). São Paulo: Abril Cultural. (Trabalho original publicado em 1904)

11. Obra no prelo

. Não forneça ano, volume ou número de páginas até que o artigo esteja publicado. Respeitada a ordem de nomes, é a última referência do autor.

Melchiori, L. E., Alves, Z. M. M. B., Souza, D. C., & Bugliani, M. A. (no prelo). Família e creche: crenças a respeito de temperamento e desempenho de bebês. *Psicologia: Teoria e Pesquisa*.

12. Autoria institucional

American Psychiatric Association (1988). *DSM-III-R, Diagnostic and statistical manual of mental disorder* (3ª ed. revisada). Washington: Autor.

13. Material consultados na mídia eletrônica

. Artigo de periódico disponível na Internet e em versão impressa:

Lemos, C., Gottschall, C. A. M., Pellanda, L. C., & Müller, M. (2008). Associação entre depressão, ansiedade e qualidade de vida após infarto do miocárdio [versão eletrônica]. *Psicologia: Teoria e Pesquisa*, 24, 471-476.

. Artigo de periódico disponível apenas na Internet:

Veríssimo, D. S., & Furlan, R. (2006). Merleau-Ponty e a evolução espontânea da psicologia. *Temas em Psicologia*, 14, 143-151. Retirado em 28/4/2009, de <http://www.sbponline.org.br/revista2/vol14n2/PDF/v14n02a04.pdf>

. Obs: quando houver dia e mês da publicação indicado na página da Internet, acrescentar junto ao ano da publicação do material.

Comitê de Ética

Os manuscritos da categoria ‘relato de pesquisa’ devem incluir carta de aprovação de um comitê de ética em pesquisa.

Endereço para Encaminhamento

Manuscritos devem ser submetidos por meio do seguinte endereço eletrônico: www.revistaptp.unb.br. Comunicações rápidas podem ser efetuadas por meio do tel/fax: 55 61 3274 6455 ou do e-mail: revptp@unb.br.

ANEXO B
Instruções aos autores do capítulo

MS WORD MANUSCRIPT INSTRUCTIONS

Please read these instructions carefully. Prepare your manuscript exactly according to the instructions. That is the easiest and the most efficient way to ensure a rapid publication process and have a good published manuscript.

Size and file format

The size of the manuscript must be between 16 and 26 full pages. The manuscript has to be submitted as MS Word (*.doc) files. If you use other word editors, and cannot transfer it in Word and PDF, please contact us.

Layout guidelines

- Use Custom Size Format, Width = 17cm, Height = 24cm
- Top margin is set to 2,5 cm and bottom margin is set to 3,0 cm
- Left and right margins are set to 2,0 cm
- Use the whole space of all pages, do not leave free space
- Strive to use space to the bottom of the last page

Guidelines for the text of the manuscript

- For the text body Use Book Antiqua font, 9pt, normal
- For Main Headings use Helvetica font, 10pt, bold
- For secondary and tertiary headings use Helvetica font, 9pt, bold
- Main headings are numbered 1, 2, 3 and so on; secondary headings are numbered 1.1, 1.2, 1.3, and tertiary headings are numbered 1.1.1, 1.1.2, 1.1.3
- All headings are left justified. No paragraph indentation.
- Paragraphs are justified using single spacing, with no paragraph indentation
- Leave one 6pt clear line between paragraphs within a section
- Leave one 6pt clear line between the main heading and the body of the text
- Leave one 14pt clear line before main, secondary or tertiary headings
- Avoid leaving a heading at the bottom of a page, with the subsequent text starting at the top of the next page. Use extra spacing (between earlier figures or sections) to push the heading up to the top of the next page. In view of the tight page constraints, however, do please make the fullest possible use of the text area.
- Number footnotes consecutively with superscript numbers. Leave one clear (9pt) line space below the footnote line

Tables and figures

- Tables and figures are centred and numbered consecutively with Arabic numerals, from 1 upwards
- Tables and figures have to be made in high quality, suitable for reproduction and print, taking into account necessary size reduction
- Photos and graphics have to be in high resolution. High resolution starts at 300 DPI for .JPEG, .TIFF or .EPS formatted files
- Tables and figures should be embedded in the text
- A short descriptive title should appear under each table/figure/photo with a clear legend
- Descriptive titles (captions) must be left justified
- For descriptive titles use Book Antiqua font, 9pt normal
- Place figures as close as possible to their reference in the paper
- The notations on figures must be clearly readable
- All units must be included
- Leave one 9pt clear line above and below a table/figure/photo

Equations

- Equations are centred and numbered consecutively with Arabic numerals, from 1 upwards
- Use Book Antiqua font, 9pt normal
- Leave one 9pt blank line above and 5pt below an equation

- You are free to use equation-editor programs such as "MathType" and "Aurora"

Language, style and spelling

- The manuscript must be written in English. If English is not your mother tongue, we recommend that you have your paper proofread to ensure the accuracy and improve the language quality
- Use common technical terms
- Avoid abbreviations
- Spelling: follow Merriam Webster's Collegiate Dictionary, Longman or Oxford English Dictionaries
- Check for consistency in the use of a decimal comma (16,2) or a decimal point (16.2)
- Be consistent in the use of units of measurement

Referring

When publications are referred to in the text, enclose the author's name and the year of publication within brackets.

- For one author, use author's surname and the year (Arkin, 2004).
- For two authors, give both names and the year (Mataric & Brooks, 1999).
- For three or more authors, use the first author and „et al.“, and the year (Siegwart et al., 2006).
- For different authors with the same surname, add initials to the authors names to distinguish them, (Arkin & S.A. Brooks, 1981) to distinguish from (A.T. Brooks & Siegwart, 2006).
- For multiple works by the same author write the author's surname once followed by the years of each publication, separated by a comma (Arkin, 2004, 2009)
- If there is more than one manuscript by the same author(s) and with the same date, label them a, b, c etc. (Stairs, 1992a, 1992b)
- For multiple references list the citations in alphabetical order and separate with semicolons (Arkin, 2005; Brooks & Siegwart, 1982; Zani, 1999).
- For organizations or group of authors: If the organization is recognized by abbreviation, cite the first time as follows: (Australian Institute of Health and Welfare [AIHW], 2005), thereafter (AIHW, 2005). If the abbreviation is not widely known, give the name in full every time: (Australian Research Council, 1996).
- For citation of a secondary source, i.e. a source referred to in another publication, (Arkin, 1982, as cited in Brooks & Siegwart, 2005). In the reference list you only include the details of the source you actually read - not the original source.

Reference list

- References have to include at least 5 items
- Do not number references
- Do not add space lines between references
- The list of references has to be arranged alphabetically according to the first author
- Publications by the same author(s) should be listed following the year of publication
- All listed references must be directly cited in the body of the text
- All references cited in text must also be included in the reference list
- Do not add full stops to URLs
- Second line is 1,24cm intended
- Be consistent with your referencing style across the document
- Write the full title of the publication. Shortening is allowed only if the publication is recognized by abbreviation
- For multiple authors: separate names with commas and use the "&" symbol before the last name
Author(1) last name, Author(1) initial., Author(2) last name, Author(2) initial., & Author(3) last name, Author (3) initial.

Examples

Print Books

Author last name, Author initial. (Date of publication). *Name of Book in Italics* (edition), Publisher, ISBN, Place of Publication

Edited Books

Editor last name, Editor initial. (Ed(s)). (Date of publication). *Name of Book in Italics*, Publisher, ISBN, Place of Publication

Electronic Books

Author last name, Author initial. (Date of publication). *Name of Book in Italics*, Publisher, Retrieved from <URL>

Chapters in a print book

Author last name, Author initial. (Year of publication). Name of chapter, In: *Name of Book in Italics*, Name(s) of Editor(s), pp. (first-last page numbers), Publisher, ISBN, Place of publication

Chapter in an electronic book

Author last name, Author initial. (Year of publication). Name of chapter, In: *Name of Book in Italics*, Name(s) of Editor(s), pp. (first-last page numbers), Publisher, Retrieved from <URL>

Papers in Journals

Author last name, Author initial. (Year of publication). Name of paper. *Name of Journal in Italics*, Vol. volume number, No. issue number, (month and year of the edition), pp. (first-last page numbers), ISSN

Papers in Conference Proceedings

Author last name, Author initial. (Year of publication). Title of conference paper, *Proceedings of xxx xxx*, ISBN, conference location, month and year

World Wide Web Sites and Other Electronic Sources

Author last name, Author initial. (Date of publication or revision). Title, In: *source in Italics*, Date of access, Available from: <Available URL>

Use n.d. (no date) where no publication date is available.

Where no author is available, transfer the organisation behind the website, or the title, to the author space.

If there is no ISBN/ISSN number mentioned on an item, it can be omitted in the reference.

Content

The manuscript must contain clear answers to the following questions: What is the problem / What has been done by other researchers and where can you contribute / What have you done / Which method or tools you used / What are your results / What is new and good, what is not good / Future research.

Structure and organization of the article

- Chapter Number
- Chapter Title
- 1st Author Name and Surname, 2nd & 3rd
- Name of the University/Company
- Country
- Body of text with numbered sections
- The body of the manuscript begins with the introduction
- The 1st heading is placed on the 1st page, titled "1. Introduction"
- The conclusion of your research must be summarized in a separate section under heading titled "Conclusion"
- As the author, it is your sole decision whether to write acknowledgments. The acknowledgment section follows compulsorily the Conclusion section and is titled "Acknowledgment"
- The last section of your work is the Reference section. If the acknowledgment section is included, the Reference section comes compulsorily after, otherwise it follows the Conclusion section.
- Conclusion, Acknowledgment and Reference sections are all numbered sections that follow your paragraph numbering. For their headings use Helvetica font, 10pt bold.

Your manuscript ends with the last reference.

ANEXO C

Carta de aceite do capítulo

NOTIFICATION OF ACCEPTANCE

November 14, 2011

Dear Dr. Estanislau,

On behalf of the Editorial Board it is my pleasure to inform you that the manuscript titled "Behavioral and humoral immune response of rats chronically treated with fluoxetine and submitted to repeated forced swimming sessions" has been accepted for publication in the book "Antidepressant", ISBN 979-953-307-524-1.

We firmly believe that your contribution will be of great importance for the scientific community.

Sincerely yours,

Aleksandar Lazinica, CEO



INTECH
d.o.o. Rijeka

ANEXO D
Comitê de Ética em Experimentação Animal

COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

OF. CIRC. CEEA Nº 53/2010

Londrina, 14 de maio de 2010.

Prezado Pesquisador

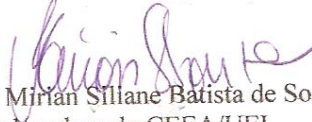
O CEEA/UEL, reunido em 11 de maio do ano corrente, avaliou o projeto de pesquisa intitulado "**Efeito da fluoxetina no comportamento e na imunidade humoral de ratos Wistar submetidos a nado forçado**", registrado no CEEA sob o nº 19/10, pesquisa do Centro de Ciências Biológicas, desenvolvido sob sua responsabilidade, julgando-o *aprovado* para execução por entender que os princípios éticos postulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal estão respeitados.

Serão utilizados 72 ratos Wistar, machos, com 90 dias de vida e massa corporal entre 250-300 gramas, provenientes do Biotério Central do CCB. Os animais serão divididos em 09 grupos com 09 animais cada. Os grupos serão: estressado e não imunizado, estressado e imunizado, estressado recebendo fluoxetina e não imunizado, estressado recebendo fluoxetina e imunizado, não estressado e não imunizado, não estressado e imunizado, não estressado recebendo fluoxetina e não imunizado, e não estressado recebendo fluoxetina e imunizado. Para isso os animais serão submetidos ao modelo de nado forçado (Lucki, 1997), aplicação de fluoxetina, avaliação do comportamento dos ratos, será coletado sangue e em alguns dos grupos serão inoculados hemácia de carneiro, e no 12º dia será coletado sangue por punção cardíaca. Após, os animais serão sacrificados e retirados órgãos linfóides para pesagem e análises histológicas. O projeto está previsto para ser executados entre julho de 2010 e agosto de 2011.

Cumpre orientar que caso se pretendam quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação do CEEA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Sem mais para o momento, subscrevo-me.

Cordialmente,



Profa. Dra. Mirian Siliane Batista de Souza
Coordenadora do CEEA/UEL

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. Emerson José Venâncio
Coordenador do Projeto
Departamento de Ciências Patológicas
Centro de Ciências Biológicas

Com cópia para Prof. Luiz Carlos Juliani (Diretor do Biotério Central da UEL).