

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Francini Arboit

**EFEITO DE UMA SESSÃO DE HIPÓXIA INTERMITENTE E SUA
ASSOCIAÇÃO COM FLUOXETINA SOBRE COMPORTAMENTO E
PARÂMETROS BIOQUÍMICOS EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS
AO MODELO DE CONTENÇÃO AGUDA**

Santa Maria, RS
2022

Francini Arboit

**EFEITO DE UMA SESSÃO DE HIPÓXIA INTERMITENTE E SUA ASSOCIAÇÃO
COM FLUOXETINA SOBRE COMPORTAMENTO E PARÂMETROS
BIOQUÍMICOS EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO MODELO DE
CONTENÇÃO AGUDA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração em Neuropsicofarmacologia e Imunofarmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para aprovação obtenção do título de **Mestre em Farmacologia**.

Orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Eliane Maria Zanchet
Coorientador: Prof. Dr. Guilherme Vargas Bochi

Santa Maria, RS
2022

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Arboit, Francini

EFEITO DE UMA SESSÃO DE HIPÓXIA INTERMITENTE E SUA ASSOCIAÇÃO COM FLUOXETINA SOBRE COMPORTAMENTO E PARÂMETROS BIOQUÍMICOS EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO MODELO DE CONTENÇÃO AGUDA / Francini Arboit.- 2022.
95 f.; 30 cm

Orientador: Eliane Maria Zanchet

Coorientador: Guilherme Vargas Bochi

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Farmacologia, RS, 2022

1. Estresse 2. Depressão 3. Ansiedade 4. Hipóxia Intermitente 5. C57BL/6 I. Zanchet, Eliane Maria II. Bochi, Guilherme Vargas III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, FRANCINI ARBOIT, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Francini Arboit

**EFEITO DE UMA SESSÃO DE HIPÓXIA INTERMITENTE E SUA ASSOCIAÇÃO
COM FLUOXETINA SOBRE COMPORTAMENTO E PARÂMETROS
BIOQUÍMICOS EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO MODELO DE
CONTENÇÃO AGUDA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração em Neuropsicofarmacologia e Imunofarmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para aprovação obtenção do título de **Mestre em Farmacologia**.

Aprovado em 16 de agosto de 2022:

Eliane Maria Zanchet, Dr^a. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Vanessa Olzon Zambelli, Dr^a. (Instituto Butantan)

Mauro Schneider Oliveira, Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS
2022

*Ao meu querido e amado Pai.
À todos os animais deste projeto.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, por me conceder saúde e sabedoria para seguir em frente.

À minha mãe Silésia, meu porto seguro, por me ensinar o caminho do bem, não medir esforços para minha felicidade e realização e por sempre me motivar a seguir em frente. À minha querida irmã Gabriela, por sua preocupação, carinho, amizade e incentivo. Obrigada por sempre acreditarem em mim, sem vocês eu não chegaria até aqui. Amo vocês!

À minha cachorrinha Jasmim, por trazer alegria para a minha vida e por ser minha melhor companhia sempre.

À minha orientadora e amiga, prof^a. Eliane Maria Zanchet, pela oportunidade de realizar este trabalho. Obrigada pela confiança, por todos os ensinamentos compartilhados e por me guiar nos primeiros passos da pós-graduação.

Ao meu coorientador, prof. Guilherme Vargas Bochi, pelo suporte científico, incentivo, disponibilidade e amizade. Agradeço também a oportunidade de integrar o grupo de pesquisa LeDep.

Aos colegas de laboratório, Elisa, Luís Fernando, Luís Guilherme, Marieli, Gerson, Gregory e Brenda, pela convivência, troca de experiências e amizade. Um agradecimento especial à Gabriele, que além de ensinar e me preparar para os experimentos, se tornou uma amiga muito querida.

Agradeço às parcerias que nos ajudaram a chegar em nossos resultados. Prof. Michele Mainardi e prof. Sara Marchesan, assim como seus respectivos alunos.

Por fim, agradeço à UFSM, por ter sido também minha casa nesses últimos anos e ter me proporcionado crescimento e desenvolvimento.

“Procure ser um homem de valor, em vez de ser um homem de sucesso.”

Albert Einstein

RESUMO

EFEITO DE UMA SESSÃO DE HIPÓXIA INTERMITENTE E SUA ASSOCIAÇÃO COM FLUOXETINA SOBRE COMPORTAMENTO E PARÂMETROS BIOQUÍMICOS EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO MODELO DE CONTENÇÃO AGUDA

AUTORA: Francini Arboit
ORIENTADORA: Eliane Maria Zanchet
COORIENTADOR: Guilherme Vargas Bochi

Doenças mentais são doenças devastadoras que afetam milhões de pessoas no mundo. A depressão e a ansiedade apresentam significativos custos financeiros e emocionais para os pacientes, familiares e sociedade. Dentre as possíveis causas desses transtornos, encontram-se os agentes estressores psicossociais. Assim, a exposição ao estresse de contenção agudo representa um modelo animal para a indução dos comportamentos do tipo-depressivo e ansioso, permitindo assim estudar a fisiopatologia destes transtornos. Além do pobre entendimento da neurobiologia destes transtornos, o tratamento também é limitado, pois um terço dos pacientes não responde ao tratamento com antidepressivos. Além disso, esses medicamentos possuem diversos efeitos colaterais e podem demorar semanas para surtirem efeitos. Logo, a descoberta e inovação de novos tratamentos/terapias são muito importantes e necessárias. A Hipóxia Intermitente (HI) consiste em um tratamento alternativo não farmacológico que utiliza a respiração com baixa concentração de oxigênio intercalada com períodos normóxia. A HI melhora a resistência geral do organismo, sendo utilizada para pré-aclimatação a altitudes, no esporte e tratamento de várias doenças, dentre elas as desordens mentais. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar o potencial ansiolítico e antidepressivo, além de efeitos sobre níveis séricos de corticosterona, parâmetros oxidativos e inflamação, de uma sessão aguda (1 hora, 13% O₂) de HI e sua associação com fluoxetina (FLX), em camundongos C57BL/6 submetidos ao modelo de estresse de contenção agudo (ECA) por 6 horas. Para a avaliação dos comportamentos do tipo-ansioso/depressivo foram utilizados o teste de campo aberto (TCA), teste do labirinto em cruz elevado (TLCE), teste de suspensão da cauda (TST) e teste de nado forçado (TNF), que revelaram comportamento do tipo-ansioso. Em relação ao estresse oxidativo, houve diminuição dos níveis de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) com os tratamentos associados em relação ao grupo controle e maior atividade da catalase (CAT) no tratamento FLX em relação a HI, no tecido hipocampal. Os níveis de interleucina IL-17, IL-6 e IFN- γ aumentaram após o protocolo de ECA. Todos os tratamentos reverteram os níveis de IFN- γ , IL-17, IL-2 e TNF- α . Os níveis de IL-6 foram alterados pelo tratamento com HI+FLX. Os resultados apresentados neste trabalho demonstram que o ECA foi insuficiente para induzir comportamento do tipo-depressivo e que apenas 1 hora de HI e/ou sua associação com fluoxetina não reverteu o comportamento do tipo ansioso, mas induziu alterações nos parâmetros oxidativos e apresentou efeito anti-inflamatório.

Palavras-chave: Estresse. Depressão. Ansiedade. Hipóxia Intermitente. C57BL/6.

ABSTRACT

EFFECT OF AN INTERMITTENT HYPOXIA SESSION AND ITS ASSOCIATION WITH FLUOXETINE ON BEHAVIOR AND BIOCHEMICAL PARAMETERS IN MICE SUBMITTED TO THE ACUTE RESTRAINT MODEL

AUTHOR: Francini Arboit

ADVISOR: Eliane Maria Zanchet

CO-ADVISOR: Guilherme Vargas Bochi

Mental illnesses are devastating illnesses that affect millions of people around the world. Depression and anxiety have significant financial and emotional costs for patients, families and society. Among the possible causes of these disorders are psychosocial stressors. Thus, exposure to acute restraint stress (ARS) represents an animal model for the induction of depressive and anxious-like behaviors, thus allowing the study of the pathophysiology of these disorders. In addition to the poor understanding of the neurobiology of these disorders, treatment is also limited, as one third of patients do not respond to treatment with antidepressants. In addition, these drugs have several side effects and can take weeks to take effect. Therefore, the discovery and innovation of new treatments/therapies are very important and necessary. Intermittent Hypoxia (IH) is a non-pharmacological alternative treatment that uses breathing with low oxygen concentration interspersed with normoxia periods. IH improves the body's general resistance, being used for pre-acclimatization to altitudes, in sports and in the treatment of various diseases, including mental disorders. Thus, the aim of this study was to investigate the anxiolytic and antidepressant potential, in addition to effects on serum corticosterone levels, oxidative parameters and inflammation, of an acute session (1 hour, 13% O₂) of IH and its association with fluoxetine (FLX), in C57BL/6 mice submitted to the ARS model for 6 hours. The open field test (OFT), elevated plus maze test (EPMT), tail suspension test (TST) and forced swimming test (FST) were used to assess anxiety/depressive-like behaviors, which revealed anxiety-like behavior. Regarding oxidative stress, there was a decrease in hydrogen peroxide (H₂O₂) levels with the associated treatments compared to the control group and greater catalase (CAT) activity in the FLX treatment compared to IH, in the hippocampal tissue. Interleukin IL-17, IL-6 and IFN- γ levels increased after the ARS protocol. All treatments reversed the levels of IFN- γ , IL-17, IL-2 and TNF- α . IL-6 levels were altered by IH+FLX treatment. The results presented in this work demonstrate that ARS was insufficient to induce depressive-like behavior and that only 1 hour of IH and/or its association with fluoxetine did not reverse anxiety-like behavior, but induced changes in oxidative parameters and had an anti-inflammatory effect.

Keywords: Stress. Depression. Anxiety. Intermittent Hypoxia. C57BL/6.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO

Figura 1 – Patogênese do Transtorno Depressivo Maior.....	22
Figura 2 – Regulação do eixo HPA.....	24
Figura 3 – Modelos animais de depressão.....	31
Figura 4 – Métodos e comportamentos para avaliação dos comportamentos tipo-depressivo e ansioso em roedores.....	31

MANUSCRITO

Figure 1 - Schematic overview of the experimental design.....	61
Figure 2 - Effects of ARS and treatments on forced swim and tail suspension tests.....	61
Figure 3 - Effects of ARS and treatments on elevated plus-maze test.....	62
Figure 4 - Effects of ARS and treatments on the open field test.....	63
Figure 5 - Effects of ARS and treatments on serum corticosterone levels (pg/mL).....	63
Figure 6 - Effects of ARS and treatments on serum cytokines levels.....	64

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

Tabela 1 – Critério diagnóstico para o Transtorno Depressivo Maior.....	18
Tabela 2 – Classes de medicamentos antidepressivos.....	21
Tabela 3 – Sintomas de ansiedade, medo e depressão.....	28
Tabela 4 – Recomendações farmacológicas para transtornos de ansiedade (TAG, TP e TAS) em adultos.....	30

MANUSCRITO

Table 1- ARS-induced behavioral changes.....	65
Table 2- SOD, CAT and H ₂ O ₂ levels in hippocampal and PFC tissues after ARS and treatments.....	65

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

$^1\text{O}_2$	Oxigênio singleto
5-HT	Serotonina
AD	Antidepressivo
ADT	Antidepressivo tricíclico
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo (do inglês, <i>brainderived neurothophic factor</i>)
CAT	Catalase
CPF	Cortex pré-frontal
DA	Dopamina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DSM-V	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (do inglês, <i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders</i>)
ECA	Estresse de contenção agudo
EO	Estresse oxidativo
EPO	Eritropoietina
ERN	Espécie reativa de nitrogênio
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FLX	Fluoxetina
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Receptor glicocorticóide
GSH	Glutaciona reduzida
H_2O_2	Peróxido de Hidrogênio
HAM-D	Escala de Avaliação de Depressão de Hamilton (do inglês, <i>Hamilton Rating Scale for Depression</i>)
HI	Hipóxia intermitente
HIF	Fator induzível por hipóxia
IDO	2,3-dioxigenase indoleamina
IFN- γ	Interferon gama
IL-17	Interleucina 17
IL-6	Interleucina 6
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IMAO	Inibidor da monoaminaoxidase
IRSN	Inibidor da recaptção se serotonina e noradrenalina
ISRS	Inibidor seletivo da recaptção de serotonina
MDA	Malondialdeído
NA	Noradrenalina
NMDA	Receptor N-metilaspártato
ON	Óxido nítrico
NO_2	Dióxido de Nitrogênio
OH^\bullet	Radical Hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONOO^\bullet	Peroxinitrito
RL	Radical livre
RTrkB	Receptor de tirosina quinase tipo B
PHQ-9	Questionário Sobre a Saúde do Paciente-9 (do inglês, <i>Patient Health Questionnaire 9</i>)
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
TA	Transtorno de ansiedade
TAG	Transtorno de ansiedade generalizada
TAS	Transtorno de ansiedade social

TCA	Teste de campo aberto
TCC	Terapia cognitivo-comportamental
TLCE	Teste de labirinto em cruz elevada
TNF	Teste de nado forçado
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TP	Transtorno de pânico
TSC	Teste de suspensão da cauda
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

	APRESENTAÇÃO	14
1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	TRANSTORNO DEPRESSIVO MAIOR (TDM)	17
2.1.1	Epidemiologia	17
2.1.2	Diagnóstico	18
3.1.3	Tratamento	19
2.1.4	Fisiopatologia	20
2.1.4.1	<i>Hipótese Monoaminérgica</i>	21
2.1.4.2	<i>O Papel Do Estresse e a Hipótese Do Eixo HPA</i>	23
2.1.4.3	<i>Hipótese Inflamatória</i>	24
2.1.4.4	<i>Hipótese Neurotrófica</i>	25
2.1.4.5	<i>Hipótese do Estresse Oxidativo</i>	25
2.1.4.6	<i>Hipótese Glutamatérgica</i>	26
2.2	TRANSTORNO DE ANSIEDADE.....	27
2.3	MODELOS ANIMAIS PARA O ESTUDO DO TDM.....	30
2.4	HIPÓXIA INTERMITENTE.....	32
3	OBJETIVOS	36
3.1	OBJETIVO GERAL.....	36
3.2	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	36
4	MANUSCRITO	37
4.1	MANUSCRITO 1.....	37
5	CONCLUSÕES	66
	REFERÊNCIAS	67
	ANEXO A – MANUSCRITO 2	80
	ANEXO B – CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS NA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA	94

APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte dessa dissertação estão apresentados sob a forma de manuscrito, submetido ao periódico *Physiology & Behavior*, sendo que este se encontra no item MANUSCRITO. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências encontram-se no próprio artigo e representam a íntegra desse estudo. A seção REFERÊNCIAS compreende somente as citações presentes nos itens INTRODUÇÃO e REVISÃO DE LITERATURA desta dissertação.

1 INTRODUÇÃO

A carga dos transtornos mentais continua a crescer mundialmente, repercutindo impactos na saúde e importantes consequências sociais. A depressão, esquizofrenia, transtorno afetivo bipolar, transtornos de ansiedade, demência, deficiência intelectual e os transtornos de desenvolvimento, como o autismo, são exemplos de transtornos psiquiátricos e, estima-se que aproximadamente 450 milhões de pessoas sejam acometidas por algum deles (ROCHA, HARA e PAPROCKI, 2015). Dentre eles, o mais prevalente é a depressão, constituindo um alerta e um desafio à saúde pública. Em períodos de epidemias e isolamento social, a incidência e agravamento de condições mentais não favoráveis tende a piorar.

A depressão, denominada oficialmente de Transtorno Depressivo Maior (TDM), e os transtornos de ansiedade (TA), são os transtornos mentais mais comuns, afetando aproximadamente 280 e 264 milhões de pessoas no mundo todo, e põem seriamente em perigo a saúde física e mental dos seres humanos. O TDM pode ser descrito de acordo com seus sintomas, que incluem alterações em quatro campos do desenvolvimento humano: afetivo, cognitivo, comportamental e fisiológico (OLIVEIRA, 2016; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019; SANTOMAURO et al., 2020). Segundo a American Psychiatric Association (2013), os sintomas têm duração de, no mínimo, duas semanas e incluem mau humor persistente, pensamento atrasado, função cognitiva prejudicada, diminuição da atividade volitiva, sintomas somáticos e diminuição de interesse em atividades antes consideradas prazerosas (ALENKO et al., 2020; JIAO et al., 2021). O TDM pode ainda ser associado às outras comorbidades, como doenças cardiovasculares, endócrinas, renais, oncológicas, doenças relacionadas à dor crônica, doenças neurodegenerativas e transtornos de ansiedade (TENG, HUMES e DEMETRIO, 2005).

Diferentemente de outras doenças crônicas e potencialmente fatais, a depressão não é causada por apenas uma condição e sim por uma combinação de fatores genéticos, bioquímicos, ambientais e psicológicos, o que dificulta seu diagnóstico, o qual além de complexo, é predominantemente clínico e subjetivo (PALAZIDOU, 2012; BOAS et al., 2019). Dentre algumas hipóteses acerca da fisiopatologia da depressão, podemos citar algumas teorias, como a monoaminérgica, a desregulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), a inflamatória, a neurotrófica, a do estresse oxidativo e a glutamatérgica (BOAS et al., 2019).

O progresso acerca dos estudos das bases fisiopatológicas do TDM se torna possível devido ao uso de modelos animais de depressão. Com base nas teorias fisiopatológicas do TDM e de que muitos episódios de TDM são precipitados por adversidades como o estresse, diversos

modelos animais de indução de depressão baseiam-se na exposição a estresse agudo ou crônico. Outros modelos relacionam-se com diferentes etiologias do transtorno, e portanto baseiam-se em administração exógena de substâncias, como glicocorticoides e lipopolissacarídeo (LPS), e manipulações genéticas (PLANCHEZ, SURGET e BELZUNG, 2019).

De acordo com a World Health Organization (2018), menos da metade das pessoas diagnosticadas com TDM recebe tratamento comprovadamente efetivo. Os tratamentos disponíveis incluem psicanálise, eletroconvulsoterapia e farmacoterapia. Diversos fármacos antidepressivos são utilizados no tratamento do TDM, porém, devido à desordem apresentar-se com curso altamente variável, existe possibilidade de diferentes respostas ao tratamento. Sabe-se que cerca de 30% dos pacientes não respondem ao tratamento ou ainda, respondem de forma parcial (ROOHI, JAAFARI e HASHEMIAN, 2021). Desta forma, pesquisas de novas abordagens e tratamentos são relevantes. A hipóxia intermitente (HI), é um tratamento alternativo que utiliza a respiração com baixa concentração de oxigênio, intercalada com períodos de respiração normal. Este método melhora a resistência geral do organismo, fornecendo um estado de proteção endógeno, auxiliando e preparando os neurônios a sobreviverem a novos insultos mais severos (JUNG et al., 2008). É utilizada desde a década de 30 para o tratamento e profilaxia de diversas doenças, incluindo os transtornos efetivos (LIU et al., 2006; ZHU et al., 2006; SEREBROVSKAYA, 2008).

Assim, utilizando o modelo animal de estresse por contenção aguda (ECA), avaliamos no presente trabalho os possíveis efeitos de uma sessão de HI (1 hora, 13% O₂) sob alterações comportamentais e bioquímicas em camundongos C57BL/6.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TRANSTORNO DEPRESSIVO MAIOR (TDM)

2.1.1 Epidemiologia

O TDM atinge em torno de 280 milhões de pessoas pelo mundo todo e é projetado como sendo o maior contribuinte para a carga global de doenças até o ano de 2030 (LÉPINE e BRILEY, 2011; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020). Segundo LIU et al., (2020) o número total de pessoas vivendo com depressão em todo mundo aumentou 49,86% entre 1990 e 2017.

A pesquisa Nacional de Saúde (PNS), realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em 2019, apontou que 10,2% dos brasileiros com 18 anos ou mais receberam o diagnóstico de depressão, o que representa 16,3 milhões de pessoas (IBGE, 2020). Esse índice foi maior do que o encontrado em 2013 na mesma pesquisa, que foi de 7,6%. Já de acordo com a Pesquisa Vigitel 2021, considerada um dos mais amplos inquéritos de saúde do país e realizada entre setembro de 2021 e fevereiro de 2022, 11,3% dos brasileiros relataram ter recebido o diagnóstico médico da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022). Os estados com maior prevalência de TDM são o Rio Grande do Sul e Santa Catarina (BONADIMAN et al., 2020). Estima-se que cerca de 50% dos 800.000 suicídios por ano em todo o mundo ocorram entre indivíduos com TDM (CHESNEY, GOODWIN e FAZEL, 2014; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020). Apesar de ser a principal causa de incapacitação de indivíduos de ambos os sexos, o impacto da depressão é 50% maior entre as mulheres (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008). Considerando ambos os sexos, o transtorno depressivo tem idade média de aparecimento por volta dos 25 anos e o pico de risco para seu desenvolvimento está entre o final da adolescência e o início dos 40 anos (BROMET et al., 2011).

É pertinente, ainda, destacar a pandemia de Covid-19 como um fator de comprometimento e agravamento da saúde mental de toda a população mundial. O contexto pandêmico que o vírus trouxe consigo e as medidas de controle recomendadas, afetaram a população mundial em muitas dimensões, trazendo um conjunto de consequências físicas e mentais. O isolamento social, sentimentos de medo, insegurança, solidão, preocupações, estresse e ansiedade fazem parte do quadro de pandemia mundial e são fatores mentais não favoráveis e próprios à depressão. A taxa de pessoas que relataram sintomas de depressão entre julho de 2019 e março de 2020, no Reino Unido, era de 10%, e em junho de 2020, durante a pandemia, essa taxa aumentou para 19%. Já nos Estados Unidos, até junho de 2019, a taxa era de 11%, subindo para 42% em dezembro de 2020 (ABBOTT, 2021). No Brasil, segundo dados

coletados pela Fundação Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz) em parceria com a Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e a Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), no período de 24 de abril a 24 de maio de 2020, 40,4% dos brasileiros sentiam-se tristes ou deprimidos e 56,6% relataram estarem mais ansiosos e nervosos. No mesmo estudo, 37,1% dos indivíduos começaram a apresentar distúrbios de sono durante o período de pandemia (BARROS et al., 2020).

2.1.2 Diagnóstico

Embora exista ampla literatura descrevendo correlatos neuroanatômicos, neuroendócrinos e neurofisiológicos sobre o TDM, não existem biomarcadores aprovados e com sensibilidade e especificidade suficientes para serem usados como parte do critério de diagnóstico (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013; HACIMUSALAR e EŞEL, 2018). O transtorno é diagnosticado de acordo com critérios presentes no Manual de Diagnóstico e Estatístico dos Distúrbios Mentais ou, do inglês, *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (DSM), elaborado pela Associação Americana de Psiquiatria (American Psychiatric Association). De acordo com o manual, um episódio depressivo maior é caracterizado pela constatação de, no mínimo, cinco entre os nove sintomas citados na tabela 1, sendo necessária a presença de pelo menos um dos dois primeiros sintomas mencionados (humor deprimido ou anedonia) além de prejuízo social, profissional ou em outras áreas importantes na vida do indivíduo; e não atribuição desses sintomas a efeitos fisiológicos de substâncias ou a outra condição médica.

Tabela 1 – Critério diagnóstico para o Transtorno Depressivo Maior

Sintomas de TDM
Humor deprimido
Anedonia (perda de interesse ou prazer)
Perda ou ganho de peso (>5% de alteração em um mês)
Insônia ou hipersonia
Retardo ou agitação psicomotora
Fadiga ou perda de energia
Sentimentos de culpa ou baixa autoestima
Diminuição da capacidade de concentração
Pensamentos recorrentes de morte ou suicídio

Fonte: AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (2014).

Além disso, o manual classifica o TDM quanto ao número de episódios (único ou recorrente), à gravidade (leve, moderada ou grave), à presença ou não de características psicóticas e ao estado de remissão (em remissão parcial ou em remissão completa) (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014). A indicação ou diagnóstico de transtorno depressivo é realizado pela história clínica, avaliação da presença e tempo de permanência dos sinais e sintomas descritos anteriormente, além da aplicação de escalas específicas (AROS e YOSHIDA, 2009). Essas escalas contribuem para facilitar a identificação dos sintomas citados anteriormente e necessitam julgamentos do próprio paciente, de alguém que o conheça bem ou de um observador profissional (CALIL e PIRES, 1998; TIER et al., 2007). Destacam-se a Escala de Avaliação de Depressão de Hamilton (HAM-D), Inventário de Depressão de Beck-II e *Patient Health Questionnaire 9* (PHQ-9) (GUERRA et al., 2018). Todos os questionários e escalas têm por objetivo avaliar a história clínica do paciente e auxiliar no correto diagnóstico, possibilitando assim um tratamento adequado, cuja recuperação é o objetivo terapêutico buscado. No entanto, os riscos de apresentação de um novo quadro depressivo são altos e, infelizmente, a cada recaída, maior a dificuldade no tratamento do transtorno (GARCIA, 2013).

2.1.3 Tratamento

De acordo com a World Health Organization (2018), menos da metade dos indivíduos diagnosticados com TDM recebem tratamento comprovadamente efetivo. Dentre as razões, destacam-se a falta de recursos e/ou profissionais capacitados, sendo que aproximadamente metade da população mundial vive em países onde existem apenas dois psiquiatras para cada 100 mil pessoas. Além disso, existe um estigma social atrelado à doenças mentais e a falta de biomarcadores para confirmação do transtorno (KAPCZINSKI, QUEVEDO e IZQUIERDO, 2011; AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION; 2014 SMITH, 2014).

Os tratamentos para o TDM variam desde psicanálise e eletroconvulsoterapia à fármacos antidepressivos (AD). Diferentes classes de medicamentos são disponíveis para tratamento.

A primeira classe de medicamentos desenvolvidos na década de 50 para tratar depressão foi a dos inibidores da monoaminaoxidase (IMAO). Esses fármacos aumentam os níveis extracelulares de serotonina (5-HT), noradrenalina (NA) e dopamina (DA) em todo o cérebro. No mesmo período, foi descoberta outra classe de antidepressivos, os tricíclicos (ADT), que também atuam aumentando os níveis de monoaminas (TATSUMI et al., 1997). A segunda geração de antidepressivos surgiu na década de 80, com classes farmacologicamente mais

específicas e menos efeitos colaterais, como os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) e inibidores da recaptação de serotonina e noradrenalina (IRSN) (YOHN, GERGUES e SAMUELS, 2017). Na sequência, foram desenvolvidos os inibidores seletivos da recaptação de noradrenalina (ISRN) e antidepressivos atípicos, conforme descritos na tabela 2.

A longo prazo, os ADs alteram e regulam mecanismos que podem contribuir para a efetividade da terapia. Isso inclui alteração na densidade ou sensibilidade de receptores adrenérgicos/serotoninérgicos, alteração no acoplamento receptor-proteína G e sinalização de nucleotídeos cíclicos, indução de fatores neurotróficos e neurogênese hipocampal (BRUNTON, HILAL-DANDAN e KNOLLMANN, 2019).

A recomendação da OMS é de que os antidepressivos não sejam a primeira linha de escolha no tratamento do transtorno depressivo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018) e a Associação Americana de Psicologia recomenda que o tratamento farmacológico seja associado à terapia cognitivo comportamental (TCC) em grupo e psicoterapia individual (AMERICAN PSYCHOLOGICAL ASSOCIATION, 2019).

Devido à desordem apresentar-se com curso altamente variável, existe possibilidade de diferentes respostas aos tratamentos, pois cerca de 30% dos pacientes não respondem ao uso de antidepressivos e o restante responde apenas de forma parcial. Além disso, as taxas de remissão frequentemente são menores que 50%, enquanto as taxas de recorrência são superiores a 85% em 10 anos (ROOHI, JAAFARI e HASHEMIAN, 2021). Outra questão é a tolerabilidade. As gerações mais recentes de antidepressivos, como os ISRSs e os IRSNs são superiores aos IMAOs e ADTs, embora ainda existam possíveis efeitos colaterais, deficiências funcionais, comportamento auto lesivo e altas taxas de recaída (SAAD AL-HARBI, 2012; ADZIC et al., 2018). E, por fim, a resposta lenta ao tratamento. Em alguns pacientes o efeito terapêutico pleno de antidepressivos pode levar de semanas a meses (NEMEROFF e OWENS, 2002).

2.1.4 Fisiopatologia

A heterogeneidade etiológica e clínica torna complexo o entendimento da fisiopatologia do TDM. Dentre as causas, podem ser citadas: 1) relativa dificuldade em acessar o cérebro, possível somente por exames de neuroimagem, no qual são mapeadas mudanças na atividade neuronal ou em estudos post-mortem; 2) o fato de grande parte dos casos de depressão serem

Tabela 2 – Classes de medicamentos antidepressivos.

Classes de ADs	Sintomas de TDM
Tricíclicos (ADTs)	Amitriptilina, clomipramina, imipramina, nortriptilina
Tetracíclicos (TeCAs)	Trazodona
Inibidores da Monoaminaoxidase (IMAOs)	Isocarboxazida, fenelzina
Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina (ISRSs)	Citalopram, escitalopram, fluoxetina, fluvoxamina, paroxetina, sertralina, vilazodona
Inibidores da Recaptação de Serotonina-noradrenalina (IRSNs)	Desvenlafaxina, duloxetina, levomilnaciprano, milnaciprano, venlafaxina
Inibidores Seletivos da Recaptação de Noradrenalina (ISRN)	Reboxetina
Atípicos	Agomelatina, bupropiona, mirtazapina, nefazodona

Fonte: AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (2014).

idiopáticos e o entendimento da etiologia ser restrito a alguns fatores de risco (estresse, câncer, efeito colateral de algumas drogas, entre outros); 3) heterogeneidade clínica do transtorno e por vezes sobreposição com sintomas de outros transtornos psiquiátricos/doenças (SOUZA, 2015). Não obstante, a ciência há tempos vem propondo teorias acerca da patofisiologia do TDM com base nos achados disponíveis.

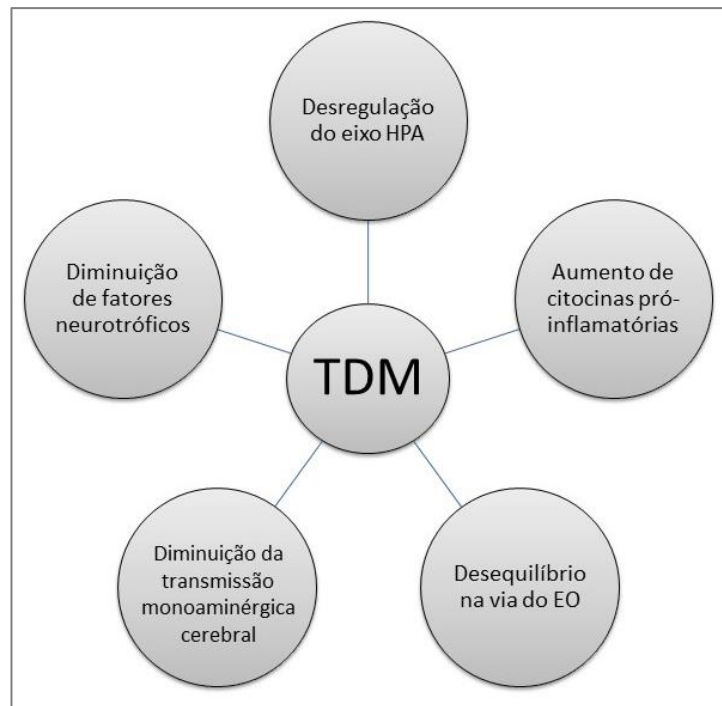
Diversas hipóteses fisiopatológicas são descritas na tentativa de se compreender as causas da depressão, e diferentes sistemas neuronais parecem estar envolvidos na neurobiologia e neuroquímica desse transtorno, conforme figura 1 e descritas abaixo.

2.1.4.1 Hipótese Monoaminérgica

Entre os anos de 1950 e 1960, começaram a surgir as primeiras teorias envolvendo os mecanismos fisiopatológicos da depressão. Nesse período, foi observado que o uso de reserpina, um fármaco antipsicótico e anti-hipertensivo, depletava as reservas de monoaminas NA, 5-HT e DA e estava associado a uma síndrome semelhante à depressão (SCHILDKRAUT, 1965). Em contraste com os efeitos obtidos com a reserpina, euforia e comportamento hiperativo foram observados em alguns pacientes em tratamento com iproniazida, um composto sintetizado para o tratamento da tuberculose, que teve como efeito secundário significativa melhora no humor dos pacientes (CRANE, 1956). Esse fármaco age inibindo a monoaminaoxidase (MAO), enzima responsável por degradar aminas biogênicas. Esses achados serviram de base para o surgimento da hipótese monoaminérgica, que postula que a

depressão seria resultante de uma deficiência neurotransmissores do sistema monoaminérgico, ou seja, um desequilíbrio nos sistemas serotoninérgicos e noradrenérgicos, levando a uma diminuição na disponibilidade de serotonina e noradrenalina no espaço

Figura 1 – Patogênese do transtorno depressivo maior



Fonte: Adaptado de CHOPRA, KUMAR e KUHAD (2011).

sináptico. Disfunções nesse sistema resultam em uma sinalização anormal e ineficiente desses neurotransmissores, afetando a homeostase cerebral (CREMA, 2011).

Visto a origem dos neurônios serotoninérgicos e noradrenérgicos bem como suas projeções para muitas áreas do cérebro, como córtex pré-frontal, e regiões límbicas, como hipocampo e amígdala, alterações no sistema monoaminérgico resultam em impactos e sintomas comportamentais, como humor, vigilância, motivação alterados, fadiga e agitação e retardo psicomotor (CHOPRA, KUMAR e KUHAD, 2011; CREMA, 2011).

Atualmente, essa hipótese é apoiada pelo mecanismo de ação de antidepressivos que têm seu mecanismo de ação baseado no aumento da concentração de monoaminas na fenda sináptica, seja pela redução da recaptação ou pela inibição de sua enzima de degradação (BERTON e NESTLER, 2006).

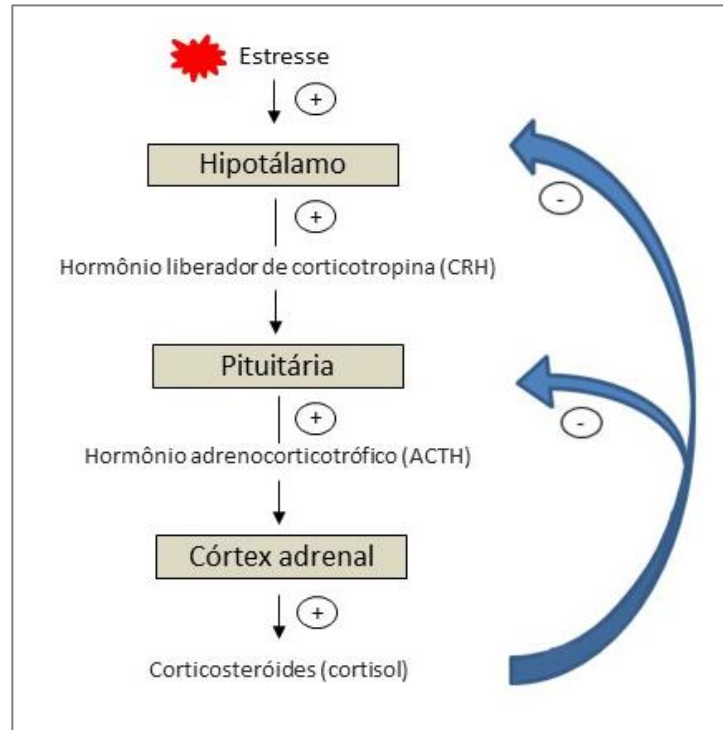
No entanto, para Krishnan e Nestler (2008), esta hipótese não é suficiente para esclarecer a fisiopatologia da depressão. Isso é explicado pelo fato de que os antidepressivos têm efeito imediato sobre os níveis de 5-HT, NA e DA no cérebro, enquanto a melhora clínica só acontece após três a quatro semanas depois do início do tratamento. Assim como também não explica as causas dos distúrbios monoaminérgicos e a refratariedade ao tratamento. Isto leva a crer que a redução dos níveis de neurotransmissores não é a causa exclusiva da depressão (VISMARI, ALVES e PALERMO-NETO, 2008).

2.1.4.2 O Papel Do Estresse e a Hipótese Do Eixo HPA

Originalmente, o termo estresse foi definido na década de 40 por Seyle e Fortier (1949) como uma reação não específica do organismo após estímulos nocivos, chamados estressores. O estresse é caracterizado como um conjunto de respostas adaptativas, tanto físicas, quanto mentais e emocionais que causam perturbação na homeostase do organismo. Situações de estresse e diferentes graus de ameaça desencadeiam cascatas de respostas neurais, hormonais e comportamentais (RODRIGUES, LEDOUX e SAPOLSKY, 2009). Ainda na tentativa de explicar a fisiopatologia da depressão, surgiu a hipótese do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), que é ativado pelo estresse, resultando na liberação de glicocorticoides, conforme mostrado na figura 2. O cortisol exerce um efeito negativo sobre o hipotálamo e a pituitária, o chamado mecanismo de feedback negativo. Porém, níveis mais altos de glicocorticoides (inclusive os sintéticos) acabam prejudicando o mecanismo de feedback e podem danificar o hipocampo, resultando assim um quadro hipercortisolêmico (CHOPRA, KUMAR e KUHAD, 2011). Em pacientes depressivos, segundo Nestler e colaboradores (2002), as concentrações de glicocorticoides estão frequentemente elevadas, caracterizando e confirmando a disfunção do eixo HPA.

A exposição crônica à glicocorticoides é neurotóxica: ocorre liberação de radicais livres e maior vulnerabilidade a eles, diminuição de transporte de glicose e diminuição de produção de fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), que provê suporte trófico aos neurônios. A atividade da enzima monoaminaoxidase-A também é aumentada em situações de hipercortisolemia, com a conseqüente redução dos níveis de noradrenalina e serotonina (SLOTKIN, SEIDLER e RITCHIE, 1998; CHOPRA, KUMAR e KUHAD, 2011). Com isso, pode-se dizer que a disfunção do eixo HPA, bem como altos níveis de glicocorticoides, têm um papel importante na fisiopatologia do TDM.

Figura 2 - Regulação do eixo HPA



Estímulos estressantes ativam o hipotálamo a liberar hormônio liberador de corticotrofina (CRH). O CRH, por sua vez, tem ação na glândula pituitária e a estimula a liberar hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que subsequentemente gera o produto final do eixo HPA pelo córtex da glândula adrenal, os glicocorticoides (cortisol em humanos e corticosterona em roedores). Fonte: adaptado de CHOPRA, KUMAR e KUHAD (2011).

2.1.4.3 Hipótese Inflamatória

A hipótese inflamatória da depressão postula que o transtorno é causado pela ação de citocinas. As citocinas são proteínas hidrofílicas de baixo peso molecular ou glicoproteínas que participam da comunicação não apenas entre células do sistema imunológico, como se pensava inicialmente, mas também possuem efeitos nas células fora do sistema imunológico (VISMARI, ALVES e PALERMO-NETO, 2008).

Alguns autores relatam maior chance de desenvolvimento de TDM em pacientes acometidos por doenças inflamatórias (ROOHI, JAAFARI e HASHEMIAN, 2021). Doenças como diabetes, artrite reumatoide, e doenças infecciosas como hepatite têm sido relacionadas a resposta inflamatória e maior risco de desenvolvimento do transtorno depressivo (FIEST et al., 2017; ASKIM et al., 2018; RÉUS et al., 2018; YEOH et al., 2018). De acordo com a literatura, frequentemente, marcadores inflamatórios encontram-se aumentados em pacientes com TDM (LIU, HO, e MAK, 2012), evidenciado por ativação monocítica e aumento na

produção de interleucinas (ILs) inflamatórias, como IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-2 e INF- γ . Esse aumento, por sua vez, contribui para a hiperatividade do eixo HPA e também redução nos níveis de serotonina devido uma resposta mediada pela ação da 2,3-dioxigenase indoleamina (IDO), que promove uma depleção nos níveis plasmáticos de triptofano, precursor da serotonina (DANTZER et al., 2008; ANDERSON, MAES e BERK, 2012). Apesar dos diversos relatos na literatura sobre as alterações imunes observadas em pacientes deprimidos, é importante ressaltar que tal perfil pró-inflamatório não é comum a todos os tipos de depressão nem a todos os pacientes.

2.1.4.4 Hipótese Neurotrófica

Uma outra hipótese formulada em 1997 para tentar explicar as causas e mecanismos do TDM, diz respeito às neurotrofinas (Duman et al., 1997). As neurotrofinas são proteínas sintetizadas por neurônios e células da Glia. Elas são responsáveis e estão envolvidas em funções essenciais para o crescimento, maturação e sobrevivência de diferentes tipos celulares que compõem o SNC e participam ainda da modulação da transmissão e plasticidade sináptica, prevenindo a degeneração neuronal e melhorando processos cognitivos, como memória e aprendizado. O BDNF tem sido bastante estudado devido à modulação de sua expressão pelo estresse e por fármacos antidepressivos e, por isso, surge como uma das neurotrofinas com importante papel no TDM (KAUFMAN et al., 2006; ARANCIO e CHAO, 2007). Em contraste, o estresse pode levar a uma diminuição nos níveis dessa neurotrofina e das vias intracelulares que por ela são ativadas, contribuindo assim para atrofia de estruturas límbicas e menor atividade das mesmas (KAUFMAN et al., 2006; CASTRÉN e RANTAMÄKI, 2010).

Nesta teoria, sugere-se então que a redução dos níveis do BDNF hipocampal, após um período de estresse agudo ou crônico, ou ainda o mau funcionamento de seu receptor (RTrkB), ocasionam alterações e atrofia de determinadas áreas cerebrais, como o hipocampo e córtex pré-frontal, corroborando para o desenvolvimento da depressão; já o seu aumento produz efeitos antidepressivos (KAUFMAN et al., 2006; CHOPRA, KUMAR e KUHAD, 2011).

2.1.4.5 Hipótese do Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo (EO) tem sido associado à patogênese de diversas doenças e pode também ser um mecanismo comum à diversos transtornos psiquiátricos. Isso porque o cérebro, segundo Chopra, Kumar e Kuhad (2011), é um dos órgãos mais vulnerável e sensível ao EO, e existem evidências crescentes do envolvimento do EO no TDM. Estudos indicam que os

pacientes com TDM possuem espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) aumentadas em conjunto com uma diminuição das defesas antioxidantes (BLACK et al., 2015).

O estresse oxidativo refere-se aos efeitos prejudiciais dos radicais livres (RL), resultado uma disfunção entre a formação de EROs e ERNs e os sistemas de defesa antioxidantes. Os RLs são os subprodutos resultantes dos processos metabólicos de células aeróbias (MAURYA, et al., 2016). Sua produção é um processo que ocorre natural e fisiologicamente no organismo e, em níveis moderados, tem fins fisiológicos, como sinalização celular e também defesa do organismo contra patógenos. Contudo, em alguns casos, sua formação supera a capacidade antioxidante do organismo, o que causa dano de macromoléculas como lipídios, proteínas e DNA e pode resultar em morte celular (Valko et al., 2007; BLACK et al., 2015).

O cérebro é mais suscetível aos danos causados pelas espécies reativas de oxigênio pois é um órgão com grande necessidade de consumo de oxigênio e possui um tecido rico em lipídios oxidáveis. Este elevado consumo de oxigênio leva ao aumento da formação de EROS, que estão envolvidas na inflamação neuronal, inibição da neurogênese, disfunção na sinalização celular e mitocondrial (BHATT, NAGAPPA e PATIL, 2020).

As principais EROS incluem, peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^\bullet), oxigênio singlete (1O_2), e os ERNs consistem em óxido nítrico (NO), peroxinitrito ($ONOO^\bullet$) e dióxido de nitrogênio (NO_2). Em contrapartida, as principais defesas enzimáticas incluem a glutathiona peroxidase (GPx), a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT) e as não enzimáticas compreendem antioxidantes tiólicos, como a glutathiona reduzida (GSH), bem como as vitaminas C e E, o composto carotenóide β -caroteno (LIU et al., 2015, VALKO, et al., 2007). A estimativa das atividades de enzimas antioxidantes é reduzida em casos de TDM, indicando o papel do estresse oxidativo no transtorno (BHATT, NAGAPPA e PATIL, 2020).

3.1.4.6 Hipótese Glutamatérgica

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC e também o aminoácido livre mais abundante desse sistema. Está envolvido na neurogênese, na formação de axônios, na sinaptogênese e na sobrevivência neuronal, bem como na resposta ao estresse. Também está envolvido em questões de aprendizado e memória e no surgimento de algumas doenças, transtornos e condições, como epilepsia, ansiedade e depressão, dor neuropática e tolerância e dependência de drogas (GREWER e RAUEN, 2005; FEATHERSTONE, 2010).

A conversão bioquímica do glutamato é escassa no espaço extracelular, pois nessa região não existem enzimas que o degradem. Assim, esse neurotransmissor é capaz de interagir

com receptores por tempo prolongado ou até que seja removido do líquido extracelular por transportadores específicos. Dessa forma, a desregulação da transmissão glutamatérgica é um fator importante no desenvolvimento de algumas doenças neurodegenerativas e transtornos psiquiátricos (SCHMIDT e REITH, 2005).

A liberação excessiva de glutamato e a superativação de receptores ionotrópicos têm sido associadas a um fenômeno conhecido como excitotoxicidade, que está relacionada com diminuição da neurogênese hipocampal, diminuição de espinhas dendríticas e morte neuronal, levando a diminuição de conexões no hipocampo, amígdala e córtex pré frontal, áreas que sabidamente estão comprometidas pela ação do estresse e envolvidas na depressão (GARCIA, 2013; MURROUGH, ABDALLAH e MATHEW, 2017). Dessa forma, a retirada de glutamato da sinapse por seus transportadores é necessária para a neurotransmissão excitatória normal (YERNOOL et al., 2004).

Sabendo-se que o glutamato e seus subtipos de receptores específicos desempenham papéis fundamentais na regulação da plasticidade sináptica e afetam os processos humanos básicos de humor, cognição, aprendizagem e recompensa, vários estudos suportam a hipótese da transmissão glutamatérgica estar envolvida na neurobiologia e tratamento da depressão. A descoberta recente de que a cetamina, antagonista do receptor N-metilaspártato (NMDA) produz efeitos antidepressivos em pacientes com depressão resistente, corrobora para essa teoria do envolvimento do glutamato na patofisiologia do transtorno depressivo (GARCIA, 2013). Tais efeitos antidepressivos da cetamina foram associados a liberação de BDNF no hipocampo (GARCIA et al., 2008).

Existe também uma correlação positiva entre os níveis plasmáticos de glutamato e a gravidade dos sintomas depressivos em pacientes com TDM (MITANI et al., 2006). Juntas, essas descobertas sugerem que anormalidades no ciclo de glutamato no cérebro provavelmente estão envolvidos na fisiopatologia do TDM.

2.2 TRANSTORNO DE ANSIEDADE

A ansiedade e medo ocasional fazem parte da vida cotidiana. Porém, para serem diagnosticados como sintomas de um transtorno de ansiedade (TA), devem ocorrer de forma excessiva, crônica e persistentes (6 meses ou mais) e ser associados à prejuízos social e ocupacional. Estes transtornos são condições comuns e incapacitantes que geralmente começam durante a infância e adolescência (STEIN e SAREEN, 2015). O medo ou ansiedade transitórios

surtem em torno de períodos de estresse e, por isso, não são diagnosticados como transtornos de ansiedade, a menos que persistam por seis meses, ou mais (MURIS et al., 2000).

Os TAs incluem transtornos que compartilham características de medo e ansiedade excessivos e perturbações comportamentais, mas diferenciam-se pelos objetos ou situações que induzem estes sentimentos. Os TAs são classificados como transtorno de ansiedade de separação, mutismo seletivo, fobias específicas, transtorno de ansiedade social (TAS), transtorno de pânico (TP), agorafobia, transtorno de ansiedade generalizada (TAG), transtorno de ansiedade induzido por substância/medicamento (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014).

Muitas condições de saúde mental e física têm sintomas que se sobrepõem aos transtornos de ansiedade. TDM e transtorno bipolar são frequentemente acompanhados de sintomas ansiosos. Embora seja difícil diferenciá-los, pois alguns sintomas estão presentes tanto no TDM quanto em TAs (fadiga e insônia), a anedonia persistente está presente apenas no TDM (ZBOZINEK, et al., 2012). Um resumo diferenciando medo, ansiedade e depressão é apresentado na tabela 3.

Indivíduos portadores de TAs apresentam risco aumentado de outras condições de saúde mental e física (por exemplo, síndromes de dor crônica, asma ou doença pulmonar obstrutiva crônica, doença inflamatória intestinal e TDM).

Os transtornos de ansiedade são caracterizados por uma interação entre fatores ambientais e variantes genéticas. Exposição à adversidades na infância e adolescência, história parental de transtornos mentais, estilo parental superprotetor ou excessivamente severo, baixo status socioeconômico e doenças crônicas aumentam o risco de desenvolvimento de um transtorno de ansiedade. Além disso, o sexo feminino também pode ser considerado um fator de risco,

Tabela 3 – Sintomas de ansiedade, medo e depressão

Ansiedade	Medo	TDM
Pensamento de ameaça iminente	Pensamentos de ameaças futuras	Pensamentos de perda/fracasso
Excitação simpática	Tensão muscular	Falta de energia
Fuga	Evitação	Cancelamento

Fonte: Adaptado de Craske, et al., (2011).

já que as mulheres são mais atingidas em uma proporção de 2:1 (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014; CRASKE E STEIN, 2016).

A fisiopatologia dos transtornos de ansiedade não é bem elucidada. Alterações em neurotransmissores (por exemplo, GABA) e nos sistemas neuroendócrinos (por exemplo, eixo HPA) já foram sugeridas (GOMES et al., 2019). Além disso, estudos de imagem cerebral (ressonância magnética), sugerem hiperatividade de regiões límbicas, como amígdala e ínsula, durante o processamento de estímulos emocionais, e conectividade funcional aberrante dessas regiões entre si e com regiões inibitórias (STEIN et al., 2007; FOZO et al., 2015). O papel dos mecanismos epigenéticos como causa dos transtornos de ansiedade também tem ganhado atenção nos últimos anos. Mecanismos epigenéticos podem desempenhar um papel no equilíbrio entre fatores de risco e resiliência, levando a um resultado adaptativo ou mal adaptativo (SCHIELE e DOMSCHKE, 2018).

Os transtornos de ansiedade são frequentemente subdiagnosticados e subtratados, visto que muitos casos incluem sintomas físicos e acabam sendo tratados em ambulatórios (WITTCHEN, 2002; BANDELOW e MICHAELIS, 2022). Em contextos clínicos, a maioria dos pacientes que procuram ajuda sofrem de transtorno de ansiedade social, transtorno de pânico e transtorno de ansiedade generalizada. Nem todos os transtornos de ansiedade precisam ser tratados quando os sintomas são leves, transitórios e sem prejuízo associado na função social e ocupacional. No entanto, o tratamento é indicado quando um paciente apresenta sofrimento acentuado ou sofre de complicações resultantes do distúrbio (por exemplo, depressão secundária, ideação suicida ou abuso de álcool) (BANDELOW, MICHAELIS, e WEDEKIND, 2022).

O plano de tratamento deve incluir psicoterapia, farmacoterapia e outras intervenções escolhidas de acordo com fatores individuais (preferência e histórico do paciente com tentativas anteriores de tratamento, gravidade da doença, comorbidades associadas, suicídio, disponibilidade local de métodos de tratamento, efeitos colaterais, tempo de espera para consultas de psicoterapia e custos).

Para todos os tipos de transtorno de ansiedade, a terapia cognitivo-comportamental é o tipo de psicoterapia para a qual há evidência mais forte e que recebe a recomendação de nível mais alto (STRÖHLE, GENSICHEN e DOMSCHKE, 2018). Visto que muitos fármacos usados para tratar transtornos de ansiedade (tabela 4) são antidepressivos, estes tratamentos podem resultar em efeitos colaterais específicos da classe, além de apresentarem uma latência para o aparecimento dos primeiros efeitos e de, ocasionalmente, piorar o nervosismo, a agitação e a ansiedade num primeiro momento. Dessa forma, esses medicamentos devem ser

administrados inicialmente em baixas doses. As taxas de respostas ao tratamento geralmente são altas, contudo, a descontinuação precoce do tratamento é associada à recaídas. É recomendado, portanto, que a terapia medicamentosa seja continuada por pelo menos 6-12 meses após o término da fase aguda. Além disso, a descontinuação da medicação deve ser gradual, ao longo de 12 semanas (PERNA et al., 2016).

Tabela 4 – Recomendações farmacológicas para transtornos de ansiedade (TAG, TP e TAS) em adultos.

Classes de ADs	Fármaco
ISRSs	Citalopram, escitalopram, fluoxetina, fluvoxamina, paroxetina, sertralina
IRSNs	Duloxetina, venlafaxina
ADTs	Clomipramina
Moduladores de Cálcio	Pregabalina
Azapironas	Buspirona
IMAOs	Moclobemida

Fonte: Adaptado de BANDELOW, MICHAELIS e WEDEKIND (2022).

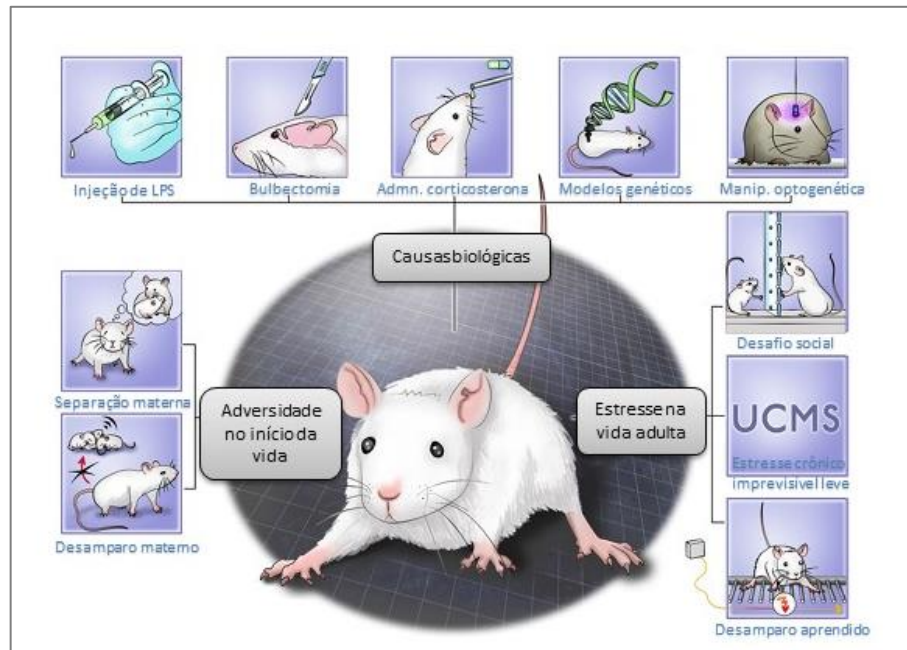
3.3 MODELOS ANIMAIS PARA O ESTUDO DO TDM

Os modelos animais fornecem informações e são um caminho para descobrir e estudar circuitos neurais e vias que podem estar envolvidas no TDM (WANG et al., 2017). Ao longo do tempo, foram sendo refinados para assemelhar-se aos aspectos comportamentais e cognitivos do TDM em humanos (NESTLER e HYMAN, 2010). Embora alguns sintomas relacionados ao TDM sejam características unicamente humanas, como o suicídio, alguns outros aspectos podem ser replicados, vistos e simulados em animais de laboratório, incluindo, entre outros, medidas de desamparo, anedonia, desespero comportamental e outras mudanças neurovegetativas, como alterações nos padrões de apetite (KRISHNAN e NESTLER, 2011).

Com base na fisiopatologia do TDM, os modelos animais de indução de depressão baseiam-se na exposição aguda ou crônica à um estressor, já que muitos episódios iniciais de TDM são precipitados por adversidades como o estresse. O estresse de contenção, modelo utilizado neste trabalho, é frequentemente utilizado para induzir comportamentos do tipo depressivo em animais experimentais (THAKARE, DHAKANE e PATEL, 2016). Este tipo de estresse é responsável por desencadear anormalidades neuroquímicas, hormonais e comportamentais. Sabe-se que o estresse de contenção estimula diversos eventos celulares e causa um desequilíbrio nos sistemas antioxidantes do cérebro, diminuindo a atividade de enzimas antioxidantes, bem como um aumento nos níveis de glicocorticoides plasmático

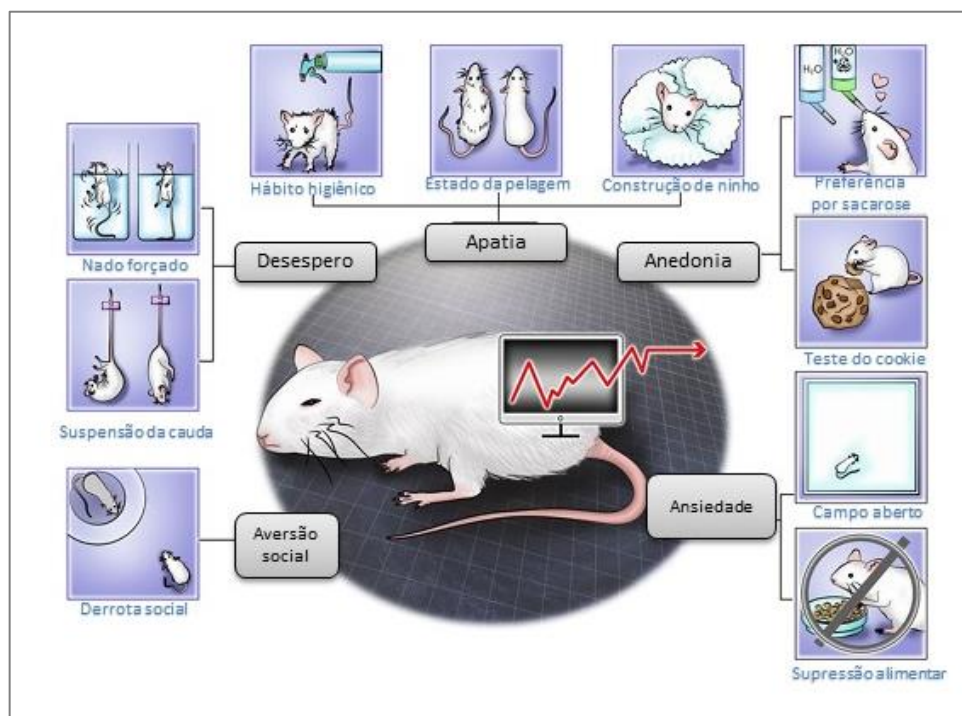
(KUMAR, GARG e PRAKASH, 2010; FREITAS et al., 2014; SULAKHIYA, et al., 2016). Alguns modelos de depressão são exibidos na figura 3. Juntamente com os modelos, são utilizados testes para avaliar e confirmar comportamento “semelhante à depressão”, conforme expostos na figura 4.

Figura 3. Modelos animais de depressão.



Fonte: Adaptado de PLANCHEZ, SURGET e BELZUNG (2019).

Figura 4 - Métodos e comportamentos para avaliação dos comportamentos tipo-depressivo e ansioso em roedores.



Fonte: Adaptado de PLANCHEZ, SURGET e BELZUNG (2019).

3.4 HIPÓXIA INTERMITENTE

As consequências da depressão não tratada ou parcialmente tratada são enormes para os pacientes, suas famílias, sistemas de saúde e sociedade. Fármacos antidepressivos têm sido usados para tratar a depressão por mais de 50 anos (CHEN e SKOLNICK, 2007; BELMAKER, 2008). No entanto, apesar de muitos ensaios com antidepressivos e estratégias de tratamento, parte dos pacientes diagnosticados com TDM não respondem aos tratamentos atuais. Além disso, possuem um início de resposta tardio e requerem, no mínimo, 2 semanas para surtirem os primeiros efeitos (NAKAJIMA et al., 2010). Soma-se a isso diversos efeitos colaterais indesejáveis causados por esses medicamentos.

Dessa forma, a busca por novos métodos, farmacológicos ou não, eficazes de profilaxia e tratamento da depressão é imprescindível.

Uma das promissoras terapias complementares e alternativa não medicamentosa é a ativação de defesa natural do próprio corpo humano através da adaptação à hipóxia intermitente (HI). Rybnikova e colaboradores (2007) sugerem que o condicionamento hipóxico leve representa uma ferramenta não medicinal benéfica para a prevenção e terapia de depressões, incluindo aquelas resistentes à antidepressivos.

O estado hipóxico pode ocorrer por diversos fatores e caracteriza-se pelo baixo teor de O_2 nos tecidos orgânicos. Na literatura médica, é frequentemente associado a processos patológicos, como apneia obstrutiva do sono. A maior parte do oxigênio obtido na respiração é utilizado pelas mitocôndrias para a produção de energia. Portanto, níveis baixos de oxigênio prejudicam atividades celulares dependentes de energia e, em tecidos com alta necessidade de O_2 , este estado geralmente é considerado perigoso (GOZAL, DANIEL e DOHANICH, 2001).

Entretanto, respostas ventilatórias e cardiovasculares, regulação do fluxo sanguíneo cerebral e outras adaptações moleculares causadas por exposição à hipóxia moderada fornece um estado de proteção endógeno. Dessa forma, o uso da hipóxia intermitente tem ganhado atenção nas últimas décadas (BURTSCHER et al., 2021).

O conceito de treinamento hipóxico intermitente surgiu antes da Segunda Guerra Mundial, na antiga União Soviética, por necessidade de aclimatar os pilotos à altas altitudes. A primeira pesquisa na área surgiu, portanto, na década de 30, objetivando buscar métodos eficazes de pré aclimação à altitudes. À época, nenhum experimento utilizando hipóxia foi realizado. Porém, foi proposto em 1934 que apenas alguns dias vivendo em altitude

aumentariam a tolerância à subsequente exposição hipóxica. Mais tarde, Sirotinin (1940) publicaria essa teoria e, a partir de tais estudos, o conceito emergiu e mais estudos começaram a surgir na área (SEREBROVSKAYA, 2002).

A HI consiste em exposição a episódios repetidos ou recorrentes à baixo teor de oxigênio (hipóxia), intercalados com períodos de normóxia (21% O₂). Os protocolos de HI variam em diferentes fatores (SEREBROVSKAYA e XI, 2016), como nível de hipoxemia dentro do episódio (porcentagem de oxigênio inspirado), número de episódios/ciclos por dia, duração da hipóxia dentro dos episódios e duração cumulativa da exposição (dias/semanas/meses). Estes fatores estão associados à efeitos e respostas biológicas benéficas ou prejudiciais (MATEIKA et al., 2015). Sugere-se, com base em evidências e resultados de estudos, que protocolos de HI (9-16% O₂), com baixo número de ciclos (3-15 episódios/dia) podem desencadear efeitos benéficos, enquanto protocolos mais severos (3-8% O₂) e em maior número por dia (48-2400 episódios/dia) podem resultar em patologias (NAVARRETE-OPAZO e MITCHELL, 2014).

Embora os mecanismos envolvidos na HI sejam mal compreendidos, sabe-se que este método fornece um estado de proteção endógeno, o qual auxilia e prepara os neurônios a sobreviverem a novos insultos hipóxicos/isquêmicos mais severos (KUSHWAH et al., 2016). A sobrevivência dos tecidos ao estresse hipóxico é um indicador de que respostas adaptativas são mobilizadas para compensar a falta de O₂ (JUNG et al., 2008). Em geral, a maioria dos mecanismos associados à este método estão envolvidos em vias de sinalização de fatores induzíveis por hipóxia (HIF) como modulador da homeostase de oxigênio (SCHEGA et al., 2016). Existem evidências de que o HIF pode estar envolvido na proliferação e diferenciação de células troncos neurais (Zhu et al., 2005) e expressão de eritropoietina (EPO), envolvida não somente na eritropoiese mas também na diferenciação de células progenitoras neurais e proteção neuronal após insultos isquêmicos (SCHÖLZKE e SCHWANINGER, 2007; SIRÉN et al., 2001). Além de genes de EPO, o HIF também induz ativação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que desempenha um papel fundamental no crescimento de novos vasos, divisão e migração de vasos existentes e também na neurogênese (JIN et al., 2002). Outras adaptações induzidas pela exposição repetida à hipóxia moderada são mediadas pela sinalização de ROS e aumento da capacidade antioxidante celular endógena, redução da inflamação, aumento da eficiência mitocondrial e sobrevivência celular cerebral (BURTSCHER et al., 2021).

Os benefícios da HI já são conhecidos para a aclimatação de pilotos e montanhistas e aumento da performance de atletas (KATAYAMA et al., 2003; WILLE et al., 2012). Tem-se mostrado que a tolerância ao exercício ou performance física está relacionada ao aumento da

eritropoiese, angiogênese e capacidade mitocondrial (VOGT e HOPPELER, 2010). Efeitos comparáveis ao treino aeróbico podem ser observado utilizando-se a HI (SCHEGA et al., 2016). Porém, seu uso também é direcionado para o tratamento e profilaxia de diversas doenças, como hipertensão, doenças isquêmicas das artérias coronárias, Doença de Parkinson e Doença de Alzheimer e leucemia mieloide aguda (LIU et al., 2006; ZHU et al., 2006; SEREBROVSKAYA, 2008).

Muitas evidências destacam o papel benéfico da HI sobre a função cardiovascular. No sistema cardiovascular humano, foi demonstrado que este método fornece melhoria nos processos metabólicos do miocárdio, aumento da tolerância miocárdica à lesão de isquemia-reperfusão (ou seja, efeito anti-isquêmico), redução dos danos por radicais livres a nível celular, melhora da função endotelial e microcirculação, efeito inotrópico positivo na função cardíaca, normalização da pressão arterial, redução da atividade do sistema nervoso simpático e limitação viscosidade e agregação plaquetária (SEREBROVSKAYA e XI, 2016).

A HI também possui papel protetivo sobre a função cognitiva, diminuindo os níveis de estresse oxidativo e promovendo angiogênese e neurogênese cerebral, tornando-se uma abordagem promissora para reverter processos de doenças neurodegenerativas. Foi observado que a exposição à hipóxia intermitente leva a aumentos nos níveis de BDNF, neurogênese hipocampal, sinaptogênese funcional e alívio de déficits na aprendizagem espacial e prejuízo da memória de longo prazo, bem como a prevenção de sinais comportamentais de retirada e diminuição de marcadores de estresse oxidativo em ratos expostos à etanol (Mateika et al., 2014). Em um estudo recente utilizando modelo animal de Doença de Alzheimer, foi observado que a HI resultou em melhora no prejuízo cognitivo e indução de processo amiloidogênico, diminuindo o acúmulo de beta-amiloide (YUE et al., 2021). Já em relação à doença de Parkinson, caracterizada por degeneração progressiva de neurônios dopaminérgicos no mesencéfalo, a HI fortalece a síntese e liberação de dopamina em quimiorreceptores periféricos e ativa a tirosina hidroxilase, envolvida no processo de síntese de dopamina. Além disso, este método também mostrou-se eficiente em estabilizar os níveis de α -sinucleína, proteína cuja agregação é característica da Doença de Parkinson (YU et al., 2004; BURTSCHER et al., 2021; BELIKOVA, KOLESNIKOVA e SEREBROVSKAYA, 2012).

Foi visto ainda, em estudos conduzidos por Yan e colaboradores (2002) e Zhu e colaboradores (2010) que a HI produziu efeitos antidepressivos via neurogênese hipocampal. Outros grupos também observaram efeitos positivos da HI em modelos de depressão, onde esse método mostrou efeito ansiolítico e antidepressivo bem como atuou como profilático desses episódios (RYBNIKOVA et al., 2007; RYBNIKOVA et al., 2008; BASOVICH, 2010). Além

disso, este método mostrou efeitos positivos em modelo animal de estresse pós traumático (MANUKHINA et al. 2020), e foi efetivo em atenuar tanto os sinais comportamentais de estresse pós traumático quanto as evidências morfológicas de distrofia do córtex adrenal, além de exercer um efeito antiestresse (MANUKHINA et al., 2018; DING et al., 2019).

Tratamentos alternativos não farmacológicos para melhorar os sistemas endógenos de defesa contra o estresse parecem promissores, pois apresentam menos efeitos colaterais e têm poucas contra-indicações. Portanto, a HI não consiste em uma forma de tratamento para uma doença em específico, mas sim em um método que melhora a resistência geral do organismo, aumentando assim a probabilidade de resiliência a fatores não favoráveis, tendo sido usado por cerca de 2 milhões de pacientes (SEREBROVSKAYA, 2002).

Dessa forma, visto abrangência mundial do transtorno depressivo maior e ansiedade e sua capacidade de interferir na qualidade de vida dos indivíduos, bem como a complexidade e eficácia relativa do seu tratamento, a hipóxia intermitente parece ser um método com vantagens terapêuticas e merece contínuo estudo.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito de uma sessão (1 hora) de HI a 13% O₂ e sua associação com fluoxetina sobre os comportamentos do tipo depressivo e ansioso e sobre parâmetros bioquímicos em camundongos C57BL/6 submetidos ao modelo de estresse por contenção aguda (6 horas).

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Avaliar o efeito de uma sessão de HI a 13% O₂ e sua associação com fluoxetina em animais submetidos ao ECA sobre:

- Comportamento tipo depressivo e ansioso através dos testes comportamentais de nado forçado (TNF), suspensão da cauda (TSC), campo aberto (TCA), e labirinto em cruz elevado (TLCE);
- Níveis de corticosterona sérica;
- Estresse oxidativo (EO) de áreas do SNC (córtex pré frontal e hipocampo);
- Níveis de citocinas séricas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-17, TNF- α e IFN- γ).

4 MANUSCRITO

4.1 MANUSCRITO 1

O manuscrito apresentado a seguir inclui as seções de “Introdução”, “Materiais e Métodos”, “Resultados e Discussão” e “Referências”. O formato apresentado é o que foi submetido para publicação no periódico *Physiology & Behavior*.

One hour of intermittent hypoxia, isolated or associated with fluoxetine, changes inflammatory biochemical parameters after exposure to acute restraint stress in C57BL/6 mice

Francini Arboit^{a,b}, Gabriele Cheiran Pereira^{a,b}, Maria Fernanda Pessano Fialho^c, Gabriela Becker^c, Evelyne da Silva Brum^c, Micheli Mainardi Pillat^b, Guilherme Vargas Bochi^{a,b}, Luiz Osório Cruz Portela^d, Eliane Maria Zanchet^{a,b,*}.

^aCenter of Health Sciences, Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Santa Maria, RS, Brazil.

^bCenter of Health Sciences, Graduate Program in Pharmacology, Federal University of Santa Maria, RS, Brazil.

^cCenter of Natural and Exact Sciences, Graduate Program in Biological Sciences: Biochemistry Toxicology, Federal University of Santa Maria, RS, Brazil.

^dCenter of Physical Education and Sports, Federal University of Santa Maria, RS, Brazil.

*Corresponding author: Eliane Maria Zanchet, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima 1000, Prédio 21, Sala 5211, Camobi, 97105-900, Santa Maria-RS, Brazil, E-mail: eliane.m.zanchet@ufsm.br

Declarations of interest: none

ABSTRACT

Mental disorders are a serious public health problem, affecting millions of people. Under current therapeutic choices, many patients do not respond and experience side effects. Using different protocols, intermittent hypoxia (IH) has already demonstrated anxiolytic, antidepressant, and neuroprotective effects. We investigated the effects of acute IH (13% O₂, 1 hour), fluoxetine (FLX), or a combination of both, on anxiety and depression-like behaviors, oxidative parameters, serum levels of corticosterone, and inflammatory cytokines induced by acute restraint stress (ARS) in C57BL/6 mice. To assess the behavior of the animals, we used the open field test (OFT), elevated plus maze test (EPMT), tail suspension test (TST), and forced swimming test (FST), which revealed anxiety-like behavior. There was a synergistic effect of the IH+FLX, which decreased the FST immobility time compared to isolated IH and increased the TST immobility latency time compared to isolated treatments and the stressed group. Although the ARS protocol did not cause significant changes in oxidative stress, there was a decrease in hydrogen peroxide (H₂O₂) levels with the associated treatment compared to the control group and greater catalase (CAT) activity in FLX treatment compared to IH, in hippocampal tissue. The interleukin IL-17, IL-6 and IFN- γ levels increased after the ARS protocol. All treatments reversed elevated levels of IFN- γ , IL-17, IL-2 and TNF- α . The IL-6 levels also were changed by IH+FLX treatment. These results demonstrate that just 1 hour of IH or/and association with fluoxetine were not able to reverse anxious-like behavior but induced changes in oxidative parameters and had an anti-inflammatory effect.

Keywords: Stress. Anxiety. Major Depression. Intermittent hypoxia.

1 INTRODUCTION

Mental health disorders are a severe public health problem, endangering human's physical and mental health, consequently reducing the quality of life. Regarding neuropsychiatric disorders, major depressive disorder (MDD) and anxiety disorders are the most prevalent, affecting 280 and 264 million people worldwide, respectively [1–3].

MDD is a heterogeneous disorder characterized by persistent bad mood, loss of interest and pleasure in everyday activities, fatigue, feelings of guilt and worthlessness, sleep and anxiety disorders, and is often followed by suicidal ideation [4,5]. In addition, these symptoms frequently overlap with symptoms of other psychiatric disorders, such as anxiety disorder [6]. Anxiety, in turn, is a normal basic emotion that can sometimes become pathologically heightened and is marked by excessive fear and avoidance in response to situations that do not pose risk or danger [7,8]. According to the Statistical Manual of Mental Disorder (DSM-5) [9], anxiety disorder includes panic disorder, agoraphobia, generalized anxiety disorder, social phobia, mixed anxiety and depressive disorder, separation anxiety disorder of childhood, selective mutism, and specific (isolated) phobias.

MDD and anxiety disorder are triggered by biological, psychological, genetic, social, and family factors, and they have symptomatology that correlates with other disorders [10,11]. Several hypotheses are proposed to define the molecular and cellular mechanisms underlying MDD, including dysregulation of monoaminergic systems and the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, inflammatory/immunological dysfunction, and oxidative stress involvement [12,13]. Regarding the pathophysiological mechanisms of anxiety disorders, alterations in neurotransmitters (e.g., GABA) and in neuroendocrine systems (e.g., HPA axis) have already been suggested [14].

Many pieces of evidence suggest that MDD and anxiety disorder arises from a combination of genetic and environmental factors. Stress, then, is an essential factor associated with these pathologies [8,15], increasing the individual's susceptibility. In this way, many depressive and anxiety episodes occur in the context of some form of stress [12,16–18]. Stress is a state of homeostatic imbalance that results in altered physiological responses and behaviors depending on the episode's severity and duration [19]. Studies indicate that different types of changes in neurotransmitter, neuroendocrine, and neuropeptide systems lead to neuronal function impairment and may mediate the relationship between stress and the development of CNS disorders, including MDD and anxiety disorders [18,20–22]. Acute restraint stress (ARS) is often used as an experimental model of depression in animals [20,23,24]. Besides causing

depression and anxiety-like behaviors in animals, this model induces changes in physiological systems, increasing pro-inflammatory cytokines, serum corticosterone, and oxidative stress in brain regions involved in the disorder [19,25,26].

Regarding MDD treatments, there are different classes of antidepressants, such as tricyclics, monoamine oxidase inhibitors (MAOIs), selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs), and serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors (SNRIs) [27]. However, about 30% of patients with depressive disorder treated with antidepressants show no clinical improvement or only partial response to treatment [28]. Furthermore, these drugs have a range of undesirable side effects, and they can take weeks to months to reach full therapeutic effects [29]. Searching for new methods, pharmacological or not, effective in preventing and treating depression and anxiety, represents one of the most urgent problems faced by modern neurobiology and medicine.

Intermittent hypoxia (IH) has been suggested as a beneficial non-medicinal tool to prevent depression and as a therapy, including those cases of refractory depression [30]. IH is the exposure to repeated or recurrent episodes of low oxygen content (hypoxia), interspersed with periods of normoxia (21% O₂). Tissue survival to hypoxic stress is an indicator that adaptive responses are mobilized to compensate the lack of O₂ through the activation of molecular and genetic mechanisms [31,32]. The potential harm or benefit of hypoxia is related to the frequency, duration, and intensity of hypoxic exposure [32,33]. Different programs with varying intensity of HI have been described (e.g., 9%-12% O₂, 30-90 min/day for 3-5 weeks) and have shown beneficial effects on the myocardium and CNS [34–36]. It is already used for the acclimatization of pilots and mountaineers, increasing the performance of athletes, and for the treatment/prevention of diseases such as hypertension, ischemic coronary artery disease, Parkinson's disease, and acute myeloid leukemia [26,33,35]. Other studies demonstrate IH anxiolytic, antidepressant, and neuroprotective effects [35], triggered by induction mechanisms, anti-apoptotic factors of the B-cell lymphoma 2 (bcl-2) family, cytosolic and mitochondrial antioxidants, metalloproteases, and activation of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) [37–39]. Furthermore, IH has been shown to be effective in preventing and treating damage induced by post-traumatic stress models [40–42] and promote increased *in vitro* [43] and *in vivo* neurogenesis [44].

Considering IH application possibilities in the treatment and prevention of diseases, the question in this study is whether the use of an acute IH protocol and its association with fluoxetine may affect depressive and anxiety-like behaviors in mice induced by an acute stress protocol. In addition, we investigated the effect of acute stress and treatments (IH, FLX or their

association) on serum corticosterone levels, and oxidative and inflammatory parameters, in brain structures associated with MDD and anxiety disorders. The association between classic and non-pharmacological treatments may result in beneficial synergistic effects to remedy behavioral and physiological changes caused by anxiety and MDD. In addition, it can be a new alternative for treatment that, to our knowledge, has never been described before.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 ANIMALS

All experiments in the present study were performed in accordance with National Research Council's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and the protocols for experimental studies were approved by our Institutional Animal Care and Use Committee (Process number 23081.020892/2020-60). The number of animals used was the minimum necessary to demonstrate consistent effects, and every effort was made to minimize their suffering. C57BL/6 female mice (20-25g, 60-90 days) were obtained from the Central Animal Facility-PRPGP of the Federal University of Santa Maria and maintained under standard laboratory conditions, at 22 ± 2 °C, 12-hour light-dark cycle and food and water *ad libitum*. Seven days before the beginning of the experiments, the animals went through a period of environmental adaptation.

2.2 DRUGS AND TREATMENTS

Fluoxetine was prepared in 0.9% NaCl isotonic saline solution and administered orally (p.o., using gavage technique) at a dose of 10 mg/kg [45,46]. The IH sessions were performed in an acrylic chamber that allows the animals to be properly kept. The composition of the air is quickly and precisely adjusted using a gas compressor (GO2 Altitude Hypocator equipment). The O₂ concentration selected for the present experiment was 13%. The program consisted of 15 minutes of hypoxic exposure, followed by 5 minutes of reoxygenation for a total duration of 1 hour. Protocol determinations were based on previous studies of our group [47].

2.3 ACUTE RESTRAINT STRESS (ARS) PROCEDURE

The depression and anxiety model used was the ARS, in which the animals were kept in 50 mL falcon tubes (adapted with holes to facilitate air circulation) for 6 hours [48,49]. The length of each tube was adjusted with cotton disks to limit the movement of the head and limbs of each animal, allowing only breathing without causing pain.

2.4 EXPERIMENTAL DESIGN

The animals were randomly divided into 5 experimental groups, and each group containing 8 animals ($n = 8$), as described below:

Control + saline (10 mL/kg, p.o.) group;

ARS + saline (10 mL/kg, p.o.) group;

ARS + IH (13% O₂ 1h) group;

ARS + FLX (10 mg/kg, p.o.) group;

ARS + IH (13% O₂ 1h) + FLX (10 mg/kg, p.o.) group.

The experimental design is shown in figure 1. All experiment phases were performed during the light phase of the light-dark cycle, and all tests were recorded on video to avoid behavioral interferences in the animals. After environmental acclimatization, the animals were transported from the animal facility to an experimental room, where the stressed groups were exposed to ARS protocol for 6 hours. All groups have restricted access to water and food during the restraint procedure [50]. Control and stressed animals were kept in the same environment. At the end of the restraint session, the animals were returned to their cages, where they remained for 40 minutes. After this period, all animals were sent to another room to receive treatments (IH or FLX or IH+FLX). Thirty minutes after the treatments, the animals were submitted to behavioral tests in the following order: open field test (OFT), elevated plus maze test (EPMT), tail suspension test (TST), and forced swim test (FST). The next day, after anesthesia with isoflurane in sufficient concentration to induce a deep anesthetic plane, blood was collected by cardiac puncture followed by the hippocampus (H) and prefrontal cortex (PFC) collection. Serum was centrifugated (3000 xg at room temperature for 10 minutes), and stored frozen, as well as tissues samples, at -80°C until biochemical analysis.

2.5 BEHAVIORAL TESTS

2.5.1 Open-Field Test (Oft)

The method was initially described by Prut and Belzung (2003) [51] to assess animals' locomotor and exploratory activity. The animals were placed individually in the center of circular apparatus measuring 60 x 60 x 60 cm. The floor is divided into quadrants of identical size and allowed to explore this environment for 5 minutes. The total number of crossings (assessment of locomotor activity) and rearings (assessment of exploratory capacity) were observed.

2.5.2 Forced Swim Test (FST) and Tail Suspension Test (TST)

The FST was performed as described by Porsolt, Pichon, and Jalfre (1977) [52]. It was used to investigate depressive-like behavior. The test consisted of submitting, individually, the animals to a 6 minutes swimming session in a colorless cylindrical tank (45 cm in height x 35 cm in diameter) containing 40 cm of water at $25 \pm 2^\circ\text{C}$. During this period, immobility was evaluated. The time the animal remained passively floating was considered immobility and reflected a behavioral state of demotivation. The latency to first immobility behavior was also evaluated. Results were expressed as immobility and latency, both in seconds (s).

The TST method was initially described by Steru et al., (1985) [53]. With some adaptations, in this test, the animal was left for 6 minutes in an uncomfortable and impossible to escape the situation, suspended by its tail on the edge of a vertical surface positioned 60 cm above the ground. The tail was fixed in the apparatus with adhesive tape. The latency to the first immobility episode was evaluated and expressed in seconds (s).

2.5.3 Elevated Plus Maze Test (EPMT)

EPMT was performed according to the description by Anseloni and Brandão (1997) [54] to investigate anxiety-like behavior. The apparatus used is composed of four arms, two closed and two open, opposite each other, and a central platform. The animals were individually positioned on the central platform, and for 5 minutes, they were able to explore the apparatus. The number of entries and the time spent in each arm were evaluated. In addition, the anxiety index (AI) was also calculated, according to the following formula: $AI = 1 - \frac{([\text{open arms time}/\text{test duration}] + [\text{open arms entries}/\text{total number of entries}])}{2}$ [55].

2.6 BIOCHEMICAL ANALYSIS

2.6.1 Serum corticosterone levels

The circulating corticosterone level was measured using an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) kit (Enzo Life Sciences, Farmingdale, New York, USA) following the instructions in the manufacturer's manual. After interpolation in a standard curve, results were obtained and expressed as pg/mL in a logarithmic form to normalize data.

2.6.2 Inflammatory parameters

Serum levels of IL-2, IL-4, IL-6, IL-17, IFN- γ , and TNF- α were evaluated by flow cytometry in a commercial kit (BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1 / Th2 / Th17 Cytokine Kit) following the manufacturer's instructions. Briefly, 25 μ L of serum, 25 μ L of mixed capture bead suspension, and 25 μ L of phycoerythrin (PE) detection reagents were mixed and incubated at room temperature, in the dark, for 2 hours. We used the BD FACSCalibur flow cytometer for data acquisition, and acquired data were analyzed with FlowJo software. Results were expressed in pg/mL.

2.6.3 Oxidative parameters

Brain tissue samples (PFC and H) were used to assess oxidative parameters. H₂O₂ levels were determined by the phenol red method [56]. The formation and degradation of H₂O₂ are carried out by enzymes, which were also evaluated in this study. Superoxide dismutase (SOD) is responsible for the formation of H₂O₂ and was evaluated using the method previously described by Misra and Fridovich (1971) [57]. In turn, the degradation of H₂O₂ is performed by catalase (CAT), which was measured using the technique described by Aebi (1984) [58].

2.7 STATISTICAL ANALYSIS

Data were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM) and were analyzed using Graph Pad Prism (version 8.0, San Diego, USA). Previously, the values were tested by the Shapiro-Wilk normality test. Depending on their distribution, data were analyzed using parametric statistics (one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test) or non-parametric statistics (Kruskal–Wallis test followed by Dunn's post hoc test). Some results were also analyzed by the Student's T-test. Results with p values less than 0.05 ($p < 0.05$) were considered significant.

3 RESULTS

3.1 EFFECT OF AN IH SESSION, ALONE OR ASSOCIATED WITH FLUOXETINE ON DEPRESSIVE AND ANXIETY-LIKE BEHAVIORS IN ANIMALS SUBMITTED TO ARS

3.1.1 Forced Swimming Test and Tail Suspension Test

Regarding the immobility time in FST (Fig. 2A), one-way ANOVA indicated a significant difference between groups [$F_{4,35}=3.07$, $p=0.02$], where IH+FLX demonstrated a lower immobility time compared to IH ($p=0.03$). Although we observed an increase of 30% in immobility time caused by stress protocol when compared to control, there isn't a significant difference between these groups ($p=0.60$). We observed a reduction of 25% and 37% in immobility time caused by treatments with FLX and IH+FLX, respectively, in relation to the stressed group. In the latency parameter (Fig. 2B), there was no significant difference between control and stressed groups ($p>0.99$) and between treated and stressed groups ($p>0.05$), but we observed an increase of approximately 33% caused by IH+FLX treatment compared to the stressed group. In the latency time in TST (Fig. 2C), one-way ANOVA indicated a significant difference between groups [$F_{4,35}=12.8$, $p<0.0001$]. The IH+FLX group showed significant differences compared to all groups ($p<0.001$).

As an additional analysis, we performed the comparison of the control group with the stressed group using a student's T-test for all behavioral tests (Table 1). In these evaluations, we observed significant differences in the immobility time in the FST and in the latency time in the TST, demonstrating that ARS induced behavioral changes in the animals.

3.1.2 Elevated plus maze test

We also evaluated the anxiety-like behavior of mice by the EPMT. Regarding the number of open arms entries (Fig. 3A), one-way ANOVA indicated a significant difference between the groups [$F_{4,35}=5.90$, $p=0.001$]. A significant increase was observed when comparing groups FLX ($p=0.0003$) and IH+FLX ($p=0.03$) to the group treated with IH. Also, it was observed a difference in the time spent in the open arms (Fig. 3B), [$F_{4,35}=25.16$, $p<0.0001$], where there was a significant decrease in the time of all groups in relation to the control group ($p<0.0001$). In addition, the group treated with IH showed a significant reduction in this parameter compared to the stressed group ($p=0.04$). Regarding the parameter entries in closed arms (Fig. 3C), significant differences were observed [$F_{4,35}=18.82$, $p<0.0001$]. The group

treated with FLX and IH+FLX showed a significant increase in this parameter compared to the stressed and control groups ($p < 0.05$). Regarding the time spent in the closed arms (Fig. 3D), significant differences were observed [$F_{4,35} = 10.75$, $p < 0.0001$], with an increase in time of all groups compared to the control group ($p < 0.05$).

Using the Student's T-test analysis for comparison only between the control and stressed groups, we obtained significant differences in the time spent in open and closed arms, and in anxiety index, as shown in table 1.

3.1.3 Open field test

Although exposure to stress did not significantly affect the number of crossings [$F_{4,35} = 2.16$, $p = 0.09$] (Fig. 4A), it resulted in a significant decrease in the number of rearings compared to the control group ($p = 0.016$) (Fig. 4B).

3.2 EFFECT OF AN IH SESSION, ALONE OR ASSOCIATED WITH FLUOXETINE, ON BIOCHEMICAL PARAMETERS IN ANIMALS SUBMITTED TO ARS

3.2.1 Serum corticosterone levels

Stress exposure did not induce significant changes in serum corticosterone levels compared to the control group neither the treatment groups show significant differences in relation to the stressed group [$F_{4,16} = 0.46$, $p = 0.76$] (Fig. 5). Using the unpaired t test analysis for comparison only between the control and stressed groups, we obtained a higher level of corticosterone in stressed group, as shown in table 1.

3.2.2 Inflammatory cytokines

The data analysis showed significant changes in serum *IFN- γ* levels [$F_{4,25} = 19.26$, $p < 0.0001$], IL-17 [$F_{4,23} = 5.33$, $p = 0.003$] and IL-6 [$F_{4,21} = 4.084$, $p = 0.0111$]. The level of *IFN- γ* (fig.6A) increased in stressed animals compared to the control group ($p = 0.0111$) and all treatments were effective to significantly reduce this increase ($p < 0.0001$). The same pattern of results was observed in relation to IL-17 analysis (Fig. 6B). Regarding the serum IL-6 level analysis (Fig. 6C), stress resulted in a significant increase in IL-6 levels compared to the control group ($p = 0.039$) and treatment with IH+FLX decreased these levels ($p = 0.0459$); besides, treatments with IH and FLX presented a trend of approximately 21% and 57% in reducing IL-6 levels, respectively. In the assessment of IL-2 serum levels (Fig. 6D) significant differences

were observed [$F_{4,25}=14.52$, $p<0.0001$]. All treated groups showed decreased levels of this cytokine compared to stressed group ($p<0.05$). In the TNF- α assessment (Fig. 6E), significant results [$F_{4,23}=8.376$, $p=0.0003$] were observed. Exposure to stress did not result in significant differences compared to the control group ($p=0.99$), but all treatment groups showed a significant decrease in TNF- α levels compared to the stressed group ($p<0.01$). We also evaluated the IL-4 levels (Fig. 6E), but no significant difference was observed.

3.2.3 Oxidative stress

Significant differences were observed only in the H₂O₂ analysis of hippocampus samples [$F_{4,24}=3.44$, $p=0.02$], when comparing the group treated with IH+FLX to the control group ($p=0.032$), and in the CAT analysis of hippocampus samples [$F_{4,20}=3.13$, $p=0.03$], between groups treated with IH and FLX ($p=0.038$), as it is shown in Table 2.

4 DISCUSSION

In this study, we investigated the IH effect, alone or in combination with fluoxetine, on depressive and anxious-like behaviors and biochemical parameters induced by an acute restraint stress (ARS). Unexpectedly, the ARS model did not induce significant behavioral changes in FST and TST when analyzed by ANOVA. Similar results were described by Misztak et. al (2022), using 6 hour of chronic restraint stress [[59]. Nevertheless, to confirm these findings, we performed an additional analysis, comparing only the stressed (ARS) and control groups (Table 1). In this analysis, it was possible to observe that the animals exposed to ARS showed significant behavioral changes. We suggest that these behavioral changes are compatible with stress-induced behaviors. In addition, we demonstrated that the treatments, pharmacological (fluoxetine) or IH, as well as the association of both, altered the stress-induced behaviours.

Considering that ANOVA did not show significant differences between the stressed and the control groups in the behavioral tests, it is important to make some assumptions: 1) a single 6-hour session of stress may be insufficient to induce significant changes in behavioral tests; 2) C57BL/6 mice may be more resilient to stress, as already mentioned by other studies [60–62]; 3) considering the chronic nature of MDD, the ARS model may not be an ideal model to induce depressive-like behaviors. However, it was shown that the animals submitted to ARS showed anxiety-like behaviors (as demonstrated in the EPMT results described below. Furthermore, we demonstrated that treatment with IH, FLX or association (IH+FLX) induced changes in specific behavioral tests, oxidative and inflammatory parameters. Among the many non-

pharmacological treatments, IH deserves particular attention as it provides protection to the brain and body against possible injuries [30]. Although severe hypoxia conditions are known for their lethal effects, milder protocols trigger beneficial effects to the organism [31]. It is known that IH results may be related to the exact type of protocol used. In this study, we evaluated the effect of one session of normobaric IH at 13% O₂, associated or not with fluoxetine, in C57BL/6 mice submitted to the ARS model.

FST is based on the observation that, after initial movements in an attempt to escape, rodents develop an immobile posture, which is associated with a measure of depressive-like behavior and behavioral despair [63]. We did not observe an increase in this parameter in animals submitted to ARS compared to control animals (through ANOVA). Experiments with rats show that they can undergo a physical and behavioral adaptation to FST response. This adaptive response saves the energy necessary for survival in an unavoidable situation [64]. Possibly, this response can be extrapolated to the mice's behavior. In general, several factors can affect behavioral performance in the FST and might influence the evaluation of potential antidepressant drugs, including lineage, gender, age, swimming susceptibility and sample number [64]. Recently, it has been observed that the susceptibility of mice to swimming is an important factor and influences the test performance [65]. Although we did not observe the presence of depressive-like behavior in the FST, we demonstrated that the animals that received the association of treatments (IH+FLX) showed less immobility when compared to the animals that received only IH. Latency in FST refers to the time it takes the animal to stay immobile. The IH+FLX association increased FST latency, differing from FLX and IH alone. This may indicate a possible synergistic effect between treatments, since fluoxetine has already established antidepressant effects [66], and IH may enhance endogenous defense systems and have neuroprotective effects [35,38,43,44,67]. The neurogenesis and beneficial effects caused by antidepressants are related to BDNF expression. Like antidepressants, IH protocols have already been shown to increase BDNF, thus interfering with neurogenesis and promoting antidepressant effects [35,68]. In the TST, the IH+FLX association increased latency in relation to the stressed group. However, other studies reported that exposure to two-hour daily IH protocols for three days was able to alter the immobility time in this test [69].

In EPMT, we observed a decrease in time spent in open arms and an increase in time spent in closed arms of stressed animals compared to controls, which is consistent with an anxious-like behavior [63,64]. It is reinforced by the observation of decreasing number of rearings in OFT. However, none of the treatments was able to reverse the anxiety-like behavior induced by ARS. In contrast, in a previous study, IH was shown to be effective in decreasing

closed-arm and increasing open-arm permanence, even 48h after exposure to the IH protocol (10% O₂, 2 hours, 3 days) [69], showing that this method has a lasting anxiolytic effect. Other studies used EPMT and IH in different periods of the experiment, and it was seen that the use of this method as preconditioning also has anxiolytic effects [30,31,37,70]. Possibly, these divergences with our results happened due to differences in protocols, since it is known that the IH results may be related to the type of protocol used [31].

It is known that different stressors result in the stimulation of adrenocortical secretion of glucocorticoids, cortisol in humans, and corticosterone in rodents [10,71,72]. Therefore, it can be said that clinical and biochemical manifestations of depression are related to the neurobiology of stress [73]. However, neither ARS nor the treatments induced changes in serum corticosterone levels. We speculate that the time of stress used in the ARS protocol was insufficient to alter these hormone levels.

Recent evidence links depression with changes in brain function and abnormalities in neuronal signalling and plasticity [74]. One of the possible causes of this structural and functional disruption is oxidative stress (OS), which is defined as an imbalance between the production of reactive oxygen species (ROS) and the antioxidant capacity of cells [75,76]. ROS play an important role in the normal functioning of the brain, but when in excess, they can participate in the pathophysiology of neurological and psychiatric diseases. The brain is the most susceptible organ to ROS damage, as it requires high oxygen consumption and is rich in oxidative lipids. Increased oxygen consumption can lead to increased ROS production [74,77]. The increase in ROS generation and the depletion of antioxidant defenses lead to brain changes [75]. The estimation of antioxidant enzymes' altered activity, such as CAT and SOD, indicates the role of oxidative stress in depression. Our results showed a decreased of 27.3% in stressed group compared to control group, and an increase by 24% and 22.5% caused by IH and IH+FLX treatments, respectively, in SOD levels, in H tissue. In turn, in PFC, the same treatments also increased this enzyme activity by 28% and 15%, when compared to ARS. In the same way, they increased CAT activity by 64% and 16% comparing to ARS group, in PFC tissue. Also, IH and IH+FLX treatments reduced H₂O₂ levels by 42.8% and 60% compared to the stressed group in the hippocampus. These results show a possible act of treatments on the antioxidant system. In a previous study by our group, exposure to a chronic IH protocol (14-11% O₂, 2 hours daily for 30 days) was shown to be efficient in increasing the body's antioxidant defenses after an increase in OS induced by a hypercaloric diet in rats [47]. Another study associates chronic IH protocol with OS attenuation in rats submitted to intoxication and abrupt withdrawal of ethanol [34]. In both, changes were observed using chronic intermittent hypoxia protocols.

Considering that we use an acute protocol with only 1 hour of hypoxic exposure, these percentage results are important and allow further investigations using different protocols.

Evidence suggests that the depressive disorder is followed by the activation of inflammatory pathways, in which there are increased levels of inflammatory cytokines, such as IL-1 β , IL-2, IL-6, IFN- γ , and TNF- α [78]. This relationship is supported by studies where patients on immunotherapies to treat hepatitis C or cancer had depressed mood throughout treatment [79,80]. In addition, some studies suggest antidepressant effects of anti-inflammatory drugs [81–83]. The brain has a cellular network formed by neurons, microglia, and astrocytes capable of producing cytokines, expressing their receptors, and amplifying their signals, affecting neurotransmitter functions, neuroendocrine and neural activity, plasticity, and changes in brain circuits [84].

Our results confirm previous findings that acute and chronic stress is a risk factor for the development of inflammation [85–87]. Our ARS protocol interfered significantly with the levels of IFN- γ , IL-17 and IL-6. These results are consistent with those of other studies, in which an increase in IL-6 was observed in animals after a 28-day chronic restraint protocol [88] as well as an acute 1-hour protocol [80]. IL-17 levels were also altered in patients with depression [89] and animals after using models of depression [90]. We obtained satisfactory results from all our treatments in reversing IFN- γ , IL-17 and IL-2 levels and also IH+FLX treatment reverting elevated levels of IL-6 after ARS. In addition, all treatments reduced TNF- α levels. Given that inflammation is closely related to depression [12,91], our results are relevant. To our knowledge, this is the first time that results have been presented on the use of IH, associated or not with fluoxetine, reducing the levels of inflammatory cytokines.

Considering that one of the main problems associated with commercially available classical antidepressants is their low remission rates related to side effects [28], the results seen with treatment of only 1 hour of IH and its association with fluoxetine are quite promising.

5 CONCLUSION

In conclusion, our data reveal that the acute restraint model was able to induce anxiety-like behavior in C57BL/6 female mice. We described at the first time that treatment of 1 hour of intermittent hypoxia and its association with fluoxetine were not able to attenuate anxiety behavior but reverse inflammatory processes induced by acute stress, showing that this alternative method may be a promising candidate for MDD and anxiety disorders treatment or even an adjuvant to already in use treatments. Studies with new protocols are needed to increase the strength of this hypothesis.

Statement of ethics

This study was approved by our Institutional Animal Care and Use Committee.

Author contributions

Eliane Maria Zanchet: Conceptualization, Formal Analysis, Writing - Original Draft, Supervision, Project Administration.

Evelyne da Silva Brum: Methodology, Investigation.

Francini Arboit: Conceptualization, Methodology, Formal Analysis, Investigation, Data Curation, Writing - Original Draft.

Gabriela Becker: Methodology, Investigation.

Gabriele Cheiran Pereira: Methodology, Investigation

Guilherme Vargas Bochi: Conceptualization, Formal Analysis, Resources, Writing - Original Draft, Supervision.

Luiz Osório Cruz Portela: Formal Analysis, Resources

Maria Fernanda Pessano Fialho: Methodology, Investigation.

Micheli Mainardi Pillat: Methodology, Formal Analysis.

Declaration of Interest:

None.

Funding sources

This work was supported by scholarships from Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES/Brazil) and National Council for Scientific and Technological Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico - CNPq/Brazil).

REFERENCES

- [1] World Health Organization. Depression. WORLD HEALTH ORGANIZATION 2019. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression> (accessed April 7, 2022).
- [2] Santomauro DF, Mantilla Herrera AM, Shadid J, Zheng P, Ashbaugh C, Pigott DM, et al. Global prevalence and burden of depressive and anxiety disorders in 204 countries and territories in 2020 due to the COVID-19 pandemic. *The Lancet* 2021;398:1700–12. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02143-7/ATTACHMENT/927FDFEF-CCD4-4655-AACF-4E7D54DFEFCF5/MMC1.PDF](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02143-7/ATTACHMENT/927FDFEF-CCD4-4655-AACF-4E7D54DFEFCF5/MMC1.PDF).
- [3] Murray CJL, Lopez AD. Evidence-based health policy--lessons from the Global Burden of Disease Study. *Science* 1996;274:740–3. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.274.5288.740>.
- [4] Alenko A, Markos Y, Fikru C, Tadesse E, Gedefaw L. Association of serum cortisol level with severity of depression and improvement in newly diagnosed patients with major depressive disorder in Jimma medical center, Southwest Ethiopia. *PLoS One* 2020;15. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0240668>.
- [5] Chiu LYL, Stewart K, Woo C, Yatham LN, Lam RW. The relationship between burnout and depressive symptoms in patients with depressive disorders. *J Affect Disord* 2015;172:361–6. <https://doi.org/10.1016/J.JAD.2014.10.029>.
- [6] Krishnan V, Nestler EJ. The molecular neurobiology of depression. *Nature* 2008 455:7215 2008;455:894–902. <https://doi.org/10.1038/nature07455>.
- [7] Ströhle A, Gensichen J, Domschke K. The Diagnosis and Treatment of Anxiety Disorders. *Dtsch Arztebl Int* 2018;611–20. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2018.0611>.
- [8] Daviu N, Bruchas MR, Moghaddam B, Sandi C, Beyeler A. Neurobiological links between stress and anxiety. *Neurobiology of Stress* 2019;11:100191. <https://doi.org/10.1016/J.YNSTR.2019.100191>.
- [9] American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders : DSM-5. 2013.
- [10] Villas Boas GR, Boerngen de Lacerda R, Paes MM, Gubert P, Almeida WL da C, Rescia VC, et al. Molecular aspects of depression: A review from neurobiology to treatment. *Eur J Pharmacol* 2019;851:99–121. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2019.02.024>.
- [11] Palazidou E. The neurobiology of depression. *Br Med Bull* 2012;101:127–45. <https://doi.org/10.1093/BMB/LDS004>.
- [12] Bruno A, Dolcetti E, Rizzo FR, Fresegna D, Musella A, Gentile A, et al. Inflammation-Associated Synaptic Alterations as Shared Threads in Depression and Multiple Sclerosis. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 2020;14. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2020.00169>.
- [13] Chopra K, Kumar B, Kuhad A. Pathobiological targets of depression. *Expert Opin Ther Targets* 2011;15:379–400. <https://doi.org/10.1517/14728222.2011.553603>.
- [14] Gomes FIF, Aragão MGB, Bezerra MM, Chaves HV. GABAergic transmission and modulation of anxiety: A review on molecular aspects. *Brazilian Journal of Biological Sciences* 2019;6:9–16. <https://doi.org/10.21472/bjbs.061202>.
- [15] Calabrese F, Molteni R, Riva MA. Antistress properties of antidepressant drugs and their clinical implications. *Pharmacol Ther* 2011;132:39–56. <https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2011.05.007>.
- [16] Gold PW. The neurobiology of stress and its relevance to psychotherapy. *Clinical Neuroscience Research* 2005;4:315–24. <https://doi.org/10.1016/J.CNR.2005.03.006>.

- [17] Otte C, Gold SM, Penninx BW, Pariante CM, Etkin A, Fava M, et al. Major depressive disorder. *Nature Reviews Disease Primers* 2016 2:1 2016;2:1–20. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.65>.
- [18] Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM. Neurobiology of depression. *Neuron* 2002;34:13–25. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00653-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00653-0).
- [19] Thakare VN, Dhakane VD, Patel BM. Attenuation of acute restraint stress-induced depressive like behavior and hippocampal alterations with protocatechuic acid treatment in mice. *Metab Brain Dis* 2017;32:401–13. <https://doi.org/10.1007/S11011-016-9922-Y>.
- [20] Capra JC, Cunha MP, Machado DG, Zomkowski ADE, Mendes BG, Santos ARS, et al. Antidepressant-like effect of scopoletin, a coumarin isolated from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in mice: evidence for the involvement of monoaminergic systems. *Eur J Pharmacol* 2010;643:232–8. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2010.06.043>.
- [21] de Balk RS, Bridi JC, de Portella RL, Carvalho NR, Dobrachinski F, da Silva MH, Amaral GP, Dias GR, de Barbosa NV SF. Clomipramine Treatment and Repeated Restraint Stress Alter Parameters of Oxidative Stress in Brain Regions of Male Rats. *Neurochem Res* 2010;1761–1770. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11064-010-0240-1>.
- [22] Kumar A, Goyal R. Quercetin Protects Against Acute Immobilization Stress-Induced Behaviors and Biochemical Alterations in Mice. *J Med Food* 2008;11:469–73. <https://doi.org/10.1089/jmf.2006.0207>.
- [23] Freitas AE, Bettio LEB, Neis VB, Santos DB, Ribeiro CM, Rosa PB, et al. Agmatine abolishes restraint stress-induced depressive-like behavior and hippocampal antioxidant imbalance in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2014;50:143–50. <https://doi.org/10.1016/J.PNPBP.2013.12.012>.
- [24] Zafir A, Banu N. Antioxidant potential of fluoxetine in comparison to *Curcuma longa* in restraint-stressed rats. *Eur J Pharmacol* 2007;572:23–31. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2007.05.062>.
- [25] Trabace L, Savegnago L, Domingues M, Casaril AM, Birmann PT, de Lourenço DA, et al. Selanylimidazopyridine Prevents Lipopolysaccharide-Induced Depressive-Like Behavior in Mice by Targeting Neurotrophins and Inflammatory/Oxidative Mediators. *Front Neurosci* 2018;12. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00486>.
- [26] Liu P, Zhu L, Zhou L, Bai X. e5NT inhibitor protects acute restraint stress-induced depression by regulating nucleoside release in mice. *J Pharm Pharmacol* 2020;72:1556–63. <https://doi.org/10.1111/JPHP.13341>.
- [27] Siddiqui, F., Barbateskovic, M., Juul S et al. Duloxetine versus “active” placebo, placebo or no intervention for major depressive disorder; a protocol for a systematic review of randomised clinical trials with meta-analysis and trial sequential analysis. *Syst Rev* 2021;10. <https://doi.org/10.1186/S13643-021-01722-5>.
- [28] Adzic M, Brkic Z, Mitic M, Francija E, Jovicic MJ, Radulovic J, et al. Therapeutic Strategies for Treatment of Inflammation-related Depression. *Current Neuropharmacology* 2018;16:176. <https://doi.org/10.2174/1570159X15666170828163048>.

- [29] Nemeroff CB, Owens MJ. Treatment of mood disorders. *Nat Neurosci* 2002;5 Suppl:1068–70. <https://doi.org/10.1038/NN943>.
- [30] Rybnikova E, Mironova V, Pivina S, Tulkova E, Ordyan N, Nalivaeva N, et al. Involvement of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the antidepressant-like effects of mild hypoxic preconditioning in rats 2007:813–23. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2007.05.010>.
- [31] Kushwah N, Jain V, Deep S, Prasad D, Singh SB. Neuroprotective Role of Intermittent Hypobaric Hypoxia in Unpredictable Chronic Mild Stress Induced Depression in Rats 2016:1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149309>.
- [32] Navarrete-Opazo A, Mitchell GS. Therapeutic potential of intermittent hypoxia: a matter of dose. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2014;307:R1181–97. <https://doi.org/10.1152/AJPREGU.00208.2014>.
- [33] Serebrovskaya T v., Manukhina EB, Smith ML, Downey HF, Mallet RT. Intermittent hypoxia: cause of or therapy for systemic hypertension? *Exp Biol Med (Maywood)* 2008;233:627–50. <https://doi.org/10.3181/0710-MR-267>.
- [34] Jung ME, Simpkins JW, Wilson AM, Downey HF, Mallet RT. Intermittent hypoxia conditioning prevents behavioral deficit and brain oxidative stress in ethanol-withdrawn rats. *Journal of Applied Physiology* 2008;105:510–7. <https://doi.org/10.1152/JAPPLPHYSIOL.90317.2008/ASSET/IMAGES/LARGE/ZDG0080880540009.JPEG>.
- [35] Zhu XH, Yan HC, Zhang J, Qu H da, Qiu XS, Chen L, et al. Intermittent hypoxia promotes hippocampal neurogenesis and produces antidepressant-like effects in adult rats. *J Neurosci* 2010;30:12653–63. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6414-09.2010>.
- [36] Ryou MG, Mallet RT, Metzger DB, Jung ME. Intermittent hypoxia training blunts cerebrocortical presenilin 1 overexpression and amyloid- β accumulation in ethanol-withdrawn rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2017;313:R10–8. <https://doi.org/10.1152/AJPREGU.00050.2017>.
- [37] Rybnikova EA, Samoilov MO, Mironova VI, Tyul'kova EI, Pivina SG, Vataeva LA, et al. The possible use of hypoxic preconditioning for the prophylaxis of post-stress depressive episodes. *Neurosci Behav Physiol* 2008;38:721–6. <https://doi.org/10.1007/S11055-008-9038-X>.
- [38] Manukhina EB, Downey HF, Shi X, Mallet RT. Intermittent hypoxia training protects cerebrovascular function in Alzheimer's disease: <https://doi.org/10.1177/1535370216649060> 2016;241:1351–63. <https://doi.org/10.1177/1535370216649060>.
- [39] Kang I, Kondo D, Kim J, Lyoo IK, Yurgelun-Todd D, Hwang J, et al. Elevating the level of hypoxia inducible factor may be a new potential target for the treatment of depression. *Medical Hypotheses* 2021;146:n. pag. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.110398>.
- [40] Ding FS, Cheng X, Zhao T, Zhao YQ, Zhang GB, Wu HT, et al. [Intermittent hypoxic preconditioning relieves fear and anxiety behavior in post-traumatic stress model mice]. *Sheng Li Xue Bao : [Acta Physiologica Sinica]* 2019;71:537–46.

- [41] Manukhina EB, Tseilikman VE, Karpenko MN, Pestereva NS, Tseilikman OB, Komelkova M v., et al. Intermittent Hypoxic Conditioning Alleviates Post-Traumatic Stress Disorder-Induced Damage and Dysfunction of Rat Visceral Organs and Brain. *International Journal of Molecular Sciences* 2020, Vol 21, Page 345 2020;21:345. <https://doi.org/10.3390/IJMS21010345>.
- [42] Rybnikova EA, Samoïlov MO, Mironova VI, Tiul'kova EI, Pivina SG, Vateeva LA, Ordian NE, Abritalin Elu KAI. The feasible applications of hypoxic preconditioning for prevention of post-stress depressive episodes. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova* 2007;107:43–8.
- [43] Shingo T, Todd Sorokan S, Shimazaki T, Weiss S. Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells. *J Neurosci* 2001;21:9733–43. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-24-09733.2001>.
- [44] Zhu LL, Zhao T, Li HS, Zhao H, Wu LY, Ding AS, et al. Neurogenesis in the adult rat brain after intermittent hypoxia. *Brain Research* 2005;1055:1–6. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2005.04.075>.
- [45] Neis VB, Bettio LB, Moretti M, Rosa PB, Olescowicz G, Fraga DB, et al. Single administration of agmatine reverses the depressive-like behavior induced by corticosterone in mice: Comparison with ketamine and fluoxetine. *Pharmacol Biochem Behav* 2018;173:44–50. <https://doi.org/10.1016/J.PBB.2018.08.005>.
- [46] Jiang CY, Qin XY, Yuan MM, Lu GJ, Cheng Y. 2,3,5,4'-Tetrahydroxystilbene-2-O-beta-D-glucoside Reverses Stress-Induced Depression via Inflammatory and Oxidative Stress Pathways. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2018;2018. <https://doi.org/10.1155/2018/9501427>.
- [47] Simões RR, Dutra AL, Finamor IA, Saccol EMH, Pavanato MA, Llesuy SF, et al. THE EFFECT OF INTERMITTENT HYPOXIC TRAINING UNDER OXIDATIVE STRESS PARAMETERS IN WISTAR RATS FED ON STANDARD AND HIGH FAT DIET. *Caderno de Pesquisa* 2013;25:12–23. <https://doi.org/10.17058/CP.V25I2.4101>.
- [48] MacDowell KS, Caso JR, Martín-Hernández D, Madrigal JL, Leza JC, García-Bueno B. Paliperidone Prevents Brain Toll-Like Receptor 4 Pathway Activation and Neuroinflammation in Rat Models of Acute and Chronic Restraint Stress. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 2015;18:1–11. <https://doi.org/10.1093/IJNP/PYU070>.
- [49] Gregus A, Wintink AJ, Davis AC, Kalynchuk LE. Effect of repeated corticosterone injections and restraint stress on anxiety and depression-like behavior in male rats. *Behavioural Brain Research* 2005;156:105–14. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2004.05.013>.
- [50] Chotiawat C, Harris RBS. Increased anxiety-like behavior during the post-stress period in mice exposed to repeated restraint stress. *Horm Behav* 2006;50:489–95. <https://doi.org/10.1016/J.YHBEH.2006.06.007>.
- [51] Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol* 2003;463:3–33. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)01272-X](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01272-X).

- [52] Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M. Behavioural despair in rats: A new model sensitive to antidepressant treatments. *European Journal of Pharmacology* 1978;47:379–91. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(78\)90118-8](https://doi.org/10.1016/0014-2999(78)90118-8).
- [53] Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 1985;85:367–70. <https://doi.org/10.1007/BF00428203>.
- [54] Anseloni VZ, Brandão ML. Ethopharmacological analysis of behaviour of rats using variations of the elevated plus-maze. *Behavioural Pharmacology* 1997;8:533–40. <https://doi.org/10.1097/00008877-199711000-00011>.
- [55] Contreras CM, Rodríguez-Landa JF, García-Ríos RI, Cueto-Escobedo J, Guillen-Ruiz G, Bernal-Morales B. Myristic Acid Produces Anxiolytic-Like Effects in Wistar Rats in the Elevated Plus Maze. *BioMed Research International* 2014;2014. <https://doi.org/10.1155/2014/492141>.
- [56] Brum E da S, Fialho MFP, Fischer SPM, Hartmann DD, Gonçalves DF, Scussel R, et al. Relevance of Mitochondrial Dysfunction in the Reserpine-Induced Experimental Fibromyalgia Model. *Mol Neurobiol* 2020;57:4202–17. <https://doi.org/10.1007/S12035-020-01996-1>.
- [57] Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 1971;44:276–87. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90370-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8).
- [58] Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984;105:121–6. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3).
- [59] Misztak P, Sowa-Kućma M, Pańczyszyn-Trzewik P, Szewczyk B, Nowak G. Antidepressant-like Effects of Combined Fluoxetine and Zinc Treatment in Mice Exposed to Chronic Restraint Stress Are Related to Modulation of Histone Deacetylase. *Molecules* 2022, Vol 27, Page 22 2021;27:22. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27010022>.
- [60] Shanks N, Griffiths J, Anisman H. Norepinephrine and serotonin alterations following chronic stressor exposure: Mouse strain differences. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 1994;49:57–65. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(94\)90456-1](https://doi.org/10.1016/0091-3057(94)90456-1).
- [61] Razzoli M, Carboni L, Andreoli M, Ballottari A, Arban R. Different susceptibility to social defeat stress of BalbC and C57BL6/J mice. *Behavioural Brain Research* 2011;216:100–8. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.07.014>.
- [62] John NC, Collins A, Crabbe JC, Frankel W, Henderson N, Hitzemann RJ, et al. Behavioral phenotypes of inbred mouse strains: implications and recommendations for molecular studies. *Psychopharmacology (Berl)* 1997;132:107–24.
- [63] Cryan JF, Mombereau C. In search of a depressed mouse: Utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice. *Molecular Psychiatry* 2004;9:326–57. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001457>.
- [64] Molendijk ML, de Kloet ER. Immobility in the forced swim test is adaptive and does not reflect depression. *Psychoneuroendocrinology* 2015;62:389–91. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.08.028>.

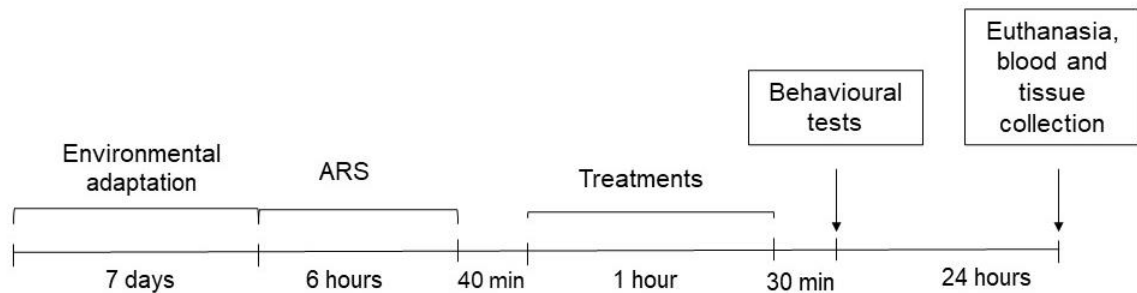
- [65] Zhou J-N. Biological Factors Influencing the Mice Forced Swim Test. *Journal of Neurology and Neuromedicine* 2016;1:21–4. <https://doi.org/10.29245/2572.942x/2016/4.1033>.
- [66] Stevanovic D, Zalsman G. Changes in cognitive distortions and affectivity levels in adolescent depression after acute phase fluoxetine treatment. *Cogn Neuropsychiatry* 2019;24:4–13. <https://doi.org/10.1080/13546805.2018.1532284>.
- [67] Gonzalez-Rothi EJ, Lee KZ, Dale EA, Reier PJ, Mitchell GS, Fuller DD. Intermittent hypoxia and neurorehabilitation. *Journal of Applied Physiology* 2015;119:1455–65. <https://doi.org/10.1152/JAPPLPHYSIOL.00235.2015/ASSET/IMAGES/LARGE/ZDG9991514920004.JPEG>.
- [68] Baker-Herman TL, Fuller DD, Bavis RW, Zabka AG, Golder FJ, Doperalski NJ, et al. BDNF is necessary and sufficient for spinal respiratory plasticity following intermittent hypoxia. *Nat Neurosci* 2004;7:48–55. <https://doi.org/10.1038/NN1166>.
- [69] Duszczek M, Gamdzyk M, Ziembowicz A, Boguszewski PM. Antidepressant-like and anxiolytic-like effects of mild hypobaric hypoxia in mice: possible involvement of neuropeptide Y 2015:364–71.
- [70] Rybnikova E, Mironova V, Pivina S, Tulkova E, Ordyan N, Vataeva L, et al. Antidepressant-like effects of mild hypoxia preconditioning in the learned helplessness model in rats 2007;417:234–9. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2007.02.048>.
- [71] Tan S, Wang Y, Chen K, Long Z, Zou J. Ketamine Alleviates Depressive-Like Behaviors via Down-Regulating Inflammatory Cytokines Induced by Chronic Restraint Stress in Mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2017;40:1260–7. <https://doi.org/10.1248/BPB.B17-00131>.
- [72] Majidi J, Kosari-Nasab M, Salari AA. Developmental minocycline treatment reverses the effects of neonatal immune activation on anxiety- and depression-like behaviors, hippocampal inflammation, and HPA axis activity in adult mice. *Brain Res Bull* 2016;120:1–13. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESBULL.2015.10.009>.
- [73] Gold PW, Machado-Vieira R, Pavlatou MG. Clinical and biochemical manifestations of depression: Relation to the neurobiology of stress. *Neural Plasticity* 2015;2015. <https://doi.org/10.1155/2015/581976>.
- [74] Belleau EL, Treadway MT, Pizzagalli DA. The Impact of Stress and Major Depressive Disorder on Hippocampal and Medial Prefrontal Cortex Morphology. *Biol Psychiatry* 2019;85:443–53. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPSYCH.2018.09.031>.
- [75] Bouayed J, Rammal H, Soulimani R. Oxidative stress and anxiety: relationship and cellular pathways. *Oxid Med Cell Longev* 2009;2. <https://doi.org/10.4161/OXIM.2.2.7944>.
- [76] Biswas SK. Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016;2016. <https://doi.org/10.1155/2016/5698931>.
- [77] Halliwell B. Reactive Species and Antioxidants. *Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. Plant Physiology* 2006;141:312–22. <https://doi.org/10.1104/PP.106.077073>.

- [78] Anisman H, Matheson K. Stress, depression, and anhedonia: Caveats concerning animal models. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2005;29:525–46. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.03.007>.
- [79] Capuron L, Ravaut A, Gualde N, Bosmans E, Dantzer R, Maes M, et al. Association between immune activation and early depressive symptoms in cancer patients treated with interleukin-2-based therapy. *Psychoneuroendocrinology* 2001;26:797–808. [https://doi.org/10.1016/S0306-4530\(01\)00030-0](https://doi.org/10.1016/S0306-4530(01)00030-0).
- [80] Valentine AD, Meyers CA. Successful Treatment of Interferon- α -Induced Mood Disorder With Nortriptyline. *Psychosomatics* 1995;36:418–9. [https://doi.org/10.1016/S0033-3182\(95\)71658-9](https://doi.org/10.1016/S0033-3182(95)71658-9).
- [81] Nery FG, Monkul ES, Hatch JP, Fonseca M, Zunta-Soares GB, Frey BN, et al. Celecoxib as an adjunct in the treatment of depressive or mixed episodes of bipolar disorder: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Hum Psychopharmacol* 2008;23:87–94. <https://doi.org/10.1002/HUP.912>.
- [82] Müller N, Schwarz MJ, Dehning S, Douhe A, Cerovecki A, Goldstein-Müller B, et al. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib has therapeutic effects in major depression: results of a double-blind, randomized, placebo controlled, add-on pilot study to reboxetine. *Mol Psychiatry* 2006;11:680–4. <https://doi.org/10.1038/SJ.MP.4001805>.
- [83] Bai S, Guo W, Feng Y, Deng H, Li G, Nie H, et al. Efficacy and safety of anti-inflammatory agents for the treatment of major depressive disorder: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 2020;91:21–32. <https://doi.org/10.1136/JNNP-2019-320912>.
- [84] Anisman H, Ravindran A v., Griffiths J, Merali Z. Endocrine and cytokine correlates of major depression and dysthymia with typical or atypical features. *Mol Psychiatry* 1999;4:182–8. <https://doi.org/10.1038/SJ.MP.4000436>.
- [85] Robles TF, Glaser R, Kiecolt-Glaser JK. Out of Balance: A New Look at Chronic Stress, Depression, and Immunity. <https://doi.org/10.1111/j.0963-7214.2005.00345.x> 2016;14:111–5. <https://doi.org/10.1111/J.0963-7214.2005.00345.X>.
- [86] Maydych V. The interplay between stress, inflammation, and emotional attention: Relevance for depression. *Frontiers in Neuroscience* 2019;13:384. <https://doi.org/10.3389/FNINS.2019.00384/BIBTEX>.
- [87] Chen HJC, Spiers JG, Sernia C, Lavidis NA. Acute restraint stress induces specific changes in nitric oxide production and inflammatory markers in the rat hippocampus and striatum. *Free Radical Biology and Medicine* 2016;90:219–29. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2015.11.023>.
- [88] Voorhees JL, Tarr AJ, Wohleb ES, Godbout JP, Mo X, Sheridan JF, et al. Prolonged Restraint Stress Increases IL-6, Reduces IL-10, and Causes Persistent Depressive-Like Behavior That Is Reversed by Recombinant IL-10. *PLoS ONE* 2013;8. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0058488>.
- [89] Davami MH, Baharlou R, Vasmehjani AA, Ghanizadeh A, Keshtkar M, Dezhkam I, et al. Elevated IL-17 and TGF- β Serum Levels: A Positive Correlation between T-helper 17 Cell-Related Pro-Inflammatory Responses with Major Depressive Disorder. *Basic Clin Neurosci* 2016;7:137–42. <https://doi.org/10.15412/J.BCN.03070207>.

- [90] Beurel E, Harrington LE, Jope RS. Inflammatory T helper 17 cells promote depression-like behavior in mice. *Biol Psychiatry* 2013;73:622–30. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPSYCH.2012.09.021>.
- [91] Roohi, E., Jaafari, N. & Hashemian F. On inflammatory hypothesis of depression: what is the role of IL-6 in the middle of the chaos? *J Neuroinflammation* 2021;18. <https://doi.org/10.1186/S12974-021-02100-7>.

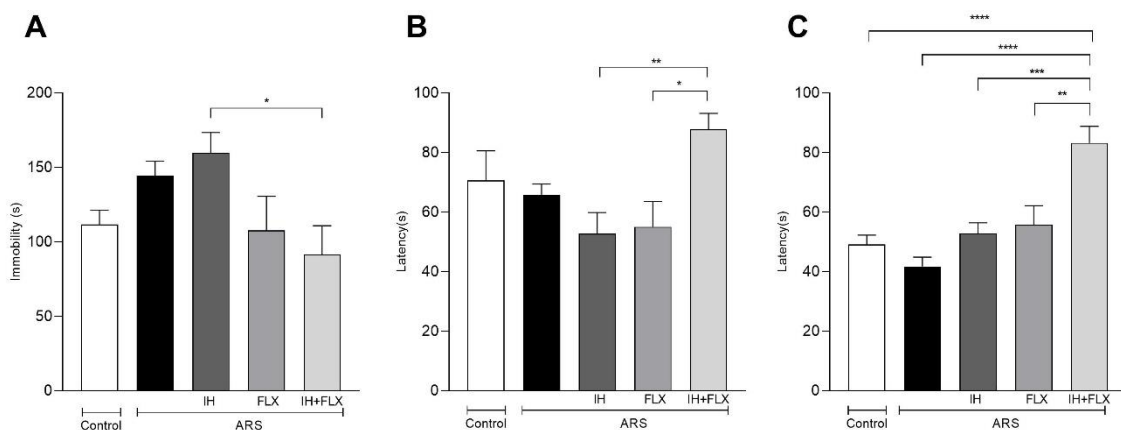
FIGURES

Fig. 1 – Schematic overview of the experimental design



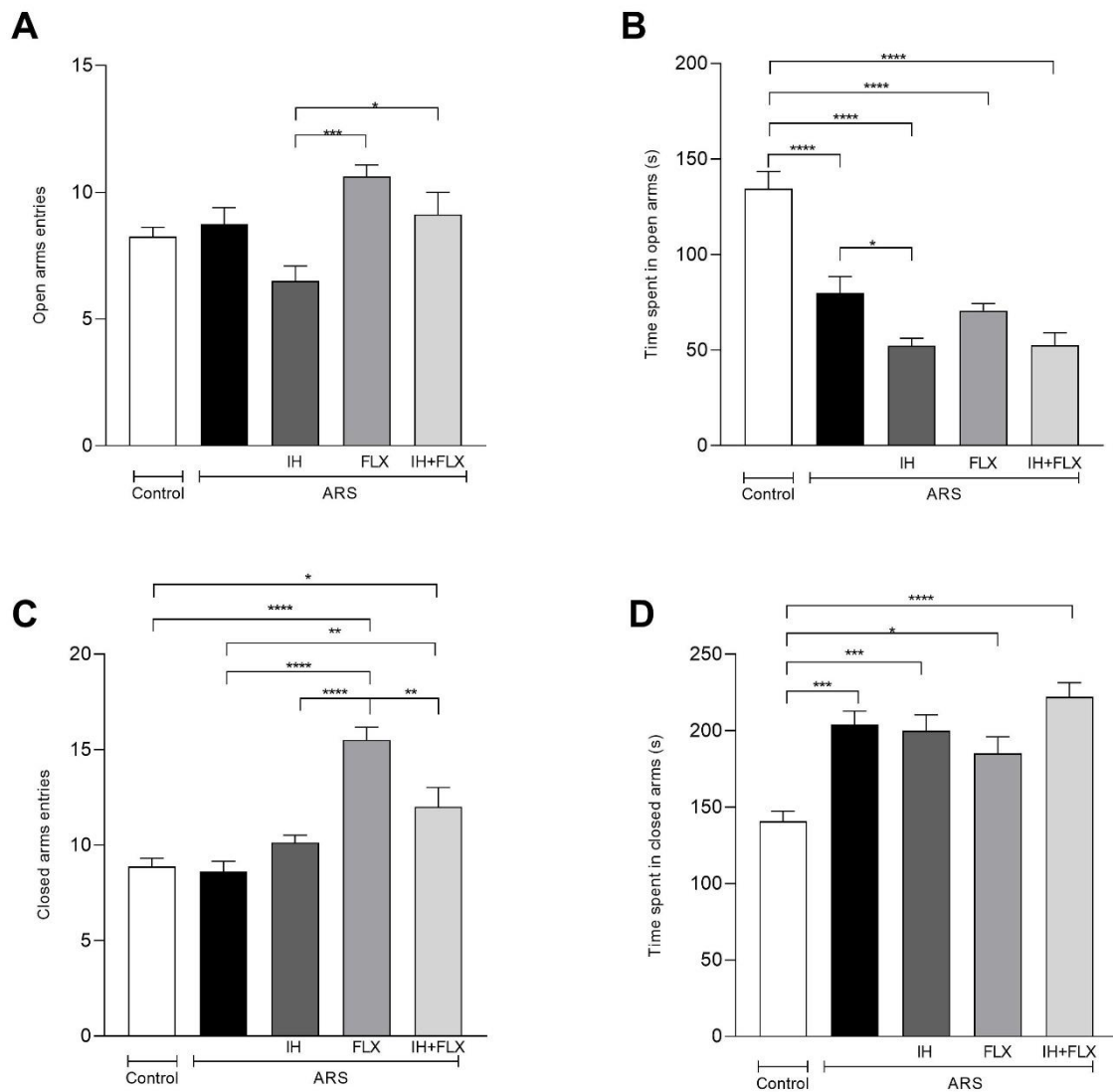
Abbreviations: ARS: acute restrain stress (6 hours); treatments: IH session (13% O₂, 1 hour), fluoxetine (10mg/kg, p.o.), or a combination of both treatments; behavioral tests: open field test, elevated plus maze test, tail suspension test, and forced swimming test. The animals received treatments 40 minutes after the ARS procedure and were submitted to behavioral tests 30 minutes after the treatments. Euthanasia occurs in the next day, in which blood and tissue (prefrontal cortex and hippocampus) were collected.

Fig. 2. Effects of ARS and treatments on forced swim and tail suspension tests



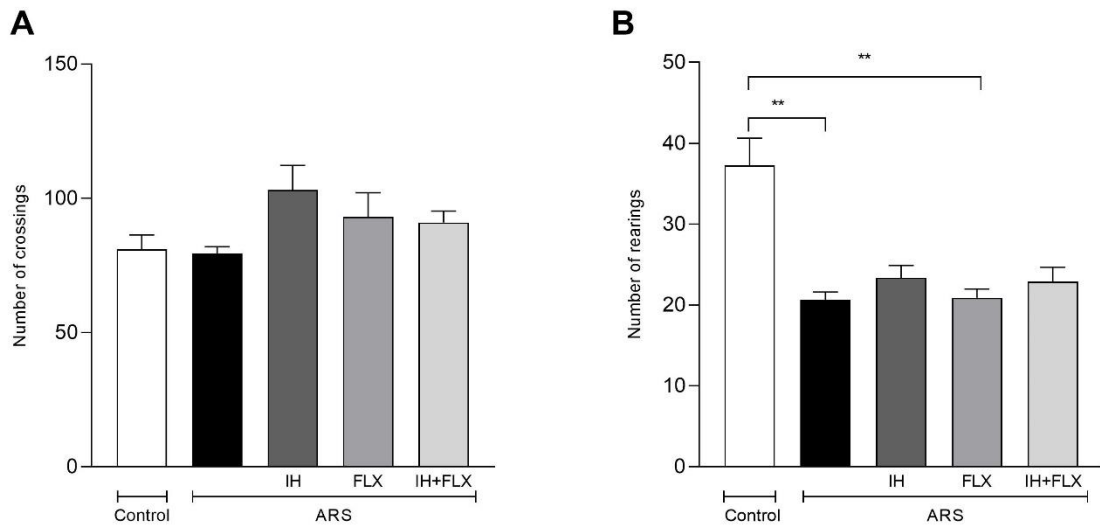
A) and B) Forced swimming test. C) Tail suspension test. The differences between groups are shown with the asterisk symbol above the indicative bar. The data was obtained using a one-way ANOVA test, followed by Tukey's or Dunn's post hoc tests, when appropriate. Values are expressed as the mean \pm SEM (n= 8 mice/group). Significant differences: *p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001; **** p <0.0001. ARS: acute restraint stress (6 hours); control: saline (10 mL/kg, p.o.); IH: hypoxia intermittent session (13% O₂, 1 hour); FLX: fluoxetine (10 mg/kg, p.o.), IH+FLX: hypoxia intermittent session + fluoxetine.

Fig. 3 – Effects of ARS and treatments on elevated plus-maze test.



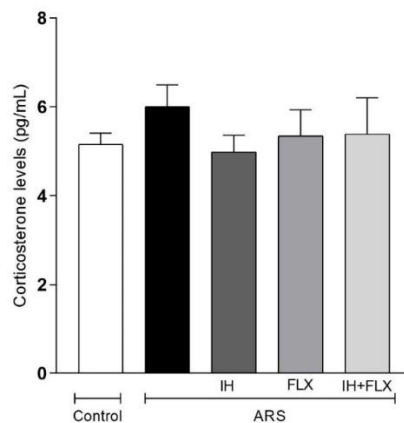
A) number of open arms entries; B) time spent in the open arms, in seconds; C) number of closed arms entries; D) time spent in the closed arms, in seconds. The differences between groups are shown with the asterisk symbol above the indicative bar. The data was obtained using a one-way ANOVA test, followed by Tukey's post hoc test. Values are expressed as the mean \pm SEM ($n=8$ mice/group). Significant differences: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. ARS: acute restrain stress (6 hours); control: saline (10 mL/kg, p.o.); IH: hypoxia intermittent session (13% O₂, 1 hour); FLX: fluoxetine (10 mg/kg, p.o.), IH+FLX: hypoxia intermittent session + fluoxetine.

Fig. 4 – Effects of ARS and treatments on the open field test.



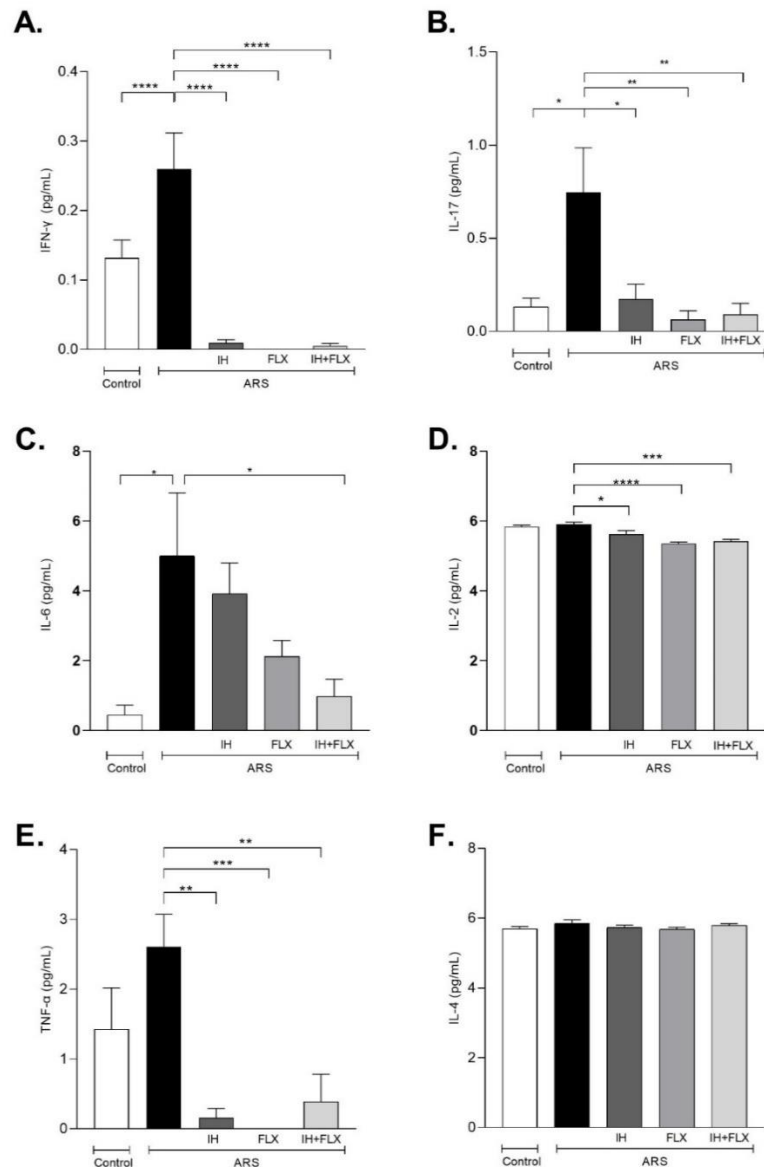
A) number of crossings; B) number of rearings. The differences between groups are shown with the asterisk symbol above the indicative bar. The data was obtained using one-way ANOVA test, followed by Tukey's or Dunn's post hoc tests, when appropriate. Values are expressed as the mean \pm SEM (n= 8 mice/group). Significant differences: ** p < 0.01. ARS: acute restrain stress (6 hours); control: saline (10 mL/kg, p.o.); IH: hypoxia intermittent session (13% O₂, 1 hour); FLX: fluoxetine (10 mg/kg, p.o.), IH+FLX: hypoxia intermittent session + fluoxetine.

Fig. 5. Effects of ARS and treatments on serum corticosterone levels (pg/mL).



The data was obtained using a one-way ANOVA test. Values are expressed as the mean \pm SEM in a logarithmic form to normalize data (n= 8 mice/group). ARS: acute restrain stress (6 hours); control: saline (10 mL/kg, p.o.); IH: hypoxia intermittent session (13% O₂, 1 hour); FLX: fluoxetine (10 mg/kg, p.o.), IH+FLX: hypoxia intermittent session + fluoxetine.

Fig. 6 – Effects of ARS and treatments on serum cytokines levels



IFN- γ (pg/mL); B) IL-2 (pg/mL); C) IL-4 (pg/mL); D) IL-6 (pg/mL); E) IL-17 (pg/mL); F) TNF- α (pg/mL). The differences between groups are shown with the asterisk symbol above the indicative bar. The data was obtained using one-way ANOVA test, followed by Tukey's or Dunn's post hoc tests, when appropriate. Values are expressed as the mean \pm SEM (n= 5-6/group). Significant differences: Significant differences: *p <0.05, ** p <0.01, ***, p <0.001; **** p <0.0001. ARS: acute restrain stress (6 hours); control: saline (10 mL/kg, p.o.); IH: hypoxia intermittent session (13% O₂, 1 hour); FLX: fluoxetine (10 mg/kg, p.o.), IH+FLX: hypoxia intermittent session + fluoxetine.

Table 1
ARS-induced behavioral changes

Parameters	Control	ARS	P-value
FST (I)	111.60 ± 9.74	144.30 ± 9.89	0.0340
TST (L)	49.13 ± 3.15	39.29 ± 2.24	0.0281
EPMT (TOA)	134.50 ± 9.03	79.88 ± 8.57	0.0006
EPMT (TCA)	140.80 ± 6.57	204.00 ± 8.78	<0.0001
AI	0.53 ± 0.01	0.61 ± 0.01	0.0016
OFT (TC)	4.25 ± 0.92	4.00 ± 1.05	0.8607
OFT (C)	81.00 ± 5.32	79.50 ± 2.41	0.8013
OFT (R)	37.25 ± 3.38	20.63 ± 0.99	0.0002
CL	5.15 ± 0.25	6.46 ± 0.21	0.0131

Note: values are expressed as mean ± SEM.

Abbreviations: ARS: acute restraint stress; FST: forced swim test; (I): immobility; TST: tail suspension test; (L): latency; EPMT: elevated plus-maze test; TOA: time spent in open arms; TCA: time spent in closed arms; AI: anxiety index; OFT: open field test; TC: time in the central area; C: number of crossings; R: number of rearings; CL: Corticosterone levels.

Table 2
SOD, CAT and H₂O₂ levels in hippocampal and PFC tissues after ARS and treatments

Groups	SOD (UI SOD/ mg protein)		CAT (µmol CAT/min/mg protein)		H ₂ O ₂ (µM H ₂ O ₂ /g tissue)	
	Hippocampus	PFC	Hippocampus	PFC	Hippocampus	PFC
Control	36.6 ± 3.6	23.4 ± 2.4	1.6 ± 0.5	1.6 ± 0.4	1365.0 ± 342.1	780.7 ± 107.2
ARS	26.6 ± 5.3	23.8 ± 3.3	5.4 ± 0.3	2.0 ± 1.2	1008.0 ± 243.0	867.6 ± 161.4
ARS + IH	33.0 ± 5.3	30.5 ± 2.3	1.3 ± 0.5	3.3 ± 1.4	576.5 ± 181.0	815.7 ± 223.0
ARS + F	19.0 ± 4.0	31.1 ± 0.5	15.3 ± 7.1 ^a	1.5 ± 0.3	498.4 ± 118.9	893.0 ± 167.2
ARS + IH + F	32.6 ± 6.0	27.5 ± 2.1	2.7 ± 1.3	2.3 ± 0.3	401.2 ± 68.0 ^b	735.1 ± 112.7

Note: values are expressed as mean ± SEM (n=3-6): differences were not significant, except in:

^a p = 0.038 compared with ARS + IH group;

^b p = 0.032 compared with control group;

Abbreviations: SOD: superoxide dismutase; CAT: catalase; H₂O₂: hydrogen peroxide; CPF: prefrontal cortex; ARS: acute restraint stress; IH: intermittent hypoxia; F: fluoxetine.

5 CONCLUSÕES

- O modelo de estresse por contenção agudo foi capaz de induzir comportamento do tipo ansioso, mas não depressivo, conforme demonstrado pelos testes comportamentais.
- Uma hora de HI apresentou propriedades anti-inflamatórias;
- A HI constitui uma boa candidata para o tratamento dos transtornos de ansiedade e depressão e como coadjuvante à tratamentos antidepressivos já existentes.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, A. COVID's mental-health toll: how scientists are tracking a surge in depression. **Nature**, v. 590, n. 7845, p. 194-195, 2021. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/d41586-021-00175-z>>. Acesso em: 29 set. 2021.
- ADZIC, M. et al. Therapeutic strategies for treatment of inflammation-related depression. **Current neuropharmacology**, v. 16, n. 2, p. 176-209, 2018. Disponível em: <<https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cn/2018/00000016/00000002/art00008>>. Acesso em: 20 ago. 2021.
- ALENKO, A. et al. Association of serum cortisol level with severity of depression and improvement in newly diagnosed patients with major depressive disorder in Jimma medical center, Southwest Ethiopia. **Plos one**, v. 15, n. 10, p. e0240668, 2020. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33064754/>
- AL-HARBI, K. S. Treatment-resistant depression: therapeutic trends, challenges, and future directions. **Patient preference and adherence**, v. 6, p. 369, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3363299/>>. Acesso em: 20 ago. 2021.
- AMERICAN PSYCHOLOGICAL ASSOCIATION. **Clinical Practice Guideline for the Treatment of Depression Across Three Age Cohort**. APA, 2019. 213p. Disponível em: <<https://www.apa.org/depression-guideline>>. Acesso em: 19 ago. 2021.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **DSM-5: Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais**. Artmed Editora, 2014. 992p. Disponível em: <<http://www.niip.com.br/wp-content/uploads/2018/06/Manual-Diagnostico-e-Estatistico-de-Transtornos-Mentais-DSM-5-1-pdf.pdf>>. Acesso em: 17 ago. 2021.
- ANDERSON, G.; MAES, M.; BERK, M. Inflammation-related disorders in the tryptophan catabolite pathway in depression and somatization. **Advances in protein chemistry and structural biology**, v. 88, p. 27–48, jan. 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780123983145000027>
- ARANCIO, O.; CHAO, M. V. Neurotrophins, synaptic plasticity and dementia. **Current opinion in neurobiology**, v. 17, n. 3, p. 325-330, 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17419049/>>. Acesso em 23 ago. 2021.
- AROS, M. S.; YOSHIDA, E. M. P. Estudos da depressão: instrumentos de avaliação e gênero. **Boletim de Psicologia**, v. 59, n. 130, p. 61-76, 2009. Disponível em: <http://pepsic.bvsalud.org/scielo.php?pid=S0006-59432009000100006&script=sci_abstract>. Acesso em: 18 ago. 2021.
- ASKIM, Å. et al. Anxiety and depression symptoms in a general population and future risk of bloodstream infection: the HUNT study. **Psychosomatic medicine**, v. 80, n. 7, p. 673-679, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29923889/>>. Acesso em: 23 ago. 2021.

BARROS, M. B. A. et al. Report on sadness/depression, nervousness/anxiety and sleep problems in the Brazilian adult population during the COVID-19 pandemic. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 29, p. e2020427, 2020. Disponível em: <<https://www.scielosp.org/article/ress/2020.v29n4/e2020427/en/>>. Acesso em: 15 ago 2021.

BASOVICH, S. N. The role of hypoxia in mental development and in the treatment of mental disorders: a review. **Bioscience trends**, v. 4, n. 6, 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21248426/>>. Acesso em: 29 ago. 2021.

BELMAKER, R. H. The future of depression psychopharmacology. **CNS spectrums**, v. 13, n. 8, p. 682-687, 2008. Disponível em: <<https://www.cambridge.org/core/journals/cns-spectrums/article/abs/future-of-depression-psychopharmacology/91FC3537E2A0F281A017A7C3CEA25330>>. Acesso em: 28 ago. 2021.

BERTON, O.; NESTLER, E. J. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 2, p. 137-151, 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16429123/>>. Acesso em: 22 ago. 2021.

BHATT, S.; NAGAPPA, A. N.; PATIL, C. R. Role of oxidative stress in depression. **Drug discovery today**, v. 25, n. 7, p. 1270-1276, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22681168/>>. Acesso em: 27 ago. 2021.

BLACK, C. N. et al. Is depression associated with increased oxidative stress? A systematic review and meta-analysis. **Psychoneuroendocrinology**, v. 51, p. 164-175, 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26445/>>. Acesso em: 27 ago. 2021.

BOAS, G. R. V. et al. Molecular aspects of depression: a review from neurobiology to treatment. **European journal of pharmacology**, v. 851, p. 99-121, 2019. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30776369/>>. Acesso em: 22 ago. 2021.

BONADIMAN, C. S. C. et al. Depressive disorders in Brazil: results from the Global Burden of Disease Study 2017. **Population Health Metrics**. v. 18, n. 1, p. 1-13, 2020. Disponível em: <<http://vizhub.healthdata.org/gbdcompare>>. Acesso em: 19 ago. 2021

BROMET, E. et al. Cross-national epidemiology of DSM-IV major depressive episode. **BMC medicine**, v. 9, n. 1, p. 90, 2011. Disponível em: <<https://bmcmmedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/1741-7015-9-90>>. Acesso em: 16 ago. 2021.

BRUNTON, L. L.; , HILAL-DANDAN, R. e KNOLLMANN, B.C. **In: As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman**. 13^a ed. Porto Alegre: AMGH, 2019.

BURTSCHER, Johannes et al. Hypoxia Conditioning as a Promising Therapeutic Target in Parkinson's Disease?. **Movement Disorders**, v. 36, n. 4, p. 857-861, 2021. Disponível em: <https://movementdisorders.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/mds.28544>. Acesso em: 18 ago. 2021

BANDELOW, Borwin; MICHAELIS, Sophie. Epidemiology of anxiety disorders in the 21st century. **Dialogues in clinical neuroscience**, 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4610617/>. Acesso em: 18 jun. 2022

BANDELOW, Borwin; MICHAELIS, Sophie; WEDEKIND, Dirk. Treatment of anxiety disorders. **Dialogues in clinical neuroscience**, 2022. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.31887/DCNS.2017.19.2/bbandelow> DOI: <https://doi.org/10.31887/DCNS.2017.19.2/bbandelow>. ACESSO EM: 18 jun. 2022

CRASKE, Michelle G; Stein, Murray B. **Anxiety. Lancet**, v. 388, p. 3048–59, 2016. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(16\)30381-6/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(16)30381-6/fulltext). Acesso em: 22. jun. 2022.

CRASKE, Michelle G. et al. What is an anxiety disorder? **Focus**, v. 9, n. 3, p. 369-388, 2011. Disponível em: <https://focus.psychiatryonline.org/doi/full/10.1176/foc.9.3.foc369> DOI: <https://doi.org/10.1176/foc.9.3.foc369>. Acesso em: 18 jun. 2022.

CALIL, H.M.; PIRES, M.L. Aspectos gerais das escalas de avaliação de depressão. **Revista de Psiquiatria Clínica Clínica**. v. 25, n. 5, ed. Esp., p. 240-244, 1998. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-228050>>. Acesso em: 18 ago. 2021.

CASTRÉN, E.; RANTAMÄKI, T.. The role of BDNF and its receptors in depression and antidepressant drug action: reactivation of developmental plasticity. **Developmental neurobiology**, v. 70, n. 5, p. 289-297, 2010. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20186711/>>. Acesso em: 22 ago. 2021. DOI: 10.1002/dneu.20758

CHEN, Z.; SKOLNICK, P. Triple uptake inhibitors: therapeutic potential in depression and beyond. **Expert opinion on investigational drugs**, v. 16, n. 9, p. 1365-1377, 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17714023/>>. Acesso em: 28 ago. 2021. DOI: 10.1517/13543784.16.9.1365

CHESNEY, E; GOODWIN, G. M.; FAZEL, S. Risks of all-cause and suicide mortality in mental disorders: a meta-review. **World psychiatry**, v. 13, n. 2, p. 153-160, 2014. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24890068/>>. Acesso em: 11 ago. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1002/wps.20128>.

CHOPRA, K.; KUMAR, B.; KUHAD, A. Pathobiological targets of depression. **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 15, n. 4, p. 379-400, 2011. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21254923/>>. Acesso em: 22 ago. 2021. DOI: 10.1517/14728222.2011.553603

CRANE, George E. The psychiatric side-effects of iproniazid. **American journal of Psychiatry**, v. 112, n. 7, p. 494-501, 1956. Disponível em:<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13283130/>>. Acesso em: 22 ago. 2021. DOI: 10.1176/ajp.112.7.494

CREMA, L. M. **Efeitos de diferentes modelos de estresse crônico sobre parâmetros neuroquímicos e comportamentos do tipo ansioso e do tipo depressivo em ratos**. 2011. 100 p. Tese (Doutorado em Neurociências) Programa de Pós-Graduação em Neurociências – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2011.

DANTZER, R. et al. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nature reviews. Neuroscience*, v. 9, n. 1, p. 46–56, jan. 2008. DOI: 10.1038/nrn2297. DISPONIVEL EM: <https://www.nature.com/articles/nrn2297>. Acesso em: 22 ago. 2021.

FEATHERSTONE, D. E. Intercellular glutamate signaling in the nervous system and beyond. **ACS chemical neuroscience**, v. 1, n. 1, p. 4-12, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3368625/>>. Acesso em: 27 ago. 2021. DOI: 10.1021/cn900006n

FIEST, K. M. et al. Systematic review and meta-analysis of interventions for depression and anxiety in persons with rheumatoid arthritis. **Journal of Clinical Rheumatology**, v. 23, n. 8, p. 425, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28221313/>>. Acesso em: 23 ago. 2021. DOI: 10.1097/RHU.0000000000000489

FREITAS, A. E. et al. Agmatine abolishes restraint stress-induced depressive-like behavior and hippocampal antioxidant imbalance in mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 50, p. 143-150, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2013.12.012>. DISPONIVEL EM: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24370459/>. ACESSO EM: Acesso em: 23 ago. 2021

FONZO, Gregory A. et al. Common and disorder-specific neural responses to emotional faces in generalised anxiety, social anxiety and panic disorders. **The British Journal of Psychiatry**, v. 206, n. 3, p. 206-215, 2015. Disponível Em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25573399>. Acesso em: 18 jun. 2022.

GOMES, Francisco Isaac Fernandes et al. GABAergic transmission and modulation of anxiety: a review on molecular aspects. **Brazilian Journal of Biological Sciences**, v. 6, n. 12, p. 9-16, 2019. Disponível em: <http://revista.rebibio.net/v6n12/v06n12a02a.html>. Acesso em: 18 jun. 2022.

GARCIA, C. R. L. **Avaliação do efeito tipo antidepressivo de N-acetilcisteína no modelo de estresse crônico imprevisível em camundongos**. 2013. 58 p. Dissertação (Mestrado em Neurociências) Programa de Pós-Graduação em Neurociências - Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, 2013.

GARCIA, L. S. B. et al. Acute administration of ketamine induces antidepressant-like effects in the forced swimming test and increases BDNF levels in the rat hippocampus. **Progress in neuro-psychopharmacology and biological psychiatry**, v. 32, n. 1, p. 140-144, 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17884272/>>. Acesso em: 27 ago. 2021. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2007.07.027

GOZAL, D.; DANIEL, J. M.; DOHANICH, G.P. Behavioral and anatomical correlates of chronic episodic hypoxia during sleep in the rat. **Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 7, p. 2442-2450, 2001. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11264318/>>. Acesso em: 29 ago. 2021. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.21-07-02442.2001.

GREWER, C.; RAUEN, T. Electrogenic glutamate transporters in the CNS: molecular mechanism, pre-steady-state kinetics, and their impact on synaptic signaling. **The Journal of membrane biology**, v. 203, n. 1, p. 1-20, 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15834685/>>. Acesso em: 27 ago. 2021. DOI: 10.1007/s00232-004-0731-6.

GUERRA, T. R. B. et al. Métodos de Rastreamento da Depressão em Pacientes Ambulatoriais com Insuficiência Cardíaca. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, v. 31, n. 4,

p. 414-421, 2018. Disponível em: < http://www.scielo.br/pdf/ijcs/v31n4/pt_2359-4802-ijcs-20180037.pdf>. Acesso em: 18 ago. 2021. DOI: 10.5935/2359-4802.20180037.

HACIMUSALAR, Y.; EŞEL, E.. Suggested biomarkers for major depressive disorder. **Archives of Neuropsychiatry**, v. 55, n. 3, p. 280, 2018. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6138223/>>. Acesso em: 19 ago. 2021. DOI: 10.5152/npa.2017.19482

JAMES, S. L. et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **The Lancet**, v. 392, n. 10159, p. 1789-1858, 2018. Disponível em:<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673618322797>>. Acesso em: 11 ago. 2021. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32279-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32279-7)

JIAO, H. et al. Traditional Chinese Formula Xiaoyaosan Alleviates Depressive-Like Behavior in CUMS Mice by Regulating PEBP1-GPX4-Mediated Ferroptosis in the Hippocampus. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 17, p. 1001, 2021. Disponível em:<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33854318/>>. Acesso em: 10 ago. 2021. DOI: 10.2147/NDT.S302443. eCollection 2021.

JIN, Kunlin et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 18, p. 11946-11950, 2002. DISPONIVEL EM: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12181492/>. Acesso em: 10 jun. 2022. DOI: 10.1073/pnas.182296499

JUNG, M. E. et al. Intermittent hypoxia conditioning prevents behavioral deficit and brain oxidative stress in ethanol-withdrawn rats. **Journal of applied physiology**, v. 105, n. 2, p. 510-517, 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18499779/>>. Acesso em: 29 ago. 2021 DOI:10.1152/jappphysiol.90317.2008.

KAESTNER, F. et al. Different activation patterns of proinflammatory cytokines in melancholic and non-melancholic major depression are associated with HPA axis activity. **Journal of affective disorders**, v. 87, n. 2-3, p. 305-311, 2005. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15951024/>>. Acesso em: 23 ago. 2021. DOI: 10.1016/j.jad.2005.03.012

KAPCZINSKI, F., QUEVEDO, J., IZQUIERDO, I. **Bases biológicas dos transtornos psiquiátricos: uma abordagem translacional**. 4º ed. Porto Alegre : Artmed, 2011.

KATAYAMA, Keisho et al. Intermittent hypoxia improves endurance performance and submaximal exercise efficiency. **High altitude medicine & biology**, v. 4, n. 3, p. 291-304, 2003. Disponível em: <https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/152702903769192250>. Acesso em: 10 jun. 2022.

KAUFMAN, J. et al. Brain-derived neurotrophic factor–5-HTTLPR gene interactions and environmental modifiers of depression in children. **Biological psychiatry**, v. 59, n. 8, p. 673-680, 2006. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16458264/>>. Acesso em: 22 ago. 2021. DOI: 10.1016/j.biopsych.2005.10.026

KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. The molecular neurobiology of depression. **Nature**, v. 455, n. 7215, p. 894-902, 2008. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nature07455>>. Acesso em: 22 ago. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature07455>

KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. Animal models of depression: molecular perspectives. **Molecular and functional models in neuropsychiatry**, p. 121-147, 2011. Disponível em: <https://link.springer.com/chapter/10.1007/7854_2010_108>. Acesso em: 29 set. 2021.

KUMAR, A.; GARG, R.; PRAKASH, A. K. Effect of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) treatment on restraint stress-induced behavioral and biochemical alteration in mice. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 10, n. 1, p. 1-6, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1186/1472-6882-10-18>. DISPONIVEL EM: <https://bmccomplementmedtherapies.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6882-10-18>. Acesso em: 22 mar. 2022

KUSHWAH, N. et al. Neuroprotective role of intermittent hypobaric hypoxia in unpredictable chronic mild stress induced depression in rats. **PLoS One**, v. 11, n. 2, p. e0149309, 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26901349/>>. Acesso em: 29 ago. 2021.

KWATRA, Mohit et al. Lipopolysaccharide exacerbates chronic restraint stress-induced neurobehavioral deficits: Mechanisms by redox imbalance, ASK1-related apoptosis, autophagic dysregulation. *Journal of Psychiatric Research*, v. 144, p. 462-482, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022395621006142>>. Acesso em: 22 mar. 2022.

LÉPINE, JP; BRILEY, M. The increasing burden of depression. **Neuropsychiatric disease and treatment**, v. 7, n. Suppl 1, p. 3, 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21750622/>>. Acesso em: 11 ago. 2021.

LIU, Q. et al. Changes in the global burden of depression from 1990 to 2017: Findings from the Global Burden of Disease study. **Journal of psychiatric research**, v. 126, p. 134-140, 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022395619307381>>. Acesso em: 20 ago. 2021.

LIU, T. et al. A meta-analysis of oxidative stress markers in depression. **PloS one**, v. 10, n. 10, p. e0138904, 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26445247/>>. Acesso em: 27 ago. 2021.

LIU, W. et al. Induction of tumor arrest and differentiation with prolonged survival by intermittent hypoxia in a mouse model of acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 107, n. 2, p. 698-707, 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16166593/>>. Acesso em: 29 ago. 2021.

LIU, Y.; HO, R. CM.; MAK, A. Interleukin (IL)-6, tumour necrosis factor alpha (TNF- α) and soluble interleukin-2 receptors (sIL-2R) are elevated in patients with major depressive disorder: a meta-analysis and meta-regression. **Journal of affective disorders**, v. 139, n. 3, p. 230-239, 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21872339/>>. Acesso em: 23 ago. 2021.

- LÓPEZ-MUÑOZ, Francisco; ALAMO, Cecilio. Monoaminergic neurotransmission: the history of the discovery of antidepressants from 1950s until today. **Current pharmaceutical design**, v. 15, n. 14, p. 1563-1586, 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19442174/>>. Acesso em: 22 ago. 2021.
- LI, Sheng. synuclein in the mouse brain cortex. **Acta Physiologica Sinica**, v. 56, n. 2, p. 263-268, 2004. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/15127141>. Acesso em: 27 mar. 2022.
- MACKENZIE, Corey S. et al. Prevalence and correlates of generalized anxiety disorder in a national sample of older adults. **The American Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 19, n. 4, p. 305-315, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1097/JGP.0b013e318202bc62>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1064748112600232>. Acesso em: 18 jun. 2022.
- MURIS, Peter et al. Fears, worries, and scary dreams in 4-to 12-year-old children: Their content, developmental pattern, and origins. **Journal of clinical child psychology**, v. 29, n. 1, p. 43-52, 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10693031/>. Acesso em: 30 Jun. 2022
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico-Vigitel**. Portal do Ministério da Saúde. Brasília-DF. 2022. Disponível em: <http://plataforma.saude.gov.br/vigitel/>. Acesso em: 19 jul. 2022.
- MANUKHINA, Eugenia B. et al. Intermittent hypoxia improves behavioral and adrenal gland dysfunction induced by posttraumatic stress disorder in rats. **Journal of applied physiology**, v. 125, n. 3, p. 931-937, 2018. Disponível em: <<https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/jappphysiol>>. Acesso em: 27 ago. 2021.
- MAES, M. et al. Serum levels of excitatory amino acids, serine, glycine, histidine, threonine, taurine, alanine and arginine in treatment-resistant depression: modulation by treatment with antidepressants and prediction of clinical responsiveness. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 97, n. 4, p. 302-308, 1998. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9570492/>>. Acesso em: 27 ago. 2021.
- MATEIKA, J. H. et al. Intermittent hypoxia: a low-risk research tool with therapeutic value in humans. **Journal of applied physiology**, v. 118, n. 5, p. 520-532, 2015. Disponível em: <<https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/jappphysiol.00564.2014>>. Acesso em: 29 set. 2021.
- MAURYA, P.K. et al. The role of oxidative and nitrosative stress in accelerated aging and major depressive disorder. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 65, p. 134-144, 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26348786/>>. Acesso em: 27 ago. 2021.
- MITANI, H. et al. Correlation between plasma levels of glutamate, alanine and serine with severity of depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 30, n. 6, p. 1155-1158, 2006. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0278584606001333> Acesso em: 28 ago. 2021.

MURROUGH, J. W.; ABDALLAH, C. G.; MATHEW, S. J. Targeting glutamate signalling in depression: progress and prospects. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 16, n. 7, p. 472-486, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28303025/>>. Acesso em: 27 ago. 2021.

NAKAJIMA, S. et al. Accelerating response to antidepressant treatment in depression: a review and clinical suggestions. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 34, n. 2, p. 259-264, 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19969039/>>. Acesso em: 28 ago. 2021.

NAVARRETE-OPAZO, A.; MITCHELL, G. S. Therapeutic potential of intermittent hypoxia: a matter of dose. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 307, n. 10, p. R1181-R1197, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25231353/>>. Acesso em: 29 ago. 2021

NEMEROFF, C. B.; OWENS, M. J. Treatment of mood disorders. **Nature neuroscience**, v. 5, n. 11, p. 1068-1070, 2002. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9236543/>>. Acesso em: 22 ago. 2021.

NESTLER, E. J. et al. Neurobiology of depression. **Neuron**, v. 34, n. 1, p. 13-25, 2002. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11931738/>>. Acesso em: 22 ago. 2021.

NESTLER, E. J.; HYMAN, S. E. Animal models of neuropsychiatric disorders. **Nature neuroscience**, v. 13, n. 10, p. 1161-1169, 2010. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nn.2647?message-global=remove&page=10>>. Acesso em: 29 set. 2021.

NOWAK, G.; ORDWAY, G. A.; PAUL, I. A. Alterations in the N-methyl-d-aspartate (NMDA) receptor complex in the frontal cortex of suicide victims. **Brain research**, v. 675, n. 1-2, p. 157-164, 1995. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7796124/>>. Acesso em: 27 ago. 2021.

OLIVEIRA, D. R. **Avaliação da atividade tipo antidepressiva do óleo essencial das folhas de *Spiranthera odoratissima* A. St.-Hil. e de seu componente majoritário, β -cariofileno.** 2016. 123p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - Universidade Federal de Goiás – Goiânia, GO, 2016.

ÖNGÜR, D.; DREVETS, W. C.; PRICE, J. L. Glial reduction in the subgenual prefrontal cortex in mood disorders. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 22, p. 13290-13295, 1998. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9789081/>>. Acesso em: 27 ago. 2021. DOI: 10.1073/pnas.95.22.13290

PALAZIDOU, Eleni. The neurobiology of depression. **British medical bulletin**, v. 101, n. 1, p. 127-145, 2012. Disponível em: <<https://academic.oup.com/bmb/article/101/1/127/262645?login=true>>. Acesso em: 21 ago. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1093/bmb/lds004>

PLANCHEZ, B.; SURGET, A.; BELZUNG, C.. Animal models of major depression: drawbacks and challenges. **Journal of Neural Transmission**, v. 126, n. 11, p. 1383-1408, 2019. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00702-019-02084-y>>. Acesso em: 29 set. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00702-019-02084-y>.

- RÉUS, G. Z. et al. Relationship of oxidative stress as a link between diabetes mellitus and major depressive disorder. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2019, 2019. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6421821/> >. Acesso em: 23 ago. 2021. DOI: 10.1155/2019/8637970
- ROCHA, F. L.; HARA, C.; PAPROCKI, J. Doença mental e estigma. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 25, n. 4, p. 590-6, 2015. Disponível em: < <http://www.rmmg.org/artigo/detalhes/1876> >. Acesso em: 11 ago. 2021. DOI: 10.5935/2238-3182.20150127.
- RODRIGUES, S. M.; LEDOUX, J. E.; SAPOLSKY, R. M. The influence of stress hormones on fear circuitry. **Annual review of neuroscience**, v. 32, p. 289-313, 2009. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19400714/> >. Acesso em: 22 ago. 2021. DOI: 10.1146/annurev.neuro.051508.135620
- ROOHI, E.; JAAFARI, N.; HASHEMIAN, F. On inflammatory hypothesis of depression: what is the role of IL-6 in the middle of the chaos?. **Journal of Neuroinflammation**, v. 18, n. 1, p. 1-15, 2021. Disponível em: < <https://jneuroinflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12974-021-02100-7> >. Acesso em: 20 ago. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12974-021-02100-7>
- RYBNIKOVA, E. A. et al. The possible use of hypoxic preconditioning for the prophylaxis of post-stress depressive episodes. **Neuroscience and behavioral physiology**, v. 38, n. 7, p. 721-726, 2008. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18709460/> >. Acesso em: 29 ago. 2021.
- RYBNIKOVA, E. et al. Antidepressant-like effects of mild hypoxia preconditioning in the learned helplessness model in rats. **Neuroscience letters**, v. 417, n. 3, p. 234-239, 2007. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17379404/> >. Acesso em: 29 ago. 2021.
- SANACORA, G.; BANASR, M. From pathophysiology to novel antidepressant drugs: glial contributions to the pathology and treatment of mood disorders. **Biological psychiatry**, v. 73, n. 12, p. 1172-1179, 2013. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23726152/> >. Acesso em: 27 ago. 2021.
- SCHEGA, Lutz et al. Effect of intermittent normobaric hypoxia on aerobic capacity and cognitive function in older people. **Journal of Science and Medicine in Sport**, v. 19, n. 11, p. 941-945, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jsams.2016.02.012>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27134133/>. Acesso em: 20 abr. 2022.
- SCHILDKRAUT, J. J. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. **American journal of Psychiatry**, v. 122, n. 5, p. 509-522, 1965. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5319766/> >. Acesso em: 22 ago. 2021.
- SCHMIDT, W. J.; REITH, M. E. **Dopamine and glutamate in psychiatric disorders**. 1ª ed. New Jersey: Human Press, 2005.
- SCHÖLZKE, Marion N.; SCHWANINGER, Markus. Transcriptional regulation of neurogenesis: potential mechanisms in cerebral ischemia. **Journal of molecular medicine**, v. 85, n. 6, p. 577-588, 2007. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00109-007-0196-z>. ACESSO EM: 20. MAI. 2022.

SCHIELE, M. A.; DOMSCHKE, K. Epigenetics at the crossroads between genes, environment and resilience in anxiety disorders. **Genes, Brain and Behavior**, v. 17, n. 3, p. e12423, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28873274/>. Acesso em: 18 jun. 2022

STEIN, Murray B. et al. Increased amygdala and insula activation during emotion processing in anxiety-prone subjects. **American Journal of Psychiatry**, v. 164, n. 2, p. 318-327, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17267796/>. Acesso em :28 jun. 2022

STEIN, Murray B.; SAREEN, Jitender. Generalized anxiety disorder. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 21, p. 2059-2068, 2015. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMcp1502514>. Acesso em: 13 jun. 2022

STRAWN, Jeffrey R. et al. Pharmacotherapy for generalized anxiety disorder in adult and pediatric patients: an evidence-based treatment review. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 19, n. 10, p. 1057-1070, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30056792/>. DOI: 10.1080/14656566.2018.1491966. Acesso em: 18 jun. 2022

STRÖHLE, Andreas; GENSICHEN, Jochen; DOMSCHKE, Katharina. The diagnosis and treatment of anxiety disorders. **Deutsches Ärzteblatt International**, v. 115, n. 37, p. 611, 2018. DOI: 10.3238/arztebl.2018.0611. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6206399/>. Acesso em: 18 jun. 2022.

SANTOMAURO, Damian F. et al. Global prevalence and burden of depressive and anxiety disorders in 204 countries and territories in 2020 due to the COVID-19 pandemic. **The Lancet**, v. 398, n. 10312, p. 1700-1712, 2021. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(21\)02143-7/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(21)02143-7/fulltext). DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02143-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02143-7). Acesso em: 18 jun. 2022

SELYE, H., FORTIER, C. Adaptive reaction to stress. **Psychosomatic medicine** v.12. p. 149–157, 1949. Disponível em:< <https://psycnet.apa.org/record/1950-06403-001>>. Acesso em: 22 ago. 2021.

SEREBROVSKAYA, T. V. Intermittent hypoxia research in the former Soviet Union and the Commonwealth of Independent States: history and review of the concept and selected applications. **High Altitude Medicine & Biology**, v. 3, n. 2, p. 205-221, 2002. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12162864/>>. Acesso em: 29 ago. 2021.

SEREBROVSKAYA, T.V. et al. Intermittent hypoxia: cause of or therapy for systemic hypertension?. **Experimental Biology and Medicine**, v. 233, n. 6, p. 627-650, 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18408145/>>. Acesso em: 29 ago. 2021.

SEREBROVSKAYA, Tatiana V.; XI, Lei. Intermittent hypoxia training as non-pharmacologic therapy for cardiovascular diseases: Practical analysis on methods and equipment. **Experimental Biology and Medicine**, v. 241, n. 15, p. 1708-1723, 2016. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/1535370216657614>. Acesso em: 30 de mai. 2022.

SIDDIQUI, F. et al. Duloxetine versus ‘active’ placebo, placebo or no intervention for major depressive disorder; a protocol for a systematic review of randomised clinical trials with

meta-analysis and trial sequential analysis. **Systematic reviews**, v. 10, n. 1, p. 1-19, 2021.

Disponível em:

<<https://systematicreviewsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13643-021-01722-5>>.

Acesso em: 29 ago. 2021.

SIRÉN, Anna-Leena et al. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 7, p. 4044-4049, 2001. Disponível EM: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.051606598>.

Acesso em: 5 Jun. 2022.

SIROTININ, N. N. Effect of acclimatization to high mountain climates on adaptation to decreased atmospheric pressure in decompression chambers. **Arkh. Pat. Anat. Pat. Physiol**, v. 6, n. 1-2, p. 35-42, 1940. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14302886/> >.

Acesso em: 29 ago. 2021.

SLOTKIN, T. A.; SEIDLER, F. J.; RITCHIE, J. C. Effects of aging and glucocorticoid treatment on monoamine oxidase subtypes in rat cerebral cortex: therapeutic implications. **Brain research bulletin**, v. 47, n. 4, p. 345-348, 1998. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9886786/>>. Acesso em: 22 ago. 2021.

SMITH, Kerri. Mental health: a world of depression. **Nature News**, v. 515, n. 7526, p. 180, 2014. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/515180a>>. Acesso em: 06 jan. 2020.

SOUZA, L. H. **Depressão de difícil tratamento: validadores para classificação e resposta à terapia interpessoal**. 2015. 158p. Dissertação. Tese (Doutorado em Ciências Médicas: Psiquiatria) Programa de Pós- Graduação em Ciências Médicas: Psiquiatria – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto alegre, RS, 2015.

SULAKHIYA, K. et al. Effect of Beta vulgaris Linn. leaves extract on anxiety-and depressive-like behavior and oxidative stress in mice after acute restraint stress. **Pharmacognosy research**, v. 8, n. 1, p. 1, 2016. DOI: 10.4103/0974-8490.171100. DISPONIVEL EM: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26941529/>. ACESSO EM: 18.MAI.2022

TATSUMI, M. et al. Pharmacological profile of antidepressants and related compounds at human monoamine transporters. **European journal of pharmacology**, v. 340, n. 2-3, p. 249-258, 1997. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9537821/>>. Acesso em: 19 ago. 2021. DOI: 10.1016/s0014-2999(97)01393-9

TENG, C.T.; HUMES, E. C.; DEMETRIO, F. N. Depression and medical comorbidity. **Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)**, v. 32, n. 3, p. 149-159, 2005. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rpc/a/C4n3mbn9gG5rKkK3Ws85S6C/abstract/?lang=pt>>. Acesso em: 11 ago. 2021.

THAKARE, V. N.; DHAKANE, V. D.; PATEL, B. M. Attenuation of acute restraint stress-induced depressive like behavior and hippocampal alterations with protocatechuic acid treatment in mice. **Metabolic brain disease**, v. 32, n. 2, p. 401-413, 2017. Disponível em:< <https://link.springer.com/article/10.1007/s11011-016-9922-y>>. Acesso em: 13 out. 2021.

TIER, C. G. et al. Escalas de avaliação da depressão em idosos. **Revista Baiana de Enfermagem**. v. 21, n. 2/3, p. 27-36, 2007. Disponível em:<<http://repositorio.furg.br/handle/1/4404>>. Acesso em: 18 ago. 2021

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16978905/>>. Acesso em: 27 ago. 2021. DOI: 10.1016/j.biocel.2006.07.001

VISMARI, L.; ALVES, G. J.; PALERMO-NETO, J. Depressão, antidepressivos e sistema imune: um novo olhar sobre um velho problema. **Archives of Clinical Psychiatry**, v. 35, p. 196-204, 2008. Disponível em: < <https://www.scielo.br/j/rpc/a/yj3WRdM8RzhQQj5zXdMTvrk/?lang=pt>>. Acesso em: 23 ago. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-60832008000500004>

VOGT, Michael; HOPPELER, Hans. Is hypoxia training good for muscles and exercise performance? *Progress in cardiovascular diseases*, v. 52, n. 6, p. 525-533, 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0033062010000423>. Acesso em: 25. jun. 22.

WANG, Q. et al. The recent progress in animal models of depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 77, p. 99-109, 2017. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28396255/>>. Acesso em: 29 set. 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.04.008>

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018. **Depression**. 2018 Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/depression>>. Acesso em: 19 ago. 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008. **The global burden of disease: 2004 update**. Disponível em: < <https://apps.who.int/iris/handle/10665/43942>> . Acesso em: 16 ago. 2021

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019. **Mental disorders – Fact sheets**. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/mental-disorders>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020. **Depression**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

WITTCHEN, Hans-Ulrich. Generalized anxiety disorder: prevalence, burden, and cost to society. **Depression and anxiety**, v. 16, n. 4, p. 162-171, 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12497648/>. Acesso em: 7 jun. 2022.

YAN, L.J. et al. Mouse heat shock transcription factor 1 deficiency alters cardiac redox homeostasis and increases mitochondrial oxidative damage. **The EMBO journal**, v. 21, n. 19, p. 5164-5172, 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC129050/>>. Acesso em: 29 ago. 2021.

YEOH, S. W. et al. Depression, fatigue and neurocognitive deficits in chronic hepatitis C. **Hepatology international**, v. 12, n. 4, p. 294-304, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29931590/>. Acesso em: 23 ago. 2021.

YERNOOL, D. et al. Structure of a glutamate transporter homologue from *Pyrococcus horikoshii*. **Nature**, v. 431, n. 7010, p. 811-818, 2004. Disponível em: < <https://www.nature.com/articles/nature03018> >. Acesso em: 27 ago. 2021.

- YOHN, C. N.; GERGUES, M. M.; SAMUELS, B. A. The role of 5-HT receptors in depression. **Molecular brain**, v. 10, n. 1, p. 1-12, 2017. Disponível em: <<https://molecularbrain.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13041-017-0306-y>>. Acesso em: 19 ago. 2021.
- YU, Shun et al. Effect of repeated acute hypoxic treatment on the expression of alpha-IBGE, 2020. **Pesquisa nacional de saúde: 2019: percepção do estado de saúde, estilos de vida, doenças crônicas e saúde bucal: Brasil e grandes regiões**. IBGE, Coordenação de Trabalho e Rendimento – Rio de Janeiro: IBGE, 2020. 113 P. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel_brasil_2019_vigilancia_fatores_risco.pdf. Acesso em: 19 jul. 2022.
- YUE, Xiangpei et al. Intermittent hypoxia treatment alleviates memory impairment in the 6-month-old APP^{swe}/PS1^{dE9} mice and reduces amyloid beta accumulation and inflammation in the brain. **Alzheimer's research & therapy**, v. 13, n. 1, p. 1-16, 2021. Disponível em: <https://alzres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13195-021-00935-z>. Acesso em: 25 mai. 2022.
- ZHU, Ling-Ling et al. Effects of hypoxia on the proliferation and differentiation of NSCs. **Molecular neurobiology**, v. 31, n. 1, p. 231-242, 2005. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1385/MN:31:1-3:231>. Acesso em: 24 jun. 2022.
- ZHU, W.Z. et al. Intermittent high altitude hypoxia inhibits opening of mitochondrial permeability transition pores against reperfusion injury. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 40, n. 1, p. 96-106, 2006. Disponível em: <[https://www.jmcc-online.com/article/S0022-2828\(05\)00310-X/fulltext](https://www.jmcc-online.com/article/S0022-2828(05)00310-X/fulltext)>. Acesso em: 29 ago. 2021.
- ZBOZINEK, Tomislav D. et al. Diagnostic overlap of generalized anxiety disorder and major depressive disorder in a primary care sample. **Depression and anxiety**, v. 29, n. 12, p. 1065-1071, 201. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3629816/>. Acesso em: 18 jun. 2022

ANEXO A: MANUSCRITO 2

Comparing a modified model of lipopolysaccharide to a classic model of corticosterone administration in mice.

Comparing novel to classic depression model

Francini Arboit^{a,b}, Gregory Klein Schneider^a, Gabriele Cheiran Pereira^{a,b}, Guilherme Vargas Bochi^{a,b}, Eliane Maria Zanchet^{a,b,*}

^aCenter of Health Sciences, Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Santa Maria, RS, Brazil, 97105-900.

^bCenter of Health Sciences, Graduate Program in Pharmacology, Federal University of Santa Maria, RS, Brazil, 97105-900.

*Corresponding author: Eliane Maria Zanchet, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima 1000, Prédio 21, Sala 5211, Camobi, 97105-900, Santa Maria-RS, Brazil, E-mail: eliane.m.zanchet@ufsm.br

ABSTRACT

Mental health disorders are a serious public health problem, wherein the most prevalent are major depressive disorder (MDD) and anxiety disorders. Much of the current understanding regarding these disorders has come from animal models that are based on the application of stressors, even though there are limited models of chronic peripheral inflammation to induce behavioral alterations that mimic MDD. Thus, this present study aimed to compare the behavioral changes associated with depression and anxiety in Swiss mice caused by the classic chronic corticosterone administration model (CCA) (21 days) and a modified protocol of chronic and intermittent lipopolysaccharide (LPS) administration (once a week/3 weeks). Our results showed that repeated administration of LPS increased immobility in the tail suspension test and in the forced swim test. On the other hand, the CCA decreased the number of closed arms entries in the elevated plus maze test, and time spent in the central area of the open field test, suggesting that the LPS model is more likely to induce depressive-like behavior, whereas the corticosterone model leans to induce anxiety-like behavior. We conclude that both protocols were successful in inducing anxiety or depressive-like behaviors in Swiss mice, but they are not identical and potentially would not respond similarly to the same antidepressive treatment.

Keywords: Depressive-like behavior, Anxious-like behavior, Depression models, Mice, LPS, Corticosterone.

INTRODUCTION

Mental disorders are among the leading causes of the global health-related burden of disease, with depressive and anxiety disorders being the most prominent, affecting 280 and 264 million people worldwide, respectively (Daly and Robinson, 2022; World Health Organization, 2019). Major depressive disorder (MDD) is a complex, multifactorial, and heterogenous clinical syndrome characterized by depressed mood, loss of interest or pleasure, reduced energy or fatigue accompanied by other symptoms such as suicidal thoughts, sleep disturbances, psychomotor agitation or retardation, and difficulty concentrating³. In addition, these symptoms may overlap with those of other psychiatric disorders, such as anxiety disorder⁴, and therefore make diagnosis difficult.

The limited success of discovering new drugs to treat depression is related to insufficient understanding of the neurobiology underlying the disorder. However, in recent decades, the research community is making efforts to develop animal models that can and are being used to generate and test new hypotheses as well as discover new treatments⁵.

The fact that stressful episodes can culminate in an initial episode of MDD is well known⁶. Thus, several animal models consist of exposure to acute or chronic stressful situations, including chronic mild stress (CMS), chronic restraint stress (CRS), chronic social defeat stress (CSDS), unpredictable chronic mild stress (UCMS), chronic unpredictable stress (CUS), social defeat stress (SDS) and the maternal separation (MS) models. Such models are capable of inducing behavioral, emotional, and cognitive changes that resemble symptoms of MDD⁷. Some other models also relate to other possible etiologies of MDD, simulating biological causes, and include genetic models, optogenetic manipulations, bulbectomy, exposure to lipopolysaccharide (LPS), and chronic corticosterone administration (CCA). These models induce alterations that may participate in the pathophysiological mechanisms of

depression^{8,9} and, therefore, by inducing such alterations, it is possible to mimic MDD behaviors in animals.

The animal model with corticosterone exposure influences molecular targets that are implicated in negative mood induction. Elevated levels of cortisol are related to MDD and can be triggered by hyperactivity of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis in a post-stress situation, for example¹⁰. Therefore, exogenous administration of corticosterone in rodents serves as a way to study the effects of elevated corticosterone levels that would occur as a consequence of exposure to stress. Exogenous corticosterone exposure produces neuronal changes in several brain regions and affects different molecular targets related to clinical signs of depression, including decreased hippocampal neurogenesis and expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), and even cell death in the hippocampus¹¹⁻¹³.

It has come to light in recent decades that depression is accompanied by immune-inflammatory activation, which influences the behavioral, neuroendocrine, and neurochemical features of MDD¹⁴. Therefore, some models induce inflammation, such as the LPS model. This model of depression is relevant to investigating emergent behaviors of inflammatory-based depression and the underlying mechanisms of depressive states.

LPS is a pathogen-associated molecular pattern (PAMP) derived from Gram-negative bacteria that binds to toll-like receptor 4 (TLR-4). Systemic inflammation by LPS triggers the release of proinflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-2 e INF- γ , which, according to Bauer and Teixeira (2019), are increased in patients with depression. Acute LPS administration is therefore commonly used as a model to access depressive-like behaviors in animals^{15,16}. However, behavioral changes induced by an acute application of LPS are not ideal for models of clinical depression, as it is difficult to decipher whether LPS-induced behaviors are related to genuine depressive behavior or just to sickness behavior. Depression is a progressive

degenerative disorder that involves different pathways, while sickness behavior is an acute and adaptive response to inflammation ¹⁷.

Today it is known that depression occurs chronically and progressively throughout life, and takes the form of recurrent and prolonged episodes ¹⁸. In this context, it is interesting to investigate and develop chronic models of depression, as they are more faithful to the course of the disorder. Thus, the objective of this work was to compare the behavior induced by CCA and a modified protocol of chronic and intermittent application of LPS in Swiss mice.

MATERIALS AND METHODS

Male Swiss mice (25-30g, n=30) were obtained from Federal University of Santa Maria breeding colony. They were housed within their experimental group in cages with food and water *ad libitum*, in a 12-hour light/dark cycle, temperature, and humidity-controlled room. All the experiments were performed in accordance with National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and approved by our Institutional Animal Care and Use Committee (CEUA UFSM N°: 3781171220). All efforts were made to limit the suffering and the number of animals used.

The mice were allowed to acclimate for seven days before the beginning of the protocols. After that, they were divided into three groups (n=10/group) that received one of the following treatments: 0.9% saline (s.c.) every day during 21 days; corticosterone (20mg/kg, s.c., dissolved in 0.9% saline with 0.2% Tween80 and 0.2% DMSO) every day during 21 days ¹⁹; and LPS (0.083mg/kg, i.p., dissolved in 0.9% saline), once a week, for 3 weeks. Animals were tested in the open field test (OFT) and elevated plus maze test (EPM) on the 22nd day (approximately 24h after the last injection). On the 23rd day, they were tested in the tail suspension test (TST) and forced swim test (FST), followed by euthanasia with isoflurane sedation, as shown in the experimental design (Figure 1). The LPS protocol was modified from

the chronic LPS protocol of Kubera et al. (2013). The drugs (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) were freshly prepared before the use and administrated in a volume of 10 mL/kg of body weight.

Data was expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM) and was analyzed using Graph Pad Prism (version 8.0, San Diego, USA) (n=10 mice/group). Previously, the values were tested by Shapiro-Wilk normality test. Depending on their distribution, data was analyzed using parametric statistics (one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test) or non-parametric statistics (Kruskal–Wallis test followed by Dunn's post hoc test). The cut-off for statistical significance was $p < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

The FST consists of a tub of water inescapable to the mice, where the animals are allocated to swim and be observed for 6 minutes. It's a test that evaluates the coping behaviors of the animals when faced with environmental stress²⁰. Many antidepressant treatments have been shown to consistently reduce immobility time on the FST²¹. Therefore, we can correlate a higher immobility time to a depressed phenotype in mice. In our results, it was observed that this behavior was statistically significant only in the LPS group (Fig. 2A), while the corticosterone group showed a tendency. Similar results of increased immobility time in the FST were also found in other studies that used the chronic administration of LPS^{22,23}. It should be noted that the time of LPS application in the cited studies was 5 doses per week for 4 months and twice weekly for 25 weeks, respectively. On the other hand, the absence of increased immobility time in the corticosterone group in our results was surprising, given that many works in the literature show that 21 days of corticosterone administration leads to increased immobility time^{19,24,25}. Several factors may have influenced these results in the FST, including experimental sample, lineage, gender, age, and swimming susceptibility²⁶. Furthermore,

experiments performed with rats show that they can undergo a physical and behavioral adaptation of the response to the FST. This adaptive response serves to conserve the energy necessary for survival in an unavoidable situation²⁶. Possibly, this response can be extrapolated to the behavior of mice, which would explain our results.

Another parameter observed in the FST is the presence of escape-directed behavior (struggling), which can be correlated with behavioral despair²¹. This parameter seems to be more intertwined with anxiety-like behavior^{27,28} and was statistically significant in the corticosterone group (Fig. 2B).

In the TST, the two evaluated parameters were latency to the first episode of immobility and total immobility time. On the first variable, no statistical significance was found in either group (Fig. 2C), but in the later, the LPS group spent significantly more time immobile when compared to the control group while the corticosterone group showed no difference compared to the control group (Fig. 2D). Antidepressant treatment lowers the immobility time in mice²⁹, therefore, it's plausible that mice undergoing stress that tries to emulate depression should have their immobility time amplified. The results observed in the LPS group, characterized by higher immobility time than the control group when presented with a presumably inescapable situation, can be indicative of depressive-like behavior. These findings are reinforced by the results observed on the FST.

Observing rodent behavior in the EPM, anti-anxiety behavior is demonstrated by more entries on open arms and/or total time spent on open arms³⁰, which was not observed in our results, where animals from both groups showed a tendency to enter and remain less time on the open arms of the EPM (data not shown), suggesting an anxious behavior. We observed that mice in the corticosterone group demonstrated fewer entries onto closed arms (Fig. 3A) while the time spent on them remained unchanged (Fig. 3B). They also spent less time in the center during the OFT (Fig. 3D) and, according to Kraeuter et al. (2018), anxiety-behaving mice

generally walk and spend more time in the periphery. Corticosterone mice also spent more time struggling in the FST (Fig. 2B). All these results point to marked anxiety-like behavior in the corticosterone group.

On the other hand, the LPS group showed results that more closely resemble depressive-like behaviors, as shown by a higher immobility time in FST and TST. In this group, statistical significance was also found in the number of entries onto closed arms in the EPM (Fig. 3A), a behavior that is more indicative of anxiety, but these results are not unexpected since depression is a heterogeneous disorder that rarely strikes alone, presenting clinical symptoms that often overlap with symptoms of other psychiatric disorders, such as anxiety disorder⁴.

Above we commented on the statistically significant behaviors but, as the graphics show, some other behavioral tendencies were observed as well. One of them is a reduced number of rearings on the OFT (Fig. 3E) and head dips on the EPM (Fig. 3C). Rearing is an exploratory behavior that can be suppressed by anxiety-provoking conditions³¹. We believe that, even if not statistically significant, the fewer rearings in both groups is another indication of the unease present in the pharmacologically stressed mice. This is also congruent with the results found in the other tests.

All these results demonstrate that, even with the high intersectionality of behaviors between the stressed groups, their individual phenotypes vary greatly. While the LPS group presents mainly depressive-like behaviors, the corticosterone group demonstrates mainly anxiety-like behaviors.

Most rodent antidepressant trials are performed with a single stress protocol. In this work, however, we demonstrated that different stress protocols induce distinct behavioral changes and that such models should not be considered equivalent. Depression is a disorder that is caused by chronic and prolonged types of stress during life^{18,32}, therefore, the use of models that recapitulate this chronicity, such as the new/modified model of chronic and intermittent

LPS administration studied here, are more faithful when trying to emulate depressive-like behaviors in animals associated with the clinical symptoms of the disorder. We incentivize researchers to add different types of stressed groups to their trials as means of evaluating if the positive results found are not reserved to revert a specific type of stress.

Therefore, we conclude that both protocols were successful in inducing anxiety and/or depressive-like behaviors in male Swiss mice, but they are not identical and possibly would not respond similarly to the same anti-depressive treatment. Finally, we stimulate further research into the particularities of each depression-inducing protocol and the different responses that animals may have to the same treatments.

Authors' contributions

FA and GKS designed and performed the experiments, as well as writing the paper; FA performed the statistical analysis; GCP performed the formal paper review; EMZ and GVB performed the conceptualization, formal analysis, supervision, project administration. The final manuscript has the approval of all authors.

Acknowledgments

We thank Juan Andres Miguez for proofreading and translational assistance and Dr. Jaime Aramburu for euthanasia assistance.

Declaration of conflicting interest

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

FIGURES

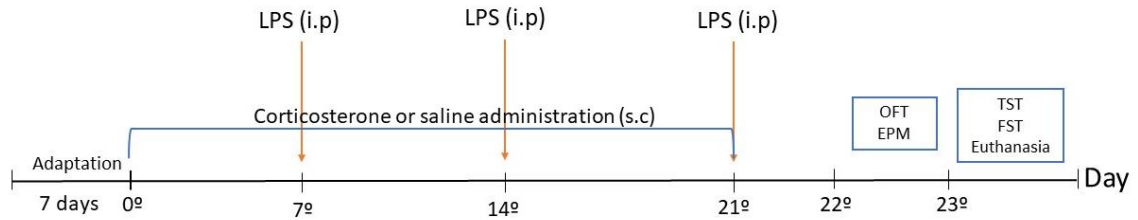


Fig. 1. Schematic overview of the experimental design.

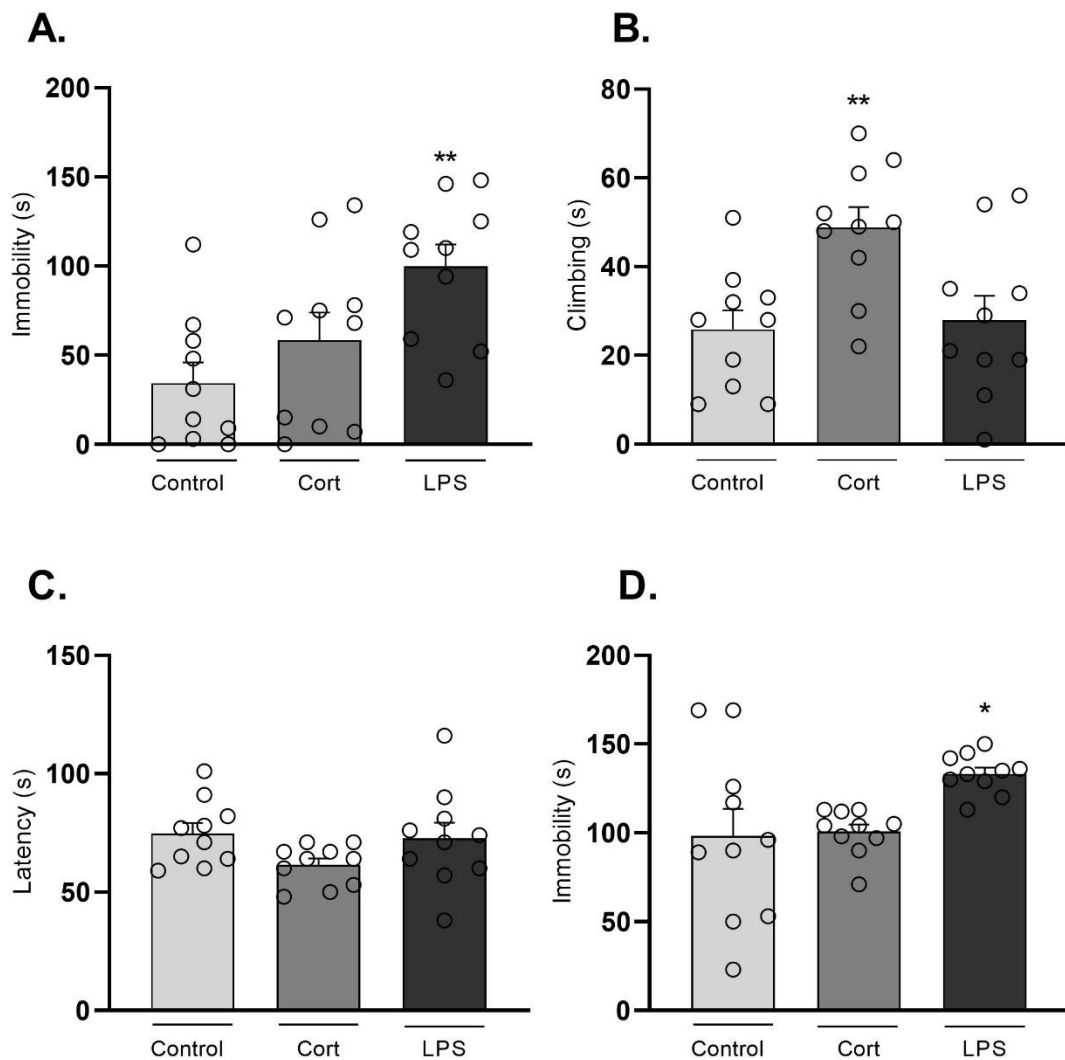


Fig. 2. Effects of corticosterone and lipopolysaccharide administration on the forced swim (A and B) and tail suspension tests (C and D). Statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 8 and the results were obtained using one-way ANOVA, followed by

Tukey's post hoc test. Values are expressed as the mean \pm SEM (n=10 mice/group). Significant differences: *p < 0.05, ** p < 0.01 when compared to control group.

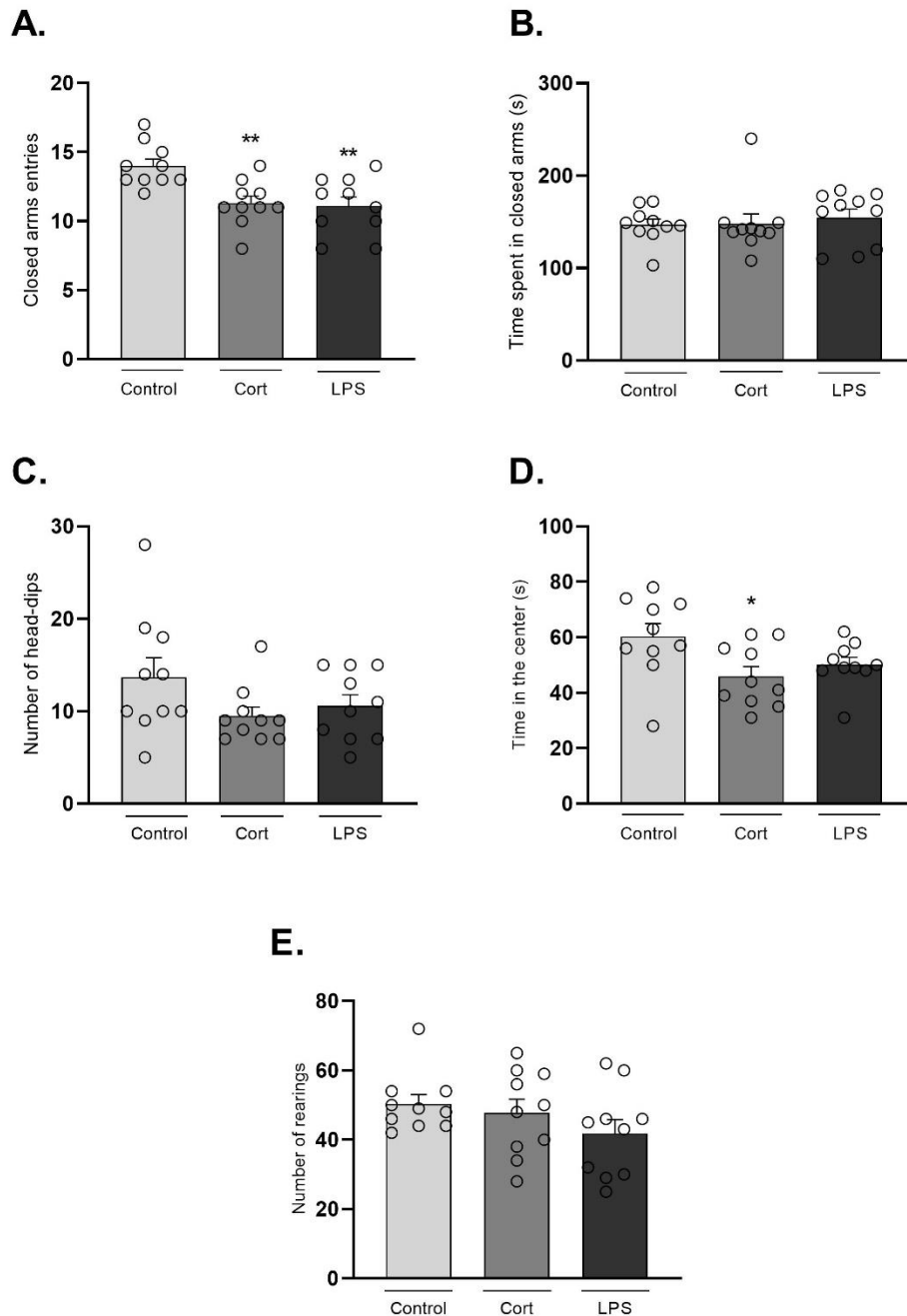


Fig. 3. Effects of corticosterone and lipopolysaccharide administration on the elevated plus maze (A, B, and C) and open field tests (D and E). A) number of closed arms entries in EPM; B) time spent in closed arms in EPM; C) number of head-dips in EPM; D) time spent in the central area in OFT; E) number of rearings in OFT. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 8 and the results were obtained using one-way ANOVA followed by

Tukey's post hoc test, or Kruskal–Wallis test followed by Dunn's post hoc test when appropriated. Values are expressed as the mean \pm SEM (n=10 mice/group). Significant differences: *p <0.05; ** p <0.01 when compared to control group.

REFERENCES

1. Daly M, Robinson E. Depression and anxiety during COVID-19. *The Lancet* 2022; **399**: 518.
2. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Depression. *WORLD HEALTH ORGANIZATION*, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression> (2019, accessed April 7, 2022).
3. Siddiqui F, Barbateskovic M, Juul S, Katakam KK, Munkholm K, Gluud C, Jakobsen JC. Duloxetine versus ‘active’ placebo, placebo or no intervention for major depressive disorder; a protocol for a systematic review of randomised clinical trials with meta-analysis and trial sequential analysis. *Systematic Reviews* 2021; **10**: 1–19.
4. Krishnan V, Nestler EJ. The molecular neurobiology of depression. *Nature* 2008 *455*:7215 2008; **455**: 894–902.
5. Gururajan A, Reif A, Cryan JF, Slattery DA. The future of rodent models in depression research. *Nature Reviews Neuroscience* 2019 *20*:11 2019; **20**: 686–701.
6. Calabrese F, Molteni R, Riva MA. Antistress properties of antidepressant drugs and their clinical implications. *Pharmacol Ther* 2011; **132**: 39–56.
7. Misztak P, Sowa-Kućma M, Pańcyszyn-Trzewik P, Szewczyk B, Nowak G. Antidepressant-like Effects of Combined Fluoxetine and Zinc Treatment in Mice Exposed to Chronic Restraint Stress Are Related to Modulation of Histone Deacetylase. *Molecules* 2022, *Vol 27*, Page 22 2021; **27**: 22.
8. Belzung C, Willner P, Philippot P. Depression: from psychopathology to pathophysiology. *Current Opinion in Neurobiology* 2015; **30**: 24–30.
9. Planchez B, Surget A, Belzung · Catherine. Animal models of major depression: drawbacks and challenges. *Journal of Neural Transmission* 2019; **126**: 1383–1408.
10. Zhao Y, Ma R, Shen J, Su H, Xing D, Du L. A mouse model of depression induced by repeated corticosterone injections. *Eur J Pharmacol* 2008; **581**: 113–120.
11. McEwen BS. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Research* 2000; **886**: 172–189.
12. Gregus A, Wintink AJ, Davis AC, Kalynchuk LE. Effect of repeated corticosterone injections and restraint stress on anxiety and depression-like behavior in male rats. *Behavioural Brain Research* 2005; **156**: 105–114.
13. Yan H-C, Cao X, Das M, Zhu X-H, Gao T-M. Behavioral animal models of depression. *Neurosci Bull* 2010; **26**: 327–337.
14. Maes M, Song C, Yirmiya R. Targeting IL-1 in depression. <https://doi.org/10.1517/147282222012718331> 2012; **16**: 1097–1112.
15. Taniguti EH, Ferreira YS, Stupp IJV, Fraga-Junior EB, Doneda DL, Lopes L, Rios-Santos F, Lima E, Buss ZS, Viola GG, Vandresen-Filho S. Atorvastatin prevents lipopolysaccharide-induced depressive-like behaviour in mice. *Brain Research Bulletin* 2019; **146**: 279–286.
16. Ferreira Mello BS, Monte AS, McIntyre RS, Soczynska JK, Custódio CS, Cordeiro RC, Chaves JH, Mendes Vasconcelos SM, Nobre Júnior HV, Florenço de Sousa FC, Hyphantis TN, Carvalho AF, Macêdo DS. Effects of doxycycline on depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide (LPS) administration. *Journal of Psychiatric Research* 2013; **47**: 1521–1529.
17. Maes M, Berk M, Goehler L, Song C, Anderson G, Gałeczki P, Leonard B. Depression and sickness behavior are Janus-faced responses to shared inflammatory pathways. *BMC Medicine* 2012; **10**: 1–19.
18. Moylan S, Maes M, Wray NR, Berk M. The neuroprogressive nature of major depressive disorder: pathways to disease evolution and resistance, and therapeutic implications. *Molecular Psychiatry* 2013 *18*:5 2012; **18**: 595–606.

19. Camargo A, Dalmagro AP, Rikel L, da Silva EB, Simão da Silva KAB, Zeni ALB. Cholecalciferol counteracts depressive-like behavior and oxidative stress induced by repeated corticosterone treatment in mice. *European Journal of Pharmacology* 2018; **833**: 451–461.
20. Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M. Behavioural despair in rats: A new model sensitive to antidepressant treatments. *European Journal of Pharmacology* 1978; **47**: 379–391.
21. Slattery DA, Cryan JF. Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. *Nat Protoc* 2012; **7**: 1009–1014.
22. Rodrigues FTS, de Souza MRM, Lima CN de C, da Silva FER, Costa DV da S, dos Santos CC, Miyajima F, de Sousa FCF, Vasconcelos SMM, Barichello T, Quevedo J, Maes M, de Lucena DF, Macedo D. Major depression model induced by repeated and intermittent lipopolysaccharide administration: Long-lasting behavioral, neuroimmune and neuroprogressive alterations. *Journal of Psychiatric Research* 2018; **107**: 57–67.
23. Krishna S, Dodd CA, Filipov NM. Behavioral and monoamine perturbations in adult male mice with chronic inflammation induced by repeated peripheral lipopolysaccharide administration. *Behavioural Brain Research* 2016; **302**: 279–290.
24. Chaves R de C, Mallmann ASV, Oliveira NF, Oliveira ICM, Capibaribe VCC, da Silva DMA, Lopes IS, Valentim JT, de Carvalho AMR, Macêdo DS, Vasconcelos SMM, Gutierrez SJC, Barbosa Filho JM, de Sousa FCF. Reversal effect of Riparin IV in depression and anxiety caused by corticosterone chronic administration in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 2019; **180**: 44–51.
25. Rosa PB, Ribeiro CM, Bettio LEB, Colla A, Lieberknecht V, Moretti M, Rodrigues ALS. Folic acid prevents depressive-like behavior induced by chronic corticosterone treatment in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 2014; **127**: 1–6.
26. Molendijk ML, de Kloet ER. Immobility in the forced swim test is adaptive and does not reflect depression. *Psychoneuroendocrinology* 2015; **62**: 389–391.
27. Lee KM, Coelho MA, Sern KR, Class MA, Bocz MD, Szumlinski KK. Anxiolytic effects of buspirone and MTEP in the Porsolt Forced Swim Test. *Chronic Stress (Thousand Oaks)*; **1**. Epub ahead of print June 27, 2017. DOI: 10.1177/2470547017712985.
28. Anyan J, Amir S. Too Depressed to Swim or Too Afraid to Stop? A Reinterpretation of the Forced Swim Test as a Measure of Anxiety-Like Behavior. *Neuropsychopharmacology* 2018 **43**:5 2017; **43**: 931–933.
29. Crowley JJ, Blendy JA, Lucki I. Strain-dependent antidepressant-like effects of citalopram in the mouse tail suspension test. *Psychopharmacology (Berl)* 2005; **183**: 257–264.
30. Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols* 2007; **2**: 322–328.
31. Sturman O, Germain PL, Bohacek J. Exploratory rearing: a context- and stress-sensitive behavior recorded in the open-field test. *Stress* 2018; **21**: 443–452.
32. Richards D. Prevalence and clinical course of depression: A review. *Clinical Psychology Review* 2011; **31**: 1117–1125.

ANEXO B – CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA



Comissão de Ética no Uso de Animais

da

Universidade Federal de Santa Maria

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITO DE SESSÕES DE TREINAMENTO HIPÓXICO INTERMITENTE SOBRE OS COMPORTAMENTOS TIPO ANSIEDADE E DEPRESSÃO EM CAMUNDONGOS", protocolada sob o CEUA nº 6484180520 (ID 003060), sob a responsabilidade de **Ellane Maria Zanchet** e equipe; *Guilherme Bochi Vargas; Luiz Osorio Cruz Portela; Francini Arboit; Brenda Moreira; Gabriele Cheiran Pereira* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA da UFSM) na reunião de 16/06/2020.

We certify that the proposal "EFFECT OF INTERMITTENT HYPOXIC TRAINING SESSIONS ON ANXIETY AND DEPRESSION BEHAVIORS IN MICE", utilizing 208 isogenics mice (208 females), protocol number CEUA 6484180520 (ID 003060), under the responsibility of **Ellane Maria Zanchet** and team; *Guilherme Bochi Vargas; Luiz Osorio Cruz Portela; Francini Arboit; Brenda Moreira; Gabriele Cheiran Pereira* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA da UFSM) in the meeting of 06/16/2020.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **10/2020** a **05/2022**

Área: **Departamento de Fisiologia E Farmacologia**

Origem: **Biotério Central UFSM**

Espécie: **Camundongos isogênicos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **2 a 3 meses**

N: **208**

Linhagem: **C57BL/6**

Peso: **25 a 35 g**

Local do experimento: Os experimentos serão realizados no Departamento de Fisiologia e Farmacologia, prédio 21. Sala/laboratório 5212 e 5214.

Santa Maria, 15 de julho de 2022

Dra. Patrícia Bräunig
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

Profa. Dra. Vania Lucia Loro
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria