

Nado forçado crônico diminui a ansiedade em camundongos

Chronic exposure to forced swimming decreases anxiety in mice

Arthur S. C. França^{1*}, Fabíola P. S. Rufino², Bruno Lobão Soares^{3,4} e Sidarta Ribeiro¹

¹Brain Institute, Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, Rio Grande do Norte, Brazil.

²Brazilian Institute of Environment and Natural Resources (IBAMA).

³Edmond and Lily Safra International Institute of Neuroscience of Natal (ELS-IINN), Natal, Rio Grande do Norte, Brazil.

⁴Departament of Biophysics and Pharmacology, Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, Rio Grande do Norte, Brazil.

*Contato: arthursergiof@neuro.ufrn.br

Resumo. Comportamentos de ansiedade têm sido relacionados ao estresse crônico em roedores e humanos. Em ratos, o teste de natação forçada (FST) é usado como uma tarefa de indução de estresse crônico. Aqui nós testamos a validade do FST como um indutor de ansiedade em camundongos. Dividimos os animais em dois grupos, FST (exposto ao FST durante 15 dias consecutivos) e controle (manipulação durante sessões semelhantes). O teste de labirinto em cruz elevado foi realizado durante o dia 16. Surpreendentemente, FST levou a uma diminuição nos parâmetros de ansiedade, incluindo o tempo e frequência nos braços abertos. Os resultados sugerem que FST crônico não promove a ansiedade em camundongos, mas leva à sua diminuição global. Este efeito pode estar relacionado aos benefícios do exercício leve, uma vez que os camundongos mostram mais capacidade de flutuação do que os ratos.

Palavras-chave. *Comportamentos de ansiedade; Labirinto em Cruz elevado; Exercício leve.*

Abstract. Anxiety-like behaviors have been related to chronic stress in rodents and humans. In rats, forced swimming test (FST) is used as a chronic stress-inducing task. Here we test the validity of FST as an anxiety inducer in mice. We divided animals in two groups, FST (exposed to FST for 15 consecutive days) and control (handled in similar sessions). Plus-maze test was performed during the day 16. Surprisingly, FST led to a decrease in the anxiety parameters, including time and frequency in open arms. The results suggest that chronic FST does not promote anxiety in mice, but rather leads its overall decrease. This effect may be related to benefits of mild exercise, since mice display more flotation capacity than rats.

Keywords. *Anxiety behaviors; Plus-Maze; Mild exercise.*

Recebido: 23fev16

Aceito: 11jul16

Publicado: 11jul16

Editado por José Guilherme Chauí-Berlink e revisado por Elisa Mari Akagi Jordão e Thiago Paes de Barros De Luccia

Introdução

Estresse agudo e crônico, oriundo do estresse social (Henriques-Alves and Queiroz, 2015; McEwen, 2012) ou de procedimentos comportamentais (Badowska-Szalewska e col., 2010; Deng e col., 2015; Linthorst e col., 2002; Sakakibara e col., 2005), vêm sendo relacionado a diversas mudanças de biomarcadores relacionados a plasticidade e neurotransmissores límbicos, (Badowska-Szalewska e col., 2010; Jiang e col., 2016; Leuner and Shors, 2013; Linthorst e col., 2002) que por sua vez também são relacionados a comportamentos de ansiedade e depressão (Campos e col., 2013; Deng e col., 2015; Jiang e col., 2016; Leuner and Shors, 2013).

A exposição repetida a fatores estressores agudos leva a respostas de estresse crônico em humanos e em animais (Qi e col., 2006). Em humanos, estressores crônicos podem produzir respostas não adaptativas que levam a desordens psicológicas, tais como desordens de ansiedade e depressão maior (Blanchard e col., 1993; Kozicz e col., 2008). Visando simular condições estressantes em huma-

nos, modelos animais de estresse vêm sendo testados a fim de produzir estados comportamentais comparáveis aos observados na nossa espécie (Qi e col., 2006).

O uso do teste de nado forçado (*Forced Swimming Test*, FST) para induzir estresse é amplamente usado em ratos (Badowska-Szalewska e col., 2010; Linthorst e col., 2002; Sakakibara e col., 2005). O nado forçado vem sendo relacionado (1) a mudanças nos níveis de fatores neurotróficos derivados do cérebro ("brain-derived neurotrophic factor", BDNF; Badowska-Szalewska e col., 2010), (2) a mudanças nos níveis de serotonina (Linthorst e col., 2002; Sakakibara e col., 2005) e (3) a diminuição nos níveis de ERK1/2 em regiões hipotalâmicas (Sakakibara e col., 2005). Embora o nado forçado seja classicamente usado para o estudo de modelos de depressão (Petit-Demouliere e col., 2004; Sakakibara e col., 2005), também foi relatado evidência direta de estresse induzido por nado forçado relacionado com comportamento de ansiedade em ratos (Habr e col., 2014).

Visando investigar em camundongos o link estabelecido entre nado forçado e comportamentos de ansiedade em ratos, submetemos os camundongos ao nado forçado cronicamente e ao final do protocolo o labirinto de cruz elevado foi utilizado para avaliar os comportamentos de ansiedade (Dawson and Tricklebank, 1995; Kheirbek e col., 2013; Lister, 1987; Pellow e col., 1985). Os resultados encontrados no presente trabalho mostram que os animais submetidos ao nado forçado crônico apresentam aumento no tempo gasto explorando os braços abertos no labirinto de cruz elevado, comportamento classicamente relacionado a menor ansiedade em roedores. Nós encontramos também uma forte tendência no aumento de comportamento de avaliação de risco *Flat-back approach* (FBA) e *head dipping* (mergulho), também relacionado a diminuição de ansiedade. Nossos resultados sugerem que nado forçado crônico não promove ansiedade em camundongos, pelo contrário, leva a diminuição da ansiedade.

Materiais e métodos

Animais

Camundongos adultos do tipo "Swiss" (n = 16) foram mantidos num ciclo de 12 horas de claro/escuro (luzes ligadas às 6 horas) e a temperatura foi mantida em $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Todos os animais tiveram acesso à água e ração à vontade. Todos os procedimentos comportamentais estiveram em concordância com procedimentos de ética animal recomendados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Grupos Comportamentais

Os animais foram separados em dois grupos: (1) Grupo Nado Forçado (FST), no qual os animais foram expostos ao procedimento de nado forçado crônico, teste classicamente usado para induzir estresse crônico e depressão (Petit-Demouliere e col., 2004, Porsolt e col., 1977) e (2) Grupo Controle, no qual os animais foram expostos somente a manipulação. Submetemos o grupo FST ao nado forçado em cilindros individuais de vidro (20 cm de altura, 15 cm de diâmetro) preenchidos com água ($24-27^\circ\text{C}$) até a 16 cm de altura. Cada camundongo (n = 6) foi colocado individualmente no cilindro e posteriormente forçado a nadar por 5 minutos uma vez ao dia por 15 dias consecutivos. Os animais do Grupo Controle (n=8) foram submetidos a 5 minutos de manipulação pelo experimentador uma vez ao dia por 15 dias consecutivos. Todos os procedimentos foram conduzidos entre as 08:00 e 16:00 horas para evitar mudanças no comportamento induzidos pelo ciclo claro/escuro. Os camundongos foram pesados no primeiro e último dia de procedimento a fim de verificar possíveis perdas de peso relacionadas ao estresse crônico e a diminuição de ingestão de comida. Durante o dia 16 ambos os grupos foram submetidos a avaliações em parâmetros de ansiedade no teste do labirinto em cruz elevado.

Labirinto em Cruz Elevado

A tarefa comportamental para acessar comportamentos de ansiedade no presente trabalho foi o labirinto

em cruz elevado (Dawson and Tricklebank, 1995; Kheirbek e col., 2013; Lister, 1987; Pellow e col., 1985), esse teste é baseado no comportamento natural dos roedores de evitar espaços abertos e altos (Pellow e col., 1985). Os parâmetros comportamentais de ansiedades avaliados no labirinto em cruz elevado foram (1) a frequências de entrada nos braços abertos, fechados e centro; (2) tempo de exploração nos braços abertos, fechados e centro; (3) frequência de mergulhos (*head dipping*) nos braços abertos (Dawson and Tricklebank, 1995; Kheirbek e col., 2013; Lister, 1987; Pellow e col., 1985) e comportamento de avaliação de risco relacionado a ansiedade no paradigma do labirinto em cruz elevado (Carola e col., 2002; Walf and Frye, 2007); (4) frequência de *grooming*; (5) frequência de aproximação com cautela (*flat-back approach*). Nós rastreamos e contabilizamos automaticamente a frequência de entrada e os tempos gastos nos braços usando o software Anymaze (Stoelting Co. USA). Os comportamentos foram contabilizados cegamente por um experimentador treinado usando o software Anymaze.

Análises estatísticas

Os dados foram analisados utilizando o Graphpad Prism. Inicialmente estabelecemos se os dados possuíam distribuição normal e variância homogênea com o teste de normalidade Shapiro-Wilk. Para as comparações entre os grupos Controle e FST, os dados que apresentaram distribuição normal foram comparados por teste t não pareado e os dados sem distribuição normal comparados com o teste de Mann-Whitney. Para as comparações do peso dos animais, aplicamos comparações multivariadas devido ao número de variáveis independentes. Então, nós usamos o teste ANOVA de duas vias, sendo o tempo (dia 1 vs dia 15) e o tratamento (Controle vs FST) como variáveis independentes e o peso em gramas como variável dependente. Nós provemos como estatística descritiva a média \pm Erro, número de animais por grupo e o valor de p.

Durante os procedimentos experimentais dois dos animais caíram ao explorar os braços abertos e foram retirados das análises estatísticas diminuindo o número de animais do grupo FST de 8 para 6.

Resultados

Peso corporal

Primeiro, nós investigamos se o procedimento de indução de estresse crônico utilizado no presente trabalho pôde diminuir o peso, característica vista em animais estressados (Jeong e col., 2013). Nós comparamos animais intra grupos para verificar se o nado forçado crônico ou a manipulação levaram a mudança de peso ao longo do procedimento, nós também verificamos se havia diferença entre os grupos. A ANOVA de duas vias (Tempo: $F(1, 24) = 0.12$, $p = 0.72$; Tratamento: $F(1, 24) = 0.23$, $p = 0.63$; Interação: $F(1, 24) = 0.03$, $p = 0.85$) foi aplicado comparando o grupo Controle (1º dia $54,78 \pm 1,6$ g e 15º dia $54,46 \pm 2,1$ g) e o grupo FST (1º dia $56 \pm 1,7$ g e 15º dia $55 \pm 1,6$ g). O teste estatístico revelou nenhuma diferença entre ou intra grupos, indicando que o nado forçado crônico não levou ao decréscimo no peso dos animais.

Comportamentos de Ansiedade

A fim de avaliar o comportamento de ansiedade, submetemos os animais ao Labirinto em cruz elevado, no dia 16. Nós usamos o tempo e frequência de entrada nos braços (Carobrez e Bertoglio, 2005) e comportamentos de avaliação de risco (Henriques-Alves e Queiroz, 2015) como métricas para indicar possíveis mudanças nos comportamentos de ansiedade. Nós aplicamos Mann-Whitney para comparar o parâmetro de tempo nos braços abertos entre FST e Controles ($14,13 \pm 7,311$ s e $0,22 \pm 0,22$ s, respectivamente, $U = 10,0$, $p = 0.042$). O teste revelou que o grupo FST passou mais tempo do que o grupo Controle nos braços abertos (Figura 1A). Por outro lado, os animais do grupo FST exibiram menos tempo nos braços fechados do que os controles de acordo com teste t não pareado ($229,5 \pm 13,09$ s e $265,6 \pm 7,90$ s, respectivamente, $t(12) = 2,49$, $p = 0,028$, Figura 1A). Nenhuma diferença entre FST e Controle foi verificada com o teste t quando se compara o tempo gasto no centro ($49,32 \pm 6,45$ s e $31,48 \pm 8,45$ s, respectivamente, $t(12) = 1,579$ $p = 0,14$). Em seguida, comparamos com teste t a frequência de entrada nos braços entre o grupo FST e Controle, o que indicou um maior número de entradas nos braços abertos no grupo FST ($2,00 \pm 0,93$ contra $0,12 \pm 0,12$, respectivamente, $t(12) = 2,32$, $p = 0,039$), nos braços fechados ($11,83 \pm 1,086$ contra $6,5 \pm 1,08$, respectivamente, $t(12) = 2,6$, $p = 0,023$) e no centro ($12,83 \pm 1,55$ contra $1,08 \pm 6,625$, respectivamente, $p = 0,005$, Figura 1B).

A análise dos comportamentos relacionados com a avaliação de risco não revelou nenhuma diferença entre FST e o grupo controle quando comparamos o número total de *flat-back approach* ($21,33 \pm 1,56$ contra $21,88 \pm 3,921$, respectivamente, $U = 21$, $p = 0,74$), *grooming* ($0,83 \pm 0,40$ contra $2,12 \pm 0,64$, respectivamente, $U = 13,5$, $p = 0,18$) e, embora nós podemos ver uma tendência no comportamento *head dipping*, o teste de Mann-Whitney não revelou diferença entre FST e os grupos de controle ($15,00 \pm 4,19$ contra $6,25 \pm 1,90$, respectivamente, $U = 9,0$, $p = 0,059$, Figura 1C).

A atividade locomotora

Finalmente, comparamos a atividade locomotora do grupo FST e do

grupo de Controle. Nós dividimos o aparato do labirinto de cruz elevado em seções de 5 cm quadrados e por contagem do número de travessias no labirinto obtivemos uma medida indireta da atividade locomotora. A comparação do teste t não revelou nenhuma diferença entre os grupos, o teste t não revelou diferenças ($46,13 \pm 7,90$ cruzamentos e 38.14 ± 8.01 cruzamentos, $t(12) = 0,68$ $p = 0,49$).

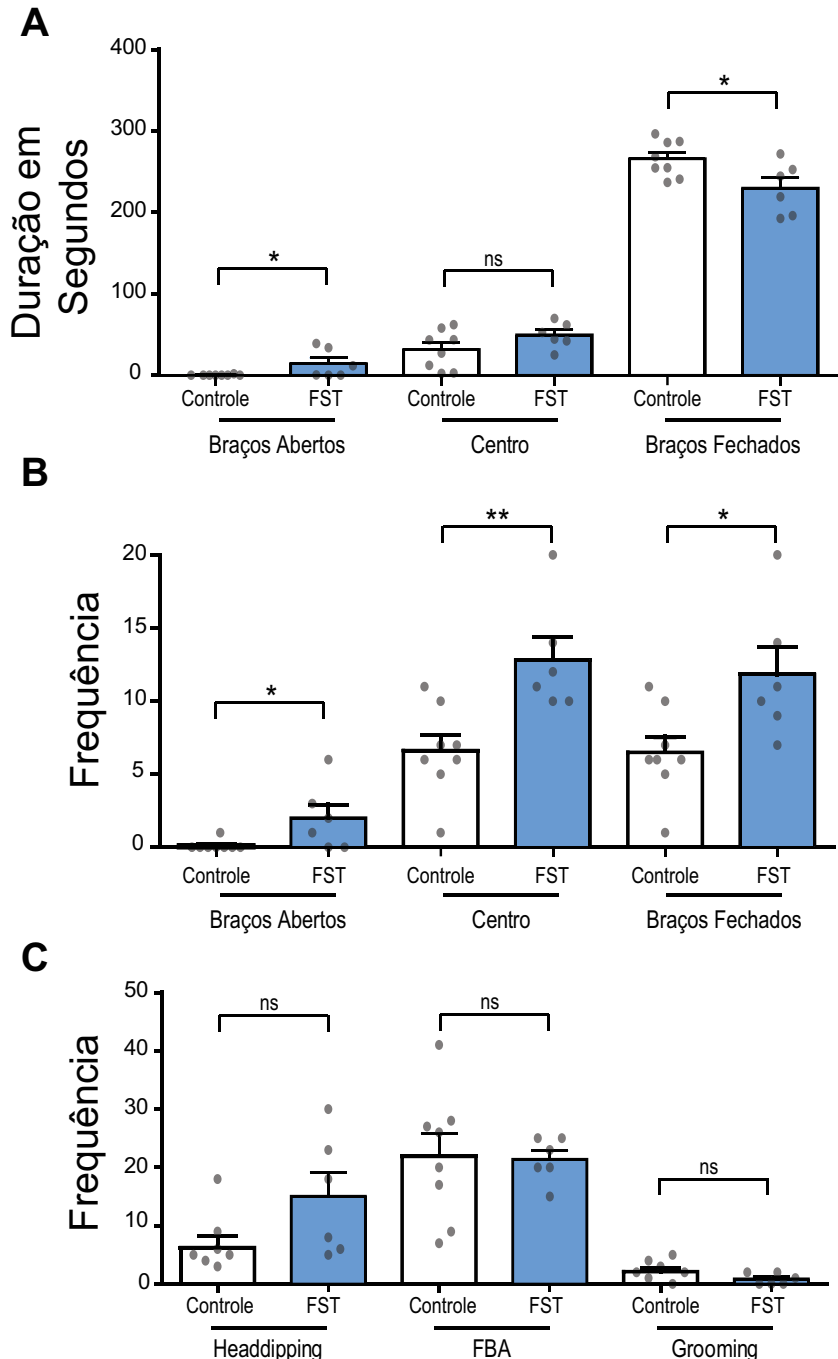


Figura 1. Procedimento de nado forçado crônico diminui comportamentos de ansiedade em camundongos. A: Tempo gasto (duração) em segundos nos braços (abertos e fechados) ou centro de labirinto em cruz. B: Número de entradas nos braços abertos e fechados, ou centro de EPM. C: Frequência de comportamentos relacionados à ansiedade: *head-dipping*, *flat-back approach* (FBA) e *grooming*. Colunas brancas: grupo controle. Azul coluna: Grupo FST. Todas as comparações foram feitas com teste t de Student T ou Mann-Whitney entre estes dois grupos para cada um dos parâmetros (duração ou frequência do comportamento), os dados apresentados com média \pm SEM. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Discussão

A perda de peso é um indicador de estresse em modelos animais de estresse crônico (Jeong e col., 2013; Blanchard e col., 1993). Em animais expostos ao teste de nado forçado não foi encontrada diferença de peso em comparação com os controles. Se os animais tinham desenvolvido o estresse crônico, teríamos provavelmente observado um declínio no peso. Os resultados indicam que o nado forçado não produz grandes sintomas de estresse crônico.

Diversos estudos dão suporte a ideia de que o estresse crônico pode influenciar a regulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (Chaudieu e col., 2008; Derijk e col., 2008; Kozicz e col., 2008; Sakakibara e col., 2005), o que aumenta a ocorrência de comorbidades, como depressão e ansiedade (Campos e col., 2013; Deng e col., 2015; Jiang e col., 2016; Leuner e Shors, 2013). Surpreendentemente, os nossos resultados sugerem que quinze dias consecutivos de nado forçado não foi capaz de produzir estresse crônico ou sintomas de ansiedade em camundongos.

O labirinto em cruz elevado é um teste padrão para medir respostas de ansiedade (Dawson e Tricklebank, 1995; Kheirbek e col., 2013; Lister, 1987; Pellow e col., 1985). O aumento no número de entradas nos braços está relacionado com um aumento da atividade motora (Cornélio e Nunes-de-Souza, 2007). A atividade locomotora é um parâmetro adicional para avaliar sintomas de estresse, já que estresse crônico produz alterações na locomoção devido à diminuição da exploração do ambiente. Qi e col. (2006), utilizando um modelo de comportamento semelhante (Nado Forçado Crônico) em ratos, observaram uma diminuição na atividade motora, enquanto que os nossos resultados não mostraram esse comportamento, o que não é indicativo de ansiedade ou depressão (Ducottet e Belzung, 2005). Este resultado pode estar relacionado com as espécies animais (camundongos, em vez de ratos) utilizados no presente experimento. Estudos com nado forçado também relataram reações diferentes em relação às espécies animais que são comumente usados nestes modelos (Armario e col., 1995; López-Rubalcava e Lucki, 2000).

No geral, nossos resultados sugerem que o protocolo nado forçado crônico empregado neste estudo foi mais semelhante a uma fonte de exercício crônica leve do que um estressor crônico. O número de entradas nos braços abertos e o tempo gasto nos braços abertos estavam significativamente aumentados em camundongos expostos ao nado forçado crônico. A forte tendência de aumento no número de *head-dipping* em animais FST, em comparação com os Controles, pode indicar que este comportamento de avaliação de risco está relacionada com a diminuição dos níveis de ansiedade (Henriques-Alves e Queiroz, 2015; Porsolt e col., 1977). Este resultado pode reforçar a noção de que o nado forçado crônico em camundongos representa um exercício equilibrado, ao invés de um estímulo de estresse crônico (Pietrelli et al, 2011; Salim e col., 2010).

Vários estudos têm apontado as diferenças entre o exercício equilibrado e exercícios excessivos. O estresse produzido pelo exercício moderado leva a uma diminui-

ção da ansiedade, enquanto o alto nível de estresse relacionado ao exercício excessivo provoca déficits cognitivos e pode até levar a danos no corpo (Marais e col., 2009; Pietrelli e col., 2011; Salim e col., 2010; van Praag, 2009). Exercícios aeróbicos equilibrados conduzem a uma melhoria das funções cognitivas e uma diminuição da ansiedade (Marais et al, 2009; Salim et al, 2010; van Praag, 2009). Exercícios leves em modelos animais e humanos reduz os danos causados por ansiedade ou estresse, e resulta em benefícios de saúde totais (Salim e col., 2010; van Praag, 2009). A capacidade de flutuação maior em camundongos, em comparação com ratos, pode explicar por que a natação forçada é um estressor mais suave em camundongos.

Conclusão

O presente estudo sugere que camundongos expostos ao nado forçado de forma repetida leva a diminuição da ansiedade devido ao exercício moderado. Isto significa que a utilização de nado forçado como um modelo de ansiedade em camundongos pode exigir um ajustamento do protocolo, estabelecer condições mais estressantes. É sugerido aqui que um aumento no tempo de natação ou a fixação de um peso extra para a cauda do rato pode compensar a flutuação aumentada de camundongos, possivelmente fornecendo o esforço muscular necessário para produzir o estresse crônico e ansiedade nesta tarefa.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a Lissandra pela supervisão e contribuições do trabalho. A pesquisa foi financiada pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Pew Latin-American Program in Biomedical Science, FINEP 01.06.1092.00, INCT-CNPq/MCT INCENMAQ 704134/2009, CNPq Universal 481506/2007-1, and Associação Alberto Santos Dumont para Apoio à Pesquisa (AASDAP).

Chronic exposure to forced swimming decreases anxiety in mice

Arthur S. C. França, Fabíola P. S. Rufino, Bruno Lobão Soares and Sidarta Ribeiro

Introduction

Acute and chronic stress, arising from the social stress (Henriques-Alves and Queiroz, 2015; McEwen, 2012) or behavioral procedures (Badowska-Szalewska et al., 2010; Deng et al., 2015; Linthorst et al., 2002; Sakakibara et al., 2005), have been reported to change several brain biomarkers related to plasticity and limbic transmitters (Badowska-Szalewska et al., 2010; Jiang et al., 2016; Leuner and Shors, 2013; Linthorst et al., 2002) that are also related to anxiety and depression-like behaviors (Campos et al., 2013; Deng et al., 2015; Jiang et al., 2016; Leuner and Shors, 2013). The repeated exposure to acute stress stimuli leads to chronic stress responses in humans and animal models (Qi et al., 2006). In humans, chronic stressors may produce maladaptive responses that led to psychological disorders such as anxiety disorders and major depression (Blanchard et al., 1993; Kozicz et al., 2008). Aiming to simulate stressful conditions in humans, animal models of stress have been tested to produce “allostatic” states comparable to those observed in our species (Qi et al., 2006).

The usage of forced swimming test (FST) to induce stress is broadly used in rats (Badowska-Szalewska et al., 2010; Linthorst et al., 2002; Sakakibara et al., 2005). It has been reported that FST (1) modulates levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF; Badowska-Szalewska et al., 2010); (2) influences serotonin levels (Linthorst et al., 2002; Sakakibara et al., 2005), which is linked to the limbic system; and (3) reduces ERK1/2 levels in the hypothalamus regions (Sakakibara et al., 2005). Although FST is classically used to study depression-like behaviors (Petit-Demouliere et al., 2004; Sakakibara et al., 2005) we also found report of directly evidence of stress induced by FST related to anxiety-like behavior in rats (Habr et al., 2014).

Aiming to investigate if the established link between FST and anxiety-like behavior found in rats also occur in mice, we conducted an experiment submitting mice to chronic FST and by the end of the protocol performed plus-maze in order to evaluate anxiety-like behaviors (Dawson and Tricklebank, 1995; Kheirbek et al., 2013; Lister, 1987; Pellow et al., 1985). Results found in the present work show that animals submitted to chronic FST display increased time spent in open arms of the plus-maze, a behavior that is classically related to decrease of anxiety in rodents. We also found a strong increasing trend of risk evaluation behavior of head-dipping, also related to a decrease of anxiety. Our results suggest that chronic FST does not promote anxiety in mice, but rather leads to an overall decrease of anxiety.

Materials and methods

Animals

Adult Swiss mice (n=16) were kept in a 12-h light-dark cycle (lights on at 06:00 a.m.) and the temperature was kept at 24 ± 1 °C. All animals had access to food and water ad libitum. Housing and behavioral procedures were in accordance with the animal ethical procedures recommended by Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Behavioral Groups

The animals were separated in two groups: (1) the FST group, in which the animals were exposed to the chronic forced swimming procedure, test classically used to induce chronic stress and depression (Petit-Demouliere et al., 2004; Porsolt et al., 1977); and (2) the Control group, in which the animals were exposed only to chronic handling. In the FST group we submitted animals to the FST in individual glass cylinders (20 cm tall, 15 cm in diameter) filled with water (24-27 °C) to a depth of 16 cm. Each mouse (n=6) was individually placed inside a cylinder and therefore forced to swim for 5 min once a day, for 15 consecutive days. Animals in the Control group (n=8) were subjected to 5 min of handling by the experimenter once a day, for 15 consecutive days. All procedures were conducted between 08:00 and 16:00h to avoid behavior difference induced by dark/light period. Mice were weighted on the 1st and 15th day of the experiment, in order to evaluate possible weight loss related to chronic stress and decreased food intake. During the day 16 both groups were submitted to evaluation of anxiety parameters in the elevated plus-maze test.

Elevated Plus-maze

The behavioral task to assess anxiety-like behavior used in the present work was the elevated plus-maze (EPM) (Dawson and Tricklebank, 1995; Kheirbek et al., 2013; Lister, 1987; Pellow et al., 1985), a test based on the natural behavior of rodents to avoid open and/or high places (Pellow et al., 1985). After the 15 days of chronic swimming or chronic handling, animals were submitted, in the day 16, to the plus-maze. The anxiety-related behavioral parameters evaluated in the EPM were (1) frequencies of entry in open arms, closed arms and center; (2) duration of time spent in open arms, closed arms, and center; (3) frequency of head-dipping in open arms (Dawson and Tricklebank, 1995; Kheirbek et al., 2013; Lister,

1987; Pellow et al., 1985) and the risk assessment behaviors related to anxiety in the plus-maze paradigm (Carola et al., 2002; Walf and Frye, 2007): (4) frequency of grooming; (5) frequency of flat-back approaches. We tracked automatically the parameters time spent and the entrance frequency of the arms by using the software AnyMaze (Stoelting Co. USA). The behaviors were blindly scored by a trained observer using the ethological analysis software AnyMaze.

Statistical Analyses

The data were analyzed using Graphpad Prism 5.0. Initially we established that the data were normally distributed and showed homogeneous variances with Shapiro-Wilk normality test. For comparisons between control and FST groups, the data that were normally distributed were compared by the parametric un-paired student's t-test and the data that did not pass normality test were compared by Mann-Whitney. For the comparison of animal weight, we applied multivariate analysis because of the number of independent variables. So, we used the Two-way ANOVA using the time (day 1 and day 15) and treatment (Control and FST groups) as independent variables and the weight measure as the dependent variable. The descriptive statistics provided were the mean \pm SEM, number of animals per group and p value. We considered alpha of 0.05.

During the experimental procedures, two animals fell while exploring the open arms: these animals were withdrawn of the statistical analyses, decreasing the number of FST group from 8 to 6 animals.

Results

Body weight

First we investigated if the chronic stress procedure utilized in the present work could result in similar decrease of weight seen in stressed animals (Jeong et al., 2013). We compared animals within groups to see if the chronic FST or handling would change the weight along the procedure; we also verified if we could see a difference between groups. The Two-way ANOVA (Time: $F(1, 24) = 0.12, p = 0.72$; Treatment: $F(1, 24) = 0.23, p = 0.63$; Interaction: $F(1, 24) = 0.03, p = 0.85$) was then applied comparing Control group (1st day $54,78 \pm 1,6g$ and 15th day $54,46 \pm 2,1g$) and FST group (1st day $56 \pm 1,7 g$ and $55 \pm 1,6g$).

Two-way ANOVA revealed no difference within or between groups, indicating that the chronic FST procedure did not lead to a decrease in animal weight.

Anxiety-like behaviors

In order to evaluate anxiety-like behavior, we submitted the animals to the EPM in the day 16. We used time and frequency of entrance in the arms (Carobrez and

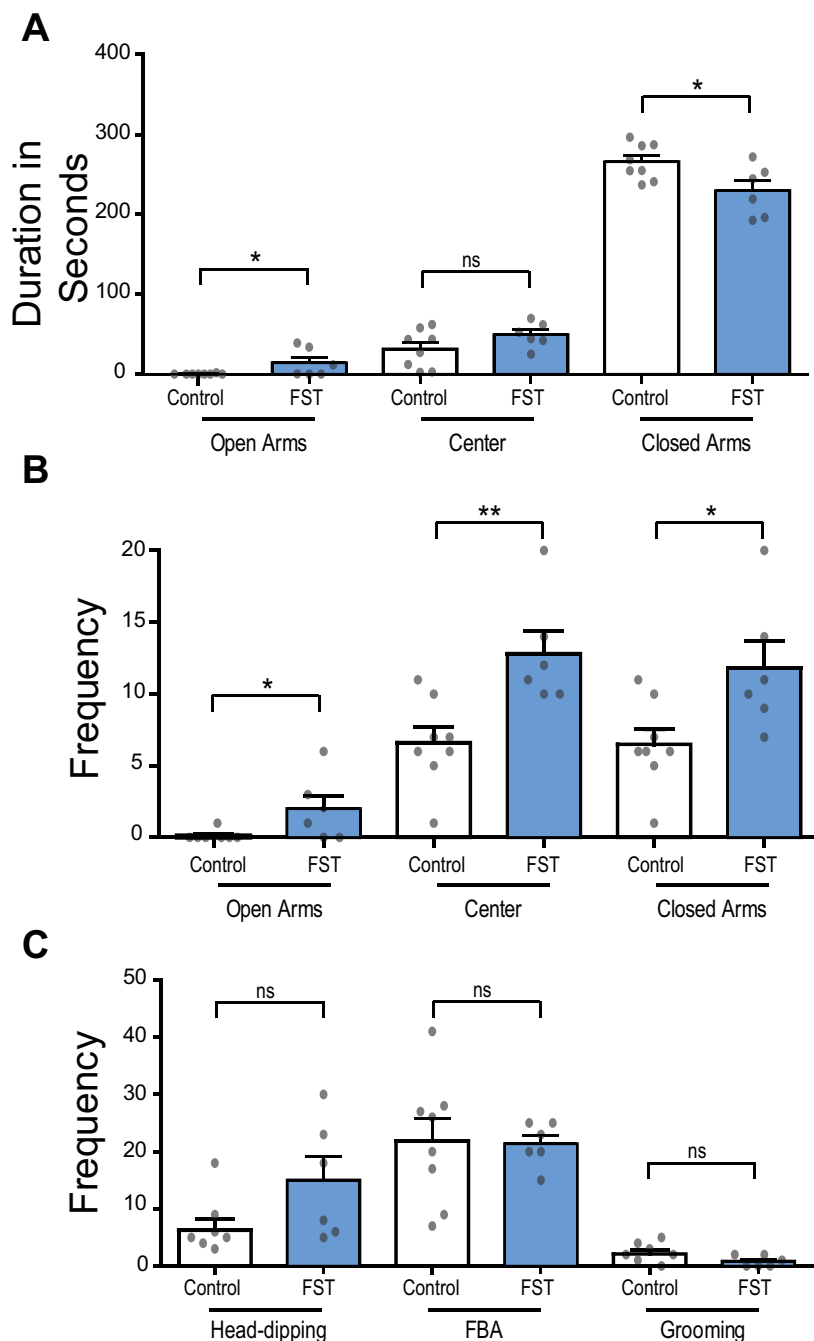


Figure 1. Chronic forced swimming procedure decrease anxiety-like behavior in the Elevated Plus-Maze (EPM) in mice. A: Time spent (duration) in seconds in the arms (open and closed) or center of plus-maze. B: Number of entries in open and closed arms, or center of EPM. C: Frequency of anxiety-related behaviors: Head-dipping, flat-back approach (FBA) and grooming. White columns: Control group. Blue column: FST group. All comparisons used Student's T test or Mann-Whitney between these two groups for each parameter (duration or frequency of behavior), data shown with mean \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Bertoglio, 2005) and behaviors related to risk assessment (Henriques-Alves and Queiroz, 2015) as metrics to indicate possible changes in anxiety-like behaviors. We applied Mann-Whitney to compare the parameter time in open arms between FST and Controls (14.13 ± 7.311 sec and 0.22 ± 0.22 sec, respectively, $U = 10.0$, $p = 0.042$). The test revealed that the FST group spent significantly more time than the Control group in the open arms (figure 1A). Conversely, animals in the FST group displayed less time in the closed arms than Controls according to unpaired t test (229.5 ± 13.09 sec and 265.6 ± 7.90 sec, respectively, $t(12) = 2.49$, $p = 0.028$ Figure 1A). No difference between FST and Control was verified with t test when we compared the time spent in the center (49.32 ± 6.45 sec and 31.48 ± 8.45 sec, respectively, $t(12) = 1.579$ $p = 0.14$). Accordingly, t test applied comparing the entrance frequency of mice in the FST and control groups also displayed an increased number of entries in open arms (2.00 ± 0.93 , 0.12 ± 0.12 respectively, $t(12) = 2.32$, $p = 0.039$), closed arms (11.83 ± 1.086 versus 6.5 ± 1.08 , respectively, $t(12) = 2.6$, $p = 0.023$) and center (12.83 ± 1.55 versus 6.625 ± 1.08 respectively, $p = 0.005$, Figure 1B).

The analysis of behaviors related to risk assessment revealed no difference between FST and Control groups when we compared the total number of flat back approaches (21.33 ± 1.56 versus 21.88 ± 3.921 respectively, $U = 21$, $p = 0.74$) and grooming (0.83 ± 0.40 versus 2.12 ± 0.64 , respectively, $U = 13.5$, $p = 0.18$). However, we can see a trend in the Head-dipping behavior despite of the Mann-Whitney test did not revealed difference between FST and Control groups (15.00 ± 4.19 versus 6.25 ± 1.90 , respectively, $U = 9.0$, $p = 0.059$, Figure 1C).

Locomotor Activity

Finally, we compared the locomotor activity of the FST group and Control group. For this, we divided the plus-maze apparatus in sections of 5 cm squares and counted the number of crossings in the maze to obtain an indirect measurement of locomotor activity. The t test comparison revealed no difference between groups (46.13 ± 7.90 crossings and 38.14 ± 8.01 crossings, $t(12) = 0.68$ $p = 0.49$).

Discussion

Loss of weight is a stress indicator in animal models of chronic stress (Jeong et al., 2013, Blanchard et al., 1993). In animals exposed to the forced swimming test we found no statistically significant weight difference in comparison with Controls. If the animals had developed chronic stress, we would have probably observed a decline of weight. The results indicate that forced swimming failed to produce major chronic stress symptoms.

Several studies support the idea that chronic stress can influence the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (Chaudieu et al., 2008; Derijk et al., 2008; Kozicz et al., 2008; Sakakibara et al., 2005), which increases the occurrence of comorbidities such as depression and anxiety (Campos et al., 2013; Deng et al., 2015; Jiang et al., 2016; Leuner and Shors, 2013). Surprisingly, con-

trary to what is observed in rats, our results suggest that fifteen consecutive days of forced swimming could not produce chronic stress or anxiety symptoms in mice.

The elevated plus-maze is a standard test for measuring anxiety responses (Dawson and Tricklebank, 1995; Kheirbek et al., 2013; Lister, 1987; Pellow et al., 1985). The increase in the number of general arm entries is related to an enhancement of motor activity (Cornélio and Nunes-de-Souza, 2007). Locomotor activity is an additional variable to evaluate stress symptoms, since chronic stress produces an alteration in locomotion due to decreased exploration of the environment. Qi et al. (2006), using a similar behavioral model (chronic forced swimming) on rats, observed a decrease in motor activity, while our results show no such behavior, and cannot be an indicative of anxiety or depression (Ducottet and Belzung, 2005). This result may be related to the animal species (mice, instead of rats) used in the current experiment. Forced swimming studies have also reported different reactions regarding the animal species that are commonly used in these models (Armario et al., 1995; López-Rubalcava and Lucki, 2000).

Overall, our results suggest that the chronic swimming protocol employed in this study was less a chronic stressor than a source of mild chronic exercise. The number of entries in open arms and the time spent in these arms were significantly increased in mice exposed to chronic swimming. Together, the strong trend of increased Head-dipping numbers in FST animals, in comparison with Controls, may indicate that this risk assessment behavior is related to decrease anxiety levels (Henriques-Alves and Queiroz, 2015; Porsolt et al., 1977). These results can be strengthening the notion that chronic swimming in mice represents mild exercise, instead of a chronic stress stimulus (Pietrelli et al., 2011; Salim et al., 2010).

Several studies have pointed out the differences between balanced and excessive exercise. The stress produced by moderate exercise leads to a decrease of anxiety, while the high stress related to excessive exercise causes cognitive deficits and may even lead to body damage (Marais et al., 2009; Pietrelli et al., 2011; Salim et al., 2010; van Praag, 2009). Balanced aerobic exercise leads to improvement of cognitive functions and a decrease in anxiety (Marais et al., 2009; Salim et al., 2010; van Praag, 2009). Mild exercise in animal models and humans reduces the damage caused by anxiety or stress, and results in overall health benefits (Salim et al., 2010; van Praag, 2009). The greater flotation capability in mice, in comparison with rats, may explain why forced swimming is a milder stressor in mice.

Conclusions

The present study suggests that mice exposed to repeated forced swimming display decreased anxiety due to moderate exercise. This means that the use of forced swimming as an anxiety model in mice may require adjustments of the protocol towards more stressful conditions. We suggest that an increase in swimming time or the attachment of an extra weight to the mouse tail may

compensate the enhanced flotation of mice, possibly providing the muscle effort required to produce chronic stress and anxiety in this task.

Acknowledgements

We want to thank Lissandra for the supervision on the work. The research was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Pew Latin-American Program in Biomedical Science, FINEP 01.06.1092.00, INCT-CNPq/MCT INCEMAQ 704134/2009, CNPq Universal 481506/2007-1, and Associação Alberto Santos Dumont para Apoio à Pesquisa (AASDAP).

References:

- Armario A, Gavaldà A, Martí, J. 1995. Comparison of the behavioural and endocrine response to forced swimming stress in five inbred strains of rats. *Psychoneuroendocrinology* 20, 879–890.
- Badowska-Szalewska E, Spodnik E, Klejbor I, Morys J. 2010. Effects of chronic forced swim stress on hippocampal brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its receptor (TrkB) immunoreactive cells in juvenile and aged rats. *Acta Neurobiol. Exp. (Warsz.)* 70, 370–381.
- Blanchard DC, Sakai RR, McEwen B, Weiss SM, Blanchard, RJ, 1993. Subordination stress: behavioral, brain, and neuroendocrine correlates. *Behav. Brain Res.* 58, 113–121.
- Campos AC, Fogaça MV, Aguiar DC, Guimaraes, FS, 2013. Animal models of anxiety disorders and stress. *Rev. Bras. Psiquiatr.* S101-111
- Carobrez AP, Bertoglio LJ. 2005. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29, 1193–1205.
- Carola V, D'Olimpio F, Brunamonti E, Mangia F, Renzi P. 2002. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. *Behav. Brain Res.* 134, 49–57.
- Chaudieu I, Beluche I, Norton J, Boulenger JP, Ritchie K, Ancelin ML. 2008. Abnormal reactions to environmental stress in elderly persons with anxiety disorders: evidence from a population study of diurnal cortisol changes. *J. Affect. Disord.* 106, 307–313.
- Cornélio AM, Nunes-de-Souza RL. 2007. Anxiogenic-like effects of mCPP microinfusions into the amygdala (but not dorsal or ventral hippocampus) in mice exposed to elevated plus-maze. *Behav. Brain Res.* 178, 82–89.
- Dawson GR, Tricklebank MD, 1995. Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. *Trends Pharmacol. Sci.* 16, 33–36.
- Deng XY, Li HY, Chen JJ, Li RP, Qui R, Fu Q, Ma SP. 2015. Thymol produces an antidepressant-like effect in a chronic unpredictable mild stress model of depression in mice. *Behav. Brain Res.* 291, 12–19.
- Derijk RH, van Leeuwen N, Klok MD, Zitman FG. 2008. Corticosteroid receptor-gene variants: modulators of the stress-response and implications for mental health. *Eur. J. Pharmacol.* 585, 492–501.
- Ducottet C, Belzung C. 2005. Correlations between behaviours in the elevated plus-maze and sensitivity to unpredictable subchronic mild stress: evidence from inbred strains of mice. *Behav. Brain Res.* 156, 153–162.
- Habr SE, Macrini DJ, Spinosa H de S, Florio JC, Bernardi, MM. 2014. Repeated forced swim stress has additive effects in anxiety behavior and in catecholamine levels of adult rats exposed to deltamethrin. *Neurotoxicol. Teratol.* 46, 57–61.
- Henriques-Alves AM, Queiroz CM. 2015. Ethological Evaluation of the Effects of Social Defeat Stress in Mice: Beyond the Social Interaction Ratio. *Front. Behav. Neurosci.* 9, 364.
- Jeong JY, Lee DH, Kang SS. 2013. Effects of Chronic Restraint Stress on Body Weight, Food Intake, and Hypothalamic Gene Expressions in Mice. *Endocrinol. Metab.* 28, 288.
- Jiang YM, Li XJ, Meng ZZ, Liu YY, Zhao HB, Li N, Yan ZY, Ma QY, Zhang HT, Chen JX. 2016. Effects of Xiaoyaosan on Stress-Induced Anxiety-Like Behavior in Rats: Involvement of CRF1 Receptor. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM* 2016, 1238426.
- Kheirbek MA, Drew LJ, Burghardt NS, Costantini DO, Tannenholz L, Ahmari SE, Zeng H, Fenton AA, Hen R. 2013. Differential Control of Learning and Anxiety along the Dorsoventral Axis of the Dentate Gyrus. *Neuron.* 77, 955–968.
- Kozicz T, Bordewin L A P, Czéh B, Fuchs E, Roubos EW. 2008. Chronic psychosocial stress affects corticotropin-releasing factor in the paraventricular nucleus and central extended amygdala as well as urocortin 1 in the non-preganglionic Edinger-Westphal nucleus of the tree shrew. *Psychoneuroendocrinology* 33, 741–754.
- Leuner B, Shors TJ. 2013. Stress, anxiety, and dendritic spines: what are the connections? *Neuroscience* 251, 108–119.
- Linthorst ACE, Peñalva RG, Flachskamm C, Holsboer F, Reul, JMHM, 2002. Forced swim stress activates rat hippocampal serotonergic neurotransmission involving a corticotropin-releasing hormone receptor-dependent mechanism. *Eur. J. Neurosci.* 16, 2441–2452.
- Lister RG. 1987. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl.)* 92, 180–185.
- López-Rubalcava C, Lucki I, 2000. Strain Differences in the Behavioral Effects of Antidepressant Drugs in the Rat Forced Swimming Test. *Neuropsychopharmacology* 22, 191–199.
- Marais L, Stein DJ, Daniels WMU. 2009. Exercise increases BDNF levels in the striatum and decreases depressive-like behavior in chronically stressed rats. *Metab. Brain Dis.* 24, 587–597.
- McEwen BS, 2012. Brain on stress: how the social environment gets under the skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 Suppl 2, 17180–17185.
- Pietrelli A, López-Costa JJ, Goñi R, López EM, Brusco A, Basso, N. 2011. Effects of moderate and chronic exercise on the nitrenergic system and behavioral parameters in rats. *Brain Res.* 1389, 71–82.
- Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M, 1977. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch. Int. Pharmacodyn. Thérapie* 229, 327–336.
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. 1985. Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods* 14, 149–167.
- Petit-Demouliere B, Chenu F, Bourin M. 2004. Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. *Psychopharmacology (Berl.)* 177, 245–255.
- Qi X, Lin W, Li J, Pan Y, Wang W. 2006. The depressive-like behaviors are correlated with decreased phosphorylation of mitogen-activated protein kinases in rat brain following chronic forced swim stress. *Behav. Brain Res.* 175, 233–240.
- Sakakibara H, Ishida K, Izawa Y, Minami Y, Saito S, Kawai Y, Butterweck V, Tamaki T, Nakaya Y, Terao J. 2005. Effects of forced swimming stress on rat brain function. *J. Med. Investig. JMI* 52 Suppl, 300–301.

- Salim S, Sarraj N, Taneja M, Saha K, Tejada-Simon MV, Chugh G. 2010. Moderate treadmill exercise prevents oxidative stress-induced anxiety-like behavior in rats. *Behav. Brain Res.* 208, 545–552.
- Van Praag H. 2009. Exercise and the brain: something to chew on. *Trends Neurosci.* 32, 283–290.
- Walf AA, Frye CA. 2007. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat. Protoc.* 2, 322–328.