

Los índices depresivos y antidepresivos durante la prueba de nado forzado se asocian diferencialmente con la estación del año y el ciclo estral en ratas Wistar hembras

Vicente Jaffar-Medina², Alexsandra Lucia Rosado-Pérez², Ana Gisela Flores-Serrano¹, José Luis Torres-Escalante², Juan Carlos Pineda^{1*}

¹Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi, Universidad Autónoma de Yucatán; ²Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán.

ABSTRACT

Depressive and antidepressant indices during the forced swim test are differentially associated with the seasonality and estrous cycle in female Wistar rats.

Introduction. Both, the influence of antidepressant drugs and the antidepressant behaviors in animal models are conditioned both by seasons of the year and by estrus stage in depressive individuals. However, at present, the influence of these factors remains poorly studied in the animal models. In the forced swimming test (FST) the depressant indexes are referred to the basal behavior produced in the early five minutes of the test. In this period, unconditioned depressant- and antidepressant-like behaviors are developed, and they are the control parameter of the model, which are used as the basal index to compare the depressive-like indexes in its second part of the test. Estrous cycle and season affect this test. However, the influences of these factors have not been studied.

Objective. Identify the influence of season and estrous cycle on the depressant- (immobility time; IT) and antidepressant-like indexes (CT and ST) in the forced swimming in a basal condition.

Methods. We measured depressive and antidepressant index, during a five minute session of forced swimming, at different seasons of the year and estrous stages in female Wistar rats.

Results. While no differences in the open field test were detected in different seasons, the IT was larger in the summer or autumn, than in winter during the forced swim. While ST was larger in the winter than summer or autumn only during diestrus stage. The estrous stage length, but not the estrous cycle length, was longer in summer than winter.

Conclusion. These results suggest that estrous cycle and seasons of the year are involved differentially and selectively in adaptive responses to stress produced during time learning in FST in female rats and may help in developing indices to predict sensitivity or resilience in depression.

Historial del artículo

Recibido: 18 feb 2019

Aceptado: 17 mar 2020

Disponible en línea: 1 may 2020

Palabras clave

Prueba de nado forzado, estrés del nado, comportamiento antidepresivo, ciclo estral, efectos estacionales

Keywords

Forced swimming test, swimming stress, antidepressant-like behavior, Estrous cycle, Seasonal effects

Copyright © 2020 por autores y Revista Biomédica.

Este trabajo está licenciado bajo las atribuciones de la *Creative Commons* (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

*Autor para correspondencia: J.C. Pineda, Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi. Universidad Autónoma de Yucatán. México, CP 97000 Tel: +5299 9924 6412 Fax: +5299 9923 6120 correo electrónico: jcpineda@correo.uady.mx <http://revistabiomedica.mx>

RESUMEN

Introducción. Tanto la influencia de los fármacos antidepresivos como sus índices en modelos animales, están condicionados por las estaciones del año y/o por el ciclo estral. Durante el modelo producido durante la prueba de nado forzado (PNF), se comparan los índices depresivos del periodo de condicionamiento, en los primeros cinco minutos de la prueba con los que se producen 24 h después. El ciclo estral y la estación afectan esta prueba.

Objetivo. Determinar la influencia de la estación del año y del ciclo estral sobre los índices depresivos (tiempo de inmovilidad; TI) y antidepresivos (tiempo de escalamiento y tiempo de nado (TN) durante el periodo basal de la PNF.

Material y métodos. Medimos los índices depresivos y antidepresivos, durante una sesión de cinco minutos de natación forzada, en diferentes estaciones del año y etapas de estro en ratas Wistar.

Resultados. El TI fue mayor en verano y otoño que en invierno durante la PNF. Mientras que el TN fue mayor en invierno que en verano o en otoño, solo durante la etapa de diestro. La longitud de la etapa estral, pero no la longitud del ciclo del estro, fue mayor en verano que en invierno.

Conclusión. Estos resultados sugieren que el ciclo estral y las estaciones del año se relacionan de manera diferencial y selectiva con las respuestas adaptativas al estrés producido durante el tiempo de aprendizaje durante la PNF en ratas hembra y pueden ayudar a desarrollar índices para predecir la sensibilidad o resiliencia en la depresión.

INTRODUCCIÓN

La gran heterogeneidad de los síntomas expresados durante los episodios de depresión mayor, así como de la respuesta del paciente a los tratamientos disponibles (1, 2), se ha relacionado con diferentes factores que influyen en la sensibilidad a los fármacos antidepresivos de los pacientes depresivos, o de roedores evaluados en modelos animales de la depresión. Entre éstos se encuentran las diferentes etapas del ciclo estral (3-5) o las estaciones del año (6-7). Por ejemplo, un estudio muestra un aumento del tiempo en estado deprimido durante los meses de diciembre a abril, con un pico en el mes de marzo (8). Además, el inicio de nuevos episodios fue mayor desde el mes de octubre hasta enero, alcanzando un

máximo en este mes (9). Sin embargo, otros estudios no han encontrado esta asociación (10).

El protocolo preclínico más utilizado para predecir la actividad antidepresiva de los fármacos es la PNF aplicada a la rata o al ratón (1) propuesta por Porsolt *et al*, 1977. Los autores mostraron que esta prueba identifica las sustancias que tienen acción antidepresiva en humanos. La prueba se lleva a cabo en dos sesiones: en la primera se introduce una rata durante 15 minutos en un cilindro lleno con agua de forma que no puede salir ni tocar su fondo y es forzada a nadar. Se registra su conducta en los primeros cinco minutos. Después de esto, la rata se regresa a su jaula. 24 h posteriormente, se repite el mismo proceso, sólo por cinco minutos. En ambas sesiones la rata despliega tres conductas activas identificadas como nado, buceo y escalamiento y una pasiva conocida como inmovilidad (7).

El índice depresivo, se obtiene midiendo el tiempo que la rata permanece haciendo únicamente los movimientos para mantener la cabeza fuera del agua y se le denomina “tiempo de inmovilidad” (TI). Mientras que el tiempo en que realiza las otras tres conductas que desarrolla durante la prueba: tiempo de nado (TN), tiempo de escalamiento (TE) y tiempo de buceo (TB) se utilizan como índices de la acción antidepresiva. Los fármacos antidepresivos reducen el índice depresivo TI e incrementan los índices antidepresivos TN y TE. En condiciones de control, en la segunda sesión de la prueba el índice depresivo TI, incrementa y es mayor que durante la primera sesión. Mientras que los índices antidepresivos se reducen notablemente.

Desde su primera descripción en 1977, la prueba ha mostrado sensibilidad a la gran mayoría de los antidepresivos usados en clínica y hasta la fecha es la prueba más utilizada para evaluar la potencial actividad antidepresiva de cualquier droga (7, 11). En este test, los cinco minutos iniciales de la primera sesión, se utilizan para evaluar la respuesta basal de la rata, en un momento en que el roedor aún no se ha sensibilizado al estrés de la prueba. En estudios previos (8, 9) mostramos que el comportamiento en estos cinco minutos predice el desempeño de las ratas en la segunda sesión de la prueba y

notablemente predice también, la sensibilidad del índice depresivo (TI) a fármacos antidepresivos con diferentes mecanismos de acción (5, 6).

Al igual que los tratamientos antidepresivos, el desempeño de las ratas durante la PNF es muy sensible a diferentes factores como la estación del año o el ciclo estral y pueden modificar el comportamiento tanto en la condición basal (primeros cinco minutos de la primera sesión) como en la sesión de prueba (los cinco minutos del segundo día). Abel en 1995, encontró que cuando las PNF fueron realizadas en ratas macho durante el invierno, la primavera y hasta el verano, el TI desarrollado en una única sesión de natación forzada de once minutos, se redujo gradualmente conforme pasaron los meses de estas dos estaciones (10). En otro estudio se observó que la progesterona, dependiendo de la etapa estral, aumentó el índice depresivo TI, mientras que los estrógenos redujeron dicho TI; todo evaluado en la segunda sesión de la prueba (4). Por el contrario, Ferguson *et al* en 2013, no encontraron pruebas sólidas de los efectos estacionales en el comportamiento de los roedores de laboratorio (3). La evaluación de la duración de los ciclos estrales en ratas se ha usado como índice de la estabilidad del estado hormonal (5), y se ha mostrado que la sensibilidad de las ratas hembra a diferentes tipos de antidepresivos varía durante el ciclo estral (3).

Ya que el comportamiento de la rata en la primera sesión de la PNF sirve como referencia para evaluar los cambios en su conducta y que el desempeño de las ratas hembras durante este periodo del PNF, predice su sensibilidad a diferentes fármacos antidepresivos (8), el objetivo de este estudio fue determinar cómo la estación del año y las etapas del ciclo estral influyen en los índices depresivo y antidepresivos durante los primeros cinco minutos de la primera sesión en la prueba de nado forzado.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Analizamos el comportamiento de 195 ratas Wistar hembras (215-230 gr) mantenidas en el laboratorio al menos cinco días a una temperatura ambiente constante de $24 \pm 1^\circ\text{C}$, humedad ($40 \pm 5\%$), con

un ciclo de luz/oscuridad de 12h (luces encendidas a las 06:00 h) y con acceso a alimentos y agua *ad libitum*, entre los años 2010 y 2014. Todas las ratas tuvieron un periodo de adaptación de al menos cinco días previos a la sesión de prueba, con acceso a agua y alimento a libre demanda y con ciclos naturales de luz y oscuridad. Todas las pruebas de comportamiento se realizaron en una habitación, al lado de donde las ratas se mantuvieron en las condiciones basales, a lo largo de los años en que se realizaron los estudios.

De este conjunto, 26 ratas se probaron en campo abierto. Al menos seis ratas fueron probadas en cada estación del año. Se clasificaron 155 ratas por temporada del año y por etapa estral: proestro/estro (estro) o metaestro/anestro (diestro). Finalmente, revisamos la duración del ciclo estral y su etapa en siete ratas durante el invierno y en otras siete ratas durante el verano en nueve ciclos estrales consecutivos. Se hicieron todos los esfuerzos para minimizar el malestar de los animales. Todos los protocolos de los estudios analizados fueron aprobados por el comité de ética local y se realizaron de acuerdo con la guía para el cuidado de animales de la *Society for Neuroscience* (12).

Prueba de Campo Abierto. En la prueba de campo abierto, las ratas se colocaron individualmente en una caja de acrílico transparente (50 cm x 50 cm x 50 cm). Con líneas blancas ubicadas cada 10 cm para hacer un cuadrado que sirvió como punto de referencia para evaluar la distancia recorrida como lo describieron Slatery y Cryan (2012) (7). Las sesiones fueron videograbadas y los registros se realizaron posteriormente.

Revisamos los registros del desempeño de las ratas en cada una de las cuatro estaciones y en dos etapas diferentes del ciclo estral (proestro y estro versus metaestro y anestro) en ratas Wistar hembras de experimentos realizados en el laboratorio a lo largo de cuatro años. También observamos la duración y regularidad de las fases del ciclo durante varios ciclos estrales, que fueron muestreados durante el invierno o durante el verano en ratas hembra. Analizamos también la actividad locomotora de las ratas en la prueba de campo abierto realizada

durante cada una de las cuatro estaciones del año para evaluar la acción directa de estos factores en el sistema locomotor de la rata.

Las pruebas de natación forzada se realizaron de manera similar a la descrita por Porsolt *et al*, en 1977 (13) para los primeros cinco minutos de la prueba, introduciendo la rata en un cilindro acrílico (diámetro 20 cm y altura 50 cm), lleno de agua hasta 30 cm desde la base y mantenido a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. El agua se cambió después de cada prueba. Los cinco minutos de la sesión de natación fueron grabados en video para el análisis del comportamiento. Se contabilizó el comportamiento prevalente por cada período de cinco segundos (un período). El número de recuentos, para cada uno de los tres comportamientos, acumulados durante los 5 minutos de la sesión única y la fecha en que se evaluaron las ratas se registraron como lo describieron Detke y Luky (2011) (13).

Analizamos los registros de cuatro a diez ratas analizadas cada mes, tanto durante la etapa de estro/metaestro como durante la etapa de proestro/estro, en cada estación del año. Antes de cada prueba de natación, se determinó la etapa de estro mediante frotis vaginal de cada rata utilizando el método de tinción de Wright-Giemsa, como se ha descrito (14, 15). Los datos se reportan como media $\pm$ media del error estándar (MEE) o mediana y rango y se utilizó cuando fue apropiado la prueba t de Student o la prueba de Mann-Whitney o el post test de Bonferroni después de ANOVA de una vía o del ANOVA de dos vías, para detectar diferencias significativas entre los grupos utilizando el programa Prism 5 (software GraphPad, Inc. La Jolla CA 92037 EE. UU.). Los datos se informaron como diferentes solo si $p < 0.05$.

RESULTADOS.

En la figura 1, se muestra la distancia recorrida de la rata cuando se evaluaron en la prueba de campo abierto. Las ratas hicieron en promedio 74 ± 10 cruces ($n = 8$) cuando se evaluaron en la primavera; 66 ± 10 ($n = 6$) cruces en verano, 90 ± 12 ($n = 6$) en otoño y 122 ± 23 ($n = 6$) en invierno. En todas las estaciones se observó una adaptación temporal evidente de la distancia recorrida durante los cinco

minutos de la prueba (no se muestra). ANOVA de una vía reveló que la distancia recorrida acumulada no se modificó por la temporada del año en que se registraron las ratas hembra ($F_{3,22} = 2.945$; $p > 0.05$).

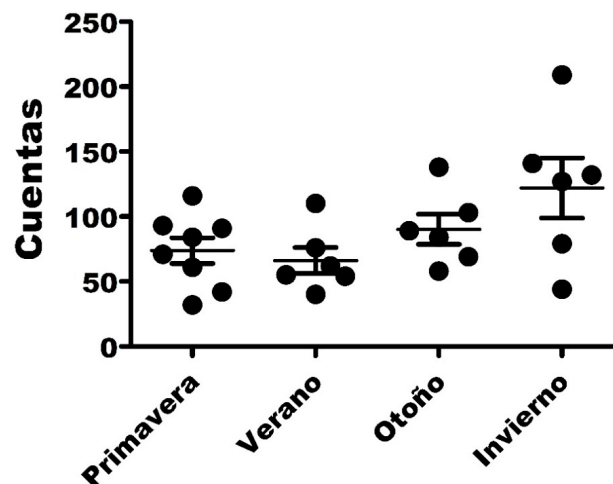


Figura 1. Actividad locomotora de ratas Wistar hembras en las cuatro estaciones del año. Los puntos indican los recuentos acumulados detectados durante la prueba de campo abierto realizada en cada estación del año en ratas hembra de entre 215 y 230 g. Las líneas indican la media $\pm$ MEE. $p > 0.05$ por ANOVA de una vía. Sin embargo, se detectó una tendencia lineal significativa para las diferencias ($p < 0.05$).

En la figura 2, se muestran las medias $\pm$ MEE para el comportamiento de las ratas cuando se evaluaron en la sesión de cinco minutos de natación forzada en cada estación del año. El ANOVA de dos vías para las puntuaciones de TI no encontró un efecto significativo debido a las estaciones del año ($F_{3,147} = 2.49$, $p < 0.06$) o de la etapa estral ($F_{3,147} = 0.66$, $p < 0.41$). Sin embargo, el TI fue mayor en el verano ($p < 0.05$), o en el otoño ($p < 0.01$) que en el invierno (prueba de post test Bonferroni; figura 2A). La prueba de ANOVA de dos vías también detectó una interacción significativa para el TN, ($F_{3,147} = 8.51$, $p < 0.0001$), y diferencias por estación del año ($F_{3,147} = 3.53$, $p < 0.02$) y por las etapas del estro ($F_{1,147} = 5.84$, $p < 0.02$). Todos los cambios detectados fueron solo durante la etapa diestro. El post test de Bonferroni indicó que el TN fue más corto en verano o en otoño que en primavera ($p < 0.001$) o

en invierno ($p < 0.05$; figura 2B). En la figura 2C se muestran las medias $\pm$ MEE para el TE, el ANOVA de dos vías no mostró un efecto significativo para

las estaciones de año ($F_{3,147} = 1.04, p > 0.05$); ni para las etapas del estro ($F_{1,147} = 0.26, p > 0.05$).

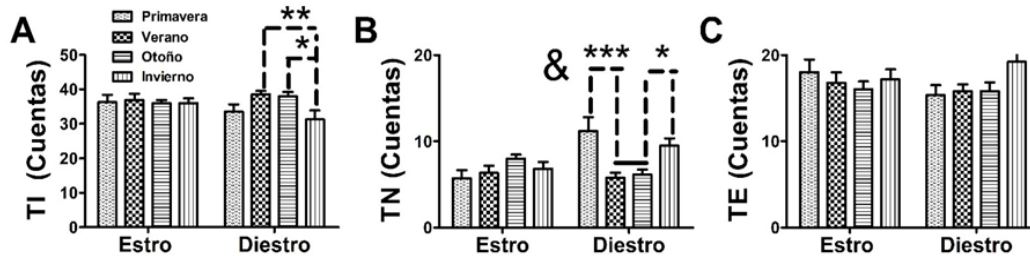


Figura 2. Comportamiento de las ratas Wistar hembras durante una sesión de cinco minutos de natación forzada en diferentes estaciones del año y etapas del ciclo estral. Las barras indican los conteos de tiempo de inmovilidad (TI), tiempo de nado (TN) o tiempo de escalada (TE), $\pm$ MEE, en ratas Wistar hembras realizada durante la etapa proestro/estro (estro), o durante la etapa diestro. En primavera, verano, otoño e invierno respectivamente. Note el cambio en la escala del eje Y en B y C. ANOVA de dos vías por estación o etapa estral (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; & indica interacción entre ambos factores, $p < 0.0001$).

En la figura 3 se muestra la duración del ciclo estral en siete ciclos medidos sucesivamente en dos estaciones del año: verano ($n = 9$) e invierno ($n = 9$). En promedio, no se encontraron diferencias en la duración de los ciclos: 4.38 ± 0.07 días durante el verano y 4.38 ± 0.08 días durante el invierno ($p > 0.05$; prueba t de Student no pareada). Sin embargo, la duración de la etapa estral durante el invierno fue de un día en todos los casos observados (59 etapas de estro). Mientras que, durante el verano, la etapa estral duró 1.24 días en promedio (se observaron 58 etapas de estro).

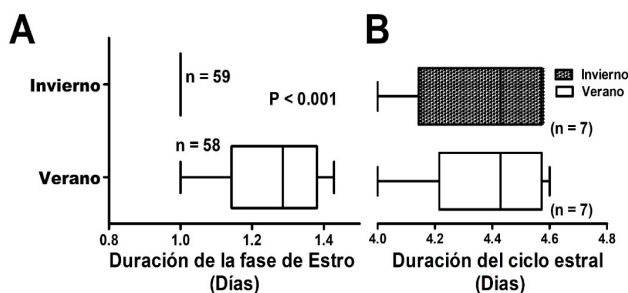


Figura 3. Duración del ciclo del estro y etapa estral, en invierno y verano en ratas Wistar. A: en la etapa del estro en invierno (se observaron 59 ratas) y en verano (barra blanca, se observaron 58); prueba de Mann Whitney, $p < 0.001$. B: duración del ciclo estral en ratas durante el invierno ($n = 7$) y el verano ($n = 7$); prueba t de Student, no pareada, no significativa

DISCUSIÓN.

Encontramos que hubo un incremento en el TI asociado a una reducción en TN solo durante la etapa de diestro, en verano y otoño cuando se comparó con el invierno. Se sugiere una susceptibilidad diferencial para aprender en la etapa temprana de la prueba de natación forzada, durante el verano y el otoño en comparación con el invierno. En contraste, no se encontraron diferencias significativas en la habituación o en la distancia recorrida de ratas hembra durante la prueba de campo abierto en diferentes estaciones del año. Ya que esta prueba evalúa cambios directos en el sistema locomotor, los cambios observados en la prueba de nado forzado en las diferentes estaciones del año, no se debieron a cambios directos sobre el sistema locomotor de las ratas (7).

El aumento del índice TI encontrado en el verano en comparación con el invierno en este estudio, contrasta con la reducción de este parámetro en el verano en ratas macho encontradas por Abel en 1995 (10). Esta diferencia no puede explicarse por los 11 minutos de duración, utilizados por Abel (1995), en el protocolo, en comparación con los cinco minutos utilizados en el presente estudio, porque se sabe que los tiempos de inmovilidad (TI) aumentan a medida que pasa el tiempo durante la

sesión de nado forzado. Entonces, en una sesión más larga, aumentaría aún más el TI registrado. De forma que la diferencia observada se explica mejor por la diferencia de sexo de los animales estudiados. La susceptibilidad diferencial para aprender durante la sesión de condicionamiento (primera) y la sesión de prueba (segunda) puede estar relacionada con el género (1). Aksoy *et al* en 2004 informaron que la duración del TI en la segunda sesión de la PNF fue más corta en agosto y noviembre que en febrero y mayo en ratas hembra. Sin embargo, los autores no informaron la etapa del ciclo estral en la que se encontraban las ratas cuando fueron evaluadas en la PNF (16).

En este estudio, evaluamos el comportamiento prevalente en cada período de cinco segundos entre tres comportamientos (13), lo que nos permitió detectar una variación simétrica entre TI y TN, un efecto que se informó anteriormente para el TI y el TE, cuando se aplicó el antidepresivo tricíclico amitriptilina en la misma cepa de ratas Wistar hembras (8). Como las estaciones del año o la etapa del ciclo estral no modularon el TE, la reducción del TI en estas estaciones del año (Figura 1A y 1B) explica el incremento en el TN observado en el invierno y la primavera. Variaciones análogas pero opuestas (es decir, reducción de TN), podrían ocurrir en ratas macho (10).

Otter y Nurmand en 1980, reportaron que el metabolismo de la dopamina se aceleró (observando disminución de la concentración de dopamina y aumento de su metabolito el ácido homovanílico en los meses de verano (junio, julio y agosto); mientras que la concentración de noradrenalina alcanzó el valor medio (17). Los cambios estacionales análogos en el metabolismo de la dopamina en ratas hembras podrían producir los cambios de comportamiento, reducción del TN e incremento del TI, observados durante el presente estudio (Figura 2). Dicha reducción en la disponibilidad de dopamina puede explicar el incremento del TI observado en la etapa de Estro durante los meses de verano (Figura 3) (17). Las diferencias encontradas en el comportamiento y en la regularidad del ciclo estral entre verano e invierno no se explican por los

cambios en la temperatura ambiente o la duración del ciclo de luz / oscuridad, porque en este estudio mantuvimos constantes estas variables (3, 5).

En la mayoría de los estudios en los que se usa la PNF, el fotoperiodo es controlado artificialmente 12 X 12 h. Este hecho podría sesgar parcialmente los resultados de los estudios. Sin embargo, ya que el presente estudio se realizó en una ubicación tropical (Mérida, México), la influencia de este factor puede ser menos determinante que en estudios realizados en otras latitudes. De hecho, en el ambiente tropical, los individuos pueden depender más de señales no fotoperiódicas dado los cambios mínimos en la duración del día en su hábitat natural. Además, los mecanismos anuales de cronometraje experimentan ciclos estacionales para varios rasgos, incluyendo la reproducción, la masa corporal y la heterotermia entre otros (18).

CONCLUSIÓN

Los primeros cinco minutos de natación forzada se consideran una etapa basal en la que se produce el proceso de aprendizaje relacionado con el desarrollo del modelo conductual del estado depresivo (7). Nuestros resultados revelan que este proceso es diferente en invierno que, en verano y otoño, y que está modulado en estas estaciones sólo durante la etapa de diestro (figura 2). El metabolito de los estrógenos 17 β -estradiol puede modular este proceso (1). Interesantemente, múltiples reportes han mostrado que el 17 β -estradiol induce influencia antidepresiva en ratas hembra (19-21).

REFERENCIAS.

1. Kokras N, Antoniou K, Mikail HG, Kafetzopoulos V, Papadopoulou-Daifoti Z, Dalla C. Forced swim test: What about females?. *Neuropharmacology*. 2015; 99:408-21. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.03.016. PubMed PMID: 25839894.
2. Perlman K, Benrimoh D, Israel S, Rollins C, Brown E, Tunteng JF, et al. A systematic meta-review of predictors of antidepressant treatment outcome in major depressive disorder. *J Affect Disord*. 2019;243:503-15. doi: 10.1016/j.jad.2018.09.067. PubMed PMID: 30286415.
3. Ferguson SA, Maier KL. A review of seasonal/circannual effects of laboratory rodent behavior. *Physiol Behav*. 2013;119:130-6. Epub 2013/06/19. doi: 10.1016/j.

- physbeh.2013.06.007 S0031-9384(13)00193-5 [pii]. PubMed PMID: 23770329.
4. Recamier-Carballo S, Estrada-Camarena E, Reyes R, Fernandez-Guasti A. Synergistic effect of estradiol and fluoxetine in young adult and middle-aged female rats in two models of experimental depression. *Behav Brain Res.* 2012;233(2):351-8. doi: 10.1016/j.bbr.2012.05.034. PubMed PMID: 22652396.
5. Baran A, Jakiel G, Wojcik G. Changes in ambient temperature and oxygenation during the proestrus do not affect duration, regularity and repeatability of the estrus cycle in female rats. *Folia Histochem Cytobiol.* 2009; 47(2):215-9. doi: 10.2478/v10042-009-0017-z. PubMed PMID: 19995706.
6. Hennessy MB, Schiml PA, Berberich K, Beasley NL, Deak T. Early Attachment Disruption, Inflammation, and Vulnerability for Depression in Rodent and Primate Models. *Front Behav Neurosci.* 2018;12:314. doi: 10.3389/fnbeh.2018.00314. PubMed PMID: 30666192; PubMed Central PMCID: PMC6330302.
7. Slattery DA, Cryan JF. Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. *Nat Protoc.* 2012;7(6):1009-14. Epub 2012/05/05. doi: 10.1038/nprot.2012.044nprot.2012.044 [pii]. PubMed PMID: 22555240.
8. Flores-Serrano AG, Vila-Luna ML, Alvarez-Cervera FJ, Heredia-Lopez FJ, Gongora-Alfaro JL, Pineda JC. Clinical doses of citalopram or reboxetine differentially modulate passive and active behaviors of female Wistar rats with high or low immobility time in the forced swimming test. *Pharmacol Biochem Behav.* 2013;110:89-97. Epub 2013/06/19. doi: 10.1016/j.pbb.2013.06.003S0091-3057(13)00158-5 [pii]. PubMed PMID: 23769836.
9. Flores-Serrano AG, Zaldivar-Rae J, Salgado H, Pineda JC. Immobility time during the forced swimming test predicts sensitivity to amitriptyline, whereas traveled distance in the circular corridor indicates resistance to treatment in female Wistar rats. *Neuroreport.* 2015;26(5):233-8. Epub 2015/02/04. doi: 10.1097/WNR.0000000000000324. PubMed PMID: 25646581.
10. Abel EL. Circannual changes in the duration of the immobility response of rats in the forced swim test. *Physiol Behav.* 1995;58(3):591-3. Epub 1995/09/01. doi: 0031-9384(95)00098-4 [pii]. PubMed PMID: 8587969.
11. Reis DJ, Casteen EJ, Ilardi SS. The antidepressant impact of minocycline in rodents: A systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports.* 2019;9(1):261. Epub 2019/01/24. doi: 10.1038/s41598-018-36507-9. PubMed PMID: 30670723; PubMed Central PMCID: PMC6342970.
12. H. U-C. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. In: (US) NRC, editor. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011.
13. Detke MJ, Rickels M, Lucki I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology* (Berl). 1995;121(1):66-72. Epub 1995/09/01. PubMed PMID: 8539342.
14. Lillie RD, H.J. Conn's. Biological Stains. 8th edition ed. Baltimore: William's & Wilkins; 1972.
15. Hubscher CH, Brooks DL, Johnson JR. A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle. *Biotech Histochem.* 2005;80(2):79-87. doi: 10.1080/10520290500138422. PubMed PMID: 16195173.
16. Aksoy A, Schulz D, Yilmaz A, Canbeyli R. Seasonal variability in behavioral despair in female rats. *Int J Neurosci.* 2004;114(12):1513-20. Epub 2004/10/30. doi: U5L6B7FUPTGVQVYQ [pii] 10.1080/00207450490509131. PubMed PMID: 15512835.
17. Otter M, Nurmand LB. [Seasonal fluctuations in the catecholamine content in the brain of white rats]. *Biull Eksp Biol Med.* 1980;89(2):215-7. Epub 1980/02/01. PubMed PMID: 7370426.
18. Saenz de Miera C, Monecke S, Barten-Sprauer J, Laran-Chich MP, Pevet P, Hazlerigg DG, et al. A circannual clock drives expression of genes central for seasonal reproduction. *Curr Biol.* 2014;24(13):1500-6. Epub 2014/07/02. doi: 10.1016/j.cub.2014.05.024. PubMed PMID: 24980500.
19. Estrada-Camarena E, Fernandez-Guasti A, Lopez-Rubalcava C. Interaction between estrogens and antidepressants in the forced swimming test in rats. *Psychopharmacology* (Berl). 2004;173(1-2):139-45. doi: 10.1007/s00213-003-1707-4. PubMed PMID: 14730416.
20. Estrada-Camarena E, Fernandez-Guasti A, Lopez-Rubalcava C. Antidepressant-like effect of different estrogenic compounds in the forced swimming test. *Neuropsychopharmacology.* 2003;28(5):830-8. Epub 2003/03/15. doi: 10.1038/sj.npp.1300097. PubMed PMID: 12637949.
21. LeGates TA, Kvarta MD, Thompson SM. Sex differences in antidepressant efficacy. *Neuropsychopharmacology.* 2019; 44 (1):140-154. Doi: 10.1038/s41386-018-0156-z. PMID:30082889