



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação Farmácia-Bioquímica**

VITOR GONÇALVES GARCIA

**PREJUÍZO COGNITIVO E ALTERAÇÃO NO PADRÃO DE ATIVAÇÃO DO
HIPOCAMPO DORSAL DE CAMUNDONGOS MACHOS SUBMETIDOS AO
ESTRESSE PSICOSSOCIAL**

**Araraquara, SP
2023**

VITOR GONÇALVES GARCIA

**PREJUÍZO COGNITIVO E ALTERAÇÃO NO PADRÃO DE ATIVAÇÃO DO
HIPOCAMPO DORSAL DE CAMUNDONGOS MACHOS SUBMETIDOS AO
ESTRESSE PSICOSSOCIAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Farmacêutico Bioquímico.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes De Souza

Coorientador: Prof. Dr. Lucas Canto De Souza

Araraquara, SP

2023

G216p

Garcia, Vitor Gonçalves.

Prejuízo cognitivo e alteração no padrão de ativação do hipocampo dorsal de camundongos machos submetidos ao estresse psicossocial / Vitor Gonçalves Garcia. – Araraquara: [s.n.], 2023.

37 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação – Farmácia Bioquímica) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Ricardo Luiz Nunes de Souza.

Coorientador: Lucas Canto de Souza.

1. Estresse psicossocial. 2. Testes comportamentais. 3. Hipocampo. 4. Memória de curto prazo. I. Souza, Ricardo Luiz Nunes de, orient. II. Souza, Lucas Canto de, coorient. III. Título.

VITOR GONÇALVES GARCIA

**PREJUÍZO COGNITIVO E ALTERAÇÃO NO PADRÃO DE ATIVAÇÃO DO
HIPOCAMPO DORSAL DE CAMUNDONGOS MACHOS SUBMETIDOS AO
ESTRESSE PSICOSSOCIAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Farmacêutico Bioquímico.

Aprovado em 15/12/2023

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza

Prof. Dr. Leandro Augusto de Oliveira

Prof. Dr. Lucas Gomes de Souza

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao mundo, a todos que o lerão. Que seja instrumento para novas hipóteses e questões; que seja veículo de conhecimento; e que sirva para promover o bem a todos os seres.

AGRADECIMENTOS

Meus primeiros agradecimentos vão para a minha família de sangue. Ao meu pai, Claudemir, que sempre me impulsionou a querer o melhor, e foi o meu exemplo de excepcionalidade e dedicação; à minha mãe, Eunice, sempre atenta para as necessidades que nem eu enxergava, meu exemplo de paciência e serenidade; e à minha irmã, Carolina, minha primeira amiga e parceira, que se tornou meu exemplo para disciplina e afinho. Mesmo em outra cidade vocês se faziam perto, me deram o suporte para continuar. Também agradeço aos meus tios e avós, que sempre cuidaram de mim e foram muito importantes durante minha graduação.

À minha companheira de caminho, Thayná, que chegou como uma parte importante da minha história em Araraquara. Só um bom relacionamento impulsiona a mudar a maneira que se vê o mundo, expandindo as perspectivas para encontrar equilíbrio e felicidade lado a lado. Obrigado por estar sempre comigo e escolher isso todo os dias desde 2019.

Agradeço à minha família de Araraquara, a Morcecasa. Vocês me ensinaram como é ter amigos e como é importante tê-los. Com vocês eu deixei de me sentir sozinho em muitos momentos, e aprendi valiosas lições que mais ninguém poderia me ensinar. Obrigado por me acolherem como parte da vida de vocês.

Agradeço os professores e funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, com certeza tudo o que vivi com vocês me fez amadurecer. É um imenso prazer por fazer parte de todas as extensões e pelo que elas me proporcionaram nessa trajetória. Com vocês cresci pessoalmente e profissionalmente.

Um agradecimento mais que especial ao laboratório de Farmacologia da FCFAr. Ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza, que me deu a incrível oportunidade de fazer parte da sua pesquisa e estar no ambiente que agora é um dos mais queridos para mim, pelas conversas inspiradoras de suas experiências que me motivaram a seguir na pesquisa com muito carinho e dedicação; e aos meus coorientadores, Prof. Dr. Lucas Canto de Souza e Profa. Dra. Daniela Baptista de Souza, que estiveram a todo tempo presentes e dedicados a me guiar e ensinar e que foram de suma importância na minha vida profissional. Agradeço também à minha parceira de laboratório, Mariana Thiele, que me ajudou a desenvolver esse

trabalho me acompanhando nas várias idas ao laboratório, dividindo a responsabilidade, as dificuldades e os ótimos momentos.

Por fim, agradeço ao CNPq e à FAPESP pelo apoio financeiro. Que mesmo não sendo direto a mim, foi essencial para este trabalho.

RESUMO

O estresse pode ser desencadeado pela exposição a eventos sociais aversivos, podendo resultar em respostas comportamentais como ansiedade, depressão e prejuízos mnemônicos. Neste sentido, o modelo animal de estresse de testemunho de derrota social (ETDS) em camundongos é uma ferramenta que permite a investigação das respostas comportamental e neurofuncional desencadeadas a partir do testemunho dos encontros agonísticos entre dois coespecíficos. Além disso, a idade das testemunhas pode exercer uma influência significativa nos efeitos do estresse de origem psicossocial. Assim, este estudo buscou investigar como a idade afeta as respostas relacionadas à ansiedade em camundongos adolescentes e adultos de 56 e 91 dias pós-natal (DPN), respectivamente, submetidos ao protocolo de ETDS. Após o protocolo de ETDS, as testemunhas foram avaliadas nos testes de campo aberto (CA), reconhecimento de objetos (RO) e esguicho de sacarose (TES). Posteriormente aos testes comportamentais, a atividade neuronal do hipocampo dorsal foi investigada através da quantificação da expressão da proteína Δ fosB (imunofluorescência). Os resultados demonstraram que o ETDS não alterou a atividade locomotora avaliada no CA e nem os comportamentos do tipo depressivo avaliados no TES. No entanto, o ETDS causou prejuízo na memória de curto prazo dos animais avaliados no RO, independentemente da idade, e redução na expressão da proteína Δ fosB em ambas idades.

Palavras-chave: estresse psicossocial; testes comportamentais; hipocampo; memória de curto prazo.

ABSTRACT

Stress can be triggered by exposure to aversive social events, leading to behavioral responses such as anxiety, depression, and mnemonic impairments. In this context, the animal model of social defeat stress in mice is a tool that allows the investigation of behavioral and neurofunctional responses triggered by witnessing agonistic encounters between two conspecifics. Furthermore, the age of the witnesses may exert a significant influence on the effects of psychosocial stress. Thus, this study aimed to investigate how age affects anxiety-related responses in adolescent and adult mice at 56 and 91 days postnatal (DPN), respectively, subjected to the social defeat stress witness protocol (SDSW). After the SDSW protocol, the witnesses were evaluated in the open field (OF), object recognition (OR), and sucrose splash (SS) tests. Subsequently, the neuronal activity of the dorsal hippocampus was investigated by quantifying the expression of the Δ fosB protein (immunofluorescence). The results demonstrated that SDSW did not alter locomotor activity assessed in the OF or depressive-like behaviors evaluated in the SS. However, SDSW impaired the short-term memory of the animals evaluated in the OR, regardless of age, and reduced the expression of the Δ fosB protein at both ages.

Keywords: psychosocial stress; behavioral tests; hippocampus; short-term memory.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama esquemático de eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA).....	12
Figura 2 – Esquema representativo do protocolo de ETDS.....	15
Figura 3 – Esquema representativo do testemunho de INA.....	16
Figura 4 – Esquema representativo do CA.....	17
Figura 5 – Esquema representativo do RO.....	18
Figura 6 – Esquema representativo TES	19
Figura 7 – Esquema representativo do protocolo de estudo.....	20
Figura 8 – Ausência de efeito do ETDS no teste CA.....	22
Figura 9 – ETDS prejudica a memória de curto prazo.....	23
Figura 10 – Ausência de efeito do ETDS no TES.....	23
Figura 11 – ETDS reduz a expressão de Δ FosB no hipocampo dorsal.....	24

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVO	13
2.1 Objetivos específicos	13
3 MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 Animais	14
3.2 Estresse de Testemunho de Derrota Social	14
3.3 Teste de campo aberto	16
3.4 Teste de reconhecimento de objetos	17
3.5 Teste de esguicho de sacarose	18
3.6 Imunofluorescência.....	19
3.7 Procedimento experimental.....	20
3.7.1 Experimentos comportamentais e imuno-histoquímica.....	20
3.8 Análise Estatística	21
4 RESULTADOS	21
5 DISCUSSÃO	24
6 CONCLUSÃO	29
7 REFERÊNCIAS.....	31

1. INTRODUÇÃO

Aproximadamente um terço da população poderá ser acometida por transtornos de ansiedade ao longo da vida (BANDELOW; MICHAELIS, 2015), e recentemente, diante da pandemia da síndrome respiratória aguda grave causada pelo coronavírus 2 (SARS-CoV-2), 80% dos brasileiros entrevistados reportaram sintomas moderados a graves de ansiedade e 68% de depressão (GOULARTE *et al.*, 2021). E em 2020, o Ligue 180 revelou um aumento de 36% em casos de violência contra a mulher. A violência doméstica faz suas vítimas: quem é agredido, e podem trazer consequências para aqueles que testemunham e convivem com ela.

A ansiedade pode ser descrita como um estado emocional subjetivo de preocupação ou nervosismo que pode ser percebido como desagradável ou ameaçador. Essa sensação de ameaça pode surgir de estímulos que despertam reações inatas ou aprendidas. Contudo, é importante reconhecer que a ansiedade também desempenha um papel crucial no repertório afetivo humano, pois um certo grau de ansiedade é necessário para garantir um desempenho adequado em tarefas tanto motoras quanto cognitivas (GRAEFF *et al.*, 2003; NUTT; STEIN, 2006).

A ansiedade patológica diferencia-se da ansiedade fisiológica pelas respostas emocionais exageradas e disfuncionais associadas a uma sensação de perda do controle (ROSEN; SCHULKIN, 1998). A depressão, por outro lado, é uma condição médica comum, crônica e recorrente, a qual é frequentemente associada à incapacitação funcional e comprometimento da saúde física. Indivíduos com depressão experimentam restrições em suas atividades e bem-estar, o que resulta em um maior uso dos serviços de saúde (FLECK *et al.*, 2003).

O estresse é um fator de risco para o desenvolvimento de doenças neuropsiquiátricas, uma vez que é definido como uma resposta fisiológica normal à eventos estressores que podem se tornar mal adaptadas (MCEWEN, 2012). Para além da situação imposta atualmente, é ampla a literatura científica demonstrando as consequências emocionais derivadas do estresse (DONNER; LOWRY, 2013; PAGE; COUTELLIER, 2019), sobretudo provenientes de fontes de natureza social (CHAOULOFF, 2013; CZÉH *et al.*, 2016; HOLLIS; KABBAJ, 2014). Além disso, a idade do indivíduo, somada à natureza do evento estressor, pode ditar a capacidade do indivíduo de se adaptar bem ou mal em resposta ao estresse (GEE; CASEY, 2015). Por exemplo, em camundongos, a exposição ao estresse crônico pode desencadear o comportamento do tipo depressivo (apatia), como a diminuição do

autocuidado avaliado no teste de esguicho de sacarose (TES) (ISINGRINI *et al.* 2010; MARROCCO *et al.*, 2014).

Estudos que investigam a neurobiologia das respostas defensivas indicam que o hipocampo é sensível aos efeitos do estresse, como o estresse de derrota social (EDS) (ISHIKAWA *et al.*, 2019; ZHANG, T. R. *et al.*, 2019; TSE *et al.*, 2014), e desempenha um papel direto na modulação das respostas defensivas (WINGENFELD; WOLF, 2014). O hipocampo relaciona-se intimamente com o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), especialmente sendo o responsável pelo feedback negativo desse eixo (KIM; DIAMOND, 2002), além de estar envolvido no processamento da memória, que pode ser prejudicada pelo estresse (EAGLE; FITZPATRICK; PERRINE, 2013; LI *et al.*, 2012; NAVA-MESA; LAMPREA; MÚNERA, 2013). Nesse sentido, o teste comportamental de reconhecimento de objetos (RO) pode ser empregado para avaliar a memória de curto prazo (ENNACEUR; DELACOUR, 1988; LEGER, *et al.* 2013).

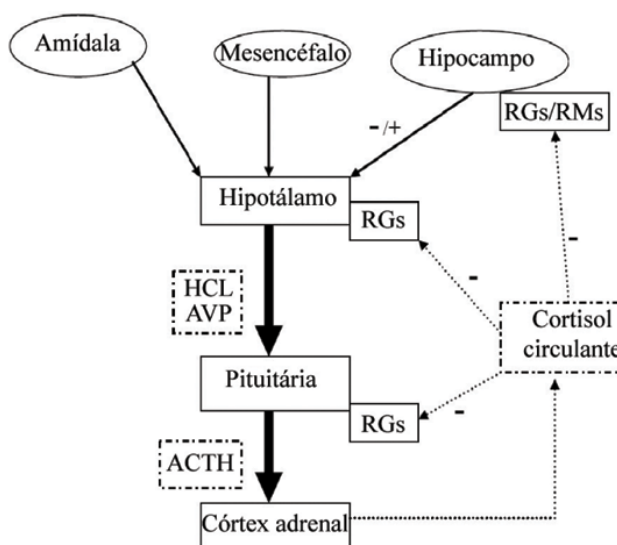


Figura 1. Diagrama esquemático de eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA), descrevendo a regulação e o feedback negativo (-) do cortisol por via dos receptores de glicocorticóides (RGs). Imagem de (JURUENA; CLEARE; PARIANTE, 2004).

A utilização de ferramentas para caracterizar o envolvimento do hipocampo e outras áreas do encéfalo nas respostas comportamentais têm sido úteis para o entendimento da neurobiologia das emoções, como a quantificação da expressão das proteínas da família Fos (BAILEY; SILVER, 2014; NESTLER, 2015; NESTLER; BARROT; SELF, 2001). O fator de transcrição Δ FosB é frequentemente utilizado em

situações de estresse crônico devido à sua estabilidade molecular e à sua acumulação frente a estímulos sustentados (NESTLER, 2008; NESTLER; KELZ; CHEN, 1999).

O modelo animal de estresse de derrota social (EDS) auxilia no entendimento da neurobiologia da resposta ao estresse social (FARIA; LAVERDE; NUNES-DE-SOUZA, 2020; VICTORIANO *et al.*, 2020). Somados a isso, exposições repetidas de EDS podem causar efeitos no comportamento do tipo depressivo (caracterizada pela anedonia) e no comportamento do tipo ansioso e mnemônicos (CZÉH *et al.*, 2007; DESLAURIERS *et al.*, 2018; RYGULA *et al.*, 2006; TIAN; XU; GUI, 2018; TSE *et al.*, 2014; FRESCA-DA-COSTA *et al.*, 2023). Diante destas evidências, nossa hipótese é de que as alterações comportamentais e neurofuncionais detectadas nos animais submetidos ao EDS também seriam observadas nos animais que testemunham os confrontos agonísticos. Para este fim, utilizamos uma variação do modelo intruso-residente (GOLDEN, 2011; PRYCE; FUCHS, 2017) e do modelo de estresse psicossocial por testemunho (IÑIGUEZ *et al.*, 2018), o que possibilitou a exposição simultânea de dois indivíduos ao estresse psicossocial de testemunho da derrota social (ETDS). Neste sentido, o uso dos testes comportamentais, como o teste de esguicho de sacarose (TES), o reconhecimento de objetos (RO) e o teste de campo aberto (CA), que se baseia nas tendências naturais dos roedores em explorar ambientes novos, enquanto evitam espaços abertos, é aplicado para a avaliação de comportamentos do tipo ansioso e atividade locomotora (KINSEY *et al.*, 2006), auxiliam na investigação dos efeitos do ETDS em roedores.

2. OBJETIVO

Este estudo teve como objetivo investigar o perfil comportamental e o padrão de ativação do hipocampo dorsal de camundongos adolescentes e adultos submetidos ao estresse de testemunha de derrota social.

2.1 Objetivos específicos

- Investigar a ansiedade e atividade locomotora através do teste do campo aberto (CA);
- Investigar a memória de curto-prazo através do teste de reconhecimento de objetos (RO);
- Investigar a depressão através do teste do esguicho de sacarose (TES);

- Investigar a atividade neurofuncional do hipocampo dorsal através da quantificação do padrão de expressão da proteína Δ FosB pela técnica de imunofluorescência.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados 128 animais da linhagem Swiss Webster, heterogênicos, com 25-30g de peso e idades, definidas em dias pós natal (DPN), de 56 DPN (adolescentes) e 91 DPN (adultos), que foram obtidos do Centro de Pesquisa e Produção de Animais – CPPA da Universidade Estadual Paulista – UNESP Botucatu. Foram mantidos no biotério sob condições controladas de temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), ciclo claro/escuro de duração de 12h e com água e ração *ad libitum*. Do número total de animais, 68 foram grupo “testemunha” e 60 do grupo “controle”. Os testes foram realizados na fase claro do ciclo claro/escuro.

Todos os procedimentos comportamentais que foram realizados no presente estudo tiveram aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) local (CEUA/FCF/CAr. 23/2021).

3.2. Estresse de Testemunha de Derrota Social

Para o protocolo de estresse foi utilizado uma variação de dois modelos, o do modelo intruso-residente (GOLDEN, 2011; PRYCE; FUCHS, 2017) e do modelo de estresse psicossocial por testemunho (IÑIGUEZ *et al.*, 2018). Tal variação possibilitou a exposição de dois machos ao estímulo estressor simultaneamente. Esses dois machos, com idades diferente de 56 e 91 DPN, denominados testemunhas, foram colocados na caixa-moradia (45 x 23 x 21cm) de um coespecífico agressivo e dominante não familiar, denominado residente. As testemunhas ficam separadas entre si e do residente por uma divisória de acrílico transparente perfurada apenas na parte frente, permitindo a interação olfativa, visual e auditiva sentido a região do encontro agonístico entre o residente e um animal denominado intruso (coespecífico e não familiar das testemunhas). O encontro entre esses sujeitos, que resulta na agressão do intruso pelo residente, é chamado de derrota social, sendo essa determinada pela exibição da postura de submissão ao camundongo residente pelo camundongo intruso por pelo menos 3 segundos ao longo de 5 minutos de interação agonística.

Os episódios de testemunha de derrota social ocorreram durante 10 dias e tiveram duração de 15 minutos em cada dia. Cada episódio foi dividido em 3 etapas de 5 minutos cada, alternado entre estresse psicológico e físico para o camundongo intruso como representado na figura 1. Na primeira etapa o intruso foi colocado em uma gaiola protetora (10 x 6 x 15cm) e na presença do animal residente. Na segunda etapa, o intruso é retirado da gaiola protetora e colocado na presença do residente, acontecendo a derrota social. Na terceira etapa, o intruso é retornado para a gaiola protetora. As testemunhas permanecem todo o episódio protegidas pela divisória de acrílico. Ao final, o intruso e as testemunhas são retornados para suas respectivas caixas-moradia.

O controle do protocolo de ETDS consistiu das mesmas etapas descritas, porém as testemunhas não testemunharam uma derrota social e sim uma interação não agressiva de dois camundongos coespecíficos e familiares. Neste sentido, o intruso e o residente fazem parte da mesma caixa-moradia. As testemunhas da interação não agressiva (TINA) eram não familiares e estavam protegidas pela divisória de acrílico por todo o episódio, conforme a figura 2.

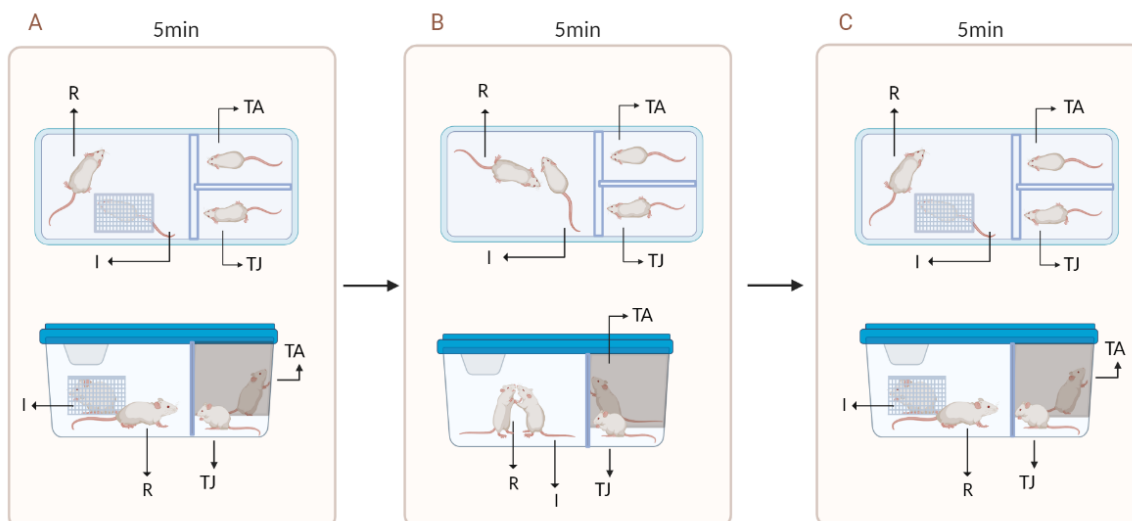


Figura 2. Esquema representativo do estresse psicológico (A e C) intercalado com o estresse físico (B) no protocolo de ETDS. R: Camundongo residente. I: Camundongo intruso. TJ: Testemunha jovem. TA: Testemunha adulta. Imagem criada com BioRender.

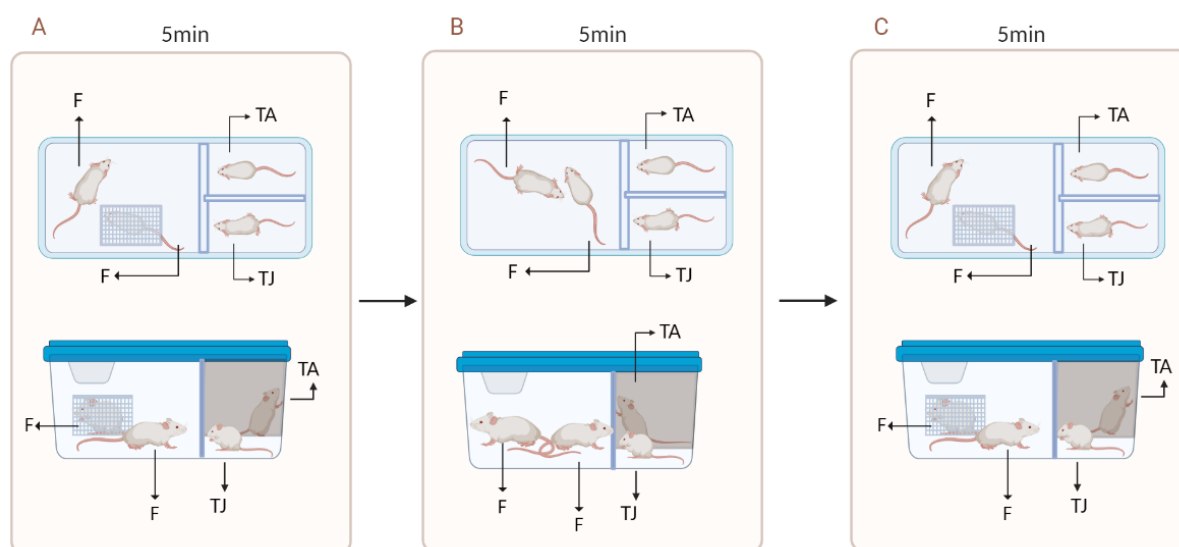


Figura 3. Esquema representativo do grupo controle durante o testemunho de uma interação não-agressiva (TINA). F: Camundongo familiar. TJ: Testemunha jovem. TA: Testemunha adulta. Imagem criada com BioRender.

3.3. Teste do Campo Aberto (CA)

O teste CA se baseia nas tendências naturais dos roedores em explorar ambientes novos enquanto evitam espaços abertos (KINSEY *et al.*, 2006). No CA, os camundongos que passaram pelo ETDS foram testados numa arena aberta de base quadrada ($42 \times 42 \times 30$ cm), feita de material acrílico opaco, com 16 divisões marcada em seu assoalho (10×10 cm) (Figura 3), onde foram avaliados a frequência de cruzamentos (número de vezes que o animal cruza as divisões marcadas no chão do aparato) e o tempo de permanência na parte central do campo aberto. No início do teste, o camundongo foi colocado na região central da arena e permaneceu nela por 5 minutos. O teste foi filmado por uma câmera acima do aparato para registro e posterior análise do comportamento por meio do programa X-plo-rat.

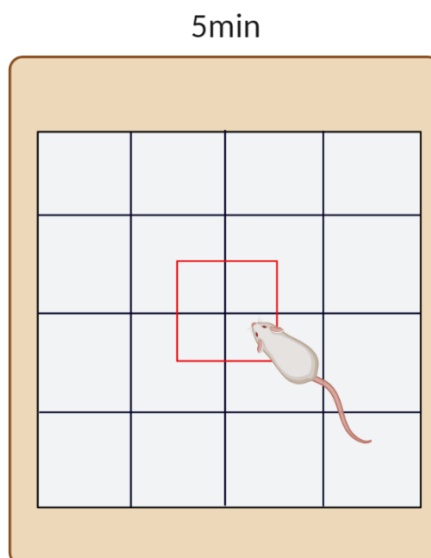


Figura 4. Esquema representativo do teste de campo aberto (CA). Imagem criada com BioRender.

3.4. Teste de Reconhecimento de Objeto (RO)

O RO é uma tarefa de uma única tentativa e não envolve a aprendizagem de qualquer regra, baseando-se inteiramente no comportamento espontâneo exploratório de roedores em relação a objetos (ENNACEUR; DELACOUR, 1988; LEGER, *et al.* 2013). O teste de RO consiste em três fases: habituação, treino (T1) ou familiarização, e teste (T2). Vinte quatro horas antes do treino, os animais foram colocados numa arena com base quadrada (42 × 42 × 30 cm) (figura 4) para habituação por 10 minutos. No dia do T1 os camundongos foram colocados individualmente no centro da arena (mesma utilizada na habituação) na presença de dois objetos similares (familiares), onde permaneceram por 5 minutos para a exploração dos objetos. Duas horas após o treino, os camundongos retornaram para a mesma arena, no entanto, um dos objetos familiares foi substituído por um novo objeto, e lá permaneceram por 5 minutos para a exploração dos objetos.

Os objetos familiares utilizados no teste tinham tamanhos e formatos similares, e não ultrapassavam 8 cm de altura e 4 cm de diâmetro, em coerência ao tamanho geral dos camundongos. O peso era suficiente para que não fosse movido pelos animais durante o teste. Nesse estudo foram utilizados saleiros em formato de abacaxi e de pepino e preenchidos com pedras. O objeto novo seguiu os mesmos padrões dos objetos familiares, porém com formato diferente. Todos os objetos e a arena foram limpos com álcool 20% entre os sujeitos.

O teste foi filmado por uma câmera acima do aparato para registro e posterior análise do comportamento por meio do programa X-plo-rat. O tempo de exploração dos objetos familiar (tF) e novo (tN) foi registrado durante o T2 e o índice de discriminação foi calculado de acordo com a fórmula: $(tF-tN)/(tF+tN)$. Para mais detalhes ver Canto de Souza e colaboradores (2017).

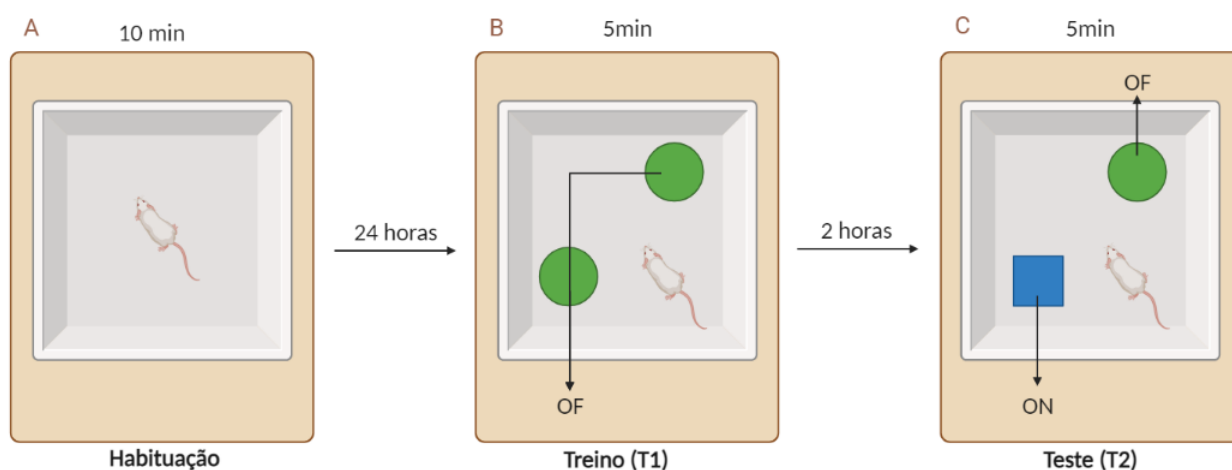


Figura 5. Esquema representativo do teste de reconhecimento de objetos (RO). OF: Objeto familiar. ON: Objeto novo.

3.5. Teste de Esguicho de Sacarose (TES)

O teste consiste em esguichar, com o auxílio de um borrifador, uma solução a 10% de sacarose no dorso do camundongo que foi colocado em uma caixa de vidro (30 × 21 × 24,5 cm) (figura 5). Por conta da viscosidade, a solução suja a pelagem do animal e induz o comportamento de autolimpeza (do inglês *grooming*). Após o esguicho foi registrado a latência de autolimpeza (tempo entre o esguicho e o início do comportamento de autolimpeza), e posteriormente a frequência e tempo total de autolimpeza ao longo de 5 minutos. O teste pode ser usado para se inferir os comportamentos de autocuidado e motivacional. Trabalhos prévios demonstram que o estresse crônico reduz esses comportamentos, o que pode ser considerado um paralelo com à apatia e anedonia, em razão do valor hedônico que soluções doces têm para esses roedores (MARROCCO *et al.*, 2014). O teste foi filmado por uma câmera acima do aparato para registro e posterior análise do comportamento por meio do programa X-plo-rat.



Figura 6. Esquema representativo do teste de esguicho de sacarose (TES).

3.6. *Imunofluorescência (IF)*

Vinte e quatro horas após o último teste comportamental os animais foram anestesiados com Uretana 25 mg/kg. Em seguida, os animais foram perfundidos (12 ml/min) com solução tampão fosfato de sódio (PBS) seguida de paraformaldeído 4% (PFA4%). Os encéfalos foram pós-fixados em PFA 4% por 1h, transferidos para solução de sacarose 30% em PBS a 4°C. Após 2 dias, os encéfalos foram fatiados em secções coronais no criostato (35 µm). Cabe ressaltar que uma marcação foi realizada com uma agulha no lado esquerdo dos encéfalos para nos certificarmos com relação ao hemisfério que foi analisado. O hipocampo dorsal foi a estrutura investigada. As fatias foram lavadas 5 vezes com PBS e em seguida incubadas com solução bloqueadora por 1h em temperatura ambiente. Na sequência as fatias foram incubadas com os anticorpos primários anti-FosB (ab184938; 1:1000) por 24h a 4°C. Na sequência as fatias foram lavadas com PBS por 5 vezes e incubadas com um anticorpo secundário Alexa Fluor 488 (ab150077; 1:1000) por 2h à temperatura ambiente. Em seguida o material foi lavado com PBS por 5 vezes e montado e selados em lâminas gelatinizadas usando Fluoroshield Mounting Medium+DAPI (Sigma-Aldrich) e lamínula. A imunomarcagem foi capturada por uma câmera microscópica AxioCam 503 colorida (Zeiss), acoplada ao microscópio Axio Imager. A quantificação da fluorescência foi realizada através do software ImageJ (NIH), pela técnica de “Corrected total cell fluorescence” (CTCF). Nesta técnica o programa mensura a fluorescência da área delimitada, entretanto, é retirada do valor final a fluorescência emitida pelo *background* (CTCF = Integrated Density – [Area of

selected tissue area x Mean fluorescence of background readings]) (BAPTISTA-DE-SOUZA *et al.*, 2020).

3.7. Procedimento experimental (Investigação do perfil comportamental de animais com diferentes idades submetidos ao ETDS): avaliação no CA, RO, TES e IF.

3.7.1. Experimentos comportamentais:

Como representado na Figura 6, os camundongos machos adolescentes e adultos tiveram suas caudas marcadas com numeração adequada e suas caixas etiquetadas de acordo com os seus respectivos grupos. Por 10 dias seguidos os sujeitos passaram pelo protocolo de estresse, em seguida, no décimo primeiro e décimo segundo dia passaram pelos testes comportamentais do TIS e LCE (consultar [Thiele, M. 2023](#) no repositório da UNESP), no décimo terceiro dia passaram pelo teste CA e RO, que foi realizado no décimo quarto dia. No décimo quinto dia foi realizado o TES.

No décimo sexto dia, os grupos testemunha do ETDS e seus respectivos grupos TINA foram eutanasiados e perfundidos para a coleta dos encéfalos, que foram adequadamente armazenados e posteriormente fatiados em cortes coronais na região do hipocampo dorsal (HPCd). Os cortes foram processados imunohistoquimicamente para a quantificação da proteína Δ FosB no HPCd.

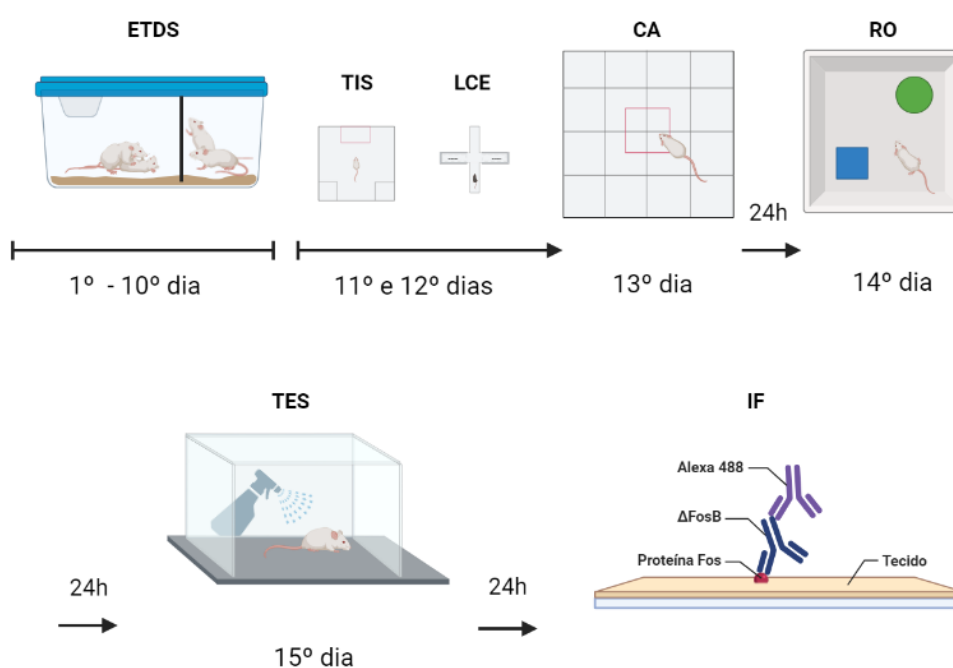


Figura 7. Esquema representativo do protocolo de estudo. ETDS: Estresse de testemunha de derrota social. TIS: Teste de interação social. LCE: Labirinto em cruz elevado. CA: Campo aberto. RO: Reconhecimento de objetos. TES: Teste de esguicho de sacarose. IF: Imunofluorescência. Imagem criada com BioRender.

Assim, os grupos experimentais foram: (i) adolescentes (n=12) testados no CA, RO e TES sem terem passado pelo ETDS (TINA), (ii) adolescentes (n=16) testados no CA, RO e TES após o ETDS; (iii) adultos (n=10) testados no CA, RO e TES sem terem passado pelo ETDS (TINA), (iv) adultos (n=16) testados no CA, RO e TES, que passaram pelo ETDS.

É importante mencionar que com esse procedimento experimental foram desenvolvidos dois trabalhos, este e o de uma colega de laboratório e pesquisa. Portanto, nele aparecem nos dias 11 e 12 os testes de Interação Social (TIS) e o Labirinto em Cruz Elevado (LCE), que anteciparam os testes deste trabalho. Para a apreciação dos resultados coletados do TIS e LCE, consultar Thiele, M. 2023 no repositório de trabalhos científicos da UNESP ([Thiele, M. 2023](#)).

3.8. *Análise estatística*

Os resultados referentes ao CA e TES foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de dois fatores [fator 1: condição (TINA ou ETDS); fator 2: idade (adolescente ou adulto)]. Os resultados do RO e da Imunofluorescência foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de três fatores para medidas repetidas. Nos casos de significância, as análises foram seguidas pelo teste de comparações múltiplas de Duncan. O valor de p menor ou igual a 0,05 foi considerado como significativo.

4. RESULTADOS

Na Figura 7 estão apresentados os dados obtidos dos camundongos machos de diferentes idades submetidos às sessões de TINA ou ETDS testados no CA. A ANOVA de duas vias não indicou diferença significativa para os fatores condição e idade e nem interação entre os fatores para nenhuma das variáveis analisadas: número de cruzamentos [condição: $F_{(1,67)} = 0,52$, $p=0,47$; idade: $F_{(1,67)} = 3,32$, $p=0,07$; condição \times idade $F_{(1,67)} = 0,25$, $p=0,61$] (Fig.7A); tempo gasto no centro da arena [condição: $F_{(1,67)} = 2,13$, $p=0,15$; idade: $F_{(1,67)} = 0,06$, $p=0,80$; condição \times idade $F_{(1,67)} = 0,15$, $p=0,70$] (Fig.8B).

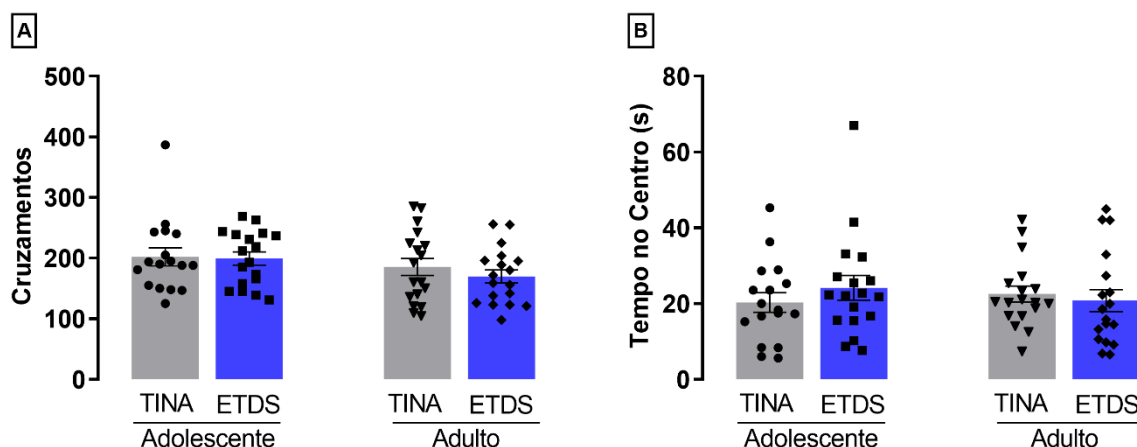


Figura 8. Ausência de efeito do ETDS no Teste de Campo Aberto (CA). Barras com ponto de dispersão representam a média (\pm EPM) do número total de cruzamentos (A) e do tempo gasto na área central (B). TINA: Testemunha da interação não agressiva; ETDS: Testemunha de estresse de derrota social.

Na Figura 8 estão apresentados os dados obtidos no teste de reconhecimento de objetos (RO). A ANOVA de três vias para medidas repetidas indicou que apenas os animais que testemunharam a interação não agressiva exploraram mais o objeto novo do que o familiar independentemente da idade [condição: $F_{(1,67)} = 4,19$, $p=0,04$; idade: $F_{(1,67)} = 6,54$, $p=0,80$; condição \times idade $F_{(1,67)} = 1,31$, $p=0,72$; Objeto: $F_{(1,67)} = 5,09$, $p=0,03$; Objeto \times condição: $F_{(1,67)} = 7,04$, $p=0,01$; Objeto \times idade: $F_{(1,67)} = 1,16$, $p=0,73$; Objeto \times condição \times idade: $F_{(1,67)} = 4,00$, $p=0,53$] (Fig. 8A). Com relação a análise do índice de discriminação dos objetos, a ANOVA de duas vias indicou diferença significativa entre os grupos para o fator condição, independentemente da idade [condição: $F_{(1,67)} = 6,30$, $p=0,04$; idade: $F_{(1,67)} = 0,01$, $p=0,75$; condição \times idade $F_{(1,67)} = 0,35$, $p=0,55$] (Fig.8B). Estes resultados sugerem que apenas os animais que testemunharam as sessões de derrota social apresentaram prejuízo na memória de curto prazo.

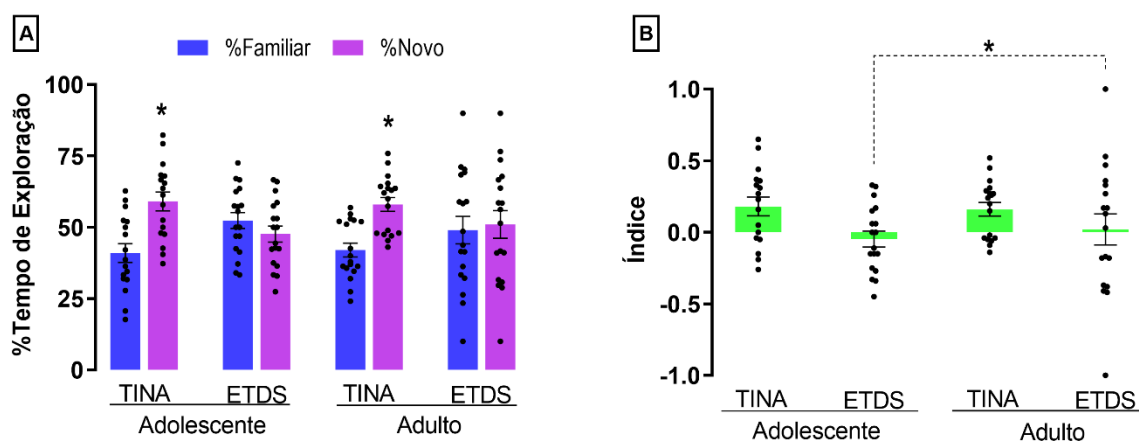


Figura 9. Testemunha de estresse de derrota social prejudica a memória de curto prazo. Barras com ponto de dispersão representam a média (\pm EPM) da porcentagem de tempo gasto explorando objetos familiares ou novos (A) e o índice de discriminação (B). Post-hoc de Duncan, $*p \leq 0,05$ versus %Familiar ou grupo TINA. TINA: Testemunha da interação não agressiva; ETDS: Testemunha de estresse de derrota social.

Na Figura 9 estão apresentados os dados obtidos no teste de esguicho de sacarose dos animais que passaram pelo mesmo protocolo experimental dos testes anteriores. A ANOVA de duas vias indicou que não houve diferença significativa nas três medidas avaliadas: [Latência (condição: $F_{(1,67)} = 0,06$, $p = 0,81$; idade: $F_{(1,67)} = 0,38$, $p = 0,54$; condição \times idade $F_{(1,67)} = 0,68$, $p = 0,41$); Frequência (condição: $F_{(1,67)} = 0,16$, $p = 0,69$; idade: $F_{(1,67)} = 0,0003$, $p = 0,99$; condição \times idade $F_{(1,67)} = 0,95$, $p = 0,33$); Tempo (condição: $F_{(1,67)} = 0,06$, $p = 0,80$; idade: $F_{(1,67)} = 1,66$, $p = 0,20$; condição \times idade $F_{(1,67)} = 0,28$, $p = 0,60$].

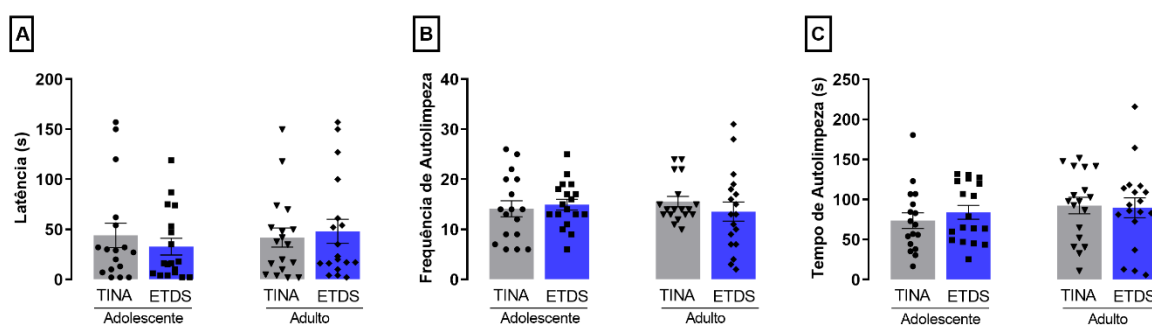


Figura 10. Ausência de efeito do ETDS no comportamento de autolimpeza de camundongos machos. Barras com ponto de dispersão representam a média (\pm EPM) da latência para iniciar a autolimpeza (A) a frequência da autolimpeza (B) e o tempo gasto na autolimpeza (C). TINA: Testemunha da interação não agressiva; ETDS: Testemunha de estresse de derrota social.

Na Figura 10, estão representados os resultados ($n = 5-6$ /grupo) dos ensaios de imunofluorescência com Δ FosB do hipocampo dorsal (HPCd) de camundongos

expostos ao ETDS e testes comportamentais. A ANOVA de três vias para medidas repetidas indicou que os animais que testemunharam a derrota social apresentaram uma redução da quantidade total de fluorescência HD em relação ao grupo TINA, e que tal redução se apresenta em lados diferentes para as diferentes idades [condição: $F_{(1,19)} = 7,02$, $p=0,02$; idade: $F_{(1,19)} = 2,75$, $p=0,11$; condição \times idade $F_{(1,19)} = 0,002$, $p=0,96$; Lado $F_{(1,19)} = 1,89$, $p=0,18$; Lado \times condição: $F_{(1,19)} = 0,34$, $p=0,57$; Lado \times idade: $F_{(1,19)} = 17,5$, $p=0,0009$; Lado \times condição \times idade: $F_{(1,19)} = 6,60$, $p=0,02$] (Fig. 10B).

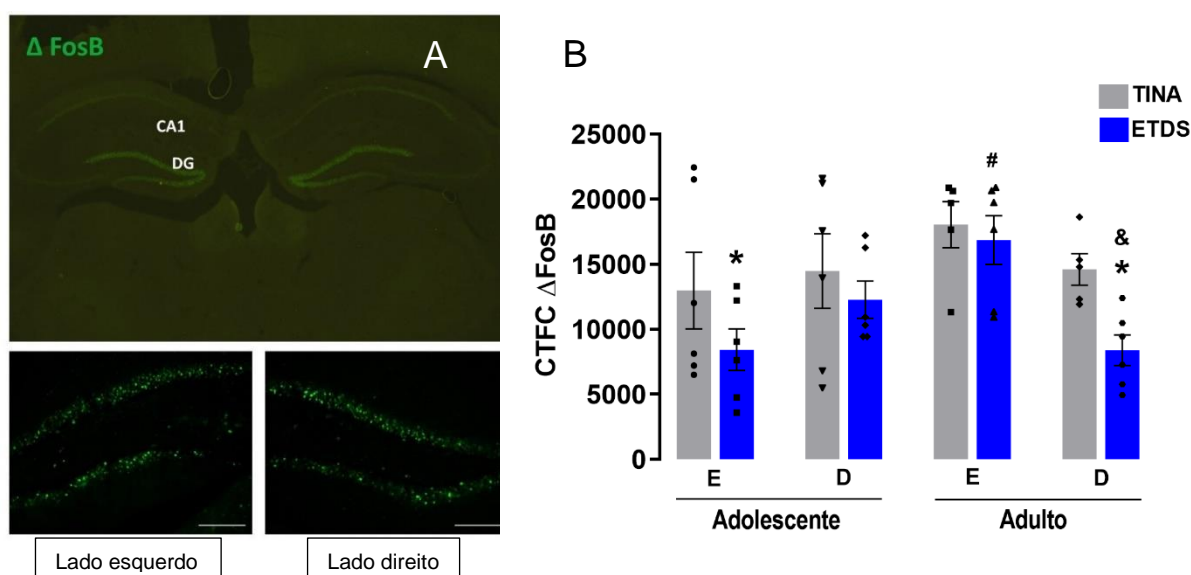


Figura 11. ETDS reduz a expressão de Δ FosB no HD. (A) Imagens representativas mostrando imunofluorescência Δ FosB no hipocampo dorsal e (B) *corrected total cell fluorescence* (CTCF) para Δ fosB positivo em neurônios no hipocampo dorsal ($n=5-6$). Barras com ponto de dispersão representam a média (\pm EPM). Barra de escala = 100 μ m. Post-hoc de Duncan, * $p \leq 0,05$ versus o respectivo grupo TINA; # versus o grupo na mesma condição, mas com idade diferente; & versus o lado oposto. E: Hemisfério esquerdo; D: Hemisfério direito; CA1: Região hipocampal CA1; DG: Giro denteado; TINA: Testemunha da interação não agressiva; ETDS: Testemunha de estresse de derrota social.

5. DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo colaborar para a ampliação da compreensão da relação entre a idade do indivíduo ao testemunhar um evento aversivo, com comportamentos relacionados à cognição e depressão, e como a atividade neuronal do HPCd pode estar envolvida nesta relação. Nossos resultados indicam que o ETDS induz ao prejuízo cognitivo independentemente da idade da testemunha, acompanhado pela diminuição da atividade do HPCd, porém, sem alterar a

locomoção e induzir comportamentos do tipo depressivo. Desta forma, os resultados obtidos no teste de RO revelaram que o ETDS prejudicou a capacidade dos sujeitos de discriminar entre um objeto familiar e um novo. Nossos dados corroboram o estudo prévio realizado pelo nosso grupo, onde camundongos adultos machos expostos ao estresse de derrota social (EDS) apresentaram comportamento similar (FRESCA-DA-COSTA *et al.*, 2023). Na análise de imunofluorescência do HPCd, os resultados mostram que em relação à expressão de Δ fosB há diferença hemisférica na quantificação dessa proteína de acordo com a idade dos indivíduos submetidos ao ETDS. Estes dados também se assemelham aos obtidos em machos adultos que passaram pelo EDS, no entanto os autores não identificaram diferença hemisférica na expressão de Δ FosB (FRESCA-DA-COSTA *et al.*, 2023). Para o teste de esguicho de sacarose e campo aberto, os resultados não apresentaram diferença significativa entre os grupos, demonstrando que o testemunho da derrota social não alterou a atividade locomotora e não induziu a comportamento do tipo depressivo.

O teste CA é utilizado para a investigação do comportamento baseado nas tendências naturais dos roedores em explorar ambientes novos, enquanto evitam espaços abertos. Neste sentido, camundongos que apresentam comportamentos do tipo ansioso geralmente passam mais tempo nas periferias do aparato em relação ao centro e tendem a se locomover menos (KINSEY *et al.*, 2006). No presente estudo, os resultados do teste CA nos mostram que os camundongos de ambas as idades que passaram pelo ETDS exploraram a arena de maneira similar ao grupo TINA, ou seja, os tempos gastos nas periferias e no centro não diferiram para o grupo estressado e controle. O mesmo perfil comportamental se repete para o número de cruzamentos, que faz analogia à atividade locomotora (KINSEY *et al.*, 2006). Tais resultados divergem daqueles encontrados em protocolos mais intensos, como o EDS (FRESCA-DA-COSTA *et al.* 2023), o que pode ser uma indicação que o ETDS não é capaz de causar alterações na atividade locomotora e induzir comportamentos do tipo ansioso quando avaliados no CA.

O TES nos fornece dados comportamentais relacionados à motivação e ao autocuidado (MARROCCO *et al.*, 2014), considerados indicativos para alguns sintomas de depressão, como comportamento apático (WILLNER, 2005). Neste sentido, o estresse crônico prolongado, como o estresse moderado crônico imprevisível, é capaz de diminuir o comportamento de autocuidado em camundongos machos da linhagem BALB/c (ISINGRINI *et al.* 2010). Dados similares

foram observados no teste de preferência por sacarose, onde camundongos adolescentes da linhagem C57BL/6 submetidos cronicamente ao EDS apresentaram diminuição na preferência pela solução adocicada (IÑIGUEZ *et al.*, 2014). Os nossos resultados mostram que os animais submetidos ao TES não apresentaram diferença entre os grupos para o comportamento motivacional e de autocuidado. Esta ausência de efeito pode se dar ao fato do protocolo de ETDS não ser intenso o suficiente para induzir comportamento do tipo depressivo relacionado à anedonia, e/ou o tipo de linhagem de camundongo utilizado.

O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) é uma parte importante do sistema neuroendócrino e o principal coordenador das respostas que envolvem o estresse, e está intimamente relacionado com outras estruturas do cérebro que auxiliam nessas respostas, como o hipocampo e o córtex pré-frontal medial (CPFm). Estas áreas encefálicas possuem projeções recíprocas que regulam essas respostas (CERQUEIRA *et al.*, 2007; GOLDMAN-RAKIC; SELEMON; SCHWARTZ, 1984; IRLE; MARKOWITSCH, 1982; PADILLA-COREANO *et al.*, 2016; ROSENE; VAN HOESEN, 1977; SANT'ANA *et al.*, 2019). De maneira resumida, em resposta ao estresse, o hipotálamo libera o fator de liberação de corticotrofina (CRF) que estimula a glândula pituitária anterior a liberar o hormônio adrenocorticotrofina (ACTH), que por sua vez estimula a síntese e liberação de glicocorticoides (GC) pelas glândulas adrenais (KLOET; JOELS; HOLSBOER, 2005). Este processo acontece tanto em humanos, quanto em roedores, com a diferença que em humanos o cortisol é mais presente, e em roedores é a corticosterona (KIM; DIAMOND, 2002). O hipocampo, assim como outras regiões do encéfalo, possui receptores para GC, e desempenha a função, além de outras, de exercer o feedback negativo para o eixo HPA, ou seja, reduzir sua atividade (KLOET; JOELS; HOLSBOER, 2005). Devido à presença por todo o encéfalo, os receptores para corticoides modulam vários processos cognitivos, e entre eles a memória (WINGENFELD; WOLF, 2014).

Já é bem consolidado na literatura que o estresse crônico é um fator de risco importante para o desenvolvimento de psicopatologias. Através da contínua e prolongada ativação do eixo HPA, e conseqüentemente a ligação dos glicocorticoides em seus respectivos receptores, que irão modular os processos cognitivos, e com isso gerar uma resposta fisiológica e comportamental, que se tornam mal adaptadas conforme o organismo responde a este evento estressor de

maneira prolongada (MCEWEN, 2012). Como o hipocampo é uma estrutura crucial, tanto em processos mnemônicos quanto neuroendócrinos da regulação dos hormônios do estresse, torna-se uma região vulnerável ao estresse crônico, levando a prejuízos na recuperação da memória de curto prazo, por vezes resultando em atrofia desta estrutura em roedores testados em tarefas dependentes de memória, como no teste de RO (KIM; DIAMOND, 2002). Neste sentido, o fato de termos observada diminuição na expressão da proteína Δ fosB no hipocampo dorsal, tanto de animais adolescentes como adultos submetidos ao estresse psicossocial, é mais uma evidência da possível diminuição da atividade hipocampal induzida pelo estresse prolongado.

Existem vários protocolos animais para testar o aprendizado e a memória em roedores. Alguns envolvem condicionamento e outros não (LI *et al.*, 2012). Como o estresse exerce efeito complexo no processamento da memória dependente do hipocampo, a escolha do protocolo é importante na investigação das características desse processamento, não só para o estudo dos seus mecanismos, mas também para a padronização de modelos animais de doenças e caracterização de novos fármacos (BIALA, 2012; LEMAIRE, 2004; MUMTAZ *et al.*, 2018; PODDAR *et al.*, 2020). No caso deste trabalho, a escolha do RO se dirige para a avaliação da memória de curto prazo, baseando-se no paradigma de que roedores tem preferência por explorar objetos novos àqueles que são familiares (ENNACEUR; DELACOUR, 1988; LEGER *et al.*, 2013). Os resultados apresentados nos indicam que apenas os animais que testemunharam a interação não agressiva exploraram mais o objeto novo do que o familiar, independentemente da idade. A partir desses dados podemos inferir que os sujeitos de ambas as idades e expostos ao ETDS tiveram dificuldade em reconhecer e diferenciar objetos novos de familiares. Tal resultado, quando confrontado com a literatura, corrobora a hipótese de que os camundongos machos que passaram pelo estresse crônico apresentam prejuízo na memória dependente do HPC (DIAMOND *et al.*, 2007; JOËLS; BARAM, 2009; VOGEL *et al.*, 2017; FRESCA-DA-COSTA *et al.*, 2023). Curiosamente, em relação a estrutura e ativação do HPCd, os resultados da imuno-histoquímica nos mostraram lateralidade que se relaciona de maneira diferente dependendo da idade, onde o lado esquerdo dos camundongos adolescentes expostos ao ETDS apresentou menor expressão de proteína Δ fosB que o direito, e para os adultos, o lado direito apresentou menor expressão que o esquerdo.

Após o advento do paciente H.M, que demonstrou a participação do hipocampo na formação e recuperação de novas memórias, muitas pesquisas que visam entender o complexo mecanismo que abarca tão importante processo cognitivo, bem como produzir uma definição adequada para o próprio termo, que pode ser abordado de formas diferentes, em diferentes áreas do conhecimento e que torna ainda mais desafiador e importante estudar o assunto (TULVING, 2005; DUDAI; ROEDIGER; TULVING, 2007; MORRIS, 2007). Assim, diversos estudos têm tentado entender qual o real papel do hipocampo nessa complexa relação cognitiva, inclusive buscando averiguar o papel da lateralidade em determinadas doenças da emoção como o transtorno de estresse pós-traumático (TEPT), onde o hipocampo esquerdo apresenta uma assimetria de volume em relação ao direito (OCKLENBURG *et al.*, 2016). Porém, tais trabalhos não levam em consideração as respostas defensivas dos sujeitos, apenas relacionam sintomas de determinadas doenças psicológicas com características morfológicas do hipocampo em cada uma delas. Aparentemente, há uma adaptação para que as memórias relacionadas ao estresse sejam adquiridas e consolidadas (DIAMOND *et al.*, 2007; JOËLS; FERNANDEZ; ROOZENDAAL, 2011; SCHWABE *et al.*, 2012), e que tais adaptações sejam em função das mudanças funcionais que ocorrem no hipocampo, que vão desde mudanças no padrão de produção genômica de glicocorticoides (JOËLS; BARAM, 2009) até alteração da consolidação da memória do eixo “cognitivo” CPFm-Hipocampo (SCHWABE *et al.*, 2012; VOGEL *et al.*, 2017).

Em estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa, utilizando o protocolo de EDS, onde foram avaliadas as respostas defensivas de camundongos machos, comportamentos mnemônicos utilizando o RO e posteriormente quantificando a expressão da proteína Δ FosB no HPCd e ventral (HPCv), além de outros testes que tinham como objetivo compreender a relação CPFm-hipocampo (FRESCA-DA-COSTA *et al.*, 2023), demonstraram que camundongos machos que passaram pelo estresse crônico exibiram comportamentos do tipo ansioso e tiveram prejuízo da memória de curto prazo. Além disso, o HPCd apresentou diminuição bilateral na expressão de Δ FosB, condizente com o efeito do estresse no HPC, como a atrofia dendrítica (GALEA *et al.*, 1997; WATANABE *et al.*, 1992). Porém, o estudo do nosso grupo demonstra apenas o aumento ou diminuição da ativação neuronal do HPCd (FRESCA-DA-COSTA *et al.*, 2023). Já um estudo que envolve o uso de “*Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs*” (DREADDs)

demonstrou que a inativação do HCPd levou ao prejuízo na memória no teste de RO (TUSCHER *et al.*, 2018).

De acordo com o que ocorre com o CPFm demonstrado por outros estudos do nosso grupo, na qual a lateralidade da região tem papel importante no controle das respostas defensivas (COSTA *et al.*, 2016; FARIA; LAVERDE; NUNES-DE-SOUZA, 2020; SANTOS-COSTA *et al.*, 2021; VICTORIANO *et al.*, 2020), encontramos um efeito dependente da idade na lateralidade no HPCd. Há muitos trabalhos na literatura que discorrem sobre a lateralização funcional do HPC em humanos, destacando a especialização para memória entre lado esquerdo, especializado para memória episódica, contextual e autobiográfica (MAGUIRE; FRITH, 2003; SPIERS *et al.*, 2001) e direito, especializado para navegação espacial (HOWARD *et al.*, 2014; MAGUIRE *et al.*, 1998; SPIERS *et al.*, 2001). E para roedores, alguns poucos estudos já mostraram o envolvimento lateral do HPC para aquisição de memória espacial e a habilidade de criar rotas (JORDAN, 2020; KLUR *et al.*, 2009; SHINOHARA *et al.*, 2012). Todavia, quando o tema é lateralidade do HPC na modulação de comportamentos defensivos, há escassez de trabalhos na área, deixando em aberto a lacuna para novas investigações.

As possíveis explicações para os resultados encontrados são: (i) o estresse ocasionado pelo protocolo utilizado não foi agressivo o suficiente para resultar em comportamentos do tipo ansioso e depressivo e diminuição da atividade locomotora; (ii) a não familiaridade dos camundongos intrusos com os animais submetidos ao ETDS pode ter desempenhado um papel na resposta emocional ao estresse, sugerindo que a empatia pode ser uma variável significativa no desenvolvimento de comportamentos relacionados à depressão; (iii) o processo incompleto de desenvolvimento das vias neurais nos animais adolescentes deve ser ponderada como justificativa para os resultados demonstrados na imuno-histoquímica, comparando os camundongos mais novos e mais velhos.

6. CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho nos levam a sugerir que o estresse ocasionado pelo testemunho do conflito social: (i) não foi capaz de induzir evitação à espaços abertos e reduzir a atividade locomotora, (ii) não induziu comportamento de anedonia relacionado à depressão, (iii) foi capaz de causar prejuízo na memória de curto prazo em camundongos adolescentes e adultos, (iv) causou a redução da

atividade neuronal do hipocampo dorsal, medida pela expressão da proteína Δ fosB, no lado esquerdo dos adolescentes e no lado direito dos adultos.

REFERÊNCIAS

BANDELOW, B.; MICHAELIS, S. Epidemiology of anxiety disorders in the 21st century. **Dialogues in clinical neuroscience**, v. 17, n. 3, p. 327–35, set. 2015.

BAPTISTA-DE-SOUZA, D. *et al.* Sex differences in the role of atypical PKC within the basolateral nucleus of the amygdala in a mouse hyperalgesic priming model. **Neurobiology of Pain**, v. 8, p. 100049, ago. 2020.

BIALA, M. A. G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. p. 93–110, 2012.

BERLYNE, D. E. Novelty and curiosity as determinants of exploratory behaviour. **British Journal of Psychology. General Section**, v. 41, n. 1-2, p. 68–80, set. 1950.

CANTO DE SOUZA, L. *et al.* Carbonic anhydrase activation enhances object recognition memory in mice through phosphorylation of the extracellular signal-regulated kinase in the cortex and the hippocampus. **Neuropharmacology**, v. 118, 2017.

CERQUEIRA, J. J. *et al.* The prefrontal cortex as a key target of the maladaptive response to stress. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 27, n. 11, p. 2781–2787, mar. 2007.

CHAOULOFF, F. Social stress models in depression research: what do they tell us? **Cell and Tissue Research**, v. 354, n. 1, 27 out. 2013.

CZÉH, B. *et al.* Chronic social stress inhibits cell proliferation in the adult medial prefrontal cortex: hemispheric asymmetry and reversal by fluoxetine treatment. **Neuropsychopharmacology**, v. 32, n. 7, p. 1490–1503, 13 jul. 2007.

CZÉH, B. *et al.* Animal models of major depression and their clinical implications. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 64, jan. 2016.

BAILEY, M.; SILVER, R. Sex differences in circadian timing systems: implications for disease. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 35, n. 1, p. 111–139, jan. 2014.

COSTA, N. S. *et al.* Functional lateralization of the medial prefrontal cortex in the modulation of anxiety in mice: left or right? **Neuropharmacology**, v. 108, p. 82–90, 2016.

DIAMOND, D. M. *et al.* The temporal dynamics model of emotional memory processing: a synthesis on the neurobiological basis of stress-induced amnesia, flashback and traumatic memories, and the Yerkes-Dodson law. **Neural plasticity**, v. 2007, p. 60803, 2007.

DESLAURIERS, J. *et al.* Current status of animal models of posttraumatic stress

disorder: behavioral and biological phenotypes, and future challenges in improving translation. **Biological Psychiatry**, v. 83, n. 10, p. 895–907, maio 2018.

DONAHUE, R. J. *et al.* Effects of striatal Δ FosB overexpression and ketamine on social defeat stress-induced anhedonia in mice. **Biological Psychiatry**, v. 76, n. 7, p. 550–558, 1 out. 2014.

DONNER, N. C.; LOWRY, C. A. Sex differences in anxiety and emotional behavior. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 465, n. 5, 16 maio 2013.

EAGLE, A. L.; FITZPATRICK, C. J.; PERRINE, S. A. Single prolonged stress impairs social and object novelty recognition in rats. **Behavioural brain research**, v. 256, p. 591–597, nov. 2013.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. **Behavioural Brain Research**, v. 31, n. 1, p. 47–59, nov. 1988.

FANSELOW, M. S.; DONG, H.-W. Are the Dorsal and Ventral Hippocampus Functionally Distinct Structures? **Neuron**, v. 65, n. 1, p. 7–19, jan. 2010.

FARIA, M. P.; LAVERDE, C. F.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Anxiogenesis induced by social defeat in male mice: Role of nitric oxide, NMDA, and CRF1 receptors in the medial prefrontal cortex and BNST. **Neuropharmacology**, 166, 2020.

FLECK, M. P. DE A. *et al.* Diretrizes da Associação Médica Brasileira para o tratamento da depressão (versão integral). **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 25, n. 2, jun. 2003.

FRESCA-DA-COSTA *et al.* Emotional- and cognitive-like responses induced by social defeat stress in male mice are modulated by the BNST, amygdala, and hippocampus. **Frontiers in integrative neuroscience**, v. 17, 2023.

GALEA, L. A. *et al.* Sex differences in dendritic atrophy of CA3 pyramidal neurons in response to chronic restraint stress. **Neuroscience**, v. 81, n. 3, p. 689–697, dez. 1997.

GEE, D. G.; CASEY, B. J. The impact of developmental timing for stress and recovery. **Neurobiology of Stress**, v. 1, p. 184–194, jan. 2015.

GOLDEN, S. A. *et al.* A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice. **Nature Protocols**, v. 6, n. 8, p. 1183–1191, 2011.

GOULARTE, J. F. *et al.* COVID-19 and mental health in Brazil: psychiatric symptoms in the general population. **Journal of Psychiatric Research**, v. 132, p. 32–37, jan. 2021.

GOLDMAN-RAKIC, P. S.; SELEMON, L. D.; SCHWARTZ, M. L. Dual pathways connecting the dorsolateral prefrontal cortex with the hippocampal formation and parahippocampal cortex in the rhesus monkey. **Neuroscience**, v. 12, n. 3, p. 719–

743, jul. 1984.

GRAEFF, F. G. *et al.* Pharmacology of human experimental anxiety. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n. 4, p. 421–432, abr. 2003.

HE, R. R. *et al.* Predator stress-induced depression is associated with inhibition of hippocampal neurogenesis in adult male mice. **Neural Regeneration Research**, v. 14, n. 2, p. 298, 2019.

HOLLIS, F.; KABBAJ, M. Social defeat as an animal model for depression. **ILAR Journal**, v. 55, n. 2, 1 jan. 2014.

HOWARD, L. R. *et al.* The hippocampus and entorhinal cortex encode the path and Euclidean distances to goals during navigation. **Current biology: CB**, v. 24, n. 12, p. 1331–1340, jun. 2014.

IÑIGUEZ, S. D. *et al.* Vicarious Social Defeat Stress Induces Depression-Related Outcomes in Female Mice. **Biological Psychiatry**, v. 83, n. 1, jan. 2018.

IÑIGUEZ, S. D. *et al.* Social defeat stress induces a depression-like phenotype in adolescent male c57BL/6 mice. **Stress**, v. 17, n. 3, p. 247–255, abr. 2014.

IRLE, E.; MARKOWITSCH, H. J. Widespread cortical projections of the hippocampal formation in the cat. **Neuroscience**, v. 7, n. 11, p. 2637–2647, 1982.

ISHIKAWA, R. *et al.* Improvement of PTSD-like behavior by the forgetting effect of hippocampal neurogenesis enhancer memantine in a social defeat stress paradigm. **Molecular Brain**, v. 12, n. 1, p. 68, 2 dez. 2019.

ISINGRINI, E. *et al.* Association between Repeated Unpredictable Chronic Mild Stress (UCMS) Procedures with a High Fat Diet: A Model of Fluoxetine Resistance in Mice. **PLoS ONE**, v. 5, n. 4, p. e10404, 28 abr. 2010.

JOËLS, M.; BARAM, T. Z. **The neuro-symphony of stress. Nature reviews. Neuroscience**, jun. 2009.

JOËLS, M.; FERNANDEZ, G.; ROOZENDAAL, B. Stress and emotional memory: a matter of timing. **Trends in cognitive sciences**, v. 15, n. 6, p. 280–288, jun. 2011.

JORDAN, J. T. The rodent hippocampus as a bilateral structure: A review of hemispheric lateralization. **Hippocampus**, v. 30, n. 3, p. 278–292, mar. 2020.

JURUEN A, M. F.; CLEARE, A. J.; PARIANTE, C. M. The hypothalamic pituitary adrenal axis, glucocorticoid receptor function and relevance to depression. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 26, n. 3, p. 189–201, 1 set. 2004.

KIM, J. J.; DIAMOND, D. M. The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 3, n. 6, p. 453–462, jun. 2002.

KINSEY, S. G. *et al.* Repeated social defeat causes increased anxiety-like behavior

and alters splenocyte function in C57BL/6 and CD-1 mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 21, n. 4, p. 458–466, maio 2007.

KLOET, E.; JOELS, M.; HOLSBOER, F. Stress and the brain: from adaptation to disease. **Nat Rev Neurosci**, v. 6, n. 6, p. 463–475, 2005.

LEGER, M. *et al.* Object recognition test in mice. **Nature Protocols**, v. 8, n. 12, p. 2531–2537, 2013.

KLUR, S. *et al.* Hippocampal-dependent spatial memory functions might be lateralized in rats: An approach combining gene expression profiling and reversible inactivation. **Hippocampus**, v. 19, n. 9, p. 800–816, set. 2009.

LEMAIRE, M. Social Recognition Task in the Rat. **Current Protocols in Pharmacology**, p. 1–11, 2004.

LI, S. *et al.* Effects of acute restraint stress on different components of memory as assessed by object-recognition and object-location tasks in mice. **Behavioural brain research**, v. 227, n. 1, p. 199–207, fev. 2012.

MAGUIRE, E. A. *et al.* Knowing where and getting there: a human navigation network. **Science (New York, N.Y.)**, v. 280, n. 5365, p. 921–924, maio 1998.

MAGUIRE, E. A.; FRITH, C. D. Lateral asymmetry in the hippocampal response to the remoteness of autobiographical memories. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 23, n. 12, p. 5302–5307, jun. 2003.

MARROCCO, J. *et al.* The effects of antidepressant treatment in prenatally stressed rats support the glutamatergic hypothesis of stress-related disorders. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 6, p. 2015–2024, 5 fev. 2014.

MCEWEN, B. S. Brain on stress: How the social environment gets under the skin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, supplement 2, 16 out. 2012.

MUMTAZ, F. *et al.* Neurobiology and consequences of social isolation stress in animal model—A comprehensive review. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 105, p. 1205–1222, May 2018.

NAVA-MESA, M. O.; LAMPREA, M. R.; MÚNERA, A. Divergent short- and long-term effects of acute stress in object recognition memory are mediated by endogenous opioid system activation. **Neurobiology of learning and memory**, v. 106, p. 185–192, nov. 2013.

NESTLER, E. J. Review. Transcriptional mechanisms of addiction: role of DeltaFosB. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 363, n. 1507, p. 3245–3255, out. 2008.

NESTLER, E. J. Δ FosB: a transcriptional regulator of stress and antidepressant

responses. **European journal of pharmacology**, v. 753, p. 66–72, abr. 2015.

NESTLER, E. J.; BARROT, M.; SELF, D. W. DeltaFosB: a sustained molecular switch for addiction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 20, p. 11042–11046, set. 2001.

NESTLER, E. J.; KELZ, M. B.; CHEN, J. DeltaFosB: a molecular mediator of long-term neural and behavioral plasticity. **Brain research**, v. 835, n. 1, p. 10–17, jul. 1999.

NUTT, D. J.; STEIN, D. J. Understanding the neurobiology of comorbidity in anxiety disorders. **CNS Spectrums**, v. 11, n. S12, p. 13–20, 7 nov. 2006.

OCKLENBURG, S. *et al.* Stress and laterality: the comparative perspective. **Physiology & Behavior**, v. 164, p. 321–329, out. 2016.

PADILLA-COREANO, N. *et al.* Direct ventral hippocampal-prefrontal input is required for anxiety-related neural activity and behavior. **Neuron**, v. 89, n. 4, p. 857–866, 2016.

PAGE, C. E.; COUTELLIER, L. Prefrontal excitatory/inhibitory balance in stress and emotional disorders: Evidence for over-inhibition. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 105, out. 2019.

PODDAR, I. *et al.* Chronic oral treatment with risperidone impairs recognition memory and alters brain-derived neurotrophic factor and related signaling molecules in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 189, p. 172853, Jan. 2020.

PRYCE, C. R.; FUCHS, E. Chronic psychosocial stressors in adulthood: Studies in mice, rats and tree shrews. **Neurobiology of Stress**, v. 6, fev. 2017.

RIGA, D. *et al.* Social defeat-induced anhedonia: effects on operant sucrose-seeking behavior. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 9, 7 ago. 2015.

ROSEN, J. B.; SCHULKIN, J. From normal fear to pathological anxiety. **Psychological Review**, v. 105, n. 2, p. 325–350, 1998.

RYGULA, R. *et al.* Effects of fluoxetine on behavioral deficits evoked by chronic social stress in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 174, n. 1, 1 nov. 2006.

SANT'ANA, A. B. *et al.* Role of 5-HT_{2C} receptors of the dorsal hippocampus in the modulation of anxiety- and panic-related defensive responses in rats. **Neuropharmacology**, v. 148, n. January, p. 311–319, 2019.

SANTOS-COSTA, N. *et al.* Glutamatergic neurotransmission controls the functional lateralization of the mPFC in the modulation of anxiety induced by social defeat stress in male mice. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, n. Received on: 15 Apr 2021.

SCHWABE, L. *et al.* Stress effects on memory: an update and integration.

Neuroscience and biobehavioral reviews, v. 36, n. 7, p. 1740–1749, ago. 2012.

SHINOHARA, Y. *et al.* Right-hemispheric dominance of spatial memory in split-brain mice. **Hippocampus**, v. 22, n. 2, p. 117–121, fev. 2012.

SPIERS, H. J. *et al.* Unilateral temporal lobectomy patients show lateralized topographical and episodic memory deficits in a virtual town. **Brain: a journal of neurology**, v. 124, n. Pt 12, p. 2476–2489, dez. 2001.

TIAN, S.-W.; XU, F.; GUI, S.-J. Apelin-13 reverses memory impairment and depression-like behavior in chronic social defeat stressed rats. **Peptides**, v. 108, p. 1–6, out. 2018.

TSE, Y. C. *et al.* A longitudinal study of stress-induced hippocampal volume changes in mice that are susceptible or resilient to chronic social defeat. **Hippocampus**, v. 24, n. 9, set. 2014.

TUSCHER, J. J. *et al.* Chemogenetic inactivation of the dorsal hippocampus and medial prefrontal cortex, individually and concurrently, impairs object recognition and spatial memory consolidation in female mice. **Neurobiology of learning and memory**, v. 156, p. 103–116, dez. 2018.

VICTORIANO, G. *et al.* Inhibition of the left medial prefrontal cortex (mPFC) prolongs the social defeat-induced angiogenesis in mice: attenuation by NMDA receptor blockade in the right mPFC. **Behavioural Brain Research**, v. 378, p. 112312, jan. 2020.

VOGEL, S. *et al.* Stress induces a shift towards striatum-dependent stimulus-response learning via the mineralocorticoid receptor. **Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 42, n. 6, p. 1262–1271, maio 2017.

ZHANG, T. R. *et al.* Negative Memory Engrams in the Hippocampus Enhance the Susceptibility to Chronic Social Defeat Stress. **The Journal of Neuroscience**, v. 39, n. 38, p. 7576–7590, 12 ago. 2019.

WATANABE, Y. *et al.* Phenytoin prevents stress- and corticosterone-induced atrophy of CA3 pyramidal neurons. **Hippocampus**, v. 2, n. 4, p. 431–435, out. 1992.

WINGENFELD, K.; WOLF, O. T. Stress, memory, and the hippocampus. **Frontiers of Neurology and Neuroscience**, v. 34, p. 109–120, 2014.

WILLNER, P. Chronic Mild Stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. **Neuropsychobiology**, v. 52, n. 2, p. 90–110, 2005.