



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**

**Faculdade de Ciências Farmacêuticas Campus de Araraquara**

**Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas**



**Influência da idade nos efeitos do estresse psicossocial sobre a  
ansiedade e cognição em camundongos fêmeas**

**FERNANDA VICTORINO DE SOUZA**

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza.

Coorientadores: Dr. Lucas Canto de Souza e Dra.  
Daniela Baptista de Souza.

**Araraquara, SP**

**-2023-**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**

**Faculdade de Ciências Farmacêuticas Campus de Araraquara Programa de  
Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas**

**Influência da idade nos efeitos do estresse psicossocial sobre a  
ansiedade e cognição em camundongos fêmeas**

**FERNANDA VICTORINO DE SOUZA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Farmacêuticas como parte  
dos requisitos para obtenção do título de Mestre em  
Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza.

**Araraquara, SP**

**2023**

---

**S729i**

Souza, Fernanda Victorino de.

Influência da idade nos efeitos do estresse psicossocial sobre a ansiedade e cognição em camundongos fêmeas / Fernanda Victorino de Souza. – Araraquara: [S.n.], 2023.  
63 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Ricardo Luiz Nunes de Souza.

Coorientador: Lucas Canto de Souza.

Coorientadora: Daniela Baptista de Souza.

1. Camundongos fêmeas. 2. Estresse psicossocial. 3. Ansiedade. 4. Prejuízo cognitivo. I. Souza, Ricardo Luiz Nunes de, orient. II. Souza, Lucas Canto de, coorient. III. Souza, Daniela Baptista de. IV. Título.

---

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP - Campus de Araraquara

**CAPES: 33004030078P6**

**Esta ficha não pode ser modificada**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



### CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Influência da idade nos efeitos do estresse psicossocial sobre a ansiedade e cognição em camundongos fêmeas

**AUTORA: FERNANDA VICTORINO DE SOUZA**

**ORIENTADOR: RICARDO LUIZ NUNES DE SOUZA**

**COORIENTADORA: DANIELA BAPTISTA DE SOUZA**

**COORIENTADOR: LUCAS CANTO DE SOUZA**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciências Farmacêuticas, área: Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. RICARDO LUIZ NUNES DE SOUZA (Participação Presencial)  
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Prof. Dr. TARCISO TADEU MIGUEL (Participação Virtual)  
Instituto de Ciências Biomédicas / Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

Prof. Dr. MARCELO TADEU MARIN (Participação Presencial)  
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Araraquara, 12 de julho de 2023

## **DEDICATÓRIA**

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.”

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| LISTA DE FIGURAS.....   | 7  |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....   | 8  |
| RESUMO.....   | 9  |
| ABSTRACT.....   | 10 |
| 1.INTRODUÇÃO.....   | 11 |
| 2.OBJETIVO.....   | 20 |
| 4.MATERIAL E MÉTODOS.....   | 21 |
| 3.1 ANIMAIS.....  | 21 |
| 3.2. ESTRESSE POR TESTEMUNHO DA DERROTA SOCIAL (ETDS).....  | 21 |
| 3.3 TESTE DE INTERAÇÃO SOCIAL (TIS).....  | 23 |
| 3.4. TESTE DE ANSIEDADE – LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE).....  | 24 |
| 3.5. TESTE DO CAMPO ABERTO (CA).....  | 25 |
| 3.6. TESTE DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS (TRO).....  | 26 |
| 3.7. TESTE DO ESGUICHO DE SACAROSE (TES).....   | 27 |
| 3.8. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....   | 29 |
| 3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....   | 30 |
| 3.10. ÉTICA.....  | 30 |
| 4. RESULTADOS.....  | 31 |
| 4.1. Camundongos fêmeas adultas apresentam aumento de evitação social<br>quando expostas ao ETDS.....                       | 31 |
| 4.2. Estresse de testemunho da derrota social diminui a exploração dos braços<br>abertos em camundongos fêmeas adultas..... | 32 |

|  |    |
|--|----|
| 4.3. Estresse de testemunho da derrota social não altera a exploração no CA.....             | 33 |
| 4.4. O ETDS prejudica a memória de curto prazo de camundongos fêmeas<br>Adultas.....         | 34 |
| 4.5. O ETDS não alterou os comportamentos avaliados no teste do Esguicho<br>de Sacarose..... | 35 |
| 5. DISCUSSÃO.....  | 36 |
| 6. CONCLUSÃO.....  | 43 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....   | 44 |

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1-** Representação esquemática de cada uma das fases da sessão de estresse de testemunha de derrota social.

**Figura 2:** Representação esquemática de cada uma das fases da sessão de interação não agressiva.

**Figura 3-** Ilustração do Teste de Interação Social (TIS). **ZA:** Zona de afastamento e **ZI:** Zona de Interação.

**Figura 4-** Representação esquemática do Labirinto em Cruz Elevado

**Figura 5 –** Representação esquemática da arena utilizada para realização do teste do Campo Aberto (CA).

**Figura 6 –** Representação esquemática do protocolo do teste de reconhecimento de objetos. (A) T1 (B) T2.

**Figura 7- (A)** Representação esquemática do protocolo utilizado no teste do esguicho de sacarose. (B) Movimentos de autolimpeza realizados pelo camundongo.

**Figura 8-** Delineamento experimental do protocolo de testemunho da derrota social. **TIS**, Teste de Interação Social; **LCE**, Labirinto em Cruz Elevado; **TCA**, Teste do Campo Aberto; **TRO**, Teste de Reconhecimento de Objetos; **TES**, Teste de Esguicho de Sacarose.

**Figura 9:** Efeito da idade sobre o comportamento de evitação social em camundongos fêmeas submetidas ao protocolo de ETDS. (A) Tempo gasto na zona de interação (ZI). (B) Tempo gasto na zona de afastamento (ZA). (C) Razão da interação social na ZI. As barras representam as médias ( $\pm$ EPM). \* $p \leq 0,05$  comparado ao respectivo grupo sem alvo. # $p < 0,05$  comparado ao grupo TINA adulta. TINA, testemunhas de interação não agressiva; ETDS, estresse de testemunha de derrota social.

**Figura 10:** Efeito da idade sobre o comportamento de camundongos testemunhas de EDS e expostos ao Labirinto em Cruz Elevado. (A) número de entradas nos braços fechados; (B) Porcentagem de entradas nos braços abertos (%EBA); (C) Porcentagem do tempo gasto nos braços abertos (%TBA). As barras representam as médias ( $\pm$ EPM). \* $p \leq 0,05$  comparado ao

respectivo grupo TINA. TINA, testemunhas de interação não-agressiva; ETDS, estresse de testemunha de derrota social.

**Figura 11:** Avaliação da idade sobre o comportamento de camundongos testemunhas de EDTS avaliados no Campo Aberto. (A) total de cruzamentos; (B) tempo gasto no centro do aparato. As barras representam as médias ( $\pm$ EPM). TINA, testemunhas de interação não-agressiva; ETDS, estresse de testemunha de derrota social.

**Figura 12:** Avaliação da idade sobre o comportamento de camundongos testemunhas de EDS avaliados no teste de reconhecimento de objetos. (A) Porcentagem do tempo de exploração do objeto familiar e novo. (B) Índice de discriminação que relaciona o tempo de exploração do objeto familiar com o tempo de exploração do objeto novo. As barras representam as médias ( $\pm$ EPM). \* $p \leq 0,05$  comparado ao objeto familiar do respectivo grupo. # $p \leq 0,05$  comparado ao grupo TINA adulta. TINA, testemunhas de interação não-agressiva; ETDS, estresse de testemunha de derrota social.

**Figura 13:** Ausência de efeito da idade sobre o comportamento de camundongos testemunhas de EDS de derrota social avaliados no teste de esguicho de sacarose. (A) Latência para início do autocuidado; (B) tempo de autocuidado; (C) frequência de autocuidado. As barras representam as médias ( $\pm$ EPM). TINA, testemunhas de interação não-agressiva; ETDS, estresse de testemunha de derrota social.

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

**EDS** – Estresse de derrota social

**ETDS** – Estresse de testemunha da derrota social

**TINA** – Testemunha da interação não agressiva

**DPN**- Dias Pós Natal

**TA** – Transtorno de Ansiedade

**LCE** – Labirinto em Cruz Elevado

**MT**- Memória de Trabalho

**MCD**- Memória de Curta Duração

**MLD**- Memória de Longa Duração

**TIS**- Teste de Interação Social

**BA** – Braços abertos

**BF** – Braços fechados

**%EBA** – Porcentagem de entradas nos braços abertos;

**%TBA** – Porcentagem de tempo nos braços abertos;

**CA** – Campo Aberto

**F**- Familiar

**N** – Novo

**RO** – Reconhecimento de Objetos

**T1** – Teste 1

**T2** – Teste 2

**ID** – Índice de discriminação

**TES** – Teste do Esguicho de Sacarose

**CPFm** – Córtex pré-frontal medial

## RESUMO

Estudos pré-clínicos indicam que o estresse pode estar associado ao desenvolvimento de doenças neuropsiquiátricas como ansiedade, depressão e prejuízo cognitivo. Os transtornos de ansiedade apresentam alta prevalência e acometem majoritariamente as mulheres em meia-idade. Entretanto, ainda são limitados os estudos na neurociência básica em que fêmeas são utilizadas e, especificamente, na investigação da influência da idade sobre as consequências do estresse. Dessa maneira, esse trabalho busca avaliar a influência da idade sobre as respostas defensivas e cognitivas em camundongos fêmeas adolescentes e adultas submetidas ao estresse psicossocial induzido através do Estresse de Testemunho de Derrota Social (ETDS). Camundongos *Swiss-Webster* fêmeas adolescentes e adultas foram expostas a 10 dias de EDTS. Após a última sessão foram realizados os seguintes testes comportamentais relacionados à (i) ansiedade: Teste de Interação Social (TIS); Labirinto em Cruz Elevado (LCE) e Campo Aberto (CA); (ii) avaliação da memória de curta duração: Teste de Reconhecimento de Objetos (RO), e (iii) depressão: Teste de Esguicho de Sacarose (TES). O protocolo ETDS induziu aumento de evitação social e de respostas relacionadas à ansiedade (TIS e LCE), além de prejuízo cognitivo (RO) apenas nas fêmeas adultas, sem alterar o perfil das respostas comportamentais relacionadas à depressão (TES). Frente aos dados obtidos, verifica-se que o modelo de estresse de testemunha da derrota social se mostra como uma importante ferramenta na investigação das consequências emocionais e cognitivas relacionadas ao estresse psicossocial em camundongos fêmeas. Adicionalmente, nosso estudo demonstrou que a idade exerce uma importante influência sobre estas respostas, uma vez que apenas as fêmeas adultas apresentaram aumento de respostas relacionadas à ansiedade e prejuízo cognitivo como consequência do estresse psicossocial.

**Palavras chaves:** Camundongos fêmeas, estresse psicossocial, ansiedade, prejuízo cognitivo.

## ABSTRACT

Preclinical studies indicate that stressful situations may be strongly related to the development of neuropsychiatric disorders such as anxiety, depression, and cognitive impairment. Anxiety disorders have a high prevalence and predominantly affect middle-aged women. However, there are still limited studies in basic neuroscience that includes female subjects, specifically investigating the influence of age on the consequences of stress. Here we evaluated the influence of age on defensive- and cognitive- like responses in adolescent and adult female mice subjected to psychosocial stress induced by witnessing social defeat stress (WSDS). Adolescent and adult female Swiss-Webster mice were exposed to 10 days of WSDS. After the last session, the following behavioral tests were performed: Social Interaction Test (SIT); Elevated Plus Maze (EPM), and Open Field (OF) to assess anxiety-like responses. The Object Recognition Test (OR) was used to evaluate responses related to short-term memory, and Sucrose Splash Test (SST) to verify depression-like behaviors. The chronic WSDS protocol induced increased social avoidance and anxiety-like responses and promoted cognitive impairment only in adult female mice. Based on the obtained data, we found that the witness stress model of social defeat is an important tool for investigating the affective and cognitive consequences of psychosocial stress in female mice. Additionally, we demonstrated that age exerts an important influence on these responses, as we observed that only adult females showed increased anxiety-like responses and cognitive impairment as a consequence of psychosocial stress.

Keywords: female mice, psychosocial stress, anxiety, cognitive impairment

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 Ansiedade, Depressão e Estresse**

A ansiedade é considerada um estado emocional e fisiológico necessário ao ser humano e importante para se obter um bom desempenho em tarefas de natureza cognitiva, mas quando em excesso, esta emoção pode desencadear prejuízos no desempenho, podendo ser classificada de ansiedade patológica (GRAEFF et al., 2003). Esta, diferentemente da ansiedade fisiológica, é caracterizada por respostas emocionais exageradas, disfuncionais e incongruentes à uma dada situação que o indivíduo pode ter sido exposto ou não, ou seja, situações cotidianas a qual engloba o ambiente inserido, que pode ser desencadeadas principalmente sensações como perda do controle momentânea devido ao acontecido (DE KONINCK; SCHULMAN, 1998; IONESCU; ROSENBAUM; ALPERT, 2015; ROSEN; SCHULKIN, 1998). Algumas dessas condições, como as fobias, o transtorno de ansiedade generalizada e o transtorno de pânico, tendem a responder à tratamentos farmacológicos e psicológicos (BALDWIN; WALDMAN; ALLGULANDER, 2011).

Até um determinado nível a ansiedade favorece e é necessária para o bom desempenho de tarefas motoras e cognitivas que são inerentes ao ser humanos, mas passa a ser indesejada, ou de ordem patológica, quando interfere com a natureza comportamental e normal do indivíduo, ou seja, ele começa a apresentar dificuldades em executar suas atividades, e até mesmo de controlar suas emoções (ZANGROSSI; GRAEFF, 2004). Considera-se o quadro patológico, quando a partir do momento o sofrimento e o impacto da ansiedade começam a trazer prejuízos ao indivíduo, que pode ser visto por comportamentos de fuga e esquiva de situações importantes, fobia social, prejuízo na da vida acadêmica, social e profissional como um todo (ANDRADE; GORENSTEIN, 1998).

Os transtornos de ansiedade apresentam alta prevalência podendo acometer aproximadamente um terço da população ao longo da vida (BANDELOW; MICHAELIS, 2015). Levantamento feito pela Organização Mundial de Saúde (OMS) indica a prevalência do transtorno de ansiedade (TA) no mundo é de 3,6%, e atinge 5,6% da população do continente americano, sendo que este índice no Brasil alcança 9,3%, considerado o maior porcentual mundial (WORLD HEALTH ORGANISATION, 2017). Além disso, a prevalência destes

transtornos de humor em mulheres chega ser duas vezes maior (ALTEMUS; SARVAIYA; NEILL EPPERSON, 2014).

Em um estudo realizado com homens e mulheres na cidade de São Paulo foi observado que as mulheres são mais acometidas com ansiedade e depressão (ANDRADE; VIANA; SILVEIRA, 2006; TSANG et al., 2008). O estudo ainda mostra que em torno de 46,3% de mulheres e 45,3% dos homens apresentaram em qualquer fase da vida algum tipo de transtorno psiquiátrico.

Já a depressão tem alta relação com a incapacidade em lidar com eventos estressores ao longo da vida, sobretudo quando a exposição se dá de forma continuada ou crônica, levando o indivíduo a perda total ou parcial prazer, além do desinteresse em executar atividades cotidianas e habituais em seu dia a dia (CRYAN; MOMBÉREAU, 2004). Aprofundando-se mais dos sintomas, o indivíduo acometido apresenta desinteresse em realizar as atividades diárias, se sente desamparado, em constante medo, culpa, insatisfação, melancolia e pensamentos suicidas recorrentes, podendo ou não ter alterações do apetite e do sono, que podem ser para mais ou para menos (TENG; HUMES; DEMETRIO, 2005; WEINSTOCK, 2017). Os pacientes deprimidos apresentam ainda limitação em executar suas atividades e seu bem-estar, além de uma maior utilização de serviços de saúde por conta dos fatores mencionados (FLECK et al., 2003). Os episódios depressivos, em cerca de 60% dos casos, são decorrentes de fatores estressantes, principalmente de origem de fatores psicossocial, ligados ao cuidado com as necessidades pessoais, emocionais, de saúde mental do indivíduo (PEETERS et al., 1994). Além disso, já se sabe que fatores genéticos podem ter também o seu papel e sua associação no desenvolvimento da depressão e transtornos de humor. (HUETHER et al., 1999).

Estima-se que aproximadamente metade dos indivíduos recuperados da depressão após tratamento farmacológico experimenta recaída dos sintomas (GOLD; MOREY; MCCARTHY, 2015). Além disso, cerca de 20% a 30% não apresentam resposta satisfatória ao tratamento (JEON; KIM, 2016). Este transtorno afetivo está presente em aproximadamente 320 milhões de indivíduos no mundo; sendo 5,8% da população brasileira onde e as mulheres as mais acometidas (WORLD HEALTH ORGANISATION, 2017).

Nos quadros depressivos, dificuldades no processo de aprendizagem e de formação e consolidação de memórias podem estar relacionado com alterações podendo ser elas de ordens químicas, neurológicas, e afetando assim diretamente a função cerebral (BRAVER; BRACH,

2002). Em um estudo, uma avaliação neuropsicológica feita com pacientes deprimidos, foi analisado o quão a capacidade de se adquirir conhecimento pode ser afetada e o relatos mais frequente foram sobre: a aquisição da memória, a atenção, a concentração, a flexibilidade cognitiva e a abstração (ZAKZANIS; LEACH; KAPLAN, 1999; PORTO; HERMOLIN; VENTURA, 2002). Além disso, não é incomum pacientes com quadro depressivos apresentarem características de transtornos de ansiedade, e da mesma forma ocorre com os pacientes acometidos com o quadro ansioso, onde também podem possuir depressão (TILLER, 2012).

No geral, o cérebro é mais plástico durante a adolescência, permitindo a otimização do comportamento para desafios futuros, ao contrário da idade adulta, quando há maior estabilidade fisiológica e comportamental (BRUST; SCHINDLER; LEWEJOHANN, 2015; TOTTENHAM; GALVÁN, 2016). Para poder determinar com maior especificidade a relação entre os dias pós nascimento (DPN) de camundongos e a fase equivalente do desenvolvimento humano, Spear (2000) descreveu as seguintes relações: início da adolescência (DPN 21-DPN 34), pré-adolescência (DPN 34 – DPN 46) e maturidade sexual ou adolescência tardia (DPN 46 – DPN 59), com base em alterações comportamentais e neurológicas características da adolescência. Em consequência disso, diferentes estudos apontam que investigações acerca de aspectos relacionados à adolescência podem ser realizados com animais até DPN 60 (BRUST; SCHINDLER; LEWEJOHANN, 2015; LAVIOLA et al., 2003; MCCORMICK et al., 2010).

## **1.2 Memória e Estresse**

Estudos pré-clínicos indicam o estresse como um fator que pode estar associado ao desenvolvimento de doenças neuropsiquiátricas, como a ansiedade e depressão (MCEWEN, 2012), sobretudo se a fonte do estresse é de natureza social (CHAOULOFF, 2013; CZÉH et al., 2016; HOLLIS; KABBAJ, 2014; SCHMIDT; STERLEMANN; MÜLLER, 2008). Outro fator é a idade do indivíduo, que somada à natureza do evento estressor, pode ditar a capacidade do indivíduo de se adaptar ou não em resposta ao estresse (GEE; CASEY, 2015). Diante disso, investigar a influência da idade do indivíduo sobre as consequências deste tipo de estresse se faz importante, uma vez que esta variável pode interferir na capacidade de adaptação ao estresse (GEE; CASEY, 2015)

O estresse, de acordo com a definição de Hans Selye (1936), refere-se à reação de uma pessoa diante de uma ameaça real ou possível que afeta diretamente o equilíbrio do corpo humano, também conhecido como homeostase. A homeostase é a capacidade do corpo de

manter condições estáveis e ideais para seu funcionamento adequado, permitindo que a pessoa desempenhe suas atividades normais. Além do estresse físico, Selye também destacou a importância dos fatores psicológicos. Por exemplo, situações como a introdução de algo novo ou a presença de problemas sociais ou pessoais podem ser considerados desencadeadores de estresse. Esses elementos psicológicos têm o potencial de provocar mudanças significativas no comportamento e no funcionamento do corpo, afetando o desempenho das atividades diárias. Isso pode levar a uma saída do estado de equilíbrio, comprometendo o funcionamento ótimo do indivíduo (MCEWEN, 2000).

Com isso sabe-se que a liberação de glicocorticoides (GC) pela suprarrenal, como consequência, tem-se imediata a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (HERMAN; CULLINAN, 1997). O eixo HPA uma vez ativado por algum fator estressor, faz com que os níveis de glicocorticoides que circulam pelo sangue, tenham seu nível elevado (ZUARDI, 2010). Dado isso, têm-se demonstrado cada vez mais em vários estudos, a primordial importância da disfunção do eixo HPA e dos níveis elevados de glicocorticoides, causando causa mudanças significativas e prejudiciais no aparecimento de transtornos neurológicos como a depressão, e ansiedade, bem como outros transtornos de humor sugerindo que este eixo pode ser um alvo para o estudo de novas drogas antidepressivas (CHOPRA; KUMAR; KUHAD, 2011; FARAVELLI et al., 2012).

Em se tratando de ansiedade crônica, quando se tem ativação do eixo HHP, ela não é mais adaptativa, existindo um dano na conexão entre o estressor e a possível causa comportamental, uma vez que o eixo HHA se mantendo hiperativado acarreta prejuízos nos mecanismos de enfrentamento, o que induz a sua baixa tolerância ao estresse crônico (BORTOLUZZI, 2016).

O sistema de resposta ao estresse envolve respostas adaptativas que são ligadas por cascatas neuroendócrinas e neuronais, incluindo o sistema nervoso autônomo (SNA) e o eixo HHP acima citado, como o principal responsável pela produção e liberação de glicocorticoides pelo córtex adrenal. Nos seres humanos, em resposta ao estresse, ocorre a liberação do principal hormônio esteroide, conhecido como o cortisol, que é equivalente à corticosterona em roedores (MARTIN et al., 2009)

Porém, sabe-se que a resposta ao estresse varia de indivíduo para indivíduo e pode ser dividida em três níveis: cognitivo, quando a resposta ao estresse depende de como o indivíduo enxerga dada situação estressora; comportamental, a qual engloba as respostas comportamentais básicas, podendo ser elas de luta e fuga, ou passividade, onde ocorre um

congelamento momentâneo e fisiológico, que faz parte e está ligado ao sistema de defesa, como parte da evolução dos seres animais que ocorre de forma natural, e correlacionando às reações fisiológicas frente a uma situação ou um evento que possa causar, ou ser uma potencial ameaça (MARGIS et al, 2003).

A exposição ao estresse é um fator já conhecido para o aumento do risco e do desenvolvimento de distúrbios psiquiátricos tais como ansiedade, depressão e estresse pós-traumático (JAVIDI; YADOLLAHIE, 2012; KENDLER et al., 1999; KESSLER, 1997). As mesmas exposições, vale ressaltar que levam as mesmas respostas perante ao estresse crônico em humanos e em animais (QI et al., 2006).

Já se sabe que com o envelhecimento ocorre uma queda dos processos mentais isso porque há modificações moleculares, conseqüentemente isso acarreta níveis significativos de alteração da função cognitiva dos indivíduos. Essa perda também pode ser influenciada por fatores psicológicos e/ou emocionais como ansiedade, depressão, estresse e alta exigência pessoal (IZQUIERDO, 2002; SEGOVIA; ARCO; MOTA, 2009; SQUIRE; KANDEL, 2003).

Diferentes estudos apontam que situações de estresse podem desencadear prejuízos cognitivos relacionados à processos mnemônicos (BAHRAMZADEH ZOERAM et al., 2019; LUINE et al., 1994; MCEWEN; SAPOLSKY, 1995), em especial situações de estresse psicossocial (OEI et al., 2006; RABABA'H et al., 2019).

Dentre os diferentes tipos de memória, pode-se classificá-los como de trabalho (MT), de curta ou de longa duração (MCD e MLD) duração (COLCIAGO et al., 2015). Atkinson e Shiffrin (1968) destacaram que a informação é inicialmente processada na memória de trabalho, sendo seguida para MCD. Além disso, a MCD pode permanecer no cérebro por curto espaço de tempo, e com isso podem ficar armazenadas como MLD ou mesmo serem deletadas, ou esquecidas (COLCIAGO et al., 2015).

Na atualidade há três distintos de aprendizado e memória que são bem estabelecidos: memória de trabalho, memória de longo prazo implícita e memória de longo prazo explícita (SMITH; GROSSMAN et al., 2008). Mas segundo Lent (2004), aprofundando mais em seus estudos, traz que as memórias ainda podem ser classificadas em: memória explícita (declarativa), memória implícita (não-declarativa) e memória operacional. Sabe-se que a memória a longo prazo (MLP) é responsável por armazenar informação e o conhecimento por cerca de períodos de longos de tempo. Muito dos conhecimentos por nós adquirido ficam

retidos na MLP, devido a isto, houveram investigadores (e.g., Tulving, 1985) que propuseram sistemas específicos de MLP com o fundamento e finalidade de mostrar os diferentes tipos de conhecimento sendo eles: o conhecimento procedimental, o conhecimento semântico e o conhecimento episódico.

Por outro lado, a capacidade de MCP, tem o seu aumento gradual conforme a evolução da idade, tendo seu início na infância até à adolescência, e tem a sua estabilidade, ou seja, quando é consolidado e desta forma permanecido durante a vida adulta, tendo a sua diminuição progressiva nos idosos, por conta da idade, condição essa normal, visto que conforme vai se aumentando a idade, prejuízos na memória são comuns, como anteriormente citado (PINTO, 1985).

Cabe destacar que o estresse resulta em efeitos distintos na memória de camundongos adolescentes e adultos (PARK et al., 2023), além de importante diferenciação destes efeitos cognitivos quando considerado o sexo (LUINE, 2002), evidenciando haver diferenças sexuais relacionadas aos aspectos cognitivos após episódios de estresse

Quando exposto repetidamente ao estresse social, o ambiente homeostático do cérebro, que mantém o organismo apto a realizar suas funções adequadamente, é alterado de certa forma que leva ao desencadeamento e podendo assim dar origem a várias desordens cognitivas e de humor, que por sua vez prejudicam, impactam a qualidade de vida do indivíduo como um todo, uma vez que saindo da homeostase, o corpo se encontra em um estado vulnerável, de alerta (MCKIM et al., 2016).

Por isso, tendo como principal objetivo mimetizar as condições estressantes em que acontecem em humanos, os modelos animais de estresse vêm sendo cada mais utilizados e de extrema valia na área pesquisa com a finalidade de se testar a fim de produzir estados comportamentais comparáveis aos observados em nossa espécie (QI et al., 2006).

### **1.3 Estresse Psicossocial e Testes Comportamentais**

Grande parte dos paradigmas experimentais envolve a exposição ao estresse físico, mas pode também conter estresse de ordem social, tal qual o estresse de derrota social (EDS) (GOLDEN et al., 2011; TIDEY; MICZEK, 1996; YAP; MICZEK, 2007). Adicionalmente, modelos animais de estresse psicossocial ou psicológico tem sido adotado como uma alternativa para se investigar os efeitos do estresse social de testemunho em comportamentos como do tipo depressivo (HODES et al., 2014; IÑIGUEZ et al., 2014; WARREN et al., 2013).

Neste sentido, considerando que exposições repetidas ao estresse de derrota social em camundongos machos podem causar alterações comportamentais como aumento de ansiedade e de evitação social (CZÉH et al., 2007), ainda não está bem descrito na literatura se estes efeitos também ocorrem em fêmeas, visto que em sua grande maioria, os estudos pré-clínicos são desenvolvidos com o uso de roedores machos (PRYCE; FUCHS, 2017).

Os roedores possuem formação social hierarquicamente estruturada onde nela fazem parte sujeitos dominantes, os quais exibem comportamentos agressivos (CROWCROFT; ROWE, 1963). Neste sentido, estudos anteriores revelaram que roedores machos, quando diante de coespecífico dominante, apresentam respostas comportamentais defensivas, resultando na redução do comportamento agressivo por parte do dominante. Essas respostas defensivas incluem um aumento de comportamentos de submissão, em que os movimentos agressivos são substituídos por comportamentos defensivos imediatos e ativos (como andar para trás) ou comportamentos defensivos passivos (como congelamento). Além disso, essas respostas defensivas também estão associadas à diminuição da locomoção e perda de peso (GONZALEZ et al., 1994; MICZEK; THOMPSON; SHUSTER, 1982).

Foi demonstrado recentemente que animais expostos tanto direta como indiretamente ao estresse social crônico podem apresentar alterações em respostas comportamentais e fisiológicas (WARREN et al., 2020). Por exemplo, a exposição de camundongos machos e fêmeas ao estresse de testemunha de derrota social, que é considerado um estresse psicossocial, induz a comportamentos relacionados à ansiedade e à depressão, como evitação social e anedonia, respectivamente (CARNEVALI et al., 2020; IÑIGUEZ et al., 2018; NAKATAKE et al., 2020; WARREN et al., 2013, 2020).

O modelo de derrota social apresenta limitações assim como qualquer outro modelo experimental: o comportamento agressivo do sujeito dominante pode e deve ser interrompido por qualquer alteração no ambiente por ele dominado e, tendo em vista esses comportamentos pesquisadores devem estar atentos à quantidade de agressão sofrida pelo animal subordinado, podendo assim interferir no processo, já que injúrias físicas em excesso, ou seja, quando o animal é agredido de forma mais violenta que o normal, uma vez que por ser eticamente questionável pois é necessário garantir a segurança e os devidos cuidados aos roedores, as mesmas podem causar alteração nas medidas fisiológicas futuramente estudadas, tendo assim alteração nos resultados esperados (KRISHNAN; NESTLER et al., 2011).

Para avaliação de respostas relacionadas à evitação social, o Teste de Interação Social (TIS) permite avaliar o comportamento dos animais em dois momentos: inicialmente, em um aparato vazio e, em seguida, no mesmo ambiente, desta vez contendo um alvo social (coespecífico) aprisionado numa gaiola posicionada em uma das extremidades do aparato. A aproximação do camundongo intruso é utilizada para avaliar a evitação social. Assim, a razão da exploração/contato social nestes dois momentos é o parâmetro utilizado para avaliar a evitação social (GOLDEN et al., 2011). Já se sabe que ansiedade é uma condição que diminui a interação social, uma vez que a intensidade da luz no aparato e a familiaridade do animal com o aparato podem ser fatores que posteriormente alterarão o seu comportamento. Com isso existem quatro condições em que o teste pode ser realizado: baixa luminosidade, campo familiarizado, alta luminosidade e campo não familiarizado (COLCIAGO et al., 2015; RICCERI; MICHETTI; SCATTONI, 2016).

Para avaliação de respostas relacionadas à ansiedade generalizada, o aparato do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) tem sido amplamente empregado (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005). O LCE é usado para se avaliar uma situação de conflito entre o comportamento exploratório natural do animal para reconhecer o ambiente e a aversão que locais abertos representam, sobretudo pela potencial exposição a predadores ou inimigos naturais, onde é possível se avaliar o índice de ansiedade existente (MORATO, 2006; PELLOW et al., 1985). O LCE foi validado em termos comportamentais, fisiológicos e farmacológicos para ratos (PELLOW et al., 1985) e para camundongos (LISTER, 1987). A aversão aos braços abertos do LCE é um sinalizador de ansiedade influenciado por diversos fatores como, por exemplo, uma única ou múltiplas exposições ao labirinto (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005).

Adicionalmente, o Campo Aberto (CA) é um importante aparato utilizado não apenas para avaliar a atividade locomotora dos animais, mas também para investigar os comportamentos relacionados à ansiedade, onde os animais são colocados no centro de uma arena com paredes elevadas, sendo assim um processo de avaliação que geralmente envolve o confronto forçado do animal ao ambiente novo (WALSH; CUMMINS, 1976). Desta forma, a avaliação da emoção obtida através da exploração do ambiente ao qual o camundongo é colocado pode ser verificada pela distância percorrida no campo aberto e pelo tempo gasto na área central do aparelho, considerada como aversiva para roedores, uma vez que esses animais usam a tigmotaxia durante o seu deslocamento em ambientes potencialmente ameaçadores, tal qual se caracteriza também o braço aberto do LCE (CHOLERIS, 2001). Os valores de distância

percorrida e tempo gasto na área central são, portanto, indicativos indiretos do nível da emoção/ansiedade observada.

O teste de reconhecimento de Objetos (RO) foi um dos primeiros testes pré-clínicos desenvolvidos para o melhor entendimento do estudo da memória de reconhecimento em animais (MISHKIN, 1978). O teste exige que um sujeito se lembre de um item associado a um lugar em particular. Quanto maior o tempo gasto próximo ao objeto novo, depreende-se que o animal apresenta memória do objeto familiar, permitindo que se possa testar a memória de curto (armazenamento de informação por pouco tempo, por exemplo, segundos ou minutos) e longo (armazenamento de informação por um tempo maior, por exemplo, recordada após anos ou por toda a vida) prazo (ANTUNES; BIALA, 2012; LUEPTOW, 2017).

Cabe destacar que, além do aumento de comportamentos relacionados à ansiedade, o estresse também influencia o processo de formação de memórias (EAGLE; FITZPATRICK; PERRINE, 2013; LI et al., 2012; NAVA-MESA; LAMPREA; MÚNERA, 2013), com efeitos sobre o hipocampo (BARKER; WARBURTON, 2011; TUSCHER et al., 2018) e córtex (AKIRAV; MAROUN, 2005; TUSCHER et al., 2018), como possíveis áreas afetadas pelo estresse sobre a modulação dos processos mnemônicos. Com base nesta alteração comportamental, o teste de reconhecimento de objetos torna-se uma importante ferramenta para se analisar a memória de curta duração (LEGER et al., 2013).

O Teste do Esguicho de Sacarose (TES) é um paradigma utilizado na investigação das respostas relacionadas à anedonia, um dos sintomas presentes no transtorno depressivo (RIZVI et al., 2016). A anedonia por definição envolve a diminuição ou ausência da capacidade de sentir prazer (WILLNER 1997), tendo a sua associação com à sensação de fadiga ou perda de energia, muita das vezes pela queixa excessiva de um cansaço exacerbado (AROS, 2008; PIZZAGALLI, 2014; DEL PORTO, 1999), juntamente com a diminuição de autocuidado e comportamento motivacional, que são sintomas associados a depressão, como por exemplo do comportamento de apatia demonstrado por pacientes deprimidos (ISINGRINI et al., 2010; MORETTI et al., 2012; ROSA et al., 2014; WILLNER, 2005).

Considerando as evidências descritas acima, a hipótese levantada por este estudo é que camundongos fêmeas ao serem expostas ao estresse psicossocial podem apresentar consequências defensiva / emocionais (e.g., respostas relacionadas à ansiedade), cognitivas (e.g., memória de curto prazo) e afetivas (e.g., respostas relacionadas à depressão) específicas de acordo com a idade.

## **2. OBJETIVO**

Este estudo teve como objetivo investigar a influência da idade sobre as respostas emocionais, cognitivas e afetivas de camundongos fêmeas com diferentes idades (adolescentes e adultas) submetidas ao estresse por testemunho da derrota social.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

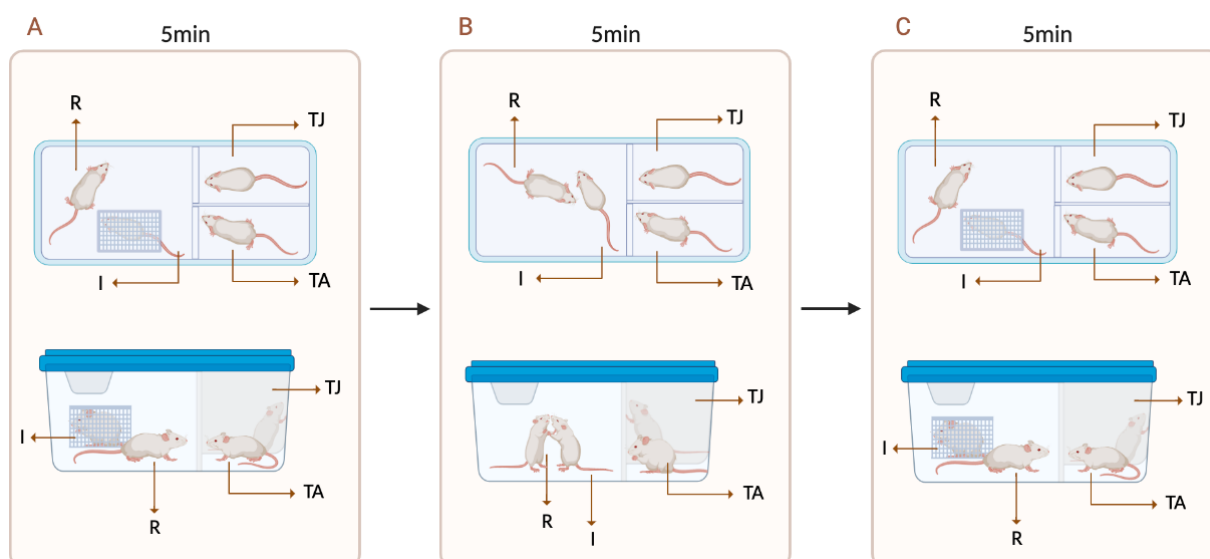
#### **3.1. Animais**

Foram utilizados camundongos heterogênicos da linhagem Swiss-Webster, sendo 40 fêmeas com idades distintas durante o período de testemunho da derrota social, sendo: adolescentes com 45-59 dias pós-natal (DPN) e adultas com 90 – 104 DPN (LAVIOLA et al., 2003). Ainda, o estudo utilizou 20 machos com 46-59 DPN, caracterizados como “intrusos”, e 10 machos de diferentes idades (mais de 100 DPN), usados como residentes. Todos os animais foram provenientes do Centro de Pesquisa e Produção de Animais (CPPA) do Instituto de Biotecnologia da UNESP (IBTEC) de Botucatu.

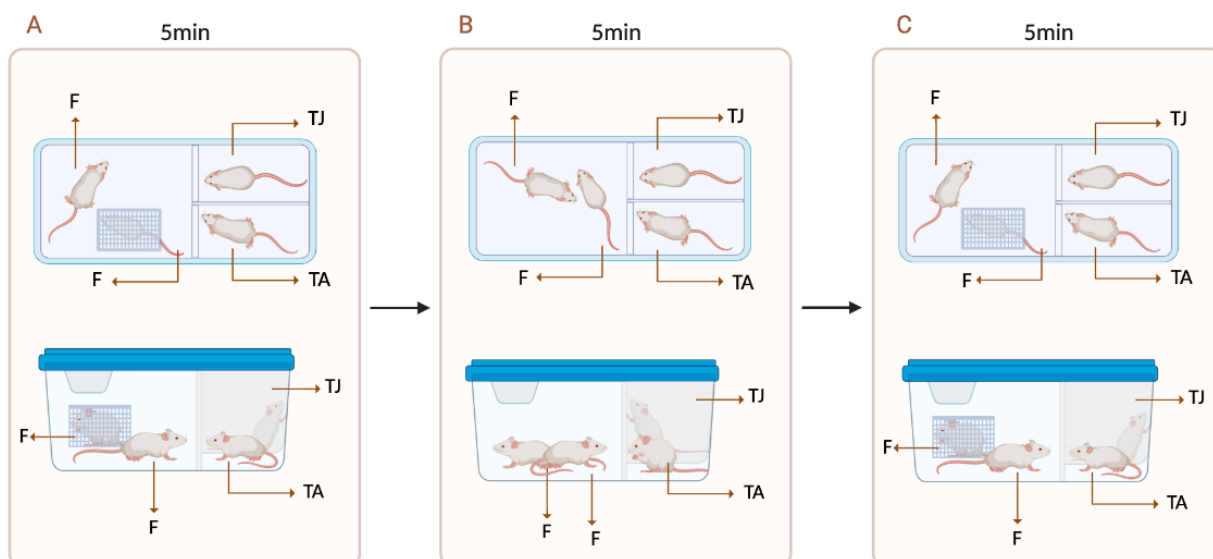
#### **3.2. Estresse de testemunho da derrota social (ETDS)**

Foi utilizada uma variação do modelo de estresse psicossocial por testemunho (IÑIGUEZ et al., 2018), permitindo a exposição simultânea de duas fêmeas ao estímulo estressor. Para tanto, animais machos denominados intrusos, foram expostos à caixa-moradia de um coespecífico agressivo macho não familiar, denominado residente, enquanto os sujeitos experimentais, denominados testemunhas fêmeas, foram confinadas numa gaiola protetora durante o encontro entre os machos, a fim de testemunharem a agressão ao intruso e sua consequente submissão. O episódio de derrota teve duração de 15 minutos, divididos em três fases de 5 minutos cada: inicialmente tanto o intruso quanto as testemunhas foram colocados numa gaiola protetora. Na sequência, o intruso foi retirado da gaiola protetora e exposto aos ataques do residente, enquanto o episódio foi assistido pelas testemunhas. Na terceira fase, o intruso foi então colocado na caixa protetora. As testemunhas permaneceram o episódio todo protegidas pela gaiola protetora. Ao final, o intruso e as testemunhas retornaram às suas caixas-moradia. Os episódios ocorreram por 10 dias (Figura 1). A derrota social é definida pela exibição de comportamentos de submissão [e.g., levantar defensivo: elevação do corpo sobre as patas traseiras, patas dianteiras estendidas em direção ao agressor, cabeça retraída e orelhas arqueadas (MICZEK; THOMPSON; SHUSTER, 1982)]. O grupo controle consistiu em animais que passaram pelo testemunho de uma interação não-agressiva (TINA), isto é, o animal intruso foi exposto a um camundongo não agressor e familiar, ocasião em que era observado por outras duas testemunhas (Figura 2).

**Figura 1:** Representação esquemática de cada uma das fases da sessão de estresse de testemunha de derrota social.



**Figura 2:** Representação esquemática de cada uma das fases da sessão de interação não agressiva.

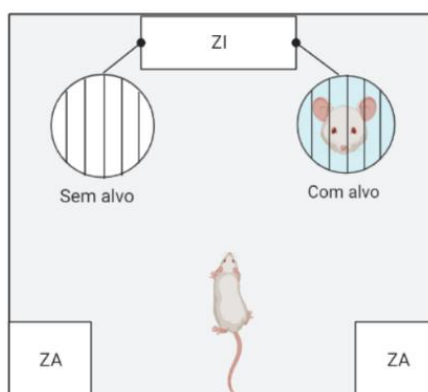


**Fonte:** Laboratório Neuropsicofarmacologia Unesp Araraquara (2023)

### 3.3. Teste de Interação Social (TIS)

No TIS, camundongos fêmeas submetidas ao protocolo ETDS ou TINA foram testadas numa arena de interação social, a qual é formada por uma caixa opaca de acrílico de paredes e assoalho cinza (42×42×15 cm) que possuía uma caixa de contenção de arame (10×6×15 cm) centralizada em uma das paredes. A arena era dividida em uma zona de interação (ZI: área de 14×24 cm; projetada à 8 cm em torno da caixa de contenção de acrílico) e duas zonas de afastamento (áreas mais afastadas da caixa de contenção – medindo 9×9 cm cada, nos cantos da arena). Para a avaliação da exploração basal (150 segundos), as testemunhas foram individualmente colocadas no centro da arena, voltadas para o lado oposto ao alvo vazio (caixa de contenção de arame). Em seguida, o camundongo fêmea testemunha era retirada da arena e um camundongo macho não familiar introduzido na caixa de contenção de arame (alvo). Na sequência, a testemunha foi colocada novamente na arena por mais 150 segundos para avaliação do comportamento de interação social (Figura 3). As sessões foram filmadas e gravadas por meio de uma câmera para posterior análise do comportamento. A medida de interação social foi calculada como a razão entre o tempo gasto na ZI com o alvo pelo tempo gasto na ZI sem alvo.

**Figura 3:** Ilustração do Teste de Interação Social (TIS). **ZA:** Zona de afastamento e **ZI:** Zona de Interação.

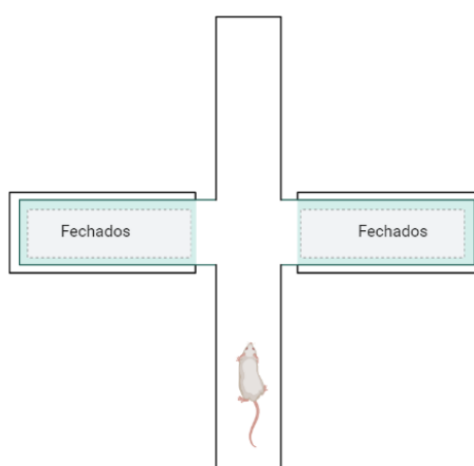


**Fonte:** Laboratório Neuropsicofarmacologia Unesp Araraquara (2023).

### 3.4 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O LCE é um aparato construído com assoalho de madeira e paredes transparentes de vidro (braços fechados) e consiste em dois braços abertos (30 x 5 x 0,25 cm) e dois braços fechados (30 x 5 x 15 cm), unidos ortogonalmente por uma plataforma central comum (5 x 5 cm), sendo o conjunto elevado 38,5 cm do solo por um suporte de madeira. Os animais ETDS e TINA foram colocados com a cabeça voltada para um dos braços abertos, podendo explorar o aparato por um período de 5 minutos, quando foram registrados os índices convencionais de ansiedade (entradas e tempo gasto nos braços abertos do aparelho) e locomoção (frequência de entradas nos braços fechados) (Figura 4). As sessões foram gravadas por meio de um sistema de filmagem para posterior análise dos comportamentos, nesse caso, os dados foram analisados através de um software nomeado como "X-plo-Rat 2005", desenvolvido pelo grupo de pesquisa do laboratório do Dr. Silvio Morato, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo, em Ribeirão Preto-Brasil (o software pode ser baixado livremente em <http://Scotty.FFCLRP.USP.br/X-plo-Rat.html>) (TEJADA et al., 2018).

**Figura 4:** Representação esquemática do Labirinto em Cruz Elevado

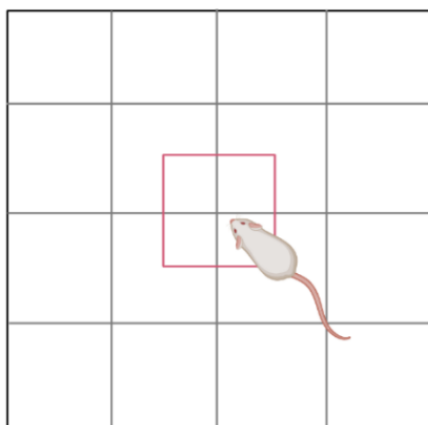


**Fonte:** Laboratório Neuropsicofarmacologia Unesp Araraquara (2023)

### 3.5. Teste do Campo Aberto (CA)

O teste do Campo Aberto (CA) consiste na análise da exploração de camundongos ao longo de 5 minutos num aparato com base quadrada ( $42 \times 42 \times 30$  cm) com 16 divisões marcadas no assoalho do aparato, onde são avaliados a frequência de cruzamentos (número de vezes que o animal cruza as divisões marcadas no chão) e o tempo de permanência na parte central do campo aberto em relação ao tempo despendido na periferia. Como mostrado na Figura 5, o teste de Campo Aberto consiste na medição do comportamento a qual é provocado pela colocação do camundongo em um espaço novo e aberto. O teste de CA é utilizado para se avaliar ansiedade e comportamento exploratório de camundongos frente ao ambiente não familiar (HIMANSHU et al., 2020).

**Figura 5:** Representação esquemática da arena utilizada para realização do teste do Campo Aberto (CA).



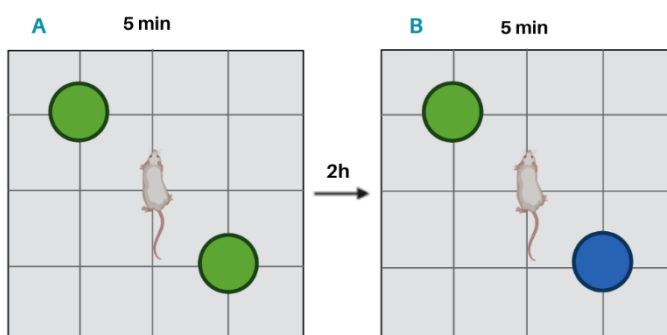
**Fonte:** Laboratório Neuropsicofarmacologia, Unesp Araraquara (2023)

### 3.6 Teste de Reconhecimento de Objetos (RO)

Este teste é baseado na tendência de camundongos explorarem mais objetos novos em comparação a objetos já familiarizados, permitindo o estudo da memória nestes animais (ENNACEUR; DELACOUR, 1988). O protocolo realizado para o teste foi semelhante ao usado em estudos anteriores (CANTO DE SOUZA et al., 2017; PROVENSI et al., 2016) e consistiu em três momentos distintos: habituação à arena ( $42 \times 42 \times 30$  cm), seguido por uma

sessão de treino (T1) e duas horas depois por uma sessão de teste (T2). Vale salientar, como representado na Figura 6, que vinte quatro horas após a habituação, o animal avaliado foi submetido a T1 por 5 minutos na presença de dois objetos iguais para a familiarização. Após essa sessão, o animal foi retornado a sua gaiola para o período de retenção das informações. Duas horas após, no T2, o animal foi recolocado ao ambiente, contendo dois objetos, sendo um familiar (F, no formato no de abacaxi) e um novo (N, no formato de pepino) registrando-se o seu tempo (t) de exploração de cada objeto ao longo de 5 minutos. O tempo (em segundos) gasto pelo camundongo explorando ativamente os objetos foi medido por dois observadores, os quais desconheciam a experiência prévia (i.e., condição) dos camundongos (se TINA ou ETDS). A exploração foi definida como cheirar ou tocar objetos com o focinho e/ou patas dianteiras. A porcentagem de tempo de exploração em cada objeto foi calculada de acordo com a fórmula [%tN ou %tF = tN ou tF/(tN + tF) x 100]. O índice de discriminação (ID) foi calculado de acordo com a fórmula [ID = (tN - tF)/(tN + tF)]. Cuidados foram tomados para evitar preferência de lugar e estímulos olfatórios, buscando-se alterar de forma aleatória a posição dos dois objetos durante a T2, e também limpando-os com álcool a 20% (tanto em T1, quanto em T2).

**Figura 6:** Representação esquemática do protocolo do teste de reconhecimento de objetos. (A) T1 (B) T2

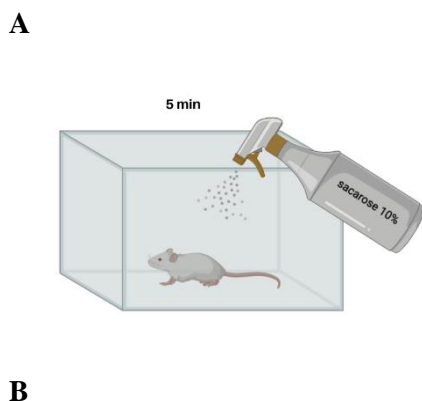


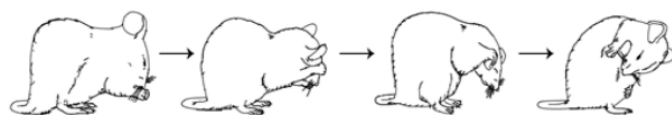
**Fonte:** Laboratório de Neuropsicofarmacologia, Unesp Araraquara (2023)

### 3.7 Teste do Esguicho de Sacarose (TES)

O teste consiste em “esguichar” uma solução de sacarose a 10% no dorso do camundongo em uma gaiola. Devido à sua viscosidade, trata-se de um teste onde há um estímulo para lambidas da solução adocicada (PLANCHEZ; SURGET; BELZUNG, 2019). Após o esguicho, espera-se que o animal faça o autocuidado, e a partir desse primeiro episódio demonstrado pelo animal, são registrados a latência da primeira lambida, o tempo e a frequência total de lambidas por um período de cinco minutos (Figura 7). A redução no comportamento de autolimpeza é considerada como o fenótipo do tipo depressivo (GRIEBEL et al., 2002). A distribuição desse comportamento pode ser entre as regiões frontal (patas dianteiras, face e cabeça) e caudal (corpo) (NOLLET; LE GUIQUET; BELZUNG, 2013) como representado na Figura 6. A execução do protocolo experimental se caracteriza pelo período de habituação dos animais ao aparato por cinco minutos, seguido pela realização de dois esguichos (volume total 0,75 ml) com a solução de sacarose na região dorsal dos animais. Após a identificação do primeiro comportamento de autolimpeza, foram registrados (por meio de gravação da imagem) a frequência e o tempo gasto na realização de autolimpeza durante cinco minutos.

**Figura 7:** (A) Representação esquemática do protocolo utilizado no teste do esguicho de sacarose. (B) Movimentos de autolimpeza realizados pelo camundongo



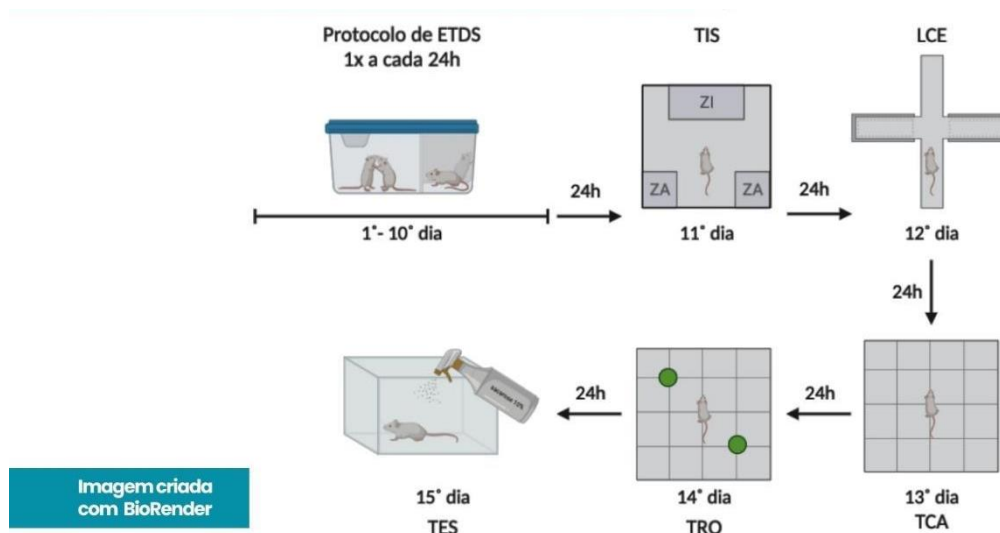


**Fonte:** Laboratório de Neuropsicofarmacologia Unesp Araraquara, 2023.

### 3.8. Procedimento experimental

Camundongos fêmeas adolescentes e adultas foram organizadas em 4 grupos, (I) adolescentes foram submetidas a observação de dois camundongos machos realizando interação não agressiva (TINA) por dez dias consecutivos e posteriormente passaram pelos testes TIS, LCE, CA, RO e TES seguindo a sequência dos testes na ordem estabelecida; (II) adolescentes submetidas ao testemunho de estresse de derrota social (ETDS) e posteriormente avaliadas no TIS, LCE, CA, RO e TES; (III) adultas submetidas a observação de dois camundongos machos realizando interação não agressiva (TINA), também por dez dias consecutivos e posteriormente passaram pelos testes TIS, LCE, CA, RO e TES e (IV) adultas submetidas ao testemunho de estresse de derrota social (ETDS) e posteriormente avaliadas no TIS, LCE, CA, RO e TES (Figura 8).

**Figura 8:** Delineamento experimental do protocolo de testemunho da derrota social. **TIS**, Teste de Interação Social; **LCE**, Labirinto em Cruz Elevado; **TCA**, Teste do Campo Aberto; **TRO**, Teste de Reconhecimento de Objetos; **TES**, Teste de Esguicho de Sacarose.



**Fonte:** Laboratório de Neuropsicofarmacologia Unesp Araraquara (2023)

### **3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados referentes ao TIS e ao TRO foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de três fatores para medidas repetidas (fator 1: presença ou não do alvo; fator 2: condição TINA ou ETDS; fator 3: idade). Os demais resultados foram analisados através da ANOVA de dois fatores (fator 1: condição TINA ou ETDS; fator 2: idade). Nos casos de significância, as análises foram seguidas pelo teste de comparações múltiplas de Duncan. Valores de p menores ou iguais a 0,05 foram considerados significativos.

#### **3.10. ÉTICA**

O protocolo experimental foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, e conduzido seguindo os princípios do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), recebendo o Protocolo CEUA/FCF/CAr. 24/2021.

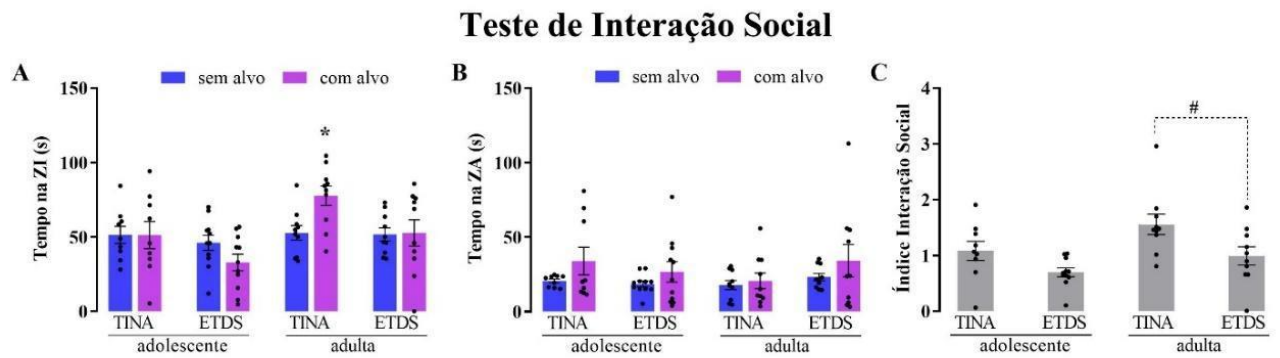
## 4. RESULTADOS

### 4.1 Camundongos fêmeas adultas apresentam aumento de evitação social quando expostas ao ETDS

A Figura 9 A e B representam as médias  $\pm$ EPM do tempo de gasto nas zonas de interação nas zonas de interação (ZI) e de afastamento (ZA), respectivamente, na ausência e presença do residente não-familiar (alvo), de fêmeas de diferentes idades que testemunharam ou não o EDS. A ANOVA de três fatores para medidas repetidas indicou diferença significativa para os fatores condição ( $F_{(1,36)} = 5,50$ ,  $p=0,02$ ), idade ( $F_{(1,36)} = 6,33$ ,  $p=0,02$ ), e interação entre os fatores condição  $\times$  alvo ( $F_{(1,36)} = 6,12$ ,  $p=0,02$ ) e idade  $\times$  alvo ( $F_{(1,36)} = 6,90$ ,  $p=0,01$ ), apenas na ZI (alvo:

$F_{(1,36)} = 0,77$ ,  $p=0,39$ ; condição  $\times$  idade  $\times$  alvo:  $F_{(1,36)} = 0,60$ ,  $p=0,45$ ; ZA - condição:  $F_{(1,36)} = 0,26$ ,  $p=0,61$ ; idade:  $F_{(1,36)} = 0,04$ ,  $p=0,84$ ; alvo:  $F_{(1,36)} = 5,23$ ,  $p=0,03$ ; condição  $\times$  idade  $\times$  alvo:  $F_{(1,36)} = 0,78$ ,  $p=0,38$ ). O teste *post hoc* revelou que apenas as fêmeas testemunhas da interação não-agressiva adultas exploraram a ZI por mais tempo na presença do alvo ( $p<0,002$ ). As médias  $\pm$ EPM do índice de interação social estão representadas na Figura 8C. A ANOVA de duas vias indicou diferença significativa para os fatores idade e condição, porém sem interação entre os fatores (idade:  $F_{(1,36)} = 9,89$ ,  $p=0,003$ ; condição:  $F_{(1,36)} = 6,47$ ,  $p=0,01$ ; condição  $\times$  idade:  $F_{(1,36)} = 0,35$ ,  $p=0,56$ ). O teste *post hoc* de Duncan revelou índice de interação social menor nos camundongos adultos submetidos ao ETDS em relação ao grupo controle (TINA adultas) ( $p = 0,02$ ).

**Figura 9:** Efeito da idade sobre o comportamento de evitação social em camundongos fêmeas submetidas ao protocolo de ETDS. **(A)** Tempo gasto na zona de interação (ZI). **(B)** Tempo gasto na zona de afastamento (ZA). **(C)** Razão da interação social na ZI. As barras representam as médias ( $\pm$ EPM). \* $p \leq 0,05$  comparado ao respectivo grupo sem alvo. # $p < 0,05$  comparado ao grupo TINA adulta. TINA, testemunhas de interação não agressiva; ETDS, estresse de testemunha de derrota social.

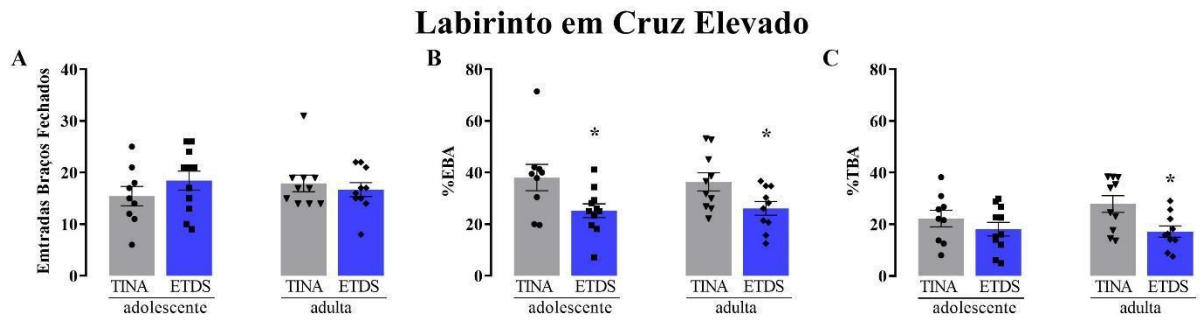


Fonte: Laboratório de Neuropsicofarmacologia Unesp Araraquara (2023)

#### 4.2 Estresse de testemunho da derrota social diminui a exploração dos braços abertos em camundongos fêmeas adultas.

A Figura 10 representa as médias  $\pm$ EPM do número de entradas nos braços fechados (A), da porcentagem de entradas nos braços abertos (B) e da porcentagem de tempo gasto nos braços abertos (C) do LCE de camundongos fêmeas de diferentes idades que testemunharam ou não o EDS. A ANOVA bifatorial indicou não haver diferença significativa entre os grupos com relação às entradas nos braços fechados (condição:  $F_{(1,36)} = 0,29$ ,  $p=0,59$ ; idade:  $F_{(1,36)} = 0,04$ ,  $p = 0,84$ ; condição  $\times$  idade:  $F_{(1,36)} = 1,56$ ,  $p=0,20$ ) (Fig. 9A). Com relação às medidas porcentagem de entradas (%EBA) e tempo (%TBA) nos braços abertos, a ANOVA indicou diferença significativa apenas para o fator condição [%EBA - condição:  $F_{(1,36)} = 10,91$ ,  $p=0,002$ ; idade:  $F_{(1,36)} = 0,01$ ,  $p = 0,91$ ; condição  $\times$  idade:  $F_{(1,36)} = 0,14$ ,  $p=0,72$ ; %TBA - condição:  $F_{(1,36)} = 6,87$ ,  $p=0,01$ ; idade:  $F_{(1,36)} = 0,70$ ,  $p = 0,41$ ; condição  $\times$  idade:  $F_{(1,36)} = 1,37$ ,  $p=0,25$ ]. O teste *post hoc* apontou que as fêmeas de ambas as idades expostas ao ETDS apresentaram diminuição na %EBA em relação aos seus respectivos controles ( $p \leq 0,05$ ). Já com relação a %TBA, a diminuição só foi observada nas mais velhas ( $p = 0,02$ ) (Fig. 10 B e C).

**Figura 10:** Efeito da idade sobre o comportamento de camundongos testemunhas de EDS e expostas ao Labirinto em Cruz Elevado. (A) número de entradas nos braços fechados; (B) Porcentagem de entradas nos braços abertos (%EBA); (C) Porcentagem do tempo gasto nos braços abertos (%TBA). As barras representam as médias ( $\pm$ EPM). \* $p \leq 0,05$  comparado ao respectivo grupo TINA. TINA, testemunhas de interação não-agressiva; ETDS, estresse de testemunha de derrota social.

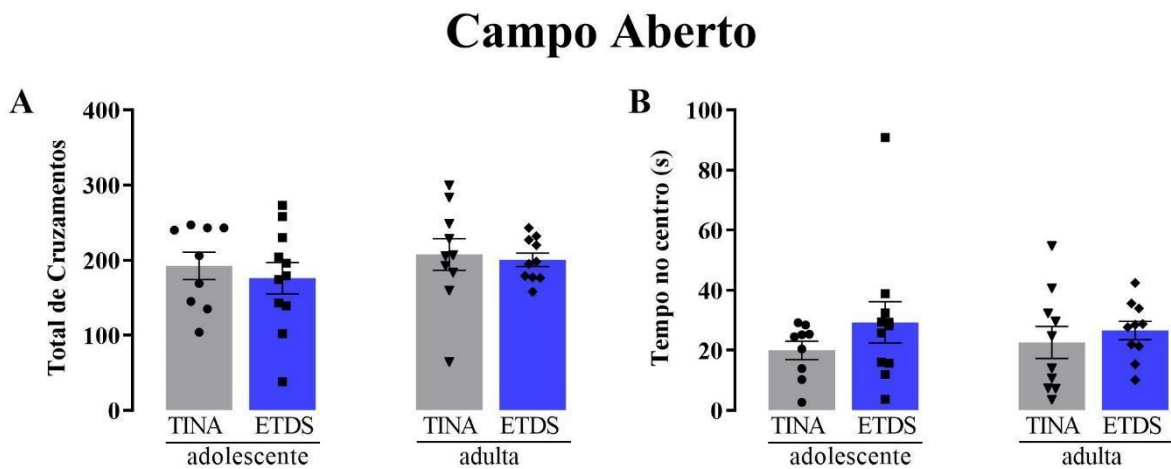


Fonte: Laboratório de Neuropsicofarmacologia Unesp Araraquara (2023)

### 4.3 Estresse de testemunho da derrota social não altera a exploração no CA.

A Figura 10 representa as médias  $\pm$ EPM do número total de cruzamentos (A) e do tempo gasto no centro (B) do CA de camundongos fêmeas de diferentes idades que testemunharam ou não o EDS. A ANOVA bifatorial indicou não haver diferença significativa para nenhum dos parâmetros avaliados [Cruzamentos - condição:  $F_{(1,36)} = 0,42$ ,  $p=0,52$ ; idade:  $F_{(1,36)} = 1,20$ ,  $p = 0,28$ ; condição  $\times$  idade:  $F_{(1,38)} = 0,07$ ,  $p=0,80$ ; Tempo centro - condição:  $F_{(1,36)} = 1,69$ ,  $p=0,20$ ; idade:  $F_{(1,36)} = 0,00011$ ,  $p=0,99$ ; condição  $\times$  idade:  $F_{(1,36)} = 0,27$ ,  $p=0,60$ ].

**Figura 11:** Avaliação da idade sobre o comportamento de camundongos testemunhas de EDTS avaliados no Campo Aberto. (A) total de cruzamentos; (B) tempo gasto no centro do aparato. As barras representam as médias ( $\pm$ EPM). TINA, testemunhas de interação não-agressiva; ETDS, estresse de testemunha de derrota social.

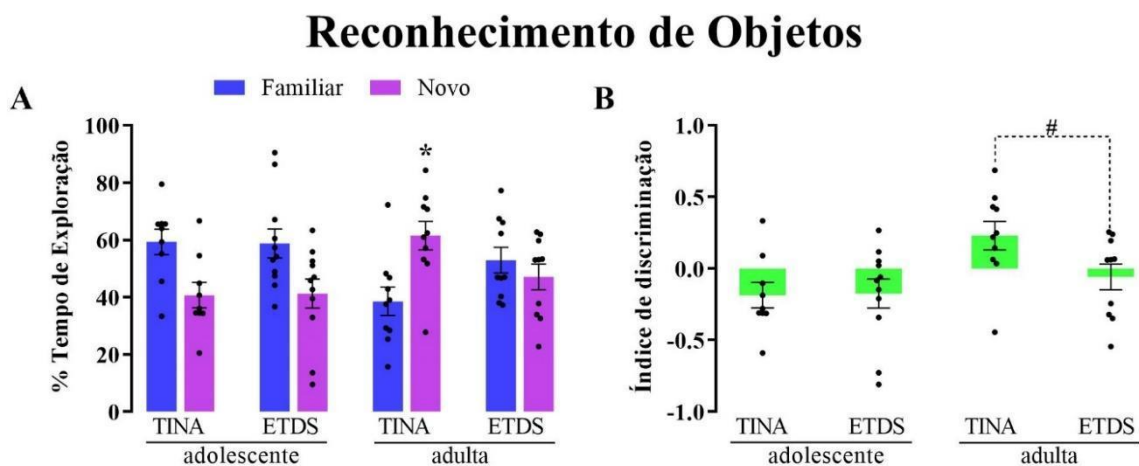


Fonte: Laboratório de Neuropsicofarmacologia Unesp Araraquara (2023)

#### 4.4 O ETDS prejudica a memória de curto prazo de camundongos fêmeas adultas.

A Figura 11A representa as médias  $\pm$ EPM da porcentagem do tempo de exploração do objeto familiar e do objeto novo de camundongos fêmeas adolescentes e adultas submetidas ou não ao ETDS. A ANOVA de três fatores para medidas repetidas indicou interação apenas entre os fatores idade  $\times$  objeto ( $F_{(1,36)} = 7,68$ ,  $p=0,009$ ) [condição:  $F_{(1,36)} = 5,51$ ,  $p=0,46$ ; idade:  $F_{(1,36)} = 2,64$ ,  $p=0,11$ ; objeto:  $F_{(1,36)} = 9,72$ ,  $p=0,33$ ; condição  $\times$  idade  $\times$  objeto:  $F_{(1,36)} = 2,42$ ,  $p=0,13$ ]. O teste *post hoc* revelou que as fêmeas do grupo controle adultas exploraram mais o objeto novo do que o familiar ( $p \leq 0,05$ ). Este perfil comportamental foi corroborado após a análise do índice de discriminação onde, a ANOVA bifatorial indicou diferença significativa apenas para o fator idade ( $F_{(1,36)} = 7,68$ ,  $p=0,009$ ) [condição:  $F_{(1,36)} = 2,06$ ,  $p=0,16$ ; condição  $\times$  idade:  $F_{(1,36)} = 2,42$ ,  $p=0,13$ ] e o teste *post hoc* de Duncan revelou que as fêmeas mais velhas do grupo submetido ao ETDS apresentaram prejuízo em discriminar os objetos em relação as fêmeas do grupo TINA ( $p \leq 0,04$ ) (Fig. 12B).

**Figura 12:** Avaliação da idade sobre o comportamento de camundongos testemunhas de EDS avaliados no teste de reconhecimento de objetos. **(A)** porcentagem do tempo de exploração do objeto familiar e novo. **(B)** índice de discriminação que relaciona o tempo de exploração do objeto familiar com o tempo de exploração do objeto novo. As barras representam as médias ( $\pm$ EPM). \* $p \leq 0,05$  comparado ao objeto familiar do respectivo grupo. # $p \leq 0,05$  comparado ao grupo TINA adulta. TINA, testemunhas de interação não-agressiva; ETDS, estresse de testemunha de derrota social.

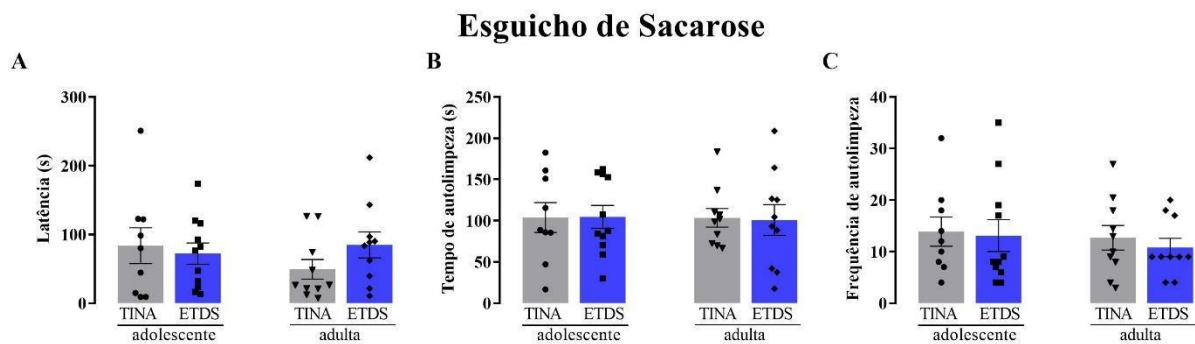


**Fonte:** Laboratório de Neuropsicofarmacologia, Unesp Araraquara (2023)

#### 4.5 O ETDS não alterou os comportamentos avaliados no teste do Esguicho de Sacarose.

Na Figura 13 estão representadas as médias  $\pm$ EPM da latência para primeira lambida (A), o tempo (B) e a frequência (C) de autolimpeza dos animais que passaram pelo protocolo de ETDS e avaliados no teste de esguicho de sacarose. A ANOVA de duas vias indicou que não houve diferença significativa nas três medidas avaliadas [Latência (condição:  $F_{(1,36)} = 0,41$ ,  $p=0,52$ ; idade:  $F_{(1,36)} = 0,33$ ,  $p=0,57$ ; condição  $\times$  idade:  $F_{(1,36)} = 1,57$ ,  $p=0,22$ ); Tempo (condição:  $F_{(1,36)} = 0,003$ ,  $p=0,86$ ; idade:  $F_{(1,36)} = 0,02$ ,  $p=0,89$ ; condição  $\times$  idade:  $F_{(1,36)} = 0,01$ ,  $p=0,91$ ); Frequência (condição:  $F_{(1,36)} = 0,27$ ,  $p=0,61$ ; idade:  $F_{(1,36)} = 0,45$ ,  $p=0,51$ ; condição  $\times$  idade:  $F_{(1,36)} = 0,04$ ,  $p=0,83$ ).

**Figura 13:** Ausência de efeito da idade sobre o comportamento de camundongos testemunhas de EDS de derrota social avaliados no teste de esguicho de sacarose. (A) Latência para início do autocuidado; (B) tempo de autocuidado; (C) frequência de autocuidado. As barras representam as médias ( $\pm$ EPM). TINA, testemunhas de interação não-agressiva; ETDS, estresse de testemunha de derrota social.



**Fonte:** Laboratório de Neuropsicofarmacologia, Unesp Araraquara (2023)

## 5. DISCUSSÃO

O presente estudo investigou a influência da idade sobre as consequências emocionais e cognitivas de camundongos fêmeas submetidas ao ETDS. Os achados obtidos confirmam nossa hipótese, a medida em que apontam que fêmeas adultas testemunhas da derrota social apresentaram aumento de respostas relacionadas à evitação social, ansiedade e prejuízo cognitivo em comparação aos grupos com a mesma idade, mas submetidos a observação de interação não agressiva. Além disso, os resultados demonstram que estas consequências emocionais e cognitivas induzidas pelo ETDS são dependentes da idade, visto que, tais efeitos não foram observados em camundongos fêmeas adolescentes.

A utilização de modelos animais para estudos de doenças neuropsiquiátricas voltados à compreensão das reações de defesa tem sido de especial importância para se desvendar os mecanismos neurobiológicos subjacentes à ansiedade (RODGERS; JOHNSON, 1995). Neste sentido, diversos trabalhos já demonstraram que, animais derrotados e avaliados logo após o contato com o agressor, apresentam as alterações fisiológicas e comportamentais semelhantes à depressão e ansiedade (BERTON et al., 2007; FRESCA DA COSTA et al., 2023; MOREIRA et al., 2016; SANTOS-COSTA et al., 2021). Desta forma, o estresse de derrota social tornou-se amplamente utilizado com o objetivo de identificar os mecanismos relacionados às respostas defensivas (SIEGFRIED; FRISCHKNECHT; NUNES DE SOUZA, 1990) e sobre os parâmetros comportamentais, fisiológicos, e moleculares relacionados ao estresse crônico (BERTON et al., 2007; BJÖRKQVIST, 2001; HAMMELS et al., 2015; HUDSON; RUSHLOW; LAVIOLETTE, 2018; KEENEY; HOGG, 1999; MACEDO et al., 2018).

Entretanto, o protocolo de derrota social contém o componente de interação física, em que o animal intruso é colocado na caixa moradia do animal residente, que irá atacá-lo durante um período pré-determinado (MICZEK; THOMPSON; SHUSTER, 1982). Enquanto alguns modelos são constituídos apenas pela fase de ataque físico, outros combinam com uma fase de estresse psicossocial, no qual o intruso é separado do residente por uma barreira física, assegurando que a exposição a uma situação ameaçadora se dê pelos contatos auditivo, visual, olfativo, porém sem a ocorrência de embate corporal (MARTINEZ; CALVO-TORRENT; PICO-ALFONSO, 1998).

Para além dos importantes achados obtidos com o emprego deste protocolo, Golden e colaboradores (2011) validaram a utilização do teste de interação social (TIS) para a identificação de animais suscetíveis e resilientes ao estresse de derrota social. Neste caso,

relacionando a resposta dos sujeitos experimentais a comportamentos de evitação social, uma importante característica do transtorno de ansiedade social (DSM, 5ª Edição). Considerando que os dados obtidos neste trabalho demonstraram que apenas as fêmeas adultas submetidas ao ETDS apresentaram índices de interação social inferiores àqueles das fêmeas submetidas ao TINA, podemos sugerir que enquanto as fêmeas adolescentes mostram-se resilientes a este tipo de estressor psicológico as fêmeas adultas apresentam-se suscetíveis.

Curiosamente, na avaliação da resposta de evitação social em camundongos machos com idade pós-natal de 60 dias (adolescentes), nosso grupo de pesquisa já demonstrou a presença de robusta resposta de evitação social, quando estes são intrusos submetidos as derrotas (FRESCA DA COSTA et al., 2023; SANTOS-COSTA et al., 2021). Resultados semelhantes foram encontrados em camundongos adolescentes, porém não em adultos, que testemunharam a derrota social (dados não publicados).

No presente estudo, também foi observado que apenas as fêmeas adultas apresentaram aumento de comportamentos relacionados à ansiedade quando avaliadas no Labirinto em Cruz Elevado (LCE). Neste teste, fêmeas adultas submetidas ao ETDS apresentaram diminuição na porcentagem de entradas e tempo gasto nos braços abertos do aparato em comparação às fêmeas TINA e na mesma idade. Cabe destacar que fêmeas adolescentes também apresentaram redução da porcentagem de entradas, porém não de tempo, nos braços abertos do LCE, sugerindo que esta faixa de idade pode ser sensível aos efeitos ansiogênicos da exposição ao estresse psicossocial. Torna-se também importante destacar que a exposição ao ETDS não levou a alterações no número de entradas nos braços fechados do LCE, uma medida amplamente utilizada para se avaliar a atividade locomotora de roedores neste tipo de aparato (RODGERS; JOHNSON et al., 1995), sugerindo que os efeitos deste tipo de estresse psicossocial se mostram seletivos em comportamentos relacionados à ansiedade. A hipótese de que o nível de estresse desencadeado em animais expostos ao ETDS não afeta a atividade locomotora se mostra apoiada pela ausência de seus efeitos no número de cruzamentos apresentados pelos animais ao teste do Campo Aberto. Contudo, há que se destacar a ausência de efeitos do ETDS sobre a ansiedade avaliada pelo tempo dispendido no centro do Campo Aberto. Tomados em conjunto, os resultados obtidos neste estudo indicam que os efeitos ansiogênicos da exposição ao ETDS são dependentes da idade dos camundongos fêmeas e do tipo de teste utilizado para se avaliar esta resposta emocional.

Embora ainda sejam poucos os estudos da neurociência básica que empregam sujeitos experimentais fêmeas, cabe destacar que há demanda crescente para que sejam cada vez mais

utilizadas (SHANSKY; MURPHY, 2021). No campo relacionado às psicopatologias, essa mudança poderá acelerar esclarecimentos neurobiológicos e ampliar opções de terapêuticas farmacológicas mais eficazes para mulheres acometidas por transtornos de ansiedade.

De modo interessante, alguns trabalhos têm demonstrado a presença de diferenças sexuais em respostas relacionadas à ansiedade em roedores submetidos a estressores. Neste sentido, Furman e colaboradores (2022) demonstraram que apenas camundongos fêmeas apresentaram aumento de respostas relacionadas à ansiedade após serem submetidas ao estresse social. Entretanto, estudo conduzido por Doeselaar e colaboradores (2021), também utilizando paradigma de estresse social, demonstrou que camundongos fêmeas se mostraram mais resilientes em apresentar respostas relacionadas à ansiedade, evitação social e níveis de corticosterona, em comparação aos machos submetidos também a protocolos semelhantes.

Para além das evidentes diferenças sexuais apontadas com relação a resposta de ansiedade decorrente de protocolos de estresse, vale ressaltar os efeitos da idade observados nestes testes para as fêmeas. Neste sentido, cabe destacar que o aumento de respostas relacionadas à ansiedade em camundongos fêmeas mais velhas já foi observado previamente, mesmo em animais que não foram submetidos a estressores. Dado semelhante é observado quando são submetidas ao protocolo de estresse crônico variável. Entretanto, vale salientar que nesses estudos os intervalos de idade entre grupos são maiores (LOTAN et al., 2018; NOLTE; NOLTE; YAN, 2019). Um importante aspecto sob o ponto de vista translacional refere-se a semelhança entre os dados obtidos e as características de prevalência de transtornos de ansiedade na população, uma vez que são as mulheres adultas que possuem maior prevalência de transtornos de ansiedade em relação aos homens e em comparação a mulheres adolescentes (“Global, regional, and national burden of 12 mental disorders in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019”, 2022; SANTOMAURO et al., 2021).

No teste de Reconhecimento de Objetos (RO) foi observado que o grupo TINA adultas teve uma resposta diferente em relação aos demais, caracterizado pelo maior tempo gasto na exploração ao objeto novo comparado a todos os outros grupos. Desta forma, o grupo de fêmeas EDTS adultas apresentou redução do índice de discriminação em comparação ao grupo que testemunhou a interação não agressiva, sugerindo um prejuízo cognitivo induzido pelo testemunho das derrotas apenas neste grupo. Neste teste, quando o roedor é exposto a um objeto familiar e um objeto novo, espera-se um maior tempo de seu contato com o objeto novo, indicando a presença de aprendizado e memória (ENNACEUR; DELACOUR, 1988),

sugerindo que os resultados encontrados no presente estudo possam estar associados a um prejuízo cognitivo induzido pelo ETDS, sobretudo em camundongos fêmeas adultas.

Diferentes estudos já demonstraram que protocolos experimentais de estresse social são capazes de induzir prejuízo cognitivo (BUWALDA et al., 2005; HAN et al., 2017; PFAU; RUSSO, 2016). Especificamente, recentes resultados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram que camundongos machos intrusos submetidos à derrota social apresentam prejuízo cognitivo acompanhado de alterações na atividade neuronal hipocampal (FRESCA DA COSTA et al., 2023). Além disso, curiosamente dados preliminares do nosso grupo de pesquisa apontam que nos machos o prejuízo cognitivo induzido pelo ETDS ocorre apenas em animais adolescentes em comparação ao grupo TINA (dados não publicados).

Diversos estudos apontam para a presença de diferenças sexuais em roedores machos e fêmeas após sessões de estresse, entretanto os achados são diversificados. A exemplo do estudo desenvolvido por Luine (2002), em que foi demonstrado que apenas ratos machos apresentam déficit cognitivo após sessões de estresse, enquanto as fêmeas demonstraram melhora na execução de tarefas. Evidências de que os prejuízos cognitivos desencadeados por estressores em animais machos e fêmeas se mostra um tema complexo podem ser encontradas no estudo de Agarwal e colaboradores (2020), em que os autores demonstram serem apenas camundongos fêmeas prejudicadas aos efeitos do estresse crônico variável em teste de reconhecimento de objetos.

O prejuízo cognitivo relacionado à idade também já foi demonstrado previamente em camundongos fêmeas que não foram submetidos a nenhum protocolo relacionado a condições de estresse (BETTIS; JACOBS, 2012; FRICK et al., 1999). Entretanto, Lotan e colaboradores (2018) demonstram efeitos opostos relacionados à idade em fêmeas submetidas ao estresse crônico variável. Nesse estudo foi observado que enquanto as fêmeas mais velhas apresentaram um prejuízo da memória após o estresse, as fêmeas mais jovens tiveram uma melhora da performance cognitiva em comparação àquelas que não foram submetidas ao estresse.

Curiosamente, no presente estudo não foram observadas diferenças entre os grupos das fêmeas adolescentes. Além disso, nesta idade elas não foram capazes de discriminar entre os objetos novo e familiar, demonstrado pela ausência de diferença significativa no tempo de exploração dos dois objetos. Desta forma, sugerimos que com 60 dias pós nascimento as fêmeas ainda não possuam maturação encefálica suficiente para a discriminação dos objetos, resposta avaliada no teste utilizado.

Embora diversos achados na literatura apontem que situações de estresse são capazes de induzir respostas relacionadas à depressão em roedores (ANTONIUK et al., 2019; VOLLMAYR; HENN, 2003; WILLNER, 2017), no presente estudo não observamos diferenças entre os grupos no teste do esguicho de sacarose. Este teste é utilizado para investigar respostas de autolimpeza nos sujeitos experimentais, manifestações que estariam diminuídas em razão de sua relação com a anedonia e apatia (NOLLET; LE GUIQUET; BELZUNG, 2013; PLANCHEZ; SURGET; BELZUNG, 2019), um endofenótipo presente no transtorno depressivo (BAPTISTA-DE-SOUZA et al., 2020; ISINGRINI et al., 2010).

Cabe destacar que o teste de esguicho de sacarose também não foi sensível para detectar alterações comportamentais em camundongos machos intrusos submetidos à dez sessões de derrota social (FRESCA DA COSTA et al., 2023). Tal qual, também não foram observadas diferenças significativas entre os grupos em animais submetidos a sessões de derrota social no teste de preferência a sacarose em camundongos machos jovens (MOURI et al., 2018). Entretanto, estudos prévios já demonstraram a presença de diferenças sexuais nas respostas de roedores expostos ao teste de esguicho de sacarose, quando precedido de protocolos experimentais causadores de diferentes tipos de estresse (FRANCIS-MALAVÉ et al., 2023; HODES et al., 2015; MADISON et al., 2022). Assim, embora no presente estudo não tenhamos identificado os efeitos do ETDS sobre as respostas relacionadas à depressão, o emprego deste teste apresenta-se como uma potencial ferramenta experimental.

Neste sentido, cabe neste ponto destacar que uma das possíveis causas para esta ausência de efeitos no teste de esguicho da sacarose pode ter sido o longo intervalo de tempo (i.e., 5 dias) entre a última sessão de derrota e a realização do teste. Com o objetivo de otimizar a utilização dos animais, optamos por não realizar grupos independentes, buscando conduzir o máximo de testes comportamentais possíveis, partindo da premissa que o efeito de um teste sobre o outro fosse mínimo. Tomando este ponto em consideração, o TIS foi conduzido vinte quatro horas após a última derrota, assim como descrito em estudos anteriores (FRESCA DA COSTA et al., 2023; GOLDEN et al., 2011; SANTOS-COSTA et al., 2021). A principal razão do uso do TIS ter sido o primeiro teste comportamental está relacionada a sua relevância na identificação de animais vulneráveis ao ETDS. O LCE foi realizado na sequência, por se tratar de um teste sensível a prévias manipulações comportamentais (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005; GRIEBEL et al., 1993; TREIT; MENARD; ROYAN, 1993). Posteriormente, realizamos o Teste do Campo Aberto, visando também como habituação à arena, a qual serviu para a condução do Teste de Reconhecimento de Objetos. Desta forma, acreditamos que o número de

testes e o tempo decorrido entre o protocolo das derrotas e o TES possa ser uma limitação na interpretação de seus efeitos sobre respostas relacionadas à depressão (FILE, 2001).

Outra limitação observada na análise dos resultados, relaciona-se ao intervalo entre as idades dos grupos experimentais. Considerando que diversos estudos apontam para relevantes efeitos do estresse no início da vida e na senescência em roedores fêmeas (FRICK et al., 1999; LOTAN et al., 2018; NOLTE; NOLTE; YAN, 2019), entendemos que novos trabalhos realizados pelo grupo possam explorar os extremos das fases de desenvolvimento e obter achados relevantes sobre os efeitos do estresse psicossocial em cada uma delas.

Para além das investigações em idades mais extremas, entendemos que o presente estudo também direciona para que outros trabalhos sejam desenvolvidos com o objetivo de esclarecer a neurobiologia envolvida na modulação das consequências do estresse psicossocial. Neste sentido, considerando sua função na modulação da ansiedade e cognição, entendemos que o Córtex Pré-Frontal medial (CPFm) seja uma estrutura cerebral chave a ser investigada. O CPFm apresenta abundantes conexões com outras regiões do cérebro, como o hipocampo, BNST e núcleos amígdaloídes, estruturas que exercem papel fundamental no processamento da memória, cognição, tomada de decisão, comportamentos sociais e de humor (KOLB; NONNEMAN, 1978; UYLINGS; GROENEWEGEN; KOLB, 2003). Adicionalmente, o CPFm está em fase de maturação neuronal durante a adolescência (KLUNE; JIN; DENARDO, 2021; KOLB et al., 2012), o que reforça a hipótese de seu papel relevante nos resultados obtidos com as fêmeas adolescentes e que não estão presentes em fêmeas adultas.

Sabe-se que em roedores o cérebro de fêmeas funciona em um meio de mudanças químicas cíclicas, que giram em torno da função ao seu ciclo estral, que durante o procedimento deste estudo, não foi levado em conta, mas se sabe da existência, sendo um possível fator que pode explicar algum dos resultados. Muitos dos hormônios sexuais são neuroativos e por isso atuam em receptores de membrana e nucleares. Desta forma, pode ser explicar o porquê possíveis alterações em resposta a elevação do eixo HPP de mulheres estão relacionadas com a sua maior prevalência de transtornos ansiosos, depressivos e de TEPT (OLFF et al., 2007).

As alterações hormonais ao longo do ciclo dos roedores, podem alterar a resposta ao estresse já que ratos e camundongos fêmeas, que por ser vez podem apresentar assim um comportamento ansiogênico e maior resposta aos estressores (LOVICK, 2012).

Sabe-se também que as fêmeas liberam mais corticosterona em comparação aos machos tanto na atividade basal do eixo HPP (CRITCHLOW et al., 1963; MCCORMICK et al., 2005; SEALE ET al., 2004) como em resposta ao estresse (RIVIER, 1993)

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que o modelo de estresse de testemunha da derrota social (TDES) apresenta-se como uma importante ferramenta na investigação das consequências afetivas e cognitivas relacionadas ao estresse psicossocial em camundongos fêmeas. Além disso, concluímos que a idade em que o sujeito experimental é avaliado neste modelo exerce uma importante influência sobre estas respostas, uma vez que observamos que apenas as fêmeas adultas apresentaram aumento de respostas relacionadas à ansiedade e prejuízo cognitivo após testemunharem as sessões de derrota social.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, P. et al. Sex-dependent effects of paternal deprivation and chronic variable stress on novel object recognition in adult California mice (*Peromyscus californicus*). **Hormones and Behavior**, v. 117, p. 104610, jan. 2020.

AKIRAV, I.; MAROUN, M. Ventromedial Prefrontal Cortex Is Obligatory for Consolidation and Reconsolidation of Object Recognition Memory. **Cerebral Cortex**, v. 16, n. 12, p. 1759–1765, 28 dez. 2005.

ALTEMUS, M.; SARVAIYA, N.; NEILL EPPERSON, C. Sex differences in anxiety and depression clinical perspectives. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 35, n. 3, p. 320–330, ago. 2014.

ANDRADE, L. H. S. G. DE; VIANA, M. C.; SILVEIRA, C. M. Epidemiologia dos transtornos psiquiátricos na mulher. **Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)**, v. 33, n. 2, p. 43–54, 2006.

ANTONIUK, S. et al. Chronic unpredictable mild stress for modeling depression in rodents: Meta-analysis of model reliability. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 99, p. 101–116, abr. 2019.

ANTUNES, M.; BIALA, G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. **Cognitive Processing**, v. 13, n. 2, p. 93–110, 9 maio 2012.

AROS MS. **Produção Científica sobre Depressão: análise de resumos (2004-2007)**. Campinas. Dissertação [Mestrado em Psicologia] - **Centro de Ciências da Vida da Pontifícia Universidade Católica de Campinas**; 2008.

ATKINSON, R. C.; SHIFFRIN, R. M. Human Memory: A Proposed System and its Control Processes. In: SPENCE, Kenneth W.; SPENCE, Janet Taylor. Editors. **Psychology of Learning and Motivation: Advances in Research and Theory**. New York: Academic Press, 1968. v. 2, p. 89–195.

BAHRAMZADEH ZOERAM, S. et al. Hippocampal orexin receptor blocking prevented the stress induced social learning and memory deficits. **Neurobiology of Learning and Memory**,

v. 157, p. 12–23, jan. 2019.

BALDWIN, D. S.; WALDMAN, S.; ALLGULANDER, C. Evidence-based pharmacological treatment of generalized anxiety disorder. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 14, n. 05, p. 697–710, 7 jun. 2011.

BANDELOW, B.; MICHAELIS, S. **Epidemiology of anxiety disorders in the 21st century**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <[www.dialogues-cns.org](http://www.dialogues-cns.org)>. Acesso em: 10 jun. 2021.

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.

BARKER, G. R. I.; WARBURTON, E. C. When Is the Hippocampus Involved in Recognition Memory? **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 29, p. 10721–10731, 20 jul. 2011.

BERTON, O. et al. Induction of  $\Delta$ FosB in the Periaqueductal Gray by Stress Promotes Active Coping Responses. **Neuron**, v. 55, n. 2, p. 289–300, jul. 2007.

BETTIS, T.; JACOBS, L. F. Sex differences in object recognition are modulated by object similarity. **Behavioural Brain Research**, v. 233, n. 2, p. 288–292, ago. 2012.

BJÖRKQVIST, K. Social defeat as a stressor in humans. **Physiology and Behavior**, 2001.

BRAVER, T.S.; BARCH, D.M. A theory of cognitive control, aging cognition, and neuromodulation. **Neurosci. Biobehav. Res.** v. 26, p. 809-817, 2002.

BRUST, V.; SCHINDLER, P. M.; LEWEJOHANN, L. Lifetime development of behavioural phenotype in the house mouse (*Mus musculus*). **Frontiers in Zoology**, v. 12, n. S1, p. S17, dez. 2015.

BORTOLUZZI, A. **Neurobiologia dos transtornos de ansiedade em adolescentes: análise de polimorfismos do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e do metiloma do DNA ao longo do tempo**. Tese (doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016. 93 p.

BUWALDA, B. et al. Long-term effects of social stress on brain and behavior: a focus on hippocampal functioning. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 1, p. 83–97, fev. 2005.

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, p. 148–156, maio 2017.

CARNEVALI, L. et al. **The contagion of social defeat stress: Insights from rodent studies** **Neuroscience and Biobehavioral Reviews** United States, abr. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149763419308760>>

CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 8, p. 1193–1205, jan. 2005.

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

CHOLERIS, E. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 3, p. 235–260, maio 2001.

CHOPRA, K.; KUMAR, B.; KUHAD, A. Pathobiological targets of depression. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 15, n. 4, p. 379–400, 23 abr. 2011.

COLCIAGO, A. et al. Learning and memory: Steroids and epigenetics. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 150, p. 64–85, jun. 2015.

CRITCHLOW V, LIEBELT A, BARSELA M, MOUNTCASTLE W, LIPSCOMB HS. Sex differences in resting pituitary-adrenal function in the rat. **Am J Physiol**. 1963;205:807–815

CROWCROFT, P.; ROWE, F. P. SOCIAL ORGANIZATION AND TERRITORIAL BEHAVIOUR IN THE. **Proceedings of the Zoological Society of London**, v. 140, n. 3, p. 517–531, maio 1963.

CRYAN, J. F.; MOMBÉREAU, C. In search of a depressed mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice. **Molecular Psychiatry**, v. 9, n. 4, p. 326–357, 1 abr. 2004.

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.

DEL PORTO, J. A. Conceito e diagnóstico. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 21, p. 6-11, 1999.

DE KONINCK, P.; SCHULMAN, H. Sensitivity of CaM Kinase II to the Frequency of Ca<sup>2+</sup> Oscillations. **Science**, v. 279, n. 5348, p. 227–230, 9 jan. 1998.

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.

FARAVELLI C, SAURO CL, LELLI L, PIETRINI F, LAZZERETTI L, GODINI L. The role of life events and HPA axis in anxiety disorders: a review. **Curr Pharm Des**. 2012;18:5663-74.

FILE, S. E. Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. **Behavioural Brain Research**, v. 125, n. 1–2, p. 151–157, nov. 2001.

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.

FRANCIS-MALAVÉ, A. M. et al. Sex differences in pain-related behaviors and clinical progression of disease in mouse models of colonic pain. **Pain**, v. 164, n. 1, p. 197–215, jan. 2023.

FRESCA DA COSTA, V. 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, n. 1168640, 2023.

FRICK, K. M. et al. Reference memory, anxiety and estrous cyclicity in C57BL/6NIA mice are affected by age and sex. **Neuroscience**, v. 95, n. 1, p. 293–307, nov. 1999.

FURMAN, O.; TSOORY, M.; CHEN, A. Differential chronic social stress models in male and female mice. **European Journal of Neuroscience**, v. 55, n. 9–10, p. 2777–2793, 2022

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.

Global, regional, and national burden of 12 mental disorders in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. **The Lancet Psychiatry**, v. 9, n. 2, p. 137–150, fev. 2022.

GOLD, A. L.; MOREY, R. A.; MCCARTHY, G. Amygdala–Prefrontal Cortex Functional Connectivity During Threat-Induced Anxiety and Goal Distraction. **Biological Psychiatry**, v. 77, n. 4, p. 394–403, fev. 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, 21 ago. 2011.

GONZALEZ, M. I. et al. Interactions between 5-hydroxytryptamine (5-HT) and testosterone in the control of sexual and nonsexual behaviour in male and female rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 47, n. 3, p. 591–601, mar. 1994.

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.

GRIEBEL, G. et al. Some critical determinants of the behaviour of rats in the elevated plus-maze. **Behavioural Processes**, v. 29, n. 1–2, p. 37–47, abr. 1993.

HAMMELS, C. et al. Defeat stress in rodents: From behavior to molecules. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 59, p. 111–140, 2015.

HAN, B. et al. Chronic Stress Contributes to Cognitive Dysfunction and Hippocampal Metabolic Abnormalities in APP/PS1 Mice. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 1766–1776, 2017.

Herman, J. P., & Cullinan, W. (1997). Neurocircuitry of stress: Central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. **Trends in Neuroscience**, 20(2), 78–84

HIMANSHU et al. A Review of Behavioral Tests to Evaluate Different Types of Anxiety and Anti-anxiety Effects. **Clinical Psychopharmacology and Neuroscience**, v. 18, n. 3, p. 341–351, 31 ago. 2020.

HODES, G. E. et al. Individual differences in the peripheral immune system promote resilience versus susceptibility to social stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 45, p. 16136–16141, 11 nov. 2014.

HODES, G. E. et al. Sex Differences in Nucleus Accumbens Transcriptome Profiles Associated with Susceptibility versus Resilience to Subchronic Variable Stress. **The Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 50, p. 16362–16376, 16 dez. 2015.

HOLLIS, F.; KABBAJ, M. Social Defeat as an Animal Model for Depression. **ILAR Journal**, v. 55, n. 2, 1 jan. 2014.

HUDSON, R.; RUSHLOW, W.; LAVIOLETTE, S. R. Phytocannabinoids modulate emotional memory processing through interactions with the ventral hippocampus and mesolimbic dopamine system: implications for neuropsychiatric pathology. **Psychopharmacology**, v. 235, n. 2, p. 447–458, 2018.

HUETHER G, DOERING S, RUGER U, RUTHER E, SCHUSSLER G. The stress-reaction process and the adaptive modification and reorganization of neuronal networks. **Psychiat Res** v. 87, p. 83-89, 1999.

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, maio 2014.

IÑIGUEZ, S. D. et al. Vicarious Social Defeat Stress Induces Depression-Related Outcomes in Female Mice. **Biological Psychiatry**, v. 83, n. 1, p. 9–17, jan. 2018.

IONESCU, D. F.; ROSENBAUM, J. F.; ALPERT, J. E. Pharmacological approaches to the challenge of treatment-resistant depression. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 17, n. 2, p. 111–126, jun. 2015.

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.

IZQUIERDO, I. **Memória**. Porto Alegre: Artmed, 2002

JAVIDI, H.; YADOLLAHIE, M. Post-traumatic Stress Disorder. **Int. J. Occup. Environ. Med.** v. 3, p. 2–9, 2012.

JEON, S.; KIM, Y.-K. Molecular Neurobiology and Promising New Treatment in Depression. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 3, p. 381, 15 mar. 2016.

KENDLER, K.S., KARKOWSKI, L.M., PRESCOTT, C.A. Causal Relationship Between Stressful Life Events and the Onset of Major Depression. **Am. J. Psychiatry** v. 156, p. 837–

841, 1999.

KEENEY, A. J.; HOGG, S. Behavioural consequences of repeated social defeat in the mouse: preliminary evaluation of a potential animal model of depression. **Behavioural pharmacology**, v. 10, n. 8, p. 753–764, dez. 1999.

KESSLER, R.C. the effects of stressful life events on depression. **Annu. Rev. Psychol.** v. 48, p. 191–214, 1997.

KLUNE, C. B.; JIN, B.; DENARDO, L. A. Linking mPFC circuit maturation to the developmental regulation of emotional memory and cognitive flexibility. **eLife**, v. 10, 5 maio 2021.

KRISHNAN, V., NESTLER, E.J. Animal Models of Depression: Molecular Perspectives, in: Hagan, J.J. (Ed.), **Molecular and Functional Models in Neuropsychiatry. Springer Berlin Heidelberg**, Berlin: Heidelberg, 2011.p. 121–147

KOLB, B. et al. Experience and the developing prefrontal cortex. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. supplement\_2, p. 17186–17193, 16 out. 2012.

KOLB, B.; NONNEMAN, A. J. Sparing of function in rats with early prefrontal cortex lesions. **Brain Research**, v. 151, n. 1, p. 135–148, jul. 1978.

LAVIOLA, G. et al. Risk-taking behavior in adolescent mice: psychobiological determinants and early epigenetic influence. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 27, n. 1–2, p. 19–31, jan. 2003.

LENT, R. **Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociências**. São Paulo: Ed Atheneu, 2004. p. 698.

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

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.

LISTER, R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, n. 2, p. 180–5, jun. 1987.

- LOTAN, A. et al. Differential effects of chronic stress in young-adult and old female mice: cognitive-behavioral manifestations and neurobiological correlates. **Molecular Psychiatry**, v. 23, n. 6, p. 1432–1445, 19 jun. 2018.
- LOVICK, T. A. Estrous cycle and stress: influence of progesterone on the female brain. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, p. 314-320, 2012.
- LUEPTOW, L. M. Novel Object Recognition Test for the Investigation of Learning and Memory in Mice. **Journal of Visualized Experiments**, (JOVE), n. 126, 30 ago. 2017.
- LUINE, V. et al. Repeated stress causes reversible impairments of spatial memory performance. **Brain Research**, v. 639, n. 1, p. 167–170, mar. 1994.
- LUINE, V. Sex Differences in Chronic Stress Effects on Memory in Rats. **Stress**, v. 5, n. 3, p. 205–216, 7 jan. 2002.
- MACEDO, G. C. et al. Consequences of continuous social defeat stress on anxiety- and depressive-like behaviors and ethanol reward in mice. **Hormones and Behavior**, v. 97, p. 154–161, jan. 2018.
- MADISON, C. A. et al. Sex-dependent differences in the stress mitigating and antidepressant effects of selective aryl hydrocarbon receptor modulators. **Journal of Affective Disorders**, v. 319, p. 213–220, dez. 2022.
- MARGIS, REGINA. Relação entre estressores, estresse e ansiedade. **Rev. psiquiatr. Rio Gd. Sul, Porto Alegre**, v. 25, supl. 1, p. 65-74, 2003.
- MARTINEZ, M.; CALVO-TORRENT, A.; PICO-ALFONSO, M. A. Social defeat and subordination as models of social stress in laboratory rodents: A review. **Aggressive Behavior**, v. 24, n. 4, p. 241–256, 1 jan. 1998.
- MARTIN, CK.; CHURCH, TS.; THOMPSON, AM.; EARNEST, CP. Blair SN Exercise dose and quality of life: a randomized controlled trial. **Arch Intern Med**. v. 169, n. 3, p. 269-78, 2009.
- MCCORMICK, C. M. et al. Investigations of HPA function and the enduring consequences of stressors in adolescence in animal models. **Brain and Cognition**, v. 72, n. 1, p. 73–85, fev. 2010.
- MCEWEN, B. S. Brain on stress: How the social environment gets under the skin. **Proceedings**

of the **National Academy of Sciences**, v. 109, n. Supplement\_2, 16 out. 2012.

MCEWEN BS. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. **Brain Res** 2000;886:172-89.

MCEWEN, B. S.; SAPOLSKY, R. M. Stress and cognitive function. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 5, n. 2, p. 205–216, abr. 1995.

MCKIM TH, BAUER DJ, BOETTIGER CA (2016) Addiction History Associates with the Propensity to Form Habits. **Journal of cognitive neuroscience** 28:1024-1038.

MCCORMICK CM, LINKROUM W, SALLINEN BJ, MILLER NW. Peripheral and central sex steroids have differential effects on the HPA axis of male and female rats. **Stress**.v. 5, p. 235-247, 2002.

MICZEK, K. A.; THOMPSON, M. L.; SHUSTER, L. Opioid-like analgesia in defeated mice. **Science** (New York, N.Y.), v. 215, n. 4539, p. 1520–2, 19 mar. 1982.

MISHKIN, M. Memory in monkeys severely impaired by combined but not by separate removal of amygdala and hippocampus. **Nature**, v. 273, n. 5660, p. 297–298, maio 1978.

MORATO, S. O papel da visão na aversão aos espaços abertos no labirinto em cruz elevado. **Psicologia USP**, v. 17, n. 4, p. 159–174, 2006.

MOREIRA, P. S. et al. Impact of Chronic Stress Protocols in Learning and Memory in Rodents: Systematic Review and Meta-Analysis. **PLOS ONE**, v. 11, n. 9, p. e0163245, 23 set. 2016.

MORETTI, M. et al. Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine, reverses depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress. **Journal of Psychiatric Research**, v. 46, n. 3, p. 331–340, mar. 2012.

MOURI, A. et al. Juvenile social defeat stress exposure persistently impairs social behaviors and neurogenesis. **Neuropharmacology**, v. 133, maio 2018.

NAKATAKE, Y. et al. The effects of emotional stress are not identical to those of physical stress in mouse model of social defeat stress. **Neuroscience Research**, v. 158, p. 56–63, 2020.

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.

NOLLET, M.; LE GUIQUET, A.-M.; BELZUNG, C. Models of depression: unpredictable chronic mild stress in mice. **Current protocols in pharmacology**, v. Chapter 5, n. 1, p. Unit 5.65, jun. 2013.

NOLTE, E. D.; NOLTE, K. A.; YAN, S. S. Anxiety and task performance changes in an aging mouse model. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 514, n. 1, p. 246–251, jun. 2019.

OEI, N. Y. L. et al. Psychosocial stress impairs working memory at high loads: An association with cortisol levels and memory retrieval. **Stress**, v. 9, n. 3, p. 133–141, 7 jan. 2006.

PARK, S.-J. et al. Chronic juvenile stress exacerbates neurobehavioral dysfunction and neuroinflammation following traumatic brain injury in adult mice. **Clinical and Experimental Emergency Medicine**, v. 10, n. 2, p. 200-212, 2023. doi: 10.15441/ceem.22.377.

PELLOW, S. et al. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of neuroscience methods**, v. 14, n. 3, p. 149–67, ago. 1985.

PEETERS BWMM, Broekkamp CLE. Involvement of corticosteroids in the processing of stressful life-events. A possible implication for the development of depression. **J Steroid Molec Biol** v. 49, n. 4-6, p. 417-422, 1994.

PINTO, A. C. (1985). **Testes de amplitude de memória imediata: Um estudo sobre os factores cognitivos responsáveis pelas diferenças de amplitude**. Dissertação complementar da tese de doutoramento, Universidade do Porto, Porto.

PIZZAGALLI DA. Depression, Stress, and Anhedonia: Toward a Synthesis and Integrated Model. **Annu Rev Clin Psychol** v. 10, p. 393-423, 2014.

PORTO, P., HERMOLIN, M. & VENTURA, P. Alterações neuropsicológicas associadas à depressão. **Revista Brasileira de Terapia Comportamental e Cognitiva**, v. 4, n.1, 2002.

PFAU, M. L.; RUSSO, S. J. Neuroinflammation Regulates Cognitive Impairment in Socially Defeated Mice. **Trends in Neurosciences**, v. 39, n. 6, p. 353–355, jun. 2016.

PLANCHEZ, B.; SURGET, A.; BELZUNG, C. Animal models of major depression: drawbacks and challenges. **Journal of Neural Transmission**, v. 126, n. 11, p. 1383–1408, 4 nov. 2019.

PROVENSI, G. et al. Donepezil, an acetylcholine esterase inhibitor, and ABT-239, a histamine H3 receptor antagonist/inverse agonist, require the integrity of brain histamine system to exert biochemical and procognitive effects in the mouse. **Neuropharmacology**, v. 109, p. 139–147, out. 2016.

PRYCE, C. R.; FUCHS, E. Chronic psychosocial stressors in adulthood: Studies in mice, rats and tree shrews. **Neurobiology of Stress**, v. 6, p. 94–103, fev. 2017.

RABABA'H, S. Y. et al. <p>Memory Impairment Induced by Chronic Psychosocial Stress Is Prevented by L-Carnitine</p>. **Drug Design, Development and Therapy**, v. Volume 13, p. 4341–4350, dez. 2019.

OLFF, M.; et al. Changes in cortisol and DHEA plasma levels after psychotherapy for PTSD. **Psychoneuroendocrinology**. v. 32, n. 6, p. 619-626, 2007.

QI X, LIN W.; LI J, PAN, Y.; WANG, W. 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.** v. 175, p. 233– 240, 2006.

RICCERI, L.; MICHETTI, C.; SCATTONI, M. L. Mouse Behavior and Models for Autism Spectrum Disorders. In: **Neuronal and Synaptic Dysfunction in Autism Spectrum Disorder and Intellectual Disability**. Elsevier, 2016. p. 269–293.

RIVIER, C. Female rats release more corticosterone than males in response to alcohol: influence of circulating sex steroids and possible consequences for blood alcohol levels. **Alcohol Clin Exp Res**, v.17, n.4, p.854-859, 1993.

RIZVI, S. J. et al. Assessing anhedonia in depression: Potentials and pitfalls. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 65, p. 21–35, jun. 2016.

RODGERS, R. J.; JOHNSON, N. J. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 52, n. 2, p. 297–303, out. 1995.

ROSA, P. B. et al. Folic acid prevents depressive-like behavior induced by chronic corticosterone treatment in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 127, p. 1–6, dez. 2014.

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

- SANTOMAURO, D. F. et al. Global prevalence and burden of depressive and anxiety disorders in 204 countries and territories in 2020 due to the COVID-19 pandemic. **The Lancet**, v. 398, n. 10312, p. 1700–1712, nov. 2021.
- 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**, v. 15, 23 ago. 2021.
- SCHMIDT, M. V.; STERLEMANN, V.; MÜLLER, M. B. Chronic Stress and Individual Vulnerability. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1148, n. 1, p. 174–183, 11 dez. 2008.
- SMITH, E.E.; GROSSMAN, M. Multiple systems of category learning. **Neurosc Behavior Reviews**. v. 32, p. 249-264, 2008.
- SHANSKY, R. M.; MURPHY, A. Z. Considering sex as a biological variable will require a global shift in science culture. **Nature Neuroscience**, v. 24, n. 4, p. 457–464, 1 abr. 2021.
- SIEGFRIED, B.; FRISCHKNECHT, H.-R.; NUNES DE SOUZA, R. L. An ethological model for the study of activation and interaction of pain, memory and defensive systems in the attacked mouse. Role of endogenous opioids. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 14, n. 4, p. 481–490, dez. 1990.
- SELYE H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. **Nature** v. 138, p. 32, 1936.
- SEALE, J. V.; WOOD, S. A.; ATKINSON, H. C.; BATE, E.; LIGHTMAN, S. L.; INGRAM, C. D.; JESSOP, D. S.; HARBUZ, M. S. Gonadectomy reverses the sexually diergic patterns of circadian and stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in male and female rats. **J Neuroendocrinol**, v.16, n.6, Jun, p.516-24, 2004.
- SEGOVIA, G.; ARCO, A. D.; MOTA, F. Environmental enrichment, prefrontal cortex, stress and aging of the brain. **J. Neural Transm.**, v. 116, p. 1007–1016, 2009.
- SPEAR, L. P. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 24, n. 4, p. 417–463, jun. 2000.
- SQUIRE, L. R.; KANDEL E. R. **Memória da mente às moléculas**. Porto Alegre: Artmed, 2003.
- TEJADA, J. et al. X-PloRat: A Software for Scoring Animal Behavior in Enclosed Spaces.

**Psicologia: Teoria e Pesquisa**, v. 33, n. 0, p. 1–4, 8 jan. 2018.

TENG, C. T.; HUMES, E. DE C.; DEMETRIO, F. N. Depressão e comorbidades clínicas. **Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)**, v. 32, n. 3, p. 149–159, jun. 2005.

TIDEY, J. W.; MICZEK, K. A. Social defeat stress selectively alters mesocorticolimbic dopamine release: an in vivo microdialysis study. **Brain Research**, v. 721, n. 1–2, p. 140–149, maio 1996.

TOTTENHAM, N.; GALVÁN, A. Stress and the adolescent brain. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 70, p. 217–227, nov. 2016.

TREIT, D.; MENARD, J.; ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 44, n. 2, p. 463–469, 1993.

TSANG, A. et al. Common Chronic Pain Conditions in Developed and Developing Countries: Gender and Age Differences and Comorbidity With Depression-Anxiety Disorders. **The Journal of Pain**, v. 9, n. 10, p. 883–891, out. 2008.

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.

TULVING, E. Memory and consciousness. **Canadian Psychology**, v. 26, p. 1–11, 1985.

UYLINGS, H. B. M.; GROENEWEGEN, H. J.; KOLB, B. Do rats have a prefrontal cortex? **Behavioural brain research**, v. 146, n. 1–2, p. 3–17, 30 nov. 2003.

VAN DOESELAR, L. et al. Chronic social defeat stress in female mice leads to sex-specific behavioral and neuroendocrine effects. **Stress**, v. 24, n. 2, p. 168–180, 4 mar. 2021.

VOLLMAYR, B.; HENN, F. A. Stress models of depression. **Clinical Neuroscience Research**, v. 3, n. 4–5, p. 245–251, dez. 2003.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The Open-Field Test: a critical review. **Psychological bulletin**, v. 83, n. 3, p. 482–504, maio 1976.

WARREN, B. L. et al. Neurobiological Sequelae of Witnessing Stressful Events in Adult Mice. **Biological Psychiatry**, v. 73, n. 1, p. 7–14, jan. 2013.

WARREN, B. L. et al. Can I Get a Witness? Using Vicarious Defeat Stress to Study Mood-Related Illnesses in Traditionally Understudied Populations. **Biological Psychiatry**, v. 88, n. 5, p. 381–391, 2020.

WEINSTOCK, M. Prenatal stressors in rodents: Effects on behavior. **Neurobiology of Stress**, v. 6, p. 3–13, fev. 2017.

WILLNER, P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. **Psychopharmacology**, v. 134, p. 319–329, 1997.

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.

WILLNER, P. The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage. **Neurobiology of Stress**, v. 6, p. 78-93, fev. 2017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352289516300170>.

WORLD HEALTH ORGANISATION. Depression and other common mental disorders: global health estimates. **World Health Organization**, 2017. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/254610>. Licença: CC BY-NC-SA 3.0 IGO

YAP, J. J.; MICZEK, K. A. Social defeat stress, sensitization, and intravenous cocaine self-administration in mice. **Psychopharmacology**, v. 192, n. 2, p. 261–273, 13 jun. 2007.

ZAKZANIS K. K.; LEACH L.; KAPLAN, E. **Neuropsychological Differential Diagnosis: Studies on Neuropsychology, Neurology and Cognition**. Psychology Press, 1999. ISBN: 978-9026515521.

ZANGROSSI JR, H.; GRAEFF, F.G. Modelos Animais. In: HETEM, L.A.B.; BERNIK, M.A.; MINUTTENTAG, N.W. Farmacoeconomia. In: HETEM, L.A.B.; GRAEFF, F.G. **Transtornos de Ansiedade**. 1a . ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2004. p.409-419.

ZUARDI, A. W. **Fisiologia do estresse e sua influência na saúde**. São Paulo: USP, Departamento de Neurociências e ciência do comportamento; 2010.