UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO

DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA

VÍTOR PANSARIM

**Efeitos da duração do estresse crônico por contenção sobre a aprendizagem
espacial e comportamentos de ratos Sprague-Dawley machos e fêmeas**

Ribeirão Preto – SP

2021

VÍTOR PANSARIM

Efeitos da duração do estresse crônico por contenção sobre a aprendizagem espacial e comportamentos de ratos Sprague-Dawley machos e fêmeas

Dissertação apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão
Preto, como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Psicobiologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Andréia Schmidt

Ribeirão Preto – SP

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Pansarim, V.

Efeitos da duração do estresse crônico por contenção sobre a aprendizagem espacial e comportamentos de ratos Sprague-Dawley machos e fêmeas. Ribeirão Preto, 2021.

68 p.: 9 il.; 30 cm

Dissertação (Mestrado). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia. Área de concentração: Psicobiologia.

Orientadora: Schmidt, Andréia.

1. Estresse crônico por contenção. 2. Ratos Sprague-Dawley. 3. Diferenças entre machos e fêmeas. 4. Comportamentos associadas a ansiedade. 5. Anedonia. 6. Aprendizagem espacial.

Nome: Vítor Pansarim

Título: Efeitos da duração do estresse crônico por contenção sobre a aprendizagem espacial e comportamentos de ratos Sprague-Dawley machos e fêmeas.

Dissertação apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão
Preto da USP para obtenção do título de
Doutor em Ciências.

Aprovado em: 27 / 04 / 2021

Banca Examinadora

Profa. Dra. Andréia Schmidt

Instituição: Universidade de São Paulo (USP)

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Fábio Leyser Gonçalves

Instituição: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Profa. Dra. Fernanda Klein Marcondes

Instituição: Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Ao meu irmão, **Vinícius Pansarim**, pelo
tempo que pudemos viver e crescer juntos e
por continuar vivo em nossos pensamentos
e ações.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora e professora, Prof^ª. Dr^ª. **Andréia Schmidt**, pela oportunidade de aprendizagem e de pesquisa, por toda sua atenção e confiança e pelo imenso conhecimento que pude adquirir com ela ao longo de oito anos de graduação e mestrado, possibilitando o meu desenvolvimento enquanto pesquisador em ciências do comportamento.

À Prof^ª Dr^ª **Christie Andrade Leite-Panissi**, por todo apoio, material e espaço disponibilizado para a realização de experimentos deste trabalho, assim como pela oportunidade de doutorado e de continuar aprendendo e me desenvolvendo enquanto pesquisador.

Ao Dr. **Rafael Alves Cazuza** e Dr. **Carlos Henrique Rocha Catalão**, por todo auxílio e atenção disponibilizados no ensino e no acompanhamento de técnicas experimentais durante o mestrado.

À minha namorada, **Saara Barros Nascimento**, por estar sempre ao meu lado, dando todo seu apoio, confiança e carinho, por me acalmar quando estava ansioso e estressado, assim como pelos dias em que me acompanhou e me auxiliou nos experimentos deste trabalho.

Aos meus pais, **Solange Aparecida Tetto Pansarim** e **Adriano Sérgio Pansarim**, por todo o amor, apoio, carinho e incentivo dado em todas as etapas de meu desenvolvimento e de minha formação acadêmica e científica.

Aos colegas de laboratório, **Ana Carolina Miranda**, **Claudia Bettio**, **Maryam Furlam**, **Sara Cirilo** e **Vinícius Warisaia**, pelos momentos de apoio, companheirismo de diversão juntos, assim como por toda a ajuda durante a graduação e mestrado.

Aos técnicos de laboratório, **Rodrigo Mazzei e João Borin**, pela ajuda fornecida em problemas técnicos e nos cuidados com os animais durante a realização deste trabalho.

À secretária, **Renata del Moro**, por toda a atenção dada para esclarecer dúvidas sobre as normas do programa.

A **todos os meus professores**, do ensino fundamental à pós-graduação, por toda a dedicação, atenção, paciência e conhecimentos transmitidos, essenciais para meu ingresso no mestrado e para a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**), pela bolsa de mestrado fornecida de março a maio de 2019, e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**), pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro no período de junho de 2019 a fevereiro de 2021 (processo FAPESP nº 2019/03384-0), possibilitando a realização deste trabalho.

RESUMO

Pansarim, V (2021). Efeitos da duração do estresse crônico por contenção sobre a aprendizagem espacial e comportamentos de ratos Sprague-Dawley machos e fêmeas (Dissertação de Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP.

A exposição ao estresse crônico por contenção (CRS) é capaz de induzir alterações em processos fisiológicos e comportamentais. Estudos utilizando esse modelo têm encontrado resultados contraditórios sobre seus efeitos na aprendizagem espacial e a ocorrência de comportamentos relacionados à ansiedade e depressão em roedores. Essas diferenças podem estar relacionadas a variáveis metodológicas, como o tempo de exposição ao CRS. Além disto, poucos estudos utilizam fêmeas, e há indícios de que fêmeas podem ser mais resistentes aos efeitos do CRS do que os machos. O presente estudo buscou investigar da interação entre o sexo (machos e fêmeas) de ratos *Sprague-Dawley* e a duração de exposição ao CRS (11 e 22 dias) sobre: a) o desempenho em uma tarefa de aprendizagem espacial no labirinto aquático de Morris (MWM); b) a ocorrência de comportamentos associados à anedonia no teste de preferência por solução de sacarose (SPT); c) a ocorrência de comportamentos associados à ansiedade e à exploração no labirinto em cruz elevado (EPM); d) a porcentagem de ganho de peso e a composição do ciclo estral. Oitenta ratos foram alocados em oito grupos experimentais (10 sujeitos por grupo) de acordo com o sexo (macho ou fêmea), com o tipo de intervenção (controle ou CRS) e com a duração da intervenção (11 ou 22 dias). Durante a intervenção, os grupos experimentais foram expostos diariamente ao CRS durante 6 horas. Ao longo do procedimento, foi monitorado o ganho de peso dos animais e o ciclo estral das fêmeas, além de serem conduzidos os SPTs. Os testes no EPM e o MWM foram iniciados no dia seguinte após o término da intervenção. Verificou-se que o CRS de 11 dias foi capaz de induzir uma queda no ganho de peso de machos e fêmeas e de alterar a composição do ciclo estral de algumas fêmeas, enquanto que os últimos 11 dias de CRS não provocaram alterações no ganho de peso. A exposição a 11 dias de CRS provocou mais comportamentos relacionados à ansiedade em comparação à exposição a 22 dias de CRS em machos, mas não nas fêmeas. Nenhum efeito do CRS foi verificado no desempenho dos grupos no MWM e nos SPTs. Desta forma, um estresse crônico de curta duração é capaz de provocar prejuízos, como o aumento da ansiedade e uma queda no ganho de peso, enquanto que um estresse crônico prolongado é capaz de levar o organismo a uma adaptação, anulando prejuízos iniciais. Além disto, confirma-se, assim como em outros estudos, que fêmeas podem ser mais resistentes ao CRS do que machos. Não é claro quais variáveis favorecem a adaptação ou o prolongamento dos prejuízos após 21 dias de exposição ao CRS, sendo necessários mais estudos para investigar os fatores envolvidos.

Palavras-Chave: Estresse crônico por contenção; ratos Sprague-Dawley; diferenças entre machos e fêmeas; comportamentos associados a ansiedade; anedonia; aprendizagem espacial.

ABSTRACT

Pansarim, V (2021). Effects of the chronic restraint stress duration on spatial learning and behaviors of male and female Sprague-Dawley rats (Dissertação de Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP.

Exposure to chronic restraint stress (CRS) can induce changes in physiological and behavioral processes. Studies using this model have found contradictory results about its effects on spatial learning and the occurrence of behaviors related to anxiety and depression in rodents. These differences may be related to methodological variables, such as the time of exposure to CRS. In addition, few studies employ females, and there are indications that females may be more resistant to the effects of CRS than males. The present study aimed to investigate the interaction between the sex (males and females) of *Sprague-Dawley* rats and the duration of exposure to CRS (11 and 22 days) on: a) performance in a spatial learning task in the Morris water maze (MWM); b) the occurrence of behaviors associated with anhedonia in the test of preference for sucrose solution (SPT); c) the occurrence of behaviors associated with anxiety and exploration in the elevated plus maze (EPM); d) the percentage of weight gain and the estrous cycle composition. Eighty rats were allocated to eight experimental groups (10 subjects per group) according to sex (male or female), the intervention type (control or CRS) and the intervention duration (11 or 22 days). During the intervention, the experimental groups were exposed daily to the CRS for 6 hours. Throughout the procedure, the weight gain of the animals and the estrous cycle of the females were monitored, besides the SPTs that were conducted. The tests at EPM and MWM started the next day after the end of the intervention. It was observed that the 11-day CRS could induce a drop in the weight gain of males and females and to change the composition of the estrous cycle of some females, while the last 11 days of CRS did not cause changes in weight gain. Exposure to 11 days of CRS caused more anxiety-related behaviors in comparison with exposure to 22 days of CRS in males, but not in females. No effects of the CRS was verified on the performance of the groups in the MWM and in the SPTs. Thus, short-term chronic stress is capable of causing impairment, such as increased anxiety and a drop in weight gain, while prolonged chronic stress is capable of leading the organism to adapt, canceling initial losses. In addition, it is confirmed, as in other studies, that females may be more resistant to CRS than males. It is not clear which variables favor adaptation or prolongation of losses after 21 days of exposure to CRS, and further studies are needed to investigate the factors involved.

Palavras-Chave: Chronic restraint stress; Sprague-Dawley rats; male and female differences; anxiety-related behaviors; anhedonia; spacial learning.

Estresse pode ser entendido como um processo no qual a homeostase – equilíbrio interno necessário para o funcionamento normal do organismo – é desregulada ou ameaçada por situações externas ou internas. O estresse envolve a apresentação de respostas fisiológicas e comportamentais com função de restaurar ou manter a homeostase (Chrousos, 2009; McEwen, 2007; Vyas, et al., 2016). Assim sendo, um estressor seria qualquer estímulo, físico ou psicológico, capaz de provocar alterações fisiológicas e comportamentais relacionadas ao estresse (Hannibal & Bishop, 2014).

Em mamíferos a resposta fisiológica ao estresse envolve tanto a ativação do sistema simpático, como a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (Tsigos & Chrousos, 2002). A ação do sistema simpático é mediada pela ativação da amígdala em situações de medo e de perigo, ocasionando a liberação de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina). Estes neurotransmissores são responsáveis por respostas de curta duração, como o aumento da pressão sanguínea e da atividade respiratória, tendo como função preparar o organismo para situações de luta e fuga. Além disto, as catecolaminas são responsáveis por promover atividade pró-inflamatória em período inicial (Hannibal & Bishop, 2014; Lucassen et al., 2014).

A ação do eixo HPA também é mediada pela atividade da amígdala e resulta na liberação de glicocorticoides (cortisol em humanos e corticoides em outros mamíferos). Os glicocorticoides são responsáveis por respostas prolongadas, como a mobilização de glicose, a supressão de sistemas não vitais e atividade anti-inflamatória, tendo como função permitir um melhor ajustamento do organismo ao estresse. Além disto, os glicocorticoides exercem atividade inibitória sobre o próprio eixo HPA, permitindo o retorno ao funcionamento normal do organismo quando a situação estressora é encerrada (Lucassen et al., 2014; Hannibal & Bishop, 2014). Dentre as estruturas

cerebrais mais afetadas pela ativação do eixo HPA, além da amígdala, estão o córtex pré-frontal e o hipocampo, os quais contêm uma grande quantidade de receptores de glicocorticoides. Desta forma, o estresse é capaz de afetar processos comportamentais mediados por tais estruturas, como respostas relacionadas à ansiedade e à alterações de humor, e a aprendizagem e retenção de novos comportamentos (McEwen, 2007; McEwen et al., 2015; Vyas et al., 2016).

Embora as respostas fisiológicas ao estresse possam resultar na recuperação da estabilidade interna e na adaptação aos estressores, tais respostas podem prejudicar a saúde e a interação do organismo com o ambiente quando se encontram desreguladas (resposta exagerada e prolongada, ou resposta insuficiente ao estresse). Desta forma, o estresse pode ser tanto adaptativo como prejudicial para os organismos (Chrousos, 2009; McEwen et al., 2015; Vyas et al., 2016).

Pesquisadores têm utilizado diferentes modelos animais (majoritariamente com roedores) para investigar os efeitos do estresse crônico em processos comportamentais, além de buscar compreender as variáveis e mecanismos envolvidos nestes efeitos e, assim, encontrar formas de evitar ou reverter os prejuízos do estresse. Dentre os modelos mais utilizados pode-se citar o estresse crônico moderado (*Chronic Mild Stress* - CMS; também chamado de estresse crônico imprevisível moderado), no qual o animal é exposto a diversos estressores de intensidade moderada (e.g. privação branda de comida e água; gaiola-viveiro inclinada; luz acesa durante período escuro; temperatura baixa) que se alternam ao longo do tempo de forma imprevisível e incontrolável para o animal (Bian et al. 2012; Gouirand & Matuszewich, 2005; Hu et al., 2017; Willner, Towell, Sampson, Sophokleous & Muscat, 1987; Willner, 2017; Xi et al, 2011). Embora o CMS seja reconhecido como um modelo que tenta se aproximar mais da experiência humana em função do fato de expor os indivíduos a diferentes estressores

de intensidade moderada, ele tem se apresentado como um modelo de difícil replicabilidade, destacando-se a grande variabilidade dos estressores utilizados e da ordem de exposição aos estressores entre os estudos (Antoniuk, Bijata, Ponimaskin & Wlodarczyk, 2019). Há também modelos de estresse crônico cujos protocolos são de mais fácil reprodução por serem baseados na exposição prolongada e recorrente a um único estressor, como no estresse crônico por contenção (*Chronic Restraint Stress* – CRS), no qual o animal é exposto a períodos diários de contenção, permanecendo totalmente imobilizado ou com possibilidade de movimentação limitada (Luine, Villegas, Martinez, & McEwen, 1994; Luine, Martinez, Villegas, Magariños, & McEwen, 1996; Kotraki, Kremmyda, Youlatos, Alexis, & Kittas, 2004; Ortiz et al., 2015). Apesar da facilidade de replicação, o modelo de CRS pode levar à habituação em função de sua previsibilidade, o que pode ser observado pela diminuição gradativa na resposta do eixo HPA ao estresse (Grissom & Bhatnagar; 2009). Embora apresentem diferenças, tanto o modelo de CRS, como o de CMS são capazes de provocar alterações fisiológicas e comportamentais no organismo (Qiao et al. 2016).

Willner e colaboradores (1987) verificaram que a exposição de ratos machos a três semanas de CMS era capaz de provocar uma queda na preferência pelo consumo de uma solução de 1% de sacarose em relação ao consumo de água. Tal fenômeno foi relacionado à anedonia (perda de preferência por estímulos anteriormente reforçadores), uma das características da depressão endógena. A anedonia tem sido verificada em alguns estudos com roedores expostos ao CMS e ao CRS em testes de preferência por sacarose (*Sucrose Preference Test* – SPT), além de ter sido revertida pela administração de antidepressivos, reforçando mais a validade do estresse crônico para o estudo da depressão induzida por estresse (Bessa et al., 2009; Hu et al., 2017; Liu, Zhao, Yue, Qian & Xie, 2019; Lu, Shao, Hu, Tu & Guo, 2016; Naert, Ixart, Maurice, Tapia-

Arancibia & Givalois, 2011; Shang, Shang, Fu & Zhang, 2017; Strekalova, Spanagel, Bartsch, Henn & Gass, 2014; Tan, Wang, Chen, Long & Zou, 2017; Wang et al., 2016; Willner, 2017; Zhu, Klomparens, Guo & Geng, 2019). No entanto, nem todos os estudos que utilizam o CMS ou o CRS verificam uma queda na preferência por sacarose (Fonseca Júnior, Castelli, & Oliveira, 2015; Herrera-Pérez, Benítez-Coronel, Jiménez-Rubio, Hernández-Hernández & Martínez-Mota, 2016; Riaz et al., 2015; Zhu, Shi, Wang & Li, 2014). Uma possível explicação para essa inconsistência entre os estudos poderia ser as diferenças nos modelos de estresse crônico, nos procedimentos de SPT, assim como nas condições de alojamento, nas espécies, nas linhagens, na idade e no sexo dos animais (Antoniuk et al., 2019; Liu et al., 2018; Qiao et al., 2016).

Alguns estudos que têm verificado a queda na preferência por solução de sacarose após administração de estresse crônico observaram também uma diminuição na latência para imobilização e um aumento no tempo de imobilização no teste de nado forçado, além de queda no ganho de peso corporal, efeitos também relacionados à depressão (Bessa et al., 2009; Liu et al., 2019; Lu et al., 2016; Naert et al., 2011; Shang et al., 2017; Tan et al., 2017; Wang et al., 2016). Strekalova et al. (2014) apontam que apenas uma parcela de ratos expostos ao estresse crônico (cerca de 60%) desenvolve anedonia, sendo que os efeitos associados à depressão no teste de nado forçado são verificados apenas em animais anedônicos. Por outro lado, verifica-se que o estresse crônico é capaz de provocar uma queda no ganho de peso independentemente da queda na preferência por solução adocicada ocorrer (Herrera-Pérez et al., 2016, 2020; Riaz et al. 2015; Strekalova et al., 2014).

O desencadeamento de respostas relacionadas à depressão mediante a exposição ao estresse crônico pode estar relacionado a alterações em áreas e vias encefálicas relacionadas à sensibilidade ao reforço e à escolha. Neste sentido, tem sido verificado

que a exposição ao estresse crônico imprevisível pode prejudicar o funcionamento da via mesolímbica dopaminérgica, incluindo regiões como a área tegmental ventral e o núcleo accumbens, assim como provocar uma retração dendrítica nos neurônios do córtex pré-frontal medial (mPFC), prejudicando o funcionamento da via mPFC-mesolímbica e induzindo uma diminuição do valor reforçador de situações anteriormente preferidas em situação de escolha (Qiao et al., 2016; Stanton, Holmes, Chang, & Joormann, 2019).

A exposição ao estresse crônico também pode provocar efeitos e comportamentos associados à ansiedade. Diversos estudos têm verificado que o CRS diminui o número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (*Elevated Plus Maze* – EPM), assim como é capaz de diminuir o tempo de permanência no centro do campo aberto (*Open Field* – OP), efeitos comumente relacionados à ansiedade em modelos animais, o que pode ser revertido também pela administração de antidepressivos (Bessa et al., 2009; Bhagya, Srikumar, Veena & Shankaranaravana Rao, 2017; Bondi, Rodriguez, Gould, Frazer & Morilak, 2008; Bigdeli, Asle-Rousta & Rahnema, 2019; Guedri, Frih, Chettoum & Royabhi, 2017; Hu et al., 2017; Liu et al., 2019; de Oliveira, Zaniboni, Carmona, Fonseca & Canto-de-Souza, 2017; Stenman, Patterson, Meunier, Roman & Lehtinen, 2020; Vyas & Chattarji, 2004; Zhu et al., 2014). Além disto, o estresse crônico é capaz de facilitar a indução de medo condicionado e aumentar a latência para alimentação no paradigma de supressão alimentar pela novidade, o que fortalece a possível relação entre o estresse prolongado e o desenvolvimento de comportamentos relacionados ao medo e à ansiedade (Conrad, Magariños, LeDoux & McEwen, 1999; Bessa et al., 2009).

Por outro lado, há estudos que não verificam nenhum efeito do CRS relacionado à ansiedade no EPM, o que poderia estar relacionado também a diferenças nos modelos

de estresse crônico utilizados pelos estudos, bem como nos organismos utilizados (Moghrabi, Suchecki, da Silva, Covolan & Hamani, 2020). Uma variável que parece ser crítica na variabilidade encontrada em relação a respostas de ansiedade produzidas por modelos de estresse crônico é a duração e a intensidade do estresse. De modo geral, estudos com ratos machos, expostos a um CRS com intensidade de 6h diárias de contenção e com duração de pelo menos 21 dias são capazes de produzir respostas associadas à ansiedade no EPM, além de uma queda na preferência por sacarose e no ganho de peso (McEwen, 2007; McEwen et al., 2015; Qiao et al., 2016). Além disto, Bhagya e colaboradores (2017) verificaram que a exposição de ratos a um ambiente enriquecido é capaz de reverter os efeitos da exposição ao CRS relacionados à ansiedade no EPM, ressaltando a importância das condições ambientais externas ao estresse na determinação dos seus efeitos sobre processos comportamentais.

A indução de respostas associadas à ansiedade pelo estresse crônico pode estar relacionada a alterações na amígdala, estrutura encefálica comumente associada ao processamento do medo, da ansiedade e da agressividade. Desta forma, tem sido verificado que a exposição ao estresse crônico pode provocar crescimento dendrítico em neurônios da amígdala basolateral, ampliando a atividade neuronal nesta estrutura (McEwen et al., 2015; Qiao et al, 2016; Vyas, Mitra, Rao & Chattarji, 2002; Vyas, Pillai & Chattarji, 2004).

Muitos estudos também buscam investigar os efeitos do estresse crônico sobre outros processos comportamentais, como a aprendizagem e a retenção de novos comportamentos. Esses estudos utilizam frequentemente tarefas de aprendizagem que dependem do hipocampo, como a aprendizagem espacial, e do córtex pré-frontal, como a aprendizagem reversa (Conrad, 2010; McEwen, 2007). Como em relação a outros

efeitos da exposição ao estresse, esses estudos também têm encontrado resultados variáveis.

Diversos estudos verificaram que os modelos de CRS e de CMS são capazes de produzir prejuízo no desempenho de roedores em tarefas de aprendizagem espacial no labirinto aquático de Morris (MWM – *Morris Water Maze*) e no labirinto de braço radial (Bian, et al., 2012; Bigdeli, Asle-Rousta & Rahnema, 2019; Conrad, 2010; Guedri et al., 2017; Hu et al., 2017; Jangra et al., 2017; Kitraki et al., 2004; Luine et al., 1994; Ortiz et al., 2015; Qiao, et al., 2016; Riaz et al., 2015; Xi et al., 2011; Zhang et al., 2017). Bessa et al. (2009) verificaram um prejuízo na aprendizagem reversa espacial de ratos machos no MWM mediante exposição ao CMS, o que foi revertido pela administração de antidepressivos. Além disso, verificaram uma correlação significativa entre o desempenho na aprendizagem espacial reversa e comportamentos relacionados à ansiedade e depressão, ressaltando a interação entre diferentes comportamentos e processos afetados pelo estresse crônico.

Efeitos negativos do estresse crônico sobre a aprendizagem espacial podem ser decorrentes de uma retração dendrítica dos neurônios da área CA3 do hipocampo (Qiao et al., 2016; Watanabe, Gould & McEwen, 1992). Neste sentido, tem sido verificado o envolvimento do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) – proteína relacionada à sobrevivência neuronal e à neogênese – nas alterações estruturais no hipocampo e em outras regiões encefálicas. O estresse crônico pode levar à sub-regulação de BDNF na área CA3 do hipocampo, resultando na retração dendrítica de seus neurônios e em prejuízos na aprendizagem, mas também pode levar à suprarregulação de BDNF na amígdala basolateral, resultado em um crescimento dendrítico de seus neurônios e no fortalecimento de comportamentos relacionados à ansiedade (McEwen et al., 2015).

De modo geral, estudos que verificam um efeito prejudicial sobre a aprendizagem espacial, associado com alterações estruturais no hipocampo, utilizam modelos de estresse crônico com duração mínima de 21 dias (e.g., CRS de 6h de contenção diárias por 21 dias) e ratos *Sprague-Dawley* machos (e.g. Hu et al., 2017; Luine et al., 1994; Ortiz et al., 2015; Riaz et al., 2015; Xi et al., 2011). Por outro lado, há estudos que não verificam nenhum efeito do estresse crônico sobre a aprendizagem espacial, assim como outros estudos que verificam que o estresse crônico é capaz de facilitar esse tipo de aprendizagem. Zain, Pandey, Majeed, Wong e Mohamed (2018) não verificaram nenhuma diferença entre camundongos *C57BL/6J* machos expostos ao CRS (6h de contenção/ 21 dias) e sujeitos controle, na aprendizagem no MWM. Da mesma forma, Luine et al. (1996) não verificaram nenhum efeito de um CRS com duração de 7 dias (6h de contenção diárias) sobre a aprendizagem espacial de ratos *Sprague-Dawley* machos no labirinto radial, verificando, entretanto, que um CRS com duração de 13 dias era capaz de facilitar o desempenho dos sujeitos na mesma tarefa. Em outro estudo Gouirand e Matuszewich (2005) verificaram que ratos *Sprague-Dawley* machos tiveram o desempenho facilitado no MWM quando expostos a um CMS com duração de 10 dias. Os diferentes efeitos do estresse crônico sobre a aprendizagem espacial poderiam estar associados a variações na espécie e na linhagem dos organismos, assim como variações na duração e na intensidade do estresse crônico. É possível que camundongos *C57BL/6J* sejam mais resistentes aos efeitos negativos do estresse crônico sobre o hipocampo e a aprendizagem espacial do que ratos *Sprague-Dawley*. Além disto, é possível que a relação entre a duração do estresse crônico e a aprendizagem espacial se dê em um modelo de “u” invertido, ou seja, um estresse crônico muito curto (e.g. 7 dias) não seria capaz de provocar alterações no desempenho, um estresse crônico de duração moderada (e.g. 10 ou 13 dias) seria capaz de melhorar o desempenho, enquanto

que um estresse crônico de duração longa (e.g. 21 dias ou mais) seria capaz de prejudicar o desempenho de machos em uma tarefa de aprendizagem espacial (Conrad, 2010). Essas hipóteses, porém, precisam ainda ser investigadas a fim de se esclarecer em que condições os modelos de estresse crônico podem (ou não) afetar de forma positiva ou negativa a aprendizagem espacial de roedores.

O sexo também pode ser uma variável relevante nos efeitos do estresse sobre o desempenho dos sujeitos. Fêmeas podem apresentar resultados diferentes em relação a machos, como verificado no estudo de Kitraki et al. (2004), no qual um CRS de 21 dias de duração (6h de contenção diárias) prejudicou o desempenho espacial de ratos machos no MWM, enquanto as fêmeas tiveram o seu desempenho facilitado pelo estresse. Ortiz et al. (2015) verificaram um efeito semelhante utilizando um modelo de CRS de 21 dias (2h de contenção diária), realizado de forma imprevisível, no qual verificaram prejuízos no desempenho de ratos *Sprague-Dawley* machos em tarefa de aprendizagem espacial no labirinto radial, sem alteração no desempenho das fêmeas. Uma possibilidade é de que fêmeas sejam mais resilientes ao estresse crônico que machos em função da maior circulação de estrogênio, hormônio que apresenta funções neurotrófica e antioxidante que poderiam evitar a retração dendrítica de neurônios no hipocampo. Além disto, fêmeas possuem um desempenho pior do que machos em tarefas de aprendizagem espacial em condição normal (sem exposição a modelos de estresse; desempenho avaliado no MWM e no labirinto radial), algo que poderia ser revertido em situações de estresse crônico (Jonasson, 2005; Luine, Gomez, Beck, & Bowman, 2017). Apesar disto, há estudos que verificam efeitos diferentes em fêmeas, como o de Conrad, Grote, Hobbs e Ferayorni (2003), que verificaram que tanto ratos *Sprague-Dawley* machos como fêmeas expostos a um CRS com duração de 21 dias (6h de contenção diárias) apresentaram um prejuízo no primeiro minuto de uma tarefa de retenção espacial no

labirinto em Y (*Y-maze*), entretanto, somente as fêmeas tiveram o desempenho facilitado nos últimos quatro minutos da mesma tarefa.

O número limitado de estudos que utilizam fêmeas como sujeito, porém, dificulta um entendimento completo da relação entre sexo, estresse crônico e processos comportamentais. Becker, Prendergast e Liang (2016) discutem que muitos pesquisadores evitam utilizar fêmeas alegando uma maior variabilidade que machos nos dados comportamentais e neurobiológicos em função das diferenças hormonais pelas quais as fêmeas passam ao longo das fases do ciclo estral. Entretanto, estes pesquisadores verificaram, através de uma meta-análise, que dados comportamentais e neurobiológicos de fêmeas não eram mais variáveis que de machos, mesmo quando havia diferenças entre machos e fêmeas e independentemente da fase do ciclo estral e da condição de alojamento (animais isolados ou alojados em grupos do mesmo sexo). Desta forma, embora possam existir diferenças comportamentais e fisiológicas entre as fases do ciclo estral, tais diferenças não são suficientes para prejudicar a comparação entre machos e fêmeas, ressaltando-se a importância da utilização de fêmeas nos estudos mesmo quando as fases do ciclo estral não são levadas em consideração nas análises (Beery, 2018; Shansky & Woolley, 2016; Shansky, 2019).

Em síntese, a maioria dos estudos com estresse crônico avaliam seus efeitos em processos comportamentais de roedores machos expostos a modelos de estresse crônico de longa duração – 21 dias ou mais. Tais estudos verificam, em grande parte, um efeito prejudicial do estresse sobre comportamentos e estruturas encefálicas, mas a literatura apresenta, ainda, grande variabilidade nos resultados encontrados, especialmente em relação a fêmeas, que são sub-representadas nos estudos. Os resultados até agora produzidos sugerem que durações menores de estresse crônico podem provocar diferentes efeitos sobre processos comportamentais. Em específico, é possível que

fêmeas sejam mais resistentes aos efeitos do estresse crônico sobre a aprendizagem espacial. Além disso, é possível que modelos de estresse crônico com duração moderada – entre 10 e 13 dias de exposição – possam melhorar o desempenho dos animais em tarefas de aprendizagem espacial.

Além disso, os estudos sugerem que efeitos da exposição ao estresse crônico sobre a aprendizagem espacial podem ser acompanhados de alterações em comportamentos associados à depressão e à ansiedade e de uma queda no ganho de peso. Da mesma forma, esses resultados não são um consenso na literatura e uma possível hipótese para os resultados variáveis encontrados nos estudos é a diferença na duração e intensidade de estresse aplicada em diferentes pesquisas, além do modelo de estresse crônico utilizado. De acordo com a revisão realizada, a utilização do modelo de CRS pode ser mais vantajosa para a avaliação de alterações comportamentais produzidas pelo estresse em função do seu protocolo ser menos variável entre os estudos e em comparação ao modelo de CMS.

Assim sendo, o presente estudo teve como objetivo investigar efeitos da interação entre a duração (11 dias ou 22 dias) da exposição ao estresse crônico por contenção e o sexo (machos ou fêmeas) de ratos *Sprague-Dawley* sobre:

- 1) O desempenho em uma tarefa de aprendizagem espacial no labirinto aquático de Morris (alteração na latência de escape e na distância percorrida);
- 2) Comportamentos associados à anedonia no teste de preferência por solução de sacarose (alteração na preferência por solução de sacarose);
- 3) Comportamentos associados à ansiedade e à exploração no labirinto em cruz elevado (tempo de permanência nos braços abertos e frequência de entradas nos braços);
- 4) A porcentagem de ganho de peso e composição do ciclo estral;

Conclusão

Em síntese, o presente estudo mostrou que o CRS de curta duração é capaz de provocar uma queda no ganho de peso, assim como pode levar a um aumento em comportamentos associados à ansiedade em machos. Entretanto, a duração prolongada do CRS (21 dias ou mais) é capaz de levar a uma adaptação dos animais, refletindo-se na estabilização do ganho de peso e em uma diminuição de comportamentos associados à ansiedade. Ainda não são conhecidos os fatores que favorecem uma adaptação ao estresse crônico prolongado, como no presente estudo, ou à intensificação dos prejuízos, como observado em outros estudos. A redução de estressores externos ao CRS, assim como a previsibilidade do modelo podem ser variáveis que favoreçam a adaptação. Além disto, o sexo dos animais é uma variável importante para a determinação dos efeitos do estresse crônico, sendo que as fêmeas podem ser mais resistentes aos efeitos do CRS do que machos. Apesar disto, o presente estudo apresenta limitações, como não estabelecer controle do ciclo estral das fêmeas, a fim de comparar os resultados comportamentais entre as diferentes fases do ciclo, e não ter utilizado tarefas de aprendizagem mais complexas, como a aprendizagem espacial reversa, que poderiam ser mais sensíveis aos efeitos do CRS. Mais estudos com machos e fêmeas que investiguem diferentes durações de CRS e a manipulação de variáveis ambientais ou relacionadas ao estresse são necessários para uma melhor compreensão dos efeitos prejudiciais e benéficos do estresse crônico.

Referências

- Antoniuk, S., Bijata, M., Ponimaskin, E., & Wlodarczyk, J. (2019). Chronic unpredictable mild stress for modeling depression in rodents: Meta-analysis of model reliability. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 99, 101-116. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.12.002>
- Bessa, J. M., Mesquita, A. R., Oliveira, M., Pêgo, J. M., Cerqueira, J. J., Palha, J. A., ... & Sousa, N. (2009). A trans-dimensional approach to the behavioral aspects of depression. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 3(1). <https://doi.org/10.3389/neuro.08.001.2009>
- Becker, J. B., Prendergast, B. J., & Liang, J. W. (2016). Female rats are not more variable than male rats: meta-analysis of neuroscience studies. *Biology of Sex Differences*, 7(1), 1-7. <https://doi.org/10.1186/s13293-016-0087-5>
- Beery, A. K. (2018). Inclusion of females does not increase variability in rodent research studies. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, 23, 143-149. <https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2018.06.016>
- Bhagya, V. R., Srikumar, B. N., Veena, J., & Shankaranarayana Rao, B. S. (2017). Short-term exposure to enriched environment rescues chronic stress-induced impaired hippocampal synaptic plasticity, anxiety, and memory deficits. *Journal of Neuroscience Research*, 95(8), 1602-1610. <https://doi.org/10.1002/jnr.23992>
- Bian, Y., Pan, Z., Hou, Z., Huang, C., Li, W., & Zhao, B. (2012). Learning, memory, and glial cell changes following recovery from chronic unpredictable stress. *Brain Research Bulletin*, 88(5), 471-476. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2012.04.008>
- Bigdeli, Y., Asle-Rousta, M., & Rahnema, M. (2019). Effects of limonene on chronic restraint stress-induced memory impairment and anxiety in male rats. *Neurophysiology*, 51(2), 107-113. <https://doi.org/10.1007/s11062-019-09800-0>
- Bondi, C. O., Rodriguez, G., Gould, G. G., Frazer, A., & Morilak, D. A. (2008). Chronic unpredictable stress induces a cognitive deficit and anxiety-like behavior in rats that is prevented by chronic antidepressant drug treatment. *Neuropsychopharmacology*, 33(2), 320-331. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301410>
- Breen, K. M., Thackray, V. G., Hsu, T., Mak-McCully, R. A., Coss, D., & Mellon, P. L. (2012). Stress levels of glucocorticoids inhibit LH β -subunit gene expression in gonadotrope cells. *Molecular Endocrinology*, 26(10), 1716-1731. <https://doi.org/10.1210/me.2011-1327>
- Chrousos, G. P. (2009). Stress and disorders of the stress system. *Nature Reviews Endocrinology*, 5(7), 374-381. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2009.106>
- Conrad, C. D., Magariños, A. M., LeDoux, J. E., & McEwen, B. S. (1999). Repeated restraint stress facilitates fear conditioning independently of causing hippocampal

- CA3 dendritic atrophy. *Behavioral Neuroscience*, 113(5), 902-913.
<https://doi.org/10.1037/0735-7044.113.5.902>
- Conrad, C. D., Grote, K. A., Hobbs, R. J., & Ferayorni, A. (2003). Sex differences in spatial and non-spatial Y-maze performance after chronic stress. *Neurobiology of Learning and Memory*, 79(1), 32-40. [https://doi.org/10.1016/S1074-7427\(02\)00018-7](https://doi.org/10.1016/S1074-7427(02)00018-7)
- Conrad, C. D. (2010). A critical review of chronic stress effects on spatial learning and memory. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 34(5), 742-755. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2009.11.003>
- Dastgerdi, A. H., Radahmadi, M., Pourshanazari, A. A., & Dastgerdi, H. H. (2017). Effects of crocin on learning and memory in rats under chronic restraint stress with special focus on the hippocampal and frontal cortex corticosterone levels. *Advanced Biomedical Research*, 6(157). https://doi.org/10.4103/abr.abr_107_17
- /
- Fonseca Júnior, A. R., Castelli, M. C. Z., & Oliveira, E. C. A. D. (2015). Effects of chronic mild stress on operant discrimination learning. *Behavior Analysis: Research and Practice*, 15(1), 20-27. <http://dx.doi.org/10.1037/h0101066>
- Forbes, N. F., Stewart, C. A., Matthews, K., & Reid, I. C. (1996). Chronic mild stress and sucrose consumption: validity as a model of depression. *Physiology & Behavior*, 60(6), 1481-1484. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(96\)00305-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(96)00305-8)
- Fu, X. Y., Chen, H. H., Zhang, N., Ding, M. X., Qiu, Y. E., Pan, X. M., ... & Wang, W. Q. (2018). Effects of chronic unpredictable mild stress on ovarian reserve in female rats: Feasibility analysis of a rat model of premature ovarian failure. *Molecular Medicine Reports*, 18(1), 532-540. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8989>
- Grissom, N., & Bhatnagar, S. (2009). Habituation to repeated stress: get used to it. *Neurobiology of Learning and Memory*, 92(2), 215-224.
<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2008.07.001>
- Guedri, K., Frih, H., Chettoum, A., & Rouabhi, R. (2017). Chronic restraint stress induced neurobehavioral alterations and histological changes in rat. *Toxicology and Environmental Health Sciences*, 9(2), 123-129. <https://doi.org/10.1007/s13530-017-0312-6>
- Gouirand, A. M., & Matuszewich, L. (2005). The effects of chronic unpredictable stress on male rats in the water maze. *Physiology & Behavior*, 86(1-2), 21-31.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2005.06.027>
- Hannibal, K. E., & Bishop, M. D. (2014). Chronic stress, cortisol dysfunction, and pain: a psychoneuroendocrine rationale for stress management in pain rehabilitation. *Physical Therapy*, 94(12), 1816-1825.
<https://doi.org/10.2522/ptj.20130597>
- Herrera-Péres, J. J., Benítez-Coronel, V., Jiménez-Rubio, G., Hernández-Hernández, O. T., Martínez-Mota, L. (2016). Young-adult male rats' vulnerability to chronic mild

stress is reflected by anxious-like instead of depressive-like behaviors. *Neuroscience Journal*, 2016, ID5317242
<https://doi.org/10.1155/2016/5317242>

- Hu, C., Luo, Y., Wang, H., Kuang, S., Liang, G., Yang, Y., ... & Yang, J. (2017). Re-evaluation of the interrelationships among the behavioral tests in rats exposed to chronic unpredictable mild stress. *Plos One*, 12(9), e0185129.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185129>
- Jangra, A., Sriram, C. S., Dwivedi, S., Gurjar, S. S., Hussain, M. I., Borah, P., & Lahkar, M. (2017). Sodium phenylbutyrate and edaravone abrogate chronic restraint stress-induced behavioral deficits: implication of oxido-nitrosative, endoplasmic reticulum stress cascade, and neuroinflammation. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 37(1), 65-81. <https://doi.org/10.1007/s10571-016-0344-5>
- Jeong, J. Y., Lee, D. H., & Kang, S. S. (2013). Effects of chronic restraint stress on body weight, food intake, and hypothalamic gene expressions in mice. *Endocrinology and Metabolism*, 28(4), 288-296.
<http://dx.doi.org/10.3803/EnM.2013.28.4.288>
- Jonasson, Z. (2005). Meta-analysis of sex differences in rodent models of learning and memory: a review of behavioral and biological data. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 28(8), 811-825. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.10.006>
- Kitraki, E., Kremmyda, O., Youlatos, D., Alexis, M. N., & Kittas, C. (2004). Gender-dependent alterations in corticosteroid receptor status and spatial performance following 21 days of restraint stress. *Neuroscience*, 125(1), 47-55.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2003.12.024>
- Liu, M. Y., Yin, C. Y., Zhu, L. J., Zhu, X. H., Xu, C., Luo, C. X., ... & Zhou, Q. G. (2018). Sucrose preference test for measurement of stress-induced anhedonia in mice. *Nature Protocols*, 13(7), 1686-1698. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0011-z>
- Liu, B., Zhao, L., Yue, C., Qian, M., & Xie, M. (2019). Changes in gonadal function at different stages of chronic restraint stress-induced depression animals. *Physiology & Behavior*, 210, 112656. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2019.112656>
- Lu, J., Shao, R. H., Hu, L., Tu, Y., & Guo, J. Y. (2016). Potential antiinflammatory effects of acupuncture in a chronic stress model of depression in rats. *Neuroscience Letters*, 618, 31-38. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.02.040>
- Lucassen, P. J., Pruessner, J., Sousa, N., Almeida, O. F., Van Dam, A. M., Rajkowska, G., ... & Czeh, B. (2014). Neuropathology of stress. *Acta Neuropathologica*, 127(1), 109-135. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1223-5>
- Luine, V., Villegas, M., Martinez, C., & McEwen, B. S. (1994). Repeated stress causes reversible impairments of spatial memory performance. *Brain Research*, 639(1), 167-170. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)91778-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)91778-7)

- Luine, V., Martinez, C., Villegas, M., Magariños, A. M., & McEwen, B. S. (1996). Restraint stress reversibly enhances spatial memory performance. *Physiology & Behavior*, 59(1), 27-32. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(95\)02016-0](https://doi.org/10.1016/0031-9384(95)02016-0)
- Luine, V. (2015). Recognition memory tasks in neuroendocrine research. *Behavioural brain research*, 285, 158-164. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.04.032>
- Luine, V., Gomez, J., Beck, K., & Bowman, R. (2017). Sex differences in chronic stress effects on cognition in rodents. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 152, 13-19. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2016.08.005>
- Marin, M. T., Cruz, F. C., & Planeta, C. S. (2007). Chronic restraint or variable stresses differently affect the behavior, corticosterone secretion and body weight in rats. *Physiology & Behavior*, 90(1), 29-35. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.08.021>
- McEwen, B. S. (2007). Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiological Reviews*, 87(3), 873-904. <https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2006>
- McEwen, B. S., Bowles, N. P., Gray, J. D., Hill, M. N., Hunter, R. G., Karatsoreos, I. N., & Nasca, C. (2015). Mechanisms of stress in the brain. *Nature Neuroscience*, 18(10), 1353-1363. <https://doi.org/10.1038/nn.4086>
- McLean, A. C., Valenzuela, N., Fai, S., & Bennett, S. A. (2012). Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (67), e4389. <https://doi.org/10.3791/4389>
- Mitra, R., Vyas, A., Chatterjee, G., & Chattarji, S. (2005). Chronic-stress induced modulation of different states of anxiety-like behavior in female rats. *Neuroscience Letters*, 383(3), 278-283. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.04.037>
- Mograb, K. D. M., Suchecki, D., da Silva, S. G., Covolan, L., & Hamani, C. (2020). Chronic unpredictable restraint stress increases hippocampal pro-inflammatory cytokines and decreases motivated behavior in rats. *Stress*, 23(4), 427-436. <https://doi.org/10.1080/10253890.2020.1712355>
- Naert, G., Ixart, G., Maurice, T., Tapia-Arancibia, L., & Givalois, L. (2011). Brain-derived neurotrophic factor and hypothalamic-pituitary-adrenal axis adaptation processes in a depressive-like state induced by chronic restraint stress. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 46(1), 55-66. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2010.08.006>
- de Oliveira, P. C., Zaniboni, C. R., Carmona, I. M., Fonseca, A. R., & Canto-de-Souza, A. (2017). Preliminary behavioral assessment of cagemates living with conspecifics submitted to chronic restraint stress in mice. *Neuroscience Letters*, 657, 204-210. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.07.008>

- Ortiz, J. B., Taylor, S. B., Hoffman, A. N., Campbell, A. N., Lucas, L. R., & Conrad, C. D. (2015). Sex-specific impairment and recovery of spatial learning following the end of chronic unpredictable restraint stress: potential relevance of limbic GAD. *Behavioural Brain Research*, 282, 176-184. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.12.051>
- Qiao, H., Li, M. X., Xu, C., Chen, H. B., An, S. C., & Ma, X. M. (2016). Dendritic spines in depression: what we learned from animal models. *Neural Plasticity*, 2016, ID8056370 <https://doi.org/10.1155/2016/8056370>
- Pansarim, V., & Schmidt, A. (2019). Efeitos do estresse crônico moderado sobre o desempenho de ratos Wistar em tarefas de aprendizagem. *Interação em Psicologia*, 23(2). <http://dx.doi.org/10.5380/psi.v23i02.58030>
- Peng, G., Yang, L., Wu, C. Y., Zhang, L. L., Wu, C. Y., Li, F., ... & Zhang, G. Q. (2021). Whole body vibration training improves depression-like behaviors in a rat chronic restraint stress model. *Neurochemistry International*, 142, 104926. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2020.104926>
- Retana-Márquez, S., Juárez-Rojas, L., Ávila-Quintero, A., Rojas-Maya, S., Perera, G., Casillas, F., ... & Gómez-Quiroz, L. (2020). Neuroendocrine disruption is associated to infertility in chronically stressed female rats. *Reproductive Biology*, 20(4), 474-483. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2020.07.011>
- Riaz, M. S., Bohlen, M. O., Gunter, B. W., Henry, Q., Stockmeier, C. A., & Paul, I. A. (2015). Attenuation of social interaction-associated ultrasonic vocalizations and spatial working memory performance in rats exposed to chronic unpredictable stress. *Physiology & Behavior*, 152, 128-134. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.09.005>
- Saito, V. M., & Brandao, M. L. (2015). The benzodiazepine midazolam acts on the expression of the defensive behavior, but not on the processing of aversive information, produced by exposure to the elevated plus maze and electrical stimulations applied to the inferior colliculus of rats. *Neuropharmacology*, 88, 180-186. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.07.018>
- Sadler, A. M., & Bailey, S. J. (2016). Repeated daily restraint stress induces adaptive behavioural changes in both adult and juvenile mice. *Physiology & Behavior*, 167, 313-323. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.09.014>
- Scholl, J. L., Afzal, A., Fox, L. C., Watt, M. J., & Forster, G. L. (2019). Sex differences in anxiety-like behaviors in rats. *Physiology & Behavior*, 211, 112670. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2019.112670>
- Shang, X., Shang, Y., Fu, J., & Zhang, T. (2017). Nicotine significantly improves chronic stress-induced impairments of cognition and synaptic plasticity in mice. *Molecular Neurobiology*, 54(6), 4644-4658. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0012-2>

- Shansky, R. M., & Woolley, C. S. (2016). Considering sex as a biological variable will be valuable for neuroscience research. *Journal of Neuroscience*, 36(47), 11817-11822. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1390-16.2016>
- Shansky, R. M. (2019). Are hormones a “female problem” for animal research?. *Science*, 364(6443), 825-826. <https://doi.org/10.1126/science.aaw7570>
- Stanton, C. H., Holmes, A. J., Chang, S. W., & Joormann, J. (2019). From stress to anhedonia: molecular processes through functional circuits. *Trends in Neurosciences*, 42(1), 23-42. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2018.09.008>
- Stenman, L. K., Patterson, E., Meunier, J., Roman, F. J., & Lehtinen, M. J. (2020). Strain specific stress-modulating effects of candidate probiotics: a systematic screening in a mouse model of chronic restraint stress. *Behavioural Brain Research*, 379, 112376. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112376>
- Strekalova, T., Spanagel, R., Bartsch, D., Henn, F. A., & Gass, P. (2004). Stress-induced anhedonia in mice is associated with deficits in forced swimming and exploration. *Neuropsychopharmacology*, 29(11), 2007-2017. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300532>
- Tan, S., Wang, Y., Chen, K., Long, Z., & Zou, J. (2017). Ketamine alleviates depressive-like behaviors via down-regulating inflammatory cytokines induced by chronic restraint stress in mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 40(8), 1260-1267. <https://doi.org/10.1248/bpb.b17-00131>
- Tsigos, C., & Chrousos, G. P. (2002). Hypothalamic–pituitary–adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of Psychosomatic Research*, 53(4), 865-871. [https://doi.org/10.1016/S0022-3999\(02\)00429-4](https://doi.org/10.1016/S0022-3999(02)00429-4)
- Vyas, A., Mitra, R., Rao, B. S., & Chattarji, S. (2002). Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *Journal of Neuroscience*, 22(15), 6810-6818. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-15-06810.2002>
- Vyas, A., Pillai, A. G., & Chattarji, S. (2004). Recovery after chronic stress fails to reverse amygdaloid neuronal hypertrophy and enhanced anxiety-like behavior. *Neuroscience*, 128(4), 667-673. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.07.013>
- Vyas, A., & Chattarji, S. (2004). Modulation of different states of anxiety-like behavior by chronic stress. *Behavioral Neuroscience*, 118(6), 1450-1454. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.118.6.1450>
- Vyas, S., Rodrigues, A. J., Silva, J. M., Tronche, F., Almeida, O. F., Sousa, N., & Sotiropoulos, I. (2016). Chronic stress and glucocorticoids: from neuronal plasticity to neurodegeneration. *Neural Plasticity*, 2016, e6391686. <https://doi.org/10.1155/2016/6391686>

- Watanabe, Y., Gould, E., & McEwen, B. S. (1992). Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Brain Research*, 588(2), 341-345. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)91597-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)91597-8)
- Wang, X., Xie, Y., Zhang, T., Bo, S., Bai, X., Liu, H., ... & Liu, D. (2016). Resveratrol reverses chronic restraint stress-induced depression-like behaviour: involvement of BDNF level, ERK phosphorylation and expression of Bcl-2 and Bax in rats. *Brain Research Bulletin*, 125, 134-143. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.06.014>
- Willner, P., Towell, A., Sampson, D., Sophokleous, S., & Muscat, R. (1987). Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology*, 93(3), 358-364. <https://doi.org/10.1007/BF00187257>
- Willner, P. (2017). Reliability of the chronic mild stress model of depression: a user survey. *Neurobiology of Stress*, 6, 68-77. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2016.08.001>
- Xi, G., Hui, J., Zhang, Z., Liu, S., Zhang, X., Teng, G., ... & Li, L. (2011). Learning and memory alterations are associated with hippocampal N-acetylaspartate in a rat model of depression as measured by 1 H-MRS. *PloS One*, 6(12), e28686. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028686>
- Zhu, S., Shi, R., Wang, J., Wang, J. F., & Li, X. M. (2014). Unpredictable chronic mild stress not chronic restraint stress induces depressive behaviours in mice. *Neuroreport*, 25(14), 1151-1155. <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000000243>
- Zhu, Y., Klomparens, E. A., Guo, S., & Geng, X. (2019). Neuroinflammation caused by mental stress: the effect of chronic restraint stress and acute repeated social defeat stress in mice. *Neurological Research*, 41(8), 762-769. <https://doi.org/10.1080/01616412.2019.1615670>

Anexos

Anexo: Parecer de aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA).

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

Campus de Ribeirão Preto

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **"Efeito da duração do estresse crônico por contenção no desempenho de ratos em uma tarefa de aprendizagem espacial"**, registrada sob nº 19.1.437.59.0, sob a responsabilidade de **Andréia Schmidt e Vitor Pansarim**, que envolve a manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

A proposta foi aprovada na reunião de 01/10/2019, o relatório final aprovado *ad referendum* em 01/02/2021.

Finalidade	Pesquisa
Vigência do Projeto	01/11/2019 a 30/06/2020
Espécie/linhagem	<i>ratos Sprague Dawley</i>
Nº de animais	+16 ratos (total utilizado: 64)
Idade/peso	150-250g
Sexo	ambos
Origem	Biotério Central USP Ribeirão Preto

Ribeirão Preto, 01 de fevereiro de 2021.

Prof. Dra. Patrícia Ferreira Monticelli
 Coordenadora da CEUA-FFCLRP/USP