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: Profª. Drª. 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, Profª. Drª. **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 Profª Drª **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.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sequência dos procedimentos experimentais para cada protocolo de intervenção. 28

Figura 2. Médias e desvios padrão da porcentagem de ganho de peso parcial (painel A) e total (painel B) para os grupos machos CRS 11 dias (n = 10), machos controle 11 dias (n = 10), machos CRS 22 dias (n = 9), machos controle 22 dias (n = 10), fêmeas CRS 11 dias (n = 10) e fêmeas controle 11 dias (n = 10), fêmeas CRS 22 dias (n = 10) e fêmeas controle 22 dias (n = 10). ***: p < .001; ** p < .01. 34

Figura 3. Médias e desvios padrão do consumo de água e de sacarose nos SPT do dia 0, dia 11 e dia 22 de intervenção, para os grupos machos CRS 22 dias (n = 9), machos controle 22 dias (n = 10), fêmeas CRS 22 dias (n = 10) e fêmeas controle 22 dias (n = 10) (painel A) e nos SPT do dia 0 e dia 11 para os grupos machos CRS 11 dias (n = 9), machos controle 11 dias (n = 10), fêmeas CRS 11 dias (n = 9) e fêmeas controle 11 dias (n = 9) (Painel B). 37

Figura 4. Preferência pelo consumo de solução de sacarose nos SPT do dia 0, do dia 11 e do dia 22 de intervenção para os grupos machos CRS 22 dias (n = 9), machos controle 22 dias (n = 10), fêmeas CRS 22 dias (n = 10) e fêmeas controle 22 dias (n = 10) (painel A) e nos SPT do dia 0 e do dia 11 para os grupos machos CRS 11 dias (n = 9), machos controle 11 dias (n = 10), fêmeas CRS 11 dias (n = 9) e fêmeas controle 11 dias (n = 9) (Painel B). A linha horizontal separa valores maiores e menores que 60%. 39

Figura 5. Médias e desvios padrão do consumo de ração nos SPT do dia 0, do dia 11 e do dia 22 de intervenção para os grupos machos CRS 22 dias (n = 9), machos controle 22 dias (n = 10), fêmeas CRS 22 dias (n = 10) e fêmeas controle 22 dias (n = 10) (painel A) e nos SPT do dia 0 e do dia 11 para os grupos machos CRS 11 dias (n = 10), machos controle 11 dias (n = 10), fêmeas CRS 11 dias (n = 10) e fêmeas controle 11 dias (n = 10) (Painel B). 40

Figura 6. Médias e desvios padrão da permanência nos braços abertos (painel A) e frequência de entradas nos braços abertos e fechados (painel B) no EPM dos grupos machos CRS 11 dias (n = 10), machos controle 11 dias (n = 10), machos CRS 22 dias (n = 9), machos controle 22 dias (n = 9), fêmeas CRS 11 dias (n = 9), fêmeas controle 11 dias (n = 10), fêmeas CRS 22 dias (n = 10) e fêmeas controle 22 dias (n = 10). **: p < .01). 42

Figura 7. Médias e desvios padrão da frequência absoluta de comportamentos complementares no EPM dos grupos machos CRS 11 dias (n = 10), machos controle 11 dias (n = 10), machos CRS 22 dias (n = 9), machos controle 22 dias (n = 9), fêmeas CRS 11 dias (n = 9), fêmeas controle 11 dias (n = 10), fêmeas CRS 22 dias (n = 10) e fêmeas controle 22 dias (n = 10). **: p < .05; *: p < .01. 44

Figura 8. Média e desvios padrão da latência de escape (painel A), da distância percorrida (painel B) e da velocidade média (painel C) nos oito conjuntos de três tentativas da aquisição no MWM (quatro conjuntos em cada sessão) para os grupos machos CRS 11 dias (n = 10), machos controle 11 dias (n = 7), machos CRS 22 dias (n = 9), machos controle

22 dias (n = 9), fêmeas CRS 11 dias (n = 8), fêmeas controle 11 dias (n = 9), fêmeas CRS 22 dias (n = 10) e fêmeas controle 22 dias (n = 9). 46

Figura 9. Média e desvios padrão da porcentagem de entradas e de permanência no quadrante 1 em relação aos demais quadrantes (painel A), da frequência de trocas entre quadrantes e da velocidade média (painel B) durante a *Probe Trial* no MWM para os grupos machos CRS 11 dias (n = 10), machos controle 11 dias (n = 7), machos CRS 22 dias (n = 9), machos controle 22 dias (n = 9), fêmeas CRS 11 dias (n = 8), fêmeas controle 11 dias (n = 9), fêmeas CRS 22 dias (n = 10) e fêmeas controle 22 dias (n = 9). 49

SUMÁRIO

Introdução 14

Método 25

Sujeitos 25

Local 26

Equipamentos 27

Procedimentos 28

Monitoramento do peso e do ciclo estral. 28

Estresse crônico por contenção (CRS). 29

Teste de preferência por sacarose (SPT). 29

Teste no labirinto em cruz elevado (EPM). 30

Teste no labirinto aquático de Morris (MWM). 30

Análise de Dados 31

Resultados 34

Ganho de Peso e Ciclo Estral 34

Teste de Preferência por Sacarose (SPT) 36

Labirinto em Cruz Elevado (EPM) 41

Labirinto Aquático de Morris (MWM) 45

Discussão 51

Conclusão 60

Referências 61

Anexos 68

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) (Tisigos & Chrousos, 2002). A ação do sistema simpático é mediada pela ativação da amigdala 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 amigdala 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 amigdala, 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 (S*ucrose 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 el 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 anedonicos. 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 & Chattarii; 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 (Mograbi, 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 amigdala, 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 amigdala basolateral, ampliando a atividade neuronal nesta estrutura (McEwen et al., 2015; Qiao et al, 2016; Vyas, Mitra, Rao & Chattarii, 2002; Vyas, Pillai & Chattarii, 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 modelo 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, Pandy, 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;

Método

Sujeitos

Foram utilizados 80 ratos *Sprague-Dawley* (*Rattus norvegicus*), 40 machos e 40 fêmeas, todos provenientes do Biotério Central da USP-Ribeirão Preto. Os sujeitos foram recepcionados no Laboratório de Nutrição e Comportamento com sete semanas de idade (machos pesando cerca de 280g e fêmeas pesando cerca de 200g), sendo imediatamente divididos de acordo com o sexo, com o tipo de intervenção a qual seriam expostos (estresse crônico por contenção – CRS ou controle) e com a duração desta intervenção (22 dias ou 11 dias). Desta forma, foram formados, por sorteio, oito grupos (n=10 em cada grupo): machos CRS 11 dias; machos controle 11 dias; fêmeas CRS 11 dias; fêmeas controle 11 dias; machos CRS 22 dias; machos controle 22 dias; fêmeas CRS 22 dias; fêmeas controle 22 dias.

No momento da recepção, os animais que seriam expostos ao CRS e os animais controle foram alocados para biotérios separados no Laboratório de Nutrição e Comportamento, nos quais permaneceram alojados até o fim do experimento em gaiolas de polietileno (41cm X 34 cm; dois ratos do mesmo sexo e grupo em cada gaiola) forradas com maravalha (trocada duas vezes por semana). Os biotérios eram climatizados (de 20 a 24ºC), com 12h de ciclo claro/escuro (luzes acesas das 6:00 às 18:00) e exaustão de 4200m³/h. Os animais tiveram livre acesso a água e alimentação (ração comercial comum para roedores). Todos os animais aparentaram estar saudáveis durante todo o período da pesquisa, com exceção de um animal do grupo macho CRS 22 dias, que apresentou distúrbios motores durante o experimento, sendo excluído do experimento e da análise de dados.

Ao atingirem onze semanas de idade (machos pesando cerca de 500g e fêmeas pesando cerca de 275g), iniciou-se a exposição dos sujeitos às intervenções CRS e

controle, com duração de 11 ou 22 dias. Todos os sujeitos foram privados de água e comida durante os períodos de intervenção (6h/dia), uma vez que o acesso à água e à comida já era impossibilitado pelo procedimento de CRS. Os sujeitos começaram a manipulados diariamente onze dias antes do início das intervenções até o fim do experimento para o monitoramento do peso corporal. Além disso, o procedimento de esfregaço vaginal for realizado diariamente (juntamente com a pesagem) nas fêmeas para o monitoramento do ciclo estral.

Os sujeitos foram submetidos ao procedimento de eutanásia imediatamente após o último procedimento experimental. A eutanásia foi realizada por sobredose anestésica pela administração da associação de Xilazina 4% (30mg/kg) e de Cloridrato de Cetamina 10% (225mg/kg) por via intraperitoneal. Os parâmetros utilizados para confirmar a morte dos animais foram: parada cardiorrespiratória, ausência de reflexo pupilar, insensibilidade cutânea por período de 15 minutos e temperatura corporal abaixo de 26°C. Logo em seguida, os animais foram decapitados para a dissecação de áreas do encéfalo (hipocampo dorsal e hipocampo ventral). Após a dissecação, os animais foram levados ao Biotério Central da Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto. O estudo foi realizado de acordo com as resoluções brasileiras de bioética em experimentos com animais e mediante análise e aprovação do CEUA da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (protocolo nº 2019.1.437.59.0; Anexo).

Local

Todos os procedimentos experimentais foram realizados em salas do Laboratório de Nutrição e Comportamento adjacentes aos biotérios nos quais os animais se encontravam alojados. O procedimento de eutanásia foi realizado nas dependências do Laboratório de Neurofisiologia da Dor e do Comportamento.

Equipamentos

Foram utilizados tubos de contenção (contensor em acrílico cristal para ratos – *Insight Equipamentos Ltda*.) foram utilizados para a exposição dos sujeitos ao CRS. Os tubos tinham 63mm de altura, 65mm de largura e 232mm de comprimento, com frente e traseira removíveis e com sistema de travamento através de manípulos. A traseira também poderia ser ajustada ao longo do comprimento do tubo para adaptação ao tamanho de cada sujeito. Os tubos também possuíam 12 furos laterais de 11,5mm para a circulação de ar e pés de silicone antiderrapantes.

Um labirinto aquático de Morris (MWM) foi utilizado para o procedimento de aprendizagem espacial. O mesmo consiste em um tanque circular de fibra de vidro (150cm de diâmetro e 40cm de altura) e de uma plataforma de aço inoxidável (15cm² de área e 28,5cm de altura). O tanque foi preenchido com água, ultrapassando 2cm da altura da plataforma. O fundo do tanque era pintado de preto, impedindo a visualização da plataforma. Sobre o labirinto, havia uma câmera de vídeo conectada a um computador em uma sala adjacente. O software *EthoVision* foi utilizado para o registro automático do desempenho dos sujeitos a partir das gravações realizadas durante o procedimento.

Um labirinto em cruz elevado (EPM) foi utilizado para a avaliação de comportamentos associados à ansiedade e exploração. O mesmo consiste em um labirinto de madeira com dois braços fechados (50cm de comprimento, 10cm de largura e 40cm de altura cada) e dois braços abertos (50cm de comprimento e 10cm de largura). Os braços abertos e fechados tinham teto aberto e eram perpendiculares entre si, elevados a 50cm do solo. Sobre o labirinto, havia uma câmera de vídeo conectada a um

computador em uma sala adjacente. O registro dos comportamentos foi realizado manualmente pelo experimentador a partir dos vídeos gravados durante o procedimento.

Procedimentos

O experimento foi dividido em dois protocolos de intervenção de acordo com sua duração: intervenção de 11 dias (CRS ou Controle) ou intervenção de 22 dias (CRS ou controle). Na intervenção de 11 dias, os sujeitos foram submetidos ao SPT nos dias 0 e 11 de intervenção, ao procedimento no EPM no dia 12 (dia seguinte ao término da intervenção), ao procedimento no MWM nos dias 12 (imediatamente após o EPM) e 13 e ao procedimento de eutanásia imediatamente após a segunda sessão no MWM, no dia 13. Na intervenção de 22 dias, os sujeitos foram submetidos ao SPT nos dias 0, 11 e 22 de intervenção, ao procedimento no EPM no dia 23 (dia seguinte ao término da intervenção), ao procedimento no MWM nos dias 23 (imediatamente após o EPM) e 24 e ao procedimento de eutanásia imediatamente após a segunda sessão no MWM no dia 24. A Figura 1 apresenta a ordem dos procedimentos para cada protocolo de intervenção.

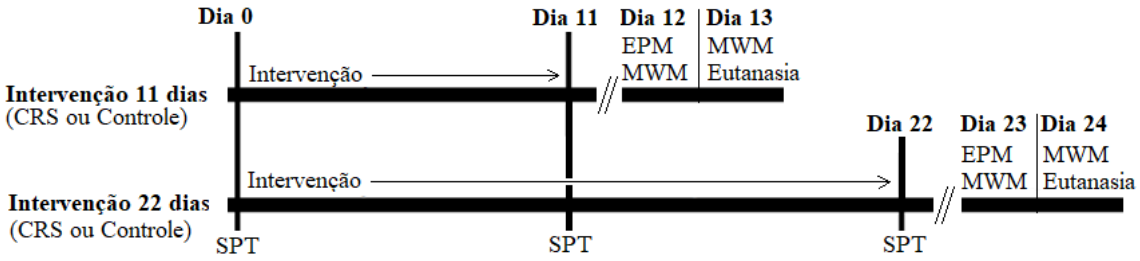

Figura 1. Sequência dos procedimentos experimentais para cada protocolo de intervenção. CRS: estresse crônico por contenção; SPT: testes de preferência por solução de sacarose; EPM: labirinto em cruz elevado; MWM: labirinto aquático de Morris.

Monitoramento do peso e do ciclo estral.

O peso de todos os sujeitos e o ciclo estral das fêmeas foi monitorado diariamente (entre 08:00 e 10:00) durante todo o experimento. Os sujeitos eram

posicionados em uma balança digital (0,01g de precisão) para a determinação do peso. A secreção vaginal das fêmeas era coletada utilizando-se uma alça de inoculação previamente esterilizada e mergulhada em água e, em seguida, inserida cuidadosamente na vagina, retirando fluído contendo células. O fluido era espalhado em uma lâmina, a qual passava pelo procedimento de coragem em corante para uso hematológico (Panótipo Rápido; *Laborclin*). Após coradas, as lâminas foram analisadas em um microscópio com luz, nas lentes 10 e 40x. Alterações na aparência citológica foram avaliadas, baseando-se no estudo de McLean, Valenzuaela, Fai e Bennett (2012), para definir as fases do ciclo estral: Proestro, Estro, Metaestro e Diestro.

Estresse crônico por contenção (CRS).

A intervenção CRS consistiu em colocar o sujeito cuidadosamente no tubo de contenção, de forma que ficasse firmemente contido e com possibilidade de movimentação limitada por um período de 6h/dia, ocorrendo sempre das 10:00 às 16:00. A contenção era realizada em gaiolas individuais. Durante este período, todos os sujeitos (expostos à intervenção CRS ou controle) ficavam sem acesso a água e comida.

Teste de preferência por sacarose (SPT).

O SPT avaliava a preferência dos animais por solução de sacarose (a diminuição dessa preferência é relacionada à anedonia, resposta associada à depressão). Para o SPT, os sujeitos ficavam durante 6h em privação de água e alimento (mesmo período da intervenção – das 10:00 às 16:00), separados em gaiolas individuais. Em seguida, dois bebedouros eram acoplados às gaiolas: um contendo apenas água e outro contendo solução de 1% de sacarose (sacarose preparada em farmácia de manipulação). Os animais tinham acesso livre aos bebedouros por um período de 16h (das 16:00 às 08:00

h do dia seguinte), sendo que a posição dos bebedouros (esquerda e direita) era randomizada entre os sujeitos e mantida para o mesmo sujeito em todos os testes. Os bebedouros e a ração eram pesados antes e ao fim do teste para a determinação do consumo de cada líquido e de ração. Os sujeitos eram reagrupados nas gaiolas originais (mesmos sujeitos por gaiola) ao término do SPT.

Teste no labirinto em cruz elevado (EPM).

A avaliação de comportamentos associados à ansiedade e a exploração no EPM ocorreu no período da manhã (entre 08:00 e 10:00). Cada sujeito era colocado na posição central do labirinto e era permitido que o explorasse por um período de 5min, sendo registradas as frequências de entrada nos braços abertos e fechados e a duração da permanência nos braços abertos como medida de ansiedade e exploração. Além disto, baseado no estudo de Saito e Brandão (2015), foram registradas a frequência de comportamentos complementares: exploração na extremidade (entrada no 1/3 posterior dos braços abertos), mergulho de cabeça (projeção da cabeça e ombros para abaixo do nível do labirinto), rastejamento (locomover-se vagarosamente para frente enquanto com o corpo completamente esticado), esticamento (retornar a posição inicial após esticar completamente o corpo) e espreitamento (projeção da cabeça e ombros em direção ao centro ou aos braços abertos do labirinto). As frequências das respostas de rastejamento, esticamento e espreitamento foram agrupadas na mesma categoria de respostas de avaliação de risco.

Teste no labirinto aquático de Morris (MWM).

A avaliação da aprendizagem espacial no MWM ocorreu em duas sessões (dias consecutivos) no período entre 10:00 e 14:00 h. O labirinto era dividido em quatro

quadrantes imaginários (quadrantes 1, 2, 3 e 4). A plataforma era colocada sempre no 1º quadrante na mesma posição. Cada sujeito passou por 12 tentativas de aquisição em cada sessão. Em cada tentativas o sujeito era colocados em uma posição de largada em um dos quadrantes sem a presença da plataforma (quadrantes 2, 3 ou 4; definido randomicamente entre as tentativas e em igual proporção) com a parte posterior do corpo virada para o centro do labirinto, permitindo-se que nadasse pelo labirinto. Cada tentativa era encerrada caso o sujeito permanece-se sobre a plataforma por 1,5 s ou caso não encontrasse a plataforma em 60 s. O sujeito era mantido sobre a plataforma no intervalo entre tentativas por 30s e imediatamente antes do início da primeira tentativa da primeira sessão por 60s. Durante a aquisição, foram registradas a duração da tentativa (latência para encontrar a plataforma) e a velocidade média de locomoção em cada tentativa; posteriormente, foi calculada a média destas medidas para blocos de três tentativas (quatro conjuntos por sessão). A partir da velocidade e da latência, calculou-se a distância percorrida pelos sujeitos em blocos de três tentativas.

Imediatamente após o término da última tentativa da segunda sessão, foi realizada uma *probe trial* (PT), na qual a plataforma era removida, o sujeito era colocado na posição de largada do quadrante 3 e mantido no labirinto por 60s. Na PT, foi registrado automaticamente a velocidade média de locomoção, a frequência de entradas em cada quadrante e a duração da permanência em cada quadrante.

Análise de Dados

Os resultados obtidos foram expressos em termos da média e desvio padrão dos grupos. Dados com valores discrepantes (*outliers*) superiores ($x > Q_3 + 1.5 \times IQR$; Q_3: terceiro quartil; IQR: intervalo entre quartis) e inferiores ($x < Q_1 - 1.5 \times IQR$; Q_1: primeiro quartil) foram identificados e removidos da análise de dados, mantendo-se um

número mínimo de sete sujeitos por grupo nas análises ($7 \leq n \leq 10$). Dados com medições longitudinais do SPT foram analisados separadamente para os grupos que passaram pelas intervenções de 11 dias e para os grupos que passaram pelas intervenções de 22 dias, uma vez que o número de medições foi diferente para cada duração de intervenção. A análise do ganho de peso parcial, referente aos períodos do dia 0 a 11 e do dia 11 a 22, foram analisados somente nos grupos que passaram pelas intervenções de 22 dias. As análises do ganho de peso total e dos dados colhidos no EPM e no MWM foram realizadas com todos os grupos.

ANOVAs foram realizadas para verificar os seguintes efeitos: (1) interação entre intervenção, duração da intervenção e sexo (a) na porcentagem de ganho de peso total, (b) na porcentagem de permanência nos braços abertos do EPM, (c) na frequência de exploração da extremidade (d) de mergulhos de cabeça e (e) de respostas de avaliação de risco no EPM, (f) na porcentagem de permanência e (g) de entradas no quadrante 1 na PT do MWM, (h) na frequência de trocas entre quadrantes na PT do MWM e (i) na velocidade na PT do MWM; (2) interação entre intervenção, sexo, e período de intervenção na porcentagem de ganho de peso parcial; (3) interação entre intervenção, sexo e dia de SPT no consumo de ração; (4) interação entre intervenção, sexo, dia de SPT e líquido (sacarose ou água) no consumo de sacarose e água nos SPTs; (5) interação entre intervenção, duração da intervenção, sexo e braço do EPM (aberto ou fechado) na frequência de entradas nos braços do EPM; (6) interação entre intervenção, duração da intervenção, sexo, sessão do MWM e conjunto de três tentativas (a) na latência de escape, (b) na distância percorrida e (c) na velocidade no MWM.

Foi calculado o eta quadrado parcial (η_p^2) para a avaliação do tamanho do efeito, considerando-o como trivial ($\eta_p^2<.01$), como pequeno ($.01<\eta_p^2<.06$), moderado ($.06<\eta_p^2<.14$) e elevado ($\eta_p^2>.14$). Para comparações específicas, foi realizado o teste

Post-Hoc de Bonferroni. A composição do ciclo estral das fêmeas foi analisada por meio do teste Chi-quadrado (χ^2), comparando-se ausência de alguma fase do ciclo estral entre os grupos.

Em todas as análises, foram considerados efeitos e diferenças significativas quando $p<.05$ (intervalo de confiança de 95%). A ANOVA foi conduzida mediante verificação da normalidade (Shapiro-Wilk), homogeneidade (Levene's) e a efericidade (Mauchly's W) dos dados. Quando não era verificada a normalidade e/ou a homogeneidade, os dados eram transformados em função logarítmica de base 10 para a realização da ANOVA. Quando não era verificada a esfericidade, era aplicada a correção do valor de F de Greenhouse-Geisser. Todas as análises estatísticas (ANOVA, χ^2, Shapiro-Wink, Levene's e Mauchly's W) foram realizadas através do *Software JASP. 0.10.2.*

Resultados

Ganho de Peso e Ciclo Estral

A Figura 2 apresenta o ganho de peso dos sujeitos em relação ao peso inicial no dia 0, expresso em porcentagem, para os grupos expostos à intervenção de 22 dias, nos períodos do dia 0 ao 11 e do dia 11 ao 22. Além disto, é demostrado o ganho de peso relativo total de todos os grupos.

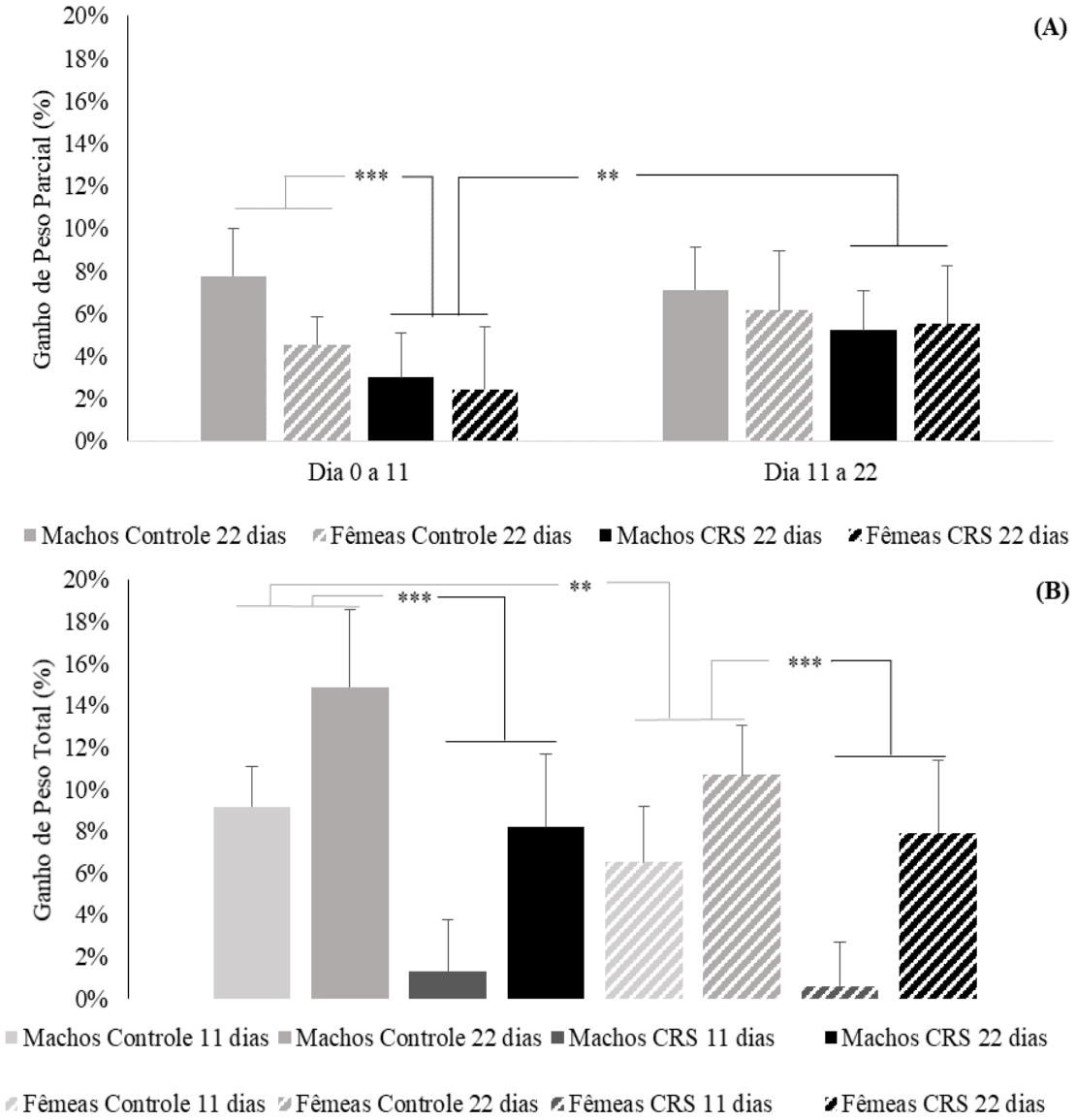

Figura 2. Médias e desvios padrão da porcentagem de ganho de peso parcial (painel A) e total (painel B) para os grupos machos CRS 11 dias (n = 10), machos controle 11 dias (n = 10), machos CRS 22 dias (n = 9), machos controle 22 dias (n = 10), fêmeas CRS 11 dias (n = 10) e fêmeas controle 11 dias (n = 10), fêmeas CRS 22 dias (n = 10) e fêmeas controle 22 dias (n = 10). ***: $p < .001$; ** $p < .01$.

No painel A da Figura 2, observa-se que os grupos expostos ao CRS, de modo geral, tiveram uma porcentagem de ganho de peso menor em comparação aos grupos controle, sendo esta diferença mais expressiva no período inicial da intervenção (dia 0 a 11) do que no período final (dia 11 a 22), quando os grupos expostos ao CRS apresentaram porcentagem de ganho de peso próxima ao dos grupos controle. Neste sentido, foi verificado um efeito elevado principal do período (dia 0 a 11 ou dia 11 a 22) ($F(1, 35) = 8.824$; $p = .005$; $\eta^2_p = .201$) e da intervenção (controle ou CRS) ($F(1, 35) = 20.165$; $p < .001$; $\eta^2_p = .366$). Uma tendência à efeito moderado foi verificada na interação entre período e intervenção ($F(1, 35) = 4.054$; $p = .052$; $\eta^2_p = .104$), encontrando-se diferenças específicas significativas para a porcentagem de ganho de peso dos grupos expostos ao CRS no período do dia 0 a 11 em comparação ao período do dia 11 a 22 ($p = .008$) e em relação aos grupos controle nos períodos do dia 0 a 11 ($p < .001$) e do dia 11 a 22 ($p < .001$).

Além disto, as fêmeas (CRS e controle) tiveram uma porcentagem de ganho de peso menor que os machos controle no período do dia 0 a 11, entretanto, sem diferenças expressivas em relação aos machos CRS no mesmo período. Foi verificado um efeito elevado principal do sexo (machos ou fêmeas) ($F(1, 35) = 4.465$; $p = .042$; $\eta^2_p = .201$), entretanto, não foram verificados efeitos da interação entre sexo e tipo de intervenção ($F(1, 35) = 3.490$; $p = .070$), e da interação entre sexo, intervenção e período ($F(1, 35) = .421$; $p = .521$).

Observa-se no painel B da Figura 2 que ambas as durações de CRS (11 e 22 dias) aparentaram provocar uma queda semelhante na porcentagem de ganho de peso total. Esta diferença também é semelhante em relação à menor porcentagem de ganho para os grupos expostos ao CRS de 22 dias no período do dia 0 a 11 (painel A, Figura 2). Em relação à porcentagem de ganho de peso total, foram verificados efeitos elevados

principais da intervenção ($F(1, 71) = 82.954$; $p < .001$; $\eta^2_p = .539$) e da duração da intervenção (11 dias ou 22 dias) ($F(1, 71) = 89.290$; $p < .001$; $\eta^2_p = .557$). Além disto, observa-se que fêmeas controle tiveram uma porcentagem de ganho de peso total menor que machos controle e que a exposição ao CRS parece ter eliminado as diferenças entre machos e fêmeas. Neste sentido, foi verificado um efeito moderado da interação entre sexo e intervenção ($F(1, 71) = 5.255$; $p = .025$; $\eta^2_p = .069$), sendo verificadas diferenças específicas entre fêmeas e machos controle ($p = .002$), entre fêmeas CRS e controle ($p < .001$) e entre machos CRS e controle ($p < .001$), mas não entre fêmeas e machos CRS ($p = 1.000$).

O ciclo estral das fêmeas teve duração de aproximada 4 dias, sendo o diestro a fase mais presente (cerca de 2 dias de duração) e o metaestro a fase menos observada (menos de 1 dia de duração). Na maioria das fêmeas, o estro e o proestro tiveram cerca de 1 dia de duração cada. Três fêmeas do grupo CRS 22 dias, duas fêmeas do grupo CRS 11 dias e uma fêmea do grupo controle 11 dias apresentaram um ciclo com diestro prolongado (cerca de 3 dias de duração) e sem proestro ao final dos primeiros 11 dias de intervenção. Todas as fêmeas apresentaram uma composição de ciclo normal ao final dos últimos 11 dias de intervenção. Desta forma, uma quantidade maior de fêmeas expostas ao CRS (5 das 20 fêmeas CRS; 25%) deixaram de apresentar proestro, em comparação às fêmeas controle (1 das 20 fêmeas controle; 5%) nos primeiros 11 dias de intervenção.Entretanto, não foi verificada uma diferença significativa entre intervenções controle e CRS ($\chi^2(1) = 3.136$; $p = .077$).

Teste de Preferência por Sacarose (SPT)

O consumo de sacarose e de água nos SPT para os grupos expostos à intervenção de 22 dias e de 11 dias é apresentada na Figura 3.

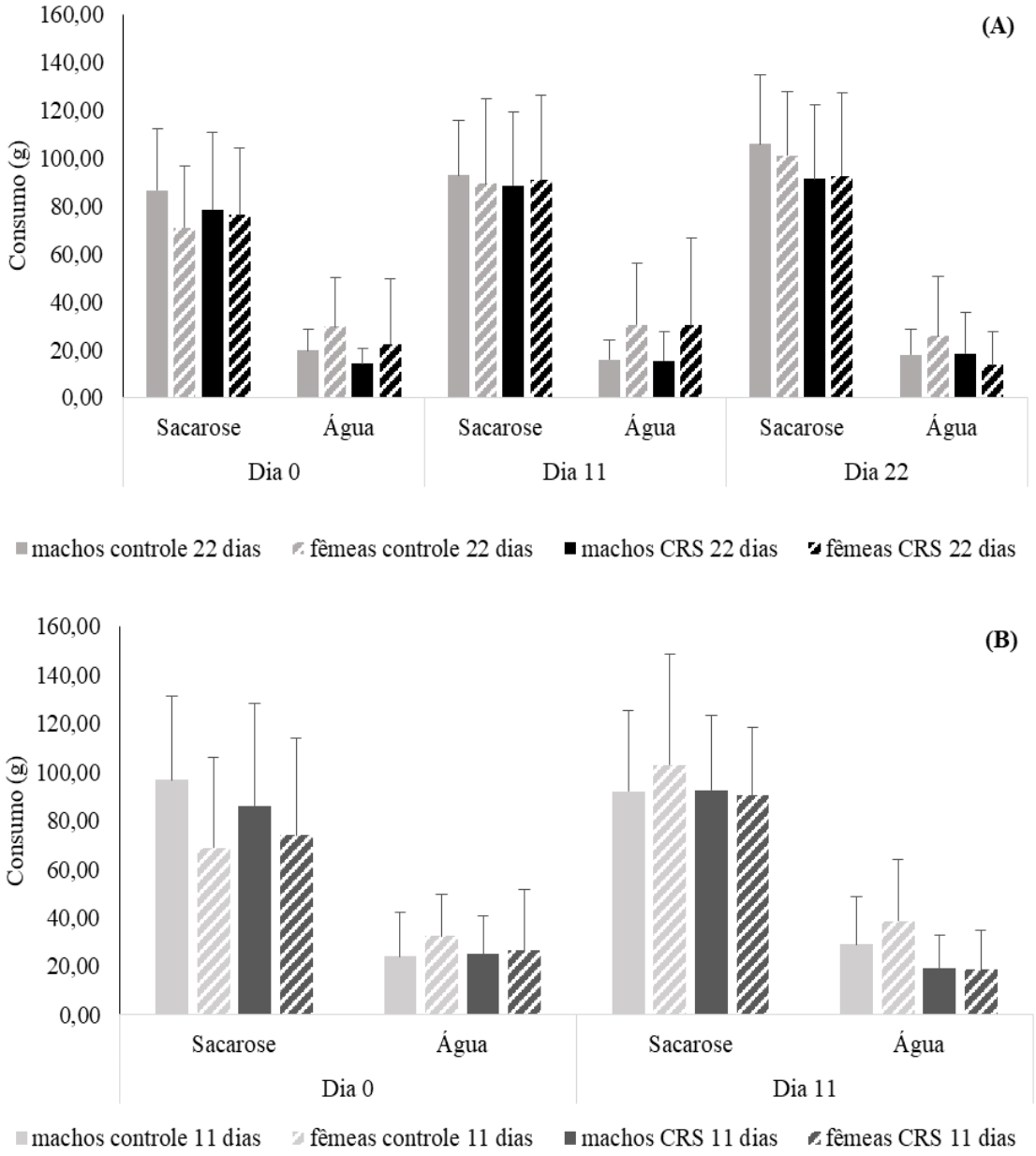

Figura 3. Médias e desvios padrão do consumo de água e de sacarose nos SPT do dia 0, dia 11 e dia 22 de intervenção, para os grupos machos CRS 22 dias (n = 9), machos controle 22 dias (n = 10), fêmeas CRS 22 dias (n = 10) e fêmeas controle 22 dias (n = 10) (painel A) e nos SPT do dia 0 e dia 11 para os grupos machos CRS 11 dias (n = 9), machos controle 11 dias (n = 10), fêmeas CRS 11 dias (n = 9) e fêmeas controle 11 dias (n = 9) (Painel B).

Observa-se na Figura 3 que o consumo de sacarose dos sujeitos expostos a ambas as durações de intervenção (11 e 22 dias) permaneceu maior que o consumo de água em todos os testes, para ambos os sexos e para os grupos controle e CRS. Em relação aos sujeitos expostos às intervenções de 22 dias (painel A), não foi verificado efeito da interação entre líquido (sacarose ou água), dia de SPT, sexo e intervenção ($F(2, 70) = .255$; $p = .776$; $\eta^2_p = .007$). Apesar disto, foi verificado um efeito elevado da

interação entre os fatores líquido e dia de teste ($F(2, 70) = 6.205$; $p = .003$; $\eta^2_p = .151$). Diferenças específicas significativas entre água e sacarose foram verificadas em todos os dias de teste e entre os dias de teste ($p < .001$ para todas as comparações), entretanto, não foram verificadas diferenças específicas entre os dias de teste para o consumo de água ($p > .10$ em todas as comparações) e para o consumo de sacarose ($p > .05$). Além disto, foi verificado um efeito elevado principal do líquido ($F(1, 70) = 242.344$; $p < .001$; $\eta^2_p = .874$).

Em relação aos grupos expostos à intervenção de 11 dias (Figura 3, painel B), também foi verificado um efeito elevado principal do líquido (sacarose ou água) ($F(1, 33) = 122.757$; $p < .001$; $\eta^2_p = .788$). Além disto, foi verificado um efeito moderado da interação entre dias de SPT e intervenção ($F(1, 33) = 4.842$; $p = .035$; $\eta^2_p = .128$), entretanto, sem diferenças significativas específicas ($p > .05$ em todas as comparações).

A Figura 4 apresenta o consumo relativo de sacarose em comparação ao consumo total de líquidos (preferência por sacarose), expresso em porcentagem, de cada sujeito dos grupos expostos às intervenções de 22 dias e de 11 dias e em cada dia de SPT.

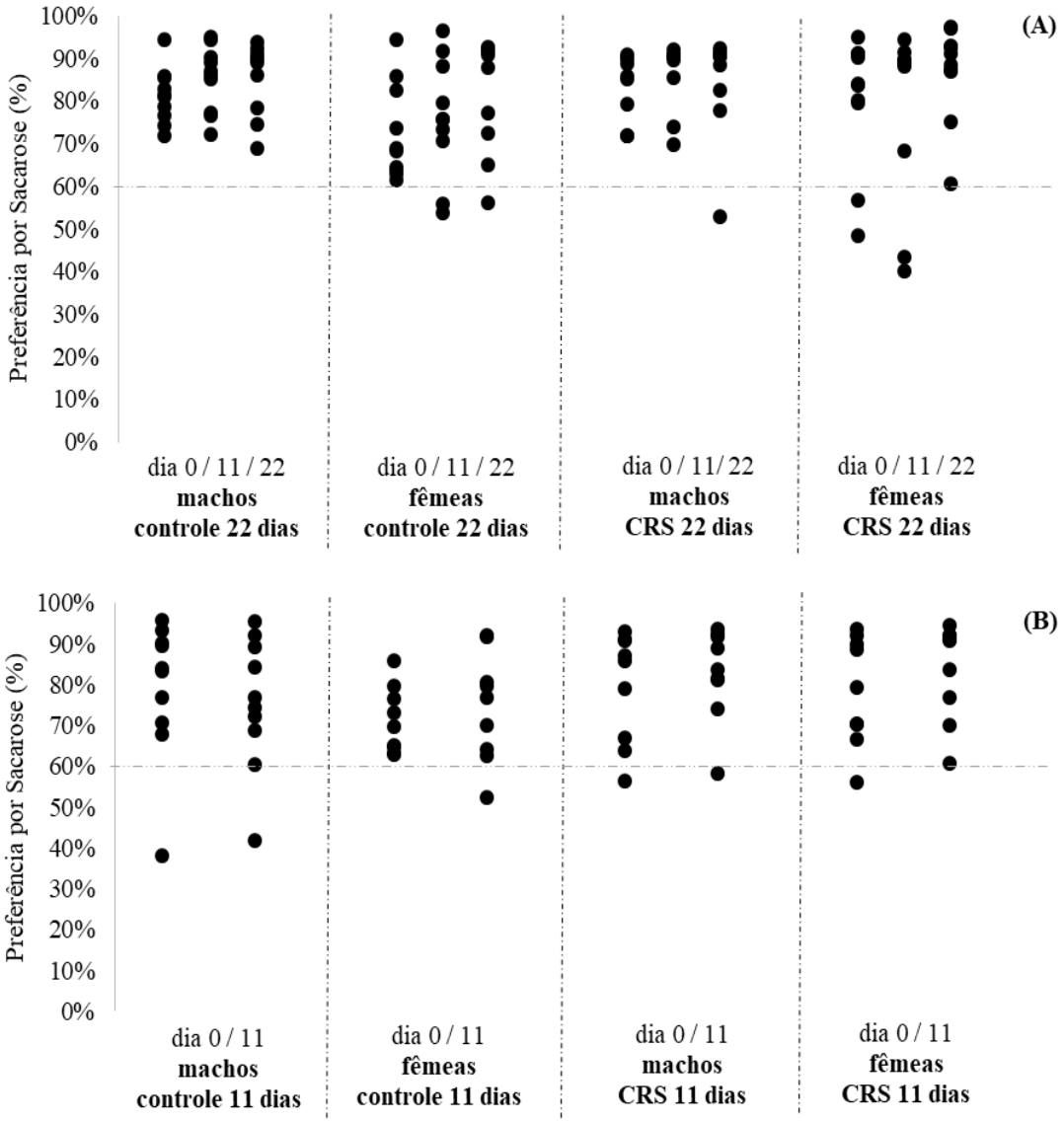

Figura 4. Preferência pelo consumo de solução de sacarose nos SPT do dia 0, do dia 11 e do dia 22 de intervenção para os grupos machos CRS 22 dias (n = 9), machos controle 22 dias (n = 10), fêmeas CRS 22 dias (n = 10) e fêmeas controle 22 dias (n = 10) (painel A) e nos SPT do dia 0 e do dia 11 para os grupos machos CRS 11 dias (n = 9), machos controle 11 dias (n = 10), fêmeas CRS 11 dias (n = 9) e fêmeas controle 11 dias (n = 9) (Painel B). A linha horizontal separa valores maiores e menores que 60%.

Observa-se no Figura 4 (painéis A e B) que a preferência por solução de sacarose se manteve acima de 60% para a maioria dos sujeitos ao longo dos testes. Apenas onze sujeitos apresentaram preferência abaixo de 60% em pelo menos um dos dias de teste, sendo um do grupo machos CRS 22 dias (dia 22 de SPT), três do grupo fêmeas CRS 22 dias (uma no dia 0, outra no dia 0 e 11 e outra apenas no dia 11 de SPT), três do grupo fêmeas controle 22 dias (duas no dia 11 e uma no dia 22 de SPT),

dois do grupo machos CRS 11 dias (um no dia 0 e outro no dia 11 de SPT), uma do grupo fêmeas CRS 11 dias (dia 0 de SPT) e uma do grupo fêmeas controle 11 dias (dia 11 de SPT).

A Figura 5 apresenta o consumo de ração nos dias 0, 11 e 22 de SPT para os grupos expostos às intervenções de 22 dias (painel A) e nos dias 0 e 11 de SPT para os grupos expostos às intervenções de 11 dias (painel B).

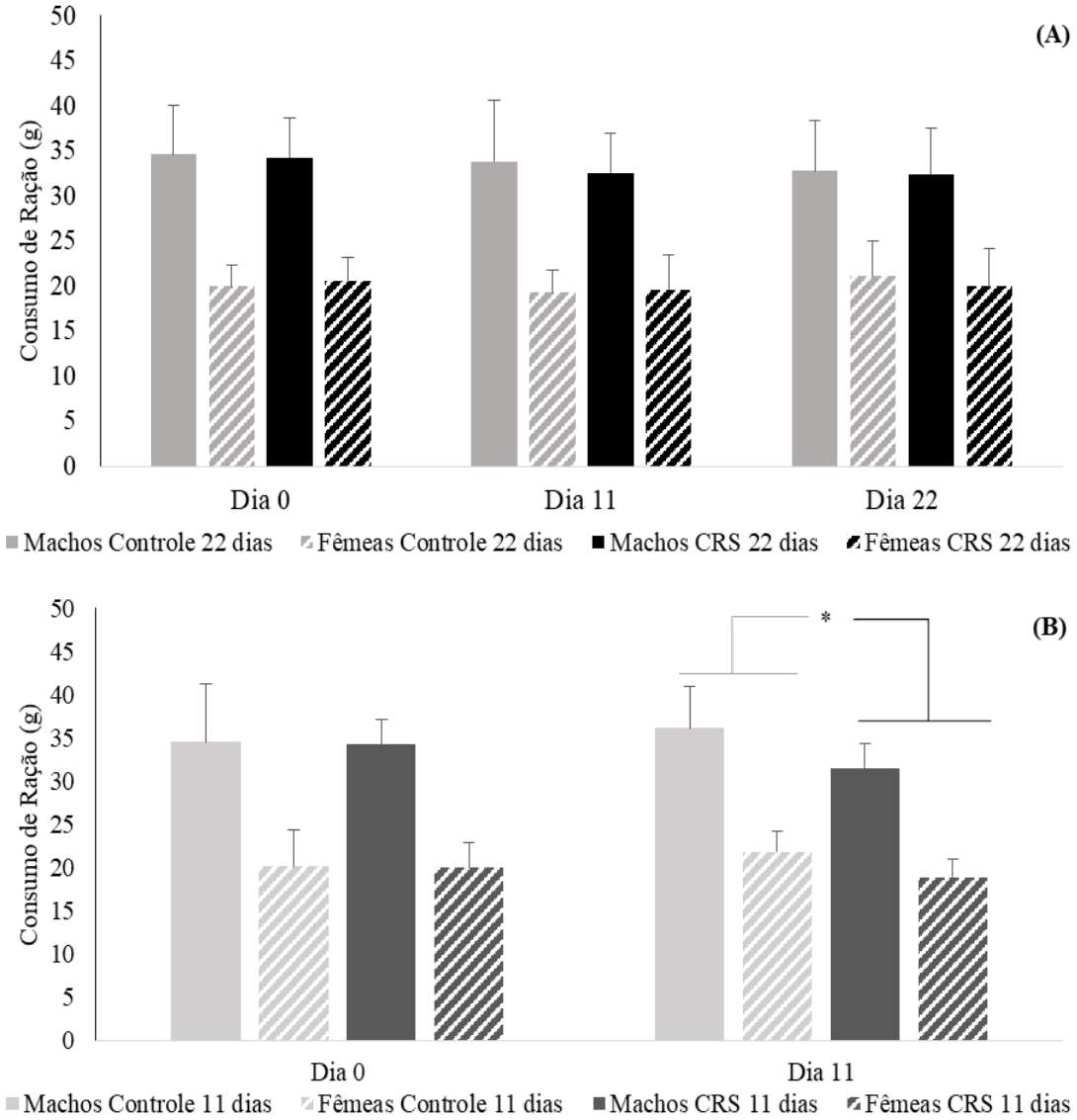

Figura 5. Médias e desvios padrão do consumo de ração nos SPT do dia 0, do dia 11 e do dia 22 de intervenção para os grupos machos CRS 22 dias (n = 9), machos controle 22 dias (n = 10), fêmeas CRS 22 dias (n = 10) e fêmeas controle 22 dias (n = 10) (painel A) e nos SPT do dia 0 e do dia 11 para os grupos machos CRS 11 dias (n = 10), machos controle 11 dias (n = 10), fêmeas CRS 11 dias (n = 10) e fêmeas controle 11 dias (n = 10) (Painel B).

Observa-se na Figura 5 (painéis A e B) que a diferença mais expressiva encontrada entre os grupos foi o consumo de ração maior para os machos em relação às fêmeas, de modo geral. Além disso, o consumo de ração aparentemente foi menor no dia 11 de SPT para machos e fêmeas expostos ao CRS de 11 dias (painel B). Neste sentido, não foi verificado efeito da interação entre dia de SPT, sexo e intervenção para grupos com intervenção de 22 dias ($F(2, 70) = .658$; $p = .521$) e para grupos com intervenção de 11 dias ($F(1, 36) = .019$; $p = .891$), sendo verificado um efeito elevado principal do sexo, tanto para grupos com intervenção de 22 dias ($F(1, 35) = 6.205$; $p < .001$; $\eta^2_p = .771$), como para grupos com intervenção de 11 dias ($F(1, 36) = 201.317$; $p < .001$; $\eta^2_p = .848$). Além disto, foi verificado um efeito elevado da interação entre os fatores dia de teste e intervenção somente para os grupos com intervenção de 11 dias ($F(1, 36) = 9.642$; $p = .004$; $\eta^2_p = .211$), verificando-se diferença específica significativa entre grupos controle e CRS no dia 11 de SPT ($p = .015$).

Labirinto em Cruz Elevado (EPM)

A Figura 6 apresenta a porcentagem média de tempo de permanência dos grupos nos braços abertos e a frequência de entradas nos braços abertos e fechados do EPM.

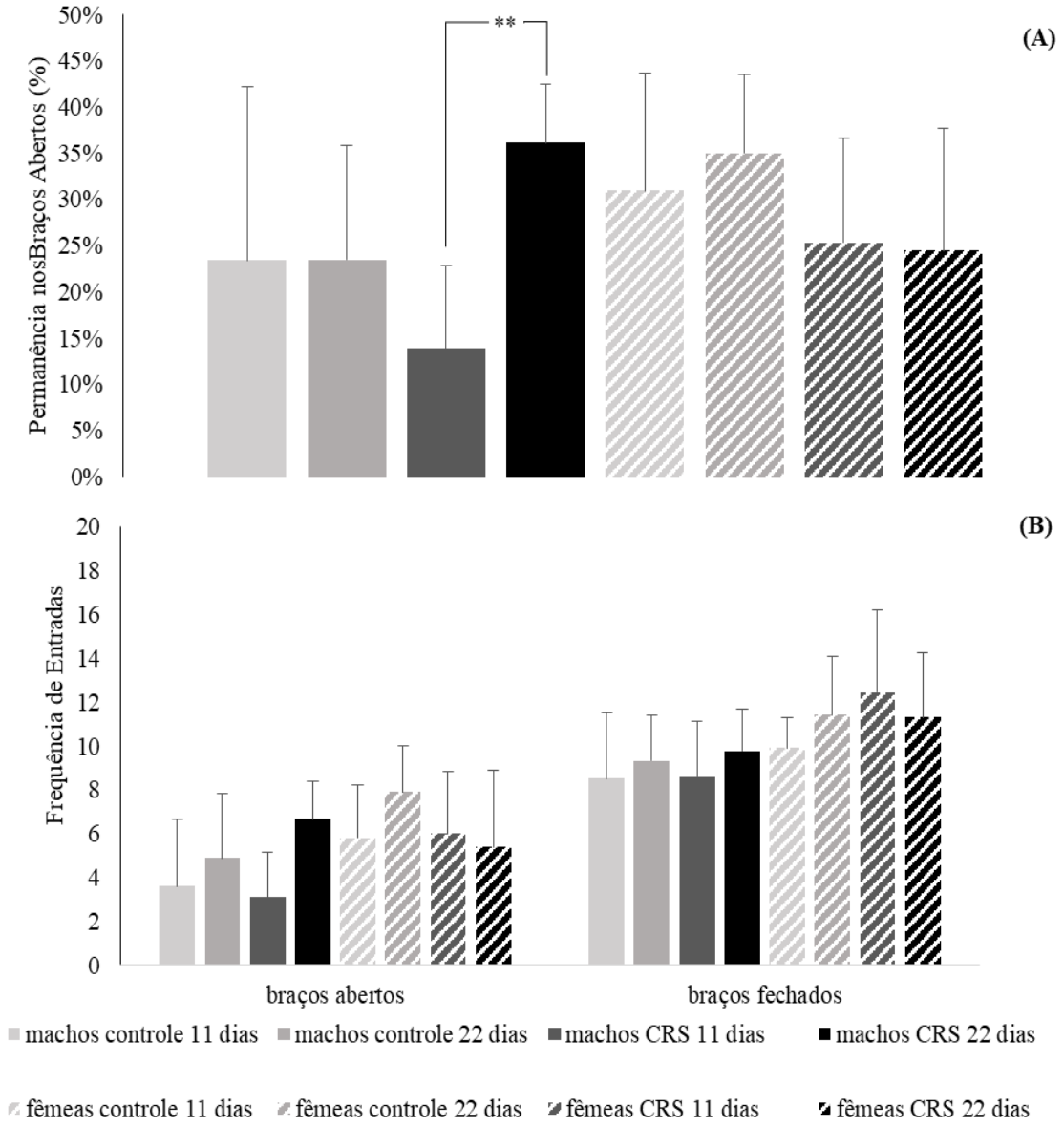

Figura 6. Médias e desvios padrão da permanência nos braços abertos (painel A) e frequência de entradas nos braços abertos e fechados (painel B) no EPM dos grupos machos CRS 11 dias (n = 10), machos controle 11 dias (n = 10), machos CRS 22 dias (n = 9), machos controle 22 dias (n = 9), fêmeas CRS 11 dias (n = 9), fêmeas controle 11 dias (n = 10), fêmeas CRS 22 dias (n = 10) e fêmeas controle 22 dias (n = 10). **: $p < .01$).

Observa-se no painel A da Figura 6 que a permanência nos braços abertos foi semelhante entre os grupos de machos controle (11 e 22 dias). Entretanto, machos expostos ao CRS de 11 dias permaneceram menos tempo nos braços abertos em comparação aos machos controle de 11 dias, enquanto machos expostos ao CRS de 22 dias permaneceram mais tempo nos braços abertos em comparação aos machos controle de 22 dias. Por outro lado, as fêmeas expostas ao CRS (11 e 22 dias) permaneceram

menos tempo nos braços abertos que as fêmeas controle (11 e 22 dias). Essa diferença, no entanto, foi aparentemente pequena. Verificou-se um efeito moderado principal da duração da intervenção ($F(1, 69) = 5.218$; $p = .025$; $\eta^2_p = .070$) e um efeito moderado da interação entre sexo, intervenção e duração da intervenção ($F(1, 69) = 5.886$; $p = .018$; $\eta^2_p = .079$). Diferenças significativas específicas foram verificadas somente entre machos expostos ao CRS de 11 dias e machos expostos ao CRS de 22 dias ($p = .005$).

Em relação à frequência de entradas (painel B da Figura 6), a frequência de entradas nos braços abertos foi menor que nos braços fechados, de modo geral, para todos os grupos. Além disto, machos tiveram uma frequência de entradas nos braços abertos e fechados menor que as fêmeas em geral, com exceção dos machos expostos ao CRS de 22 dias, que apresentaram uma frequência média de entradas nos braços abertos maior que os demais grupos de machos e semelhante aos grupos de fêmeas. Embora nenhum efeito da interação entre os tipos de braço, sexo, intervenção e duração da intervenção tenha sido verificado ($F(1, 69) =.384$; $p = .538$), foi verificado efeito elevado principal do tipo de braço (aberto ou fechado) ($F(1, 69) = 139.426$; $p < .001$; $\eta^2_p = .669$) e do sexo ($F(1, 69) = 19.176$; $p < .001$; $\eta^2_p = .217$). Além disto, foi verificado um efeito moderado da interação entre os fatores sexo, intervenção e duração ($F(1, 69) = 4.952$; $p = .029$; $\eta^2_p = .067$), apresentando diferenças significativas específicas entre machos e fêmeas expostos ao CRS de 11 dias.

A Figura 7 apresenta a frequência de comportamentos complementares (exploração da extremidade dos braços abertos, mergulho de cabeça e respostas de avaliação de risco) emitidos no EPM para todos os grupos.

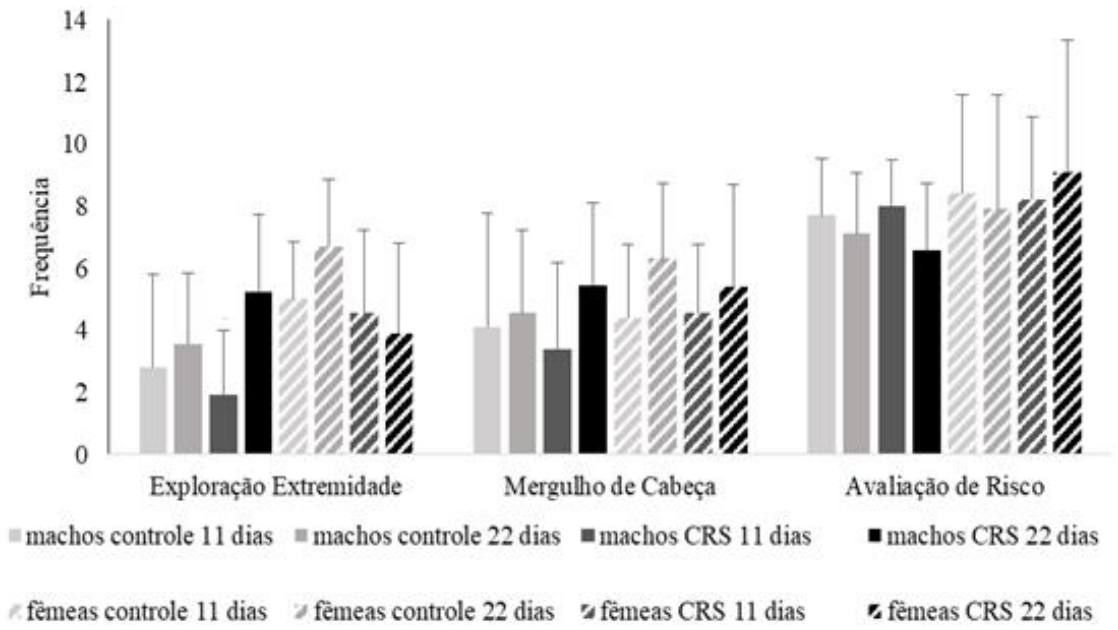

Figura 7. Médias e desvios padrão da frequência absoluta de comportamentos complementares no EPM dos grupos machos CRS 11 dias (n = 10), machos controle 11 dias (n = 10), machos CRS 22 dias (n = 9), machos controle 22 dias (n = 9), fêmeas CRS 11 dias (n = 9), fêmeas controle 11 dias (n = 10), fêmeas CRS 22 dias (n = 10) e fêmeas controle 22 dias (n = 10).

Na Figura 7, pode-se observar que machos, em geral, tiveram menor frequência média de comportamentos de exploração na extremidade em comparação às fêmeas. Entretanto, machos expostos ao CRS de 22 dias e fêmeas controle de 22 dias tiveram uma frequência de exploração da extremidade maior que os demais grupos. Neste sentido, verificou-se efeitos moderados do sexo ($F(1, 69) = 8.844$; $p = .004$; $\eta^2_p = .114$), da duração da intervenção ($F(1, 69) = 5.203$; $p = .026$; $\eta^2_p = .070$) e da interação entre sexo, intervenção e duração da intervenção ($F(1, 69) = 4.805$; $p = .032$; $\eta^2_p = .065$). Entretanto, não foram verificadas diferenças significativas relevantes entre os grupos.

Também se observa na Figura 7 a ausência de diferenças expressivas entre os grupos para a frequência de mergulhos de cabeça e respostas de avaliação de risco. Apesar disto, fêmeas, de modo geral, aparentam apresentar uma frequência de respostas de avaliação de risco levemente maior que machos. Não foram verificados efeitos da interação entre sexo, intervenção e duração da intervenção em relação a frequência de mergulhos de cabeça ($F(1, 69) = 1.071$; $p = .304$; $\eta^2_p = .015$) e a frequência de respostas

de avaliação de risco ($F(1, 69) = .752$; $p = .389$; $\eta^2_p = .011$). Embora tenha sido verificado um efeito da duração da intervenção na frequência de mergulho de cabeça ($F(1, 69) = 4.211$; $p = .044$), foi encontrado um tamanho de efeito pequeno ($\eta^2_p = .058$).

Labirinto Aquático de Morris (MWM)

A Figura 8 apresenta a latência de escape, a distância percorrida e a velocidade média em conjuntos de três tentativas do MWM para todos os grupos.

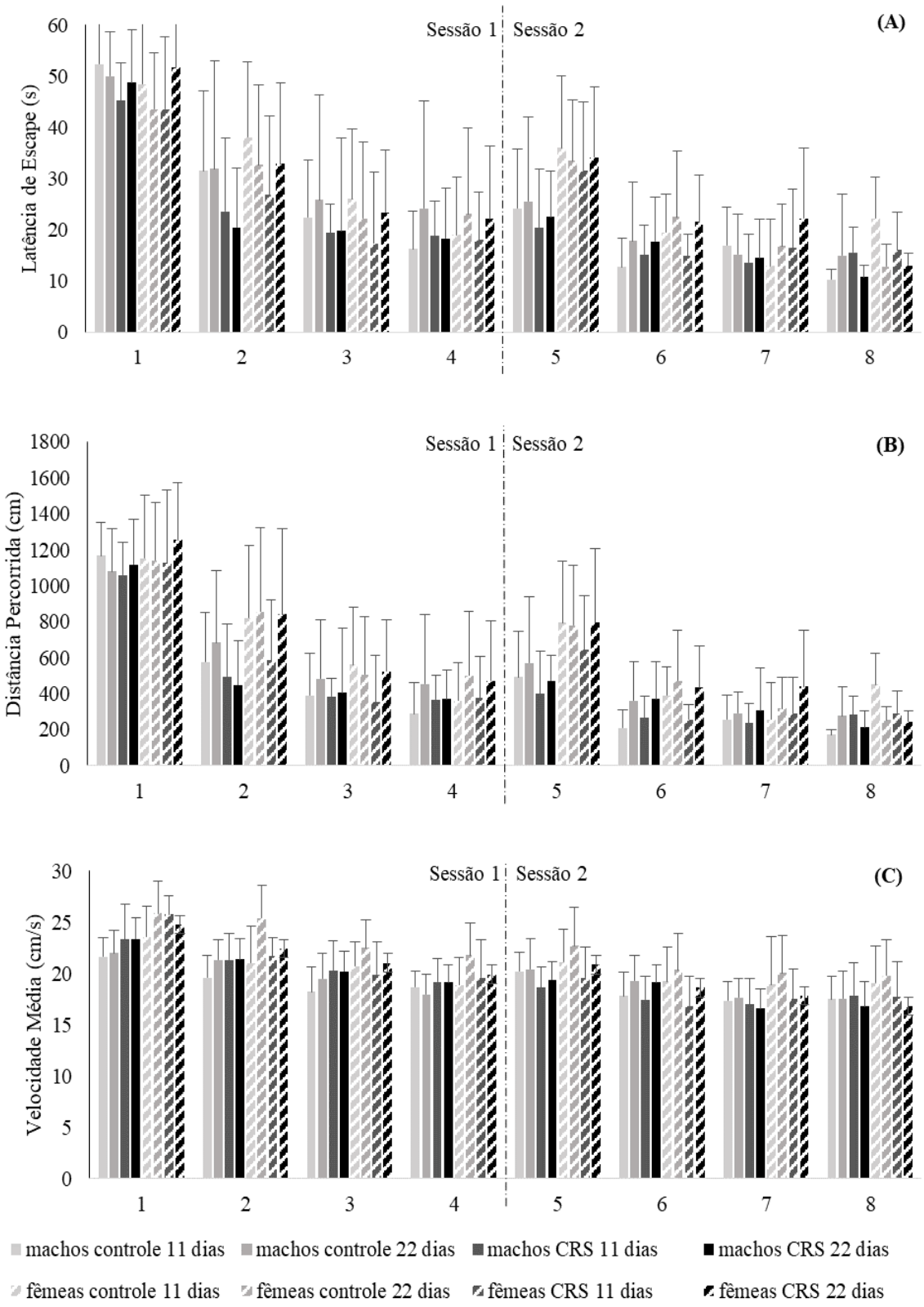

Figura 8. Média e desvios padrão da latência de escape (painel A), da distância percorrida (painel B) e da velocidade média (painel C) nos oito conjuntos de três tentativas da aquisição no MWM (quatro conjuntos em cada sessão) para os grupos machos CRS 11 dias (n = 10), machos controle 11 dias (n = 7), machos CRS 22 dias (n = 9), machos controle 22 dias (n = 9), fêmeas CRS 11 dias (n = 8), fêmeas controle 11 dias (n = 9), fêmeas CRS 22 dias (n = 10) e fêmeas controle 22 dias (n = 9).

Observa-se na Figura 8 que a latência de escape (painel A) e a distância percorrida (painel B) diminuíram, de modo geral, ao longo das tentativas e sessões, sendo a queda mais expressiva do primeiro para o segundo bloco de tentativas (início da sessão 1). Uma queda menos expressiva é observada do segundo para o terceiro bloco de tentativas (meio da sessão 1) e do quinto para o sexto bloco (início da sessão 2). Também é possível observar que ocorreu um aumento da latência de escape e da distância percorrida do quarto para o quinto bloco de tentativas (transição entre as sessões 1 e 2) para as fêmeas, mas não para os machos. Verificou-se um efeito elevado principal da sessão (1 ou 2) na latência de escape ($F(1, 63) = 104.934$; $p < .001$; $\eta^2_p = .625$) e na distância percorrida ($F(1, 63) = 153.620$; $p < .001$; $\eta^2_p = .709$). Em relação à distância percorrida, verificou-se um efeito moderado da interação entre sessão e tentativa ($F(3, 189) = 7.629$; $p < .001$; $\eta^2_p = .108$).

De forma geral, também se observa na Figura 8 que machos apresentaram uma latência de escape (painel A) e uma distância percorrida (painel B) menor que as fêmeas, principalmente no quinto conjunto de tentativas (transição da primeira para a segunda sessão). Verificou-se um efeito moderado principal do sexo na latência de escape ($F(1, 63) = 4.025$; $p = .049$; $\eta^2_p = .060$) e na distância percorrida ($F(1, 63) = 7.412$; $p = .008$; $\eta^2_p = .105$) e um efeito moderado da interação entre sexo e sessão na latência de escape ($F(1, 63) = 5.019$; $p = .029$; $\eta^2_p = .074$). Diferenças significativas específicas para a latência de escape foram verificadas entre machos e fêmeas somente na segunda sessão ($p = .036$).

Em específico, observa-se na Figura 8 que machos expostos ao CRS de 22 dias apresentaram latência média de escape (painel A) e uma distância média percorrida (painel B) menor que machos controle 22 dias no segundo bloco de tentativas, enquanto fêmeas expostas ao CRS de 11 dias apresentaram latência média de escape e distância

percorrida menor que fêmeas controle de 11 dias no segundo, terceiro e no sexto blocos de tentativas. Entretanto, não foi verificado nenhum efeito da interação entre sessão, tentativa, sexo, intervenção e duração da intervenção na latência de escape ($F(3, 189) = 1.607$; $p = .189$) e na distância percorrida ($F(3, 189) = 1.441$; $p = .232$). Foi verificado somente um efeito pequeno da interação entre sessão, tentativa e duração da intervenção na latência de escape ($F(3, 189) = 2.734$; $p = .045$; $\eta^2_p = .042$) e na distância percorrida ($F(3, 189) = 3.016$; $p = .031$; $\eta^2_p = .046$), sendo que grupos expostos às intervenções de 22 dias apresentaram uma latência de escape e uma distância percorrida maior que grupos expostos às intervenções de 11 dias, principalmente no sexto bloco de tentativas, mas sem serem verificadas diferenças específicas significativas entre a intervenção de 11 dias e a de 22 dias em todas as tentativas de cada sessão.

Observa-se no painel C da Figura 8, que a velocidade média apresentou, de modo geral, uma queda gradual ao longo das tentativas e das sessões. Verificou-se um efeito elevado principal da sessão ($F(1, 63) = 114.530$; $p < .001$; $\eta^2_p = .645$) e um efeito moderado da interação entre sessão e tentativa ($F(3, 189) = 4.260$; $p = .006$; $\eta^2_p = .063$). Também é possível observar que fêmeas tiveram uma velocidade média maior que machos de modo geral, verificando-se um efeito moderado principal do sexo ($F(1, 63) = 7.573$; $p = .008$; $\eta^2_p = .107$).

Não foi verificado um efeito da interação entre sessão, tentativa, sexo, intervenção e duração da intervenção na velocidade média ($F(3, 189) = .412$; $p = .744$). Entretanto, verificou-se um efeito elevado da interação entre intervenção e sessão ($F(1, 63) = 11.508$; $p = .001$; $\eta^2_p = .154$), sendo que os sujeitos expostos ao CRS tenderam a apresentar uma velocidade média menor que os sujeitos controle somente na segunda sessão (tendência à diferença significativa específica; $p = .057$).

A Figura 9 apresenta a porcentagem de entradas no quadrante 1 em relação aos demais quadrantes, a porcentagem de permanência no quadrante 1 em relação aos outros quadrantes, a frequência de trocas de quadrantes e a velocidade média para todos os grupos durante a *Probe Trial* (PT) no MWM.

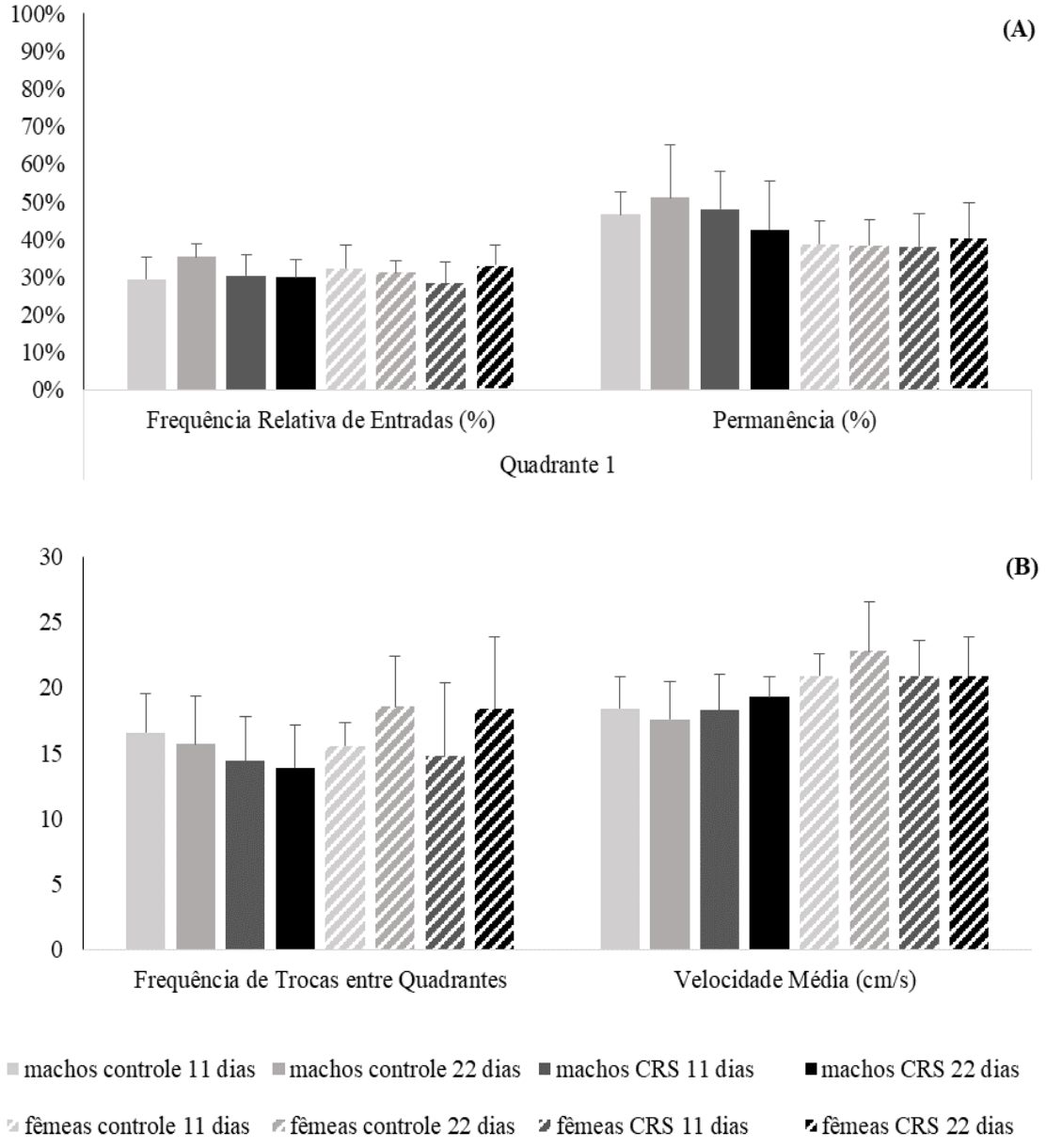

Figura 9. Média e desvios padrão da porcentagem de entradas e de permanência no quadrante 1 em relação aos demais quadrantes (painel A), da frequência de trocas entre quadrantes e da velocidade média (painel B) durante a *Probe Trial* no MWM para os grupos machos CRS 11 dias (n = 10), machos controle 11 dias (n = 7), machos CRS 22 dias (n = 9), machos controle 22 dias (n = 9), fêmeas CRS 11 dias (n = 8), fêmeas controle 11 dias (n = 9), fêmeas CRS 22 dias (n = 10) e fêmeas controle 22 dias (n = 9).

Observa-se no painel A da Figura 9 que não houve diferenças entre os grupos para a porcentagem de entradas no quadrante 1. Embora tenha sido verificado um efeito moderado da interação entre sexo, intervenção e duração da intervenção na porcentagem de entradas no quadrante 1 ($F(1, 63) = 6.593$; $p = .013$; $\eta^2_p = .095$), não foram verificadas diferenças significativas específicas entre os grupos ($p > .50$ em todas as comparações). Em relação à porcentagem de permanência no quadrante 1, observa-se que machos tiveram uma permanência maior que fêmeas no quadrante 1 de modo geral, sendo verificado um efeito elevado principal do sexo ($F(1, 63) = 12.317$; $p < .001$; $\eta^2_p = .164$). Não foi verificado efeito da interação entre sexo, intervenção e duração na porcentagem de permanência no quadrante 1 ($F(1, 63) = 1.814$; $p = .183$)

No painel B da Figura 9, observa-se que fêmeas tiveram frequência de trocas entre quadrantes maior que machos somente quando expostas à intervenção de 22 dias. Além disto, fêmeas apresentaram velocidade média maior que os machos de modo geral, assim como durante a aquisição no MWM. Verificou-se um efeito elevado principal do sexo na velocidade média ($F(1, 63) = 21.850$; $p < .001$; $\eta^2_p = .258$) e um efeito moderado da interação entre sexo e duração da intervenção na frequência de trocas entre quadrante ($F(1, 63) = 4.325$; $p = .042$; $\eta^2_p = .064$). Entretanto, não foi verificada diferença significativa específica entre fêmeas e machos na intervenção de 22 dias para a frequência de trocas entres quadrantes ($p = .063$). Além disto, não foram verificados efeitos da interação entre os fatores sexo, intervenção e duração da intervenção na frequência de trocas entre quadrantes ($F(1, 63) = .020$; $p = .889$) e na velocidade média ($F(1, 63) = 2.144$; $p = .148$).

Discussão

A hipótese inicial deste estudo era de que a exposição a um estresse de longa duração (CRS 22 dias) teria um efeito prejudicial na aprendizagem espacial e o fortalecimento de comportamentos associados à ansiedade e à anedonia, enquanto que um estresse de curta duração (CRS 11 dias) teria um efeito benéfico na aprendizagem espacial e um enfraquecimento (ou ausência de efeito) nos comportamentos associados à ansiedade e à anedonia. Entretanto, verificou-se que os animais expostos a 22 dias de CRS apresentaram menor frequência de comportamentos associados à ansiedade no EPM, em comparação aos animais expostos a 11 dias de CRS. Além disso, não foram verificados efeitos do CRS de 11 e de 22 dias no desempenho dos animais na tarefa de aprendizagem espacial no MWM e nem na preferência por solução de sacarose nos SPT. Dessa forma, é possível afirmar que as hipóteses desse trabalho não foram confirmadas. A seguir, são discutidos detalhadamente os possíveis fatores envolvidos nos resultados obtidos.

A capacidade de um modelo produzir estresse pode ser avaliada por meio da verificação de alterações fisiológicas e comportamentais relacionadas ao estresse, como alterações no ganho de peso, alterações no ciclo estral de fêmeas e alterações na preferência por solução de sacarose. Kitraki et al. (2004) e Dastgerdi, Radahmadi, Pourshanazari e Dastgerdi (2017) verificaram que o CRS é capaz de aumentar os níveis de corticosterona, sugerindo uma maior atividade do eixo HPA, uma das principais respostas fisiológicas do organismo ao estresse. O presente estudo verificou que a exposição a 11 e a 22 dias de CRS foi capaz de reduzir o ganho de peso relativo de ratos. O efeito da queda no ganho de peso em função da exposição ao CRS é observado amplamente na literatura, sendo acompanhado pelo aumento nos níveis de corticosterona (Conrad, Grote, Hobbs & Feravorni, 2003; Kitraki et al., 2004; Naert et

al., 2011). Logo, é possível que a queda no ganho de peso seja um bom indicativo de que o CRS foi capaz de produzir estresse nos animais do presente estudo.

Na análise do ganho de peso dos animais do estudo, observou-se, como esperado, que machos controle tiveram uma porcentagem de ganho de peso maior que fêmeas controle. Entretanto, a exposição ao CRS foi capaz de igualar a porcentagem de ganho de peso de machos e fêmeas, efeito decorrente de uma queda na porcentagem de ganho de peso maior nos machos do que nas fêmeas. De forma semelhante, Kitrake et al. (2004) verificaram que o percentual de ganho de peso em 21 dias de machos controle foi maior que de fêmeas controle (cerca de 7,2% maior nos machos), e que esta diferença entre machos e fêmeas se tornou menor (cerca de 2,5% maior nos machos) mediante exposição ao CRS. Além disso, verificaram que o CRS foi capaz de diminuir o percentual de ganho de peso em machos e fêmeas, sendo que esta queda foi maior nos machos que nas fêmeas. Neste sentido, é possível que fêmeas apresentem uma maior resistência aos efeitos negativos do estresse crônico do que machos (Luine et al., 2017).

A alteração na composição do ciclo estral de algumas fêmeas (a maioria expostas ao CRS) poderia ser também um indicativo de indução de estresse pelo modelo no presente estudo, apesar de não ter sido verificada diferença significativa entre os animais submetidos ao CRS e animais controle. Situações estressoras são capazes de perturbar o ciclo estral de mulheres e de fêmeas de espécies não humanas, o que afeta a fertilidade e dificulta a gravidez. Tais alterações estariam relacionadas à atividade dos glicocorticoides no eixo hipotálamo-pituitária-gonadal (Fu et al., 2018; Retana-Márquez et al., 2020). De forma similar ao presente estudo, Breen et al. (2012) observaram um prolongamento do diestro em fêmeas de camundongos durante exposição ao CRS. É possível que uma amostra maior fosse capaz de verificar uma diferença significativa para as alterações na composição do ciclo estral observadas no presente estudo.

Em relação à duração do CRS, observou-se que a queda no ganho de peso e as alterações na composição do ciclo estral ocorreram somente durante os primeiros 11 dias de exposição ao estresse. Nos 11 dias finais de CRS, o ganho de peso não sofreu mais alterações e as fêmeas com alterações no ciclo estral voltaram a apresentar regularidade no ciclo, o que poderia indicar uma adaptação dos animais ao CRS ao longo do tempo. O modelo de CRS adotado, por envolver a exposição previsível a um único estressor, pode ter facilitado uma adaptação dos animais. Isso pode significar que modelos previsíveis de estresse podem gerar a adaptação do organismo às condições adversas ao longo do tempo, de forma que os efeitos do estresse podem ser observados apenas na fase inicial de exposição ao modelo, mas não após 22 dias. Essa conclusão é fortalecida pelos resultados obtidos por Marin, Cruz e Planeta (2007), que verificaram que a queda no ganho de peso foi maior em animais expostos ao modelo imprevisível de CMS em comparação a animais expostos ao modelo previsível de CRS. É possível que um modelo de CRS imprevisível, assim como conduzido por Ortiz et al. (2015), que alternaram diferentes períodos, durações e contextos (salas e odores) de contenção, possa dificultar a adaptação e provocar uma queda no ganho de peso maior e mais prolongada, assim como alterar por um período mais prolongado a composição do ciclo estral de mais fêmeas do que no modelo de CRS previsível utilizado no presente estudo. Estudos futuros devem testar essa hipótese.

Observou-se uma divergência nos resultados em relação ao consumo de ração nos SPT: animais expostos a 11 dias de CRS apresentaram um consumo menor no dia 11 em comparação a ratos controle, enquanto que animais expostos a 22 dias de CRS não apresentaram diferenças no consumo no dia 11 em relação à ratos controle. Uma possibilidade para esta diferença nos resultados é de que a queda no consumo de ração tenha ocorrido de modo mais intenso nos primeiros dias de exposição ao CRS, podendo

estar associada à queda no ganho de peso no mesmo período, enquanto que no dia 11º dia de exposição ao CRS o consumo de ração estava quase semelhante ao grupo controle, refletindo a adaptação observada no ganho de peso e dificultando a verificação de diferenças significativas. Neste sentido, Jeong, Lee e Kang (2013) verificaram que camundongos expostos ao CRS apresentaram queda no consumo de comida nos primeiros quatro dias de exposição ao modelo, acompanhada por uma queda no peso corporal e por alterações em genes relacionados à atividade hipotalâmica e ao consumo de comida. Uma recuperação gradativa do consumo de ração foi verificada pelos pesquisadores nos dias seguintes de exposição ao CRS. Outro fator que deve ser levado em consideração no presente estudo é a avaliação do consumo de ração ter ocorrido durante os SPT, nos quais os ratos eram expostos à solução de 1% de sacarose. É possível que o consumo da solução adocicada possa ter afetado o consumo de ração durante os períodos de avaliação.

Outro indicador da capacidade do modelo para indução do estresse é a preferência por solução de sacarose, variável relacionada também à anedonia. No presente estudo não foi verificada queda na preferência por solução adocicada em função da exposição ao CRS durante os SPT. Embora alguns estudos registrem queda na preferência e no consumo de sacarose após 7, 14 e 21 dias de exposição ao CRS (e.g. Liu et al., 2019; Naert et al., 2011; Wang et al., 2016; Zhu et al., 2019), outros estudos não verificaram esse efeito (e.g. Fonseca Júnior, Castelli & Oliveira, 2015; Pansarim & Schmidt, 2019; Zhu et al., 2014). É possível que as diferenças encontradas nessa variável entre os estudos (queda ou não na preferência e consumo da solução) estejam relacionadas a diferenças nos procedimentos de SPT. O presente estudo utilizou uma privação de água e comida de 6h anterior aos SPT – privação com duração inferior ao executado por outros estudos. Forbes, Stewart, Matthews e Reid (1996), verificaram que

a privação de água e de comida no protocolo de CMS era necessária para produzir o efeito de anedonia no SPT. Além disto, os pesquisadores verificaram que apenas a privação crônica de água e comida eram suficientes para provocar a anedonia. Embora alguns estudos que utilizam o CRS verifiquem uma queda na preferência por sacarose, mesmo sem utilizar a privação de água e comida como estressores crônicos (e.g. Liu et al., 2019; Naert et al., 2011; Wang et al., 2016), é possível que os efeitos possam ser alcançados com um longo período de privação de água e comida anteriores ao teste, como utilizado em outros estudos. No entanto, é preciso considerar que longos períodos de privação são também estressores que podem se somar aos estressores dos modelos utilizados, dificultando, assim, a diferenciação dos efeitos dos estressores do modelo em si (e.g., a contenção) e os efeitos da privação. Essa dificuldade nos levou a optar, no presente estudo, por reduzir a privação de água e comida como forma de evitar estressores adicionais.

Os resultados obtidos sugerem, portanto, que 11 e 22 dias de CRS podem não ser suficientes para induzir a anedonia. Esses resultados, assim como a variabilidade de resultados obtidos em outros estudos que relacionam a exposição ao estresse com a produção de anedonia, indicam que a queda da preferência e consumo de solução de sacarose não é uma medida confiável de indução de estresse pelo modelo, tampouco de indução de comportamento relacionado à depressão. A queda no ganho de peso e no consumo de alimento, assim como a perturbação na composição do ciclo estral de algumas fêmeas, podem ser indicadores mais confiáveis de que a exposição crônica ao modelo afetou os organismos, entretanto, tais medidas estão sujeitas ao efeitos de adaptação em exposições previsíveis de maior duração. Tanto a indução de estresse pela exposição a 11 dias de CRS, como a adaptação a 22 dias de CRS podem levar a diferentes alterações comportamentais.

Observou-se, no presente estudo, que 11 dias de CRS podem induzir um aumento na frequência de comportamentos relacionados à ansiedade (diminuição no tempo de permanência nos braços abertos), enquanto que 22 dias de CRS podem induzir a frequências mais baixas destes comportamentos (aumento no tempo de permanência nos braços abertos). Entretanto, tais efeitos foram observados somente em ratos machos, enquanto que fêmeas expostas a 11 dias e a 22 dias de CRS não apresentaram diferenças entre si e em relação às fêmeas controle. Diversos estudos também verificam que o CRS é capaz de diminuir o tempo de permanência nos braços abertos do EPM (Bhagya et al., 2017; Bigdeli, Asle-Rousta & Rahnema, 2019; Peng et al., 2021), entretanto, após 21 dias de exposição aos períodos de contenção. O presente estudo sugere que 11 dias de CRS são suficientes para provocar efeitos comportamentais relacionados à ansiedade em machos, sendo que o aumento deste período de exposição ao estresse é capaz de levar a uma adaptação que anula os efeitos comportamentais iniciais. Outros estudos também registraram esse efeito adaptativo. Sandler e Bailey (2016), por exemplo, verificaram que 14 dias de CRS foi capaz de provocar alterações adaptativas em camundongos machos jovens, como aumento na locomoção no EPM, diminuição do tempo de imobilização e aumento do tempo nadando no teste do nado forçado. Os resultados obtidos por Sandler e Bailey fortalecem a ideia de que os efeitos observados no EPM do presente estudo após 22 dias reflitam uma adaptação comportamental ao CRS, de modo que os efeitos associados à ansiedade do CRS podem ser revertidos à medida que sua duração é prolongada, podendo até provocar efeitos comportamentais associados a uma diminuição da ansiedade. Esta possível adaptação ao estresse crônico pode estar relacionada aos mesmos efeitos observados no ganho de peso e no ciclo estral no presente estudo.

Ainda não são claros os fatores que podem favorecer a adaptação ou o prejuízo do estresse crônico prolongado – 21 dias ou mais de duração. A influência de condições de alojamento sobre os efeitos do CRS foi verificada no estudo de Bhagya et al. (2017), no qual um ambiente enriquecido foi capaz de reverter os efeitos relacionados à ansiedade do CRS no EPM. Desta forma, é possível que variáveis ambientais externas ao CRS possam contribuir para uma adaptação ao estresse (como no presente estudo) ou para um prolongamento dos prejuízos do estresse (e.g. Bigdeli, Asle-Rousta & Rahnema, 2019; Peng et al., 2021) após 21 dias de exposição. Estudos adicionais são necessários para verificar tal hipótese e para investigar os fatores mediadores da relação entre a duração do CRS e processos fisiológicos e comportamentais. Além disto, o sexo dos animais também se mostrou determinante para os efeitos do CRS. Fêmeas expostas ao CRS foram mais resistentes que machos a alterações comportamentais associadas à ansiedade, resultado que se alinha à menor intensidade da queda no ganho de peso nas fêmeas em relação aos machos. Da mesma forma, Mitra, Vyas, Chatterjee e Chattarji (2005), não verificaram nenhum efeito associando a ansiedade ao estresse crônico em ratos fêmeas no EPM. Luine et al. (2017) sugerem que o estrogênio, por possuir funções neurotrófica e antioxidante, seria o hormônio responsável por proteger as fêmeas dos efeitos do CRS. Mais estudos que comparem machos e fêmeas expostos ao CRS são necessários para confirmar esta hipótese.

O presente estudo não verificou alterações significativas no desempenho dos animais no MWM – aquisição e *Probe Trial* – mediante exposição a 11 e a 22 dias de CRS, ao contrário de outros estudos que verificaram um prejuízo (e.g. Hu et al., 2017; Luine et al., 1994; Ortiz et al., 2015; Riaz et al., 2015; Xi et al., 2011) ou uma melhora no desempenho (e.g. Gouirand & Matuszewich, 2005). Entretanto há estudos que também não verificam nenhum efeito do CRS e do CMS sobre a aprendizagem espacial

(e.g. Luine et al., 1996; Pansarim & Schmidt, 2019), medida no MWM. Essa variabilidade encontrada nos estudos indica que os efeitos do estresse sobre a aprendizagem espacial é um tópico ainda muito controverso na literatura. Assim como no presente estudo, Bessa et al. (2009) não verificaram nenhum efeito do estresse crônico sobre a aquisição no MWM, entretanto, verificaram prejuízo em uma tarefa de aprendizagem espacial reversa no mesmo aparato, conduzida após o término da aquisição inicial. A aprendizagem reversa, no entanto, não foi medida nesse estudo. Nota-se, com isso, que a aprendizagem espacial no MWM, assim como a preferência por sacarose no SPT, foi menos sensível a alterações induzidas pelo CRS do que comportamentos associados à ansiedade no EPM.

Este estudo também verificou diferenças gerais entre machos e fêmeas, independentemente da exposição ou não ao CRS. Fêmeas, de modo geral, tiveram um pior desempenho que machos no MWM, algo observado principalmente no início da segunda sessão e na *Probe Trial*. Esses dados podem sugerir que os machos tenham tido uma maior retenção da aquisição no MWM do que as fêmeas. Outros estudos apontam que machos apresentam facilidade maior que fêmeas em tarefas de retenção de aprendizagem espacial, algo verificado em roedores e em humanos (Luine, 2015). Além disto, o presente estudo verificou que fêmeas, de modo geral, apresentaram uma maior atividade locomotora que machos no EPM – maior frequência de entrada nos braços, tanto abertos como fechados, e de exploração da extremidade dos braços abertos – e no MWM – maior velocidade e maior frequência de troca entre quadrantes. Scholl, Afzar, Fox, Watt e Forster (2019) também verificaram uma maior atividade locomotora de fêmeas no EPM, além de um maior tempo de permanência e de entradas nos braços abertos em comparação a machos. Estes pesquisadores sugerem que fêmeas apresentam menos comportamentos associados à ansiedade e uma maior atividade locomotora que

machos. Entretanto, o presente estudo não verificou mais comportamentos associados a ansiedade em machos controle do que em fêmeas controle no EPM. As diferenças entre machos e fêmeas em tarefas de aprendizagem espacial encontradas por diferentes estudos podem indicar diferentes estratégias de exploração utilizadas por machos e por fêmeas nessas tarefas, o que deve ser melhor explorado pelo aumento do número de pesquisas envolvendo fêmeas.

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 LHβ-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

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

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., ... & Czéh, 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

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

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

Mograbi, 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?. *Sciênce*, *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

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

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 º 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	*ratos Sprague Dawley*
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.

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

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais da FFCLRP USP
Fone: (16) 3315-4811 Avenida Bandeirantes, 3900 - bloco 01 da Administração - sala 06
CEP: 14040-901 - Ribeirão Preto - SP - Brasil
Homepage: http://www.ffclrp.usp.br - e-mail: ceua@listas.ffclrp.usp.br