



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

Axel Fogaça Rosado

**ASSOCIAÇÃO ENTRE A FLEXIBILIDADE COGNITIVA E RESPOSTAS
COMPORTAMENTAIS AO ESTRESSE SOCIAL EM CAMUNDONGOS
MACHOS**

Florianópolis

2022

Axel Fogaça Rosado

**ASSOCIAÇÃO ENTRE A FLEXIBILIDADE COGNITIVA E RESPOSTAS
COMPORTAMENTAIS AO ESTRESSE SOCIAL EM CAMUNDONGOS
MACHOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Neurociências da Universidade Federal de Santa
Catarina para obtenção do título de Mestre em
Neurociências

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Manuella Pinto Kaster

Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo Luiz Gasnhar Moreira

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Rosado, Axel

Associação entre a flexibilidade cognitiva e respostas comportamentais ao estresse social em camundongos machos / Axel Rosado ; orientadora, Manuella Pinto Kaster, coorientador, Eduardo Luis Gasnhar Moreira, 2022.
82 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Neurociências, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Neurociências. 2. Estresse. 3. Cognição. 4. Flexibilidade cognitiva. 5. Córtex pré-frontal. I. Pinto Kaster, Manuella . II. Luis Gasnhar Moreira, Eduardo . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências. IV. Título.

Axel Fogaça Rosado

**ASSOCIAÇÃO ENTRE A FLEXIBILIDADE COGNITIVA E RESPOSTAS
COMPORTAMENTAIS AO ESTRESSE SOCIAL EM CAMUNDONGOS
MACHOS**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca
examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof^{ta}. Dr^a. Ana Lúcia Severo Rodrigues
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^{ta}. Dr^a. Fernanda Barbosa Lima
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Marcelo Farina
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^{ta}. Dr^a. Ariane Zamoner Pacheco de Souza
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi
julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Neurociências

Prof. Dr. Aderbal Silva Aguiar Junior
Coordenador do Programa

Prof.^a Dra. Manuella Pinto Kaster
Orientadora

Florianópolis, 2022

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a minha família, minha mãe Ivonir, meu pai Fernando e meu irmão Bryan, por toda a educação, aprendizagem, suporte e carinho durante minha vida. Agradeço muito por toda a estrutura e oportunidades criadas com os seus sacrifícios. Gostaria de agradecer a Universidade Federal de Santa Catarina pelas condições de poder proporcionar um ensino de qualidade e diferenciado para seus alunos e frequentadores, com seus professores, técnicos e terceirizados. Gostaria de agradecer ao LAMEB e seus funcionários pelo apoio e disposição em auxiliar e ajudar sempre que necessário.

Gostaria de agradecer a minha orientadora, Manuella, essa pessoa maravilhosa e querida, que me acolheu de braços abertos em todos os momentos, sempre disposta, sempre carinhosa, que segue como um modelo de pesquisadora, professora e pessoa, na qual me baseio e busco me tornar um dia. Gostaria de agradecer meu co-orientador Eduardo, por todo apoio e ajuda, sendo um exemplo de professor e pesquisador, que com muito respeito me espelho.

Gostaria de agradecer as minhas colegas de laboratório, Nicolle, Bruna, Caibe e Isabelle, parceiras nesta jornada, sempre receptivas para me receber sempre que preciso de apoio, sou muito agradecido por suas presenças.

Gostaria de agradecer a Laura, minha namorada, por todo o amor e carinho em todos os momentos, minha melhor amiga, por toda ajuda, apoio e consideração em todos os momentos, minha companheira e dupla, com quem eu quero viver minha vida junto, sou muito agradecido por ter te conhecido, obrigado por me fazer tão feliz e uma pessoa melhor.

Por fim gostaria de agradecer a todos os animais utilizados para esta pesquisa, que fundamentam nosso trabalho e sacrificam suas vidas para que possamos melhorar a nossa. Muito obrigado por tudo.

RESUMO

Eventos estressores compreendem fenômenos que causam perturbações nos sistemas fisiológicos de regulação homeostática e controle metabólico. A resposta do organismo ao estresse, apesar de necessária e adaptativa, pode causar danos diretos e indiretos na saúde dos indivíduos quando o evento estressor é crônico ou muito intenso. Alterações metabólicas, prejuízos nos mecanismos de neuroplasticidade e regulação da resposta ao estresse estão associados ao desenvolvimento de diferentes doenças em indivíduos suscetíveis, incluindo transtornos neuropsiquiátricos. Entretanto, indivíduos resilientes apresentam alterações transitórias frente a eventos estressores, através de mecanismos de adaptação mais eficientes. Dentre estes mecanismos, o desempenho cognitivo está associado a uma performance mais eficiente na avaliação de ameaças, regulação do humor, processamento emocional, adequação de estratégias e flexibilidade comportamental, por meio da ativação de regiões do córtex pré-frontal. O presente estudo teve como objetivo avaliar a associação entre a flexibilidade cognitiva basal e as estratégias de enfrentamento e respostas de interação social, comportamento emocional e morfológicas corticais ao estresse. Foram utilizados camundongos C57BL6 macho (60 dias de idade), submetidos ao labirinto aquático de Morris para avaliação da flexibilidade cognitiva basal, divididos em baixa e alta flexibilidade cognitiva. Posteriormente os animais foram divididos em controle e animais expostos ao protocolo de estresse crônico de derrota social (ECDS) por 10 dias. Após o término do ECDS os animais foram submetidos a testes comportamentais para avaliação do comportamento social e emocional. Após 24h os animais foram perfundidos para avaliação da morfologia cortical pelo método de Golgi-Cox. Os animais de alta flexibilidade cognitiva exibiram modificações nas suas estratégias de enfrentamento ao ECDS, de ativas para passivas, e também apresentaram uma redução da interação social. Além disso, os animais de alta flexibilidade cognitiva demonstraram prejuízos no comportamento emocional. Do ponto de vista morfológico, os animais submetidos ao ECDS apresentaram diminuições no número de ramificações dendríticas de neurônios piramidais das camadas II, III e V das sub-regiões pré-límbica e infralímbica do córtex pré-frontal, ao passo que os animais de alta flexibilidade cognitiva apresentaram um número relativo maior de ramificações dendríticas destes neurônios. Não observamos alterações nas estratégias de enfrentamento, comportamento social e emocional e na morfologia cortical dos animais de baixa flexibilidade cognitiva. Assim, nossos resultados sugerem que uma alta flexibilidade cognitiva de camundongos C57BL6 machos podem estar associadas às diferentes abordagens estratégicas de enfrentamento ao estresse, em conjunto com reduções da interação social e prejuízos nos comportamentos emocionais, além de alterações das ramificações dendríticas de neurônios piramidais do córtex pré-frontal.

Palavras-chave: estresse, flexibilidade cognitiva, córtex pré-frontal.

ABSTRACT

Stress is defined as an event that causes disturbances in the physiological systems of homeostatic regulation and metabolic control. Despite being adaptive and necessary, the stress response can cause direct and indirect damages to adaptation mechanisms when chronic or intense. In this scenario, stress is associated with metabolic alterations, impairments in neuroplasticity mechanisms and other maladaptive changes involved in the development of different diseases in susceptible individuals, including neuropsychiatric disorders. However, some individuals are resilient and show only transient changes in the face of stressful events, through more efficient adaptation mechanisms. Cognitive performance is associated with a more efficient performance in threat assessment, mood regulation, emotional processing, strategy adequacy and behavioral flexibility, via prefrontal cortex recruitment and activation. The present study aimed to evaluate the association between baseline cognitive flexibility and coping strategies alongside with social and emotional behavior and cortical morphology in responses to social stress. In the present study, male C57BL6 mice (60 days old) were submitted to the Morris water maze to assess baseline cognitive flexibility, divided into low and high cognitive flexibility scores. Afterwards, the animals were divided in control group and the group exposed to the chronic stress of social defeat (CSDS) protocol for 10 days. After the end of the CSDS protocol, mice were submitted to behavioral tests to assess social and emotional behavior. After 24 hours, the animals were perfused for cortical morphology evaluation by the Golgi-Cox method. The high cognitive flexibility animals exhibited changes in their CSDS coping strategies, from active to passive coping, with decreased social interaction. In addition, high cognitive flexibility animals showed impairments in emotional behavior, assessed by Z-score of the tail suspension test, splash test and open field test. Moreover, the animals submitted to CSDS showed a decrease in the number dendritic branches in pyramidal neurons from prefrontal cortex layers II, III and V, sub-regions prelimbic and infralimbic, while the animals with high cognitive flexibility showed a greater number of dendritic branches on those neurons. No alterations were observed in the coping strategies, social and emotional behavior and cortical morphology of low cognitive flexibility animals. Thus, this study suggests that a higher cognitive flexibility of male C57BL6 mice might be associated with different coping strategies and social interaction reductions, alongside with impairments in emotional behaviors and cortical morphology alterations on the prefrontal cortex.

Keywords: stress, cognitive flexibility, prefrontal cortex.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ativação dos eixos simpático-adrenal-medular e hipotálamo-hipófise-adrenal de resposta ao estresse.....	16
Figura 2. Divisão das camadas do córtex.....	22
Figura 3. Divisão das sub-regiões do córtex pré-frontal em humanos.....	24
Figura 4. Divisão das sub-regiões do córtex pré-frontal em roedores.....	26
Figura 5. Delineamento experimental.....	30
Figura 6. Protocolo para avaliação do aprendizado e flexibilidade cognitiva no teste do labirinto aquático de Morris.....	33
Figura 7. Esquema do aparato para teste de interação social.....	35
Figura 8. Representação da localização encefálica do córtex pré-frontal (PL e IL) e configurações para análise de Sholl.....	37
Figura 9. Avaliação do aprendizado e da flexibilidade cognitiva basal no teste do labirinto aquático de Morris.....	41
Figura 10. Classificação da flexibilidade cognitiva conforme performance no teste do labirinto aquático de Morris.....	43
Figura 11. Índices das estratégias de enfrentamento ao estresse crônico de derrota social (ECDS) e número total de ataques.....	45
Figura 12. Índice de interação social após o ECDS.....	48
Figura 13. Avaliação dos parâmetros emocionais através do teste de suspensão pela cauda.....	50
Figura 14. Avaliação dos parâmetros emocionais através do teste de borrifagem de sacarose.....	52
Figura 15. Avaliação dos parâmetros emocionais através do teste do campo aberto.....	54
Figura 16. Índice do comportamento emocional integrado após o ECDS.....	55
Figura 17. Morfologia de neurônios piramidais do córtex pré-frontal após o ECDS.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACTH – Hormônio Adrenocorticotrófico
- ACA – Área Anterior Cingulada
- ACC – Córtex Anterior Cingulado
- AI – Área Insular Agranular
- BDNF – Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo
- BHE – Barreira Hematoencefálica
- CRH – Hormônio Liberador de Corticotrofina
- ECDS – Estresse Crônico de Derrota Social
- GC – Glicocorticoides
- GR – Receptores de Glicocorticoides
- HHA – Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
- IL – Área Infralímbica
- IS – Índice de Interação Social
- MO – Área Motora Secundária
- NEC – Número de Entradas no Centro
- OFC – Córtex Orbitofrontal
- ORB – Área Orbital
- PFC – Córtex Pré-Frontal
- dIPFC – Córtex Pré-Frontal Dorsolateral
- dmPFC – Córtex Pré-Frontal Dorsomedial
- vlPFC – Córtex Pré-Frontal Ventrolateral
- vmPFC – Córtex Pré-Frontal Ventromedial
- PL – Área Pré-límbica
- PVN – Núcleo Paraventricular do Hipotálamo
- SAM – Eixo Simpático-Adrenal-Medular
- SNC – Sistema Nervoso Central
- TBS – Teste de Borrifagem de Sacarose

TTC – Tempo Total no Centro

TCA – Teste do Campo Aberto

TTI – Tempo Total de Imobilidade

TIS – Teste de Interação Social

TLI – Tempo de Latência para Imobilidade

TLA – Tempo de Latência para Autolimpeza

TSC – Teste de Suspensão pela Cauda

TTA – Tempo Total de Autolimpeza

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 ESTRESSE.....	13
1.2 ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS DE RESPOSTA AO ESTRESSE	14
1.3 RESPOSTA RESILIENTE AO ESTRESSE	19
1.4 COGNIÇÃO.....	21
1.5 CÓRTEX PRÉ-FRONTAL E FLEXIBILIDADE COGNITIVA	23
2. JUSTIFICATIVA	27
3. OBJETIVOS	28
3.1 OBJETIVO GERAL	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 ANIMAIS.....	29
4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	29
4.3 PROTOCOLO DE ESTRESSE	30
4.3.1. Estresse Crônico de Derrota Social.....	30
4.3.2. Avaliação das estratégias de enfrentamento.....	31
4.4 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	32
4.4.1 Testes cognitivos	32
4.4.1.1 <i>Teste do labirinto aquático de Morris</i>	32
4.4.2 Testes de comportamento emocional	33
4.4.2.1 <i>Teste de suspensão pela cauda</i>	33
4.4.2.2 <i>Teste do campo aberto</i>	34
4.4.2.3 <i>Teste de borrifagem de sacarose</i>	34
4.4.2.4 <i>Teste de interação social</i>	34
4.5 ANÁLISES HISTOQUÍMICAS	36
4.5.1 Preparações das amostras e impregnação com Golgi.....	36
4.5.2 Análises de Sholl.....	37
4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	38
4.6.1 Análises estatísticas para avaliação do aprendizado e flexibilidade cognitiva.....	38
4.6.2 Análises estatísticas para avaliação do comportamento social e emocional	38
4.6.3 Análises estatísticas para avaliação da morfologia neuronal	40
5. RESULTADOS	40
5.1 AVALIAÇÃO DO APRENDIZADO E FLEXIBILIDADE COGNITIVA	40
5.2 ASSOCIAÇÃO ENTRE A FLEXIBILIDADE COGNITIVA E AS ESTRATÉGIAS DE ENFRENTAMENTO AO ECDS.....	43

5.3 ASSOCIAÇÃO ENTRE A FLEXIBILIDADE COGNITIVA E O COMPORTAMENTO SOCIAL APÓS O ECDS	46
5.4 AVALIAÇÕES DA ASSOCIAÇÃO ENTRE A FLEXIBILIDADE COGNITIVA E O COMPORTAMENTO EMOCIONAL APÓS O ECDS	49
5.4.1 Teste de suspensão pela cauda	49
5.4.2 Teste de borrifagem de sacarose	51
5.4.3 Teste do campo aberto.....	52
5.4.4 Comportamento emocional integrado	54
5.5 AVALIAÇÕES DA FLEXIBILIDADE COGNITIVA E A MORFOLOGIA NEURONAL DO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL APÓS O ECDS.....	56
6. DISCUSSÃO	58
7. CONCLUSÕES	67
8. REFERÊNCIAS	68

1. INTRODUÇÃO

A flexibilidade cognitiva está associada aos diferentes tipos de respostas comportamentais ao estresse? A formulação desta pergunta científica tem origem em estudos que destacam que as respostas comportamentais e estratégias de enfrentamento ao estresse diferem entre os indivíduos. Uma vez que as respostas fisiológicas ao estresse são universais e conservadas através das espécies, nós temos que indivíduos resilientes possuem respostas transitórias e passageiras, de maneira suficiente, mas não excessiva, recuperando-se de forma eficiente uma vez que o estímulo estressor cessa. Indivíduos suscetíveis possuem respostas ao estresse duradouras e excessivas, na qual a exposição ao estresse provoca prejuízos diretos e indiretos na sua saúde, envolvidos na manifestação de diversas doenças, como os transtornos neuropsiquiátricos (MURROUGH e RUSSO, 2019; PFAU e RUSSO, 2015; RUSSO et al., 2012).

De modo semelhante, diversas espécies de invertebrados e vertebrados, como insetos, peixes, roedores e primatas, demonstram comportamentos sociais, exibindo relações, interações e hierarquias determinadas de forma evolutiva e conservada. Nestas espécies, a distribuição de recursos ocorre através do estabelecimento destas relações sociais, que podem gerar impactos positivos ou negativos à saúde do indivíduo conforme sua posição social. Contudo, o repertório comportamental utilizado para lidar com estes eventos estressores sociais pode variar entre os indivíduos, influenciando no impacto que o estresse provoca em seu bem-estar. Tendo em vista que eventos estressores são inevitáveis, entender os mecanismos comportamentais que auxiliam no enfrentamento ao estresse social são necessários para minimizar seus efeitos deletérios e prejuízos associados (WOOD e BHATNAGAR, 2015; PÉREZ-TEJADA et al., 2013; DE MIGUEL et al., 2011).

Para responder a esta pergunta científica primeiramente nós iremos destacar alguns tópicos conceituais como o estresse, as alterações fisiológicas de respostas ao estresse, respostas comportamentais resilientes e suscetíveis ao estresse, a cognição, a flexibilidade cognitiva e as regiões encefálicas responsáveis por esta função. Posteriormente, serão descritos os protocolos experimentais de estresse, testes comportamentais para avaliação da flexibilidade cognitiva e comportamentos emocionais e análises morfológicas das regiões encefálicas envolvidas. Para finalizar, os resultados obtidos serão discutidos com a literatura para conclusões e contribuições acerca da

associação entre a flexibilidade cognitiva e as diferentes respostas comportamentais ao estresse.

1.1 ESTRESSE

O estresse é cotidianamente definido como um agente ou evento externo que causa alterações ou danos no indivíduo. Apesar de popular, esta definição carrega em si diversos conceitos físicos, químicos e biológicos. Partindo de uma explicação histórica, o termo estresse é utilizado na física e engenharia há séculos para definir a interação entre uma carga ou peso e a deformação que ela causa em diferentes estruturas ou materiais. Os estudos sobre estresse na engenharia buscam compreender como os materiais reagem aos diferentes agentes externos com o intuito de construir estruturas e edificações mais resistentes e eficientes em suportar pesos e resistir às intempéries climáticas e eventos naturais (LAZARUS, 1993; HINKLE, 1973).

Da mesma forma que a física e a química estudam os átomos e materiais para entender suas características basais e como eles reagem e se alteram frente a agentes e forças externas, a biologia aplica estes conceitos aos organismos. Partindo de estudos fisiológicos sobre a regulação do ambiente interno em estados basais, foi postulado que, para o funcionamento adequado do organismo, é necessário a preservação da constância destes estados basais, independentemente das alterações e modificações externas. A partir destes estudos sobre os mecanismos de manutenção da constância fisiológica definiu-se o termo homeostase, que representa esta manutenção dinâmica do ambiente interno dos organismos (BRITO e HADDAD, 2017; CANNON, 1932).

Em termos biológicos, o conceito físico de estresse foi adaptado de diferentes formas ao longo dos anos, fazendo referência às modificações do ambiente interno dos organismos. O conceito biológico de estresse inicialmente se assemelhava ao conceito físico, sendo descrito como qualquer fenômeno que expunha ao risco a vida do organismo, ou ainda como as respostas inespecíficas do corpo frente a qualquer demanda feita sobre ele. Os mecanismos descritos como inespecíficos envolviam alterações do eixo endócrino Hipotálamo-Hipófise-Adrenal, que regula a secreção do hormônio liberador de corticotrofina (CRH), hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e glicocorticoides (GC) (SELYE, 1950; SELYE, 1976; PERDRIZET, 1997; SZABO et al., 2012).

Entretanto, este conceito não abrange a totalidade dos estudos sobre o estresse, deixando de lado questões psicológicas e individuais para focar apenas nos agentes

externos. Juntamente aos fenômenos externos, as respostas internas individuais de percepção, interpretação e enfrentamento ao estresse possuem igual importância. Estes mecanismos de adaptação e manutenção da homeostase, que incluem a mobilização de reservas energéticas, alocação de recursos metabólicos, ativação de cascatas hormonais, ativação da resposta imunológica, entre outros, são denominados alostase, e o quanto a ativação destas vias de manutenção custa ao corpo é denominado carga alostática. De maneira conjunta, os eventos ou fenômenos externos ou internos, físicos, psicológicos, agudos ou crônicos que causam alterações na homeostase dos organismos gerando ativações de mecanismos alostáticos integram os estudos biológicos sobre estresse (COHEN et al., 2016; MCEWEN, 1998; STERLING e EYER, 1988).

1.2 ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS DE RESPOSTA AO ESTRESSE

A ativação de mecanismos alostáticos de resposta ao estresse é um processo adaptativo, que permite a sobrevivência dos organismos frente a diferentes eventos estressores. O ambiente apresenta diversos estímulos, desafios e adversidades, e para sobreviver os organismos necessitam adaptar-se, através da ativação dos sistemas nervoso, endócrino, e imunológico, mobilização de energia, alocação de recursos metabólicos e respostas de defesa. Dentre estes mecanismos destacam-se os eixos neuroendócrinos simpático-adrenal-medular e hipotálamo-hipófise-adrenal, de respostas rápidas e lentas respectivamente, conforme ilustra a Figura 1 (COHEN et al., 2016; MURISON, 2016; SMITH e VALE, 2006).

A resposta ao estímulo estressor inicia-se através da ativação do eixo simpático-adrenal-medular, por receptores sensoriais, que transmitem a informação através de fibras aferentes para diferentes centros nervosos de processamento, como o tálamo, hipotálamo, córtex pré-frontal, amígdala, hipocampo e *locus ceruleus*, que orquestram comportamentos de luta, fuga, imobilidade e medo, através da liberação e secreção de catecolaminas, como a adrenalina e noradrenalina pela medula da glândula adrenal. As catecolaminas circulam através do sangue atingindo os sistemas cardiovascular, gastrointestinal, muscular, respiratório, renal, endócrino, imunológico, entre outros, na qual controlam frequência cardíaca, pressão sanguínea, digestão, secreção de hormônios e citocinas e mobilização energética, permitindo alterações fisiológicas rápidas ao organismo para reagir ao estímulo estressor (MURISON, 2016; EVEN et al., 2012; SMITH e VALE, 2006; HERMAN et al., 2003).

As ativações destas regiões encefálicas também estimulam o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, inicialmente através dos núcleos paraventriculares do hipotálamo (PVN), que produzem e secretam o CRH, que por sua vez estimula o lobo anterior da hipófise a liberar o ACTH na corrente sanguínea. O ACTH circulatório atinge principalmente seus receptores no córtex das glândulas adrenais, estimulando a produção e secreção de GC, como o cortisol (em seres humanos) e a corticosterona (em roedores). De forma periférica, os GC interagem com receptores de GC (GR) expressos em diversos tecidos, estimulando a liberação e mobilização de energia nos músculos, através da glicogenólise, no tecido adiposo, através da lipólise, e no fígado, através da gliconeogênese. Os GC atuam também no sistema imunológico inibindo ações inflamatórias através da imunossupressão de leucócitos, no sistema cardiovascular, através de aumentos na pressão sanguínea e frequência cardíaca, e no ritmo circadiano, envolvido no ciclo sono-vigília (AZMI et al., 2021; LIGHTMAN et al., 2020; LIU et al., 2019; KLOET e SZCZEPEK, 2017; MURISON, 2016; SMITH e VALE, 2006).

No sistema nervoso central (SNC), os GC interagem com GR expressos em regiões límbicas e corticais como o hipocampo, amígdala, córtex pré-frontal, núcleo accumbens e outras, que modulam o comportamento frente a episódios de estresse (DUDEK et al., 2019). Esta cascata de ativação hormonal também ativa um mecanismo de retroinibição no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, e o excesso de GC atingem os GR no hipocampo e hipotálamo, inibindo sua ativação e liberação dos hormônios subsequentes. Este mecanismo é responsável pelo retorno da homeostase do organismo, conforme os eventos estressores cessam (WALKER e SPENCER, 2017; MURISON, 2016; VASHIST e SCHNEIDEIR, 2014; EVEN et al., 2012; SMITH e VALE, 2006; HERMAN et al., 2003). Entretanto, o estresse intenso ou crônico pode levar a falhas nos mecanismos de retroinibição do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, gerando sua hiperativação e um aumento prolongado na secreção de GC (CORYELL, 2006). Embora indispensáveis para resposta do organismo aos agentes estressores, o aumento persistente de GC pode resultar em prejuízos no metabolismo celular, excitotoxicidade, dano oxidativo e morte celular (SATO et al., 2010; MADRIGAL et al., 2006).

Figura 1. Ativação dos eixos simpático-adrenal-medular e hipotálamo-hipófise-adrenal de resposta ao estresse

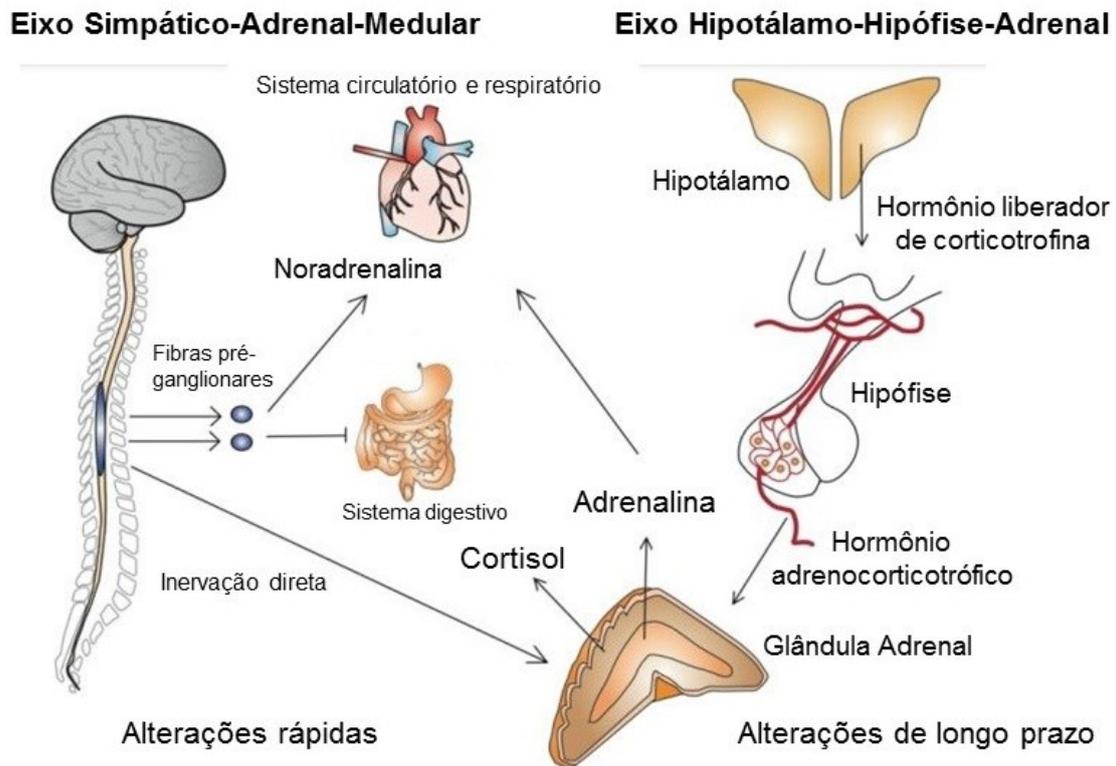


Figura 1. A resposta ao estresse ocorre através da ativação dos eixos neuroendócrinos simpático-adrenal-medular e o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. O eixo simpático-adrenal-medular é ativado por meio de fibras aferentes, que estimulam a liberação de adrenalina e noradrenalina pelas células cromafins, localizadas na medula da glândula adrenal. A adrenalina e a noradrenalina atuam em diversos tecidos em respostas fisiológicas que mobilizam reservas energéticas e recursos metabólicos para comportamentos de luta ou fuga. Na ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, os núcleos paraventriculares do hipotálamo liberam o hormônio liberador de corticotrofina, que por sua vez estimula o lobo anterior da hipófise a secretar o hormônio adrenocorticotrófico na corrente sanguínea, atingindo seus receptores no córtex da glândula adrenal, estimulando-a a liberar glicocorticoides, como o cortisol (humanos) e a corticosterona (roedores). Os hormônios esteroides interagem com receptores nucleares nos tecidos-alvo e geram respostas metabólicas de liberação e mobilização de energia através da glicogenólise nos músculos, gliconeogênese no fígado e lipólise no tecido adiposo, de imunossupressão de leucócitos do sistema imunológico e de regulação da pressão sanguínea e frequência cardíaca no sistema cardiovascular (Adaptado de EVEN et al., 2012).

Os prejuízos associados ao estresse elevado ou crônico podem resultar em danos diretos à saúde, através do desenvolvimento e agravamento de diferentes condições clínicas, como a obesidade, diabetes, síndromes metabólicas e doenças cardiovasculares, câncer, doenças autoimunes, doenças neurodegenerativas e psiquiátricas, ao passo que também podem resultar em danos indiretos, através da alteração e comprometimento de comportamentos saudáveis, como alimentação, sono e atividades físicas (O'CONNOR et

al., 2021; RAB e ADMON, 2020; RUSSEL e LIGHTMAN, 2019). Dentre os prejuízos provocados pelo estresse crônico ou elevado destacam-se aumentos na liberação do hormônio grelina, associadas à síndrome metabólica e obesidade (ABIZAID, 2019; STEFANAKI et al., 2018), aumentos na resistência à insulina, associados ao desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2 (JOSEPH e GOLDEN, 2017), alterações no microambiente tumoral, através da degradação do gene supressor tumoral p53 e danos no DNA, as quais promovem todos os estágios da tumorigênese (DAI et al., 2020; COHEN et al., 2012). Além disso, o estresse crônico também está associado a alterações cardiovasculares, que incluem variações na frequência cardíaca, arritmias, cardiomiopatias, hipertensão e infarto do miocárdio (KIM et al., 2017; ESLER, 2017). No sistema imunológico, o estresse crônico está associado ao aumento da expressão de genes pró-inflamatórios, que incluem aumento de citocinas pró-inflamatórias como interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8) e fator de necrose tumoral (TNF), em conjunto com alterações pró-inflamatórias no perfil leucocitário (ROHLEDER, 2019; CAIN e CIDLOWSKI, 2017; LÓPEZ-LÓPEZ et al., 2016; OTTE et al., 2016; POWELL et al., 2013). Esta estimulação do sistema imunológico pode levar a dessensibilização dos GR de monócitos, aumentando a resposta inflamatória, associada ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas e transtornos psiquiátricos (TROUBAT et al., 2020; BARNES e ADCOCK, 2019; MENARD et al., 2017; KAUFMANN et al., 2017; POWELL et al., 2013).

No SNC, este aumento prolongado de GC está associado a redução na plasticidade sináptica em áreas abundantes em receptores de GC, como o hipocampo e o córtex frontal, em conjunto com alterações estruturais e morfológicas de diferentes circuitos neurais e neurodegeneração (DUMAN e MONTEGGIA, 2006). Foi demonstrado que o estresse crônico está associado ao desenvolvimento da doença de Alzheimer através do acúmulo de placas β -amiloides, agregados neurofibrilares de proteína Tau, atrofia e perda sináptica, e neurodegeneração (SAEEDI e RASHIDY-POUR, 2021; BISHT et al., 2018). Em relação à doença de Parkinson, alterações no eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal e o aumento de GC podem acelerar os sintomas locomotores de bradicinesia e acinesia, devido aos prejuízos de neurônios dopaminérgicos na substância negra, inibição da autofagia e acúmulo da proteína α -sinucleína (PEÑA-BAUTISTA et al., 2020; HERRERA et al., 2015).

Embora haja uma influência conjunta de fatores genéticos e ambientais, eventos estressores estão frequentemente associados aos transtornos psiquiátricos, constituindo o

principal fator ambiental envolvido na sua gênese e progressão (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017; COHEN et al., 2016; PLIEGER et al., 2015; MONROE e HARKNESS, 2005). Foi demonstrado em estudos clínicos de pacientes diagnosticados com transtorno depressivo maior que o estresse elevado ou crônico e o aumento de GC circulantes estão associados à redução no volume e atrofia generalizada do hipocampo e córtex pré-frontal (BELLEAU et al., 2019). O aumento de cortisol também está ligado às alterações morfológicas de dendritos no córtex pré-frontal e giro denteado da formação hipocampal, que provocam uma redução na neurogênese hipocampal e danos celulares, contribuindo para sua atrofia. A desregulação do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal também está associada a reduções na expressão de genes neuroprotetores e agentes antioxidantes, aumento do estresse oxidativo e um desbalanço entre os níveis de oxidantes/antioxidantes no hipocampo e córtex pré-frontal (DING e DAI, 2019).

Em estudos pré-clínicos em roedores, o estresse crônico reduziu a concentração, liberação, e disponibilidade de serotonina no córtex pré-frontal e hipocampo, juntamente com prejuízos no seu transportador e recaptação. Também foram demonstrados prejuízos na liberação e recaptação de glutamato e GABA no córtex pré-frontal e hipocampo. Em conjunto, estas desregulações na neurotransmissão serotoninérgica, glutamatérgica, e GABAérgica podem contribuir para os danos celulares, redução no volume e neurogênese e atrofia generalizada do córtex pré-frontal e hipocampo (BELLEAU et al., 2019). Em paralelo, esta redução do hipocampo também está associada a redução de fatores neurotróficos, como o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), alterações epigenéticas de metilação de DNA e acetilação de histonas dos genes de BDNF, serotonina e GR (DING e DAI, 2019). Em relação ao comportamento, o estresse crônico causa prejuízos na circuitaria do córtex pré-frontal, hipocampo, estriado, amígdala, hipotálamo, núcleo accumbens e área tegmentar ventral, envolvidos nos sistemas de recompensa, resposta ao estresse e homeostasia (STANTON et al., 2019). No entanto, apesar dos estudos clínicos e pré-clínicos sobre o estresse crônico, é importante ressaltar que existem indivíduos que, quando expostos a eventos estressores ou traumas, apresentam mudanças mínimas e transitórias em seu bem-estar emocional, sendo estes considerados resilientes (PFAU e RUSSO, 2015).

1.3 RESPOSTA RESILIENTE AO ESTRESSE

A resiliência é um processo dinâmico de adaptação às adversidades e condições aversivas, na qual o indivíduo recupera-se de alterações fisiológicas frente a eventos estressores ou traumáticos, evitando consequências biológicas, psicológicas e sociais das cargas alostáticas geradas pelo estresse (MURROUGH e RUSSO, 2019; DANTZER et al., 2018; OSÓRIO et al., 2016; RUSSO et al., 2012). Apesar de haver pouco entendimento sobre os mecanismos capazes de gerar resiliência ao estresse, acredita-se que este é um processo ativo e integrativo, envolvendo alterações comportamentais, mecanismos genéticos, epigenéticos, neuroquímicos e modificações de plasticidade em diferentes áreas encefálicas (CATHOMAS et al., 2019).

Diferentes modelos animais são utilizados para identificar os mecanismos biológicos da resiliência e suscetibilidade ao estresse, como o modelo de estresse crônico de derrota social (ECDS). No ECDS, após a interação com outros animais agressivos por 10 dias, cerca de 65% dos animais apresentam reduções na interação social, preferência por sacarose, locomoção e exploração ambiental, em conjunto com perda de peso corporal, aumento do peso da glândula adrenal e falhas nos comportamentos ativos de escape frente a situações aversivas, sendo estas alterações comportamentais associadas a um perfil suscetível ao ECDS, enquanto que 35% dos animais apresentam características comportamentais semelhantes aos animais controle, sendo associados a um perfil resiliente ao ECDS (TANG et al., 2019; HODES et al., 2015; IÑIGUEZ et al., 2014; RUSSO et al., 2012; GOLDEN et al., 2011; KUDRYAVTSEVA et al., 1991).

Além das alterações comportamentais, diversas diferenças neuroquímicas já foram observadas em animais considerados resilientes e suscetíveis ao ECDS, incluindo alterações no eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (GURURAJAN et al., 2019), no sistema imunológico (PFAU et al., 2019; HODES et al., 2014) e em mecanismos de neuroplasticidade (COLYN et al., 2019; NASCA et al., 2019). Foi demonstrado que animais suscetíveis ao ECDS apresentam uma diminuição da densidade de espinhos dendríticos em neurônios piramidais do córtex pré-frontal e uma diminuição do volume hipocampal, juntamente com um aumento na arborização dendrítica e expressão de pró-BDNF na amígdala basolateral (COLYN et al., 2019; NASCA et al., 2019). Além disso, animais suscetíveis ao ECDS apresentaram um aumento na expressão de 372 genes na porção ventral do giro denteado da formação hipocampal em comparação ao aumento de 612 genes dos animais resilientes, com apenas 124 genes sobrepostos (NASCA et al.,

2019). Mais especificamente, a expressão do gene *Zfp189* que codifica domínios proteicos de zinco no córtex pré-frontal de camundongo C57BL6J promoveu um comportamento resiliente ao ECDS (LORSCH et al., 2019).

Os transtornos psiquiátricos e os modelos animais de estresse são frequentemente associados a déficits cognitivos e prejuízos de memória (WILLIAMS et al., 2020; SHEN et al., 2019; DENG et al., 2018; ZHANG et al., 2018; ZHANG et al., 2018; SCHOENFELD et al., 2017). Contudo, alguns estudos sugerem que níveis mais altos de desempenho cognitivo em testes de memória de trabalho visual e verbal, reconhecimento facial, atenção, cálculo e resolução de problemas possam estar associados a maior resiliência em adultos saudáveis (LEE et al., 2013; SIMEON et al., 2007). Além disso, Rodman et al. (2019) demonstraram através de um estudo clínico longitudinal que, dentre os indivíduos que sofreram maus tratos durante a fase infantil, aqueles que melhor recrutaram regiões do córtex pré-frontal para modular as respostas emocionais da amígdala exibiram menor risco de desenvolver depressão ao longo da vida.

Em relação ao caráter integrativo biopsicossocial da resiliência, diversos estudos apontam a interação entre o ambiente e a expressão de genes associados à resposta ao estresse e a modulação da circuitaria neural (HORNOR, 2016). A ativação de áreas encefálicas relacionadas a avaliação de ameaças e a regulação de humor estão associadas a uma adaptabilidade mais eficiente frente a mudanças ambientais. Uma maior capacidade de regulação do humor e emoções positivas, através da ativação do córtex anterior cíngulado e córtex pré-frontal ventromedial, também auxiliam na flexibilidade cognitiva e estratégias adaptativas durante eventos estressores (ETKIN et al., 2015; BRIDGETT et al., 2013; SAPIENZA e MASTEN, 2011). A capacidade de reavaliação cognitiva, através da ativação do córtex pré-frontal dorsomedial, dorsolateral e ventrolateral, está associada ao controle cognitivo frente a situações aversivas e modulação das respostas emocionais da amígdala (BUHLE et al., 2014). A regulação do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal em indivíduos resilientes também está associada ao sistema glutamatérgico, fatores neurotróficos como o BDNF, e baixos níveis inflamatórios (FEDER et al., 2019; GOUIN et al., 2017; TECHE et al., 2017; STELLAR et al., 2015; DUMAN, 2014; FEDER et al., 2014).

Entretanto, conforme a dinâmica das relações ambientais e sociais é alterada, a flexibilidade comportamental se faz necessária para adequar as respostas do indivíduo de forma competente, de acordo com as novas exigências do contexto (FEDER et al., 2019; NELSON e GUYER, 2011). Diversas regiões do córtex frontal são ativadas para adequar

o comportamento, como o córtex orbitofrontal, córtex anterior cingulado e córtex lateral ventral e dorsal, relacionadas aos domínios cognitivos de valoração, inibição e expressão de respostas emocionais, aquisição de padrões, tomada de decisões, associadas ao processamento sensorial, memória de trabalho e de longo prazo. Neste contexto, respostas de resiliência ao estresse, através da atividade de regiões do córtex frontal, se dão de maneira rápida e eficiente para recuperação psicobiológica, de maneira suficiente, mas não excessiva, uma vez que o estímulo estressor cessa (FEDER et al., 2019; RUDEBECK et al., 2013; NELSON e GUYER, 2011; BARBAS e ZIKOPOULOS, 2007; BARBAS, 2000).

1.4 COGNIÇÃO

A cognição é definida como o processamento de informação para formação da experiência e aquisição de conhecimento através de processos mentais. Os processos mentais envolvem diferentes domínios como sensação, percepção, ação, atenção, motivação, aprendizado, memória, linguagem, pensamento, imaginação, planejamento, funções executivas e consciência (WARD, 2015; KANDEL et al., 2014). A neurociência cognitiva busca unir estes processos mentais com estruturas e regiões encefálicas, explicando processos psicológicos cognitivos através de mecanismos biológicos e cerebrais específicos (WARD, 2015). A partir de estudos realizados através da estimulação elétrica cerebral e de pacientes com danos cerebrais, fundou-se o conceito de especialização funcional de diferentes regiões encefálicas, na qual destaca-se que diferentes áreas encefálicas são especializadas em diferentes funções.

Estudos documentados por Broca (1861) e Wernicke (1874) demonstraram que pacientes com danos em regiões específicas do encéfalo possuíam prejuízos em diferentes aspectos da linguagem, incluindo no seu reconhecimento, reprodução e interpretação. Observações das particularidades de cada caso, como prejuízos na compreensão da linguagem sem prejuízos na sua reprodução, ou prejuízos na reprodução da linguagem sem prejuízos na sua compreensão, eram relacionados a danos em regiões particulares e independentes do encéfalo, sugerindo que, para linguagem, existem diferentes áreas responsáveis por cada tipo de função. Posteriormente, Brodmann (1909) fundamentou-se na distribuição citoarquitetônica dos neurônios, através da relativa proeminência das camadas, tamanho celular e as densidades celulares características, para mapear as regiões

do córtex. Com base nestas observações, foram mapeadas 47 regiões no córtex cerebral (WARD, 2015).

O córtex é organizado em seis camadas, ordenados de maneira externa para interna (Figura 2A). A camada I, mais externa, é denominada de camada molecular, contendo dendritos e axônios de camadas mais profundas que a perpassam para fazer conexões com outras áreas do córtex. As camadas II e III são denominadas camada granular externa e camada piramidal externa, respectivamente. Estas camadas contêm neurônios piramidais pequenos e arredondados com projeções para áreas corticais, formando as comunicações córtico-corticais. A camada IV é chamada de camada granular interna e contém neurônios esféricos pequenos, que recebem as aferências sensoriais vindas do tálamo. A camada V é dominada camada piramidal interna, contendo neurônios piramidais grandes (Figura 2C), com projeções para outras áreas corticais e subcorticais, formando as principais vias eferentes do córtex. A camada VI é dominada camada multiforme, com neurônios heterogêneos que se misturam com a substância branca delineando o limite do córtex. A densidade de cada camada do córtex varia conforme a área e sua função específica, como regiões motoras, sensoriais e de processamento (Figura 2B) (KANDEL et al., 2014).

Figura 2. Divisão das camadas do córtex

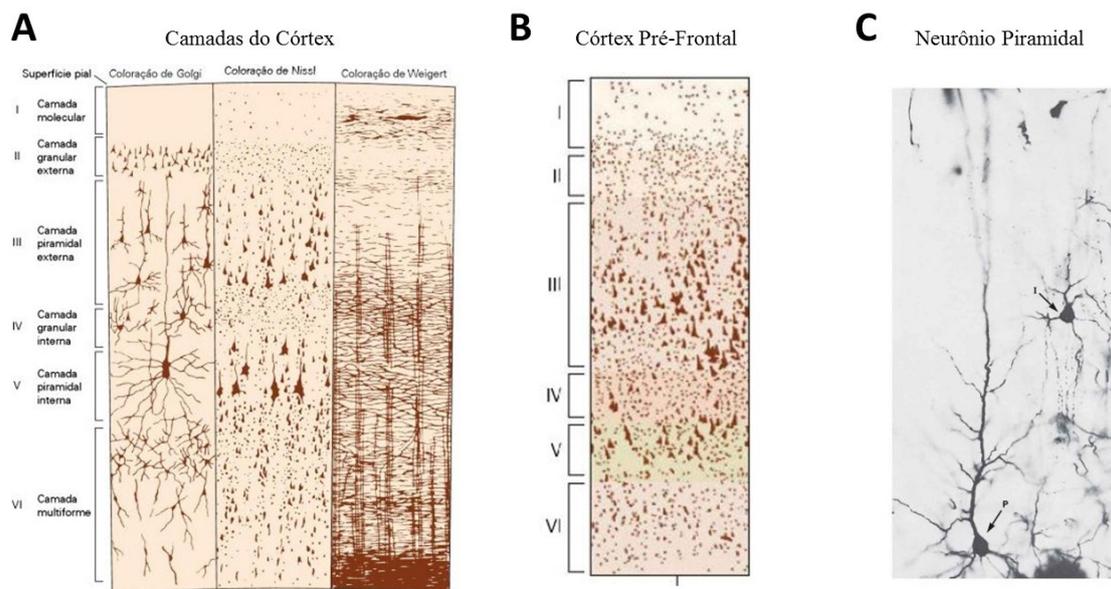


Figura 2. Divisão das camadas do córtex. Organização das seis camadas do córtex, de forma externa para interna: Camada I – Molecular, onde ocorre a passagem de axônios e dendritos de neurônios das camadas inferiores; Camada II – Granular Externa e Camada III – Piramidal Externa, possuem neurônios piramidais pequenos que se projetam para áreas corticais, realizando

a comunicação córtico-cortical; Camada IV – Granular Interna, que contém interneurônios esféricos que recebem aferências sensoriais vindas do tálamo; Camada V – Piramidal Interna, que contém neurônios piramidais grandes que se projetam para áreas corticais e sub-corticais; Camada VI – Multiforme, que contém neurônios heterogêneos delineando o limite do córtex (A). Organização e espessura das camadas do córtex pré-frontal, nota-se a camada III bem acentuada, que confere a comunicação e modulação do córtex pré-frontal sobre outras áreas corticais (B). Representação de um neurônio piramidal (P) típico das camadas III e V, destacam-se os dendritos apical e basais bem acentuados que conferem o formato piramidal ao neurônio (C) (Adaptado de KANDEL et al., 2014).

1.5 CÓRTEX PRÉ-FRONTAL E FLEXIBILIDADE COGNITIVA

O córtex pré-frontal está associado a funções executivas, que permitem o indivíduo otimizar sua resposta e performance em situações que exigem diversos processos cognitivos, através da coordenação, sincronização, ativação e inibição de outras regiões e áreas encefálicas. As funções executivas estão envolvidas no processamento e coordenação de domínios cognitivos multimodais, na resolução de problemas, planejamento e na performance frente novidades, situações aversivas e de respostas não automáticas. O córtex pré-frontal possui comunicações com os sistemas sensoriais, regiões corticais motoras e estruturas envolvidas no humor, emoções e memória. As funções executivas associam informações sensoriais, componentes da memória, de curta e longo prazo, e o processamento emocional para simular cenários, planejar estratégias e solucionar problemas de maneira eficiente. Este tipo de processamento é flexível, para se adequar à um ambiente em constante mudança, ativo, para sobrepujar comportamentos automáticos frente situações de novidade, e enviesado, uma vez que a experiência e memória influenciam na repetição de comportamentos específicos (HELFRICH e KNIGHT 2019; CARLÉN, 2017; WARD, 2015; KANDEL et al., 2014; BARBAS e ZIKOPOULOS, 2007; DE BRUIN et al., 2000).

O córtex pré-frontal é dividido nas sub-regiões dorsomedial (dmPFC), ventromedial (vmPFC), ventrolateral (vlPFC), dorsolateral (dlPFC) e orbitofrontal (OFC) de acordo com suas funções e conexões (Figura 3A e B) (CARLÉN, 2017; KOLB, 2015). O dlPFC recebe aferências sensoriais do tálamo e juntamente com o dmPFC coordena a adaptação do comportamento frente mudanças no ambiente. Este comportamento de flexibilidade envolve o aprendizado, através de tentativa e erro, das mudanças de regras de contingência de um determinado cenário. Lesões no dlPFC e dmPFC prejudicam a seleção de comportamentos adequados para um desempenho eficiente conforme as alterações ambientais (ARCO et al., 2017; PARK e MOGHADDAM, 2017). O OFC está associado a funções de mediação entre a flexibilidade comportamental e a expectativa de

resultados. Baseado nas regras de contingência de um determinado cenário, o animal aprende quais comportamentos levam à uma recompensa ou punição e quais comportamentos não produzem resultados, adaptando seus comportamentos conforme as regras e cenários para um determinado resultado se alteram. Lesões no OFC provocam prejuízos na flexibilidade adaptativa frente a estas mudanças (SALLET, et al., 2020; PARK e MOGHADDAM, 2017). Em paralelo, o vmPFC também está envolvido na flexibilidade comportamental, através do processamento de informações relacionadas a ameaças e comportamentos defensivos. Similarmente, lesões no vmPFC provocam prejuízos nos padrões comportamentais de resposta às mudanças ambientais, afetando a performance eficiente destas adaptações comportamentais. (KAEFER et al., 2020; PARK e MOGHADDAM, 2017).

Figura 3. Divisão das sub-regiões do córtex pré-frontal em humanos

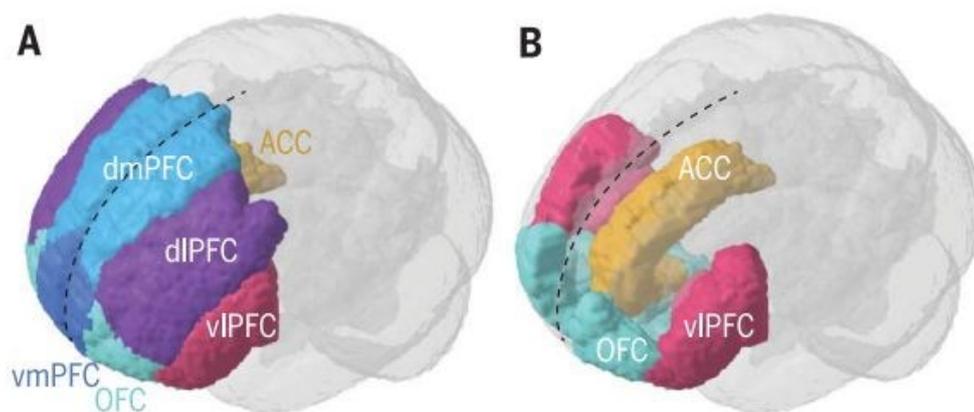


Figura 3. Visão lateral-frontal da divisão das sub-regiões do córtex pré-frontal de humanos (A e B). Abreviações: ACC – Córtex anterior cingulado; dmPFC – Córtex pré-frontal dorsomedial; dlPFC – Córtex pré-frontal dorsolateral; vmPFC – Córtex pré-frontal ventromedial; vlPFC – Córtex pré-frontal ventrolateral; OFC – Córtex orbitofrontal (Adaptado de CÁRLEN et al., 2017).

De forma geral, o vmPFC e OFC possuem conexões com áreas de processamento emocional. Lesões nestas regiões afetam uma resposta flexível frente mudanças ambientais de caráter emocional. Ao passo que o dlPFC e dmPFC possuem conexões com áreas sensoriais e motoras. Lesões nestas regiões afetam uma resposta flexível frente mudanças nas regras condicionadas de uma tarefa (WARD, 2015). Mais especificamente, o vmPFC possui projeções para diversas áreas relacionadas ao processamento emocional de resposta ao estresse, como hipocampo, amígdala e núcleo accumbens. Sua ativação está associada à diminuição da atividade da amígdala e a regulação de comportamentos

tipo-depressivo em modelos animais de resposta ao estresse (NUMA, et al., 2019; PARK e MOGHADDAM, 2017; VIALOU et al., 2014; PITMAN et al., 2012; ONGUR e PRICE, 2000).

A capacidade de processamento multimodal do córtex pré-frontal está associada a propriedade de seletividade mista de seus neurônios, na qual diferentes tipos estímulos e demandas ambientais, como estímulos sensoriais, respostas motoras e regras de contingência, são processadas em conjunto para uma resposta flexível adaptativa e eficiente. Os neurônios do córtex pré-frontal também atuam de modo dinâmico, com respostas adaptativas de acordo com a discriminação de estímulos e regras situacionais que são relacionadas às demandas ambientais momentâneas. Estas propriedades conferem ao córtex pré-frontal um caráter de processamento elevado, em que diferentes tipos de estímulo são processados em conjunto para uma resposta flexível adaptativa com performance elevada em tarefas e atividades cognitivas (PARK e MOGHADDAM, 2017; RIGOTTI et al., 2013; STOKES et al., 2013).

Em roedores o córtex pré-frontal é dividido nas sub-regiões anterior cingulada (ACA), motora secundária (MO), orbital (ORB), insular agranular (AI) e medial (mPFC), contendo as áreas pré-límbica (PL) e infralímbica (IL), conforme ilustrado pela Figura 4A, B e C. Em estudos com roedores foi demonstrado que o mPFC está associado à flexibilidade comportamental, na qual são exigidas adaptações comportamentais frente a mudanças nas demandas e resultados de uma tarefa ou atividade. As sub-regiões PL e IL do mPFC de roedores estão envolvidas na codificação e abstração de regras, na organização de comportamentos que relacionam processamentos sensoriais e motores com resultados esperados e na mudança de estratégias, através da criação de novas estratégias e inibição de estratégias anteriores (CARLÉN, 2017; PARK e MOGHADDAM, 2017; MURUGAN et al., 2017; RICH e SHAPIRO, 2009; RAGOZZINO et al., 2003).

As sub-regiões PL e IL atuam de modo dinâmico na mudança de estratégias, utilizando pistas espaciais e visuais para adaptar o comportamento de forma eficiente. A sub-região PL codifica as estratégias, associando-as à diferentes resultados, sua ativação é necessária para adaptações comportamentais mediante mudanças nas demandas ambientais, através do aprendizado de quais comportamentos e estratégias estão associados a recompensas específicas. A sub-região IL estabelece relações entre as estratégias após seus resultados, codificando estes resultados de modo a estabelecer uma performance eficiente para a atividade ou tarefa. Lesões nas sub-regiões PL e IL

prejudicam a flexibilidade comportamental, reduzindo a capacidade de adaptação e alteração de estratégias estabelecidas quando os resultados e recompensas também se alteram (CARLÉN, 2017; PARK e MOGHADDAM, 2017; MURUGAN et al., 2017; RICH e SHAPIRO, 2009; RAGOZZINO et al., 2003).

Figura 4. Divisão das sub-regiões do córtex pré-frontal em roedores

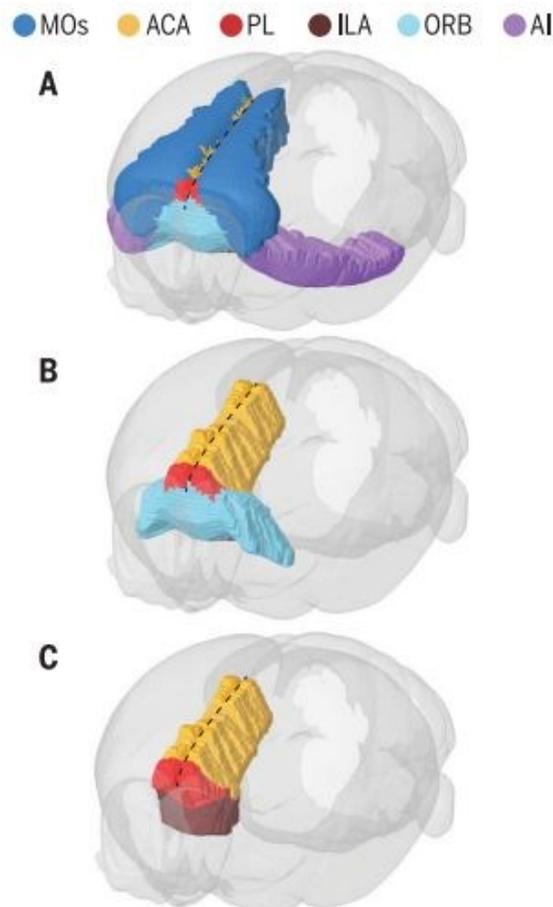


Figura 4. Visão lateral-ventral da divisão das sub-regiões do córtex pré-frontal de roedores (A, B e C). Abreviaturas: MO – Área motora secundária; ACA - Área anterior cingulada; PL – Área pré-límbica; IL – Área infralímbica; ORB – Área orbital; AI – Área insular agranular (Adaptado de CÁRLEN et al., 2017).

Neste contexto, foi demonstrado em modelos animais que o estresse crônico produz prejuízos em testes cognitivos, como em testes de condicionamento operante, labirinto aquático de Morris e labirinto radial, devido ao aumento de GC circulantes. Estes déficits cognitivos relacionados ao aumento de GC estão associados a alterações de plasticidade estrutural de neurônios piramidais das camadas II e III do mPFC (PL e IL). A exposição ao estresse crônico reduz a arborização dendrítica e a densidade de espinhos dendríticos, através da diminuição do comprimento dos dendritos e da quantidade de

ramificações e espinhos dendríticos apicais, resultando em uma atrofia destes neurônios (RADLEY et al., 2005; COOK e WELLMAN, 2004). Além disso, Goldwater et al. (2009) demonstraram que o estresse crônico provoca alterações na plasticidade estrutural, através da retração dendrítica e perda de espinhos dendríticos, e funcional, através de prejuízos na modulação sináptica por meio da diminuição de receptores de dopamina em neurônios piramidais da camada V do mPFC (IL).

Em conjunto, estes estudos sugerem que o estresse crônico pode causar prejuízos e falhas nos mecanismos de adaptação e resposta ao estresse, associados ao desenvolvimento de diferentes doenças, sendo o principal fator ambiental para o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos. Entretanto, indivíduos resilientes apresentam alterações transitórias frente eventos estressores, através de mecanismos de adaptação mais eficientes. Dentre estes mecanismos, o desempenho cognitivo está associado à uma performance mais eficiente na avaliação de ameaças, regulação do humor, processamento emocional, adequação de estratégias e flexibilidade comportamental, por meio do recrutamento e ativação de regiões do córtex pré-frontal. Portanto testes cognitivos que avaliem a performance e flexibilidade de camundongos associados ao modelo de estresse crônico de derrota social podem fornecer resultados que elucidem os mecanismos comportamentais envolvidos nas diferentes estratégias de enfrentamento ao estresse. Neste caso, o labirinto aquático de Morris tem-se mostrado eficiente em avaliar o aprendizado, memória espacial e flexibilidade cognitiva de camundongos (GEHRING et al., 2015; GIL-MOHAPEL et al., 2013; VORHEES e WILLIAMS, 2006).

2. JUSTIFICATIVA

Atualmente a exposição ao estresse é inevitável na sociedade. Eventos estressores podem causar prejuízos diretos e indiretos na saúde de indivíduos, envolvidos também no desenvolvimento de doenças e transtornos psiquiátricos devido a falhas nos mecanismos de regulação homeostática. Os transtornos psiquiátricos figuram entre as principais causas de incapacidade no mundo. A depressão maior encontra-se atualmente em primeiro lugar como causa de incapacidade civil mundial, e junto com os transtornos de ansiedade, gera um dispêndio anual de cerca de 1 trilhão de dólares para economia global (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). Entretanto, os eventos estressores podem desencadear diferentes níveis de respostas entre os indivíduos, como respostas resilientes,

na qual as alterações causadas pelo estresse são transitórias e adaptativas, e respostas suscetíveis, na qual a exposição ao estresse provoca alterações duradouras nos organismos, envolvidas na manifestação destes transtornos psiquiátricos.

Portanto, a compreensão dos mecanismos associados aos processos de resiliência ao estresse pode gerar conhecimento necessário para o desenvolvimento de terapias farmacológicas e não farmacológicas capazes de minimizar seus efeitos deletérios sobre o sistema nervoso. Assim, temos como hipótese que uma performance mais alta de aprendizado, memória espacial e flexibilidade cognitiva está associada a neuroplasticidade estrutural em regiões corticais envolvidas na adoção de estratégias de enfrentamento ao estresse mais bem-sucedidas, reduzindo seu impacto em comportamentos emocionais após o estresse crônico.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a associação entre a flexibilidade cognitiva basal e as estratégias de enfrentamento durante o estresse crônico de derrota social, e o comportamento social e emocional e a morfologia cortical após o estresse crônico de derrota social em camundongos machos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a flexibilidade cognitiva basal em camundongos machos;
- Avaliar se diferenças na flexibilidade cognitiva basal estão associadas ao uso de diferentes estratégias de enfrentamento durante o estresse crônico de derrota social em camundongos machos;
- Avaliar se diferenças na flexibilidade cognitiva basal estão associadas no comportamento de interação social após o estresse crônico de derrota social em camundongos machos;
- Verificar se diferenças na flexibilidade cognitiva basal estão associadas no comportamento emocional após o estresse crônico de derrota social em camundongos machos;
- Verificar se alterações na flexibilidade cognitiva basal estão associadas a alterações na morfologia do córtex pré-frontal (pré-límbico e infralímbico) após o estresse crônico de derrota social em camundongos machos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL6 (animais experimentais, 2 meses) fornecidos pelo Prof. Dr. Eduardo Luiz Gasnhar Moreira (Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas, UFSC), agrupados aleatoriamente em caixas de residência (41 x 31 x 16 cm, n = 10), e camundongos machos da linhagem *Swiss* (animais agressores, 4-6 meses) obtidos do biotério central da UFSC, agrupados em caixas de residência (41 x 31 x 16 cm, n = 8). Os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica em temperatura ambiente (20-22°C) com livre acesso à água e comida e ciclo claro-escuro de 12:12h (7h – 19h, ciclo claro). Os animais foram ambientados na sala de comportamento 12 horas antes do início dos testes. Os testes comportamentais foram realizados com iluminação vermelha ou indireta (30 lux) e gravados para análise posterior através do software ANY-maze. Todos os procedimentos foram aprovados previamente pelo Comitê de Ética no Uso de Animais e realizados de forma a minimizar o sofrimento (UFSC - CEUA nº 5290231120).

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os camundongos C57BL6 machos com 60 dias de idade (n = 41) foram submetidos ao teste cognitivo do labirinto aquático de Morris por um período de 8 dias para a avaliação da flexibilidade cognitiva, classificados em baixa e alta flexibilidade através da sua performance no teste. Após os testes cognitivos, os camundongos C57BL6 retornaram para suas caixas de residência no Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica por um intervalo de 14 dias para descanso. Um total de vinte e cinco animais C57BL6, escolhidos de forma aleatória dos grupos de baixa flexibilidade (N = 7) e alta flexibilidade (N = 18), foram submetidos ao protocolo de ECDS por 10 dias, tendo suas estratégias de enfrentamento avaliadas durante o contato físico com o animal agressor nos dias 1 e 10. Dezesesseis animais C57BL6 dos grupos de baixa flexibilidade (N = 6) e alta flexibilidade (N = 10) permaneceram nas suas caixas de residência no Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica como grupo controle.

Após o protocolo de ECDS foram obtidos os 4 grupos experimentais, Controle/Baixa flexibilidade (N = 6), Controle/Alta flexibilidade (N = 10), ECDS/Baixa flexibilidade (N = 7) e ECDS/Alta flexibilidade (N = 18). Vinte e quatro horas após o

protocolo de ECDS, foi realizado o teste de interação social para a avaliação do comportamento social. Vinte e quatro horas após o teste de interação social, os camundongos C57BL6 foram submetidos ao teste de suspensão pela cauda e ao teste do campo aberto. Vinte e quatro horas após o teste de suspensão pela cauda foi realizado o teste de borrifagem de sacarose. Os testes do campo aberto, suspensão pela cauda e borrifagem de sacarose, em conjunto, foram utilizados para avaliação do comportamento emocional. Os camundongos C57BL6 foram anestesiados e perfundidos 24 horas após a última avaliação comportamental para a avaliação da morfologia do córtex pré-frontal (PL e IL) através da técnica de Golgi (Figura 5).

Figura 5. Delineamento experimental

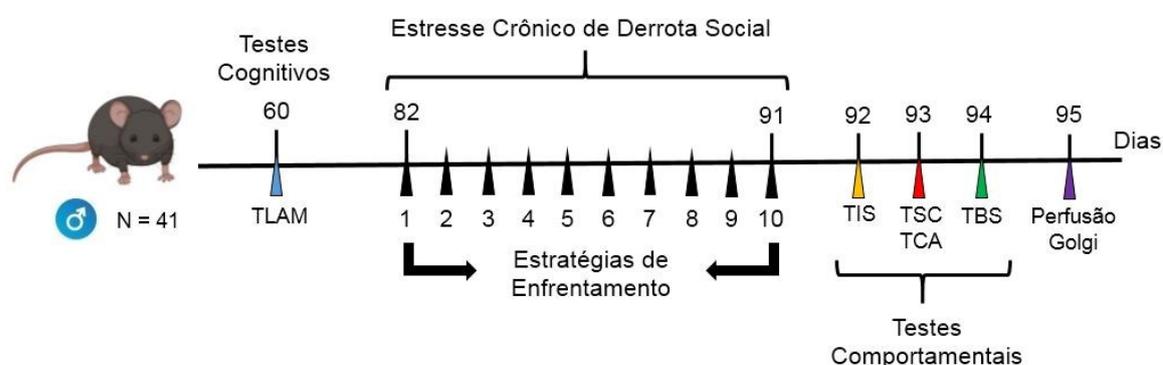


Figura 5. Camundongos C57B6 machos com 60 dias de idade foram submetidos ao teste do labirinto aquático de Morris por 8 dias para avaliação da flexibilidade cognitiva. Após 14 dias os animais foram divididos em controles e animais submetidos ao ECDS. O protocolo de estresse crônico de derrota social teve a duração de 10 dias, com os dias 1 e 10 filmados para avaliação das estratégias de enfrentamento. Após o protocolo de ECDS os animais foram submetidos aos testes de interação social, suspensão pela cauda, campo aberto e borrifagem de sacarose para avaliação do comportamento social e emocional. Após os testes comportamentais os animais foram perfundidos e os encéfalos foram removidos para avaliações da morfologia neuronal através da técnica de Golgi. Abreviações: TLAM – Teste do labirinto aquático de Morris; TIS – Teste de interação social; TSC – Teste de suspensão pela cauda; TCA – Teste do campo aberto; TBS – Teste de borrifagem de sacarose.

4.3 PROTOCOLO DE ESTRESSE

4.3.1. Estresse Crônico de Derrota Social

O ECDS consiste na exposição física e sensorial do animal experimental à um animal agressor por um período de 10 dias (GOLDEN et al., 2011). Camundongos *Swiss* machos com 4-6 meses de idade (agressores) foram isolados em caixas de residência de forma individual (41 x 31 x 16 cm) por 30 dias com o objetivo de aumentar o comportamento agressivo. Para avaliar o perfil agressivo foi realizado uma triagem de

agressividade, que consiste na exposição do animal agressor à um camundongo C57BL6 diferente a cada dia (usado apenas para a triagem dos agressores) durante 180 segundos por 3 dias consecutivos. Foram avaliados o número total de ataques e a latência para o primeiro ataque, sendo selecionados para o protocolo de ECDS os camundongos *Swiss* que obtiveram os maiores perfis de agressividade. Vinte e quatro horas antes do primeiro dia do protocolo de ECDS (dia 0) os camundongos *Swiss* selecionados foram alojados individualmente em caixas de residência retangular (26,7 cm x 48,3 cm x 15,2 cm) contendo um divisor perfurado transparente que separa fisicamente a caixa em duas partes.

Os camundongos C57BL6 (intrusos) dos grupos ECDS/Baixa flexibilidade (n = 7) e ECDS/Alta flexibilidade (n = 18) foram expostos a um camundongo *Swiss* agressor diferente por 10 dias consecutivos durante 10 minutos (estresse físico). Após cada período de estresse físico, os camundongos C57BL6 foram alocados no lado oposto do divisor da caixa para permitir o contato sensorial durante o restante do período de 24 horas (estresse sensorial). Nas sessões subsequentes de 10 dias do protocolo de ECDS, os camundongos C57BL6 foram expostos ao compartimento da caixa de um novo agressor. Os camundongos C57BL6 dos grupos Controle/Baixa flexibilidade (n = 6) e Controle/Alta flexibilidade (n = 10) permaneceram em caixas de residência no Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica durante o protocolo de ECDS agrupados em pares, com a formação de diferentes pares a cada dia do protocolo de ECDS. Cada camundongo C57BL6 experimental (n = 41) foi alojado individualmente após o último dia do protocolo de ECDS até a avaliação comportamental (GOLDEN et al., 2011).

4.3.2. Avaliação das estratégias de enfrentamento

Nos dias 1 e 10 do ECDS, durante o período de 10 minutos de contato físico entre os agressores e intrusos, foram avaliadas as estratégias de enfrentamento ao ataque. Os tipos de estratégias foram classificados entre ativas, que consistem em um comportamento de fuga, evitação ou defesa, e passivas, que consistem em um comportamento de imobilidade ou submissão. O comportamento de ataque foi classificado como uma interação direta agressiva ou persecutória do agressor para o intruso. O índice de enfrentamento ativo foi calculado através do total de comportamentos ativos subtraídos pelo total de comportamentos passivos, normalizados pelo número total de comportamentos ($\text{Ativo} - \text{Passivo} / \text{Total}$). O índice de enfrentamento passivo foi

calculado através do total de comportamentos passivos subtraídos pelo total de comportamentos ativos, normalizados pelo número total de comportamentos (Passivo – Ativo / Total) (LeCLAIR et al., 2021; GONI-BALENTZIAGA et al., 2019; WOOD e BHATNAGAR, 2015; PÉREZ-TEJADA et al., 2013).

4.4 TESTES COMPORTAMENTAIS

4.4.1 Testes cognitivos

4.4.1.1 *Teste do labirinto aquático de Morris*

O teste do labirinto aquático de Morris consiste na exposição dos animais a um tanque circular (110 cm de diâmetro e 100 cm de altura) contendo 50 cm de água (25 °C \pm 1 °C) com uma plataforma submersa (MORRIS, 1984). O tanque é dividido em 4 quadrantes (norte, sul, leste e oeste) e cada quadrante possui uma pista visual para orientação espacial (MULLER et al., 2010). Para avaliação da memória espacial, o teste iniciou com uma fase de aquisição (Figura 6), na qual os animais foram submetidos a uma sessão de treino por dia, durante 3 dias. Cada sessão de treino possuiu 4 tentativas com 1 hora de intervalo e os animais deveriam encontrar a plataforma, fixa no quadrante sudoeste, dentro de 60 segundos, partindo de quadrantes diferentes. Ao encontrar a plataforma, os animais permaneceram sobre ela por 20 segundos, sendo então retirados do tanque. Caso a plataforma não fosse encontrada dentro dos 60 segundos, os animais eram guiados até ela. A fase de teste ocorreu 24h após a fase de aquisição e os animais foram expostos ao tanque por 60 segundos sem a presença da plataforma. Como parâmetros de memória espacial e aprendizagem foram avaliados o tempo de permanência, tempo de latência e número de entradas no quadrante onde a plataforma estava durante as fases de aquisição e teste.

Posteriormente, para a avaliação da flexibilidade cognitiva, o teste seguiu com uma fase de flexibilidade, onde os animais foram submetidos a uma sessão de treino por dia, durante 4 dias. Cada sessão de treino possuiu 4 tentativas com 1 hora de intervalo e os animais deveriam encontrar a plataforma, que alterava de posição a cada dia (Dia 5 – Leste; Dia 6 – Oeste; Dia 7 – Norte; Dia 8 – Sul). Ao encontrar a plataforma, os animais permaneceram sobre ela por 20 segundos, sendo então retirados do tanque. Caso a plataforma não fosse encontrada dentro dos 60 segundos, os animais eram guiados até ela. Para avaliação da flexibilidade cognitiva foi utilizado a diferença dos tempos de latência entre as fases de flexibilidade (média dos dias 5 ao 8) e a fase de aquisição (dia

3) (NASCA et al., 2014; NUNEZ, 2008; BRUIN et al., 2001; BRUIN et al., 2000; MORRIS, 1984).

Figura 6. Protocolo para avaliação do aprendizado e flexibilidade cognitiva no teste do labirinto aquático de Morris

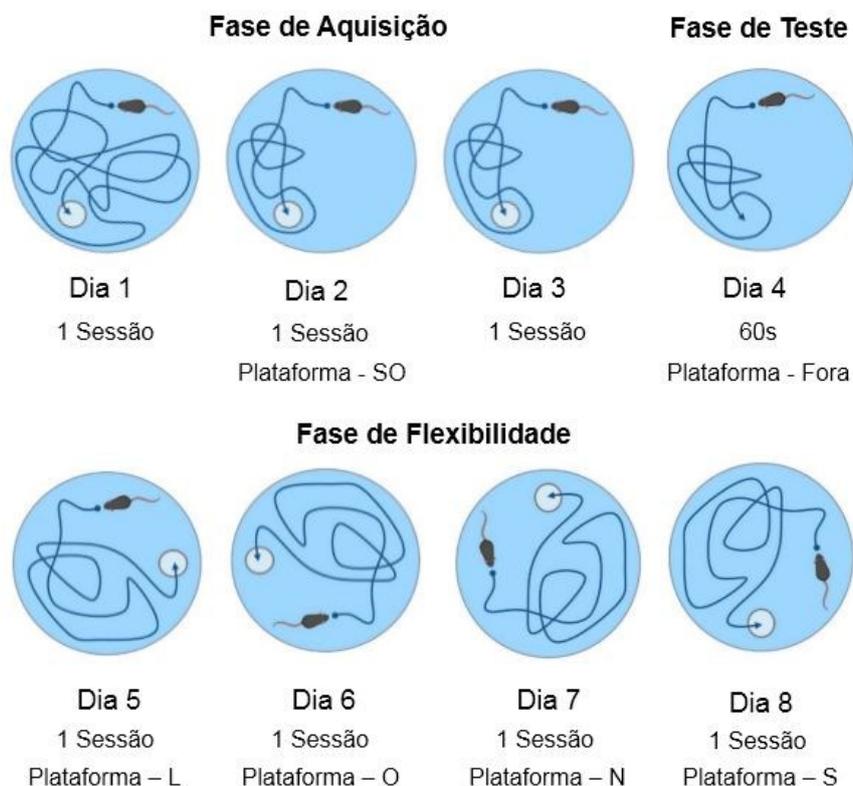


Figura 6. Os animais foram submetidos aos 3 dias de treinos com a plataforma fixa no quadrante sudoeste na fase de aquisição, seguidos da fase de teste para avaliação do aprendizado. Após a fase de aquisição os animais foram submetidos à fase de flexibilidade por 4 dias com a plataforma variando nos quadrantes leste, norte, oeste e sul. Abreviações SO – Sudoeste; L – Leste; N – Norte; O – Oeste; S – Sul (Fonte: o Autor).

4.4.2 Testes de comportamento emocional

4.4.2.1 *Teste de suspensão pela cauda*

O teste de suspensão pela cauda (TSC) é utilizado para avaliar o comportamento de resignação e consiste em aplicar uma situação de estresse inescapável ao animal, na qual ele é suspenso do chão e preso pela cauda por uma fita adesiva por 6 minutos (CAN et al., 2012; STERU et al., 1985). O tempo de imobilidade do animal, considerado como a falta de tentativa de escapar da situação aversiva, e o tempo de latência para iniciar a imobilidade, considerado uma resposta comportamental motivada, foram mensurados e utilizados como parâmetros para compor o comportamento emocional (NEIS et al., 2015).

4.4.2.2 *Teste do campo aberto*

O teste do campo aberto (TCA) consiste na avaliação da atividade locomotora espontânea e exploração voluntária dos animais. O aparato consiste em uma caixa de madeira branca (40 cm x 40 cm x 40 cm), no qual o chão é dividido em 12 quadrantes iguais. O animal foi exposto por 5 minutos ao campo aberto e foram avaliadas a distância total percorrida, considerado um parâmetro locomotor espontâneo devido ao comportamento exploratório de roedores, e o tempo total e o número de entradas no centro do aparato, considerados parâmetros para avaliação de um comportamento tipo-ansioso devido ao comportamento de roedores de explorar ambientes desconhecidos preferencialmente de maneira periférica. Os parâmetros de comportamento tipo-ansioso foram utilizados para compor o comportamento emocional. O aparato foi limpo com uma solução de etanol 10% entre cada sessão de teste (NEIS et al., 2015; BAILEY E CRAWLEY, 2009; PRUT e BELZUNG, 2003).

4.4.2.3 *Teste de borrifagem de sacarose*

O teste de borrifagem de sacarose (TBS) consiste em alocar o animal em um cilindro transparente por 5 minutos e borrifar uma solução de 10% de sacarose em seu dorso. Devido à viscosidade da solução, os roedores tendem a iniciar um comportamento de autolimpeza, considerado um indicador de autocuidado, em conjunto com um comportamento de recompensa devido à sacarose ser um alimento palatável aos roedores. Os animais foram ambientados ao cilindro transparente por 1 minuto, borrifados com a solução de sacarose e avaliados por 5 minutos. A latência para o início do comportamento de autolimpeza e o tempo de autocuidado, considerados uma resposta comportamental motivada, foram utilizados como parâmetros para compor o comportamento emocional. O aparato foi limpo com uma solução de etanol 10% entre cada sessão de teste (KASTER et al., 2015; ISINGRINI et al., 2010).

4.4.2.4 *Teste de interação social*

O teste de interação social (TIS) é baseado no paradigma agressor/intruso apresentado no protocolo de ECDS e consiste em expor o animal experimental à um animal agressor semelhante ao utilizado no ECDS, porém desconhecido (GOLDEN et al., 2011). O TIS foi composto por duas etapas em um aparato adaptado de campo aberto (42 cm x 42 cm x 42 cm) contendo um cilindro móvel de plástico perfurado, apoiado em uma

de suas paredes. O aparato é dividido em diferentes zonas, a zona de interação (14 x 24 cm) se localiza em volta do cilindro móvel de plástico perfurado que contém o animal agressor. A zona de canto (42 x 9 cm) se localiza na parede oposta à do cilindro móvel (Figura 7). Na primeira etapa, o camundongo intruso foi colocado no centro do aparato com o cilindro móvel vazio por 150 segundos. Após um intervalo de 30 segundos foi iniciada a segunda etapa, na qual foi colocado um camundongo *Swiss* desconhecido (agressor) dentro do cilindro móvel e o mesmo camundongo intruso foi recolocado no aparato por 150 segundos.

Figura 7. Esquema do aparato para teste de interação social



Figura 7. Esquema do aparato para teste de interação social com as representações das zonas de interação (azul), e canto (vermelho), valores em centímetros (Fonte: o Autor).

O índice de interação social (IS) foi calculado através do tempo total na zona de interação na presença do animal agressor dividido pelo tempo total na zona de interação na ausência do animal agressor. O índice de entradas na zona de interação foi calculado através do número de entradas na zona de interação na presença do animal agressor menos o número de entradas na zona de interação na ausência do animal agressor. O tempo total na zona de canto foi calculado através do tempo total na zona de canto na presença do animal agressor dividido pelo tempo total na zona de canto na ausência do animal

agressor. Foram utilizados para avaliar a interação social os parâmetros índice de interação social, índice de entradas na zona de interação, tempo total na zona de canto e distância total percorrida. O aparato foi limpo com uma solução de etanol 10% entre cada sessão de teste (GRAFE et al., 2020; NASCA et al., 2019; HIGASHIDA et al., 2018; OIZUMI et al., 2018; GOLDEN et al., 2011).

4.5 ANÁLISES HISTOQUÍMICAS

4.5.1 Preparações das amostras e impregnação com Golgi

Os animais C57BL6 foram anestesiados com cetamina/xilazina (100 mg/kg e 10 mg/kg) por injeção intraperitoneal e perfundidos com solução salina 0,9% 24 horas após o término dos testes comportamentais. Após a perfusão os encéfalos foram removidos e depositados em frascos contendo 20ml de solução de Golgi, trocados por uma solução nova 24 horas depois e armazenados no escuro à temperatura ambiente por 14 dias para impregnação. Após o período de impregnação os encéfalos foram transferidos para solução de sacarose 30% para saturação e lavagem da solução de Golgi, foram realizadas 3 trocas de sacarose com um intervalo de 21 dias entre cada troca. Após o período de saturação por sacarose os encéfalos foram fatiados por secções coronais de 200 µm com a utilização de um vibrátomo (Vibratome®, Série 1000, St. Louis, MO, EUA). As fatias foram montadas em lâminas gelatinizadas em 2% e armazenadas em ambiente escuro para secagem e fixação. Após o período de secagem as lâminas foram desidratadas através da sequência: água destilada (1 min), hidróxido de amônio (30 min), água destilada (1 min), Kodak (30 min), água destilada (1 min), 50% etanol (1 min), 70% de etanol (1 min), 95% etanol (1 min), 100% etanol (10 min), 100% etanol/xilol (1:1 por 10 min) e xilol (20 min), finalizadas com a colagem da lamínula por Entellan e armazenadas em ambiente escuro para análises morfológicas. (KANNANGARA et al., 2014).

As análises morfológicas foram realizadas em neurônios piramidais das camadas II, III e V do córtex pré-frontal (PL e IL) localizados na porção anterior do Bregma (+2mm), através de um microscópio invertido, conforme Figura 8A. Foram selecionados neurônios piramidais que possuíam impregnação consistente, pouca sobreposição e distinguíveis de células adjacentes, com extensão e ramificações dendríticas delimitadas (FRAGA et al., 2020; GIACHERO et al., 2015; RISHER et al., 2014).

4.5.2 Análises de Sholl

As avaliações das ramificações dendríticas dos neurônios piramidais do córtex pré-frontal foram realizadas através da análise de Sholl, que consiste em traçar intervalos concêntricos de 10 μm a partir do soma. Os parâmetros utilizados foram o comprimento dos dendritos (distância máxima), a média total de ramificações e a quantidade de intersecções por raio. Foram selecionados 8 neurônios piramidais das camadas II, III e V do córtex pré-frontal (PL e IL) por animal para cada grupo ($n = 4$) conforme especificações citadas anteriormente. As fatias foram analisadas em um microscópio invertido, com ampliação de 40x em imagens 3D feitas em Z-stack. Para análise de Sholl foi utilizado o programa Image J (NIH), plugin *Simple Neurite Tracer* (SNT), na qual os neurônios são traçados manualmente e o programa cria uma representação 3D com os intervalos concêntricos de 10 μm partindo do centro do soma para análise automática do comprimento, quantidade e intersecções por raio (Figura 8B, C e D) (FRAGA et al., 2020; BIRD e CUNTZ, 2019; OLESCOWICZ et al., 2018; BINLEY et al., 2014; FERREIRA et al., 2014; GENSEL et al., 2010).

Figura 8. Representação da localização encefálica do córtex pré-frontal (PL e IL) e configurações para análise de Sholl

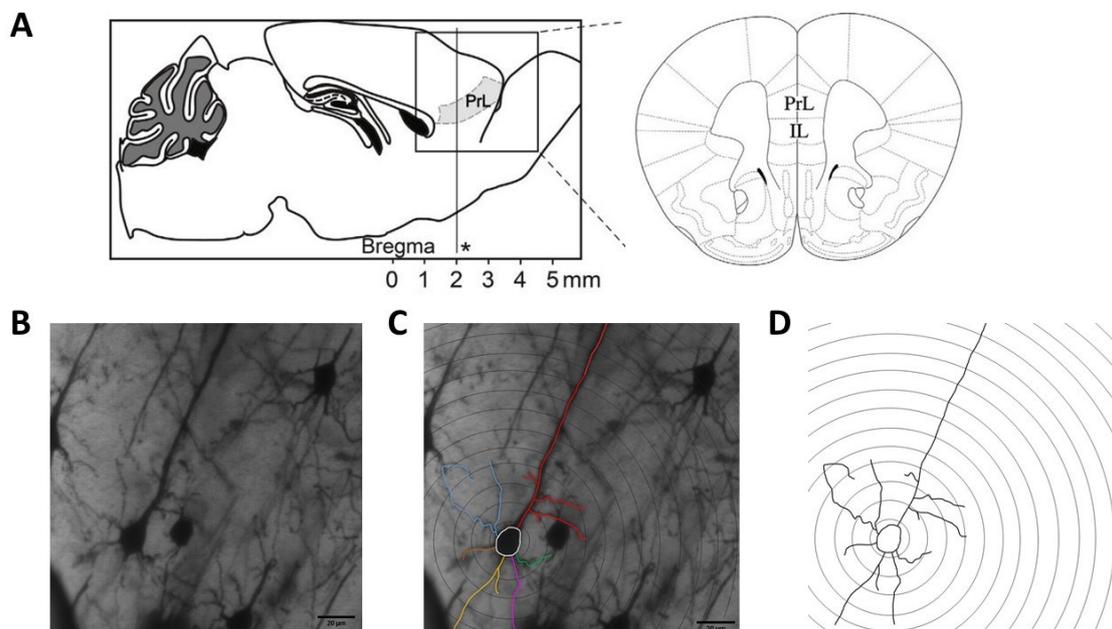


Figura 8. Representação de um corte longitudinal do encéfalo de roedores com a localização do córtex pré-frontal (PL) destacado a partir do Bregma +2mm (A – Esquerda). Representação de um corte coronal do encéfalo de roedores com a localização do córtex pré-frontal (PL e IL) destacado (A – Direita). Representação de um neurônio piramidal do córtex pré-frontal medial de roedores (B). Representação dos traçados realizados manualmente e aplicação das circunferências

geradas automáticas pelo programa Image J SNT para análise de Sholl (C). Ilustração dos traçados e circunferências isoladas para análise de Sholl (D) (Adaptado de DIK et al., 2018 (A – Esquerda); CHOHAN et al., 2014 (A – Direita); o Autor (B, C e D).

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram avaliados utilizando os *softwares* GraphPad Prism 7® e Statistica 7®. A distribuição normal dos dados foi avaliada através do teste de Shapiro-Wilk para escolha do teste estatístico adequado. Os valores *outliers* foram identificados através do programa GraphPad QuickCalcs® e removidos das análises. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.

4.6.1 Análises estatísticas para avaliação do aprendizado e flexibilidade cognitiva

Para a análise da curva de aprendizado na fase de aquisição foi utilizado a análise de variância (ANOVA) de uma via de medidas repetidas, seguido pelo *post-hoc* de Tukey quando apropriado. Para a fase de teste da fase de aquisição foi utilizado o teste t de Student comparando a média dos tempos no teste versus o valor do tempo total do teste dividido pelo número de quadrantes (15 segundos). Para avaliar a flexibilidade cognitiva foi utilizado a abordagem estatística na qual os animais que mantiveram uma performance durante fase de flexibilidade dentro da média + 1 desvio padrão da fase de aquisição (dia 3) foram classificados como alta flexibilidade. Os animais que marcaram um tempo de latência superior à média + 1 desvio padrão da fase de aquisição (dia 3) foram classificados como baixa flexibilidade.

4.6.2 Análises estatísticas para avaliação do comportamento social e emocional

Para avaliação do número de ataques dos agressores foi utilizado o teste t de Student comparando a média do número de ataques do dia 1 versus a média do número de ataques do dia 10. Para as análises das estratégias de enfrentamento, interação social e testes de suspensão pela cauda, borrifagem por sacarose e campo aberto foi utilizado a ANOVA de duas vias, seguido pelo *post-hoc* de Tukey quando apropriado. Para as análises de correlação foi realizado o teste de correlação de Pearson seguido da regressão linear. Posteriormente os testes de suspensão pela cauda, borrifagem por sacarose e campo aberto foram avaliados através da análise de Score-Z e compilados para formar o comportamento emocional integrado (GUILLOUX et al., 2011).

Para análise de Score-Z foram selecionados 2 parâmetros de cada teste: tempo total de imobilidade (TTI) e tempo de latência para imobilidade (TLI) (teste de suspensão pela cauda - TSC), tempo de latência para autolimpeza (TLA) e tempo total de autolimpeza (TTA) (teste de borrifagem de sacarose - TBS) e tempo total no centro (TTC) e número de entradas no centro (NEC) (teste do campo aberto - TCA).

Para análise de Score-Z, cada parâmetro do comportamento emocional avaliado foi convertido através da equação: dado individual (X) menos média do grupo controle (μ) dividido pelo desvio padrão do grupo controle (σ). A direcionalidade dos valores foi corrigida para que scores positivos indiquem um maior prejuízo da performance comportamental nos parâmetros emocionais avaliados.

$$Score\ Z = \frac{X - \mu}{\sigma}$$

Para integrar os parâmetros de Score-Z de cada teste foi utilizado a seguinte equação: Score-Z parâmetro 1 mais Score-Z parâmetro 2 dividido pelo número de parâmetros.

$$Score\ Z\ TSC = \frac{Score\ Z\ TTI + Score\ Z\ TLI}{2}$$

$$Score\ Z\ TBS = \frac{Score\ Z\ TLA + Score\ Z\ TTA}{2}$$

$$Score\ Z\ TCA = \frac{Score\ Z\ TTC + Score\ Z\ NEC}{2}$$

Posteriormente, para calcular o valor do comportamento emocional integrado de cada animal foram utilizados os valores somados de Score-Z de cada teste divididos pelo número de testes.

$$Score\ Z\ Comportamento\ Emocional = \frac{Score\ Z\ TSC + Score\ Z\ TBS + Score\ Z\ TCA}{3}$$

4.6.3 Análises estatísticas para avaliação da morfologia neuronal

Para a avaliação da morfologia neuronal foi utilizada a análise de Sholl. Para as análises do comprimento e número de ramificações dos dendritos de neurônios piramidais das camadas II, III e V foram utilizadas a ANOVA de duas vias, seguido pelo *post-hoc* de Tukey quando apropriado. Para a análise quantidade das intersecções por raio foi utilizada a ANOVA de medidas repetidas, seguido pelo *post-hoc* de Tukey quando apropriado.

5. RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DO APRENDIZADO E FLEXIBILIDADE COGNITIVA

A ANOVA de uma via de medidas repetidas [$F(40, 80) = 2,825$ $p < 0,0001$] demonstra um efeito significativo do número de dias de treinamento sobre o tempo de latência para localizar a plataforma. A análise de *post-hoc* indicou que, na fase de aquisição, os animais demonstraram uma diminuição significativa no tempo de latência para localizar a plataforma no dia 2 ($p < 0,0001$) quando comparados ao dia 1, e no dia 3 ($p < 0,001$), quando comparado ao dia 2. Na fase de teste os animais permaneceram um tempo significativamente maior no quadrante correto [$t=5,260$ $df=40$, $p < 0,0001$] quando comparados ao tempo do teste dividido pelo número de quadrantes (15 segundos por quadrante), conforme ilustrado na Figura 9A, indicando que a fase de aquisição foi eficiente para o aprendizado dos animais. A Figura 9B ilustra a fase de flexibilidade e a distribuição dos tempos de latência para localizar a plataforma de cada animal nos dias 5, 6, 7, 8, bem como a média e erro padrão da média dos tempos obtidos nos dias 5, 6, 7 e 8. Estes valores foram utilizados para classificar a performance e delinear a flexibilidade cognitiva dos animais conforme os resultados a seguir.

Figura 9. Avaliação do aprendizado e da flexibilidade cognitiva basal no teste do labirinto aquático de Morris

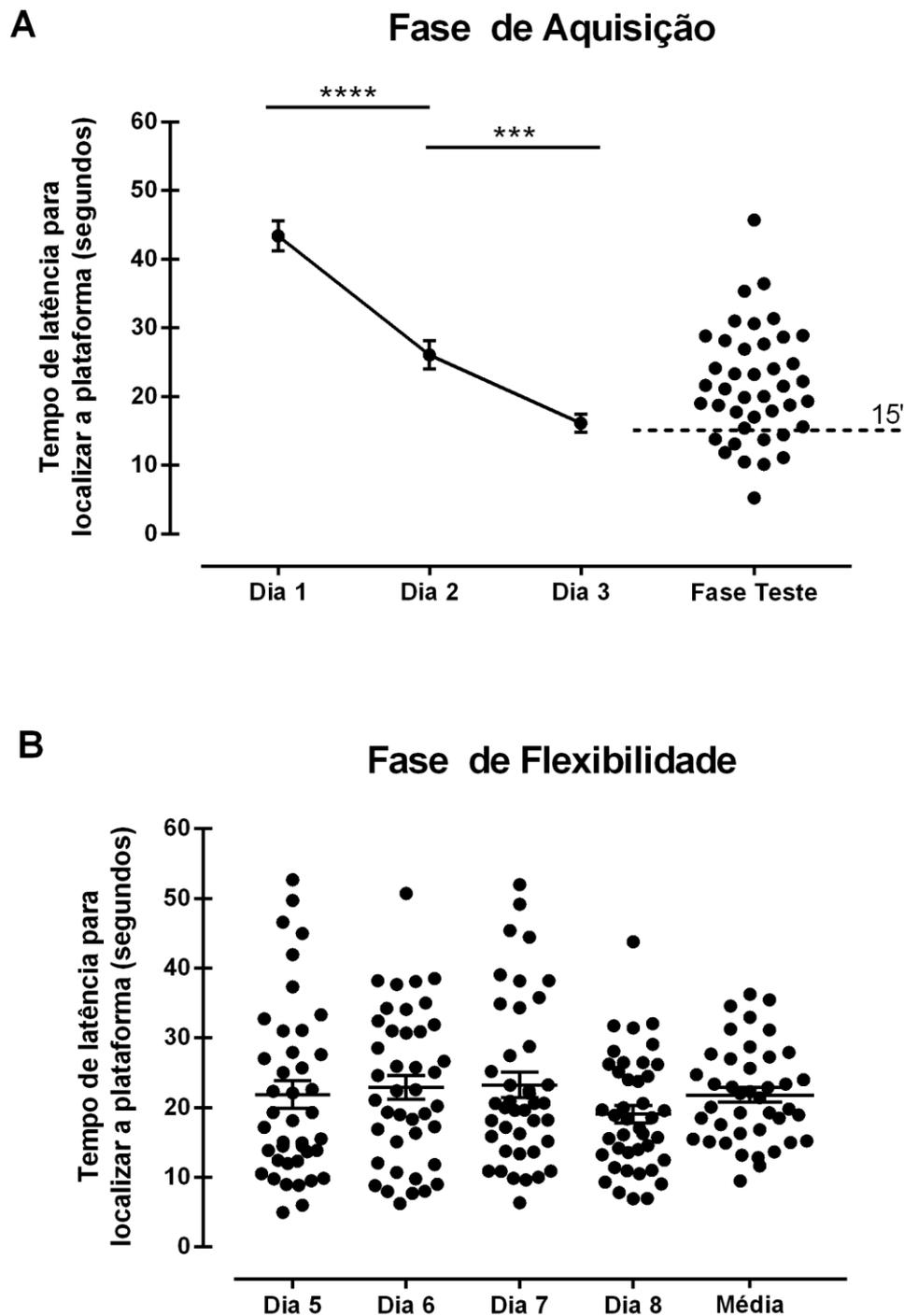


Figura 9. Avaliação do aprendizado durante a fase de aquisição mensurado pelo tempo de latência em localizar a plataforma (dias 1, 2 e 3) e pelo tempo de permanência no quadrante correto na fase de teste no teste do labirinto aquático de Morris (A). Distribuição dos tempos de latência para localizar a plataforma durante a fase de flexibilidade (dias 5, 6, 7 e 8) e a média destes valores (B). Os valores estão expressos como valores individuais e/ou média \pm erro padrão da média. **** $p < 0,0001$ *post-hoc* de Tukey da diferença entre o dia 2 e dia 1. *** $p < 0,001$ *post-hoc* de Tukey da diferença entre o dia 3 e dia 2. $N = 41$.

Os resultados da Figura 10 demonstram a metodologia utilizada para classificar a flexibilidade cognitiva dos animais. Através da ANOVA de uma via é possível observar uma diferença significativa entre os grupos nos tempos de latência para localizar a plataforma [$F(3, 119) = 16,10, p < 0,0001$]. A análise de *post-hoc* revelou que o tempo de latência para localizar a plataforma durante a fase de flexibilidade é significativamente maior do que tempo de latência para localizar a plataforma durante o terceiro dia da fase de aquisição ($p < 0,01$), indicando que existe uma diferença no aprendizado dos animais entre o terceiro dia da fase de aquisição e a média de aprendizado da fase de flexibilidade.

Para aplicar a metodologia de separação das performances no teste nós utilizamos a média e o desvio padrão de todos os animais do terceiro dia de aquisição e a média de cada animal nos 4 dias de flexibilidade (dias 5, 6, 7 e 8). Foi possível observar animais que mantiveram um tempo de latência médio para localizar a plataforma durante fase de flexibilidade dentro da média do terceiro dia de aquisição + 1 desvio padrão (Figura 10 – grupo alta flexibilidade, $n = 28$, pontos verdes). Por outro lado, um outro grupo de animais teve um tempo de latência médio para localizar a plataforma durante fase de flexibilidade superior à média + 1 desvio padrão do terceiro dia de aquisição (Figura 10 – grupo baixa flexibilidade, $n = 13$, pontos vermelhos). Assim, os animais foram divididos em dois grupos, um grupo chamado de baixa flexibilidade, e um grupo de alta flexibilidade, que são significativamente diferentes entre si ($p < 0,0001$). Além disso, o grupo com baixa flexibilidade apresenta um tempo de latência significativa ($p < 0,0001$) maior quando comparados à fase de aquisição (dia 3), o que não é observado no grupo com alta flexibilidade ($p = 0,6902$).

Figura 10. Classificação da flexibilidade cognitiva conforme performance no teste do labirinto aquático de Morris

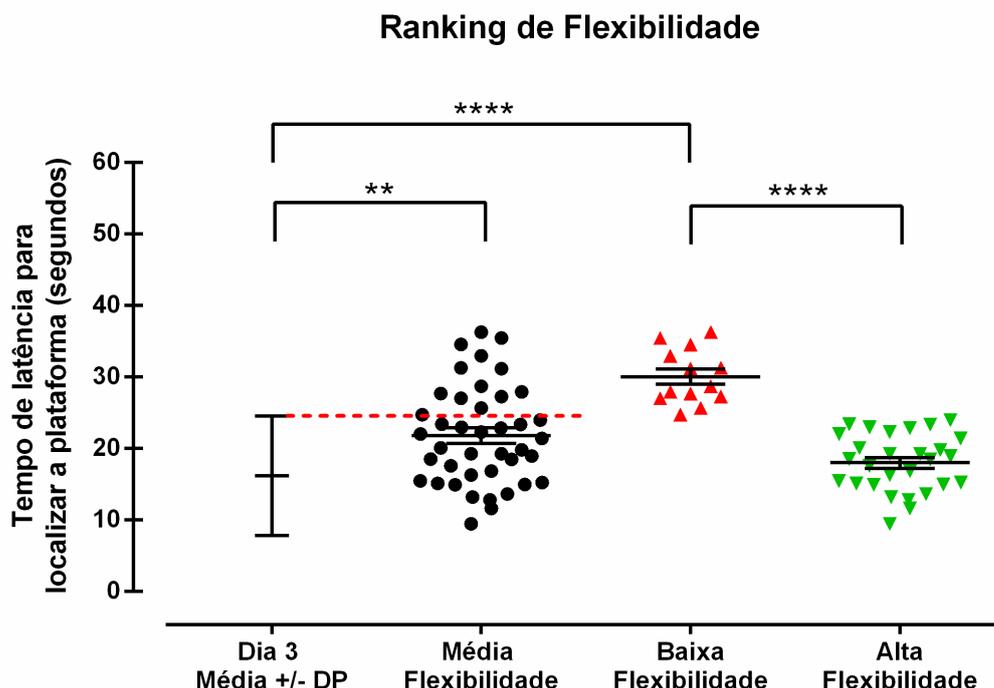


Figura 10. Classificação da flexibilidade cognitiva conforme o tempo de latência para localizar a plataforma durante fase de flexibilidade (média flexibilidade) em comparação ao dia 3 da fase de aquisição (dia 3 média +/- Desvio Padrão). Os valores do Dia 3 estão expressos como média de todos os animais e desvio padrão. Os grupos: média flexibilidade, baixa flexibilidade e alta flexibilidade estão expressos como valores individuais e média \pm erro padrão da média. Pontos pretos – distribuição dos tempos de latência na fase de flexibilidade, N = 41; Pontos vermelhos - distribuição dos tempos de latência do grupo baixa flexibilidade, N = 13; Pontos verdes – distribuição dos tempos de latência do grupo alta flexibilidade, N = 28. ** $p < 0,01$ *post-hoc* de Tukey da diferença entre o dia 3 média +/- DP e média flexibilidade. **** $p < 0,0001$ *post-hoc* de Tukey da diferença entre os grupos alta flexibilidade e dia 3 média +/- DP em comparação ao grupo baixa flexibilidade.

5.2 ASSOCIAÇÃO ENTRE A FLEXIBILIDADE COGNITIVA E AS ESTRATÉGIAS DE ENFRENTAMENTO AO ECDS

Para avaliar as estratégias de enfrentamento ao estresse foram analisados os comportamentos ativos e passivos durante os dias 1 e 10 do protocolo de ECDS. A Figura 11A ilustra o índice de enfrentamento ativo, que avalia os comportamentos ativos de enfrentamento dos animais como fuga, evitação ou defesa. A ANOVA de duas vias utilizou como variáveis independentes a flexibilidade cognitiva e dia de interação social, e como variável dependente o score do índice de enfrentamento ativo. Os resultados não demonstraram um efeito significativo da flexibilidade cognitiva [$F(1, 45) = 1,084$, $P =$

0,3033], ou dos dias de interação social [$F(1, 45) = 2,805, P = 0,1009$]. Entretanto foi demonstrado um efeito significativo da interação entre flexibilidade cognitiva e dias de interação [$F(1, 45) = 5,667, P = 0,0216$]. A análise de *post-hoc* revelou que apenas o grupo de alta flexibilidade cognitiva diminuiu significativamente seu índice de enfrentamento ativo do dia 1 para o dia 10 ($p < 0,01$), indicando uma alteração nas suas estratégias de enfrentamento, enquanto o grupo de baixa flexibilidade manteve suas estratégias de enfrentamento ativas constantes nos dias 1 e 10 ($p = 0,9895$).

A Figura 11B ilustra o índice de enfrentamento passivo dos animais, que observa comportamentos de imobilidade e submissão. A ANOVA de duas vias não demonstrou efeito significativos da flexibilidade cognitiva [$F(1, 45) = 1,084, P = 0,3033$], ou dos dias de interação social [$F(1, 45) = 2,805, P = 0,1009$], contudo foi demonstrado um efeito significativo da interação entre flexibilidade cognitiva e dias de interação [$F(1, 45) = 5,667, P = 0,0216$]. A análise de *post-hoc* revelou que apenas o grupo de alta flexibilidade cognitiva teve seu índice de enfrentamento passivo reduzido do dia 1 para o dia 10 ($p < 0,01$), apontando uma modificação em suas estratégias de enfrentamento ao estresse, enquanto o grupo de baixa flexibilidade manteve suas estratégias de enfrentamento passivas constantes nos dias 1 e 10 ($p = 0,9895$). Estes resultados indicam que os animais de alta flexibilidade alteram suas estratégias de enfrentamento de ativas para passivas ao longo dos 10 dias de protocolo de ECDS e que os animais de baixa flexibilidade não modificam suas estratégias de enfrentamento adotadas no início do protocolo até o final. A Figura 11C indica o número de ataques realizados pelos animais agressores durante os dias 1 e 10 do protocolo de ECDS. Os animais agressores reduziram significativamente o número total de ataques realizados durante o dia 10 de ECDS [$t=9,707, df=24, p < 0,0001$] quando comparados ao dia 1 de ECDS, sugerindo que ao longo do protocolo de ECDS os animais agressores reduzem o número total de ataques.

Figura 11. Índices das estratégias de enfrentamento ao estresse crônico de derrota social (ECDS) e número total de ataques

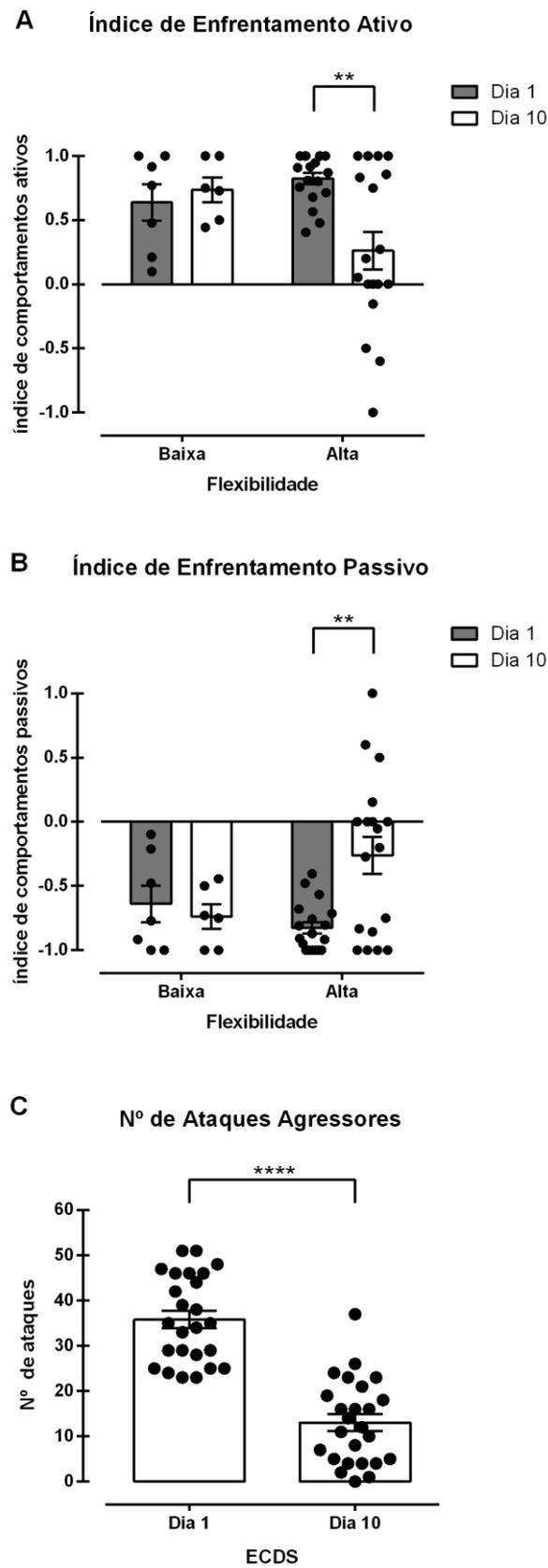


Figura 11. Índices das estratégias ativas de enfrentamento ao ECDS avaliadas pelos comportamentos de fuga, evitação ou defesa (A). Índices das estratégias passivas de enfrentamento ao estresse crônico de derrota social avaliadas pelos comportamentos de imobilidade ou submissão (B). Os scores foram feitos nos dias 1 e 10 do protocolo de ECDS. O índice de enfrentamento ativo foi calculado através do total de comportamentos ativos subtraídos pelo total de comportamentos passivos, normalizados pelo número total de comportamentos. O índice de enfrentamento passivo foi calculado através do total de comportamentos passivos subtraídos pelo total de comportamentos ativos, normalizados pelo número total de comportamentos. Número total de ataques realizados pelos animais agressores durante os dias 1 e 10 do ECDS (C). Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média. ** $p < 0,01$ *post-hoc* de Tukey da diferença entre os dias 1 e 10 do grupo de alta flexibilidade para os índices de enfrentamento ativo (A) e passivo (B). **** $p < 0,0001$ *teste t* de Student comparando o número de ataques dos agressores no dia 1 e 10 do ECDS (C). Baixa flexibilidade N = 7; Alta flexibilidade N = 18.

5.3 ASSOCIAÇÃO ENTRE A FLEXIBILIDADE COGNITIVA E O COMPORTAMENTO SOCIAL APÓS O ECDS

Para avaliação da sociabilidade dos animais foi utilizado o índice de interação social conforme os tempos na zona de interação e nos cantos, no teste de interação social. No teste, o animal experimental é exposto a um animal agressor que ele nunca teve contato antes. A Figura 12A indica o índice de interação social na zona de interação, calculado através do tempo na zona de interação na presença do alvo dividido pelo tempo na zona de interação na ausência do alvo (animal agressor). A ANOVA de duas vias utilizou como variáveis independentes a flexibilidade cognitiva e o ECDS, e como variável dependente o índice de interação social. A ANOVA revelou um efeito significativo para a flexibilidade cognitiva [$F(1, 37) = 7,460, P = 0,0096$], mas não para o ECDS [$F(1, 37) = 0,1083, P = 0,7439$], ou para interação entre o ECDS e a flexibilidade cognitiva [$F(1, 37) = 3,179e-005, P = 0,9955$]. A análise de *post-hoc* não revelou diferenças significativas entre os grupos. A Figura 12B demonstra o Índice de entradas na zona de interação calculado pelo número de entradas na zona de interação na presença do alvo dividido pelo número de entradas na zona de interação na ausência do alvo. A ANOVA de duas vias utilizando a variável número de entradas na zona de interação, demonstrou um efeito significativo para a flexibilidade cognitiva [$F(1, 35) = 11,44, P = 0,0018$], mas não para o ECDS [$F(1, 35) = 0,5337, P = 0,4699$], ou para interação entre o ECDS e a flexibilidade cognitiva [$F(1, 35) = 1,655, P = 0,2067$]. Contudo, a análise de *post-hoc* não revelou diferenças significativas entre os grupos. Pelo resultado da ANOVA das figuras 12A e 12B, podemos sugerir que a flexibilidade cognitiva alta está associada uma menor interação com o animal agressor, independente do protocolo de ECDS.

A Figura 12C ilustra o índice de permanência na zona de canto, calculado através do tempo na zona de canto na presença do alvo dividido pelo tempo na zona de canto na ausência do alvo. A ANOVA de duas vias não demonstrou resultados significativos para o ECDS [$F(1, 35) = 0,03880$, $P = 0,8450$], para a flexibilidade cognitiva [$F(1, 35) = 0,3396$, $P = 0,5638$], ou para a interação entre o ECDS e a flexibilidade cognitiva [$F(1, 35) = 0,01212$, $P = 0,9130$], sugerindo que nem o ECDS ou a flexibilidade cognitiva causam alterações no tempo de permanência na zona de canto. A Figura 12D indica a distância total percorrida pelos animais na presença do alvo (animal agressor). A ANOVA de duas vias não demonstrou resultados significativos para o ECDS [$F(1, 37) = 1,523$, $P = 0,2249$], para a flexibilidade cognitiva [$F(1, 37) = 0,1452$, $P = 0,7053$], ou para a interação entre o ECDS e a flexibilidade cognitiva [$F(1, 37) = 0,3930$, $P = 0,5346$], sugerindo que o ECDS e a flexibilidade cognitiva não promovem alterações na distância total percorrida. A Figura 12E ilustra a correlação entre a flexibilidade cognitiva e a interação social. A análise de correlação demonstrou um efeito significativo, porém fraco ($p = 0,0072$, $R^2 = 0,1711$) da flexibilidade cognitiva sobre a interação social. A regressão linear ($Y = 0,06253 * X + 0,2651$) indica a relação entre a flexibilidade cognitiva e a interação social, sugerindo que existe uma correlação positiva entre a flexibilidade cognitiva sobre a interação social.

interação (B) calculado pela ANOVA de duas vias. Controle/Baixa flexibilidade N = 6; Controle/Alta flexibilidade N = 10; ECDS/Baixa flexibilidade N = 7; ECDS/Alta flexibilidade N = 18.

5.4 AVALIAÇÕES DA ASSOCIAÇÃO ENTRE A FLEXIBILIDADE COGNITIVA E O COMPORTAMENTO EMOCIONAL APÓS O ECDS

Para avaliar o comportamento emocional dos animais foram utilizados os testes comportamentais de suspensão pela cauda, borrifagem de sacarose e campo aberto. Os testes emocionais foram normalizados e compilados através do Score-Z, que permite agrupar diferentes aspectos e parâmetros do comportamento emocional dos animais em um único parâmetro.

5.4.1 Teste de suspensão pela cauda

Como parâmetros do comportamento emocional foram utilizados os critérios de tempo de imobilidade e latência para imobilidade, avaliados pelo teste de suspensão pela cauda. Com relação ao tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda, Figura 13A, a ANOVA de duas vias não demonstrou efeitos significativos para o ECDS [F (1, 37) = 2,649, P = 0,1121], para a flexibilidade cognitiva [F (1, 37) = 0,4699, P = 0,4973, ou para a interação entre o ECDS e a flexibilidade cognitiva [F (1, 37) = 0,1094, P = 0,7427], indicando que nem as diferenças na flexibilidade cognitiva e o ECDS causam uma alteração no tempo de imobilidade dos animais.

De acordo com a Figura 13B, os animais de alta flexibilidade cognitiva demonstraram um maior tempo de latência para a imobilidade em comparação aos animais de baixa flexibilidade cognitiva, independente do ECDS. A ANOVA de duas vias demonstrou um efeito significativo para a flexibilidade cognitiva [F (1, 37) = 4,476, P = 0,0412], mas não para o ECDS [F (1, 37) = 0,3934, P = 0,5344] ou para a interação entre a flexibilidade cognitiva e o ECDS [F (1, 37) = 3,982, P = 0,0534]. A análise de *post-hoc* revelou que o grupo controle de alta flexibilidade cognitiva apresentou um tempo de latência para a imobilidade significativamente maior que o grupo controle de baixa flexibilidade cognitiva ($p < 0,05$), indicando que a flexibilidade cognitiva basal está associada a um tempo de latência maior para a imobilidade. Contudo, esse efeito não foi observado nos animais submetidos ao ECDS ($p = 0,9997$). A Figura 13C ilustra os parâmetros de tempo de imobilidade e tempo de latência para imobilidade compilados

através do Score-Z, formando o Score-Z para o teste de suspensão pela cauda. A ANOVA de duas vias não demonstrou efeito significativo para o ECDS [$F(1, 37) = 0,6000, P = 0,4435$], para a flexibilidade cognitiva [$F(1, 37) = 2,478, P = 0,1239$] ou para a interação entre o ECDS e a flexibilidade cognitiva [$F(1, 37) = 2,476, P = 0,1241$], sugerindo que quando compilados através do Score-Z, os parâmetros avaliados pelo teste de suspensão pela cauda não demonstram resultados significativos.

Figura 13. Avaliação dos parâmetros emocionais através do teste de suspensão pela cauda

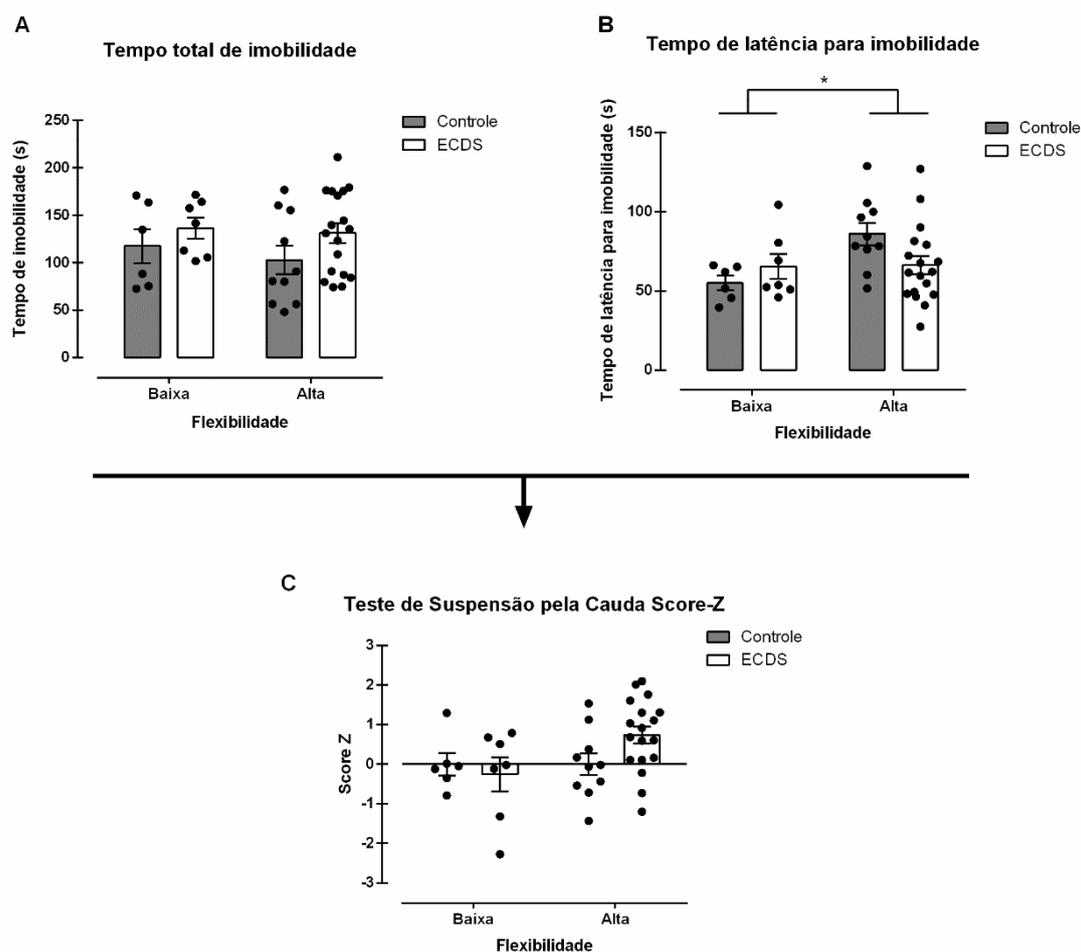


Figura 13. Avaliação dos parâmetros emocionais de tempo total de imobilidade (A) e tempo de latência para a imobilidade (B) no teste de suspensão pela cauda. Compilação dos parâmetros emocionais normalizados através do Score-Z para formação do Score-Z do teste de suspensão pela cauda (C). Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ efeito da flexibilidade cognitiva no tempo de latência para imobilidade pela ANOVA de duas vias (B). Controle/Baixa flexibilidade $N = 6$; Controle/Alta flexibilidade $N = 10$; ECDS/Baixa flexibilidade $N = 7$; ECDS/Alta flexibilidade $N = 18$.

5.4.2 Teste de borrifagem de sacarose

Como parâmetros do comportamento emocional foram utilizados os critérios de tempo de latência e tempo total de autolimpeza, avaliados pelo teste de borrifagem de sacarose. Conforme ilustrado pela Figura 14A, não houve alterações no tempo de latência dos animais. A ANOVA de duas vias não demonstrou efeitos significativos para o ECDS [F (1, 36) = 0,9325, P = 0,3406], para a flexibilidade cognitiva [F (1, 36) = 0,007598, P = 0,9310] ou para a interação entre o ECDS e a flexibilidade cognitiva [F (1, 36) = 0,2235, P = 0,6393], indicando que diferenças na flexibilidade cognitiva e o ECDS não alteram o tempo de latência dos animais. De acordo com a Figura 14B, não houve alterações no tempo total de autolimpeza dos animais. A ANOVA de duas vias não demonstrou efeitos significativos para o ECDS [F (1, 37) = 0,07374, P = 0,7875], para a flexibilidade cognitiva [F (1, 37) = 0,08433, P = 0,7731] ou para a interação entre o ECDS e a flexibilidade cognitiva [F (1, 37) = 0,07755, P = 0,7822], sugerindo que diferenças na flexibilidade cognitiva e o ECDS não alteram o tempo total de autolimpeza dos animais.

A Figura 14C ilustra os parâmetros de tempo de latência e tempo total de autolimpeza compilados através do Score-Z, formando o Score-Z para o teste de borrifagem de sacarose. A ANOVA de duas vias não demonstrou efeitos significativos para o ECDS [F (1, 37) = 1,040, P = 0,3145], para a flexibilidade cognitiva [F (1, 37) = 4,264e-005, P = 0,9948] ou para a interação entre o ECDS e a flexibilidade cognitiva [F (1, 37) = 4,083e-005, P = 0,9949], sugerindo que quando compilados através do Score-Z, os parâmetros avaliados pelo teste de borrifagem de sacarose não demonstram resultados significativos.

Figura 14. Avaliação dos parâmetros emocionais através do teste de borrifagem de sacarose

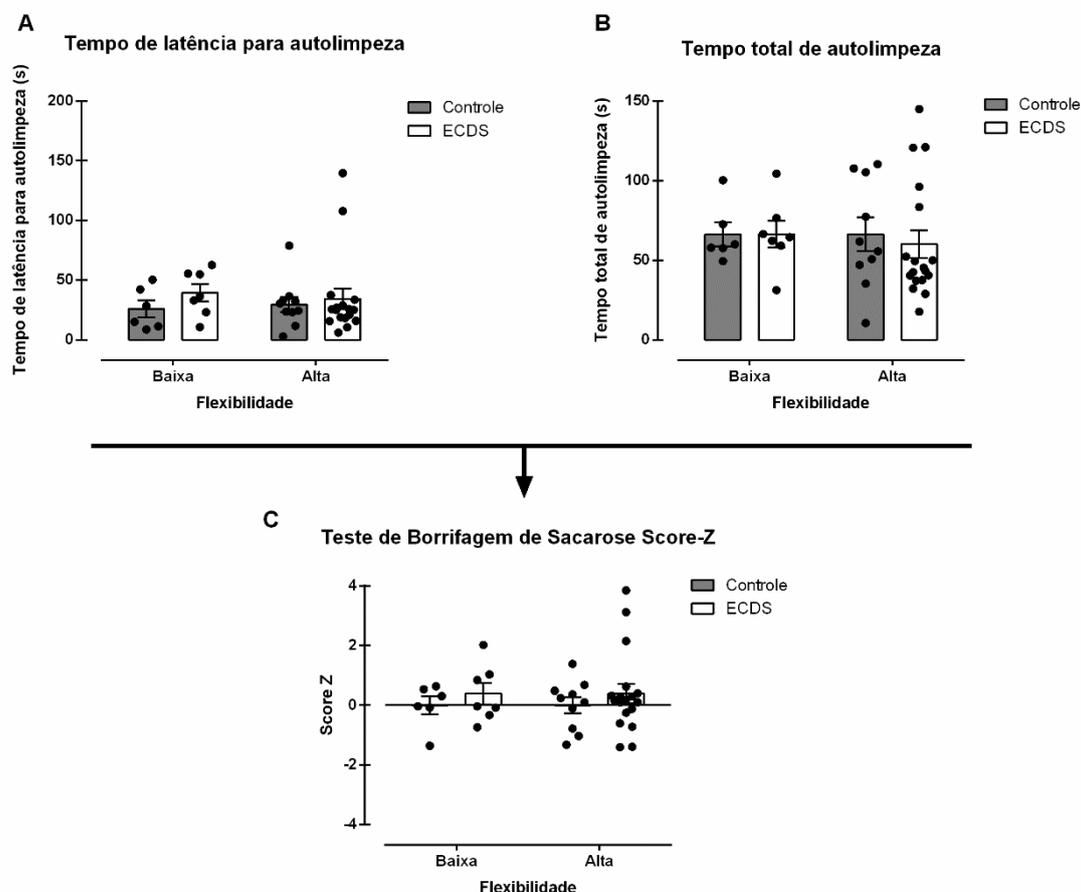


Figura 14. Avaliação dos parâmetros emocionais de latência (A) e tempo total de autolimpeza (B) no teste de borrifagem de sacarose. Compilação dos parâmetros emocionais normalizados através do Score-Z para formação do Score-Z do teste de borrifagem de sacarose (C). Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média. Controle/Baixa flexibilidade N = 6; Controle/Alta flexibilidade N = 10; ECDS/Baixa flexibilidade N = 7; ECDS/Alta flexibilidade N = 7; ECDS/Alta flexibilidade N = 18.

5.4.3 Teste do campo aberto

Como parâmetros do comportamento emocional foram utilizados os critérios de número de entradas no centro e tempo no centro, avaliados pelo teste do campo aberto. O aumento no número de entradas e permanência no centro está associada a efeitos ansiolíticos em roedores. Conforme ilustrado pela Figura 15A, não houve diferenças no número de entradas no centro dos animais. A ANOVA de duas vias demonstrou um efeito significativo para a interação entre o ECDS e a flexibilidade cognitiva [$F(1, 36) = 6,694$, $P = 0,0139$], mas não para o ECDS [$F(1, 36) = 3,154e-007$, $P = 0,9996$], ou para a flexibilidade cognitiva [$F(1, 36) = 2,521$, $P = 0,1211$]. A análise de *post-hoc* não revelou

diferenças significativas entre os grupos. Pelos resultados da ANOVA, podemos sugerir que existe um efeito combinado dos fatores de flexibilidade cognitiva e ECDS no parâmetro de entradas no centro do campo aberto.

De acordo com a Figura 15B, não houve alterações no tempo total no centro do campo aberto. A ANOVA de duas vias não demonstrou efeitos significativos para o ECDS [$F(1, 36) = 0,4754, P = 0,4949$], para a flexibilidade cognitiva [$F(1, 36) = 2,105, P = 0,1555$] ou para a interação entre o ECDS e a flexibilidade cognitiva [$F(1, 36) = 3,012, P = 0,0912$], indicando que diferenças na flexibilidade cognitiva basal e o ECDS não alteram o tempo total no centro dos animais. A Figura 15C ilustra os parâmetros de número de entradas no centro e o tempo no centro compilados através do Score-Z, formando o Score-Z para o teste do campo aberto. A ANOVA de duas vias não demonstrou efeitos significativos para o ECDS [$F(1, 37) = 1,962, P = 0,1696$], para a flexibilidade cognitiva [$F(1, 37) = 1,646, P = 0,2076$] ou para a interação entre o ECDS e a flexibilidade cognitiva [$F(1, 37) = 1,646, P = 0,2075$], indicando que quando compilados através do Score-Z, os parâmetros avaliados pelo teste do campo aberto não demonstram resultados significativos.

Figura 15. Avaliação dos parâmetros emocionais através do teste do campo aberto

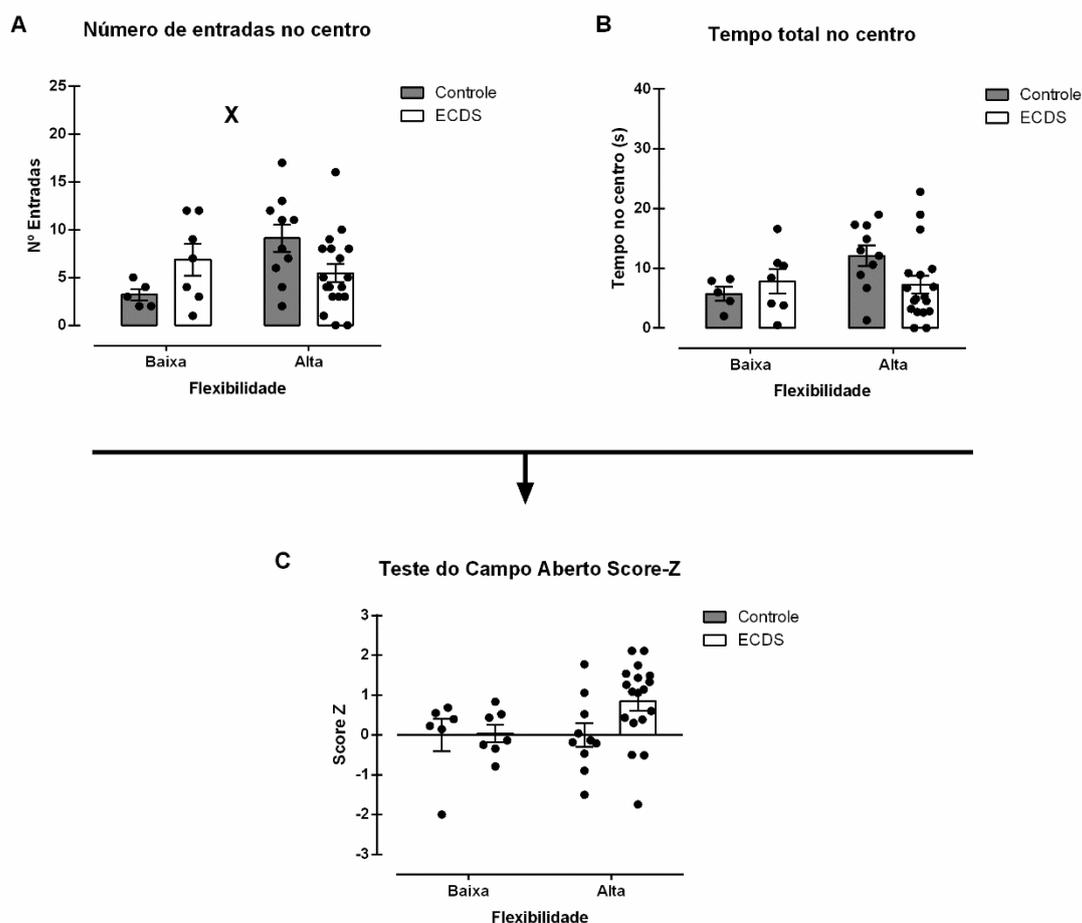


Figura 15. Avaliação dos parâmetros emocionais de número de entradas no centro (A) e tempo total no centro (B) no teste do campo aberto. Compilação dos parâmetros emocionais normalizados através do Score-Z para formação do Score-Z do teste do campo aberto (C). Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média. X $p < 0,05$ efeito da interação entre flexibilidade cognitiva e ECDS no número de entradas no centro do campo aberto calculado pela ANOVA de duas vias. Controle/Baixa flexibilidade N = 6; Controle/Alta flexibilidade N = 10; ECDS/Baixa flexibilidade N = 7; ECDS/Alta flexibilidade N = 18.

5.4.4 Comportamento emocional integrado

Para a avaliação do comportamento emocional integrado dos animais foram utilizados os Score-Z dos testes de suspensão pela cauda, borrifagem de sacarose e campo aberto, Figura 16. A ANOVA de duas vias demonstrou efeito significativos para o ECDS [F (1, 37) = 3,838, P = 0,05], mas não para a flexibilidade cognitiva basal [F (1, 37) = 2,700, P = 0,1088] ou para a interação entre o ECDS e a flexibilidade cognitiva [F (1, 37) = 2,699, P = 0,1089]. Os resultados encontrados na ANOVA sugerem que os animais submetidos ao ECDS apresentam scores emocionais mais altos, indicando um prejuízo na performance dos parâmetros comportamentais emocionais avaliados (maior tempo

total de imobilidade e menor latência para iniciar a imobilidade no teste de suspensão pela cauda; menor tempo total de autolimpeza e menor tempo de latência para iniciar a autolimpeza no teste de borrifagem de sacarose; menor tempo total e número de entradas no centro no teste do campo aberto). Contudo, a análise de *post-hoc* revelou que o grupo submetido ao ECDS de alta flexibilidade cognitiva possui scores emocionais significativamente maiores que o grupo controle de alta flexibilidade cognitiva ($p < 0,05$), indicando que apenas o grupo de alta flexibilidade cognitiva tem prejuízos na performance dos parâmetros comportamentais emocionais avaliados após o ECDS. De acordo com a Figura 16, apesar dos animais submetidos ao ECDS de alta flexibilidade demonstrarem um score emocional maior, o que representa uma pior performance nos testes comportamentais que avaliam desespero comportamental, motivação/anedonia e ansiedade, quando comparados ao controle de alta flexibilidade, não houve diferenças entre os animais de alta flexibilidade cognitiva submetidos ao ECDS quando comparado aos de baixa flexibilidade submetidos ao ECDS ($p = 0,0739$).

Figura 16. Índice do comportamento emocional integrado após o ECDS

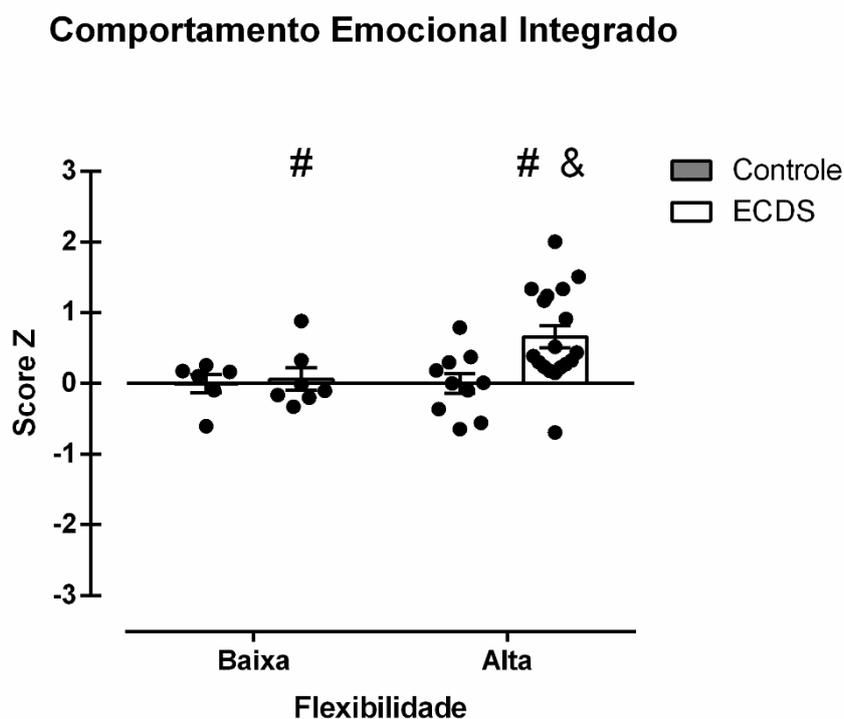


Figura 16. Avaliação do comportamento emocional integrado através do Score-Z compilado dos testes de suspensão pela cauda, borrifagem de sacarose e campo aberto. Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média. # $p < 0,05$ efeito do ECDS no índice de comportamento emocional integrado calculado pela ANOVA de duas vias. & $p < 0,05$ *post-hoc* de Tukey da diferença do comportamento emocional integrado entre os grupos controle alta

flexibilidade e ECDS alta flexibilidade. Controle/Baixa flexibilidade N = 6; Controle/Alta flexibilidade N = 10; ECDS/Baixa flexibilidade N = 7; ECDS/Alta flexibilidade N = 18.

5.5 AVALIAÇÕES DA FLEXIBILIDADE COGNITIVA E A MORFOLOGIA NEURONAL DO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL APÓS O ECDS

Para avaliar a morfologia dos neurônios piramidais das camadas II, III e V do córtex pré-frontal (PL e IL) foi realizada a análise de Sholl, sendo utilizado como parâmetros o número de ramificações dendríticas, o comprimento dos dendritos (distância máxima) e a quantidade de intersecções por raio (10 μ m). A Figura 17A ilustra a morfologia de um neurônio piramidal do córtex pré-frontal medial dos grupos Controle Baixa flexibilidade, ECDS Baixa flexibilidade, Controle Alta flexibilidade e ECDS Alta flexibilidade, representado através do traçado desenhado manualmente. A Figura 17B ilustra o número de ramificações dendríticas de cada grupo. A ANOVA de duas vias demonstrou efeitos significativos para o ECDS [F (1, 132) = 11,39, P = 0,0010] e para a flexibilidade cognitiva basal [F (1, 132) = 5,134, P = 0,0251], mas não para a interação entre o ECDS e a flexibilidade cognitiva basal [F (1, 132) = 0,7197, P = 0,3978]. A análise de *post-hoc* revelou que o grupo estressado de alta flexibilidade possui um número total de ramificações dendríticas menor que o grupo controle de alta flexibilidade ($p < 0,05$), indicando que o ECDS pode causar alterações na quantidade de ramificações dos dendritos destes neurônios.

A Figura 17C ilustra o comprimento dendrítico. A ANOVA de duas vias não demonstrou efeito significativo para o ECDS [F (1, 132) = 1,222, P = 0,2711], para a flexibilidade cognitiva basal [F (1, 132) = 0,9102, P = 0,3418] e para a interação entre o ECDS e a flexibilidade cognitiva basal [F (1, 132) = 2,949, P = 0,0883], sugerindo que a flexibilidade cognitiva e o estresse não provocam alterações significativas no comprimento dendrítico destes neurônios. A Figura 17D demonstra a quantidade de intersecções por raio. A ANOVA de medidas repetidas não demonstrou efeitos significativos entre os grupos conforme os raios concêntricos [F (3, 56) = 0,06709, P = 0,9772], indicando que a flexibilidade cognitiva e o ECDS não alteram a distribuição de ramificações dendríticas ao longo dos raios.

Figura 17. Morfologia de neurônios piramidais do córtex pré-frontal após o ECDS

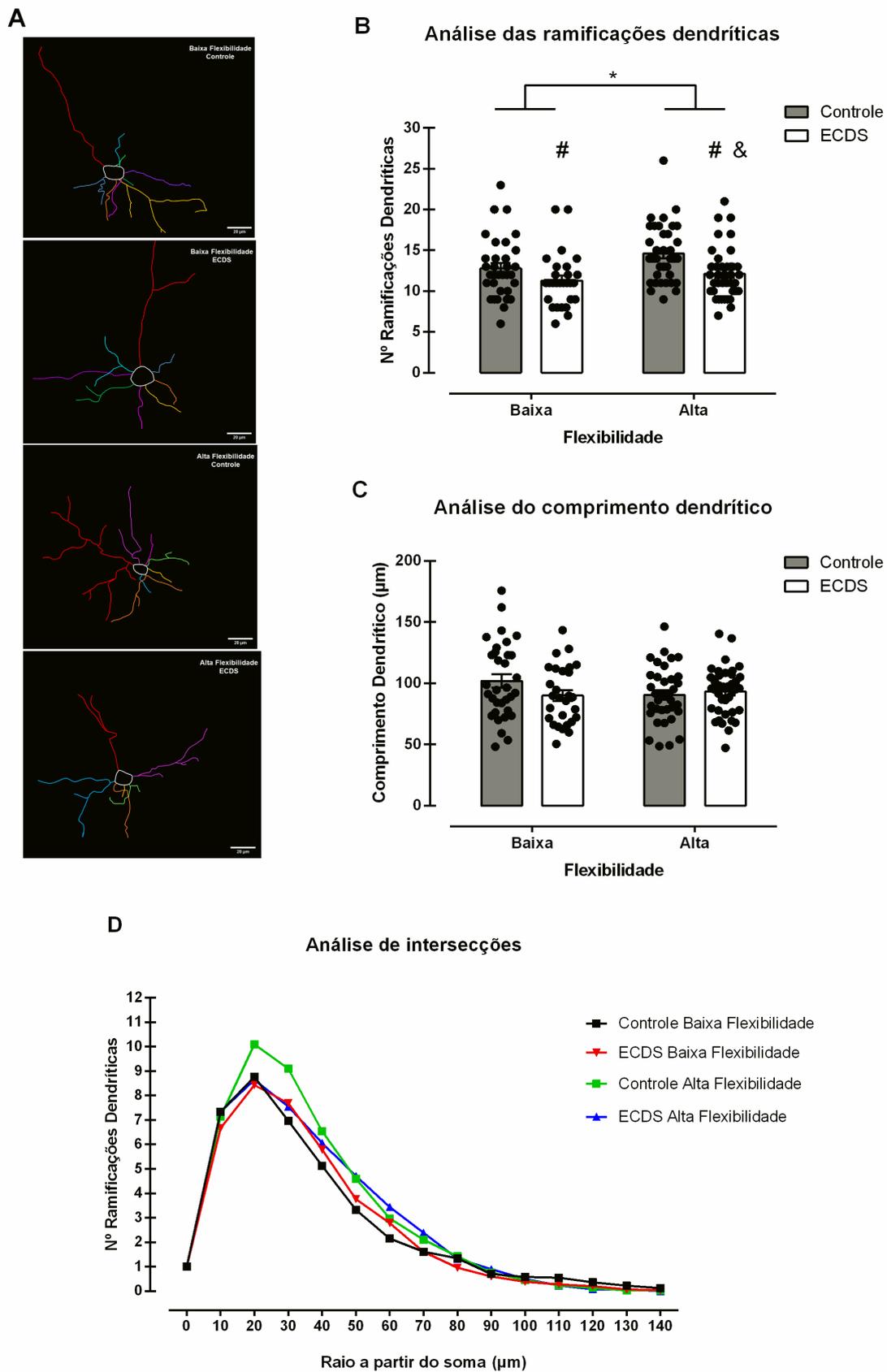


Figura 17. Morfologia de um neurônio piramidal do córtex pré-frontal medial (mPFC), representado através do traçado desenhado manualmente por grupo: Controle/Baixa flexibilidade;

ECDS/Baixa flexibilidade; Controle/Alta flexibilidade; ECDS/Alta flexibilidade (A). Avaliação do número médio de ramificações dendríticas por grupo (B). Avaliação do comprimento dendrítico por grupo (C). Avaliação do número de intersecções por raio de 10 μm por grupo (D). Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ efeito da flexibilidade cognitiva no número de ramificações dendríticas pela ANOVA de duas vias. # $p < 0,001$ efeito do ECDS no número de ramificações dendríticas pela ANOVA de duas vias. & $p < 0,05$ *post-hoc* de Tukey da diferença do número de ramificações dendríticas entre os grupos controle alta flexibilidade e ECDS alta flexibilidade. Controle/Baixa flexibilidade N = 33; ECDS/Baixa flexibilidade N = 28; Controle/Alta flexibilidade N = 36; ECDS/Alta flexibilidade N = 39.

6. DISCUSSÃO

O presente estudo investigou se a flexibilidade cognitiva basal em um teste de memória espacial está associada com as estratégias de enfrentamento de camundongos C57BL6 machos expostos ao ECDS. Além disso, foi avaliada se a flexibilidade cognitiva está associada a performance em testes de interação social, de comportamento emocional e alterações na morfologia de neurônios piramidais das sub-regiões pré-límbica e infralímbica do córtex pré-frontal. Os animais classificados com uma alta flexibilidade cognitiva basal tiveram alterações nas estratégias de enfrentamento, migrando de estratégias ativas para passivas ao longo do protocolo de 10 dias de ECDS, enquanto o grupo de baixa flexibilidade manteve estratégias ativas durante o protocolo de ECDS. Os animais de alta flexibilidade demonstraram uma diminuição da interação social quando comparados ao grupo de baixa flexibilidade, independente da exposição ao ECDS. Estes resultados diferem da hipótese levantada, na qual esperava-se que os animais com maior flexibilidade cognitiva apresentassem estratégias de enfrentamento ativas e uma maior interação social.

Em relação aos comportamentos emocionais, os animais de alta flexibilidade cognitiva submetidos ao ECDS demonstraram um prejuízo em sua performance de acordo com os parâmetros avaliados (teste de suspensão pela cauda, teste de borrifagem de sacarose e teste do campo aberto) em comparação ao grupo de alta flexibilidade não submetido ao ECDS, enquanto que o grupo de baixa flexibilidade submetido ao ECDS manteve a mesma performance nos testes de avaliação do comportamento emocional do grupo de baixa flexibilidade não submetido ao ECDS. Além disso, os animais de alta flexibilidade submetidos ao protocolo de ECDS demonstraram ainda uma diminuição no número de ramificações dendríticas de neurônios piramidais nas sub-regiões pré-límbica e infralímbica em relação ao grupo de alta flexibilidade não submetido ao ECDS, ao passo

que o grupo de baixa flexibilidade manteve o número de ramificações dendríticas independente do ECDS. Estes resultados não estão de acordo com a hipótese levantada, pois esperava-se que os animais com maior flexibilidade cognitiva demonstrassem uma diminuição dos prejuízos emocionais derivados do ECDS.

Nossos resultados demonstraram que os animais C57BL6 possuem uma curva de aprendizado acentuada quando submetidos por 3 dias à fase de aquisição do labirinto aquático de Morris. A média dos tempos de latência para localizar a plataforma, fixa no quadrante sudoeste do labirinto aquático, é significativamente menor no dia 2 quando comparado ao dia 1, e no dia 3 quando comparado ao dia 2. Na fase teste os animais permanecem mais tempo no quadrante correto do labirinto aquático na ausência da plataforma. Estes parâmetros indicam que os animais C57BL6 aprendem de maneira eficiente as regras aplicadas no labirinto aquático de Morris quando submetidos aos 3 dias de aquisição.

Nossos resultados corroboram a literatura, indicando que um protocolo de aprendizagem com duração de 3 dias no labirinto aquático de Morris é suficiente para diminuir o tempo de latência para localizar a plataforma em roedores. Gil-Mohapel e colaboradores (2013) demonstraram que através de um protocolo de 3 dias de aprendizagem, subdivididos em 2 sessões de 2 blocos contendo 3 tentativas cada, camundongos C57BL6J macho com 1,5, 3, 6, 9 e 12 meses de idade diminuíram significativamente o tempo de latência para localizar a plataforma no último dia de treinamento (dia 3) em comparação ao primeiro dia de treinamento (dia 1), indicando que, independentemente da idade, camundongos C57BL6J foram capazes de aprender a tarefa. Além disso, Gehring e colaboradores (2015) avaliaram as estratégias de nado de ratos submetidos ao labirinto aquático de Morris por 3 dias, com 4 tentativas por dia, e demonstraram que ao final do terceiro dia os animais diminuem o tempo de latência para localizar a plataforma mesmo adotando diferentes estratégias de nado ao longo de uma mesma tentativa.

Para análise da flexibilidade cognitiva diversos estudos utilizam o protocolo de aquisição reversa do labirinto aquático de Morris (HERNÁNDEZ-MERCADO e ZEPEDA, 2022; YERMAKOV et al., 2019; WILLIAMSON e BILBO, 2014). Este protocolo estabelece um período de aquisição (e.g., 5 dias) onde a plataforma é fixa em um quadrante. Posteriormente, a plataforma é realocada em um quadrante oposto e os animais são submetidos à uma fase de aquisição reversa (e.g., 1-5 dias). Neste protocolo são avaliadas a performance dos animais em localizar a plataforma na fase de aquisição

e na fase de aquisição reversa. Neste cenário, de Bruin e colaboradores (1994) demonstraram que lesões no córtex pré-frontal medial de ratos Wistar macho prejudicam a performance para localizar a plataforma em um protocolo de 1 dia de aquisição reversa. Menezes e colaboradores (2020) constataram que 3 horas de privação maternal por 10 dias (período pós-natal 1 ao 10) em ratos Wistar machos causam prejuízos na flexibilidade cognitiva em um protocolo de aquisição reversa de 1 dia. Além disso, An e colaboradores (2019) demonstraram que a exposição pré-natal de melamina, um composto utilizado na indústria plástica, em ratos Wistar fêmeas provoca prejuízos na flexibilidade cognitiva em um protocolo de aquisição reversa por 3 dias. Neste contexto, o protocolo de aquisição reversa ressalta diferenças comportamentais provocadas por lesões e condições adversas.

Tendo em vista que nossas investigações partiam da flexibilidade cognitiva basal dos animais experimentais, nós utilizamos o protocolo adaptado do labirinto aquático de Morris para avaliação de memória espacial de trabalho descrito por Vorhees e Williams (2006), na qual a plataforma é realocada em diferentes quadrantes a cada dia de treinamento. Este procedimento não permite que os animais transponham o aprendizado adquirido de um dia de treinamento para o outro, reforçando um novo aprendizado diário associado à flexibilidade cognitiva, através da sequência de aprendizado, extinção do aprendizado anterior para aquisição de um novo aprendizado. Deste modo, nós ampliamos a característica de flexibilidade cognitiva ao longo de 4 dias de treinamento (dias 5, 6, 7 e 8), com o intuito de agrupar os animais experimentais em subgrupos de acordo com sua performance na fase de flexibilidade.

Para tal, nós aplicamos uma abordagem estatística desenvolvida por Nasca e colaboradores (2015) utilizada para dividir em subgrupos animais de baixa e alta susceptibilidade ao estresse. Nesta abordagem, animais submetidos ao estresse crônico imprevisível foram divididos em subpopulações de baixa e alta susceptibilidade através dos parâmetros de tempo de imobilidade no teste do nado forçado e do consumo de sacarose. Animais estressados que obtiveram valores dentro do intervalo da média mais desvio padrão do grupo controle foram considerados de baixa susceptibilidade, uma vez que seus parâmetros avaliados são similares. Os animais que obtiveram valores superiores ao intervalo da média mais desvio padrão do grupo controle foram considerados de alta susceptibilidade. Deste modo, é possível dividir o mesmo grupo de animais em subpopulações distintas, de acordo com os parâmetros estabelecidos.

Em nossa investigação, aplicamos esta abordagem estatística para o teste do labirinto aquático de Morris com o intuito de dividir os animais experimentais em

subpopulações de baixa e alta flexibilidade cognitiva. Para nosso estudo, foi considerado como grupo controle o dia de maior aprendizado (menor latência para localizar a plataforma) durante a fase de aquisição, neste caso o dia 3, e comparando-o com a média dos tempos de latência para localizar a plataforma durante a fase de flexibilidade de cada animal. Os animais que obtinham um tempo de latência para localizar a plataforma dentro do intervalo da média mais desvio padrão do grupo controle (dia 3) foram considerados de alta flexibilidade, uma vez que seus tempos de latência para localizar a plataforma eram semelhantes ao dia de maior aprendizado (dia 3) mesmo com a plataforma alternando de quadrante a cada dia. Os animais que obtinham um tempo de latência para localizar a plataforma superior ao intervalo da média mais desvio padrão do grupo controle (dia 3) foram considerados de baixa flexibilidade.

A aplicação da abordagem estatística desenvolvida por Nasca e colaboradores (2015) nos permitiu verificar que, o tempo de latência para localizar a plataforma no dia 3 é significativamente menor que a média do tempo de latência durante a fase de flexibilidade, indicando que existe uma diferença de aprendizagem da fase de aquisição para fase de flexibilidade. Entretanto, existiram animais que se adaptaram às mudanças ambientais da fase de flexibilidade e que mantiveram sua performance semelhante ao dia de maior aprendizado (dia 3), não havendo diferenças estatísticas significativas entre os tempos de latência para localizar a plataforma, classificados como alta flexibilidade cognitiva. Em contrapartida, foi possível observar animais que tiveram um prejuízo na sua performance devido ao aumento no tempo de latência para localizar a plataforma durante a fase de flexibilidade em comparação ao dia de maior aprendizado (dia 3), classificados como baixa flexibilidade cognitiva. Os animais de baixa flexibilidade cognitiva possuem um tempo de latência para localizar a plataforma significativamente maior em comparação ao dia de maior aprendizado (dia 3) e aos animais de alta flexibilidade cognitiva. Esta abordagem estatística nos permitiu dividir, de forma significativa e eficiente, os animais experimentais em subpopulações de baixa e alta flexibilidade cognitiva através de sua performance no teste do labirinto aquático de Morris.

No presente estudo nós investigamos as diferentes respostas comportamentais ao estresse. Para tal, utilizamos o protocolo de ECDS, que consiste na exposição física e sensorial do animal experimental à um animal agressor por um período de 10 dias (GOLDEN et al., 2011). Este modelo de estresse provoca reduções na interação social, preferência por sacarose, locomoção e exploração ambiental e peso corporal e um

aumento dos comportamentos de esquiva, submissão e imobilidade e do peso da glândula adrenal (RYGULA et al., 2006; RYGULA et al., 2006; RYGULA et al., 2005; KUDRYAVTSEVA et al., 1991), alterações metabólicas como aumento de grelina (LUTTER et al., 2008), redução de leptina (CHUANG et al., 2010) e prejuízos na regulação de colesterol e triglicérides (CHUANG et al., 2010), e desregulações no eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (GURURAJAN et al., 2019), no sistema imunológico (PFAU et al., 2019; HODES et al., 2014) e em mecanismos de neuroplasticidade (COLYN et al., 2019; NASCA et al., 2019). Estas alterações estão associadas com a intensidade e duração do período de derrota social, o que permite a investigação de diferentes respostas comportamentais e moleculares individuais dos animais derrotados (RAZZOLI et al., 2011; KRISHNAN et al., 2007; BERTON e NESTLER, 2006).

Dentre as respostas avaliadas, nós investigamos as estratégias de enfrentamento ao ECDS adotadas pelos animais derrotados. Neste contexto, as estratégias de enfrentamento são classificadas como padrões de respostas comportamentais ao estresse, que podem influenciar no impacto que o evento estressor tem no bem-estar físico e psicológico do indivíduo (LeCLAIR e RUSSO, 2021; WOOD e BHATNAGAR, 2015). De maneira geral, as estratégias de enfrentamento são classificadas como ativas, com comportamentos proativos de aproximação, luta, evitação e defesa, e passivas, com comportamentos reativos de submissão e imobilidade (LeCLAIR e RUSSO, 2021; LeCLAIR et al., 2021).

Nossos resultados demonstraram que durante a fase de contato físico no primeiro dia de derrota social os grupos de baixa e alta flexibilidade cognitiva exibiram índices de estratégias ativas e passivas similares, com ambos os grupos apresentando índices de enfrentamento ativo positivo, indicando um maior número de comportamentos ativos. Porém, durante a fase de contato físico no décimo dia de derrota social, apenas os animais de alta flexibilidade cognitiva exibiram uma diminuição significativa dos índices de estratégias ativas em relação ao seu índice ativo no primeiro dia e um aumento significativo dos índices de estratégias passivas em relação ao seu índice passivo no primeiro dia. Os animais de baixa flexibilidade cognitiva exibiram índices de estratégias ativas e passivas similares entre o primeiro e décimo dia de derrota social. Em relação aos animais agressores, houve uma diminuição significativa do número de ataques realizados no décimo dia de derrota social em comparação ao primeiro dia. Estes resultados indicam que apenas os animais de alta flexibilidade cognitiva alteram suas estratégias comportamentais de enfrentamento ao estresse, de ativas para passivas, ao

longo do protocolo de derrota social, uma vez que as condições ambientais de agressões e ataques foram modificadas. Estas alterações das estratégias de enfrentamento dos animais de alta flexibilidade corrobora a hipótese de que uma maior flexibilidade está associada a uma maior adaptabilidade frente modificações ambientais, onde estes animais respondem de forma flexível e plástica.

Pérez-Tejada e colaboradores (2013) demonstraram que camundongos OF1 machos que exibiam estratégias de enfrentamento passivas ao ECDS exibiam um maior tempo de imobilidade no teste do nado forçado, em conjunto com aumentos na concentração plasmática de corticosterona e na expressão de mRNA de CRH no hipotálamo e amígdala e diminuições nas concentrações plasmáticas de adrenalina e noradrenalina e na expressão de mRNA de tirosina hidroxilase e dopamina β -hidroxilase na glândula adrenal. De forma semelhante, De Miguel e colaboradores (2011) demonstraram que camundongos OF1 machos expostos à derrota social que exibiam estratégias de enfrentamento passivas apresentavam um aumento de corticosterona e uma diminuição de adrenalina plasmáticas e diminuições na expressão de mRNA de tirosina hidroxilase no tronco encefálico e interleucina-2 no baço, ao passo que animais que exibiam estratégias de enfrentamento ativas apresentavam aumentos na expressão de mRNA de interleucina-1 β no hipotálamo e baço. Goni-Balentziaga e colaboradores (2019) demonstraram que camundongos OF1 machos que exibiam estratégias de enfrentamento passivas ao estresse de derrota social desenvolviam um aumento da metástase pulmonar ao final do protocolo de estresse.

Como demonstrado por Golden e colaboradores (2011), animais submetidos ao ECDS exibem uma diminuição do índice de interação social. Este índice de interação social é calculado através do tempo total na zona de interação na presença do animal agressor dividido pelo tempo total na zona de interação na ausência do animal agressor durante o teste de interação social. Um índice de interação maior que 1 demonstra que o animal experimental passa um tempo maior na zona de interação quando o animal agressor está presente, indicando uma preferência de interação social. Um índice de interação menor que 1 demonstra que o animal experimental passa um tempo maior na zona de interação na ausência do animal agressor, indicando um comportamento de esquiva social. Neste contexto, diversos autores associam um índice de interação social maior que 1 no teste de interação social com um perfil resiliente ao protocolo de ECDS, uma vez que o comportamento social do animal derrotado se assemelha ao comportamento social dos animais controle, enquanto que um índice de interação social

menor que 1 no teste de interação social é associado à um perfil suscetível ao protocolo de ECDS, uma vez que os animais derrotados exibem um comportamento de esquiva social (LeCLAIR et al., 2021; GURURAJAN et al., 2019; LORSCH et al., 2019; WANG et al., 2018; HODES et al., 2014; KRISHNAN et al., 2007; BERTON et al., 2006).

Nossos resultados indicaram que os animais de baixa e alta flexibilidade cognitiva exibiram um índice de interação médio maior que 1, independentemente do protocolo de ECDS, o que sugere que ambos os grupos, submetidos ou não ao protocolo de ECDS, exibem uma preferência por interação social, visto que seu tempo na zona de interação é maior na presença do animal agressor. Entretanto, os animais de alta flexibilidade cognitiva, submetidos ou não ao protocolo de ECDS, exibiram um índice de interação social e um índice de entradas na zona de interação menor em comparação aos animais de baixa flexibilidade cognitiva, submetidos ou não ao protocolo de ECDS, ao passo que ambos os grupos possuem tempos na zona de canto e distância total percorrida semelhantes. Estes resultados indicam que apesar da preferência por interação social, os animais de alta flexibilidade cognitiva demonstram uma preferência menor de interação social comparados aos animais de baixa flexibilidade cognitiva. Desta forma, Lee e colaboradores (2021) demonstraram que os camundongos C57BL6 macho suscetíveis ao protocolo de ECDS exibiram diminuições do tempo total no centro do campo aberto, do tempo total nos braços abertos do labirinto em cruz elevada e na preferência por sacarose, em conjunto com aumentos nos tempos de imobilidade nos testes de suspensão pela cauda e nado forçado, enquanto os camundongos resilientes ao protocolo de ECDS exibiram valores semelhantes ao controle. Gururajan e colaboradores (2019) demonstraram que camundongos C57BL6 machos suscetíveis ao protocolo de ECDS exibiram níveis mais elevados de corticosterona plasmática, hipertrofia da glândula adrenal, e um aumento de monócitos pró-inflamatórios circulantes em relação aos animais resilientes e controle.

Em relação aos parâmetros emocionais, nossos resultados não indicaram diferenças entre os grupos de baixa e alta flexibilidade cognitiva, submetidos ou não ao protocolo de ECDS, para os parâmetros de latência e tempo total de autolimpeza no teste de borrifagem de sacarose, número de entradas e tempo total no centro do campo aberto, e tempo total de imobilidade no teste de suspensão pela cauda. Os animais de alta flexibilidade cognitiva exibiram um tempo de latência maior para imobilidade no teste de suspensão pela cauda que os animais de baixa flexibilidade cognitiva, indicando que de forma basal, uma melhor performance durante a fase de flexibilidade pode estar associada à um tempo de escape inicial maior. De forma geral, os parâmetros emocionais

individuais avaliados neste estudo destoam da literatura em relação ao protocolo de ECDS, em parte pela diminuição do número de ataques realizados pelos animais agressores. Neste contexto, Kudryavtseva e colaboradores (1991) demonstraram que camundongos C57BL6 macho expostos ao ECDS exibem um aumento no tempo de imobilidade no teste do nado forçado e uma diminuição da locomoção e exploração no teste do campo aberto. De forma semelhante, Rygula e colaboradores (2005) demonstraram que ratos Wistar machos submetidos ao ECDS exibiram uma diminuição da atividade locomotora e exploratória no campo aberto, diminuição da preferência por sacarose e um aumento do tempo de imobilidade no teste do nado forçado.

Para uma análise mais robusta dos comportamentos emocionais foi realizada a normalização através do Score-Z de cada parâmetro emocional avaliado, seguido de sua compilação para formação do comportamento emocional integrado. Segundo Guilloux e colaboradores (2011), a normalização através do Score-Z baseia-se na comparação do desvio de cada parâmetro avaliado do grupo experimental em relação ao grupo controle, de maneira a convergir e integrar os dados extraídos ao longo de diferentes testes comportamentais.

Nossos resultados apontaram que ao normalizar e integrar os desvios dos grupos de baixa e alta flexibilidade submetidos ao protocolo de ECDS em relação ao seu grupo controle, apenas o grupo de alta flexibilidade cognitiva obteve um prejuízo na performance dos parâmetros comportamentais emocionais avaliados (maior tempo total de imobilidade e menor latência para iniciar a imobilidade no teste de suspensão pela cauda; menor tempo total de autolimpeza e menor tempo de latência para iniciar a autolimpeza no teste de borrifagem de sacarose; menor tempo total e número de entradas no centro no teste do campo aberto). O grupo de baixa flexibilidade cognitiva submetido ao protocolo de ECDS obteve uma performance dos comportamentos emocionais semelhante ao seu grupo controle. Estes resultados indicam que uma maior flexibilidade cognitiva está associada à um maior prejuízo dos comportamentos emocionais, indicando que os animais com maior flexibilidade respondem ao protocolo de ECDS com prejuízos mais acentuados em relação aos comportamentos emocionais.

De forma similar, Mir e colaboradores (2020) demonstraram que a produção crônica de indol em camundongos C3H/HeN *germ-free* submetidos ao protocolo de estresse crônico imprevisível por 7 semanas não provocou prejuízos nos testes de novidade, labirinto em cruz elevado, borrifagem de sacarose, consumo de sacarose, suspensão pela cauda, estado da pelagem e qualidade do ninho de forma isolada, porém

a compilação destes testes através do Score-Z revelou um prejuízo dos comportamentos emocionais de forma integrada em relação à produção de indol e ao protocolo de estresse crônico imprevisível.

O ECDS também está associado com alterações morfológicas de neurônios em diferentes regiões encefálicas. Nossos resultados apontaram que o comprimento dendrítico e o número de intersecções por raio (10 μm) de neurônios piramidais das camadas II, III e V das sub-regiões pré-límbica e infralímbica do córtex pré-frontal dos animais de baixa e alta flexibilidade cognitiva submetidos ao protocolo de ECDS é semelhante aos animais de baixa e alta flexibilidade cognitiva não submetidos ao protocolo de ECDS. Porém o ECDS provocou reduções no número de ramificações dendríticas em ambos os grupos de baixa e alta flexibilidade cognitiva, ao passo que os animais de alta flexibilidade cognitiva exibiram um número maior de ramificações dendríticas em relação aos animais de baixa flexibilidade cognitiva. Estes resultados sugerem que de forma basal os animais de alta flexibilidade cognitiva apresentam um maior número de ramificações dendríticas em neurônios piramidais das camadas II, III e V nas sub-regiões pré-límbica e infralímbica do corte pré-frontal, enquanto o protocolo de ECDS é capaz de provocar reduções neste número de ramificações em ambos os grupos de baixa e alta flexibilidade cognitiva.

Wenting e colaboradores (2020) demonstraram que camundongos C57BL6 macho expostos ao protocolo de ECDS apresentaram reduções nas ramificações dendríticas e densidade de espinhos dendríticos em neurônios piramidais da região CA1 do hipocampo. Shu e colaboradores (2020) demonstraram que camundongos C57BL6 machos apresentaram prejuízos na formação, mas não na eliminação de espinhos dendríticos em neurônios piramidais da camada V do córtex frontal associativo após o protocolo de ECDS, associadas à redução da densidade total de espinhos dendríticos nesta região. Yang e colaboradores (2018) apresentaram que camundongos C57BL6 machos suscetíveis ao protocolo de ECDS exibiram reduções na densidade de espinhos dendríticos na sub-região pré-límbica do córtex pré-frontal medial e nas áreas CA3 e giro denteado da formação hipocampal em comparação aos animais resilientes e controle. Em contrapartida, os animais suscetíveis ao protocolo de ECDS apresentaram um aumento na densidade de espinhos dendríticos nas regiões do núcleo accumbens e área tegmentar ventral em comparação aos animais resilientes e controle.

7. CONCLUSÕES

Neste estudo nós investigamos a associação entre a flexibilidade cognitiva e as estratégias de enfrentamento e respostas de interação social, comportamento emocional e morfológicas corticais ao protocolo de ECDS. Podemos concluir que existe uma variabilidade basal na flexibilidade cognitiva de camundongos C57BL6 machos. As diferenças na flexibilidade cognitiva estão associadas à adoção de diferentes estratégias de enfrentamento frente a um animal agressor, com animais de alta flexibilidade alterando as estratégias usadas no decorrer dos dias de estresse e adotando um enfrentamento mais passivo. Contudo, apesar da maior flexibilidade cognitiva e da alteração das estratégias de enfrentamento, os animais de alta flexibilidade parecem mais sensíveis a alterações no comportamento social e emocional após o estresse. Ainda, apesar do estresse reduzir o número de ramificações dendríticas de neurônios piramidais no córtex pré-frontal tanto em animais de baixa flexibilidade quanto de alta, os animais de alta flexibilidade cognitiva exibem um maior número de ramificações quando comparado aos de baixa flexibilidade, o que pode estar associado à sua capacidade de alterar as estratégias de enfrentamento ao agressor.

Desta forma, temos como perspectivas aprofundar os estudos e experimentos sobre flexibilidade cognitiva, explorando diferentes modelos e testes cognitivos para desenvolver uma análise mais robusta e completa sobre variações na flexibilidade de camundongos. Além disso, temos como perspectivas explorar diferentes modelos de estresse crônico e agudo em animais estratificados pela flexibilidade cognitiva, de forma a avaliar suas respostas comportamentais frente diferentes cenários e eventos estressores sociais e não-sociais. Ainda, como perspectivas, iremos investigar diferentes regiões encefálicas relacionadas ao comportamento emocional e cognitivo, como a formação hipocampal, amígdala e núcleo accumbens, relacionando as funções de memória, resposta emocional e recompensa com a flexibilidade cognitiva. Estas análises serão realizadas através de diferentes abordagens histológicas, para verificar diferenças na morfológicas e estruturais de neurônios piramidais, e sua atividade e ativação, relacionando estas regiões aos comportamentos emocionais e sociais observados.

8. REFERÊNCIAS

ABIZAID A. Stress and obesity: The ghrelin connection. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 31, p. 1-8, 2019.

AN, L. et al. Prenatal melamine exposure impairs cognitive flexibility and hippocampal synaptic plasticity in adolescent and adult female rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 186, p. 1-8, 2019.

ARCO A. D. et al. Adaptive Encoding of Outcome Prediction by Prefrontal Cortex Ensembles Supports Behavioral Flexibility. **The Journal of Neuroscience**, v. 37, n. 35, p. 8363–8373, 2017.

AZMI, N. A. S. M. et al. Cortisol on Circadian Rhythm and Its Effect on Cardiovascular System. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, p. 1-15, 2021.

BAILEY, K. R.; CRAWLEY, J. N. Anxiety-related behaviors in mice. **Methods of Behavior Analysis in Neuroscience**. Taylor & Francis, 2ª edição, cap. 5. 2009.

BARBAS, H.; ZIKOPOULOS, B. The prefrontal cortex and flexible behavior. **Neuroscientist**, v. 13, n. 5, p. 532-545, 2007.

BARBAS, H. Complementary roles of prefrontal cortical regions in cognition, memory, and emotion in primates. **Advances in Neurology**, v. 84, p. 87-110, 2000.

BARNES P. J., ADCOCK I. A. Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases. **The Lancet**, v. 373, p. 1905-1917, 2009.

BELLEAU E. L. et al. The Impact of Stress and Major Depressive Disorder on Hippocampal and Medial Prefrontal Cortex Morphology. **Biological Psychiatry**, v. 85, n. 6, p. 443–453, 2019.

BERTON, O. et al. Essential Role of BDNF in the Mesolimbic Dopamine Pathway in Social Defeat Stress. **Science**, v. 311, p. 864-868, 2006.

BERTON, O., NESTLER, E. J. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. **Nature Neuroscience**, v. 7, p. 1-15, 2006.

BINLEY, K. E. et al. Sholl analysis: a quantitative comparison of semi-automated methods. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 225, p. 65-70, 2014.

BIRD, A. D.; CUNTZ, H. Dissecting Sholl Analysis into Its Functional Components. **Cell Reports**, v. 27, n. 10, p. 3081-3096, 2019.

BISHT K. et al. Chronic stress as a risk factor for Alzheimer's disease: Roles of microglia mediated synaptic remodeling, inflammation, and oxidative stress. **Neurobiology of Stress**, v. 9, p. 9-21, 2018.

BRIDGETT D. J. et al. Integrating and differentiating aspects of self-regulation: Effortful control, executive functioning, and links to negative affectivity. **Emotion**, v. 13, p. 47–63, 2013.

BRITO, I., HADDAD, H. A formulação do conceito de homeostase por Walter Cannon. **Filosofia da História e da Biologia**, v. 12, n. 1, p. 99-113, 2017.

BRUIN J.P.C. et al. Role of the prefrontal cortex of the rat in learning and decision making: effects of transient inactivation. **Progress in brain research**, v. 126, p. 103-113, 2000.

BRUIN J.P.C. et al. Place and response learning of rats in a Morris water maze: differential effects of fimbria fornix and medial prefrontal cortex lesions. **Neurobiology of learning and memory**. v. 75, n. 2, p. 164-178, 2001.

BUHLE J. T. et al. Cognitive reappraisal of emotion: A meta-analysis of human neuroimaging studies. **Cerebral Cortex**, v. 24, p. 2981–2990, 2014.

CAIN D. W., CIDLOWSKI J. A. Immune regulation by glucocorticoids. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, p. 233-247, 2017.

CAN, A. D. et al. The tail suspension test. **Journal of visualized experiments**, v. 59, p.3769, 2012.

CANNON, W.B. The wisdom of the body. **W. W. Norton & Company**, p. 177–201, 1932.

CARLÉN, M. What constitutes the prefrontal cortex? **Science**, v. 358, p. 478-482, 2017.

CATHOMAS, F. et al. Neurobiology of Resilience: interface between mind and body. **Biological Psychiatry**, v. 86, n. 6, p. 410-420, 2019.

CHOHAN, T. W. et al. Partial genetic deletion of neuregulin 1 and adolescent stress interact to alter NMDA receptor binding in the medial prefrontal cortex. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 8, n. 298, p. 1-11, 2014.

CHUANG, J-C. et al. Chronic social defeat stress disrupts regulation of lipid synthesis. **Journal of Lipid Research**, v. 51, p. 1-10, 2010.

CHUANG, J-C. et al. A β 3-adrenergic-leptin-melanocortin circuit regulates behavioral and metabolic changes induced by chronic stress. **Biological Psychiatry**, v. 67, n. 11, p. 1075-1082, 2010.

COHEN, S. et al. A stage model of stress and disease. **Perspectives on Psychological Science**, v. 11, n; 4, p. 456-463, 2016.

COHEN L. Depressive Symptoms and Cortisol Rhythmicity Predict Survival in Patients with Renal Cell Carcinoma: Role of Inflammatory signaling. **PLOS ONE**, v. 7, n. 8, p. 1-8, 2012.

COLYN, L. et al. Chronic social defeat stress induces sustained synaptic structural changes in the prefrontal cortex and amygdala. **Behavioural Brain Research**, v. 373, p. 112079-112086, 2019.

COOK, S. C., WELLMAN, C. L. Chronic Stress Alters Dendritic Morphology in Rat Medial Prefrontal Cortex. **Journal of Neurobiology**, v. 60, n. 2, p. 236-248, 2004.

CORYELL, W. H. Clinical assessment of suicide risk in depressive disorder. **International Journal of Neuropsychiatric Medicine**, v. 11 (6), p.455, 2006.

DAI S. et al. Chronic Stress Promotes Cancer Development. **Frontiers in Oncology**, v. 10, n. 1492, p. 1-10, 2020.

DANTZER, R. et al. Resilience and immunity. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 1591 (18) p.30440-9, 2018.

DE BRUIN J. P. C. et al. A behavioural analysis of rats with damage to the medial prefrontal cortex using the morris water maze: evidence for behavioural flexibility, but not for impaired spatial navigation. **Brain Research**, v. 652, p. 323-333, 1994.

DE BRUIN, J. P. C. et al. Role of the prefrontal cortex of the rat in learning and decision making: effects of transient inactivation. **Progress in Brain Research**, v. 126, p. 1-11, 2000.

DE MIGUEL, Z. et al. Behavioral coping strategies in response to social stress are associated with distinct neuroendocrine, monoaminergic and immune response profiles in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 225, p. 554-561, 2011.

DENG, M. et al. Resilience and Cognitive Function in Patients with Schizophrenia and Bipolar Disorder, and Healthy Controls. **Frontiers in psychiatry**, v. 9 p.279, 2018.

DING Y. DAI J. Advance in Stress for Depressive Disorder. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1180, p. 147-178, 2019.

DIK, A. et al. Contradictory effects of erythropoietin on inhibitory synaptic transmission in left and right prelimbic cortex of mice. **Neurobiology of Stress**, v. 9, p. 113-123, 2018.

DUDEK, K. A. et al. Neurobiology of resilience in depression: immune and vascular insights from human and animal studies. **European Journal of Neuroscience**, p.1-39, 13 set. 2019.

DUMAN R. S. Neurobiology of stress, depression, and rapid acting antidepressants: Remodeling synaptic connections. **Depression and Anxiety**, v. 31, p. 291–296, 2014.

DUMAN, R. S.; MONTEGGIA, L. M. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. **Biological Psychiatry**, v. 59 (12), p.1116-1127, 2006.

ESLER M. Mental stress and human cardiovascular disease. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 74, p. 269-276, 2017.

- ETKIN A. et al. The neural bases of emotion regulation. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, p. 693–700, 2015.
- EVEN N. et al. General Stress Responses in the Honey Bee. **Insects**, v. 3, p. 1271-1298, 2012.
- FEDER, A. et al. The Biology of Human Resilience: Opportunities for Enhancing Resilience Across the Life Span. **Biological Psychiatry**, v. 86, p. 443–453, 2019.
- FEDER A. et al. Efficacy of intravenous ketamine for treatment of chronic posttraumatic stress disorder: A randomized clinical trial. **JAMA Psychiatry**, v. 71, p. 681–688, 2014.
- FERREIRA, T. A. et al. Neuronal morphometry directly from bitmap images. **Nature Methods**, v. 11, n. 10, p. 982–984, 2014.
- FRAGA, D. B. et al. Ascorbic acid presents rapid behavioral and hippocampal synaptic plasticity effects. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 96, p. 1-12, 2020.
- GEHRING, T. V. et al. Detailed classification of swimming paths in the Morris water maze: multiple strategies within one trial. **Scientific Reports**, v. 5, p. 14562, 2015.
- GENSEL, J. C. et al. Semi-automated Sholl analysis for quantifying changes in growth and differentiation of neurons and glia. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 190, n. 1, p. 71–79, 2010.
- GIACHERO, M. et al. Hippocampal dendritic spines remodeling and fear memory are modulated by GABAergic signaling within the basolateral amygdala complex. **Hippocampus**, v. 25, n. 5, p. 545-555, 2015.
- GIL-MOHAPPEL, J. et al. Hippocampal neurogenesis levels predict WATERMAZE search strategies in the aging brain. **Public Library of Science**, v. 8, n. 9, p. e75125, 2013.
- GOLDEN, S. et al. A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice. **Nature Protocols**, v. 6, n. 8, p. 1183-1191, 2011.
- GOLDWATER, D. S. et al. Structural and Functional Alterations to Rat Medial Prefrontal Cortex Following Chronic Restraint Stress and Recovery, **Neuroscience**, v. 164, p. 798-808, 2009.
- GONI-BALENTZIAGA, O. et al. Behavioral coping strategies predict tumor development and behavioral impairment after chronic social stress in mice. **Physiology & behavior**. v. 214, p. 112747, 2019.
- GOUIN J. P. et al. Resilience resources moderate the association of adverse childhood experiences with adulthood inflammation. **Annals of Behavioral Medicine**, v. 51, p. 782–786, 2017.

GRAFE L.A. et al. Passive Coping Strategies During Repeated Social Defeat Are Associated With Long-Lasting Changes in Sleep in Rats. **Frontiers in Systems Neuroscience**, v. 14, n. 6, p. 1-10, 2020.

GUILLOUX J-P. et al. Integrated Behavioral Z-Scoring Increases the Sensitivity and Reliability of Behavioral Phenotyping in mice: Relevance to Emotionality and Sex. **Journal of Neurosciences Methods**. v. 197, n. 1, p. 21-31, 2011.

GURURAJAN, A. et al. Resilience to chronic stress is associated with specific neurobiological, neuroendocrine and immune responses. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 80, p. 583-594, 2019.

HERRERA A. J. et al. Relevance of chronic stress and the two faces of microglia in Parkinson's disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 9, n. 312, p. 1-17, 2015.

HELFRICH, R. F. e KNIGHT, R. T. Cognitive neurophysiology of the prefrontal cortex. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 163, n. 3, p. 1-25, 2019.

HERMAN, J. P. et al. Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo–pituitary–adrenocortical responsiveness. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 24, n. 3, p. 151-180, 2003.

HERNÁNDEZ-MERCADO, K., ZEPEDA, A. Morris Water Maze and Contextual Fear Conditioning Tasks to Evaluate Cognitive Functions Associated With Adult Hippocampal Neurogenesis. **Frontiers in Neuroscience**, v. 15, p. 1-16, 2022.

HIGASHIDA S. et al. Repeated social defeat stress impairs attentional set shifting irrespective of social avoidance and increases female preference associated with heightened anxiety. **Scientific Reports Nature**, v. 8, p. 1-11, 2018.

HINKLE, L. E. The concept of "stress" in the biological and social sciences. **Science, Medicine and Man**, v. 1, p. 31-48, 1973.

HODES, G. E. et al. Sex differences in nucleus accumbens transcriptome profiles associated with susceptibility versus resilience to subchronic variable stress. **The Journal of Neuroscience**, v. 35 p. 16362–16376, 2015.

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

HORNOR, G. Resilience. **Journal of Pediatric Health Care**, v. 31, n. 3, p. 384-390, 2017.

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

ISINGRINI, E. et al. Association between repeated unpredictable chronic mild stress (UCMS) procedures with a high fat diet: a model of fluoxetine resistance in mice. **Public Library of Science**, v. 5, n. 4, p. e10404, 2010.

JOSEPH J. J., GOLDEN S. H. Cortisol dysregulation: the bidirectional link between stress, depression, and type 2 diabetes mellitus. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 139, n. 1, p. 20-34, 2017.

KAEFER, K. et al. Replay of Behavioral Sequences in the Medial Prefrontal Cortex during Rule Switching. **Neuron**, v. 106, p. 1-12, 2020.

KANDEL, E. R. et al. **Princípios de Neurociência**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

KANNANGARA T.S. et al. Deletion of the NMDA Receptor GluN2A Subunit Significantly Decreases Dendritic Growth in Maturing Dentate Granule Neurons. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. e103155, 2014.

KASTER, M. P. et al. Caffeine acts through neuronal adenosine A2A receptors to prevent mood and memory dysfunction triggered by chronic stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 25, p. 7833–7838, 2015.

KAUFMANN, F. N. et al. Nlrp3 inflammasome-driven pathways in depression: clinical and preclinical findings. **Brain, behavior, and immunity**, v. 64, n. 17, p. 367-383, 2017.

KIM H-G. et al. Stress and Heart Rate Variability: A Meta-Analysis and Review of the Literature. **Psychiatry Investigation**, v. 15, n. 3, p. 235-245, 2018.

KLOET, E.; SZCZEPEK, A. Stress and glucocorticoid action in the brain and ear: implications for tinnitus. **tinnitus and stress: an interdisciplinary companion for healthcare professionals**. Springer, p. 7–35. 2017.

KOLB, B. **International Encyclopedia of the Social & Behavioral Sciences**. 2. ed. Amsterdam: Elsevier, p. 811-816, 2015.

KRISHNAN, V. et al. Molecular Adaptations Underlying Susceptibility and resistance to Social Defeat in Brain Reward Regions. **Cell**, v. 131, p. 391-404, 2007.

KUDRYAVTSEVA, N. N. et al. Social model of depression in mice of C57BL/6J strain. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 38, n. 2, p. 315-320, 1991.

LAZARUS, R. S. From psychological stress to the emotions: a history of changing outlooks. **Annual Review of Psychology**, v. 44, p. 1-22, 1993.

LeCLAIR, K. B. et al. Individual history of winning and hierarchy landscape influence stress susceptibility. **eLife**. v. 1, n. 1, p. 1-19, 2021.

LeCLAIR, K. B., RUSSO, S. J. Using social rank as the lens to focus on the neural circuitry driving stress coping styles. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 68, p. 167–180, 2021.

LEE, J. et al. Social and nonsocial cognition in bipolar disorder and schizophrenia-relative levels of impairment. **The American Journal of Psychiatry**, v. 170 p. 334–41, 2013.

LIGHTMAN, S. L. et al. Dynamics of ACTH and Cortisol Secretion and Implications for Disease. **Endocrine Reviews**, v. 41, n. 3, p. 1-21, 2020.

LIU, B. et al. The Glucocorticoid Receptor in Cardiovascular Health and Disease. **Cells**, v. 8, n. 1227, p. 1-21, 2019.

LÓPEZ-LÓPEZ A. L. et al. Chronic unpredictable mild stress generates oxidative stress and systemic inflammation in rats. **Physiology & Behavior**, v. 161, p. 15-23, 2016.

LORSCH, Z. S. et al. Stress resilience is promoted by a Zfp189-driven transcriptional network in prefrontal cortex. **Nature Neuroscience**, v. 22, n. 9, p. 1413-1423, 2019.

LUTTER, M. et al. The orexigenic hormone ghrelin defends against depressive symptoms of chronic stress. **Nature Neuroscience**, v. 11, n. 7, p. 752-753, 2008.

MADRIGAL, J. L. et al. Stress-induced oxidative changes in brain. **CNS & Neurological Disorders Drug Targets**, v. 5, p.561-568, 2006.

MCEWEN, B. S. Stress, adaptation, and disease: allostasis and allostatic load. **Annual New York Academy Science**, v. 1, n. 840, p. 33-44, 1998.

MÉNARD, C. et al. Social stress induces neurovascular pathology promoting depression. **Nature Neuroscience**, v. 20, n. 12, p.1752-1760, 2017.

MENEZES, J. et al. Maternal deprivation impairs memory and cognitive flexibility, effect that is avoided by environmental enrichment. **Behavioural Brain Research**, v. 381, p. 1-9, 2020.

MIR, H-D, et al. The gut microbiota metabolite indole increases emotional responses and adrenal medulla activity in chronically stressed male mice. **Psychoneuroendocrinology**, v. 119, p. e104750, 2020.

MONROE, S. M.; HARKNESS, K. L. Life Stress, The considerations from a Life Stress Perspective. **Psychological Review**, v. 112, n. 2, p. 417-445, 2005.

MORRIS, R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 11, n. 1, p. 47-60, 1984.

MULLER, A P. et al. Exercise increases insulin signaling in the hippocampus: physiological effects and pharmacological impact of intracerebroventricular insulin administration in mice. **Hippocampus**, v. 21, n. 10, p. 1082-1092, 2010.

MURISON, R. The neurobiology of stress. **The Neuroscience of Pain, Stress and Emotion**, n. 1, p. 29- 48, 2016.

MURROUGH, J. W., RUSSO, S. J. The Neurobiology of Resilience: Complexity and Hope. **Biological Psychiatry**, v. 86, n. 6, p. 406-409, 2019.

MURUGAN, M. et al. Combined social and spatial coding in a descending projection from prefrontal cortex. **Cell**, v. 171, n. 7, p. 1663-1677, 2017.

NASCA, C. et al. Multidimensional Predictors of Susceptibility and Resilience to Social Defeat Stress. **Biological Psychiatry**, v. 86, n. 6, p. 483-491, 2019.

NASCA C. et al. Mind the gap: glucocorticoids modulate hippocampal glutamate tone underlying individual differences in stress susceptibility. **Molecular Psychiatry**, v. 20, n. 1, p. 755-763, 2014.

NEIS, V. B. et al. Agmatine enhances antidepressant potency of MK-801 and conventional antidepressants in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 130, p. 9-14, 2015.

NELSON, E.E.; GUYER, A. E. The development of the ventral prefrontal cortex and social flexibility. **Developmental Cognitive Neuroscience**, v. 1, n. 3, p. 233-245, 2011.

NUMA, C. et al. Social defeat stress-specific increase in c-Fos expression in the extended amygdala in mice: Involvement of dopamine D1 receptor in the medial prefrontal cortex. **Nature**, v. 9, p. 1-9, 2019.

NUNEZ, J. Morris Water Maze Experiment. **Journal of Visualized Experiments**, n. 19, p. 1-2, 2008.

O'CONNOR D. B. et al. Stress and Health: A Review of Psychobiological Processes. **Annual Review of Psychology**, v. 72, p. 663–688, 2021.

OIZUMI H. et al. Influence of aging on the behavioral phenotypes of C57BL/6J mice after social defeat. **Plos One**, v. 1, p. 1-14, 2018.

OLESCOWICZ, G. et al. Antidepressant and pro-neurogenic effects of agmatine in a mouse model of stress induced by chronic exposure to corticosterone. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 81, p. 395-407, 2018.

ONGUR, D. e PRICE, J. L. The organization of networks within the orbital and medial prefrontal cortex of rats, monkeys and humans. **Cerebral Cortex**, v. 10, p. 206-219, 2000.

OSÓRIO C. et al. Adapting to stress: understanding the neurobiology of resilience. **Behavioral Medicine**, v. 1, p. 307-322, 2016.

OTTE C. et al. Major depressive disorder. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, n. 16065, p. 1-10, 2016.

PARK, P. e MOGHADDAM, B. Impact of anxiety on prefrontal cortex encoding of cognitive flexibility. **Neuroscience**, v. 345, p. 193-202, 2017.

PEÑA-BAUTISTA C. et al. Stress and neurodegeneration. **Clinica Chimica Acta**, v. 503, p. 163-168, 2020.

PERDRIZET, G. Hans Selye and beyond: response to stress. **Cell Stress Chaperones**, v. 2, n. 4, p. 214–219, 1997.

PÉREZ-TEJADA, J. et al. Coping with Chronic Social Stress in Mice: hypothalamic-pituitary-adrenal/ sympathetic-adrenal-medullary axis activity, behavioral changes and effects of antalarmin treatment. **Neuroendocrinology**, v. 98, n. 1, p. 73-88, 2013.

PFAU, M. L.; RUSSO, S. J. Peripheral and central mechanisms of stress resilience. **Neurobiology of Stress**, v. 1, p.66-79, 2015.

PFAU, M. L. et al. Role of Monocyte-Derived MicroRNA106b~25 in Resilience to Social Stress. **Biological Psychiatry**, v. 86, n. 6, p. 474-482, 2019.

PITMAN, R. K. et al. Biological studies of post-traumatic stress disorder. **Nature reviews Neuroscience**, v. 13, p. 769-787, 2012.

PLIEGER, T. et al. Life stress as potential risk factor for depression and burnout. **Burnout Research**, v. 2, n. 1, p.19-24, 2015.

POWELL, N. D. et al. Social stress up-regulates inflammatory gene expression in the leukocyte transcriptome via β -adrenergic induction of myelopoiesis. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 110, n. 41, p. 16574-16579, 2013.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, p. 3-33, 2003.

RAB S. L. ADMON R. Parsing inter- and intra-individual variability in key nervous system mechanisms of stress responsivity and across functional domains. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 120, p. 550-564, 2021.

RADLEY, J. J. et al. Repeated Stress Induces Dendritic Spine Loss in the Rat Medial Prefrontal Cortex. **Cerebral Cortex**, v. 16, p. 313-320, 2005.

RAGOZZINO, M. E. et al. The contribution of the rat prelimbic infralimbic areas to different forms of task switching. **Behavioral Neuroscience**, v. 117, p. 1054-1065, 2003.

RAZZOLI, M. et al. Different susceptibility to social defeat stress of BalbC and C57BL6/J mice. **Behavioural Brain Research**, v. 216, p. 100-108, 2011.

RICH, E. L. e SHAPIRO, M. Rat prefrontal cortical neurons selectively code strategy switches. **The Journal of Neuroscience**, v. 29, p. 7208–7219, 2009.

RIGOTTI, M. et al. The importance of mixed selectivity in complex cognitive tasks. **Nature**, v. 497, p. 585-590, 2013.

RISHER, W. C. et al. Rapid Golgi analysis method for efficient and unbiased classification of dendritic spines. **Public Library of Science**, v. 9, n. 9, p. e107591, 2014.

RODMAN, A. M. et al. Neurobiological Markers of Resilience to Depression Following Childhood Maltreatment: the role of neural circuits supporting the cognitive control of emotion. **Biological Psychiatry**, v. 86, n. 6, p. 464-473, 2019.

ROHLEDER N. Stress and inflammation – The need to address the gap in the transition between acute and chronic stress effects. **Psychoneuroendocrinology**, v. 105, p. 164-171, 2019.

RUDEBECK, P. H. et al. Prefrontal mechanisms of behavioral flexibility, emotion regulation and value updating. **Nature Neuroscience**, v. 16, n. 8, p. 1140-1145, 2013.

RUSSEL G., LIGHTMAN S. The human stress response. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 15, p. 1-10, 2019.

RUSSO, S. J. et al. Neurobiology of resilience. **Nature Neuroscience**, v. 15, n. 11, p. 1475-1484, 2012.

RYGULA, R. et al. Citalopram counteracts depressive-like symptoms evoked by chronic social stress in rats. **Behavioural Pharmacology**, v. 17, p. 19–29, 2006.

RYGULA, R. et al. Effects of fluoxetine on behavioral deficits evoked by chronic social stress in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 174, p. 188–192, 2006.

RYGULA, R. et al. Anhedonia and motivational deficits in rats: Impact of chronic social stress. **Behavioural Brain Research**, v. 162, p. 127–134, 2005.

SAEEDI M. RASHIDY-POUR A. Association between chronic stress and Alzheimer's disease: Therapeutic effects of Saffron. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 133, p. 1-9, 2021.

SALLET, J. et al. Behavioral flexibility is associated with changes in structure and function distributed across a frontal cortical network in macaques. **PLOS Biology**, v. 18, n. 5, p. 1-26, 2020.

SAPIENZA J. K. e MASTEN A. S. Understanding and promoting resilience in children and youth. **Current Opinion in Psychiatry**, v. 24, p. 267–273, 2011.

SATO, H. et al. Glucocorticoid Generates ROS to Induce Oxidative Injury in the Hippocampus, Leading to Impairment of Cognitive Function of Rats. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 47, p.224-32, 2010.

SCHOENFELD, T. J. et al. Stress and Loss of Adult Neurogenesis Differentially Reduce Hippocampal Volume. **Biological Psychiatry**, v. 82, n. 12, p. 914-923, 2017.

SELYE, H. Stress and the general adaptation syndrome. **British Medical Journal**, v. 1, n. 4667, p 1383-92, 1950.

SELYE, H. Stress without distress. **Psychopathology of Human Adaptation**, p. 137-146, 1976.

SHEN, J. et al. The enriched environment ameliorates chronic unpredictable mild stress-induced depressive-like behaviors and cognitive impairment by activating the SIRT1/miR-134 signaling pathway in hippocampus. **Journal of Affective Disorders**, v. 248, p. 81-90, 2019.

SHU, Y., XU, T. Chronic Social Defeat Stress Modulates Dendritic Spines Structural Plasticity in Adult Mouse Frontal Association Cortex. **Neural Plasticity**, v. 2017, p. 1-13, 2020.

SIMEON, D. et al. Factors associated with resilience in healthy adults. **Psychoneuroendocrinology**, v. 32 p. 1149–52, 2007.

SMITH, S. M.; VALE, W. W. The role of hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine response. **Dialogues Clinical Neuroscience**, v. 8, n. 4, p. 383–395. 2006.

STANTON C. H. et al. From Stress to Anhedonia: Molecular Processes through Functional Circuits. **Trends in Neuroscience**, v. 42, n. 1, p. 23-42, 2019.

STEFANAKI C. et al. Chronic stress and body composition disorders: implications for health and disease. **Hormones**, v. 17, p. 33-43, 2018.

STELLAR J. E. et al. Positive affect and markers of inflammation: Discrete positive emotions predict lower levels of inflammatory cytokines. **Emotion**, v. 15, p. 129–133, 2015.

STERLING, P., EYER, J. Allostasis: A new paradigm to explain arousal pathology. **Handbook of Life Stress, Cognition and Health**, Copyright, p. 629-630, 1988.

STERU, L. et al. The tail suspension test: A new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, v. 85, n. 3, p.367-370, 1985.

STOKES, M. G. et al. Dynamic coding for cognitive control in prefrontal cortex. **Neuron**, v. 78, p. 364-375, 2013.

SZABO, S. et al. The legacy of Hans Selye and the origins of stress research: A retrospective 75 years after his landmark brief “Letter” to the Editor of Nature. **Stress**, v. 15, n. 5, p. 472-478, 2012.

TANG, M. et al. Hippocampal proteomic changes of susceptibility and resilience to depression or anxiety in a rat model of chronic mild stress. **Translational Psychiatry**, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2019.

TECHE S. P. et al. Resilience to traumatic events related to urban violence and increased IL10 serum levels. **Psychiatry Research**, v. 250, p. 136–140, 2017.

TROUBAT R. et al. Neuroinflammation and depression: A review. **European Journal of Neuroscience**, v. 53, p. 151-171, 2021.

VASHIST S. K. e SCHNEIDEIR M. Depression: An Insight and Need for Personalized Psychological Stress Monitoring and Management. **Journal of Basic & Applied Sciences**, v. 10, n. 25, p. 177-182, 2014.

VIALOU, V. et al. Prefrontal cortical circuit for depression- and anxiety-related behaviors mediated by cholecystokinin: role of Δ FosB. **Journal of Neuroscience**, v. 34, p. 3878–3887, 2014.

VORHEES, C. V.; WILLIAMS, M. T. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. **Nature Protocols**, v. 1, n. 2, p. 848-858, 2006.

WALKER, D. J., SPENCER, K. A. Glucocorticoid programming of neuroimmune function. **General and Comparative Endocrinology**, v. 256, p. 80-88, 2017.

WANG, J. et al. Epigenetic modulation of inflammation and synaptic plasticity promotes resilience against stress in mice. **Nature Communications**, v. 9, n. 477, p. 1-14, 2018.

WARD, J. **The Student's Guide to Cognitive Neuroscience**. 3. ed. Londres: Psychology Press, 2015.

WENTING, F. et al. Metformin ameliorates stress-induced depression-like behaviors via enhancing the expression of BDNF by activating AMPK/CREB-mediated histone acetylation. **Journal of Affective Disorders**, v. 260, p. 302-313, 2020.

WILLIAMS, E. S. et al. Androgen-Dependent Excitability of Mouse Ventral Hippocampal Afferents to Nucleus Accumbens Underlies Sex-Specific Susceptibility to Stress. **Biological Psychiatry**, v. 87, n. 6, p. 492-501, 2020.

WILLIAMSON, L. L., BILBO, S. D. Neonatal infection modulates behavioral flexibility and hippocampal activation on a Morris Water Maze task. **Physiology & Behavior**, v. 129, p. 152-159, 2014.

WOOD S. K. e BHATNAGAR S. Resilience to the effects of social stress: Evidence from clinical and preclinical studies on the role of coping strategies. **Neurobiology of stress**, v. 1, n. 1, p. 164-173, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates. **Geneva**: 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

YANG, Q. Y. et al. Regional differences in dendritic spine density confer resilience to chronic social defeat stress. **Acta Neuropsychiatrica**, v. 30, n. 2, p. 117-122, 2018.

YERMAKOV, L. M. et al. Impairment of cognitive flexibility in type 2 diabetic db/db mice. **Behavioural Brain Research**, v. 371, p. 1-24, 2019.

ZHANG, R. et al. Radix Scutellariae Attenuates CUMS-Induced Depressive-Like Behavior by Promoting Neurogenesis via cAMP/PKA Pathway. **Neurochemical Research**, v. 43, n. 11, p. 2111-2120, 2018.

ZHANG, S. et al. Sex Differences in the Neuroadaptations of Reward-related Circuits in Response to Subchronic Variable Stress. **Neuroscience**, v. 376, p. 108-116, 2018.