

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Isabele Haruna Ono Zamaro

**Caracterização dos protocolos de estresse crônico de derrota social em
camundongos C57BL/6 machos e fêmeas**

Florianópolis

2022

Isabele Haruna Ono Zamaro

Caracterização dos protocolos de estresse crônico de derrota social em camundongos C57BL/6 machos e fêmeas

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Licenciada em Ciências Biológicas

Orientadora: Dra. Manuella Pinto Kaster

Florianópolis

2022

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

Ono Zamaro, Isabele Haruna

Caracterização dos protocolos de estresse crônico de derrota social em camundongos C57BL/6 machos e fêmeas / Isabele Haruna Ono Zamaro ; orientadora, Manuella Pinto Kaster, 2022.

58 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Diferenças sexuais. 3. Performance cognitiva. 4. Transtornos mentais. I. Pinto Kaster, Manuella. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

Isabele Haruna Ono Zamaro

Caracterização dos protocolos de estresse crônico de derrota social em camundongos C57BL/6 machos e fêmeas

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de licenciada e aprovado em sua forma final pelo Curso de Ciências Biológicas.

Florianópolis, 15 de Julho de 2022.

Coordenação do Curso

Banca examinadora

Profa. Manuella Pinto Kaster, Dra.

Orientadora

Profa. Ana Lúcia Severo Rodrigues, Dra.

Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Joana Margarida Navalho Gaspar, Dra.

Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 2022.

Aos meus pais, Elisa e Pedro.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, expresso toda a minha gratidão aos meus pais, Elisa e Pedro, que se desdobraram diversas vezes ao longo de toda a minha vida para que sempre pudessem me oferecer o que havia de melhor. Agradeço pelo cuidado, apoio, ensinamentos e empatia que tiveram comigo durante todo o processo de formação acadêmica, sem os quais eu jamais chegaria aonde cheguei.

A minha Obaachan, Catarina, que participou da minha criação e foi a primeira professora de biologia que tive. Obrigada por todos os ensinamentos sobre plantas, apicultura, comportamento e criação animal, por todo o cuidado, apoio e carinho que teve comigo, por ter me abrigado nos primeiros anos de graduação e ter me acompanhado em saídas de campo.

A todos os professores e amigos que compuseram parte fundamental dessa jornada, Lucas, Bruna, Criscieli, Jady, Roberto, George, Davidson, Iroko, Geovanna, Eliza, Luana, Madalena, Ricardo, Manuella, Bruna, Laura, Caibe, Axel, Nicolle, Igor, Mayana, Leandro, saibam que vocês proporcionaram os melhores e mais marcantes momentos da minha vida, tenham a plena certeza de que os levarei no coração para sempre.

À equipe da Marista Escola Social Lúcia Mayvorne, que me recebeu de braços abertos, a Rosana, por ter sido tão carismática e querida, à turma 102, por fazer parte da minha formação como docente em Ciências Biológicas, ao Edson, por estar sempre disposto a auxiliar em sala, e a Mayana, por ter sido uma excelente orientadora de estágio de docência.

Um agradecimento especial a Manuella, que aceitou me orientar e assim o fez com paciência, compreensão e dedicação. Obrigada por fazer parte dessa etapa final do curso, por ter tornado o processo mais leve. À banca, por ter aceitado avaliar o presente trabalho e aconselhar da melhor maneira possível os ajustes necessários.

*“Quando partires em viagem para Ítaca faz votos
para que seja longo o caminho, pleno de aventuras,
pleno de conhecimentos.” (KAVÁFIS, 1863-1933)*

RESUMO

A prevalência e incidência dos transtornos mentais comuns são maiores no sexo feminino, entretanto, a maioria das pesquisas em neurociência utiliza animais experimentais machos. Diferenças sexuais neuroquímicas e de comportamento em resposta a diversos estressores já foram observadas tanto em animais experimentais quanto em humanos. Assim, este trabalho teve como objetivo descrever e comparar dois protocolos de estresse crônico de derrota social (ECDS), adaptados para machos e para fêmeas, e analisar o comportamento de ambas as coortes quando submetidos a testes para avaliação de comportamentos emocionais. No total, foram utilizados 37 camundongos C57BL/6 (machos n=20, fêmeas n=17), dos quais 10 machos e 9 fêmeas foram submetidos ao protocolo de ECDS. Enquanto que os machos exibiram *coping* ativo ao longo dos 10 dias de ECDS, as fêmeas demonstraram redução gradual das estratégias ativas, dando ênfase em posturas passivas. O teste de interação social revelou um prejuízo no comportamento social nos machos, mas não nas fêmeas, observado pela redução no índice de interação social e pelo aumento do tempo despendido nas zonas de canto, sugerindo um comportamento de esquiva social. Os resultados dos testes de comportamento emocional demonstraram que as fêmeas expostas ao ECDS exibiram um aumento na latência para e imobilidade no teste de suspensão pela cauda. Além disso, as fêmeas expostas ao ECDS exibiram comportamento tipo-ansioso no teste do campo aberto, explorando a área central e mais exposta do aparato por mais tempo que o grupo controle. Contudo, o ECDS não afetou a atividade locomotora no campo aberto ou a exploração no labirinto em cruz elevado em fêmeas. Nos machos, não foram observados efeitos do ECDS nos testes que avaliaram locomoção e comportamento emocional, como o teste do campo aberto, teste de suspensão pela cauda e labirinto em cruz elevado. Foi observado neste trabalho que machos e fêmeas apresentaram estratégias diferentes de *coping* durante o ECDS. Além disso, o ECDS afetou o comportamento social dos machos, mas não o das fêmeas, e afetou o comportamento emocional das fêmeas, mas não dos machos. O que reforça a necessidade de mais estudos para compreender como os estressores afetam ambos os sexos.

Palavras-chave: diferenças sexuais; performance cognitiva; transtornos mentais.

ABSTRACT

Prevalence and incidence of common mental disorders are higher in females, however most neuroscience research uses experimental male animals. Sex differences in behavioral and neurochemical responses to different stressors have already been observed in both experimental animals and humans. Therefore, this study aimed to objective to describe and compare two protocols of chronic stress of social defeat (CSDS) adapted for males and for females, and to analyze the behavior of both cohorts when submitted to tests to evaluate emotional behaviors. In total, 37 C57BL/6 mice (males n=20, females n=17) were evaluated, of which 10 males and 9 females were submitted to the ECDS protocol. Males exhibited active *coping* throughout the 10 days of ECDS, while females showed a gradual reduction in active strategies, emphasizing passive postures. The social interaction test revealed an impairment in the social behavior in males, but not in females, observed by the reduction in the social interaction index and by the increase in the time spent in the corner zones, suggesting a social avoidance behavior. Results of emotional behavior tests demonstrated that females exposed to CSDS exhibited an increase in latency to immobility in the tail suspension test. In addition, females exposed to CSDS exhibited anxious-like behavior in the open field test, exploring the central and most exposed area of the apparatus for longer periods than the control group. However, CSDS did not affect locomotor activity in the open field or exploration in the elevated plus maze in females. In males, no CSDS effects were observed in tests that evaluated locomotion and emotional behavior, such as the open field test, tail suspension test and elevated plus maze. It was observed in this work that males and females presented different *coping* strategies during CSDS. Furthermore, CSDS affected the social behavior of males but not of females, and it affected the emotional behavior of females but not of males. This reinforces the need for more studies to understand how stressors affect both sexes.

Keywords: sex differences; cognitive performance; mental disorders.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Eixo HPA.....	17
Figura 2: Desenho experimental	25
Figura 3: Estresse crônico de derrota social	26
Figura 4: Teste de interação social	31
Figura 5: Teste de suspensão pela cauda	33
Figura 6: Teste do campo aberto	34
Figura 7: Teste do labirinto em cruz elevado.....	36
Figura 8: Avaliação das estratégias de enfrentamento durante o protocolo de ECDS	38
Figura 9: Avaliação do comportamento social através do Teste de interação social pós ECDS.....	39
Figura 10: Análise do tempo de imobilidade durante o teste de suspensão pela cauda pós ECDS.....	41
Figura 11: Avaliação do parâmetro emocional de tempo e deslocamento no teste do campo aberto	43
Figura 12: Avaliação do parâmetro emocional no Teste do Labirinto em Cruz Elevado	44
Figura 13: Resumo dos resultados.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Descrição dos comportamentos analisados	30
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
DREADD	Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs
ECDS	Estresse crônico de derrota social
GC	Glicocorticoides
HPA	Hipotálamo-pituitária-adrenal
IS	Interação social
NIH	Institutos Nacionais da Saúde

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	ESTRESSE, RESILIÊNCIA E SUSCETIBILIDADE.....	18
1.2	COVID-19 E OS TRANSTORNOS MENTAIS COMUNS.....	20
1.3	ESTRESSE CRÔNICO DE DERROTA SOCIAL (ECDS)	20
2	HIPÓTESE	23
3	JUSTIFICATIVA	23
4	OBJETIVOS	24
4.1	OBJETIVO GERAL	24
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
5	MATERIAIS E MÉTODOS	24
5.1	ANIMAIS	24
5.2	DESENHO EXPERIMENTAL.....	25
5.3	PROTOCOLO DE ESTRESSE	25
5.3.1	ECDS	25
5.3.1.1	<i>Triagem de camundongos agressores</i>	26
5.3.1.2	<i>Camundongos experimentais machos</i>	27
5.3.1.3	<i>Camundongos experimentais fêmeas</i>	28
5.3.1.4	<i>Índice de coping ativo e passivo</i>	29
5.4	TESTES COMPORTAMENTAIS EMOCIONAIS.....	30
5.4.1	Teste de interação social	30
5.4.1.1	<i>Habituação – sem alvo</i>	31
5.4.1.2	<i>Teste – com alvo</i>	32
5.4.1.3	<i>Índice de IS</i>	32
5.4.2	Teste de suspensão pela cauda	33
5.4.3	Teste do campo aberto	34
5.4.4	Teste do labirinto em cruz elevado	35
5.4.5	Análises estatísticas	36
6	RESULTADOS	37
6.1	ESTRATÉGIAS DE ENFRENTAMENTO AO ESTRESSE.....	37
6.2	INTERAÇÃO SOCIAL.....	38
6.3	TESTE DE SUSPENSÃO PELA CAUDA.....	40
6.4	TESTE DO CAMPO ABERTO	42

6.5	TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	43
7	DISCUSSÃO	46
8	CONCLUSÃO	52
	REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, os “transtornos mentais comuns”, como os o transtorno depressivo maior e os transtornos de ansiedade, estão entre as principais causas de incapacitação de pessoas ao redor do mundo. A partir de 2015, foi demonstrado que o transtorno depressivo maior representou 7,5% de todas as causas de incapacitação, já os transtornos de ansiedade, 3,4% (WHO, 2017). Conforme o estudo de Vos *et al.* (2020) sobre a classificação da incidência, prevalência e mortalidade de algumas das doenças que mais prejudicaram a qualidade de vida humana, verificou-se que o transtorno depressivo maior está entre as cinco principais causas de incapacitação de adolescentes de 10 a 24 anos, entre as dez para jovens adultos de 25 a 49 anos e entre as quinze para adultos de 50 a 74 anos; já os transtornos de ansiedade, entre as dez causas de incapacitação em adolescentes e entre as quinze para jovens adultos.

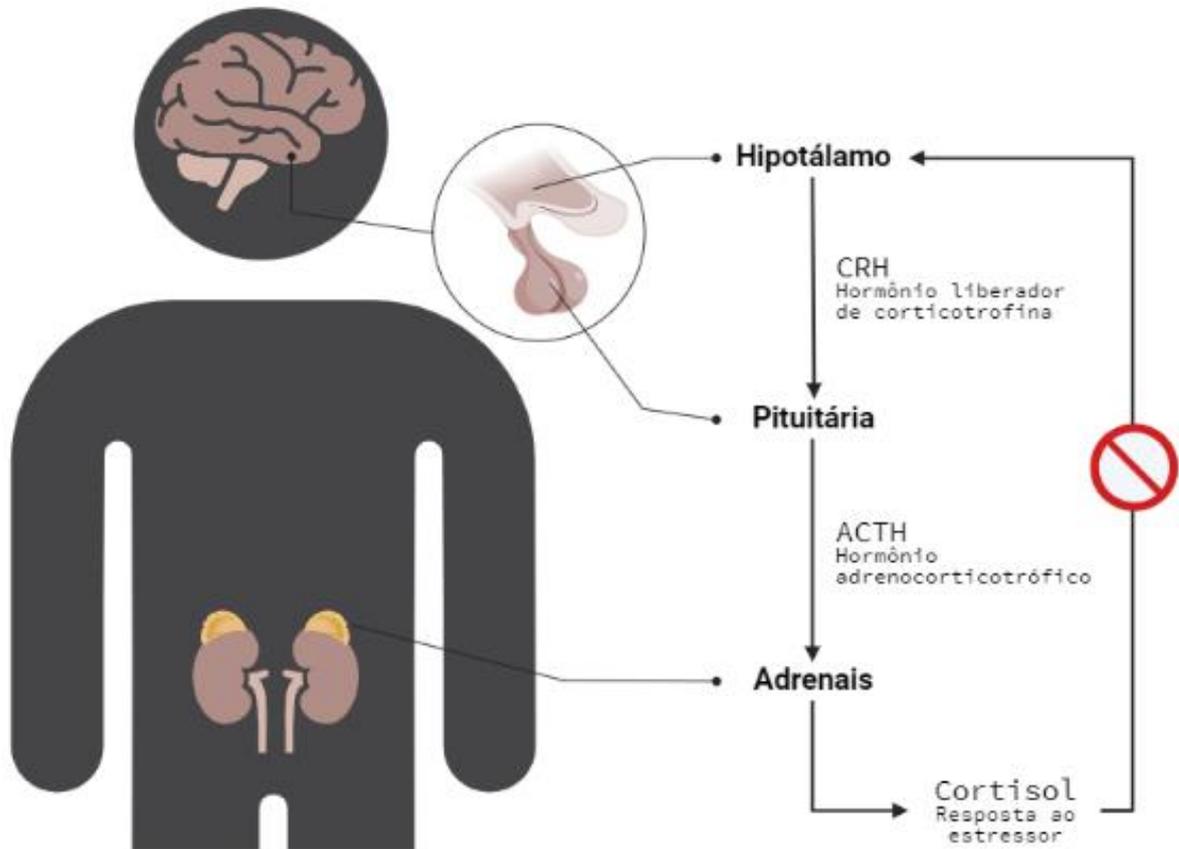
O transtorno depressivo maior pode ser caracterizado pelos sintomas de tristeza persistente, perda de interesse em atividades usuais, prejuízo na concentração e qualidade de sono, alterações cognitivas e, conforme o agravamento do sintomas, pode haver o ímpeto à automutilação; os transtornos de ansiedade incluem um grupo mais heterogêneo de condições clínicas, mas que podem ser caracterizadas pela sensação de preocupação excessiva, dificuldade de se concentrar, recordar informações ou dormir, além da sensação de cansaço e de prejuízo na realização de tarefas rotineiras (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013; WHO, 2020). A intensidade dos sintomas difere conforme o avanço da doença e a presença de comorbidades (VIGO, 2016; WHO, 2020).

O aumento da incidência e prevalência dos transtornos mentais comuns (VOS *et al.*, 2020), pertencentes à categoria das doenças não-comunicáveis – doenças crônicas cujo desenvolvimento se dá em um processo longo e como resultado de fatores genéticos, influências socioambientais e/ou fatores comportamentais (WHO, 2013; BUDREVICIUTE *et al.*, 2020) –, atraiu pesquisadores para que se pudesse entender quais processos neurológicos estão envolvidos no desenvolvimento desses transtornos (SACCHETTI *et al.*, 2005; MYERS e DAVIS, 2007; IZQUIERDO *et al.*, 2016).

Com observações clínicas associadas à experimentação animal, constatou-se uma relação íntima entre transtornos mentais e eventos estressores. O estresse é

considerado como principal fator ambiental envolvido na progressão dos transtornos psiquiátricos e tem sido utilizado como modelo para promover alterações comportamentais, coincidentes às observadas nos transtornos mentais comuns, em modelos animais (VIANA *et al.*, 1994; POLLAK *et al.*, 2010; FURMAN *et al.*, 2022). O estresse intenso ou crônico é capaz de prejudicar os mecanismos de retroinibição do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA; Figura 1), uma rede essencial para as respostas ao estresse (VASCONCELOS *et al.*, 2015), em que a hiperativação e consequente aumento de glicocorticoides (GC) pode favorecer a patogênese do transtorno depressivo maior (HOLLIS *et al.*, 2014; VASCONCELOS *et al.*, 2015) e outros efeitos adversos na saúde (SWARBRICK *et al.*, 2021).

Figura 1: Eixo HPA



Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: Representação da resposta do eixo HPA aos estressores. Os estímulos sensoriais do sistema nervoso central interagem com receptores de neurônios hipotalâmicos, estes, por sua vez, são estimulados a produzir CRH (hormônio liberador de corticotrofina). O CRH atua na estrutura imediatamente abaixo do hipotálamo, a pituitária, que, ao interagir com o referido hormônio, produz ACTH (hormônio adrenocorticotrófico). O ACTH é liberado na corrente sanguínea, ao alcançar as glândulas adrenais, acima dos rins, estimula as estruturas a produz glicocorticoides, dentre os quais o cortisol. O organismo, enquanto em estado de estresse, mantém o eixo HPA ativado. Conforme os níveis de cortisol circulante aumentam, receptores de neurônios hipocâmpais e hipotalâmicos

interagem com o glicocorticoide e, em um mecanismo de *feedback* negativo, inibem a produção de mais cortisol.

A fim de traçar um perfil dos fatores que mais prejudicam a saúde de uma população, diversos estudos revelaram maior prevalência e incidência dos transtornos depressivos e de ansiedade no sexo feminino, além de outras doenças não comunicáveis (OTTE *et al.*, 2016; WHO, 2017; JAMES *et al.*, 2018; VOS *et al.*, 2020). Pesquisas em laboratório demonstraram outras diferenças sexuais na performance de roedores machos e fêmeas, por exemplo, van Haaren e van de Poll (1984a) evidenciaram que ratos Wistar exibem dimorfismo sexual na latência para reentrar em um compartimento onde receberam choques (protocolo de esquiva passiva), em que machos passam a evitar o compartimento a partir da terceira sessão, ao contrário das fêmeas, cuja latência só aumentou a partir da nona. Os mesmos autores ainda observaram que, através de um protocolo diferente de esquiva passiva, um número maior de ratos Wistar fêmeas evitaram o estímulo aversivo luminoso em relação à coorte dos machos (VAN HAAREN e VAN DE POLL, 1984b). Outros estudos observaram diferença sexual dos efeitos da administração de fluoxetina logo após o desmame de ratos Wistar, em que o fármaco pode estar associado a um aumento da memória de medo, mas que se administrado durante a adolescência, a esquiva passiva das fêmeas é melhorada (SAKHAIE *et al.*, 2020).

1.1 ESTRESSE, RESILIÊNCIA E SUSCETIBILIDADE

Um estressor pode ser interpretado como tudo aquilo que promove alterações fisiológicas no organismo de um indivíduo (MCEWEN, 2000), como por exemplo ter problemas de saúde, discutir com colegas, atrasar uma tarefa, perder o emprego, envolver-se em conflitos físicos, experienciar isolamento social, separar-se dos pais, sofrer abusos, etc. Entretanto, nem todo estresse representa um fenômeno de impacto negativo, o desafio cognitivo que um estressor confere aos animais, humanos ou não, também pode ser concebido como experiência num momento futuro (OSÓRIO *et al.*, 2016). Além disso, os estressores são percebidos de maneiras diferentes pelos seres vivos, tendo em vista que o cérebro é responsável pelas interpretações de mundo e que os eventos externos exercem influências sobre o órgão, também, cada indivíduo pode se valer de diferentes estratégias para lidar

com esses eventos (MCEWEN, 2000; OSÓRIO *et al.*, 2016; OTTE *et al.*, 2016; DANTZER *et al.*, 2018).

Em relação às estratégias que podem ser recorridas para lidar com os eventos estressores, dependendo da natureza delas, o indivíduo pode ser classificado como resiliente ou suscetível ao estresse. Denomina-se resilientes aqueles que são capazes de reestabelecer a homeostasia – os parâmetros fisiológicos vitais para um funcionamento eficiente do organismo – através da alostase – conjunto de processos que restauram a homeostasia – após ter sido submetido a um evento estressor, o que promove um impacto positivo sobre a relação do indivíduo com o meio (MCEWEN, 2000; OSÓRIO *et al.*, 2016). Apesar de os mecanismos não serem completamente conhecidos, sabe-se de alguns fatores que estão envolvidos na resposta resiliente de um animal, por exemplo a epigenética (OSÓRIO *et al.*, 2016), sistema imunológico (OTTE *et al.*, 2016; MURROUGH e RUSSO, 2019), *coping* ou estratégias de enfrentamento, microbiota (DANTZER *et al.*, 2018) e plasticidade neural (CATHOMAS *et al.*, 2019; TSYGLAKOVA, 2019). Uma característica que foi observada em indivíduos resilientes é a *downregulation* (inibição da transcrição) do cluster miR-106b~25 em camundongos knockout (camundongos geneticamente modificados para não expressar proteínas específicas), em que a inibição ou redução da atividade epigenética de um grupo de microRNAs específicos conferem resiliência ao organismo (PFAU *et al.*, 2019).

Já os indivíduos de perfil suscetível são aqueles que, ao enfrentar situações de estresse ou trauma, exibem comportamentos tipo-ansioso ou -depressivo em virtude da carência ou latência de respostas alostáticas para retomar a homeostasia, por exemplo a anedonia (perda de interesse em atividades que outrora foram prazerosas), afastamento social e/ou perda do comportamento de auto cuidado (CATHOMAS *et al.*, 2019; TSYGLAKOVA, 2019). Em indivíduos suscetíveis, constou-se elevada ativação de neurônios dopaminérgicos do sistema mesolímbico, redução da neurogênese hipocampal (CATHOMAS *et al.*, 2019; REUS *et al.*, 2017), elevados níveis de corticosterona plasmática, no caso de roedores (TSYGLAKOVA, 2019), e de leucócitos circulantes momentos antes de vivenciar o estresse (HODES *et al.*, 2014). A fim de compreender os mecanismos envolvidos na resposta ao estresse, diversos modelos animais foram projetados para estudar a resiliência e suscetibilidade aos eventos estressores, como por exemplo o teste de derrota social, de exploração do campo aberto, privação do cuidado materno nas fases iniciais da

vida, teste do labirinto em cruz elevado, da suspensão pela cauda e do nado forçado (CATHOMAS *et al.*, 2019).

1.2 COVID-19 E OS TRANSTORNOS MENTAIS COMUNS

No dia 11 de Março de 2020, através de veículos de comunicação, o diretor geral da Organização Mundial da Saúde reconheceu a pandemia pelo novo coronavírus (SARS-CoV-2), que já afetava a cidade de Wuhan, China, desde 31 Dezembro de 2019 (WU *et al.*, 2020). Em decorrência das medidas de segurança para evitar o alastramento do vírus, a rotina da população mundial teve de ser modificada repentinamente (HAWES *et al.*, 2021). Até a presente data, cerca de 567 milhões de casos foram confirmados no mundo inteiro, número que segue crescendo desde 2019 (WHO, 2022). Além dos impactos do isolamento e distanciamento social, quarentena, rigorosidade da higienização pessoal, de objetos e ambientes, a população ainda sofreu com a infecção propriamente dita, ao assistir indivíduos infectados, com o luto e preocupações financeiras (HAWES *et al.*, 2021).

O novo coronavírus representa um novo estressor para a rotina da população. Foi visto que as medidas tomadas para impedir a dispersão do vírus impactaram a saúde mental da população. Crianças, adolescentes e jovens adultos exibiram um aumento dos sintomas tipo-depressivos e -ansiosos em decorrência das medidas de prevenção da dispersão do vírus (HAWES *et al.*, 2021; ŚNIADACH *et al.*, 2021). O fechamento das escolas e comércio, acompanhado do isolamento e distanciamento social, quarentena, insegurança financeira, cessão total ou redução dos ganhos econômicos de diversas famílias intensificou os sintomas característicos dos transtornos mentais comuns. Quando verificada a incidência desses sintomas nos sexos masculino e feminino, constatou-se que o aumento foi maior no sexo feminino (HAWES *et al.*, 2021). Observou-se que mulheres jovens, solteiras, com pouca experiência profissional ou que ocupam cargos diretamente relacionados com o tratamento de pacientes infectados com o SARS-CoV-2 são fatores associados ao aumento de sintomas tipo-depressivos e -ansiosos (ELBAY *et al.*, 2020).

1.3 ESTRESSE CRÔNICO DE DERROTA SOCIAL (ECDS)

Considerando que os transtornos mentais que acometem os seres humanos não podem ser completamente simulados em animais experimentais, utiliza-se protocolos de estresse que promovam alguns comportamentos tipo-depressivos e -ansiosos coincidentes entre as espécies para que esses possam ser estudados (DALLA *et al.*, 2009). O estresse social é comum entre os vertebrados (ZAYAN, 1991), no ser humano, pode corroborar o desenvolvimento de transtornos mentais, por exemplo os de ansiedade (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013), ao promover estresse comportamental em virtude da sensação de medo e antecipação ou sofrimento físico propriamente dito, resultando no estresse psicológico (ZAYAN, 1991). Assim, modelos de estresse social são interessantes para avaliar os impactos da derrota sobre outros parâmetros comportamentais – latência para escapar de uma situação aversiva (FURMAN *et al.*, 2022), latência para imobilidade durante o nado forçado (HODES *et al.*, 2015) e suspensão pela cauda, ou índice de interação social (FURMAN *et al.*, 2022).

O interesse pela compreensão dos impactos do conflito social sobre um organismo vem de longa data (SCOTT, 1946), há décadas, diversos protocolos de estresse crônico de derrota social (ECDS) foram padronizados (HOLLIS e KABBAJ, 2014), sendo todos eles baseados no paradigma do residente-intruso, em que um animal residente demonstrará forte apelo para defender seu território de um intruso (de outra linhagem, ou não), para tal, irá ataca-lo até que se estabeleça uma hierarquia, sendo o camundongo residente dominante e o intruso, submisso; o paradigma foi construído baseado na utilização de camundongos machos tanto como residente quanto intruso (ZAYAN, 1991; OLIVIER e MOSS, 1992; KOOLHAAS *et al.*, 2013; HOLLIS *et al.*, 2014; BEERY e KAUFER, 2015; SCHEGGI *et al.*, 2018).

Quando projetado para a utilização de animais experimentais do sexo feminino, o protocolo de ECDS contempla algumas limitações, a mais fundamental é a dificuldade em garantir uma consistência de interações agressivas por parte dos camundongos residentes, uma vez que o comportamento natural é de não atacar indivíduos fêmeas (BENUS *et al.*, 1990; Harris *et al.*, 2018; KUSKE e TRAINOR, 2021). Considerando que a interação agressiva com contato físico representa um risco tanto para o agressor quanto para a vítima, quando se submete fêmeas à derrota social é interessante considerar parâmetros comportamentais que envolvem não apenas ataques com mordidas, mas também as perseguições, *grooming*,

investidas, tentativas e montas propriamente ditas, além de demonstrações de dominância (KOOLHAAS *et al.*, 2013; VAN DOESELAR *et al.*, 2021).

Alguns protocolos foram desenvolvidos baseados na indução sensorial de agressão ao impregnar os camundongos fêmeas com urina de indivíduos machos (HARRIS *et al.*, 2017; TAKAHASHI *et al.*, 2017) e pela utilização de camundongos residentes cujo comportamento agressivo é induzido pelo cruzamento entre linhagens transgênicas, em conjunto à administração de fármacos (TAKAHASHI *et al.*, 2017; YIN *et al.*, 2019). Ainda, viu-se que a exclusão da fase de contato sensorial demonstrou ser favorável para o aumento de interações agressivas contra os camundongos intrusos fêmeas, uma vez que esse período de contato sensorial pode representar uma fase de extinção das memórias aversivas, um tipo de aprendizado (TAKAHASHI *et al.*, 2017; KUSKE e TRAINOR, 2021). Alcançada uma consistência de ataques performados contra os camundongos fêmeas, estas podem exibir comportamentos de submissão ao intruso agressor, como imobilidade, deitar-se com o abdômen voltado para cima, ou ficar em posição ereta com as patas dianteiras para o alto (YIN *et al.*, 2019; LECLAIR *et al.*, 2021).

2 HIPÓTESE

Hipótese 1 – o ECDS prejudica o comportamento social de interação de machos e fêmeas.

Hipótese 2 – o ECDS prejudica o comportamento emocional de machos e fêmeas.

3 JUSTIFICATIVA

Em 2015, a agência Institutos Nacionais da Saúde (NIH) anunciou, através da notificação NOT-OD-15-103, o critério de inclusão de ambos os sexos em pesquisas envolvendo animais vertebrados, uma vez que o sexo é considerado uma variável biológica que tem influência sobre processos moleculares e celulares, entendendo que as descobertas sexo-específicas podem contribuir para estudos biomédicos. Revisões demonstraram uma discrepância na utilização exclusiva de animais experimentais machos em pesquisas de neurociência (BEERY e ZUCKER, 2011; PRENDERGAST *et al.*, 2014; SHANSKY e WOOLLEY, 2016; WILL *et al.*, 2017). Segundo Shansky e Woolley (2016), dos 1244 artigos analisados, publicados em cinco diferentes jornais, aproximadamente 32% contemplaram apenas o sexo masculino nas análises e 7%, o feminino, dos estudos que contemplaram ambos os sexos, apenas 4% obteve sucesso em observar diferenças sexuais.

A qualidade de vida e o desenvolvimento econômico de um país estão relacionados com a integridade da saúde da população (VIGO, 2016). Os transtornos mentais estão entre os principais protagonistas de todas as causas de incapacitação civil no mundo (VOS *et al.*, 2020). Foi observado que a incidência e prevalência dos transtornos de ansiedade e de depressão acometem mais o sexo feminino do que o masculino (RITCHIE e ROSER, 2018). Ainda, estudos demonstraram que animais experimentais exibem diferenças comportamentais, neuroanatômicas e/ou fisiológicas conforme o sexo (ANDREANO e CAHILL, 2009; RIBEIRO *et al.*, 2010). Assim, neste estudo, padronizamos dois protocolos de ECDS em camundongos C57BL/6 machos e fêmeas, comparando os desfechos comportamentais e as estratégias de enfrentamento utilizadas. Nossos resultados poderão contribuir para o entendimento das diferenças sexuais na performance dos animais durante os testes emocionais (STEIN *et al.*, 2015; BEERY e ZUCKER, 2011; PRENDERGAST *et al.*, 2014; SHANSKY e WOOLLEY, 2016).

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo avaliar e comparar os protocolos de ECDS em camundongos C57BL/6 machos e fêmeas.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar e comparar as estratégias de *coping* de camundongos C57BL/6 machos e fêmeas durante o protocolo de ECDS;
- Analisar os efeitos do ECDS sobre o comportamento emocional e social de camundongos C57BL/6 machos e fêmeas.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

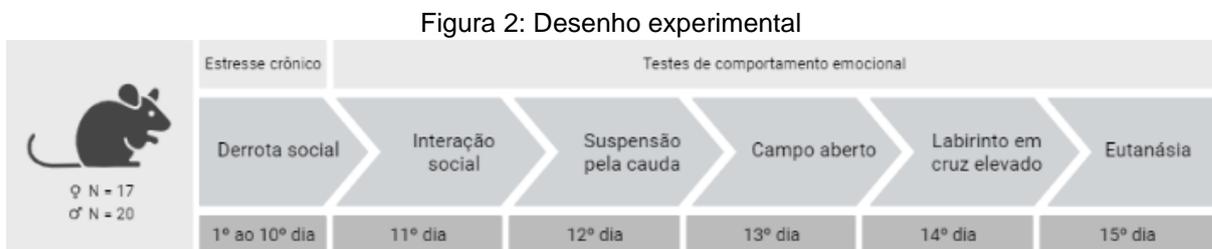
5.1 ANIMAIS

No total, foram utilizados 20 camundongos machos e 17 fêmeas (3 e 4 meses de idade) da linhagem C57BL/6; para os protocolos de derrota social, foram utilizados camundongos machos da linhagem *Swiss* (entre 4 a 6 meses de idade). Todos os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, com acesso livre à água e alimento específico para camundongos (NUVITAL – Nuvilab CR1), sob temperatura ambiente (20-23°C) e ciclo claro-escuro de 12:12h (7h – 19h, ciclo claro).

Os experimentos foram realizados na sala de comportamento do Departamento de Bioquímica da UFSC e as coortes experimentais foram ambientadas ao local pelo menos 24 horas antecedentes ao início dos protocolos de estresse e testes comportamentais. Os grupos controles foram mantidos no Biotério Setorial sob as mesmas condições de residência que os animais experimentais. A utilização dos animais e a realização dos protocolos de estresse foram autorizadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (UFSC – CEUA nº 5290231120).

5.2 DESENHO EXPERIMENTAL

As coortes experimentais de machos ($n = 10$) e fêmeas ($n = 9$) foram submetidas ao protocolo de estresse crônico de derrota social, com duração de 10 dias, para avaliação das estratégias de enfrentamento aos ataques. Nos dias 1, 5 e 10 do protocolo, registrou-se em vídeo os comportamentos para análise do *coping* e cálculo das estatísticas. Nos dias seguintes, foram realizados testes para avaliação de comportamento emocional (Figura 2).



Fonte: elaborado pela autora.

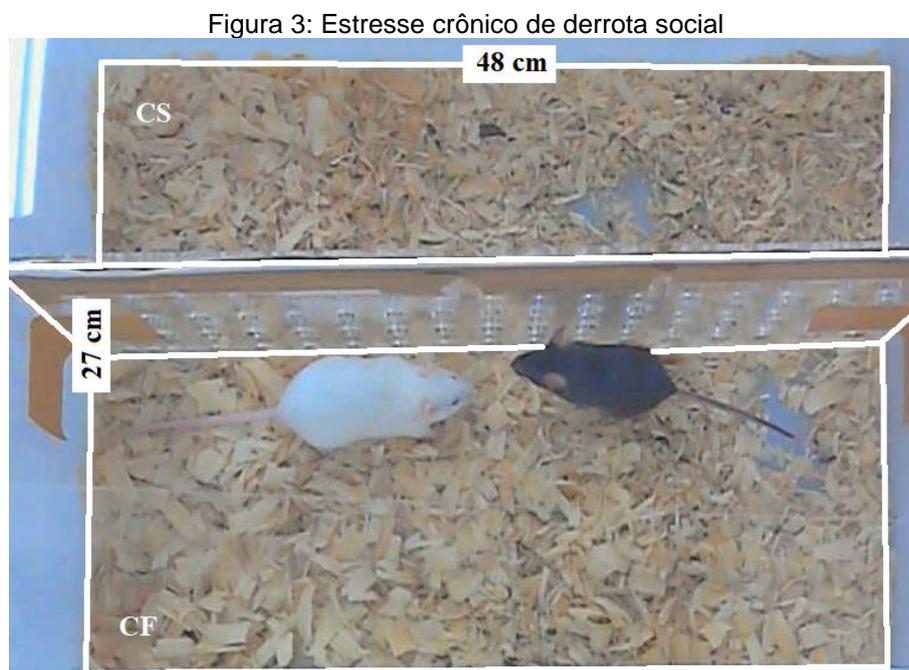
Legenda: Ao todo, 19 camundongos experimentais da linhagem C57BL/6 (machos $n = 10$, 2 meses de idade, e fêmeas $n = 9$, 3 a 4 meses de idade) foram submetidos ao protocolo de estresse crônico de derrota social por um período de 10 dias (as estratégias de enfrentamento foram registradas em vídeo nos dias 1, 5 e 10 do protocolo), seguido dos testes de comportamento emocional: interação social, suspensão pela cauda, campo aberto e labirinto em cruz elevado. Após a finalização do último teste, todos os animais (experimentais e controles) foram eutanasiados.

5.3 PROTOCOLO DE ESTRESSE

5.3.1 ECDS

O protocolo de ECDS consiste na exposição de cada animal experimental C57BL/6 a uma sessão diária de confronto físico seguido de contato sensorial por 24 horas (GOLDEN *et al.*, 2011; HARRIS *et al.*, 2018). Como antagonista, foi utilizada a linhagem de camundongos Swiss, que tem porte maior e comportamento mais agressivo em relação aos C57BL/6. Em cada caixa de residência (com dimensões aproximadas de 48 x 27 x 15 cm), foi alojado um camundongo agressivo e um experimental, ambos separados por uma divisória plástica transparente, removível e perfurada para permitir a troca de estímulos sensoriais (Figura 3). Durante uma

sessão de 10 minutos por dia, ao longo de 10 dias, o camundongo experimental é transferido para o lado do agressor para ser submetido aos ataques (etapa de contato físico), em seguida, os camundongos são separados e o animal derrotado é retornado para o outro lado da divisória (etapa de contato sensorial). Após cada dia de contato sensorial, os camundongos C57BL/6 foram rotacionados para a caixa de residência de um *Swiss* diferente, para evitar que houvesse habituação de ambas as partes; os camundongos *Swiss* não agrediram o mesmo indivíduo C57BL/6 mais de uma vez durante todo o experimento.



Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: Registro fotográfico obtido durante a sessão de conflito físico do protocolo de ECDS. Dimensões e esquematização das áreas da caixa de residência utilizada para performar o protocolo de estresse. Abreviações CS – Contato Sensorial; CF – Contato Físico.

5.3.1.1 *Triagem de camundongos agressores*

Para garantir que os animais experimentais sejam submetidos a sessões consistentes de ataques durante o protocolo de ECDS, foram selecionados camundongos *Swiss* agressivos através de um processo de triagem, em que cada indivíduo (de 3 a 4 meses de idade) foi isolado por 30 dias antecedentes à seleção. Num segundo momento, os camundongos *Swiss* foram expostos, em suas próprias caixas de residência, a indivíduos C57BL/6 machos – utilizados especificamente

para esta etapa do protocolo de ECDS – por 3 dias consecutivos, cada exposição foi realizada em sessões de 3 minutos por dia.

Durante os 3 dias de triagem, os camundongos C57BL/6 foram alternados de modo que um indivíduo *Swiss* não atacasse o mesmo camundongo mais de uma vez. Para serem selecionados, os camundongos considerados agressivos foram os que apresentaram uma latência de ataque inferior a 60 segundos ou que promoveram mais de 10 ataques em ao menos dois dias consecutivos (GOLDEN *et al.*, 2011). Por fim, os indivíduos *Swiss* agressivos selecionados foram isolados em caixas de residência retangulares, com dimensões aproximadas de 48 cm x 27 cm x 15 cm.

5.3.1.2 *Camundongos experimentais machos*

Os camundongos machos da linhagem C57BL/6, foram divididos em grupo ECDS e controle (10 animais por grupo). Cada animal do grupo ECDS foi alojado na caixa de residência de um camundongo agressivo, dividida por uma placa transparente e perfurada, permitindo a troca de estímulos sensoriais (Figura 3). Durante uma sessão de 10 minutos por dia, ao longo de 10 dias, o camundongo experimental foi transferido para o lado do agressor para ser submetido aos ataques (etapa de contato físico), após os 10 minutos, os camundongos foram separados e o animal derrotado foi retornado para o outro lado (etapa de contato sensorial). Após cada dia de contato sensorial, os camundongos C57BL/6 foram rotacionados para a caixa de residência de um *Swiss* diferente, os agressores não encontraram o mesmo indivíduo C57BL/6 mais de uma vez durante todo o experimento.

Os controles foram alocados em pares nas caixas de residência, em ambos os lados havia um camundongo C57BL/6 macho, sendo que ambos foram mantidos separados por uma placa removível, perfurada e transparente para permitir o contato sensorial. Os animais controles também foram rotacionados diariamente para que não houvesse habituação ao companheiro da caixa de residência; ao contrário da etapa de confronto físico para o grupo ECDS, no controle não houve nenhum tipo de contato físico. O acesso à água e ração foi livre durante todo o experimento.

5.3.1.3 *Camundongos experimentais fêmeas*

Para a coorte das fêmeas, o protocolo de ECDS foi modificado de acordo com Harris *et al.* (2018) e van Doeselaar *et al.* (2021). As fêmeas da linhagem C57BL/6, foram distribuídas entre os grupos ECDS (n = 9) e controle (n = 8). Foram utilizados os mesmos *Swiss* agressores tanto para o protocolo de ECDS dos machos quanto para o das fêmeas. Para garantir que as fêmeas passassem por sessões de derrota social consistentes, antes da etapa de contato físico, foi aplicado urina de camundongos machos C57BL/6 no dorso, base da cauda e orifício vaginal para estimular a agressividade dos camundongos *Swiss*. O ciclo estral não foi rastreado ao longo de todo o experimento, uma vez que a verificação representa um estressor para as fêmeas (DALLA *et al.*, 2009; FURMAN *et al.*, 2022) e que o estágio do ciclo não impacta significativamente a performance dos camundongos (HARRIS *et al.*, 2017; YOHAN *et al.*, 2019).

A urina utilizada foi coletada de camundongos C57BL/6 machos específicos para essa finalidade. Diariamente por aproximadamente 2 horas, cerca de 15 animais foram transferidos para uma caixa de residência sem maravalha, alimento e garrafa de água, com apenas uma grade na base da caixa para evitar que os camundongos caminhassem sobre a urina excretada. A urina excretada foi coletada com auxílio de uma micropipeta e armazenada em microtubos.

As fêmeas foram do grupo ECDS foram alojadas na caixa de residência de um camundongo agressivo, dividida por uma placa transparente e perfurada, permitindo a troca de estímulos sensoriais (Figura 3). Durante uma sessão de 10 minutos por dia, ao longo de 10 dias, o camundongo experimental foi transferido para o lado do agressor para ser submetido aos ataques (etapa de contato físico), após os 10 minutos, os camundongos foram separados e o animal derrotado foi retornado para o outro lado (etapa de contato sensorial). Após cada dia de contato sensorial, os camundongos C57BL/6 foram rotacionados para a caixa de residência de um *Swiss* diferente, os agressores não encontraram o mesmo indivíduo C57BL/6 mais de uma vez durante todo o experimento.

O grupo controle foi mantido em condições semelhantes aos animais experimentais. Em uma caixa de residência, pares de fêmeas foram alojadas isoladamente, separadas por uma divisória transparente, removível e perfurada para permitir a troca de estímulos sensoriais (não houve interação física entre as fêmeas

controles). Todos os dias, as fêmeas controle foram expostas ao odor da urina dos camundongos machos, que foi aplicada no dorso, base da cauda e orifício vaginal. As fêmeas controles também foram rotacionadas diariamente para que não houvesse habituação à companheira da caixa de residência; não houve nenhum tipo de contato físico. O acesso à água e ração foi livre durante todo o experimento.

5.3.1.4 *Índice de coping ativo e passivo*

Por “*coping*”, entende-se tratar das estratégias de enfrentamento que os animais experimentais recorrem para lidar com os estressores e, no caso do protocolo de ECDS, a análise dessas estratégias se dá pelo registro da forma com que o animal experimental intruso responde a cada investida agressiva performada pelo camundongo agressor residente (LECLAIR *et al.*, 2021). Para avaliação das estratégias de enfrentamento da coorte dos machos, foi considerado como comportamento agressivo as investidas do Swiss com presença de mordida no dorso, abdômen, cauda ou patas. Já para a coorte das fêmeas, foi considerado como interação agressiva as tentativas de monta – o comportamento foi interrompido em todas as vezes, nenhuma fêmea veio a ficar prenha –, “*grooming*” (quando o camundongo Swiss lambe a fêmea C57BL/6), investidas, perseguições e mordidas (KOOLHAAS *et al.*, 2013; LECLAIR *et al.*, 2021). Em casos de ferimentos graves e intensos, recomenda-se que a sessão seja interrompida. No presente estudo não houve necessidade de interromper o experimento, feridas graves também não foram observadas em ambas as coortes.

As respostas às interações agressivas foram classificadas em ativas (movimentos de fuga, “*boxing*”, quando o camundongo C57BL/6 afasta o agressor com as patas dianteiras, mordidas ou investidas) e passivas (exibição de imobilidade e comportamentos de submissão, como por exemplo deitar-se com o abdômen voltado para cima ou ficar em posição ereta com as patas dianteiras para o alto (YIN *et al.*, 2019; LECLAIR *et al.*, 2021)). O cálculo do índice de *coping* ativo foi feito pela subtração de estratégias ativas pelas passivas, dividido pelo número total de estratégias (número de respostas ativas – número de respostas passivas / total de respostas) (LECLAIR *et al.*, 2021).

Tabela 1 – Descrição dos comportamentos analisados

Comportamentos	Descrição
Interação agressiva (machos)	Investidas com mordidas
Interação agressiva (fêmeas)	Investidas com e sem mordidas, tentativas de monta, <i>grooming</i> agressivo, perseguições
Estratégia ativa	Fuga, <i>boxing</i> , afastamento corporal
Estratégia passiva	Imobilidade, posturas submissas

Fonte: elaborado pela autora.

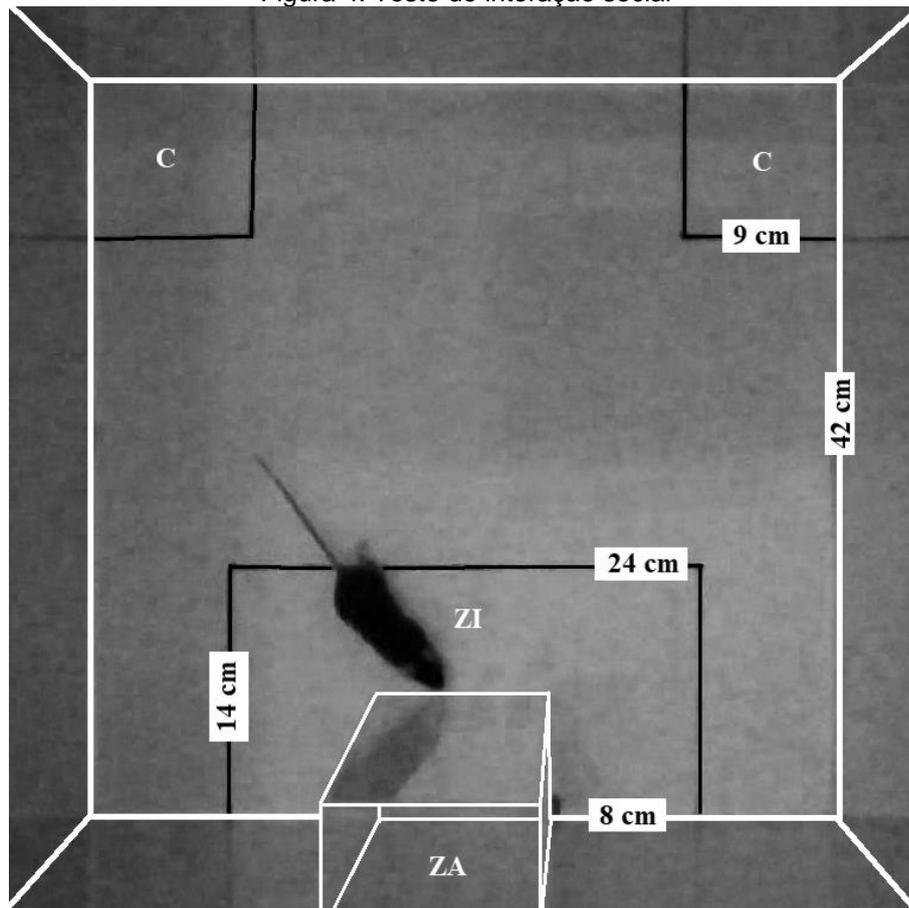
5.4 TESTES COMPORTAMENTAIS EMOCIONAIS

Após 24 horas do término do protocolo de ECDS, os animais experimentais foram submetidos a testes comportamentais emocionais para verificação da resiliência.

5.4.1 Teste de interação social

O teste de interação social de duas etapas (habituação e teste) foi realizado para analisar o comportamento de esquiva social dos animais experimentais (GOLDEN *et al.*, 2011). O aparato consiste em uma arena de dimensões 42 cm x 42 cm x 42 cm, cuja a base é seccionada em duas zonas de cantos, uma zona de interação e um compartimento do agressor (Figura 4), onde o camundongo *Swiss* foi abrigado na etapa de teste, e trata-se de uma caixa de acrílico perfurado e transparente que permite o contato sensorial entre o agressor e intruso.

Figura 4: Teste de interação social



Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: Registro fotográfico obtido durante a fase de habituação do protocolo. Dimensões e esquematização das zonas do aparato utilizado para performar o teste de interação social.

Abreviações: C – Canto; ZA – Zona do agressor; ZI – Zona de interação.

5.4.1.1 *Habituação – sem alvo*

Imediatamente após o término do protocolo de ECDS, os camundongos experimentais foram individualmente alojados em caixas de residência. Para dar início à primeira etapa do teste de interação social, 24 horas após o término do protocolo de ECDS, cada animal C57BL/6 foi aclimatado na sala de experimentos comportamentais por pelo menos 1 hora, em seguida, foi posicionado no interior do aparato para explorá-lo por um período de 150 segundos. Nesta fase, a caixa de acrílico foi posicionada no interior do aparato, adjacente a uma das paredes, sem a presença do camundongo *Swiss* agressor (o alvo). Durante o experimento, foram utilizadas duas caixas, uma específica para cada fase de modo a evitar a

impregnação de estímulos odoríferos durante a habituação. Ao final da exploração, o animal foi devolvido à caixa de residência e o aparato limpo com álcool 10%.

5.4.1.2 Teste – com alvo

Decorridos 30 segundos de intervalo, os animais experimentais foram novamente posicionados no aparato, que agora conta com a presença de um *Swiss* desconhecido (o alvo) e retido na caixa de acrílico, o camundongo experimental permaneceu no interior do aparato por mais 150 segundos. Para ambas as etapas (ausência e presença do camundongo agressor), foi contabilizado o índice de IS, o tempo nas zonas dos cantos e a distância percorrida por todo o aparato. Para a coorte das fêmeas, os testes foram realizados sob iluminação por lâmpada vermelha (30 luxes), para os machos, sob meia-luz. Nos dias 1, 5 e 10 as sessões de ECDS foram registradas em vídeo, posteriormente, os arquivos foram analisados através do programa ANY-maze Video Tracking System, versão 7.13, © Stoelting Co. Ao final do teste, os camundongos experimental e agressivo foram devolvidos às caixas de residência, separadamente, e o aparato foi higienizado com álcool 10%.

5.4.1.3 Índice de IS

Foi obtido por meio da divisão do tempo despendido na zona de interação com a presença do camundongo agressor (T') pelo tempo na zona de interação na ausência do camundongo agressor (T''). Um índice igual a 1 representa o limite para se considerar que os camundongos exibiram comportamento de esquiva social, ou não. Entende-se que se trata de um animal que está evitando o *Swiss* agressor quando a razão é menor que 1; quando o camundongo experimental apresenta um índice igual ou superior a 1, tem-se um indicativo de que ele não está exibindo comportamento de esquiva social (GOLDEN *et al.*, 2011).

$$\text{Índice de interação social (IIS)} = \frac{\text{Tempo na zona de interação COM o alvo (T')}}{\text{Tempo na zona de interação SEM o alvo (T'')}}$$

Em que:

IS ≥ 1 = Comportamento semelhante ao controle

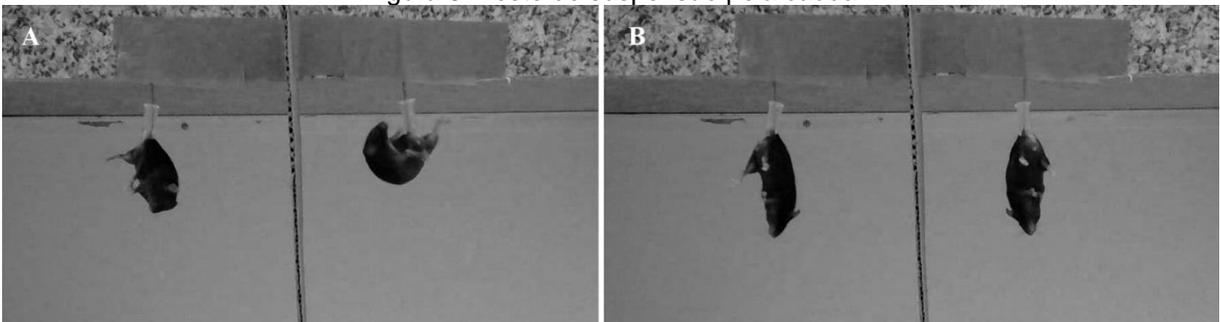
IS < 1 = Comportamento de esquiva social

5.4.2 Teste de suspensão pela cauda

Trata-se de um teste comportamental de estresse agudo utilizado para investigar o comportamento tipo-depressivo. Assim, o animal é submetido a uma situação inescapável e aversiva, em que ele é suspenso pela cauda por um determinado período de tempo e, ao longo de toda a sessão, o comportamento dos animais experimentais é analisado. A reação instintiva é mover-se vigorosamente em tentativas de escape, assim, os animais exibem agitações do corpo e das patas para alcançar a cauda ou a superfície do suporte (CAN *et al.*, 2012), sendo que os animais resilientes apresentam latência de imobilidade maior que os animais suscetíveis (CARTER e SHIEH, 2012).

No presente trabalho, cada animal teve a cauda fixada em um suporte por uma fita adesiva, de modo a não conseguir escalar por ela ou alcançar a superfície das paredes adjacentes, permanecendo suspenso por um período de 6 minutos (CAN *et al.*, 2012, Figura 5). O tempo de imobilidade e a latência para alcançar o estado de imobilidade foram contabilizados. Como a tendência dos animais é escapar dessa situação, os camundongos exibem movimentações frenéticas, que, ao longo do tempo, tornam-se mais sutis até que seja exibido o estado de imobilidade - a movimentação pendular ou das patas dianteiras não foram consideradas como mobilidade (CAN *et al.*, 2012).

Figura 5: Teste de suspensão pela cauda



Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: Registro fotográfico obtido de uma das sessões do teste de suspensão pela cauda.

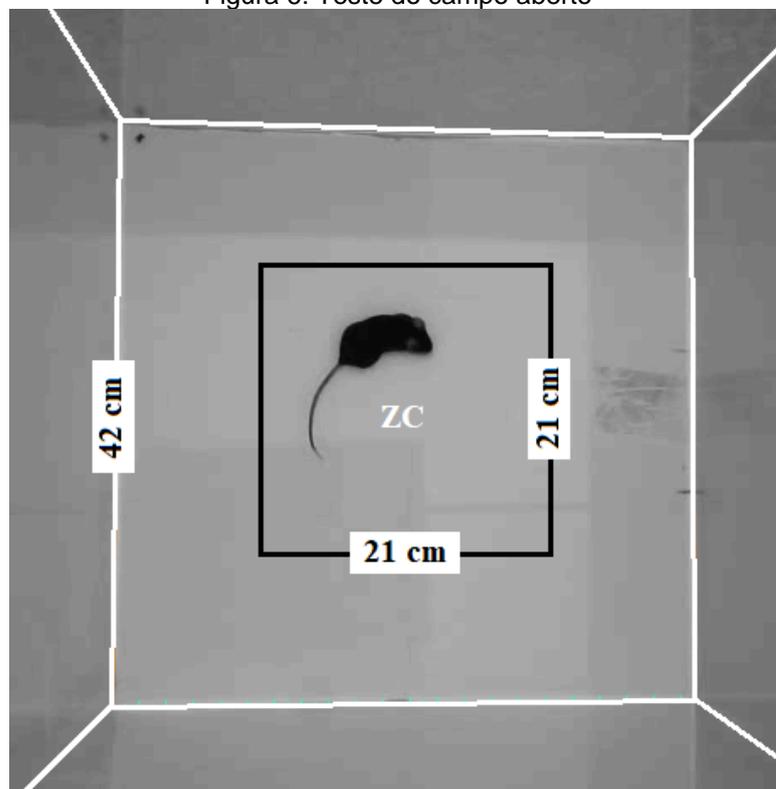
Observa-se dois indivíduos machos de C57BL/6, separados por uma divisória de papelão, fixos por uma fita adesiva na extremidade da bancada da sala de comportamentos; de modo a evitar a escalada pela cauda, foram adaptados tubos de eppendorf na base da cauda de cada animal. (A)

Período de movimentação intensa, ambos tentam escapar da situação ao realizar agitações corporais. (B) Período em que os mesmos animais exibem o comportamento de imobilidade.

5.4.3 Teste do campo aberto

Utilizado para avaliar comportamentos emocionais tipo-ansiosos e habilidade locomotiva dos camundongos experimentais (SEIBENHENER e WOOTEN, 2015), o teste do campo aberto se deu no interior de uma arena de acrílico, cercada por paredes e aberta no topo, com dimensões de 42 x 42 x 42 cm e um quadrante de 21 x 21 cm no meio (zona do centro, Figura 6). Por aproximadamente 30 minutos antes do início dos testes, os animais foram aclimatados na sala de comportamento, em que o teste do campo aberto foi realizado. Individualmente, todos os camundongos C57BL/6 foram submetidos a uma sessão de 5 minutos no campo aberto. Os parâmetros analisados foram a distância total percorrida e o tempo gasto na zona do centro. O aparato foi limpo com solução de álcool 10% para remover quaisquer pistas olfativas entre os testes.

Figura 6: Teste do campo aberto



Fonte: elaborado pela autora.

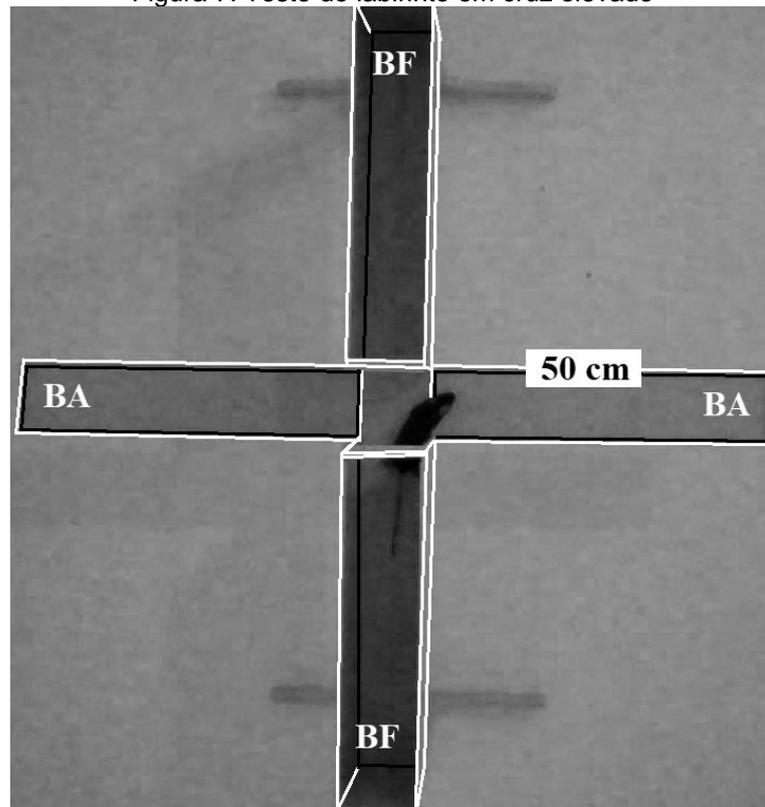
Legenda: Registro fotográfico obtido de uma das sessões do teste do campo aberto. Observa-se um indivíduo fêmea de C57BL/6 explorando o quadrante central do aparato, demarcado virtualmente para fins de rastreamento do indivíduo durante o teste. Abreviação: ZC – zona do centro.

5.4.4 Teste do labirinto em cruz elevado

Utilizado para analisar comportamentos tipo-ansioso em roedores (WALF e FRYE, 2007; KOMADA *et al.*, 2008; KRAEUTER *et al.*, 2019), o teste do labirinto em cruz elevado é realizado em um aparato com dois braços abertos e dois fechados, perpendiculares uns aos outros, com dimensões de 50 x 5 x 30 cm (Figura 7). Nos 30 minutos que antecedem o início do teste, os animais foram levados à sala de comportamento para aclimatação. Individualmente, cada camundongo de ambos os grupos e coortes foram posicionados no ponto de intersecção dos braços do aparato e a atividade exploratória foi registrada por 5 minutos.

O tempo despendido nos braços abertos e fechados é usado para analisar o comportamento tipo-ansioso dos animais. Trata-se de parâmetros complementares, os braços abertos representam áreas de exposição e risco, então, quanto menor o tempo de exploração nestas áreas, em combinação a um maior tempo de permanência nos braços fechados, mais o animal exibe comportamentos tipo-ansiosos. Depois de cada sessão, o aparato foi limpo com solução de álcool 10% eliminando as pistas olfativas deixadas no labirinto.

Figura 7: Teste do labirinto em cruz elevado



Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: Registro fotográfico obtido de uma das sessões do teste do labirinto em cruz elevado. Observa-se um camundongo C57BL/6 fêmea saindo do braço fechado “sul” em direção ao braço aberto “leste”. O aparato foi demarcado virtualmente para fins de melhoramento da visualização do labirinto e camundongo. Abreviação: BF –braço fechado; BA – braço aberto.

5.4.5 Análises estatísticas

Para as análises estatísticas, foi utilizado o software GraphPad Prism 8®. Em um primeiro momento, calculou-se a distribuição normal dos dados através do teste de *Kolmogorov-Smirnov*, em seguida, quando coube, verificou-se a presença de dados outliers através da ferramenta QuickCalcs®, sendo excluídos da análise seguinte quando identificados. Nos casos em que os resultados não obedeceram a distribuição normal foi realizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Para associar as estratégias de enfrentamento durante o ECDS – *coping* ativo e passivo – com a performance nos testes comportamentais emocionais após o ECDS – índice de IS, tempo de imobilidade, tempo nos braços abertos, tempo no centro do campo aberto e distância percorrida no campo aberto –, foram realizados o *test t* (para os testes emocionais) e ANOVA de uma via com medidas repetidas (para o *coping*).

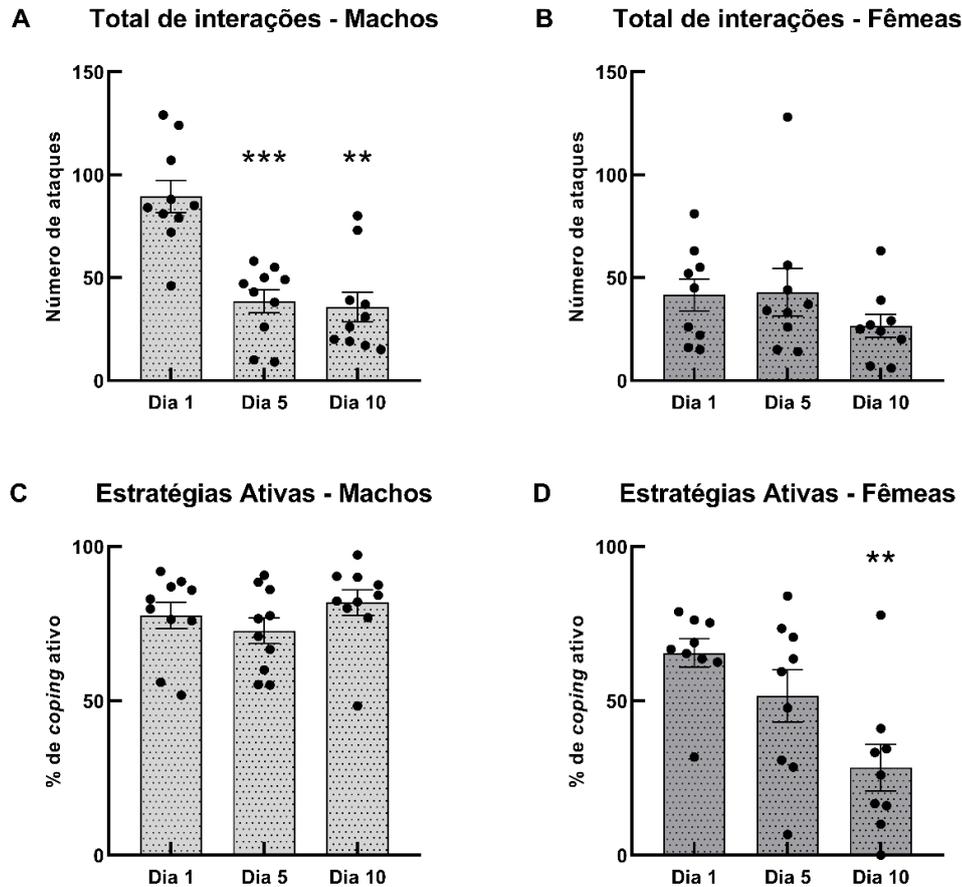
6 RESULTADOS

6.1 ESTRATÉGIAS DE ENFRENTAMENTO AO ESTRESSE

Para a análise das estratégias de enfrentamento, foram consideradas as interações entre o camundongo agressor e experimental dos dias 1, 5 e 10 do protocolo de ECDS, sendo registradas as respostas ativas e passivas em cada interação agressiva. Com relação ao número de ataques realizados ao longo do experimento, foi observada uma redução gradual e significativa para o grupo experimental dos machos, conforme demonstrado pela ANOVA de uma via de medidas repetidas ($F = 20,14$, $p = 0,0004$), Figura 8A. Segundo o teste de comparações múltiplas de *Tukey*, houve uma redução significativa dos ataques do dia 1 para o 5 ($p < 0,0001$) e para o 10 ($p = 0,0034$), mas não do dia 5 para o 10 ($p = 0,961$). A Figura 8B demonstra que, para a coorte das fêmeas, não houve diferença significativa do número de ataques recebidos entre os dias 1, 5 e 10 do protocolo de ECDS, conforme indicado pela ANOVA de uma via de medidas repetidas ($F = 1,642$, $p = 0,2356$).

A comparação do *coping* ativo entre os dias 1, 5 e 10 do protocolo de ECDS para a coorte dos machos não revelou alterações significativas, conforme a ANOVA de uma via de medidas repetidas ($F = 1,314$, $p = 0,293$, Figura 8C). Para a coorte das fêmeas (Figura 8D), a ANOVA de uma via de medidas repetidas indicou uma redução do número de estratégias ativas do dia 10 comparado ao dia 1 ($F = 7,844$, $p = 0,0063$); a análise de *Tukey* demonstrou que, apesar de uma redução gradual entre todos os dias, a diferença só atingiu significância quando comparados os dias 1 e 10 ($p = 0,0033$).

Figura 8: Avaliação das estratégias de enfrentamento durante o protocolo de ECDS



Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: Figuras A e B – número total de interações agressivas estabelecidas durante o protocolo de ECDS; (A) os resultados da coorte dos machos indicaram reduções significativas do número de ataques sofridos ao longo do protocolo (dia 1-5, $p < 0,0001$; dia 1-10, $p = 0,0034$), a comparação entre os dias 5 e 10 não revelou diferença; (B) os resultados da coorte das fêmeas não revelaram alterações significativas quando comparados os ataques sofridos de cada dia, apesar de no dia 10 haver uma redução, esta não foi significativa ($p = 0,17$). Figuras C e D – registro das estratégias de enfrentamento em resposta aos ataques performados pelo camundongo agressor; (C) a coorte dos machos não alterou o padrão de *coping* durante todo o protocolo, apesar de haver uma variação, essa diferença não foi significativa; (D) a coorte das fêmeas demonstrou uma redução gradual do número de estratégias ativas ao longo do protocolo, atingindo significância quando comparados os dias 1 e 10 ($p = 0,0033$). Coorte de machos, grupo controle N=10, grupo experimental N=10; coorte de fêmeas, grupo controle N=8, grupo experimental N=9.

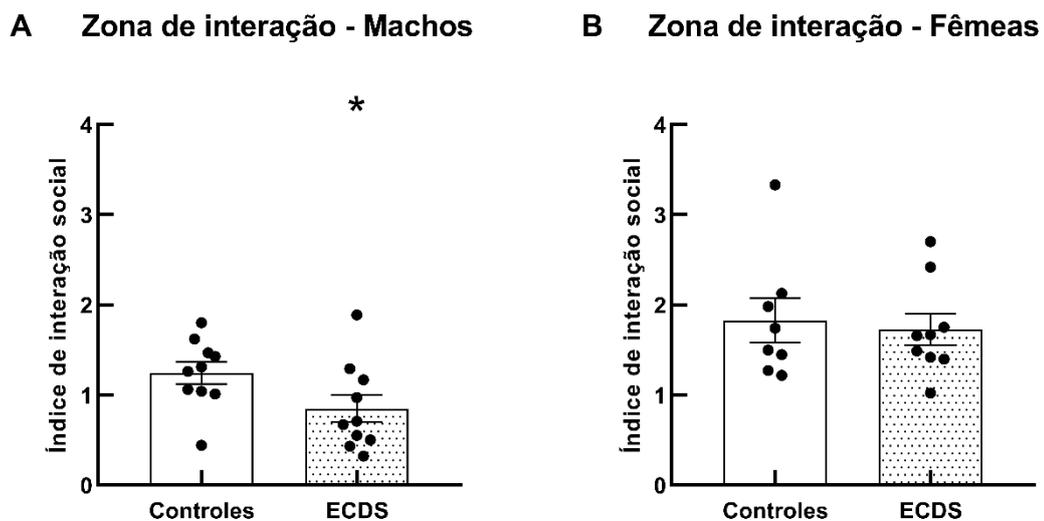
6.2 INTERAÇÃO SOCIAL

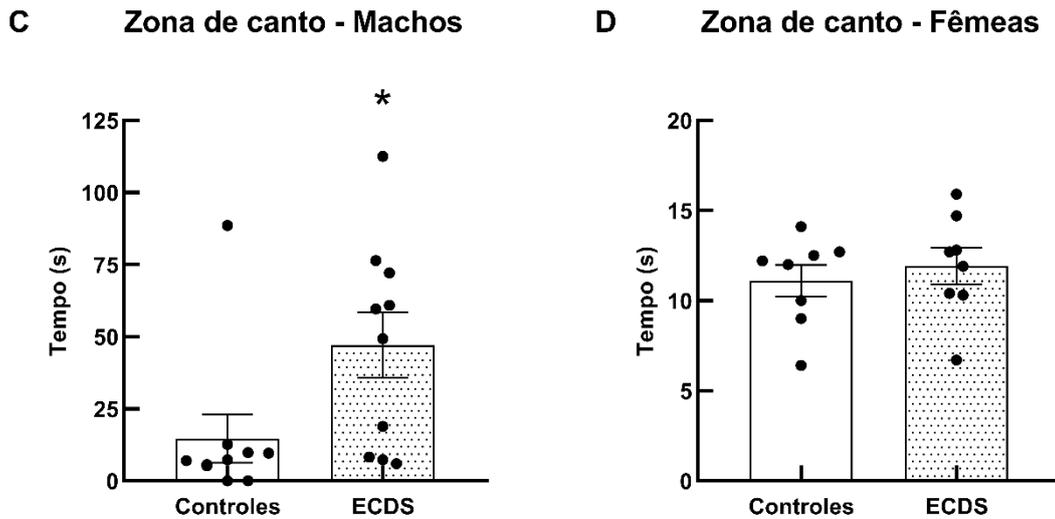
Os dados do índice de IS de fêmeas e machos apresentaram distribuição normal, conforme o teste de *Kolmogorov-Smirnov* ($p > 0,1$). Os resultados

apresentados na Figura 9A demonstram que o ECDS reduziu o índice de IS para a coorte de camundongos machos, como verificado pelo *test t* ($t = 2,018$, $p = 0,05$). Entretanto, para a coorte de fêmeas (Figura 9B) não houve diferença no índice de IS quando comparados os grupos de ECDS e controle ($t = 0,346$, $p = 0,73$). Ainda, a partir do cálculo do índice de IS, os camundongos foram classificados como “suscetíveis” (índice de IS < 1) e “resilientes” (índice de IS ≥ 1), assim, da coorte dos machos, 30% dos indivíduos submetidos ao protocolo de ECDS foram classificados como resilientes ao estresse, já para as fêmeas, 100% dos indivíduos alcançaram um índice de IS maior ou equivalente a 1, portanto, todas foram classificadas como resilientes.

Com relação ao tempo despendido nas zonas de canto (fora da zona de interação), os dados obtidos de machos e fêmeas apresentaram distribuição normal, conforme o teste de *Kolmogorov-Smirnov* ($p > 0,1$). Os resultados apresentados na Figura 9C demonstram que os camundongos machos submetidos ao ECDS passaram um tempo maior nos cantos do aparato quando comparado aos controles ($t = 3,362$, $p = 0,0037$). Com relação à coorte das fêmeas, diferenças significativas entre ECDS e controle não foram observadas ($t = 0,606$, $p = 0,55$), conforme demonstrado na Figura 9D.

Figura 9: Avaliação do comportamento social através do Teste de interação social pós ECDS





Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: Figuras A e B – Índice de interação social calculado através da razão entre o tempo despendido na zona de interação na presença do animal agressor e o tempo na mesma zona, porém, na ausência do agressor; (A) os resultados demonstraram uma redução significativa do índice de interação social para a coorte dos machos ($t = 2,018$, $p = 0,05$); (B) não houve alteração significativa no índice de interação para a coorte das fêmeas ($t = 0,346$, $p = 0,73$). Figuras C e D – Tempo, em segundos, despendido nas zonas de canto enquanto na presença do camundongo agressor; (C) os dados obtidos para os machos após o ECDS demonstraram um aumento significativo nas zonas de canto na presença do alvo ($t = 3,362$, $p = 0,0037$); (D) o tempo despendido nas zonas de canto não teve alterações significativas após o ECDS para a coorte das fêmeas. Coorte de machos, grupo controle $N=10$, grupo experimental $N=10$; coorte de fêmeas, grupo controle $N=8$, grupo experimental $N=9$.

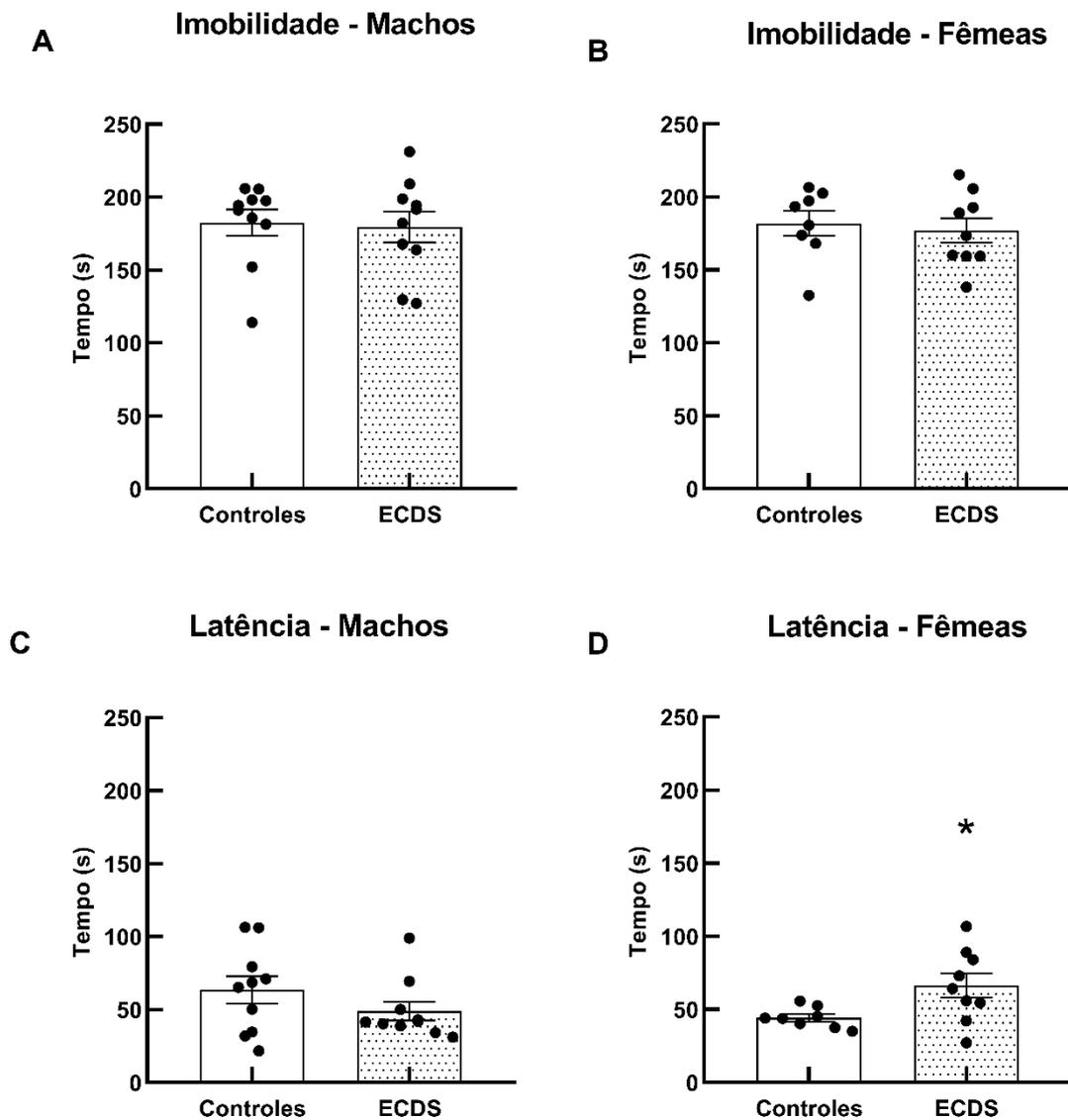
6.3 TESTE DE SUSPENSÃO PELA CAUDA

Com relação ao tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda, a coorte dos machos não atingiu uma distribuição normal. Um outlier foi identificado e removido, passando no teste de normalidade de *Kolmogorov-Smirnov* ($p > 0,1$). O *test t* não pareado demonstrou que o grupo ECDS não apresentou alterações significativas no tempo de imobilidade ($t = 0,868$, $p = 0,397$, Figura 10A). A coorte das fêmeas passou no teste de normalidade, segundo *Kolmogorov-Smirnov* ($p > 0,1$), o *test t* não pareado não revelou diferenças entre os grupos ECDS e controle ($t = 0,4$, $p = 0,693$, Figura 10B).

A latência para alcançar o estado de imobilidade foi contabilizado. Os dados da coorte dos machos não atingiram a normalidade, um outlier foi identificado e

removido. O teste de *Kolmogorov-Smirnov* indicou que os dados ainda não alcançaram a normalidade. O teste de Mann-Whitney foi realizado e nenhuma diferença significativa foi observada ($t = 27$, $p = 0,156$, Figura 10C). A coorte das fêmeas atingiu a normalidade, indicada pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov* ($p > 0,1$). Os dados do grupo ECDS revelaram uma alteração significativa na latência em decorrência do estresse crônico, de acordo com o *test t* ($t = 2,422$, $p = 0,028$, Figura 10D).

Figura 10: Análise do tempo de imobilidade durante o teste de suspensão pela cauda pós ECDS



Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: Figuras A e B – o tempo, em segundos, em estado de imobilidade é um parâmetro emocional observado no animal enquanto em situação inescapável e aversiva, no caso, a suspensão pela cauda; (A) os resultados demonstraram que não houve alteração significativa no tempo total de

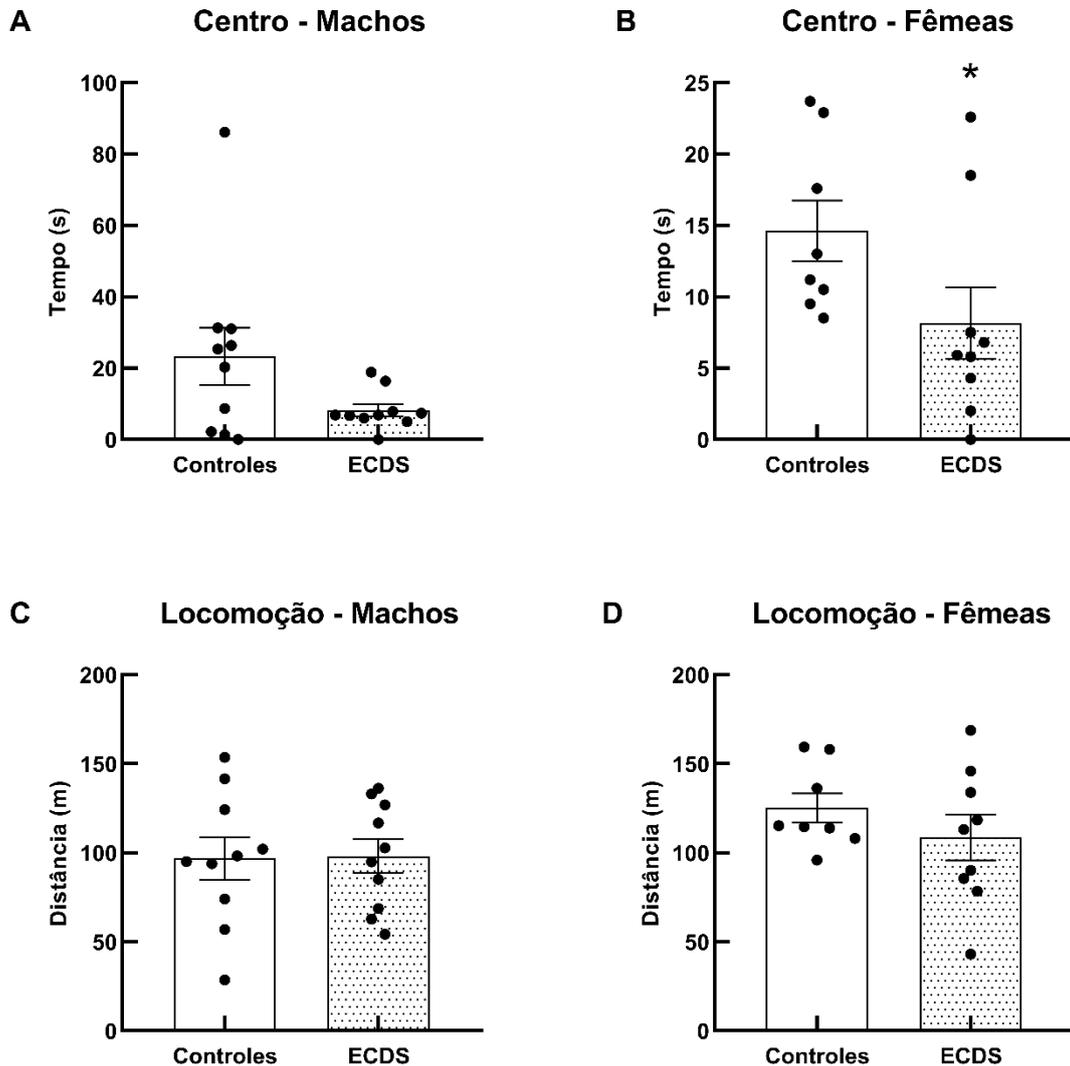
imobilidade para a coorte dos machos ($t = 0,868$, $p = 0,397$), assim como (B) não houve alteração significativa no tempo de imobilidade para a coorte das fêmeas ($t = 0,4$, $p = 0,693$). Figuras C e D – a latência para imobilidade, registrada em segundos, também é um parâmetro emocional observado durante uma situação inescapável e aversiva; (C) os resultados demonstraram que o ECDS não alterou significativamente a latência para imobilidade na coorte dos machos ($t = 27$, $p = 0,156$); (D) os resultados para o grupo ECDS da coorte das fêmeas apontou uma alteração significativa na latência quando comparado ao grupo controle ($t = 2,422$, $p = 0,028$). Coorte de machos, grupo controle N=10, grupo experimental N=10; coorte de fêmeas, grupo controle N=8, grupo experimental N=9.

6.4 TESTE DO CAMPO ABERTO

Nesse teste, foram analisados dois parâmetros: o tempo que o animal passou no quadrante central do aparato (indicativo de comportamento tipo-ansioso) e a distância total (em metros) percorrida no aparato. Com relação ao tempo no centro, ambas as coortes de machos e fêmeas não apresentaram distribuição normal, conforme o teste de *Kolmogorov-Smirnov* ($p < 0,05$), *outliers* não foram identificados e a análise foi concluída com o teste não paramétrico de *Mann-Whitney*. Não houve diferenças entre os grupos na coorte de machos ($t = 29,5$, $p = 0,127$, Figura 11A). Entretanto, na coorte de fêmeas, o grupo ECDS apresentou uma redução significativa do tempo despendido no centro do aparato quando comparado ao grupo controle ($t = 12$, $p = 0,02$, Figura 11B). Portanto, o protocolo de ECDS influenciou o comportamento emocional tipo-ansioso na coorte das fêmeas.

Quanto ao parâmetro da distância total percorrida no interior do aparato, o cálculo do teste de normalidade *Kolmogorov-Smirnov* para os machos apontou uma distribuição normal ($p > 0,1$), o teste *t* não indicou diferenças entre os grupos ($t = 0,085$, $p = 0,933$, Figura 11C), indicando que o ECDS não prejudicou o comportamento de locomoção dos camundongos dessa coorte. Quando analisado os dados das fêmeas, os dados do grupo controle não apresentaram ($p < 0,05$), tendo sido realizado o teste não paramétrico de *Mann-Whitney*, que não apontou diferenças entre os grupos ($t = 26$, $p = 0,37$, Figura 11D).

Figura 11: Avaliação do parâmetro emocional de tempo e deslocamento no teste do campo aberto



Fonte: elaborado pela autora.

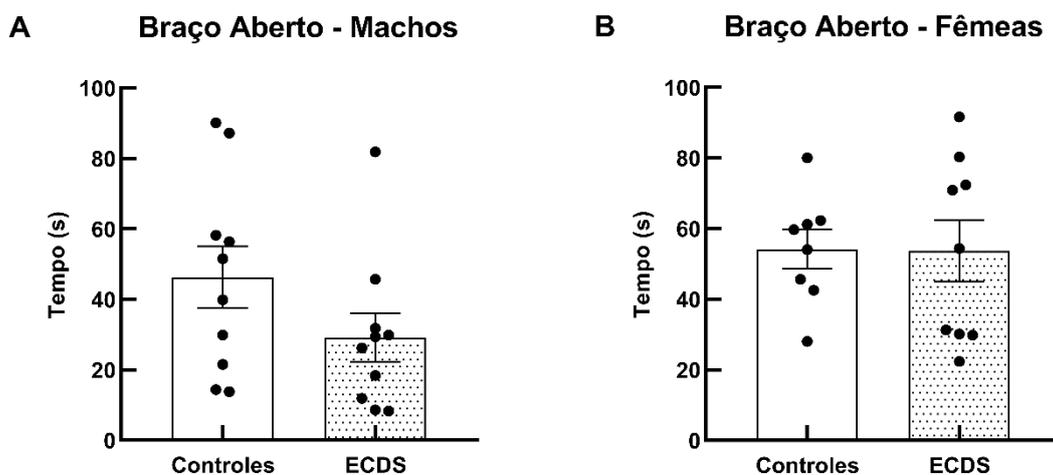
Legenda: Figuras A e B – o tempo despendido, contabilizado em segundos, no quadrante central do aparato durante o teste do campo aberto é um parâmetro de comportamento emocional tipo-ansioso; (A) os dados da coorte dos machos não evidenciou outliers ou diferenças significativas do tempo no centro entre os grupos controle e ECDS ($t = 29,5$, $p = 0,127$); (B) a coorte das fêmeas passou menos tempo no quadrante central do aparato e, quando comparados, o grupo ECDS diferiu significativamente do controle ($t = 12$, $p = 0,02$). Figuras C e D – o parâmetro de locomoção total foi registrado, conforme os resultados, não houve alteração significativa quando comparados os grupos ECDS e controle de ambas as coortes ($t = 0,08$, $p = 0,933$, Figura C para os machos; $t = 26$, $p = 0,37$, Figura D para as fêmeas); Coorte de machos, grupo controle $N=10$, grupo experimental $N=10$; coorte de fêmeas, grupo controle $N=8$, grupo experimental $N=9$.

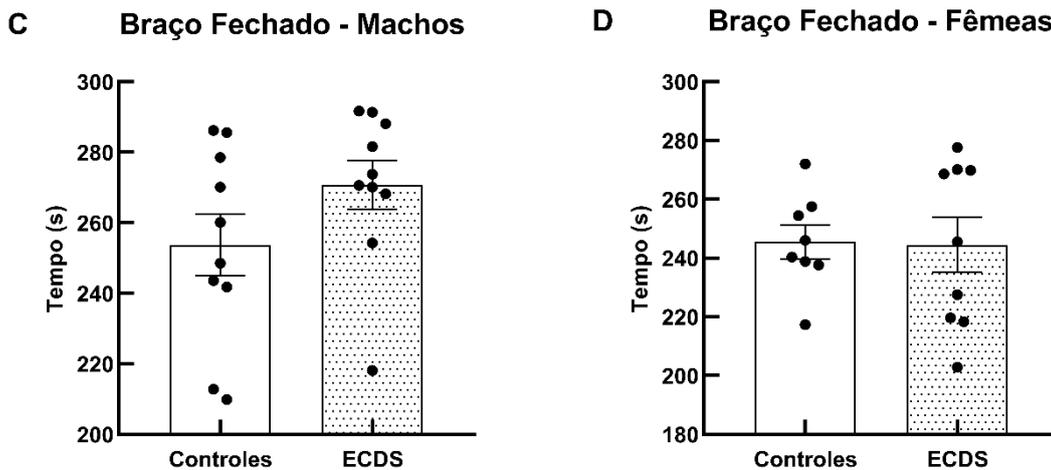
6.5 TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

O labirinto em cruz elevado é um aparato que pode ser utilizado para avaliar parâmetros de locomoção total pelo aparato, e emocionais, como por exemplo o tempo de permanência nos braços abertos ou fechados, sendo este um indicativo de comportamento tipo-ansioso. Neste estudo, foi registrado o tempo de permanência nos braços abertos e fechados. Com relação ao tempo despendido nos braços abertos, os dados de ambas as coortes apresentaram distribuição normal no teste de *Kolmogorov-Smirnov* ($p > 0,05$). O grupo ECDS dos machos passou menos tempo nos braços abertos quando comparado ao grupo controle, todavia, o *test t* não pareado indicou que não houve significância nessa diferença ($t = 1,531$, $p = 0,143$, Figura 12A). Para a coorte das fêmeas, o ECDS não alterou o tempo despendido nos braços abertos, também ($t = 0,044$, $p = 0,964$, Figura 12B).

Quanto ao tempo despendido nos braços fechados, um indicativo de comportamento tipo-ansioso, o teste de *Kolmogorov-Smirnov* ($p > 0,05$) indicou que ambas as coortes apresentaram distribuição normal. Em relação ao grupo controle, o grupo ECDS da coorte dos machos passou mais tempo nos braços fechados, entretanto, o *test t* não pareado indicou não haver diferença significativa ($t = 1,531$, $p = 0,143$, Figura 12C). Ambos os grupos da coorte das fêmeas passaram um período de tempo muito semelhante nos braços fechados, não apresentando alterações significativas ($t = 0,089$, $p = 0,93$, Figura 12D).

Figura 12: Avaliação do parâmetro emocional no Teste do Labirinto em Cruz Elevado





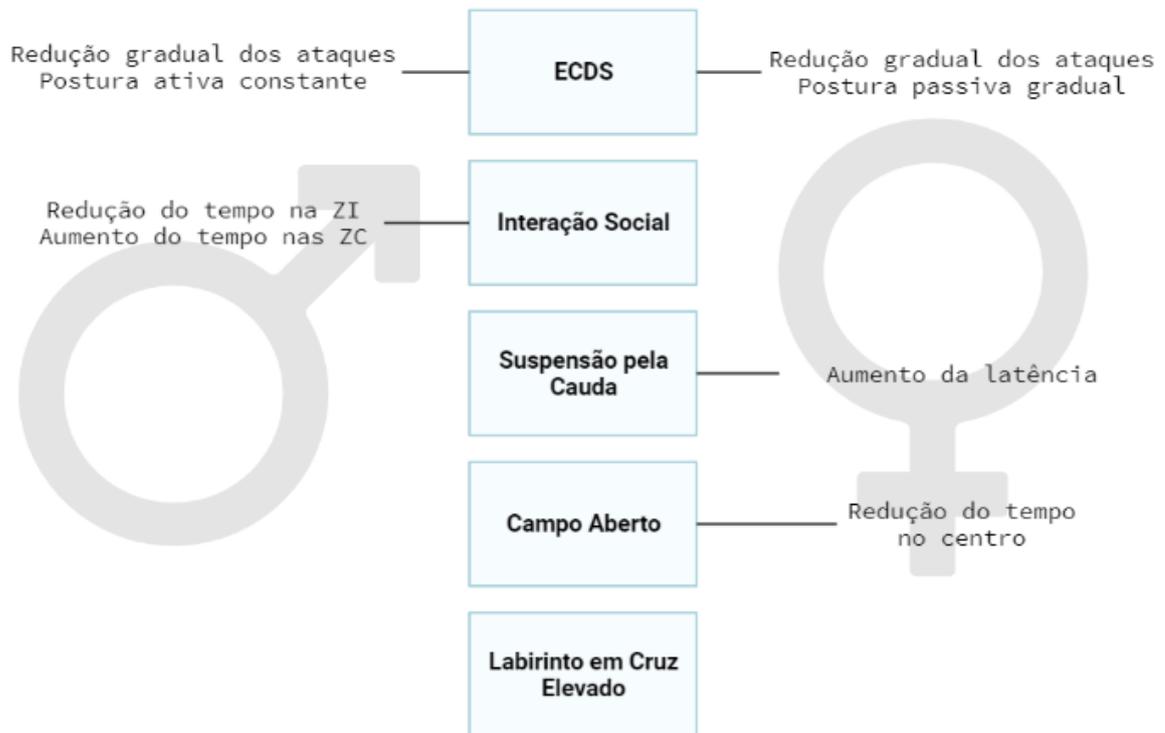
Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: Figuras A e B – o tempo despendido nos braços abertos, contabilizado em segundos, não teve influência do ECDS para ambas as coortes; (A) quando analisados através do *test t*, os dados da coorte dos machos não indicaram significância da redução do tempo despendido nos braços abertos ($t = 1,531$, $p = 0,143$); (B) o grupo ECDS da coorte das fêmeas, assim como a dos machos, não apresentou redução após o ECDS ($t = 0,044$, $p = 0,964$). Figuras C e D – o tempo despendido nos braços fechados, um indicativo de comportamento tipo-ansioso, não teve alterações significativas após o estresse crônico; (C) em machos, o grupo ECDS passou mais tempo nos braços fechados, mas a diferença não alcançou significância ($t = 1,531$, $p = 0,143$); (D) os dados da coorte das fêmeas não indicaram diferenças significativas entre os grupos controle e ECDS ($t = 0,089$, $p = 0,93$). Coorte de machos, grupo controle N=10, grupo experimental N=10; coorte de fêmeas, grupo controle N=8, grupo experimental N=9.

6.6 RESUMO

Em resumo (Figura 13), a submissão dos animais ao ECDS resultou em diferenças sexuais nas respostas aos testes comportamentais. Os machos exibiram prejuízo no comportamento social, as fêmeas não diferiram do grupo controle. As fêmeas, mas não os machos, exibiram alterações no comportamento emocional, em que a latência para atingir a imobilidade foi maior no grupo estressado em relação ao controle; o tempo de exploração da área central do campo aberto teve redução quando comparado ao grupo controle.

Figura 13: Resumo dos resultados



Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: Machos mantiveram uma postura ativa constante em resposta às interações agressivas; as fêmeas gradualmente exibiram uma postura passiva ao longo do protocolo. O ECDS afetou o comportamento social dos machos, mas não o das fêmeas; o comportamento emocional só apresentou alterações na coorte das fêmeas, mas não dos machos, em que houve um aumento na latência no teste de suspensão pela cauda e uma redução do tempo no centro do campo aberto.

7 DISCUSSÃO

Neste estudo, foi analisado os efeitos do ECDS sobre as estratégias de enfrentamento ao estresse (*coping*), comportamento social e emocional em camundongos C57BL/6 machos e fêmeas. Os dois protocolos de ECDS utilizados foram baseados em Golden *et al.* (2011) para camundongos machos, e Harris *et al.* (2018) para camundongos fêmeas, com pequenas modificações. Os resultados alcançados indicaram diferenças nos ataques sofridos por machos e fêmeas, nas estratégias de *coping* adotadas, e também no comportamento social e emocional após os 10 dias de ECDS. As fêmeas submetidas ao ECDS receberam um menor número de ataques dos animais agressivos quando comparado aos machos, adotaram estratégias de *coping* majoritariamente passivas, e apresentaram um aumento na latência para imobilidade do teste de suspensão pela cauda e comportamento tipo-ansioso no teste do campo aberto. Por outro lado, os animais

machos submetidos ao ECDS sofreram um número maior de ataques, exibiram um padrão de *coping* majoritariamente ativo, e tiveram uma redução no comportamento social, sem impacto nos comportamentos emocionais avaliados.

A análise das estratégias de enfrentamento ao ECDS indicou que o total de ataques performados contra a coorte dos machos sofreu uma redução gradual no quinto e décimo dia quando comparado ao primeiro dia de protocolo. Em comparação aos machos, as fêmeas sofreram um menor número de ataques em todos os dias do protocolo, o que já era esperado, já que camundongos machos, mesmo de outra linhagem, possuem a tendência de não atacar fêmeas em virtude do instinto territorialista em defender um espaço e potenciais parceiras sexuais (BENUS *et al.*, 1990; HARRIS *et al.*, 2017; DIETERICH *et al.*, 2021). Cabe ainda ressaltar que os animais agressivos utilizados nos dois protocolos do presente estudo eram camundongos *Swiss* entre 5-6 meses de idade, diferente dos protocolos utilizados por Harris *et al.* (2017) e Gold *et al.* (2011), que utilizaram camundongos pós-reprodutivos da linhagem CD-1, o que pode explicar algumas diferenças na intensidade dos ataques.

No presente estudo, utilizamos um protocolo no qual as fêmeas são expostas à urina de camundongos machos imediatamente antes da interação social, para aumentar o número de ataques sofridos. Tendo em vista as dificuldades na padronização de protocolos de derrota social em fêmeas, algumas soluções para o baixo número de ataques contra coortes de fêmeas incluem a exposição dos agressores a sessões de confronto com intrusos machos para, posteriormente, expô-los a fêmeas (BENUS *et al.*, 1990). Além disso, outros protocolos removeram a etapa de 24 horas de contato sensorial indireto, o que se mostrou eficiente na promoção de agressões contra fêmeas (KUSKE e TRAINOR, 2021). Ainda, métodos baseados na indução da agressividade de camundongos machos contra fêmeas foram desenvolvidos com a utilização de DREADDs (sigla em inglês para “*designer receptors exclusively activated by designer drugs*”), e ativação de áreas encefálicas específicas capazes de promover um comportamento agressivo atípico, como o hipotálamo ventromedial (TAKAHASHI *et al.*, 2017; YIN *et al.*, 2019).

Uma outra diferença entre machos e fêmeas observadas no presente estudo foi no tipo de *coping* utilizado para enfrentar as interações com os animais agressivos. Os animais machos apresentaram uma predominância do *coping* ativo, um indicativo de postura não submissa aos agressores (PAUL *et al.*, 2011). Os

camundongos *Swiss* diminuíram as investidas contra os intrusos com o passar dos dias. Por outro lado, constatamos que a postura submissa das fêmeas foi confirmada pela evidente redução, sessão após sessão, do *coping* ativo exibido pela coorte, entendido como comportamentos de fuga e variadas formas afastamento corporal. No quinto dia do protocolo de ECDS, as fêmeas já demonstravam uma alteração significativa de postura em relação ao primeiro dia, o que não foi observado na coorte dos machos, pelo contrário, esta coorte manteve um padrão consistente de respostas ativas, indicando resistência da submissão aos agressores. Além disso, quando comparadas as estratégias de machos e fêmeas no dia 1 do protocolo de ECDS, nota-se uma evidente diferença do número de estratégias ativas, em que as fêmeas responderam mais passivamente desde o início das interações, evitando, assim, os ataques dos residentes agressores (KANARIK *et al.*, 2011).

No nosso estudo, os machos apresentaram menor tempo de exploração social do alvo, indicando esquiva social, em que o camundongo passa a evitar a zona do alvo, seja por tê-lo reconhecido como um agressor, ou por antecipar uma futura derrota física, dados que corroboram outros estudos (GOLDEN *et al.*, 2011; FURMAN *et al.*, 2022). Por outro lado, outros autores demonstraram que o ECDS em fêmeas também promoveu impactos sobre o comportamento social, evidenciado pela esquiva social e redução do tempo na zona de interação e do índice de interação social (HARRIS *et al.*, 2017; TAKAHASHI *et al.*, 2017; IÑIGUEZ *et al.*, 2018; YIN *et al.*, 2019; VAN DOESELAR *et al.*, 2021), entretanto, esses parâmetros não foram observados nas fêmeas do presente estudo. Apesar dos protocolos diferentes, quando comparamos o índice de interação social de machos e fêmeas após o ECDS podemos observar que as fêmeas apresentaram uma maior interação social em comparação aos machos, indicando maior exploração social do alvo. Assim, no nosso protocolo e nas nossas condições experimentais, o ECDS não prejudicou o comportamento social em fêmeas, apenas em machos.

Com relação à proporção de indivíduos resilientes (índice de IS ≥ 1) e suscetíveis (índice de IS < 1), os resultados encontrados no presente estudo demonstraram que aproximadamente um-terço dos animais submetidos ao ECDS falhou em desenvolver esquiva social, caracterizando-se, portanto, como indivíduos resilientes (GOLDEN *et al.*, 2011; TAKAHASHI *et al.*, 2017). Com relação à coorte das fêmeas, tanto os indivíduos do grupo controle quanto as do ECDS, exibiram um

índice de IS maior ou equivalente a 1, a baixa ocorrência de indivíduos suscetíveis também foi observada em outros estudos (TAKAHASHI *et al.*, 2017; FURMAN *et al.*, 2022), o que pode ser um indicativo de elevada exploração social quando analisada a performance cognitiva basal (AN *et al.*, 2011). Um parâmetro complementar à interação social é representado pelo tempo que os animais passam nas zonas de canto do aparato enquanto na presença do alvo, indicativo de esquiva social. Os machos do grupo ECDS tiveram um aumento significativo do tempo que os indivíduos passaram nas zonas de canto, o que corrobora o índice de IS reduzido na coorte (GOLDEN *et al.*, 2011; KWIATKOWSKI *et al.*, 2021). Já para as fêmeas, ao contrário do observado em outros estudos (YIN *et al.*, 2019), não foram identificadas alterações significativas do tempo despendido nas zonas de canto do aparato quando o grupo ECDS foi comparado ao controle.

Ainda que diversos protocolos tenham sido padronizados para contemplar camundongos fêmeas em pesquisas comportamentais, a inclusão do sexo feminino se dá de maneira sutil e vagarosa, mas um aumento no número de inclusões das fêmeas em pesquisas tem sido observado (SHANSKY e WOOLLEY, 2016; WILL *et al.*, 2017). Observamos que as fêmeas de fato foram sujeitas a um número menor de interações agressivas provenientes do *Swiss* quando comparadas à coorte dos machos (TAKAHASHI *et al.*, 2017; YOHN *et al.*, 2019), o que pode ter influenciado nos resultados. Além do baixo número de ataques, outros fatores podem ter interferido, como o período de contato sensorial prolongado, que já foi observado ser prejudicial em outros protocolos de estresse crônico social, no sentido de representar um período de habituação ou extinção da memória aversiva (KUSKE e TRAINOR, 2021), a linhagem de agressor utilizada (GOLDEN *et al.*, 2011).

Prejuízos em comportamentos emocionais são frequentemente encontrados em diferentes modelos de estresse, tanto em animais machos quanto em fêmeas, e justificam o uso destes modelos para o estudo de transtornos psiquiátricos (HARRIS *et al.*, 2017; TAKAHASHI *et al.*, 2017; IÑIGUEZ *et al.*, 2018; YIN *et al.*, 2019; VAN DOESELAR *et al.*, 2021; FURMAN *et al.*, 2022). No presente estudo, a submissão dos camundongos aos testes de comportamento emocional resultou em efeitos do ECDS sobre as fêmeas, mas não nos machos. Nas fêmeas expostas ao estresse foi observada uma maior latência para atingir o estado de imobilidade durante o teste de suspensão pela cauda, e um aumento do tempo despendido no quadrante central do campo aberto.

O teste de suspensão pela cauda é utilizado para avaliar desespero comportamental frente a uma situação aguda de estresse e comportamento tipo-depressivo. Reduções nos parâmetros de latência para imobilidade e tempo total de imobilidade são observadas após tratamento com fármacos antidepressivos e indicam um efeito tipo-antidepressivo (CASTAGNÉ *et al.*, 2011; CAN *et al.*, 2012). No nosso estudo, apesar de não haver alteração do tempo total de imobilidade, observamos um aumento na latência para imobilidade das fêmeas submetidas ao ECDS, uma resposta contrária a esperada após um protocolo de estresse. Contudo, o ECDS influenciou o comportamento emocional das fêmeas ECDS, o que fez com que fosse expresso o comportamento tipo-ansioso na coorte durante o teste do campo aberto (YIN *et al.*, 2019; VAN DOESELAR *et al.*, 2021); quanto à locomoção no aparato, nenhuma alteração significativa foi observada ao comparar os grupos controle e ECDS da coorte de machos ou fêmeas.

Durante o teste do labirinto em cruz elevado, utilizado para avaliar o comportamento tipo-ansioso, avalia-se os parâmetros de tempo de exploração nos braços, locomoção total, número de entradas e comportamento de avaliação de risco. No presente trabalho, utilizou-se o tempo de exploração nos braços abertos e fechados, em que um maior tempo nas áreas abertas e menor tempo nas fechadas são indicativos de comportamento tipo-ansioso (KOMADA *et al.*, 2008). Esperava-se que os animais passariam menos tempo explorando os braços abertos do aparato após o ECDS. Contudo, não foram observadas diferenças nos parâmetros de ansiedade avaliados no labirinto em cruz elevado. Apesar da ocorrência de comportamentos associados à ansiedade ser comumente descrita na literatura após diferentes protocolos de estresse (RAINVILLE *et al.*, 2018), a ausência de comportamento ansioso também já foi demonstrada por outros pesquisadores (IÑIGUEZ *et al.*, 2018; VAN DOESELAR *et al.*, 2021), sugerindo que diferenças de protocolos, animais experimentais e intensidades de estresse podem gerar impactos diferentes sobre parâmetros emocionais. Cabe ressaltar que tanto a locomoção central no campo aberto, quanto a exploração dos braços aberto do labirinto em cruz elevado são indicadores de comportamento ansioso, contudo, os testes apresentam situações aversivas diferentes para o animal, e podem gerar respostas diferentes.

Os transtornos mentais comuns são mais incidentes e prevalentes no sexo feminino no mundo todo, entretanto, a maioria dos animais utilizados em estudos de neurociência são machos. A inclusão das fêmeas na experimentação animal trará

benefícios para o entendimento da patogênese dos transtornos mentais no sexo feminino. Entretanto, há alguns desafios que incluem avaliações comportamentais mais completas, que vão nos permitir o aprimoramento dos protocolos de ECDS e da nossa interpretação dos resultados comportamentais. A partir dos resultados do presente trabalho, observamos que o protocolo de ECDS utilizado não foi suficiente para promover esquiva social em fêmeas, comportamento frequentemente utilizado para dividir os animais em resilientes e suscetíveis na literatura, mas promoveu comportamento tipo-ansioso, o que significa que outros processos neurológicos possam estar envolvidos nos efeitos do estresse em fêmeas. Portanto, mais estudos se fazem necessários para analisar essas diferenças comportamentais entre os sexos.

8 CONCLUSÃO

Neste estudo, foi observado que o ECDS é suficiente para alterar a resposta de machos e fêmeas aos testes para avaliação de comportamento social e emocional, em que somente os camundongos machos tiveram prejuízo no comportamento social, e as fêmeas no comportamento emocional. Outros estudos têm observado diferenças sexuais, relacionando-as a especificidades biológicas (VAN HAAREN e VAN DE POLL, 1984a e b; ANDREANO e CAHILL, 2009; RIBEIRO *et al.*, 2010; SAKHAIE *et al.*, 2020). O presente estudo revela a necessidade e importância de se incluir fêmeas na experimentação animal, em que os parâmetros analisados demonstraram diferenças de comportamento após a submissão de machos e fêmeas ao ECDS.

REFERÊNCIAS

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-5®). American Psychiatric Pub, 2013.

AN, X. L. *et al.* Strain and sex Differences in Anxiety-Like and Social Behaviors in C57Bl/6J and BALB/cJ Mice. *Experimental Animals*, v. 60, n. 2, p. 111–123, 2011.

ANDREANO, J. M. *et al.* Sex influences on the neurobiology of learning and memory. **Learning & Memory**, [S.L.], v. 16, n. 4, p. 248-266, 24 mar. 2009. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/lm.918309>.

BEERY, A. K. *et al.* Sex bias in neuroscience and biomedical research. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [S.L.], v. 35, n. 3, p. 565-572, jan. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.07.002>.

BEERY, A. K. *et al.* Stress, social behavior, and resilience: insights from rodents. **Neurobiology Of Stress**, [S.L.], v. 1, p. 116-127, jan. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ynstr.2014.10.004>.

BUDREVICIUTE, A. *et al.* Management and Prevention Strategies for Non-communicable Diseases (NCDs) and Their Risk Factors. **Frontiers In Public Health**, [S.L.], v. 8, p. 1-11, 26 nov. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fpubh.2020.574111>.

CAN, A. *et al.* The Tail Suspension Test. **Journal Of Visualized Experiments**, [S.L.], n. 58, p. 1-5, 13 dez. 2011. MyJove Corporation. <http://dx.doi.org/10.3791/3769>.

CARTER, M. *et al.* Animal Behavior. In: CARTER, Matt; SHIEH, Jennifer. Guide to Research Techniques in Neuroscience. Colorado: Academic Press, 2012. Cap. 2. p. 39-71. Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-01531-1>.

CASTAGNÉ, V. *et al.* Rodent Models of Depression: forced swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. **Current Protocols In Neuroscience**, [S.L.], v. 55, n. 1, p. 1-14, abr. 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/0471142301.ns0810as55>.

CATHOMAS, F. *et al.* Neurobiology of Resilience: interface between mind and body. **Biological Psychiatry**, [S.L.], v. 86, n. 6, p. 410-420, set. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2019.04.011>.

DALLA, C. *et al.* Sex Differences in Animal Models of Depression and Antidepressant Response. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, [S.L.], v. 106, n. 3, p. 226-233, mar. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-7843.2009.00516.x>.

DANTZER, R. *et al.* Resilience and immunity. **Brain, Behavior, And Immunity**, [S.L.], v. 74, p. 28-42, nov. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2018.08.010>.

DIETERICH, A. *et al.* Chronic non-discriminatory social defeat stress reduces effort-related motivated behaviors in male and female mice. **Translational Psychiatry**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 1-12, 15 fev. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41398-021-01250-9>.

ELBAY, R. Yeni *et al.* Depression, anxiety, stress levels of physicians and associated factors in Covid-19 pandemics. **Psychiatry Research**, [S.L.], v. 290, n. , p. 113130, ago. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.psychres.2020.113130>.

FURMAN, O. *et al.* Differential chronic social stress models in male and female mice. **European Journal Of Neuroscience**, [S.L.], v. 55, n. 9-10, p. 2777-2793, 15 out. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/ejn.15481>.

GOLDEN, S. A. *et al.* A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice. **Nature Protocols**, [S.L.], v. 6, n. 8, p. 1183-1191, 21 jul. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2011.361>.

HARRIS, A. Z. *et al.* A Novel Method for Chronic Social Defeat Stress in Female Mice. **Neuropsychopharmacology**, [S.L.], v. 43, n. 6, p. 1276-1283, 1 nov. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/npp.2017.259>.

HAWES, M. T. *et al.* Increases in depression and anxiety symptoms in adolescents and young adults during the COVID-19 pandemic. **Psychological Medicine**, [S.L.], p. 1-9, 13 jan. 2021. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s0033291720005358>.

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**, [S.L.], v. 111, n. 45, p. 16136-16141, 20 out. 2014. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1415191111>.

HODES, G. E. *et al.* Sex Differences in Nucleus Accumbens Transcriptome Profiles Associated with Susceptibility versus Resilience to Subchronic Variable Stress. **Journal Of Neuroscience**, [S.L.], v. 35, n. 50, p. 16362-16376, 16 dez. 2015. Society for Neuroscience. <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.1392-15.2015>.

IÑIGUEZ, S. D. *et al.* Vicarious Social Defeat Stress Induces Depression-Related Outcomes in Female Mice. **Biological Psychiatry**, [S.L.], v. 83, n. 1, p. 9-17, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.07.014>.

IZQUIERDO, I. *et al.* Fear Memory. **Physiological Reviews**, [S.L.], v. 96, n. 2, p. 695-750, abr. 2016. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00018.2015>.

JAMES, S. L. *et al.* Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the global burden of disease study 2017. **The Lancet**, [S.L.], v. 392, n. 10159, p. 1789-1858, nov. 2018. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(18\)32279-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(18)32279-7).

KANARIK, M. *et al.* Brain responses to chronic social defeat stress: effects on regional oxidative metabolism as a function of a hedonic trait, and gene expression in susceptible and resilient rats. **European Neuropsychopharmacology**, [S.L.], v. 21, n. 1, p. 92-107, jan. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.euroneuro.2010.06.015>.

KOMADA, M. *et al.* Elevated Plus Maze for Mice. **Journal Of Visualized Experiments**, [S.L.], n. 22, p. 1-4, 22 dez. 2008. MyJove Corporation. <http://dx.doi.org/10.3791/1088>.

KOOLHAAS, J. M. *et al.* The Resident-intruder Paradigm: a standardized test for aggression, violence and social stress. **Journal Of Visualized Experiments**, [S.L.], n. 77, p. 1-7, 4 jul. 2013. MyJove Corporation. <http://dx.doi.org/10.3791/4367>.

KRAEUTER, A. K. *et al.* The Elevated Plus Maze Test for Measuring Anxiety-Like Behavior in Rodents. In: GUEST, P. (ed.). *Pre-Clinical Models: techniques and protocols*. New York: Humana Press, 2019. Cap. 4. p. 69-74. (1916). Springer Protocols BV. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2_4.

KUSKE, J. X.; TRAINOR, B. C. Mean Girls: social stress models for female rodents. **Neuroscience Of Social Stress**, [S.L.], p. 95-124, 2021. Springer International Publishing. http://dx.doi.org/10.1007/7854_2021_247.

KWIATKOWSKI, C. C. *et al.* Quantitative standardization of resident mouse behavior for studies of aggression and social defeat. **Neuropsychopharmacology**, [S.L.], v. 46, n. 9, p. 1584-1593, 3 maio 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41386-021-01018-1>.

MCEWEN, B. S. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance¹¹published on the world wide web on 22 november 2000. **Brain Research**, [S.L.], v. 886, n. 1-2, p. 172-189, dez. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0006-8993\(00\)02950-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0006-8993(00)02950-4).

MURROUGH, J. W.; RUSSO, S. J. The Neurobiology of Resilience: complexity and hope. **Biological Psychiatry**, [S.L.], v. 86, n. 6, p. 406-409, set. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2019.07.016>.

MYERS, K. M.; DAVIS, M. Mechanisms of fear extinction. **Molecular Psychiatry**, [S.L.], v. 12, n. 2, p. 120-150, 12 dez. 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.mp.4001939>.

OSÓRIO, C. *et al.* Adapting to Stress: understanding the neurobiology of resilience. **Behavioral Medicine**, [S.L.], v. 43, n. 4, p. 307-322, 21 abr. 2016. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/08964289.2016.1170661>.

OTTE, C. *et al.* Major depressive disorder. **Nature Reviews Disease Primers**, [S.L.], v. 2, n. 1, p. 1-21, 15 set. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2016.65>.

PAUL, E. D. *et al.* Repeated social defeat increases reactive emotional coping behavior and alters functional responses in serotonergic neurons in the rat dorsal raphe nucleus. **Physiology & Behavior**, [S.L.], v. 104, n. 2, p. 272-282, ago. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.01.006>.

PFAU, M. L. *et al.* Role of Monocyte-Derived MicroRNA106b~25 in Resilience to Social Stress. **Biological Psychiatry**, [S.L.], v. 86, n. 6, p. 474-482, set. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2019.02.023>.

PRENDERGAST, B. J. *et al.* Female mice liberated for inclusion in neuroscience and biomedical research. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [S.L.], v. 40, p. 1-5, mar. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.01.001>.

RAINVILLE, J. R.; TSYGLAKOVA, M.; HODES, G. E. Deciphering sex differences in the immune system and depression. **Frontiers In Neuroendocrinology**, [S.L.], v. 50, p. 67-90, jul. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yfrne.2017.12.004>.

REUS, G. Z. *et al.* Resilience Dysregulation in Major Depressive Disorder: focus on glutamatergic imbalance and microglial activation. **Current Neuropharmacology**, [S.L.], v. 16, n. 3, p. 297-307, 5 mar. 2018. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1570159x15666170630164715>.

RIBEIRO, A. M. *et al.* Sex differences in aversive memory in rats: Possible role of extinction and reactive emotional factors. *Brain and Cognition*, v. 74, n. 2, p. 145–151, 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bandc.2010.07.012>.

RITCHIE, H; ROSER, M. Mental Health. Published online at OurWorldInData.org, 2018. Disponível em: <https://ourworldindata.org/mental-health>.

SACCHETTI, B.; SCELFO, B.; STRATA, P. The cerebellum: Synaptic changes and fear conditioning. *Neuroscientist*, v. 11, n. 3, p. 217–227, 2005.

SAKHAIE, N. *et al.* Sex-dependent effects of chronic fluoxetine exposure during adolescence on passive avoidance memory, nociception, and prefrontal brain-derived neurotrophic factor mRNA expression. *Brain Research Bulletin*, v. 162, n. June, p. 231–236, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2020.06.009>.

SCHEGGI, S.; DE MONTIS, M. G.; GAMBARANA, C. Making Sense of Rodent Models of Anhedonia. **International Journal Of Neuropsychopharmacology**, [S.L.], v. 21, n. 11, p. 1049-1065, 20 set. 2018. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/ijnp/pyy083>.

SCOTT, J. P. Incomplete adjustment caused by frustration of untrained fighting mice. **Journal Of Comparative Psychology**, [S.L.], v. 39, n. 6, p. 379-390, 1946. American Psychological Association (APA). <http://dx.doi.org/10.1037/h0061897>.

SEIBENHENER, M. L.; WOOTEN, M. C. Use of the Open Field Maze to Measure Locomotor and Anxiety-like Behavior in Mice. **Journal Of Visualized Experiments**,

[S.L.], n. 96, p. 1-6, 6 fev. 2015. MyJove Corporation. <http://dx.doi.org/10.3791/52434>.

SHANSKY, R. M.; WOOLLEY, C. S. Considering sex as a biological variable will require a global shift in science culture. **Nature Neuroscience**, [S.L.], v. 24, n. 4, p. 457-464, 1 mar. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41593-021-00806-8>.

ŚNIADACH, J. *et al.* Increased Depression and Anxiety Disorders during the COVID-19 Pandemic in Children and Adolescents: a literature review. **Life**, [S.L.], v. 11, n. 11, p. 1188, 5 nov. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/life11111188>.

STEIN, D. J. *et al.* Global mental health and neuroscience: potential synergies. **The Lancet Psychiatry**, [S.L.], v. 2, n. 2, p. 178-185, fev. 2015. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s2215-0366\(15\)00014-0](http://dx.doi.org/10.1016/s2215-0366(15)00014-0).

SWARBRICK, M. *et al.* MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: local and systemic effects of glucocorticoids on metabolism. **European Journal Of Endocrinology**, [S.L.], v. 185, n. 5, p. 113-129, 1 nov. 2021. Bioscientifica. <http://dx.doi.org/10.1530/eje-21-0553>.

TAKAHASHI, A. *et al.* Establishment of a repeated social defeat stress model in female mice. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 1-12, 9 out. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-12811-8>.

TSYGLAKOVA, M.; MCDANIEL, D.; HODES, G. E. Immune mechanisms of stress susceptibility and resilience: Lessons from animal models. *Frontiers in Neuroendocrinology*, v. 54, n. July, p. 100771, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2019.100771>.

VAN DOESELAR, L. *et al.* Chronic social defeat stress in female mice leads to sex-specific behavioral and neuroendocrine effects. **Stress**, [S.L.], v. 24, n. 2, p. 168-180, 26 dez. 2020. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10253890.2020.1864319>.

VAN HAAREN, F.; VAN DE POLL, N. E. The effect of a choice alternative on sex differences in passive avoidance behavior. **Physiology & Behavior**, [S.L.], v. 32, n. 2, p. 211-215, fev. 1984b. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0031-9384\(84\)90131-8](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9384(84)90131-8).

VAN HAAREN, F.; VAN DE POLL, N. E. The number of pre-shock trials affects sex differences in passive avoidance behavior. **Physiology & Behavior**, [S.L.], v. 33, n. 2, p. 269-272, ago. 1984b. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0031-9384\(84\)90110-0](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9384(84)90110-0)

VAN OORTMERSEN, G.A. *et al.* Routine Formation and Flexibility in Social and Non-Social Behaviour of Aggressive and Non-Aggressive Male Mice. **Behaviour**, [S.L.], v. 112, n. 3-4, p. 176-193, 1990. Brill. <http://dx.doi.org/10.1163/156853990x00185>.

VIGO, D.; THORNICROFT, G.; ATUN, R. Estimating the true global burden of mental illness. **The Lancet Psychiatry**, [S.L.], v. 3, n. 2, p. 171-178, fev. 2016. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s2215-0366\(15\)00505-2](http://dx.doi.org/10.1016/s2215-0366(15)00505-2).

VOS, Theo *et al.* Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the global burden of disease study 2019. **The Lancet**, [S.L.], v. 396, n. 10258, p. 1204-1222, out. 2020. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)30925-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(20)30925-9).

WALF, A. A.; FRYE, C. A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. **Nature Protocols**, [S.L.], v. 2, n. 2, p. 322-328, fev. 2007. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2007.44>.

WILL, T. R. *et al.* Problems and Progress regarding Sex Bias and Omission in Neuroscience Research. **Eneuro**, [S.L.], v. 4, n. 6, p. 1-10, nov. 2017. Society for Neuroscience. <http://dx.doi.org/10.1523/eneuro.0278-17.2017>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates. Geneva: 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global action plan for the prevention and control of noncommunicable diseases 2013-2020. p. 55, 2013. Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241506236>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. 2022. Disponível em: <https://covid19.who.int/>. Acesso em: 25 jul. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO methods and data sources for global burden of disease estimates 2000-2019 (Global Health Estimates Technical Paper WHO/ DDI/DNA/GHE/2020.3). November, 2020. Disponível em: http://www.who.int/healthinfo/statistics/GlobalDALYmethods_2000_2011.pdf?ua=1.

WU, J. T. *et al.* Nowcasting and forecasting the potential domestic and international spread of the 2019-nCoV outbreak originating in Wuhan, China: a modelling study. **The Lancet**, [S.L.], v. 395, n. 10225, p. 689-697, fev. 2020. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)30260-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(20)30260-9).

YIN, W. *et al.* Repeated social defeat in female mice induces anxiety-like behavior associated with enhanced myelopoiesis and increased monocyte accumulation in the brain. **Brain, Behavior, And Immunity**, [S.L.], v. 78, p. 131-142, maio 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2019.01.015>.

YOHAN, C. N. *et al.* Chronic non-discriminatory social defeat is an effective chronic stress paradigm for both male and female mice. **Neuropsychopharmacology**, [S.L.], v. 44, n. 13, p. 2220-2229, 7 set. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41386-019-0520-7>.