

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E
FARMACOLOGIA

ALCIONE ROCHA MEDEIROS

EFEITOS DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE ESTRESSE POR
SEPARAÇÃO MATERNAL NO COMPORTAMENTO DE
CAMUNDONGOS JUVENIS

BELO HORIZONTE

2020

ALCIONE ROCHA MEDEIROS

**EFEITOS DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE ESTRESSE POR
SEPARAÇÃO MATERNAL NO COMPORTAMENTO DE
CAMUNDONGOS JUVENIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção de título de mestre.

Área de concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Bruno Rezende de Souza

BELO HORIZONTE

2020

043

Medeiros, Alcione Rocha.

Efeitos de diferentes protocolos de estresse por separação maternal no comportamento de camundongos juvenis [manuscrito] / Alcione Rocha Medeiros. - 2020.

92 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Rezende de Souza.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Estresse Fisiológico. 2. Privação Materna. 3. Comportamento. 4. Caracteres Sexuais. I. Souza, Bruno Rezende de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE GRADUAÇÃO EM FISILOGIA E FARMACOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO N° 529 DE ALCIONE ROCHA MEDEIROS

"Efeitos de Diferentes Protocolos de Estresse por Separação Maternal no Comportamento de Camundongos Juvenis"

ALCIONE ROCHA MEDEIROS

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **16 de setembro de 2020**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

Prof. Dr. Marco Antônio Peliky Fontes - ICB/UFMG
Prof. Dr. Fabrício de Araújo Moreira - ICB/UFMG
Prof. Dr. Bruno Rezende de Souza - ICB/UFMG - Orientador

Belo Horizonte, 16 de setembro de 2020



Documento assinado eletronicamente por **Marco Antonio Peliky Fontes, Membro de comissão**, em 18/09/2020, às 08:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Rezende de Souza, Professor do Magistério Superior**, em 21/09/2020, às 15:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabricio de Araujo Moreira, Professor do Magistério Superior**, em 25/09/2020, às 16:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0243113** e o código CRC **8735DEC2**.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao meu orientador, Bruno, por ter me acolhido durante esses dois anos de mestrado, pela paciência, empatia e por me dizer nos meus momentos de desespero: “Relaxa, calma, vai dar tudo certo, sem estresse”. Em segundo lugar, gostaria de agradecer à querida Ana Luíza, por todo o suporte nesse tempo, desde o pedido dos animais à análise dos dados, você é demais, Ana. Em adição, à Giovanna, por ter me ajudado em todos os experimentos, por isso dividindo comigo inúmeros fins de semana, passando horas na UFMG em pleno domingo. Em acréscimo, agradecimento especial à Muiara, Laila, Bruna e Bia, que me ajudaram muito com o projeto. Outrossim, aos professores do Núcleo de Neurociências (NNC), Prof. André Ricardo Massenssini, Prof. Marcio Moraes, Profa. Grace Schenatto, Profa. Juliana Tavares e Prof. Cleiton Lopes, pela estrutura e ensinamentos nas discussões de artigos e nos seminários do laboratório. Agradeço também, a todos os alunos do NNC pela partilha de conhecimento ao longo desse tempo. Além disso, agradeço ainda, ao trabalho admirável feito pelo Samir e pelo Silvio, mantendo o Biotério sempre impecável. Ainda, ao trabalho prestado pelo Thiago na secretaria pgfifar, sendo sempre muito proativo e atencioso. Ademais, agradeço ao meu namorado, por me acompanhar na UFMG ao longo desses dois anos, em muitos sábados e domingos, ainda, pelo suporte com o excel na análise dos dados.

Destarte, agradeço às agências de fomento pelo apoio financeiro que tornou esse trabalho possível: CAPES, CNPq, FAPEMIG, PRPq e ISN.

Sumário

| | |
|--|----|
| LISTA DE FIGURAS..... | 5 |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | 8 |
| RESUMO..... | 9 |
| ABSTRACT..... | 10 |
| 1. INTRODUÇÃO | 11 |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA..... | 13 |
| 2.1 ESTRESSE..... | 13 |
| 2.1.1 <i>História do conceito do estresse</i> | 13 |
| 2.1.2 <i>Alostase</i> | 14 |
| 2.1.3 <i>Diferenças individuais</i> | 14 |
| 2.1.4 <i>Carga alostática e sobrecarga alostática</i> | 15 |
| 2.2 EIXO HPA | 15 |
| 2.3 SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO SIMPÁTICO (SNAS)..... | 16 |
| 2.4 ESTRESSE CRÔNICO | 17 |
| 2.5 ESTRESSE PÓS-NATAL | 17 |
| 3. JUSTIFICATIVA | 21 |
| 4. OBJETIVOS..... | 23 |
| 5. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 24 |
| 5.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS | 24 |
| 5.2 DESENHO EXPERIMENTAL | 26 |
| 5.3 TESTES COMPORTAMENTAIS | 27 |
| 5.3.1 <i>Caixa de Atividade Locomotora</i> | 29 |
| 5.3.2 <i>Teste de Campo Aberto</i> | 30 |
| 5.3.3 <i>Caixa claro-escuro</i> | 32 |
| 5.3.4 <i>Labirinto em Cruz Elevado</i> | 33 |
| 5.3.5 <i>Nado forçado</i> | 34 |
| 5.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS | 35 |
| 6. RESULTADOS..... | 36 |
| 6.1 INVESTIGAÇÃO SE PROTOCOLOS DE ESTRESSE POR SEPARAÇÃO MATERNAL ALTERAM O COMPORTAMENTO MOTOR, TIPO-ANSIOSO E TIPO-DEPRESSIVO DE CAMUNDONGOS C57/BL6 PRÉ-PÚBERES FÊMEAS E MACHOS | 36 |
| 6.1.1 <i>Caixa de Atividade Locomotora</i> | 36 |
| 6.1.2 <i>Campo Aberto</i> | 39 |
| 6.1.3 <i>Caixa Claro-Escuro</i> | 42 |
| 6.1.4 <i>Labirinto em cruz elevado</i> | 45 |
| 6.1.5 <i>Nado Forçado</i> | 50 |
| 6.2 INVESTIGAÇÃO SE DIFERENTES PROTOCOLOS DE ESTRESSE POR SEPARAÇÃO MATERNAL AFETAM O COMPORTAMENTO DE CAMUNDONGOS C57/BL6 PRÉ-PÚBERES DE FORMA DISTINTAS | 53 |
| 6.2.1 <i>Caixa de atividade</i> | 53 |
| 6.2.2 <i>Campo Aberto</i> | 56 |
| 6.2.3 <i>Caixa Claro-Escuro</i> | 59 |
| 6.2.4 <i>Labirinto em Cruz Elevado</i> | 62 |
| 6.2.5 <i>Nado Forçado</i> | 67 |

| | |
|---|-----------|
| 7. DISCUSSÃO | 70 |
| 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 78 |
| REFERÊNCIAS | 79 |
| ANEXOS..... | 88 |
| ANEXO A – DADOS DA CAIXA DE ATIVIDADE LOCOMOTORA; CAMPO ABERTO; CAIXA CLARO-ESCURO; LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO E NADO FORÇADO POR TESTE ONE WAY ANOVA | 88 |

Lista de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Resposta do eixo HPA a um agente estressor..... | 16 |
| Figura 2 - Desenho experimental..... | 28 |
| Figura 3 - Filhotes dos diferentes grupos de separação maternal..... | 29 |
| Figura 6 - Aparato onde é realizado a separação maternal..... | 30 |
| Figura 7 - Caixa de Atividade Locomotora..... | 31 |
| Figura 8 - Campo Aberto..... | 32 |
| Figura 9 - Caixa Claro-Escuro..... | 33 |
| Figura 10 - Labirinto em Cruz Elevado..... | 34 |
| Figura 11 - Nado Forçado..... | 35 |
| Figura 12 - Efeitos dos diferentes protocolos de separação maternal em machos pré-púberes no teste de Caixa de Atividade Locomotora comparados ao grupo controle..... | 38 |
| Figura 13 - Efeitos dos diferentes protocolos de separação maternal em fêmeas pré-púberes no teste de Caixa de Atividade Locomotora comparados ao grupo controle..... | 39 |
| Figura 14 - Efeitos dos diferentes protocolos de separação maternal em machos pré-púberes no teste de Campo Aberto comparados ao grupo controle..... | 41 |
| Figura 15 - Efeitos dos diferentes protocolos de separação maternal em fêmeas pré-púberes no teste de Campo Aberto comparados ao grupo controle..... | 42 |
| Figura 16 - Efeitos dos diferentes protocolos de separação maternal em machos pré-púberes no teste de Caixa Claro-Escuro comparados ao grupo controle..... | 44 |
| Figura 17 - Efeitos dos diferentes protocolos de separação maternal em fêmeas pré-púberes no teste de Caixa Claro-Escuro comparados ao grupo controle..... | 45 |
| Figura 18 - Efeitos dos diferentes protocolos de separação maternal em machos pré-púberes no teste de Labirinto em Cruz Elevado comparados ao grupo controle..... | |
| Figura 19 - Efeitos dos diferentes protocolos de separação maternal em fêmeas pré-púberes no teste de Labirinto em Cruz Elevado comparados ao grupo controle..... | 49 |

| | |
|---|----|
| Figura 20 - Efeitos dos diferentes protocolos de separação maternal em machos pré-púberes no teste de Nado Forçado comparados ao grupo controle..... | 52 |
| Figura 21 - Efeitos dos diferentes protocolos de separação maternal em fêmeas pré-púberes no teste de Nado Forçado comparados ao grupo controle..... | 53 |
| Figura 22 - Comparação, entre os grupos de separação maternal, dos efeitos da SM no teste de Caixa de Atividade Locomotora entre machos pré-púberes..... | 55 |
| Figura 23 - Comparação, entre os grupos de separação maternal, dos efeitos da SM no teste de Caixa de Atividade Locomotora entre fêmeas pré-púberes..... | 56 |
| Figura 24 - Comparação, entre os grupos de separação maternal, dos efeitos da SM no teste de Campo Aberto entre machos pré-púberes..... | 58 |
| Figura 25 - Comparação, entre os grupos de separação maternal, dos efeitos da SM no teste de Campo Aberto entre fêmeas pré-púberes..... | 59 |
| Figura 26 - Comparação, entre os grupos de separação maternal, dos efeitos da SM no teste de Caixa Claro-Escuro entre machos pré-púberes..... | 61 |
| Figura 27 - Comparação, entre os grupos de separação maternal, dos efeitos da SM no teste de Caixa Claro-Escuro entre fêmeas pré-púberes..... | 62 |
| Figura 28 - Comparação, entre os grupos de separação maternal, dos efeitos da SM no teste de Labirinto em Cruz Elevado entre machos pré-púberes..... | 64 |
| Figura 29 - Comparação, entre os grupos de separação maternal, dos efeitos da SM no teste de Labirinto em Cruz Elevado entre fêmeas pré-púberes..... | 66 |
| Figura 30 - Comparação, entre os grupos de separação maternal, dos efeitos da SM no teste de Nado Forçado entre machos pré-púberes..... | 69 |
| Figura 31 - Comparação, entre os grupos de separação maternal, dos efeitos da SM no teste de Nado Forçado entre fêmeas pré-púberes..... | 70 |
| Figura 32 - Efeitos do Isolamento Físico e do Horário em animais machos pré-púberes C57/BL6..... | 71 |

| | |
|---|----|
| Figura 33 - Efeitos do Isolamento Físico e do Horário em animais fêmeas pré-púberes C57/BL6..... | |
| Figura 34 - Resumo dos parâmetros que apresentaram diferença significativa entre os grupos de separação maternal em machos | 76 |
| Figura 35 - Resumo dos parâmetros que apresentaram diferença significativa entre os grupos de separação maternal em fêmeas | 78 |

Lista de Abreviaturas

SM = Separação Maternal

PVN = Núcleo Paraventricular do Hipotálamo

PFC = córtex pré-frontal

CRF = Fator Liberador de Corticotrofina

PMOC = Pro-opiomelanocortina

ACTH = Hormônio Adrenocorticotrófico

GREs = Elementos da Resposta de Glicocorticoides

GR = Receptores de Glicocorticoides

MR = receptores de Mineralocorticoides

PHP = período hiporesponsivo pós-natal

P2 = segundo dia pós-natal

P14 = décimo quarto dia pós-natal

P23 = vigésimo terceiro dia pós-natal

P28 = vigésimo oitavo dia pós-natal

P29 = vigésimo nono dia pós-natal

P30 = trigésimo dia pós-natal

P31 = trigésimo primeiro dia pós-natal

HJF = horário fixo juntos

HJI = horário fixo isolados

HVF = horário variável juntos

HVF = horário variável isolados

Resumo

Introdução: O período pós-natal é caracterizado pelo alto nível de plasticidade sináptica e de ser importante para o desenvolvimento do hipocampo. É sabido que experiências traumáticas, durante esse período, aumentam a incidência de transtornos psiquiátricos em idade adulta. O protocolo mais utilizado para se estudar esse tipo de estresse em modelo animal é o protocolo de separação maternal. Há estudos mostrando que o protocolo de separação maternal gera comportamento tipo-depressivo em camundongos machos adolescentes, mas não é capaz de gerar comportamento tipo-ansioso. Por outro lado, existem estudos com animais machos adolescentes em que foi possível observar comportamento tipo-ansioso, mas não tipo-depressivo. Essa inconsistência nos dados pode ser devida à utilização de protocolos de separação maternal distintos, que estão ocasionando tipos de estresse e/ou intensidade de estresse diferentes. **Objetivo:** Avaliar se diferentes protocolos de separação maternal são capazes de gerar comportamentos tipo-ansioso e tipo-depressivo em animais pré-púberes machos e fêmeas. Além disso, avaliar se há influência do Isolamento Físico e do Horário no comportamento dos animais. **Materiais e Métodos:** Foram utilizados cinco grupos experimentais: um grupo controle, que não passou pelo protocolo de separação maternal; um grupo que passou pela separação no mesmo horário todo dia junto aos irmãos de ninhada; um grupo que passou pela separação no mesmo horário todo dia isolado dos irmãos de ninhada; um grupo que passou pela separação em horário variável junto aos irmãos de ninhada e um grupo que passou pela separação em horário variável isolado dos irmãos de ninhada. A separação maternal ocorreu do 2º ao 14º dia de nascimento, com duração de 180 min/dia. O comportamento dos animais foi avaliado do 28º ao 31º pós-natal. **Resultados:** Os protocolos de separação maternal alteraram o comportamento locomotor e geraram um comportamento tipo-ansioso em animais machos pré-púberes em comparação com o grupo controle. Os parâmetros analisados nas fêmeas sofreram menos alterações comparados ao grupo controle. O protocolo Horário Variável Isolados foi o responsável pelo maior número de alterações nos parâmetros comportamentais. Observamos influência do fator horário e do fator isolamento físico, além da interação entre ambos nos comportamentos dos animais. **Conclusão:** Diferentes tipos de protocolo de estresse por separação maternal têm efeitos distintos no comportamento de camundongos machos e fêmeas pré-púberes.

Palavras chaves: Estresse; protocolo de separação maternal, comportamento, dimorfismo sexual, pré-púberes.

Abstract

Introduction: The postnatal period is characterized by a high level of synaptic plasticity and being important for the development of the hippocampus. It is known that traumatic experiences during this period increase the incidence of psychiatric disorders in adulthood. The most used protocol to study this type of stress in an animal model is the maternal separation protocol. There are studies showing that the maternal separation protocol generates type-depressive behavior in male adolescent mice, but is not capable of generating type-anxious behavior. On the other hand, there are studies with male adolescent animals in which it was possible to observe type-anxious, but not type-depressive behavior. This inconsistency in the data may be due to the use of different maternal separation protocols, which are causing different types of stress and / or intensity of stress. **Objective:** To assess whether different maternal separation protocols are capable of generating type-anxious and type-depressive behaviors in male and female prepubertal animals. In addition, assess whether there is an influence of Physical Isolation and Time on the animals' behavior. **Materials and Methods:** Five experimental groups were used: a control group, which did not undergo the maternal separation protocol; a group that went through the separation at the same time every day with the litter brothers; a group that went through the separation at the same time every day isolated from the brood brothers; a group that underwent separation at variable time with the litter brothers and a group that underwent separation at variable time isolated from the litter brothers. Maternal separation occurred from the 2nd to the 14th day of birth, lasting 180 min / day. The behavior of the animals was evaluated from 28 ° to 31 ° postnatal. **Results:** The maternal separation protocols altered the locomotor behavior and generated type-anxious behavior in prepubertal male animals compared to the control group. The parameters analyzed in the females suffered less changes compared to the control group. The Isolated Variable Time protocol was responsible for the largest number of changes in behavioral parameters. We observed the influence of the hourly factor and the physical isolation factor, in addition to the interaction between both in the animals' behavior. **Conclusion:** Different types of stress protocol due to maternal separation have different effects on the behavior of male and female prepubertal mice.

Key words: Stress; maternal separation protocol, behavior, sexual dimorphism, prepubertal.

1. INTRODUÇÃO

O período pós-natal é caracterizado pelo alto nível de plasticidade sináptica e de ser importante para o desenvolvimento do hipocampo (BRUNSON *et al.*, 2003). É sabido que experiências traumáticas, durante esse período, aumentam a incidência de transtornos psiquiátricos, como depressão, ansiedade, estresse pós-traumático e transtorno do déficit de atenção em homens e mulheres em idade adulta (KAUFMAN, JOAN, 2012). Ainda, o risco de desenvolver certos distúrbios mentais pode ser influenciado de forma diferente por subtipos específicos de experiências (abuso físico, sexual e emocional, bem como negligência física e emocional) (GERKE *et al.*, 2018). O abuso físico, por exemplo, é associado a transtornos de humor, enquanto o abuso emocional está relacionado à ocorrência de transtornos de personalidade e esquizofrenia (CARR *et al.*, 2013). Estudos evidenciam que crianças que sofreram maus-tratos físicos apresentaram reduções do córtex orbitofrontal, enquanto que as que sofreram abuso físico em conjunto com negligência emocional foram associados a maiores diminuições no córtex orbitofrontal e no córtex subgeneal (BICK; NELSON, 2016). Então, será que tipos diferentes de estresses afetam o neurodesenvolvimento de formas diferentes? Ou será que é a intensidade do estresse que varia? De forma a responder a essas e outras perguntas, torna-se importante o estudo do estresse no período pós-natal em modelo animal. Para isso, o protocolo mais utilizado para testar a hipótese dos efeitos do estresse no neurodesenvolvimento é o protocolo de separação maternal, em que os filhotes são separados da mãe por 180 min. Assim, o protocolo de separação maternal já é muito utilizado na literatura, conquanto, algumas pesquisas apresentam dados mistos ou até mesmo contraditórios. Há estudos mostrando que o protocolo de separação maternal, (P2 ao P21) por 180 min por dia, gera comportamento tipo-depressivo em camundongos adolescentes C57/BL6 machos, mas não é capaz de gerar comportamento tipo-ansioso (BIAN *et al.*, 2015). Por outro lado, existem estudos com animais machos C57/BL6 adolescentes em que foi possível observar comportamento tipo-ansioso após o protocolo de separação maternal, mas não tipo-depressivo (SHIN *et al.*, 2016). Essa inconsistência nos dados pode ser devida à utilização de protocolos de separação maternal distintos, que estão ocasionando tipos de estresse e/ou intensidade de estresse diferentes. Nesse contexto, é importante a padronização do protocolo para uma sistematização dos resultados. Diante disso, nesse trabalho, avaliamos se diferentes protocolos de separação maternal são capazes de gerar comportamentos tipo-ansioso e tipo-depressivo em animais machos e fêmeas

pré-púberes. As variáveis testadas durante o protocolo de separação maternal foram a variação ou não dos horários de separação, e a presença ou não dos irmãos durante a separação.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ESTRESSE

2.1.1 História do conceito do estresse

Claude Bernard (1813-1878), médico fisiologista francês, foi o primeiro a reconhecer as condições estáveis no sangue e em outros líquidos corporais que o ser humano era capaz de manter. Dentre as suas descobertas, o pesquisador observou que o fígado tinha a capacidade de manter a glicose em concentrações ideais no sangue, armazenando ou liberando de acordo com a necessidade do organismo. Assim, Bernard postulou a hipótese: “a constância do meio interno é a condição para a vida livre” (BERNARD,1865). Subsequente, Walter Bradford Cannon (1871-1945) cunhou o termo "homeostase" para descrever a manutenção do organismo dentro de faixas aceitáveis de várias variáveis fisiológicas, como glicose no sangue, níveis de oxigênio e temperatura central, sendo que para mantê-la era necessário a ativação do eixo hipotálamo-adrenal (CANNON, 1929). Cannon descreveu, pela primeira vez, as mudanças agudas na secreção da glândula adrenal associadas ao que ele chamou de respostas de "luta ou fuga" (CANNON, 1915). Anos mais tarde, Hans Selye (1907- 1982) percebeu que alguns pacientes que procuravam a clínica apresentavam sintomas comuns, como perda de peso, falta de apetite e diminuição da força muscular (TAN; YIP, 2018). Então, de forma a entender mais sobre o processo que ocorria, ele submeteu animais a uma situação aversiva e notou que eles sempre respondiam da mesma forma diante de um agente físico, com dilatação do córtex da suprarrenal, atrofia timo linfática e úlceras gástricas (SELYE,1936). Nesse contexto, ele relacionou esses achados com o conceito de estresse, definindo-o como uma reação defensiva fisiológica do organismo em resposta a qualquer estímulo. Então, em 1936, Hans Selye denominou essa reação de Síndrome da Adaptação Geral (SAG) ou do Estresse Biológico, sendo dividida em três fases: a reação de alarme, de resistência e de exaustão. Nesse sentido, a fase de alarme ocorre imediatamente após o confronto com o estressor e pode ser consciente ou não, porém se houver a persistência do estressor, inicia-se a fase de resistência em que o corpo trabalha para a sobrevivência e adaptação, e por fim, se o estressor persistir ou não ocorrer o equilíbrio, inicia-se a fase de exaustão, em que a adaptação não ocorre e podem surgir doenças e até a morte (TAN; YIP, 2018). Dessa forma, Hans Selye é considerado o precursor do estresse biológico, no entanto não levou em consideração as diferenças existentes entre cada indivíduo, uma vez que, acreditava que todos os organismos respondiam da mesma forma. Em razão disso, foi alvo de críticas de outros pesquisadores da época, que defendiam a existência dos estressores de

natureza psicológica e não só biológica (GOLDSTEIN; KOPIN, 2007). Posteriormente, ao final da segunda guerra mundial, muitos dos soldados que voltaram da batalha apresentavam transtornos emocionais. Em razão disso, foi incorporado componentes psicológicos na investigação da resposta ao estresse. Assim, os pesquisadores chegaram à conclusão que os indivíduos respondem de maneiras diferentes a agentes estressores, sendo que além da resposta biológica, há também uma resposta cognitiva ao agente estressor (LAZARUS, 1966). Nessa perspectiva, Lazarus e Launier, em 1978, definem **estresse como qualquer estímulo que demande do ambiente externo ou interno e que exceda as fontes de adaptação de um indivíduo, sendo que a resposta ao estresse tem uma etapa biológica e uma fase na qual participam algumas funções cognitivas, emocionais e comportamentais, que podem influenciar na intensidade dessas alterações** (LAZARUS; LAUNIER, 1978).

2.1.2 Alostase

Atualmente, o estresse é definido como uma ameaça à homeostase, em que a resposta tem um grau de especificidade, dependendo, entre outras coisas, da percepção do organismo sobre o estressor e a capacidade percebida de lidar com ele. Assim, os níveis de atividade fisiológica necessários para restabelecer ou manter a homeostase diferem, dependendo das condições em constante mudança nas quais o organismo se encontra - por exemplo, correr versus ficar em pé ou deitar (GOLDSTEIN; KOPIN, 2007).

Dessa forma, a "Alostase", termo usado por Sterling e Eyer, em 1988, refere-se aos níveis de atividade necessários para o indivíduo "manter a estabilidade através da mudança" (GOLDSTEIN; KOPIN, 2007) - ou seja, adaptar, por meio de mediadores como o cortisol, sistema autonômico, metabólico, imunológico e mudanças comportamentais que atuam em conjunto de maneira não linear para manter a homeostase (MCEWEN, 1998).

2.1.3 Diferenças individuais

Em adição, a alostase é determinada por fatores genéticos e experiências anteriores. Por exemplo, foi documentado que a maioria das pessoas responde a um desafio de falar em público com níveis aumentados de cortisol salivar, mas se habitua rapidamente à repetição do desafio; no entanto, uma minoria de indivíduos falha em habituar sua resposta ao cortisol, sendo que essas pessoas têm a característica de baixa autoestima (KIRSCHBAUM *et al.*, 1995). Ainda, o segundo aspecto das diferenças individuais diz respeito às condições do próprio corpo. Por exemplo, pessoas que estão em boas condições físicas podem lidar com exercícios

extenuantes muito melhor do que aqueles que não estão em forma. Além disso, desequilíbrios metabólicos que levam à obesidade e diabetes podem aumentar a vulnerabilidade de um indivíduo ao estresse, e estes podem ter um componente genético (BRINDLEY; ROLLAND, 1989)

2.1.4 Carga alostática e sobrecarga alostática

No entanto, apesar da alostase ser eficaz por um curto intervalo, com o tempo as alterações podem ter efeitos adversos cumulativos, denominada carga alostática. Assim, carga alostática refere-se ao efeito cumulativo de múltiplos estressores, bem como à desregulação da rede não linear de alostase (por exemplo, excesso ou falta de cortisol, adrenalina ou inflamação em resposta a um desafio). Por conseguinte, a sobrecarga alostática refere-se à fisiopatologia cumulativa que pode resultar dessa desregulação, por exemplo, a elevação crônica da pressão arterial para garantir fluxo sanguíneo adequado para o cérebro pode levar à aterosclerose e derrame ou oclusão coronariana (GOLDSTEIN; KOPIN, 2007; MCEWEN, 1998).

2.2 EIXO HPA

Em razão de sua importância a curto prazo e de seus efeitos negativos a longo prazo, é importante entender como é a resposta fisiológica ao estresse. Assim, quando o estímulo estressor é percebido pelo cérebro, há uma ativação das células do Núcleo Paraventricular do Hipotálamo (PVN). Então, essas células respondem, produzindo e secretando o Fator Liberador de Corticotrofina (CRF) no sistema portal hipofisário, que conecta o hipotálamo à hipófise, também conhecida como pituitária (VALE *et al.*, 1981). Seguidamente, o CRF se associa aos receptores CRFR1 das células da adeno-hipófise, estimulando a conversão do pró-hormônio Pro-opiomelanocortina (POMC) em Hormônio Adrenocorticotrófico (ACTH), que é liberado na circulação sistêmica (LACAZE-MASMONTEIL *et al.*, 1987). Além disso, a produção de ACTH é sinergicamente estimulada pela Vasopressina, um hormônio também produzido pelas células do PVN, e liberado na circulação porto-hipofisária, se ligando ao receptor V1b das células da adeno-hipófise (HERNANDO *et al.*, 2001). Posteriormente, o ACTH, se associa aos receptores MC2-R no córtex da glândula adrenal, estimulando a liberação de cortisol, em humanos, ou corticosterona, em roedores (MOUNTJOY *et al.*, 1992) (Figura 1). É sabido, que os efeitos biológicos dos glicocorticoides são geralmente adaptativos; no entanto, a ativação inadequada ou excessiva do eixo HPA pode contribuir para o desenvolvimento de patologias (MCEWEN; STELLAR, 1993).

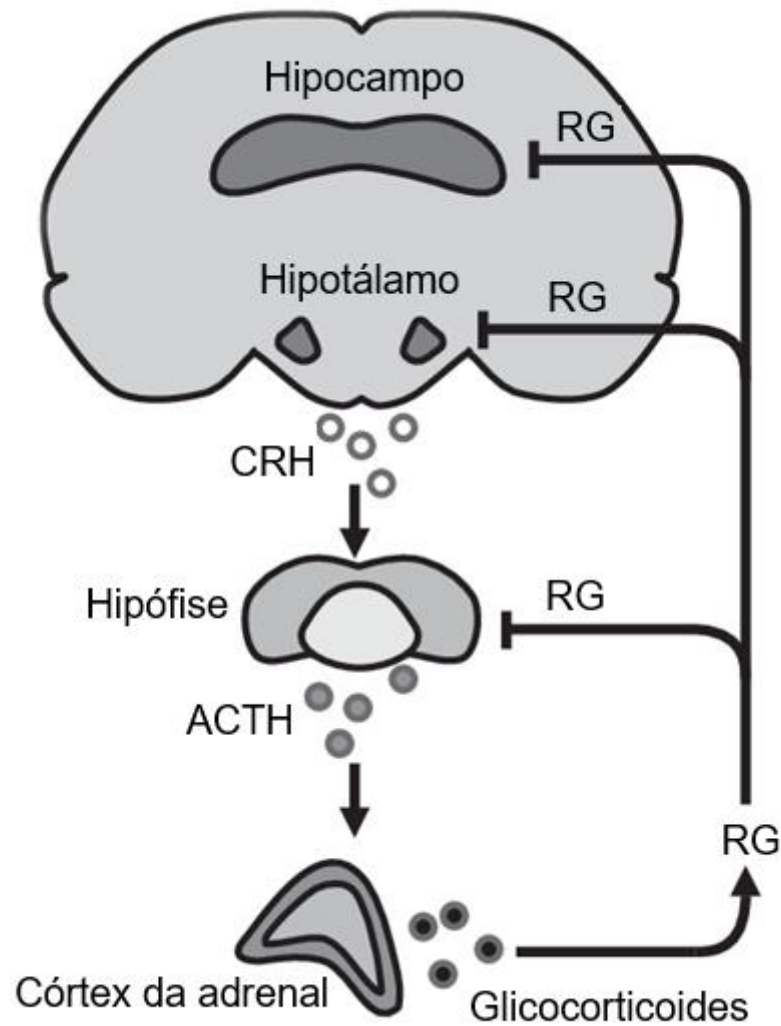


Figura 1 - Resposta do eixo HPA a um agente estressor. Na presença de um agente estressor, os neurônios do hipotálamo liberam CRH, que age na hipófise estimulando a produção e secreção de ACTH. O ACTH é liberado na corrente sanguínea, atuando no córtex da glândula adrenal, onde ele aumenta a secreção de glicocorticoides. Os glicocorticoides agem em diversas partes do corpo, inclusive no SNC, onde regulam a liberação de CRH e de ACTH por mecanismos de feedback negativo (Adaptado de LUPIEN, 2009).

2.3 SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO SIMPÁTICO (SNAS)

Após a exposição ao estressor, o hipotálamo envia sinais neurais que aumentam a ativação do sistema nervoso autônomo simpático periférico. Assim, a ativação do SNA simpático na periferia causa a vasoconstrição, a dilatação dos brônquios e da pupila e a inibição da digestão. Em consequência disso, a pressão arterial se eleva, a respiração se torna mais rápida e profunda para retirada do dióxido de carbono excedente, as funções digestivas e secretórias diminuem.

A taxa metabólica aumenta e a liberação de endorfinas diminui a sensibilidade à dor, e os sentidos são mantidos em estado de alerta (ROGERSON, 1997). Além disso, o sistema nervoso simpático estimula a medula das glândulas adrenais a liberarem adrenalina e noradrenalina na corrente sanguínea. Essas duas substâncias estimulam a produção de glicose a partir do glicogênio do fígado e dos músculos esqueléticos. Em adição, inibem a produção de insulina pelo pâncreas, assim elevando a glicemia (TSIGOS *et al.*, 2000).

2.4 ESTRESSE CRÔNICO

Nesse contexto, sabe-se que os glicocorticoides desempenham um papel fundamental no organismo. Por exemplo, o estresse agudo gera potenciação de processos de aprendizagem e memória hipocampo dependentes. Assim, isso permite que um indivíduo que se encontre em um contexto potencialmente nocivo retenha melhor informações que podem auxiliá-lo a responder adequadamente a essa situação (YARIBEYGI *et al.*, 2017). Em contrapartida, o estresse crônico pode exacerbar a concentração plasmática desse hormônio e causar alterações fisiopatológicas no cérebro e essas alterações podem se manifestar como distúrbios comportamentais, cognitivos e de humor (CADLE; ZOLADZ, 2015). Diante disso, estudos realizados em modelos animais mostraram que o estresse crônico, aliado ao aumento dos glicocorticoides plasmáticos, foi responsável pela atrofia do hipocampo e, por consequência, pela redução reversível da memória espacial (CONRAD, 2008). Além disso, pesquisas mostram que pessoas que recebem altas dosagens de drogas anti-inflamatórias sintéticas exógenas (glicocorticoides), ou ainda, que possuem a síndrome de Cushing, apresentam atrofia do hipocampo e distúrbios de memória associados (YARIBEYGI *et al.*, 2017). De fato, imagens de imagens de ressonância magnética, tiradas do cérebro de pessoas com transtorno de estresse pós-traumático (TEPT), demonstraram uma redução no volume do hipocampo juntamente com efeitos neurofisiológicos, como uma memória verbal fraca (BREMNER, 2006). Nesse contexto, a relação dose resposta dos glicocorticoides durante a resposta de estresse, tem um comportamento em U invertido, apresentando um pico de resposta adaptativa induzida pelo estresse agudo seguido de uma queda nessa resposta devido à sobrecarga alostática gerada pelo estresse crônico (MCEWEN *et al.*, 2015), como é possível ser observado na figura (2).

2.5 ESTRESSE PÓS-NATAL

O período pós-natal é umas das janelas neurodesenvolvimentais mais importantes, uma vez que, é caracterizado por um alto nível de plasticidade sináptica, além de ser crítico para o

desenvolvimento do hipocampo (BRUNSON *et al.*, 2003). Diante disso, experiências adversas durante essa janela de desenvolvimento parecem gerar efeitos a longo prazo no modo como os indivíduos respondem a situações de estresse (MCEWEN, 2011). A priori, evidências científicas revelam que a origem de muitas doenças que ocorrem na vida adulta, acontecem em razão de perturbações que ocorrem nos primeiros anos de vida, durante períodos sensíveis do desenvolvimento, incorporando-se permanentemente nos processos fisiológicos regulatórios (SHONKOFF; BOYCE; MCEWEN, 2009). Dentre essas perturbações que ocorrem na infância, estão: pobreza extrema; violência no bairro; escolas disfuncionais; maus-tratos pessoais; caos doméstico e pais ausentes, fazendo com que a criança se torne vulnerável à incorporação biológica do risco de doença. (EVANS, 2004). É sabido que experiências traumáticas, durante esse período, aumentam a incidência de transtornos psiquiátricos, como depressão, ansiedade, estresse pós-traumático e transtorno do déficit de atenção em homens e mulheres em idade adulta (KAUFMAN, JOAN, 2012). (DANESE *et al.*, 2008). Adversidades, durante a infância, pode aumentar também a probabilidade de um indivíduo se envolver em comportamentos inadequados, como agressão e delinquência (HUGHES *et al.*, 2020). Ainda, o risco de desenvolver certos distúrbios mentais pode ser influenciado de forma diferente por subtipos específicos de experiências (abuso físico, sexual e emocional, bem como negligência física e emocional) (GERKE *et al.*, 2018). O abuso físico, por exemplo, é associado a transtornos de humor, enquanto o abuso emocional está relacionado à ocorrência de transtornos de personalidade e esquizofrenia (CARR *et al.*, 2013). Pode ser citado, a título de exemplo, pesquisa realizada com os dados de 2003 homens e mulheres, que passaram pelo período da segunda guerra mundial quando criança. Sendo que 320 dessas foram evacuadas da cidade de Helsinque para um orfanato temporário durante 1,7 anos e o restante das crianças permaneceram com os pais na cidade natal durante o período de guerra. A média de idade foi de 4,8 anos. As crianças evacuadas mostraram taxas mais altas de morbidade cardiovascular e sintomas de depressão em comparação com seus pares não evacuados sessenta anos depois (ALASTALO *et al.*, 2009). Ademais, homens e mulheres que sofreram maus tratos na primeira década de vida e que aos 32 anos de idade apresentaram diagnóstico de depressão têm duas vezes mais chances de terem elevações clinicamente relevantes dos níveis de proteína C reativa, biomarcador de maior risco de doença cardiovascular, em comparação com os controles. Por fim, o efeito do estresse sobre o hipocampo parece estar implicado em diversas dessas alterações, reprogramando a resposta do eixo HPA deixando indivíduos mais susceptíveis a

estressores (FABRICIUS; WÖRTWEIN; PAKKENBERG, 2008). Todavia, esses estudos epidemiológicos são correlacionais e não permitem estabelecer relações de causalidade, além de possuírem inúmeras limitações. Por esses motivos, é importante estudar os efeitos do estresse pós-natal em modelos animais nos quais é possível realizar manipulações experimentais. De fato, modelos animais mostram que essas perturbações que ocorrem nos anos iniciais de desenvolvimento podem persistir na vida adulta e alterar estados emocionais, capacidades de tomada de decisão e processos corporais que contribuem para a instabilidade emocional, abuso de substâncias, agressão e obesidade (ISGOR *et al.*, 2004; KAUFMAN *et al.*, 2007).

2.6 PROTOCOLO DE SEPARAÇÃO MATERNAL

O modelo mais utilizado para o estudo do estresse pós-natal é o protocolo de SM. Assim, esse protocolo consiste em separar os animais da mãe por tempos superiores a 180 min, diariamente, do segundo ao décimo quarto dia pós-natal ou mais dias, mantendo os animais a uma temperatura constante de aproximadamente 32°C (PLOTSKY; MEANEY, 1993). Em consequência disso, há um aumento da atividade do PVN que produzirá mais CRH, e por conseguinte, elevação brusca nos níveis de corticosteroides dos filhotes durante o tempo da separação (ROSENFELD *et al.*, 1991). Há pesquisas na literatura mostrando que o protocolo de separação maternal, (P2 ao P21) por 180 min por dia (09:00-12:00 h), gera comportamento tipo-depressivo em camundongos adolescentes C57/BL6 machos, mas não é capaz de gerar comportamento tipo-ansioso, já o tempo de 15 min de separação diária não é suficiente para alterar o comportamento dos animais (BIAN *et al.*, 2015). Porém, não é escrito se durante a separação maternal os animais permanecem isolados ou juntos aos irmãos de ninhada. Existem estudos com animais machos C57/BL6 adolescentes que passaram pelo protocolo de separação maternal (P2 ao P20) durante 4 h diárias (10 h às 14h), com os animais permanecendo juntos aos irmãos de ninhada durante o tempo de separação, em que foi possível observar comportamento tipo-ansioso, mas não tipo-depressivo (SHIN *et al.*, 2016). Também já foi observado comportamento tipo-depressivo em ratas adolescentes após a separação maternal de 4 h por dia entre P2 e P20 (LUKKES *et al.*, 2017). Por último, em ratos Wistar adolescentes, de ambos os sexos, que passaram pelo protocolo de separação maternal 4 h por dia do P1 ao P21, isolados aos irmãos de ninhada, foi possível observar uma diminuição do comportamento tipo-ansioso (WANG *et al.*, 2015). O número de dias de separação maternal parece ser crucial nos resultados, foi feita uma pesquisa com ratos Wistar em que foi avaliado dois tipos de protocolos de separação maternal, sendo que no primeiro deles, a separação ocorre em um

período mais curto (P1 ao P10) e o segundo em um período mais longo (P1 ao P21), em ambos o tempo do isolamento da mãe por dia foi de 4 horas e os animais permaneciam junto aos irmãos de ninhada durante a separação. O modelo mais longo gerou um comportamento tipo-ansioso e prejudicou o reconhecimento na adolescência e na idade adulta, enquanto o mais curto não gerou comportamento tipo-ansioso, mas afetou o aprendizado na adolescência (BANQUERI; MÉNDEZ; ARIAS, 2017). Diante disso, a natureza e a intensidade do estresse, o gênero, a idade e as cepas dos roedores são elementos que determinam os resultados do efeito do estresse no início da vida e esses fatores podem contribuir para os resultados diferentes (FREUND *et al.*, 2013).

3. JUSTIFICATIVA

Como já foi mencionado, o estresse no período pós-natal (abuso físico e emocional, negligência; pobreza extrema; violência de bairro) aumenta a incidência de transtornos psiquiátricos, como depressão, ansiedade, estresse pós-traumático e transtorno do déficit de atenção em homens e mulheres em idade adulta (KAUFMAN, JOAN, 2012). Além disso, aumenta também a probabilidade de um indivíduo se envolver em comportamentos inadequados, como agressão e delinquência (HUGHES *et al.*, 2020). No Brasil, em consenso com a pesquisa de 2018 do IBGE, cerca 5,2 milhões de brasileiros de 0 a 14 anos estão na extrema pobreza. Em adição, o país tem as maiores taxas de maus-tratos contra crianças no mundo (VIOLA *et al.*, 2016). Essa conjuntura reflete nos dados de 2017 da OMS, em que a população brasileira é a mais ansiosa do mundo e apresenta uma taxa de depressão de 5,8%, acima da média global que é 4,4% (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2017). Ainda de acordo com a OMS, a depressão é a doença que mais gera incapacidade e afastamento do trabalho no mundo, sendo também a maior causa das mortes por suicídio, 800 mil casos por ano (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). Estima-se que, a cada ano, as consequências dos transtornos neuropsiquiátricos, tais como ansiedade e depressão, geram uma perda econômica de 1 trilhão de dólares para o mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). Por esses motivos é importante a realização de um estudo detalhado sobre os efeitos do estresse pós-natal, entre machos e fêmeas, por exemplo, as principais áreas afetadas, os prejuízos causados e o impacto no comportamento. Contudo, as pesquisas epidemiológicas existentes não permitem esse tipo de estudo, uma vez que elas são correlacionais e não permitem estabelecer relações de causalidade. Dessa forma, é extremamente importante a utilização de modelos animais para satisfazer essas dúvidas. Porém, apesar de já existir um modelo para o estudo do estresse pós-natal que é o protocolo de separação maternal, ele ainda não se encontra patronizado. Desde a sua descrição inicial, diversas modificações foram realizadas no protocolo de separação maternal com o intuito de aumentar a intensidade do estímulo estressor ou alterar os efeitos sobre o SNC. Assim, foram realizadas pesquisas com diferentes tempos de separação dos filhotes da mãe, além de pesquisas com animais de diferentes idades. Todavia, fatores como o isolamento físico dos filhotes de seus irmãos de ninhada e a variação do horário de separação, apesar de muito utilizados, ainda não foram bem estudados (LAI; YANG; HUANG, 2008), podendo gerar inconsistência nos resultados. É fundamental entender melhor os efeitos dessas variações na SM para que seja

possível uma sistematização dos resultados desse tipo de manipulação. Somente dessa forma será possível usar os dados desse modelo animal para melhor entender os efeitos deletérios do estresse pós-natal em humanos.

4. OBJETIVOS

Objetivo Geral: Avaliar se diferentes protocolos de separação maternal alteram o comportamento de animais machos e fêmeas pré-púberes de formas distintas.

Objetivos Específicos:

- I. Avaliar se diferentes protocolos de SM produzem **comportamento tipo-ansioso** em camundongos pré-púberes;
- II. Testar se diferentes protocolos de SM produzem **comportamento tipo-depressivo** em camundongos pré-púberes;
- III. Examinar se diferentes protocolos de SM modificam o **comportamento locomotor** em camundongos pré-púberes;
- IV. Investigar se a **variação ou não dos horários de separação, e a presença ou não dos irmãos durante a separação** têm efeitos diferentes nos comportamentos citados;
- V. Pesquisar se as consequências do estresse por separação maternal são distintas em camundongos **fêmeas e machos**.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Camundongos machos e fêmeas C57/BL6 com 8 a 12 semanas foram adquiridos do Biotério Central da UFMG e mantidos no Biotério de Experimentação em Camundongos como matrizes. Vale frisar que as fêmeas que ficaram prenhas não eram reutilizadas. Assim, foi mantido sempre uma ninhada por fêmea. Por outro lado, os machos eram reutilizados até atingirem 6 meses de idade. No Biotério de Experimentação em Camundongos, em algum momento, as matrizes foram contaminadas por *sarna miocóptica*. Após ter conhecimento da contaminação, animais que estavam com perda de pelos, ou ainda, em que era possível identificar o parasita por meio da lupa, foram eutanasiados e um protocolo contra o parasita foi instaurado no biotério, contendo o problema. Os animais foram mantidos em temperatura ambiente de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade 40-70%, em ciclo claro-escuro de 12/12 horas, com livre acesso à ração e água. Em seguida, os cruzamentos foram realizados na proporção de 2 fêmeas para 1 macho durante um período de 7 a 10 dias. Após esse período, os machos foram separados das fêmeas, sendo mantidos em caixas com 2 a 4 animais. Em seguida, no provável 18º dia de gestação (E18), as fêmeas foram transferidas para caixas individuais. Por conseguinte, no 21º dia, as fêmeas tiveram os filhotes. No dia do nascimento, todas as ninhadas permaneceram com as mães e não foi realizada nenhuma manipulação, em razão do estresse materno, sendo que a sobrecarga do estresse poderia desencadear a morte dos filhotes pela mãe. No segundo dia pós-natal, a ninhada foi padronizada mantendo 5-8 filhotes/ninhada tentando manter a média de 6 filhotes/ninhada. A padronização foi realizada da seguinte forma: caso ocorresse de uma fêmea ter 4 filhotes e outra 8 filhotes, dois filhotes desta eram transferidos para aquela, resultando em 6 filhotes por fêmeas. Conquanto, poderia ocorrer de apenas uma fêmea ter 4 filhotes e todas as outras terem 6. Diante disso, todos os quatro filhotes eram sacrificados. Ainda, se ocorresse de uma fêmea ter mais filhotes que o padronizado e as outras ninhadas já estarem completas, eles também eram sacrificados. Outro tipo de padronização seria a padronização por sexos, por exemplo, manter sempre 3 fêmeas e 3 machos em cada ninhada, porém, isso não foi possível de ser realizado, uma vez que em razão das discrepâncias existentes entre as ninhadas, muitas teriam que ser sacrificadas inteiras, caso nascessem filhotes de apenas um sexo, por consequência disso, geraria muitas perdas de filhotes e necessitaria de maior período para o término dos experimentos. No segundo dia do nascimento (P2) até o décimo quarto dia (P14), os filhotes foram separados da mãe por 180 min em cada dia, de acordo com cada protocolo de separação

maternal, sendo que as mães continuavam na mesma caixa no próprio Biotério de Camundongos, enquanto os filhotes foram levados para o laboratório (NNC), local onde ocorreu a separação. Após a separação maternal, do P14 ao P23, os filhotes foram mantidos com as respectivas mães no biotério. No P23, foi feito o desmame das ninhadas, e essas foram separadas por sexo nas caixas e mantidas no biotério nas condições descritas anteriormente. Posteriormente, no 28 ° dia pós-natal, iniciaram os testes comportamentais, sendo realizados até o 31 °.

5.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Os animais utilizados foram divididos em cinco grupos experimentais: um grupo que não passou pelo protocolo de separação maternal, permanecendo junto à mãe até o desmame (**Controle**), um grupo que passou pela separação maternal no mesmo horário todos os dias, cujos filhotes da mesma ninhada foram mantidos juntos durante o período da separação (**Horário Fixo Juntos**); um grupo que passou pela separação maternal no mesmo horário todos os dias, cujos filhotes da mesma ninhada foram mantidos isolados durante o período da separação (**Horário Fixo Isolados**); um grupo que passou pela separação maternal em horário variável, cujos filhotes da mesma ninhada foram mantidos juntos durante o período da separação (**Horário Variável Juntos**); um grupo que passou pela separação maternal em horário variável, cujos filhotes da mesma ninhada foram mantidos isolados durante o período da separação (**Horário Variável Isolados**).

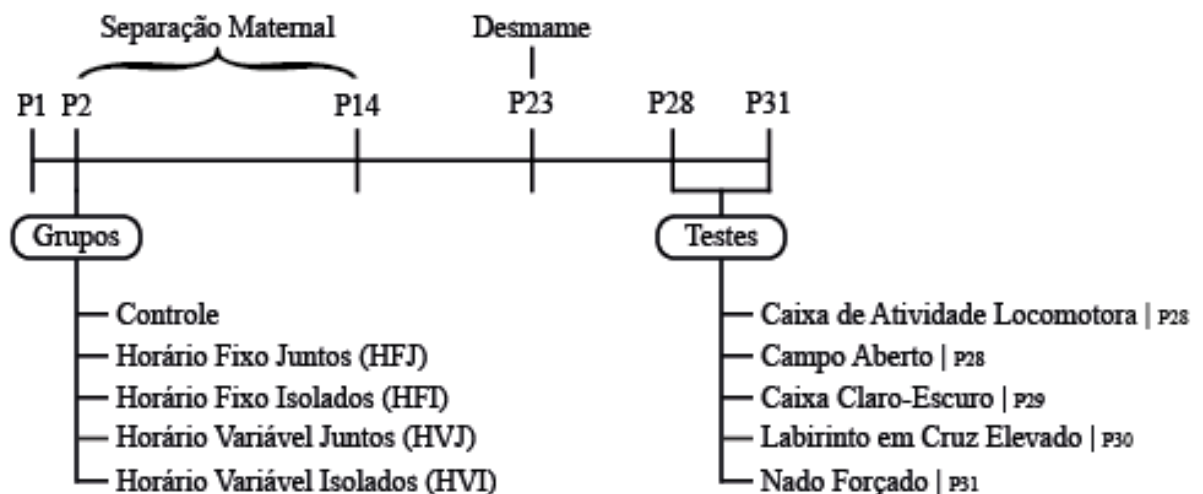


Figura 2 - Desenho Experimental. Os animais utilizados foram divididos em 5 grupos experimentais: um grupo controle que não passou pela separação maternal; um grupo que passou pela SM em Horário Fixo Juntos aos irmãos de ninhada; um grupo que passou pela SM em Horário Fixo Isolados aos irmãos de ninhada; um grupo que passou pela SM em Horário Variável Juntos aos irmãos de ninhada; um grupo que passou pela SM em Horário Variável Isolados aos irmãos de ninhada. Os animais da SM foram isolados da mãe do 2º (P2) ao 14º (P14) dia pós-natal. O desmame ocorreu no 23º (P23) dia pós-natal. Os testes comportamentais foram realizados entre o 28º e o 31º (P28 a P31) dia pós-natal na seguinte ordem: caixa de atividade locomotora; teste de campo aberto; labirinto em cruz elevado; caixa claro-escuro e nado forçado.

Todos os protocolos de separação maternal foram realizados entre o 2º (P2) e o 14º (P14) dia pós-natal e tiveram duração de 180 min por dia. A separação maternal foi realizada dentro de um aparato incubador que consistiu em um banho maria colocado dentro de uma caixa de isolamento acústico que possuía iluminação constante (figura 5). Os animais foram mantidos em recipientes de plástico (figura 4) e colocados dentro do banho maria, cuja temperatura permaneceu em $32^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Os testes comportamentais foram realizados na 4ª semana pós-natal e todos os animais passaram por todos os testes. Após a conclusão dos testes comportamentais, os animais foram anestesiados com Cetamina (100 mg/Kg) e Xilazina (10mg/Kg) em conjunto, via intraperitoneal e foi aplicado um teste de sensibilidade à dor. Na indicação de perda total da sensibilidade, os animais sofreram deslocamento cervical. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG, sob o protocolo nº 261/2019.



Figura 3 – Animais de diferentes protocolos de separação maternal, sendo os potes de plástico maiores referente aos animais juntos e os potes menores referente aos animais isolados.



Figura 4 – Banho Maria onde foi realizada a separação maternal dos grupos.

5.3 TESTES COMPORTAMENTAIS

Os testes comportamentais para avaliar a atividade locomotora, o comportamento tipo-ansioso e tipo-depressivo foram realizados em todos os animais de todos os grupos experimentais na 4ª semana pós-natal. Assim, os animais foram submetidos aos testes individualmente na seguinte ordem: Caixa de Atividade; Teste de Campo Aberto; Labirinto em Cruz Elevado; Teste de Nado Forçado. Todos os testes comportamentais foram realizados durante a fase clara do ciclo, sendo

que foi realizado um teste por dia, com exceção do teste de Caixa de Atividade e Campo Aberto que foram realizados no mesmo dia, com um intervalo de 60 min. Por fim, é válido explicar as discrepâncias entre o (n) amostral nos resultados, que ocorreu em razão de diversos motivos, como: perda de vídeos por criptografia ao computador (Campo-Aberto); vídeos corrompidos (Labirinto em Cruz Elevado); desligamento do computador durante o teste e acidente de trabalho (nado-forçado). Além disso, houve também uma diferença entre o (n) dos grupos de SM, que ocorreu em razão de vazamento nas mamadeiras dos animais machos do grupo HVI, tendo que sacrificar os animais em razão do estresse recebido.

5.3.1 Caixa de Atividade Locomotora

A distância total percorrida e a velocidade média foram usadas como parâmetros para mensurar a atividade locomotora e o número de rearings foi medido para mensurar o comportamento exploratório (PRUT; BELZUNG, 2003a). O sistema automatizado Actitrack v2.7.13. foi utilizado para mensurar a atividade locomotora e exploratória dos animais (BRANCHI; ALLEVA; COSTA, 2002). Então, o aparato consiste em uma caixa de acrílico 25 x 25 cm, sendo que o fundo possui um sistema de sensores infravermelhos que detectam a posição do animal ao longo do teste que dura 10 min. Após a finalização da filmagem, o programa permitiu a exportação dos dados para uma planilha do excel, onde constava a distância total percorrida horizontalmente pelo animal, velocidade média e número total de rearings ao longo do tempo. Em seguida, a caixa foi higienizada com álcool 70% antes de um novo animal ser colocado.

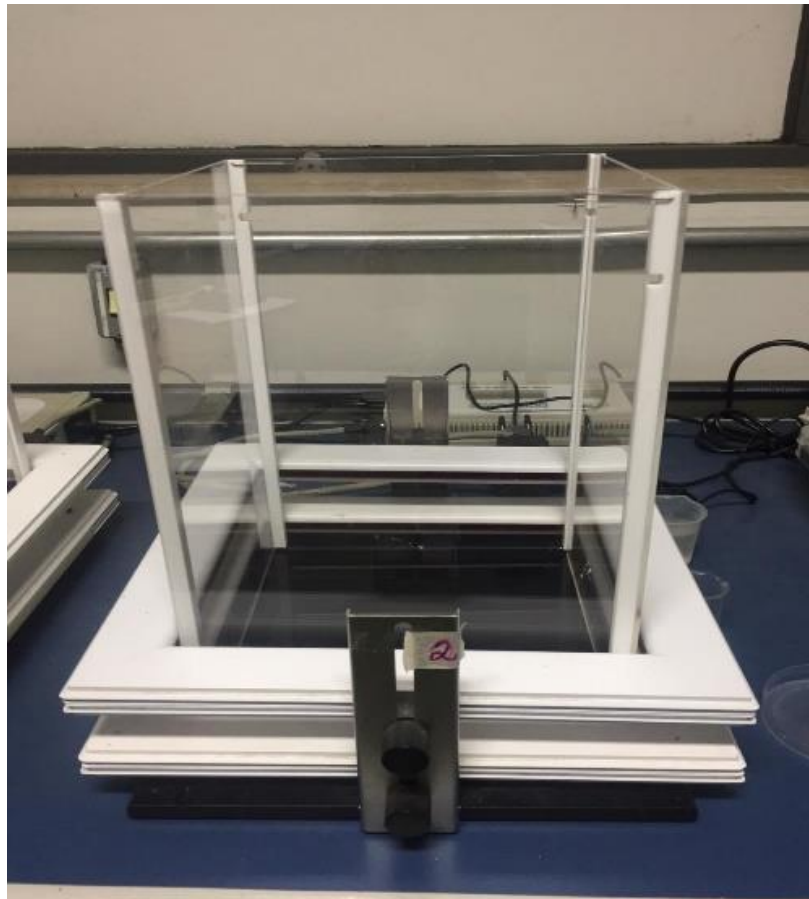


Figura 5 - Aparato do teste “Caixa de Atividade Locomotora”.

5.3.2 Teste de Campo Aberto

O Teste de Campo Aberto foi utilizado para avaliar os comportamentos tipo-ansioso e exploratório dos animais (HALL; BALLACHEY, 1932). O aparato consiste em uma caixa de acrílico 50 x 50 cm, onde as laterais e o fundo são revestidos com papel cor preta, sendo que o fundo é subdividido em 16 quadrantes. Assim, o animal foi colocado sempre no mesmo quadrante e foi filmado a sua exploração durante 5 min. Após a filmagem, foi realizada a análise do vídeo, por meio do programa XPLORAT, onde o experimentador analisou o tempo em que o animal permaneceu no centro e na periferia, número de cruzamentos realizados no centro e na periferia, além de ser computado o número total de rearings. A área central é desprovida de paredes, enquanto que a área periférica é adjacente às paredes do aparato. Normalmente, os roedores são mais ativos e permanecem mais tempo na periferia do aparato em comparação com a área central (VALLE, 1970). Isto ocorre porque a locomoção junto à parede permite a realização de tigmotaxia (VALLE, 1970; (PRUT; BELZUNG, 2003), entendida como uma reação de defesa natural, na qual os roedores passam suas vibrissas sobre superfícies verticais, dando a sensação de menor exposição, e, portanto, de estarem protegidos de um eventual ataque por predador (TREIT; MENARD; ROYAN, 1993). Neste sentido, a locomoção na periferia do aparato tem uma conotação exploratória, enquanto que a locomoção no centro tem uma conotação emocional, um comportamento frente a uma situação aversiva. O aumento na locomoção e no tempo gasto na área central ou a diminuição da latência para entrar na área central do CA são indicadores de diminuição da ansiedade (PRUT; BELZUNG, 2003). Drogas ansiolíticas tendem a aumentar a locomoção e o tempo de permanência na área central do CA, enquanto drogas ansiogênicas apresentam o resultado contrário (GENTSCH; LICHTSTEINER; FEER, 1987). Após o término da filmagem, a caixa foi higienizada com álcool 70%, antes que um novo animal fosse colocado.

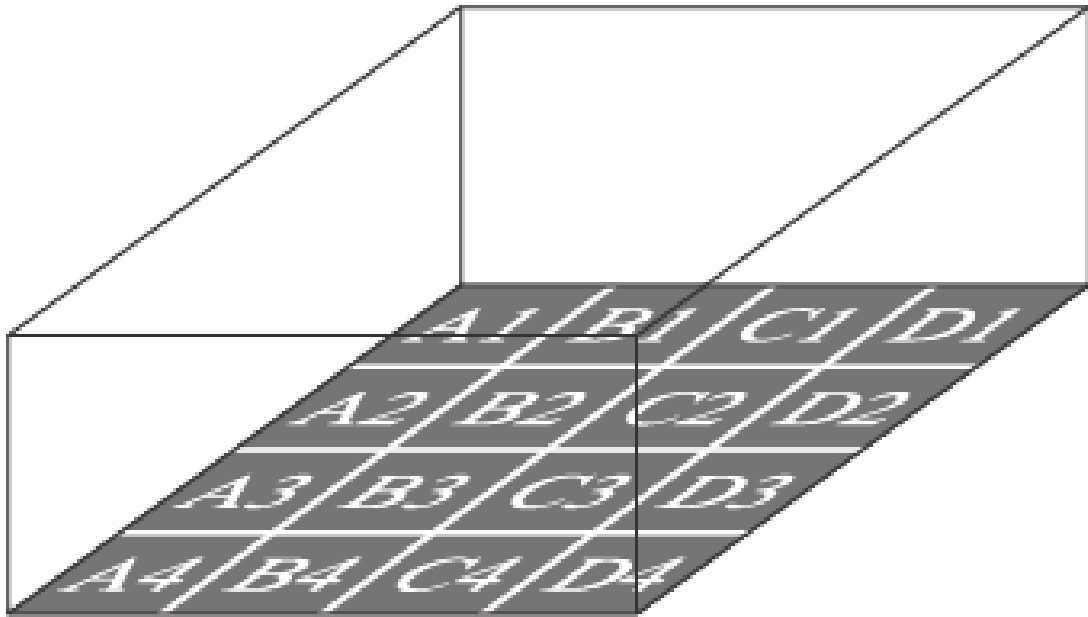


Figura 6 - Desenho esquemático do aparato do teste de Campo Aberto, em que B2, C2, B3 e C3 corresponde ao centro e os quadrantes restantes à periferia.

5.3.3 Caixa claro-escuro

O teste caixa claro-escuro foi utilizado para avaliar o comportamento tipo - ansioso dos animais (BOURIN; HASCOËT, 2003). Então, o aparato consiste em uma caixa de acrílico 40 x 20 cm, sendo dividida em um lado claro (2/3 da caixa) e um lado escuro (1/3 da caixa), apresentando uma pequena abertura entre as duas comportas, suficiente para a passagem do animal. Vale ressaltar ainda, que para realização do teste, foi utilizada luz branca que incidia sobre a parte clara da caixa, sendo controlada a luminosidade pelo luxímetro, com o valor em torno de 500-600 luxs. Os animais possuem a tendência natural de explorar e de se esquivar do que não é familiar (neofobia). O comportamento aversivo dos animais é produzido neste modelo pelos estímulos estressores “ambiente novo” e “iluminação”. Considerando que locais altamente iluminados representam uma ameaça natural aos roedores, que são animais de hábitos noturnos, eles possuem a tendência natural de passar mais tempo no lado escuro do modelo. Quando tratados com drogas utilizadas na clínica para o tratamento da ansiedade, como os benzodiazepínicos, os animais acabam passando significativamente mais tempo no compartimento claro do modelo, quando comparados aos animais controles (BOURIN; HASCOËT, 2003). O animal foi colocado no lado claro, de frente para o lado escuro e foi computado o tempo necessário para ele ir para o outro lado da caixa (latência). Em seguida, foi iniciada a filmagem por 5 min. Por conseguinte, o experimentado realizou a análise do vídeo por XPLOTTRAT, onde computou o tempo de permanência no claro e a frequência de cruzamento entre os dois lados. Após o término da filmagem, a caixa foi higienizada com álcool 70% para que um novo animal fosse colocado.

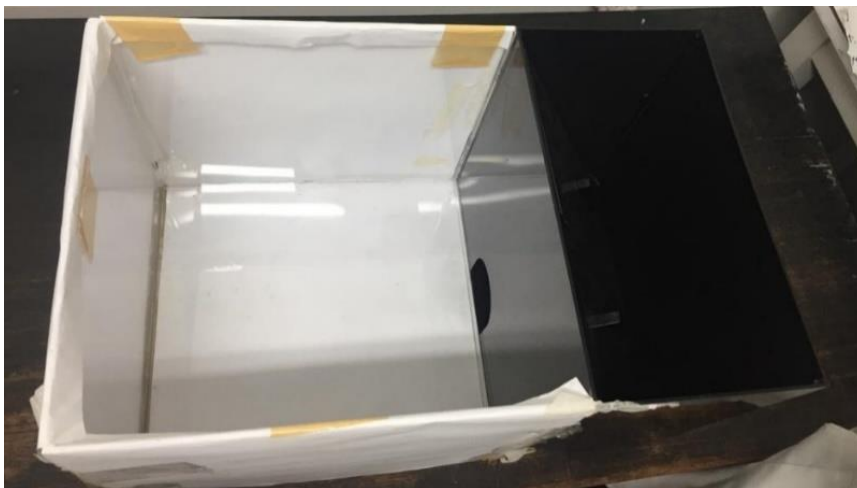


Figura 7 - Caixa Claro- Escuro

5.3.4 Labirinto em Cruz Elevado

O Labirinto em Cruz Elevado foi utilizado para avaliar o comportamento tipo-ansioso dos animais (LISTER, 1987; PELLOW et al., 1985). Então, o aparato de acrílico, em formato de cruz, possui dois braços abertos (direção nordeste – sudoeste da figura) e dois braços fechados (direção noroeste-sudeste da figura), além de um centro, onde o animal pode escolher quais dos braços explorar. Assim, os braços possuem 30 cm de comprimento e são elevados cerca de 30 cm do solo. Como parâmetros clássicos foram contabilizados a porcentagem de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos e fechados, considerados apenas quando o animal colocava as quatro patas em um novo local. Assume-se que os braços abertos do labirinto combinam dois componentes naturalmente aversivos aos animais: o fato de ser ambiente novo e um espaço aberto. Em contrapartida, os braços fechados oferecem ao animal um ambiente protegido contra estímulos potencialmente nocivos, tais como a presença de predadores (WALF; FRYE, 2007). Também foram contabilizados como parâmetros de ansiedade os comportamentos de “head dipping” (movimento descendente da cabeça dos roedores em direção ao chão a partir dos braços abertos), “rearings” (quando o animal se apoia nas duas patas traseiras) e “stretchings” (quando o animal estica o corpo para frente sem mover as patas), grooming (comportamento de autolimpeza), tempo no centro e tempo na extremidade (WALF; FRYE, 2007). Os animais foram colocados no centro e filmados por 5 min. Após a filmagem, o experimentador analisou o vídeo com o auxílio do programa XPLOSTAT. Após o término da filmagem, a caixa foi higienizada com álcool 70% para que um novo animal fosse colocado.



Figura 8 - Labirinto em Cruz Elevado

5.3.5 Nado forçado

O teste nado forçado foi utilizado para avaliar comportamento tipo-depressivo dos animais (YANKELEVITCH-YAHAV *et al.*, 2015). Então, o aparato consiste em um becker com capacidade de 5 L, onde foi colocado água aquecida em uma temperatura de 26 a 28 graus. O animal foi colocado na água e filmado em frente à câmera. Após a filmagem, o vídeo foi analisado por meio do programa XPLORAT, onde foram computados a latência; tempo de nado; tempo de climbing e frequência de climbing. Assume-se que a redução da latência para imobilidade, o aumento do tempo total de imobilidade e a redução dos comportamentos de escalada e nado denotam comportamento tipo depressivo dos animais (PETIT-DEMOULIERE; CHENU; BOURIN, 2005).



Figura 9 - Nado Forçado

Fonte: www.creative-biolabs.com

5.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente com os programas SigmaPlot 11.0 e as figuras criadas pelo GraphPad Prism 6. Primeiramente, foi utilizado o teste One Way ANOVA e o Holm-Sidak como posthoc para comparar cada protocolo de separação maternal ao grupo controle para todos os parâmetros comportamentais avaliados. Após a análise de todos os parâmetros de cada grupo com o grupo controle pelo teste One Way ANOVA, os grupos de separação maternal foram comparados entre si pelo teste Two way Anova, de forma a avaliar o efeito da variação do horário e do isolamento físico durante a separação maternal. Os comportamentos que foram afetados por pelo menos um desses fatores foram submetidos ao teste post-hoc de Tukey para detectar diferenças entre os tipos de SM. O nível de significância usado foi $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1 INVESTIGAÇÃO SE PROTOCOLOS DE ESTRESSE POR SEPARAÇÃO MATERNAL ALTERAM O COMPORTAMENTO MOTOR, TIPO-ANSIOSO E TIPO-DEPRESSIVO DE CAMUNDONGOS C57/BL6 PRÉ-PÚBERES FÊMEAS E MACHOS

6.1.1 Caixa de Atividade Locomotora

Foi observado um aumento de 29% da distância total percorrida ($p = 0,016$; $t = -2,630$) e da velocidade média ($p = 0,017$; $t = -2,590$) dos machos do grupo HVI quando comparados ao grupo controle (Figuras 11A-B). Não foram observadas diferenças significativas no número de rearings nos machos (Figura 11C). Também não foram observadas diferenças significativas na distância total percorrida, velocidade média e número de rearings nas fêmeas pré-púberes (Figuras 12A-C).

Caixa de Atividade Locomotora (Machos)

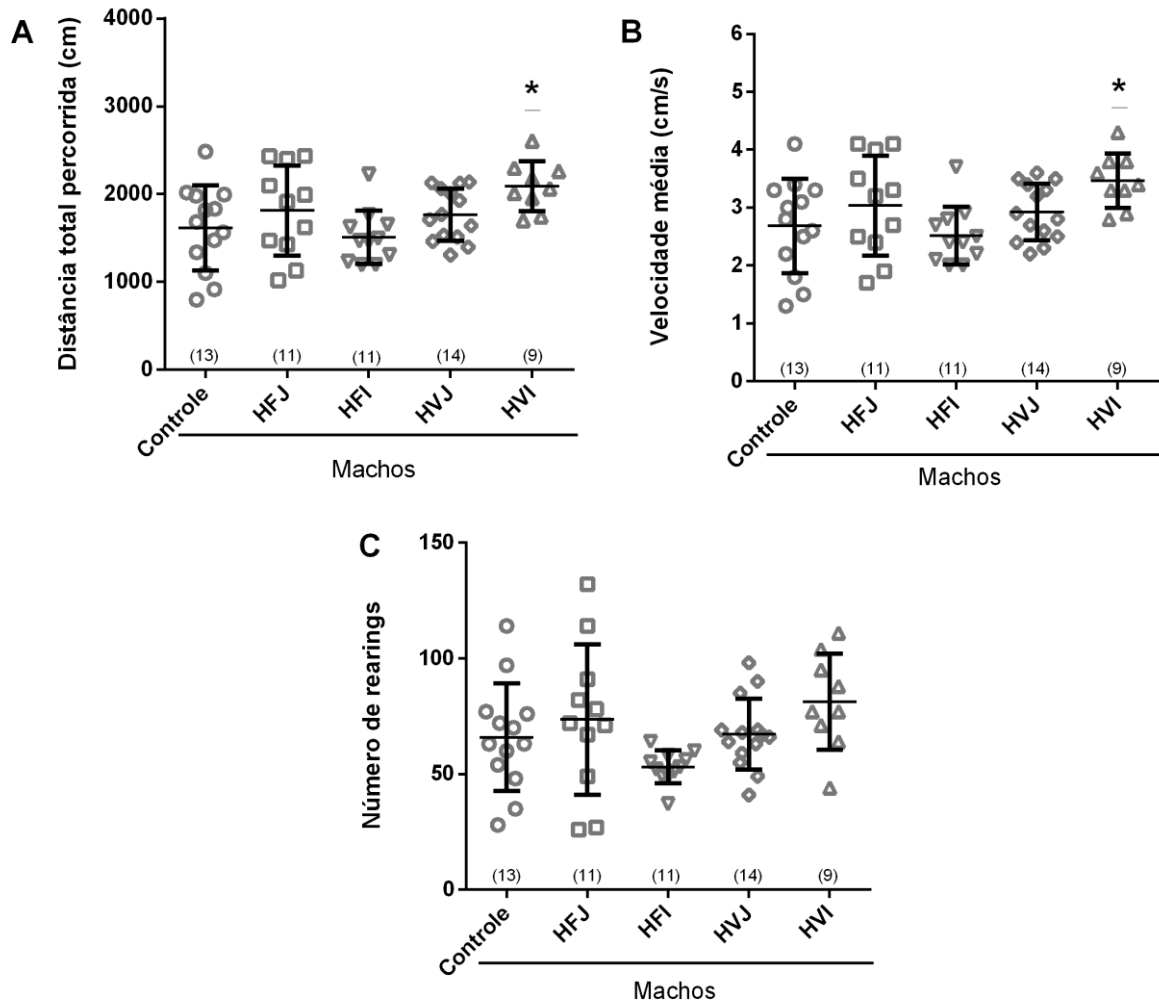


Figura 10 - Efeitos de diferentes protocolos de separação materna no Teste de Caixa de Atividade Locomotora em camundongos C57/BL6 machos pré-púberes. Os camundongos machos do grupo HVI apresentaram aumento da distância total percorrida (A) e da velocidade média (B). Nenhuma alteração no número de rearings foi observada (C). Distância total percorrida (A); Velocidade média (B) e número de rearings (C) são dados paramétricos mostrados com média e desvio padrão. O n amostral é indicado acima de seu respectivo grupo. Os asteriscos indicam dados que apresentaram diferença estatisticamente significativa, ($p < 0,05$). Foi realizado o teste estatístico One Way ANOVA em todos os parâmetros e o Holm-Sidak como posthoc. HFJ (Animais que foram separados da mãe em horário fixo juntos aos irmãos de ninhada); HFI (Animais que foram separados da mãe em horário fixo isolados dos irmãos de ninhada); HVJ (Animais que foram separados da mãe em horário variável juntos aos irmãos de ninhada); HVI (Animais que foram separados da mãe em horário variável isolados dos irmãos de ninhada).

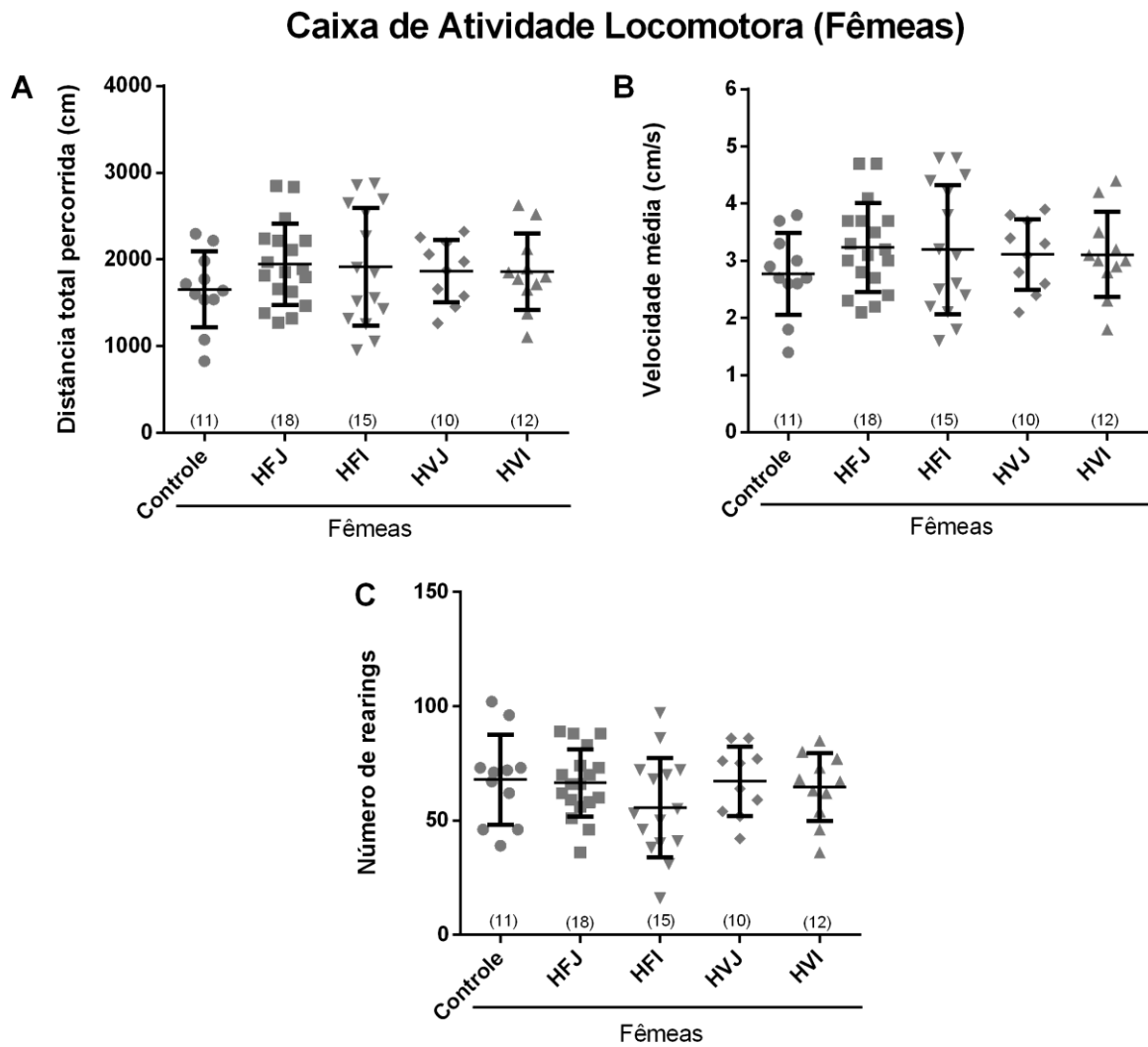


Figura 11 - Efeitos de diferentes protocolos de separação maternal no Teste de Caixa de Atividade Locomotora em camundongos C57/BL6 fêmeas pré-púberes. As fêmeas de todos os grupos não apresentaram diferença estatística significativa em nenhum dos parâmetros analisados, sendo distância total percorrida (A); velocidade média (B) e número de rearings (C). Distância total percorrida (A); Velocidade média (B) e número de rearings (C) são dados paramétricos mostrados com média e desvio padrão. O n amostral é indicado acima de seu respectivo grupo. Foi realizado o teste estatístico One Way ANOVA em todos os parâmetros. HFJ (Animais que foram separados da mãe em horário fixo juntos aos irmãos de ninhada); HFI (Animais que foram separados da mãe em horário fixo isolados dos irmãos de ninhada); HVJ (Animais que foram separados da mãe em horário variável juntos aos irmãos de ninhada); HVI (Animais que foram separados da mãe em horário variável isolados dos irmãos de ninhada).

6.1.2 Campo Aberto

Foi verificado uma diminuição de 40% do tempo no centro ($p = 0,026$; $t = 2,359$) e uma diminuição de 32 % do número de cruzamentos dos machos ($p = 0,024$; $t = 2,397$) do grupo HVJ e uma diminuição de 47% do tempo no centro ($P = 0,026$; $t = 2,410$) dos machos do grupo HVI quando comparados ao grupo controle (Figura 13 A-D). Não foram observadas diferenças significativas no número de rearings e nos números de cruzamentos na periferia dos machos (Figura 13 B-C). Também não foram observadas diferenças significativas do tempo no centro; do número de rearings; do número de cruzamentos no centro e do número de cruzamentos na periferia, nas fêmeas pré-púberes (Figuras 14A-D).

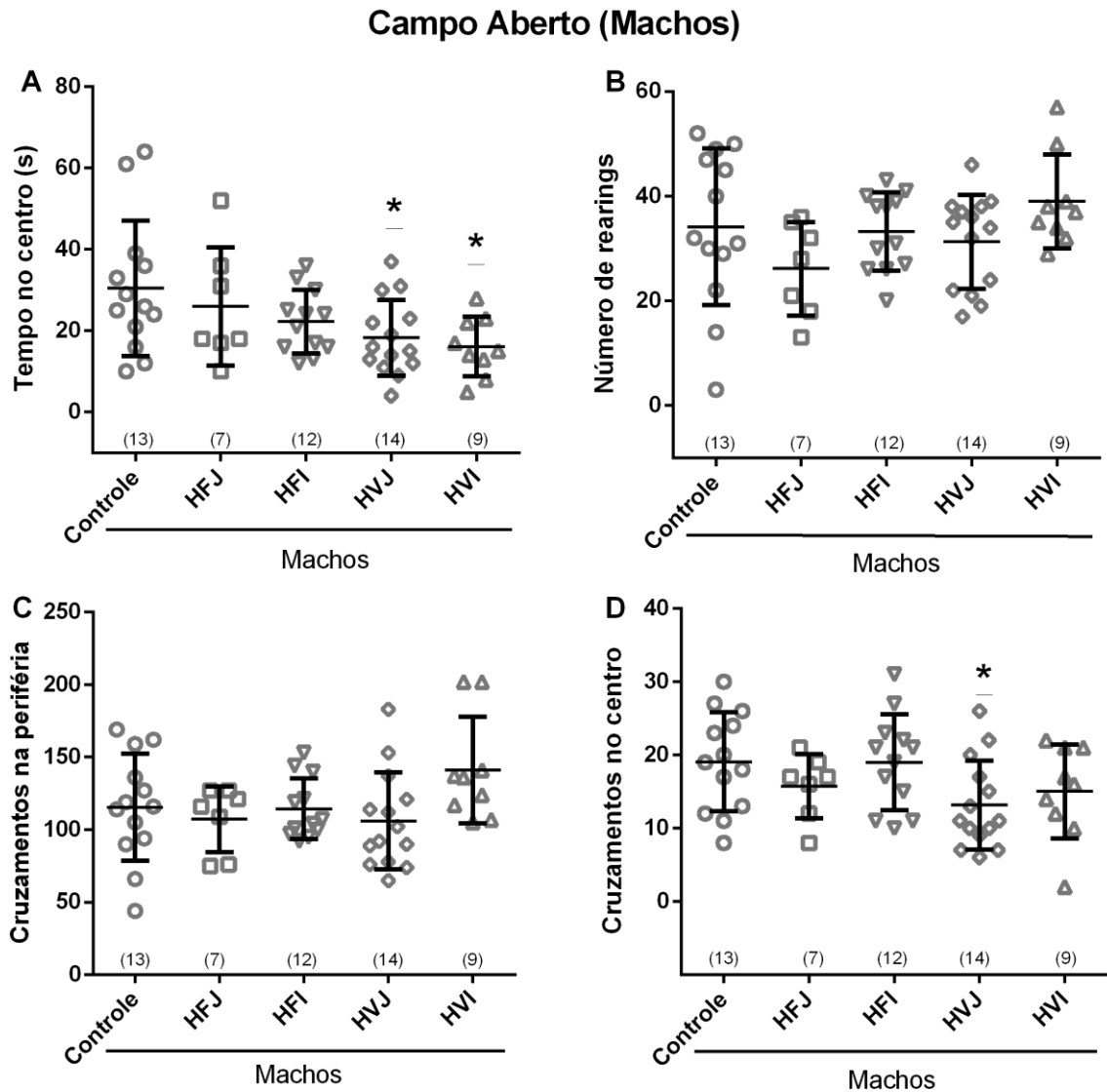


Figura 12 - Efeitos de diferentes protocolos de separação maternal (HFJ; HFS; HVJ e HVS) no Teste de Campo Aberto em camundongos C57/BL6 machos pré-púberes. Os camundongos machos do grupo HVJ apresentaram diminuição do tempo no centro (A) e do número de cruzamentos no centro (D) e os machos do grupo HVI apresentaram diminuição do tempo no centro (A). Nenhuma alteração no número total de rearings (B) e no número de cruzamentos na periferia (C) foi observada. Dados paramétricos mostrados com média e desvio padrão. O n amostral é indicado acima de seu respectivo grupo. Os asteriscos indicam dados que apresentaram diferença estatisticamente significativa, ($p < 0,05$). Foi realizado o teste estatístico One Way ANOVA em todos os parâmetros e o Holm-Sidak como posthoc. HFJ (Animais que foram separados da mãe em horário fixo juntos aos irmãos de ninhada); HFI (Animais que foram separados da mãe em horário fixo isolados dos irmãos de ninhada); HVJ (Animais que foram separados da mãe em horário variável juntos aos irmãos de ninhada); HVI (Animais que foram separados da mãe em horário variável isolados dos irmãos de ninhada).

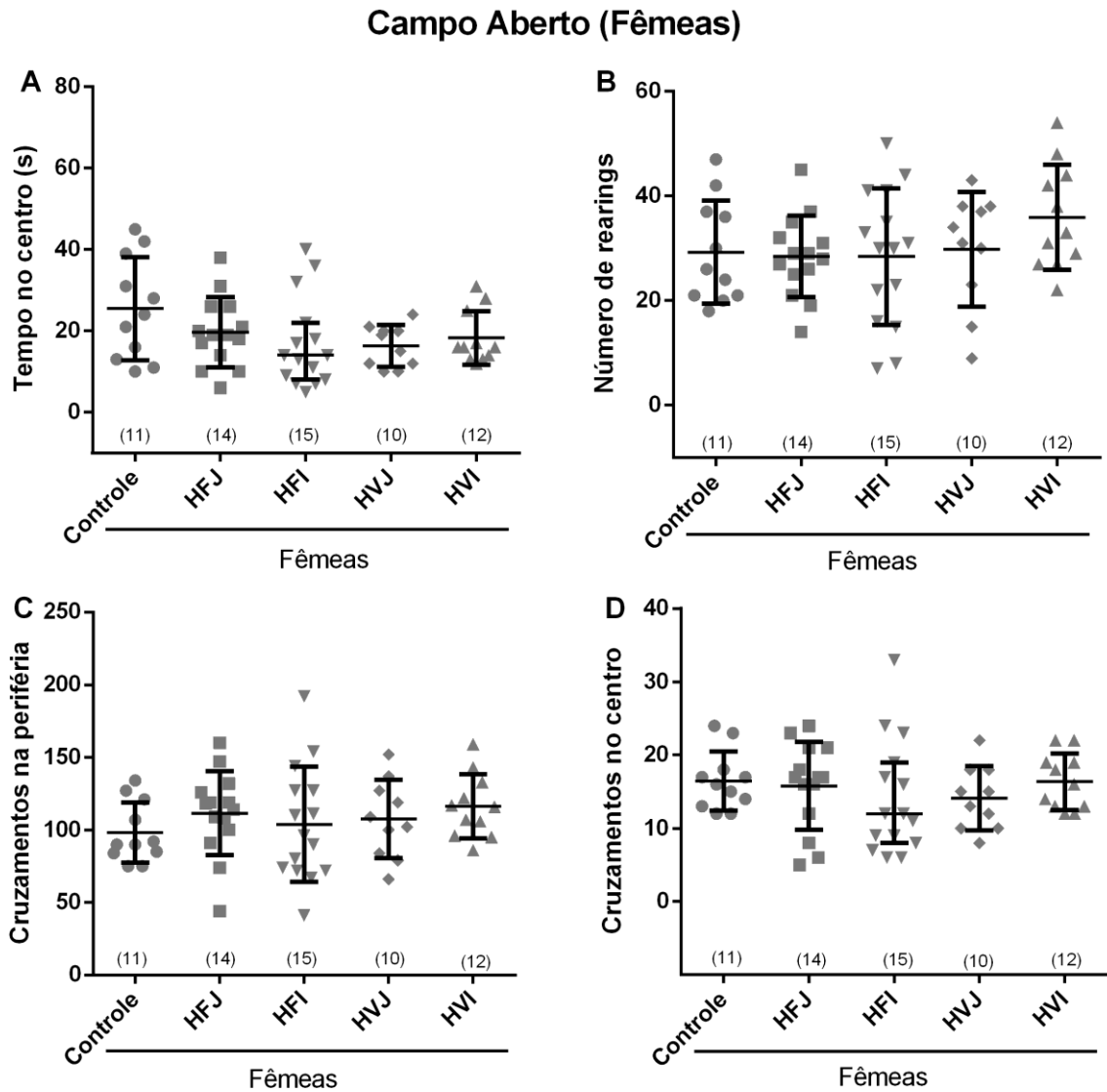


Figura 13 - Efeitos de diferentes protocolos de separação maternal (HFJ; HFS; HVJ e HVS) no Teste de Campo Aberto em camundongos C57/BL6 fêmeas pré-púberes. Nenhuma alteração nos parâmetros tempo no centro (A); número total de rearings (B); número de cruzamentos na periferia (C) e número de cruzamentos no centro (D) foi observada. Tempo no centro e número de cruzamentos no centro do grupo HFI são dados não paramétricos mostrados com mediana e interquartil. Todos os outros parâmetros são dados paramétricos mostrados com média e desvio padrão. O n amostral é indicado acima de seu respectivo grupo. Foi realizado o teste estatístico One Way ANOVA em todos os parâmetros. HFJ (Animais que foram separados da mãe em horário fixo juntos aos irmãos de ninhada); HFI (Animais que foram separados da mãe em horário fixo isolados dos irmãos de ninhada); HVJ (Animais que foram separados da mãe em horário variável juntos aos irmãos de ninhada); HVI (Animais que foram separados da mãe em horário variável isolados dos irmãos de ninhada).

6.1.3 Caixa Claro-Escuro

Foi observado um aumento de 46% no tempo no claro ($p = 0,001$; $t = -3,717$) e de 60% na frequência de cruzamentos ($p = 0,001$; $t = -3,754$) dos machos do grupo HVI quando comparados ao grupo controle (Figura 15B-C). Não foram observadas diferenças significativas na latência dos machos (Figura 11C). Também não foram observadas diferenças significativas na latência; no tempo no claro e nos números de cruzamentos das fêmeas (Figura 16A-C).

Caixa Claro-Escuro (Machos)

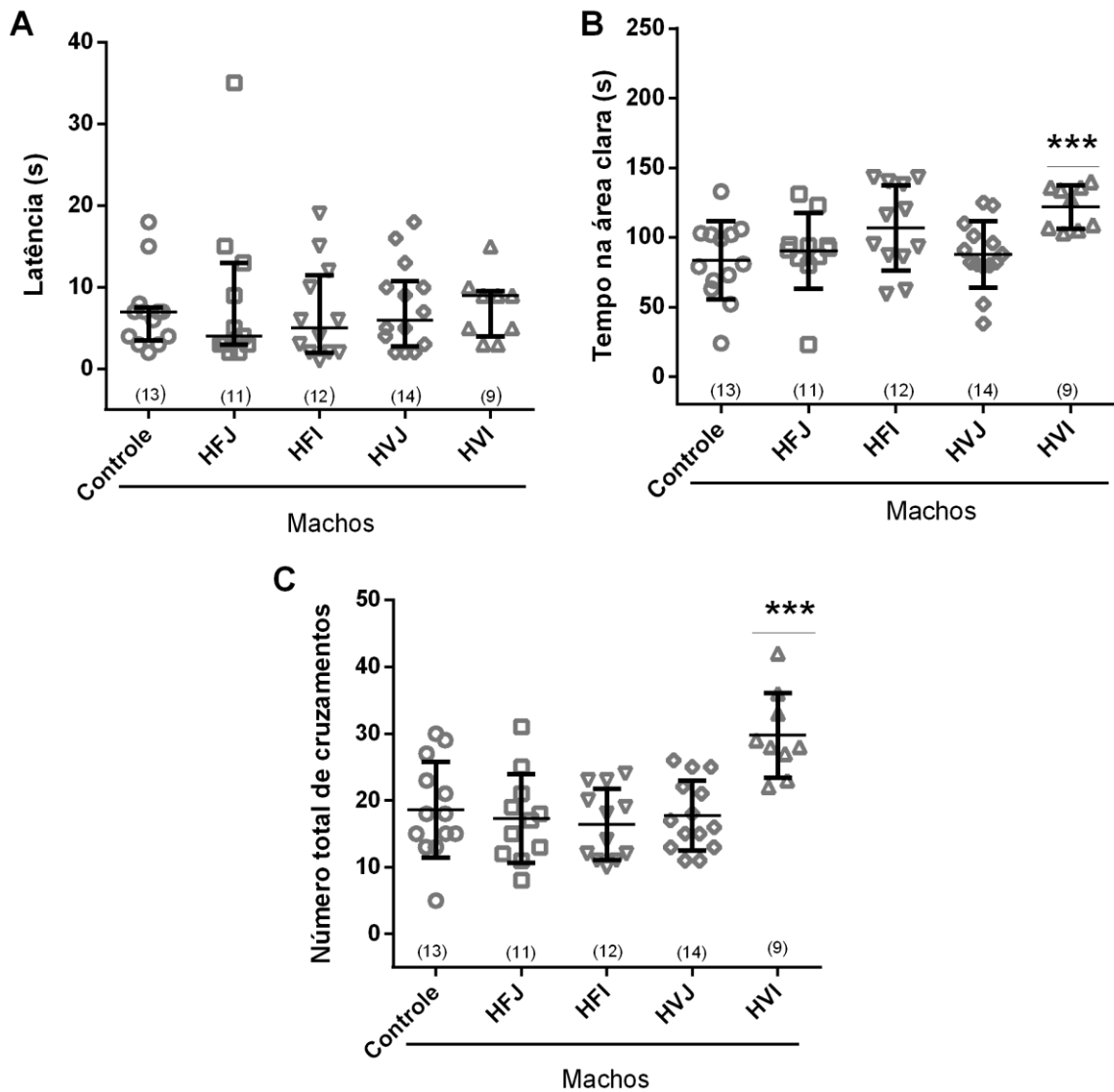


Figura 14 - Efeitos de diferentes protocolos de separação materna (HFJ; HFS; HVJ e HVS) no teste Caixa Claro-Escuro em camundongos C57/BL6 machos pré-púberes. Os camundongos machos do grupo HVI apresentaram aumento do tempo no claro (A) e do número total de cruzamentos (C). Nenhuma alteração na latência foi observada (A). Latência (dado não paramétrico) mostrada com mediana e interquartil. Tempo no claro e número de cruzamentos (dados paramétricos) mostrados com média e desvio padrão. O n amostral é indicado acima de seu respectivo grupo. Os asteriscos indicam dados que apresentaram diferença estatisticamente significativa, ($p < 0,05$). Foi realizado o teste estatístico One Way ANOVA em todos os parâmetros e o Holm-Sidak como posthoc. HFJ (Animais que foram separados da mãe em horário fixo juntos aos irmãos de ninhada); HFI (Animais que foram separados da mãe em horário fixo isolados dos irmãos de ninhada); HVJ (Animais que foram separados da mãe em horário variável juntos aos irmãos de ninhada); HVI (Animais que foram separados da mãe em horário variável isolados dos irmãos de ninhada).

Caixa Claro-Escuro (Fêmeas)

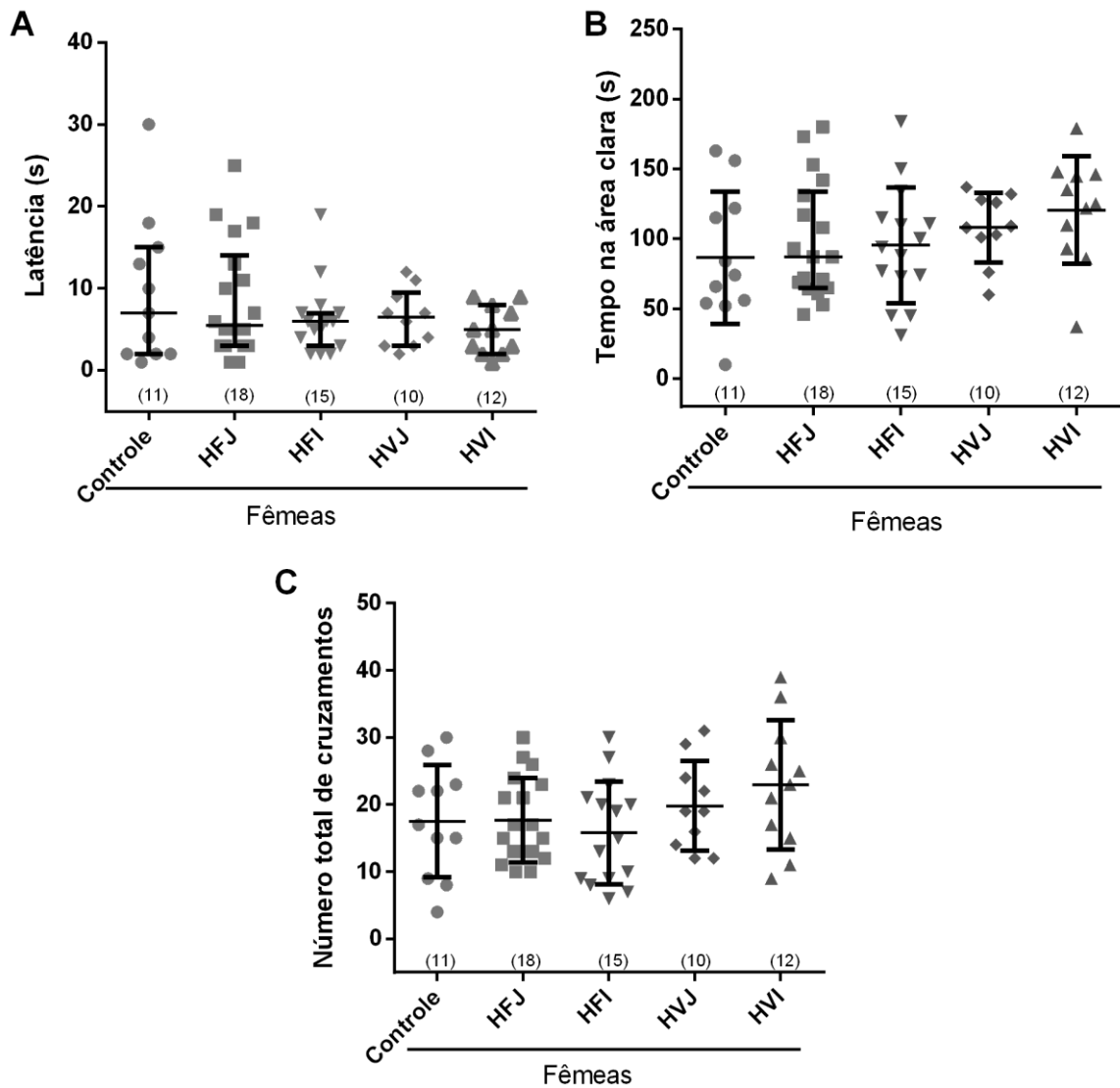
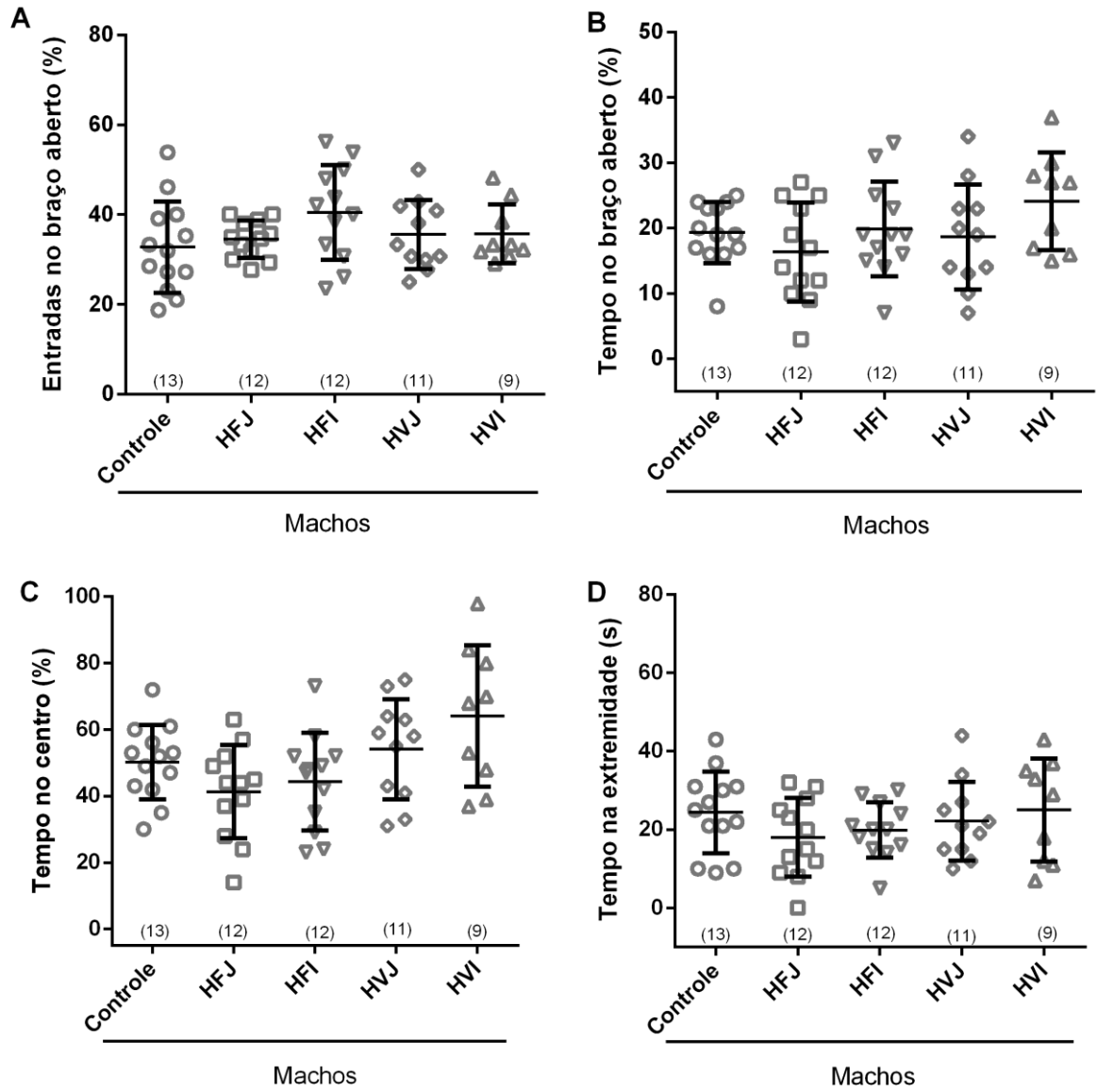


Figura 15 - Efeitos de diferentes protocolos de separação maternal (HFJ; HFS; HVJ e HVS) no teste Caixa Claro-Escuro em camundongos C57/BL6 fêmeas pré-púberes. Nenhuma alteração foi observada na latência; no tempo no claro e no número de cruzamentos (A, B, C). Latência (dado não paramétrico) e tempo no claro do grupo HFI (dado não paramétrico) mostrados com mediana e interquartil. Número de cruzamentos e tempo no claro dos grupos restantes (dados paramétricos) mostrados com média e desvio padrão. O n amostral é indicado acima de seu respectivo grupo. Foi realizado o teste estatístico One Way ANOVA em todos os parâmetros. HFJ (Animais que foram separados da mãe em horário fixo juntos aos irmãos de ninhada); HFI (Animais que foram separados da mãe em horário fixo isolados dos irmãos de ninhada); HVJ (Animais que foram separados da mãe em horário variável juntos aos irmãos de ninhada); HVI (Animais que foram separados da mãe em horário variável isolados dos irmãos de ninhada).

6.1.4 Labirinto em cruz elevado

Foi observado uma diminuição de 30% no número de stretching ($p = 0,004$; $T = 87,500$) dos machos do grupo HVJ e uma diminuição de 36% do número de groomings ($p = 0,039$; $T = 73,500$) dos machos do grupo HVI quando comparados ao grupo controle (Figuras 17G-H). Ainda, foi observado um aumento de 50% no número de dippings ($p=0,048$; $t=2,102$) e de 29% no tempo no centro das fêmeas do grupo HVI ($p = 0,018$; $t = -2,566$) quando comparadas ao grupo controle (Figuras 18C-F). Não foram observadas diferenças no número na % de entradas no braço aberto; número de rearings; número de dippings; tempo no centro e tempo na extremidade, nos machos (Figuras 17A-F) e nem na % entradas no braço aberto; tempo no braço aberto; número de rearings; número de stretchings; número de grooming e tempo na extremidade das fêmeas (18A-H).

Labirinto em Cruz Elevado (Machos)



Labirinto em Cruz Elevado (Machos)

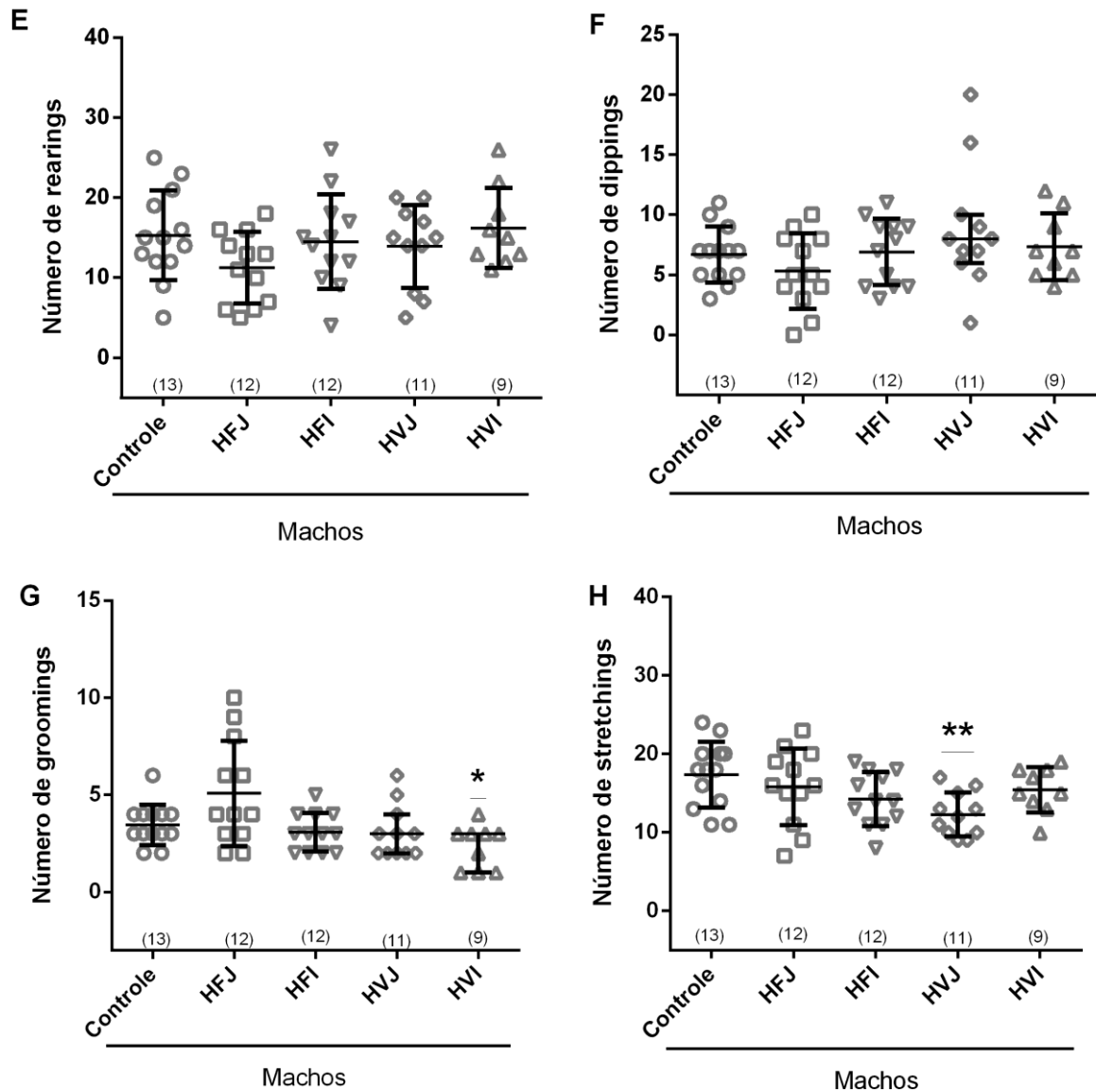
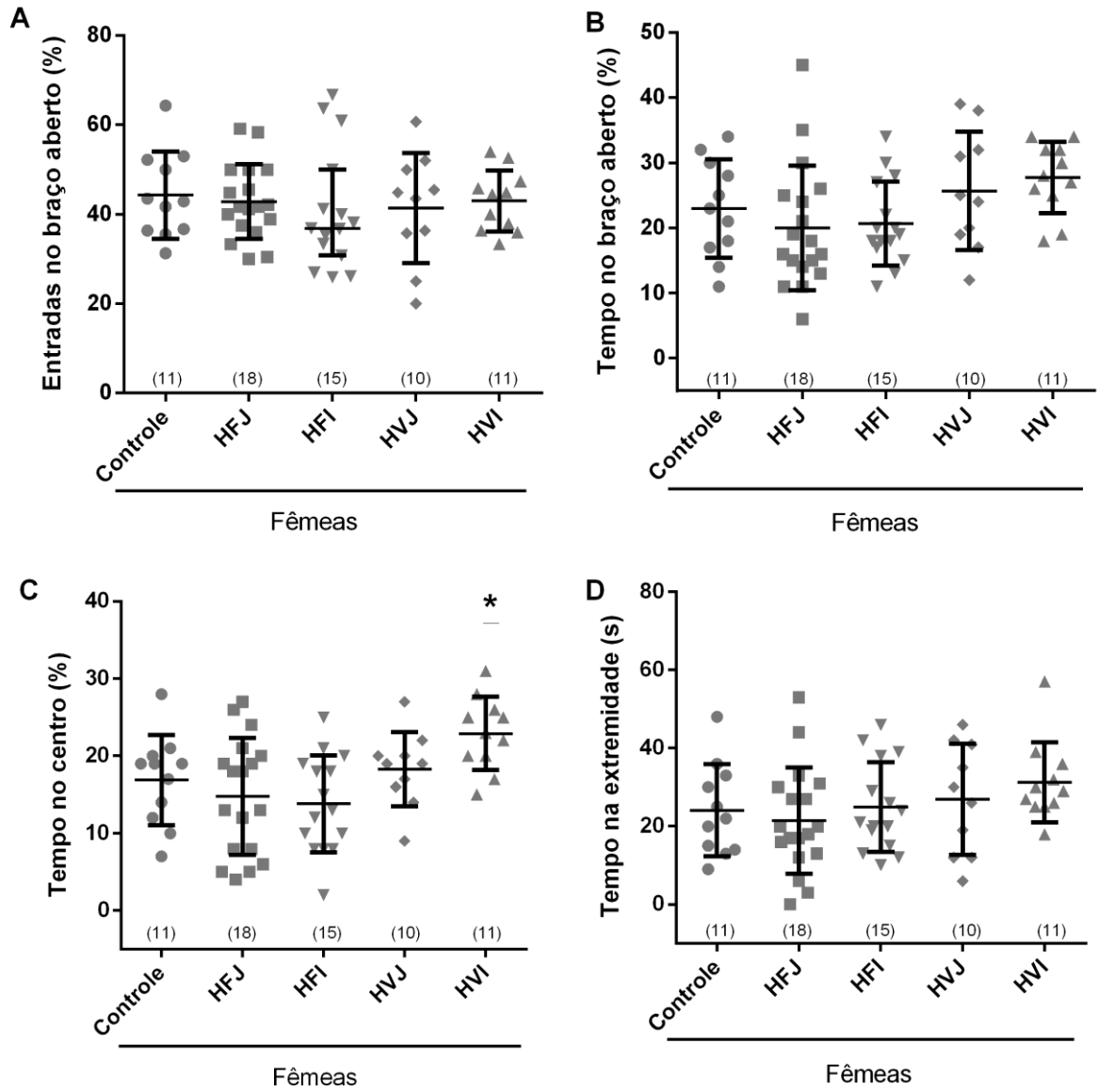


Figura 16 - Efeitos de diferentes protocolos de separação maternal (HFJ; HFS; HVJ e HVS) no teste de Labirinto em Cruz Elevado em camundongos C57/BL6 machos pré-púberes. Os camundongos machos do grupo HVJ apresentaram diminuição do número de stretching (H) e os machos do grupo HVI apresentaram uma diminuição do número de groomings (G). Nenhuma alteração foi observada nas entradas no braço aberto; tempo no braço aberto; tempo no centro; tempo na extremidade; número de rearings e dippings (A, B, C, D, E, F). Dados não paramétricos (dippings do grupo HVJ e grooming dos grupos HVJ e HVI) mostrados com mediana e interquartil e dados paramétricos (parâmetros restantes) mostrados com média e desvio padrão. O n amostral é indicado acima de seu respectivo grupo. Os asteriscos indicam dados que apresentaram diferença estatisticamente significativa, ($p < 0,05$). Foi realizado o teste estatístico One Way ANOVA em todos os parâmetros e o Holm-Sidak como posthoc. HFJ (Animais que foram separados da mãe em horário fixo juntos aos irmãos de ninhada); HFI (Animais

que foram separados da mãe em horário fixo isolados dos irmãos de ninhada); HVJ (Animais que foram separados da mãe em horário variável juntos aos irmãos de ninhada); HVI (Animais que foram separados da mãe em horário variável isolados dos irmãos de ninhada).

Labirinto em Cruz Elevado (Fêmeas)



Labirinto em Cruz Elevado (Fêmeas)

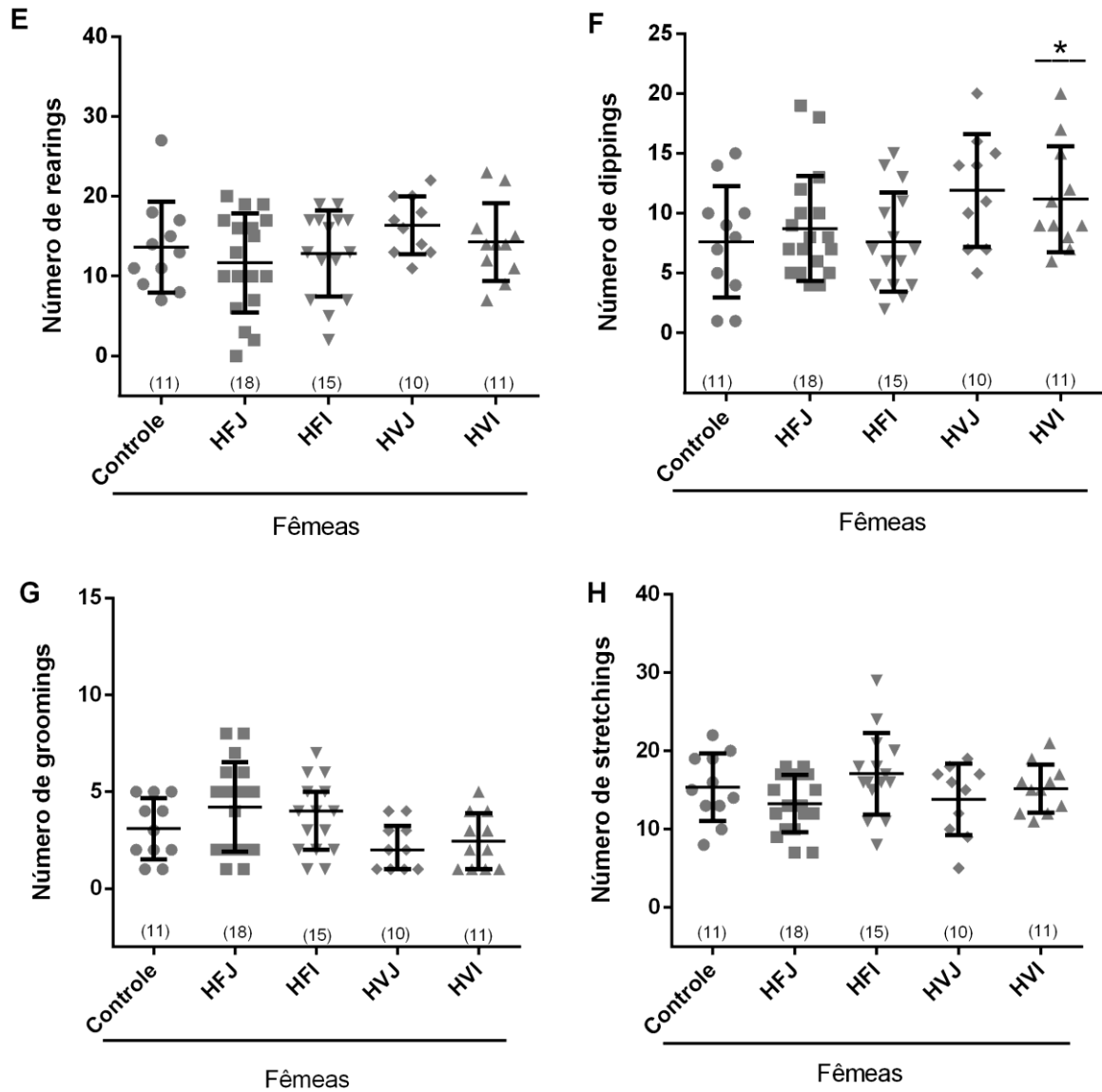


Figura 17 - Efeitos de diferentes protocolos de separação maternal (HFJ; HFS; HVJ e HVS) no teste de Labirinto em Cruz Elevado em camundongos C57/BL6 fêmeas pré-púberes. Os camundongos fêmeas do grupo HVI apresentaram aumento do tempo no centro (C) e do número de dippings (F). Nenhuma alteração foi observada nas entradas no braço aberto; tempo no braço aberto; tempo na extremidade; número de rearings; número de stretchings e número de groomings (A, B, D, E, G, H). Dados não paramétricos (entradas no braço aberto do grupo HFI e grooming dos grupos HFI e HVJ) mostrados com mediana e interquartil e dados paramétricos (parâmetros restantes) mostrados com média e desvio padrão. O n amostral é indicado acima de seu respectivo grupo. Os asteriscos indicam dados que apresentaram diferença estatisticamente significativa, ($p < 0,05$). Foi realizado o teste estatístico One Way ANOVA em todos os parâmetros e o Holm-Sidak como posthoc. HFJ (Animais que foram separados da mãe em horário fixo juntos aos irmãos de ninhada); HFI (Animais que foram separados da mãe em horário fixo isolados dos irmãos de ninhada); HVJ (Animais que foram separados da mãe em horário variável

juntos aos irmãos de ninhada); HVI (Animais que foram separados da mãe em horário variável isolados dos irmãos de ninhada).

6.1.5 Nado Forçado

Foram observados aumentos na frequência de climbing e no tempo de climbing em todos os grupos de separação maternal, comparados ao grupo controle, sendo elas, respectivamente, HFJ 50% ($p = 0,019$; $T = 170,500$) e 79% ($p = 0,010$; $t = -2,831$); HFI 47% ($p = 0,030$; $t = -2,324$) e 49% ($P = 0,029$; $t = -2,329$); HVJ 64% ($p = 0,030$; $t = -2,324$) e 70% ($p = 0,028$; $T = 115,000$); HVI 81% ($p = 0,001$; $t = -3,722$) e 88% ($p = 0,002$; $t = -3,577$) (Figura 19C-D). Também foi observado um aumento de 32% na latência de imobilidade ($p = 0,029$; $t = -2,366$) dos machos do grupo HVI e uma diminuição de 14% do tempo de nado ($p = 0,046$; $T = 185,000$) do grupo HFI (Figura 19 A-B). Além disso, foi observado uma diminuição de 18% do tempo de nado das fêmeas do grupo HFJ (Figura 20B). Não foram observadas diferenças no tempo de nado dos machos (19B) e na latência de imobilidade; frequência de climbing e tempo de climbing das fêmeas (20A-D).

Nado Forçado (Machos)

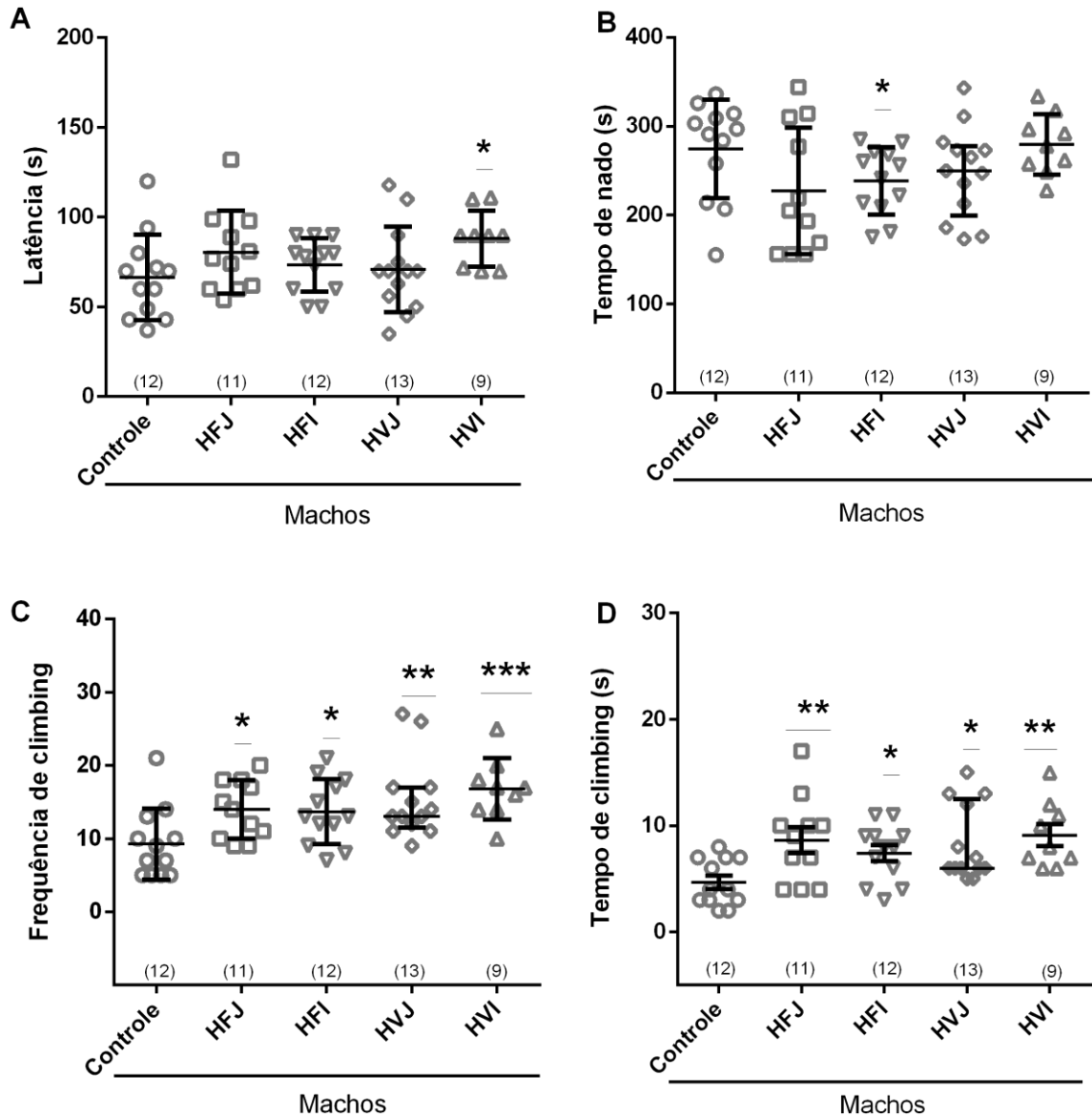


Figura 18 - Efeitos de diferentes protocolos de separação maternal (HFJ; HFS; HVJ e HVS) no teste Nado Forçado em camundongos C57/BL6 machos pré-púberes. Os camundongos machos de todos os grupos de separação maternal apresentaram aumento da frequência e do tempo de climbing (C e D). Os machos do grupo HVI apresentaram também aumento da latência de imobilidade e os machos do grupo HFI apresentaram diminuição do tempo de nado. Dados não paramétricos (tempo de nado; frequência de climbing e tempo de climbing do grupo HVJ) mostrados com mediana e interquartil e dados paramétricos (parâmetros restantes) mostrados com média e desvio padrão. O n amostral é indicado acima de seu respectivo grupo. Os asteriscos indicam dados que apresentaram diferença estatisticamente significativa, ($p < 0,05$). Foi realizado o teste estatístico One Way ANOVA em todos os parâmetros e o Holm-Sidak como posthoc. HFJ (Animais que foram separados da mãe em horário fixo juntos aos irmãos de ninhada); HFI (Animais que foram separados da mãe em horário fixo isolados dos irmãos

de ninhada); HVJ (Animais que foram separados da mãe em horário variável juntos aos irmãos de ninhada); HVI (Animais que foram separados da mãe em horário variável isolados dos irmãos de ninhada).

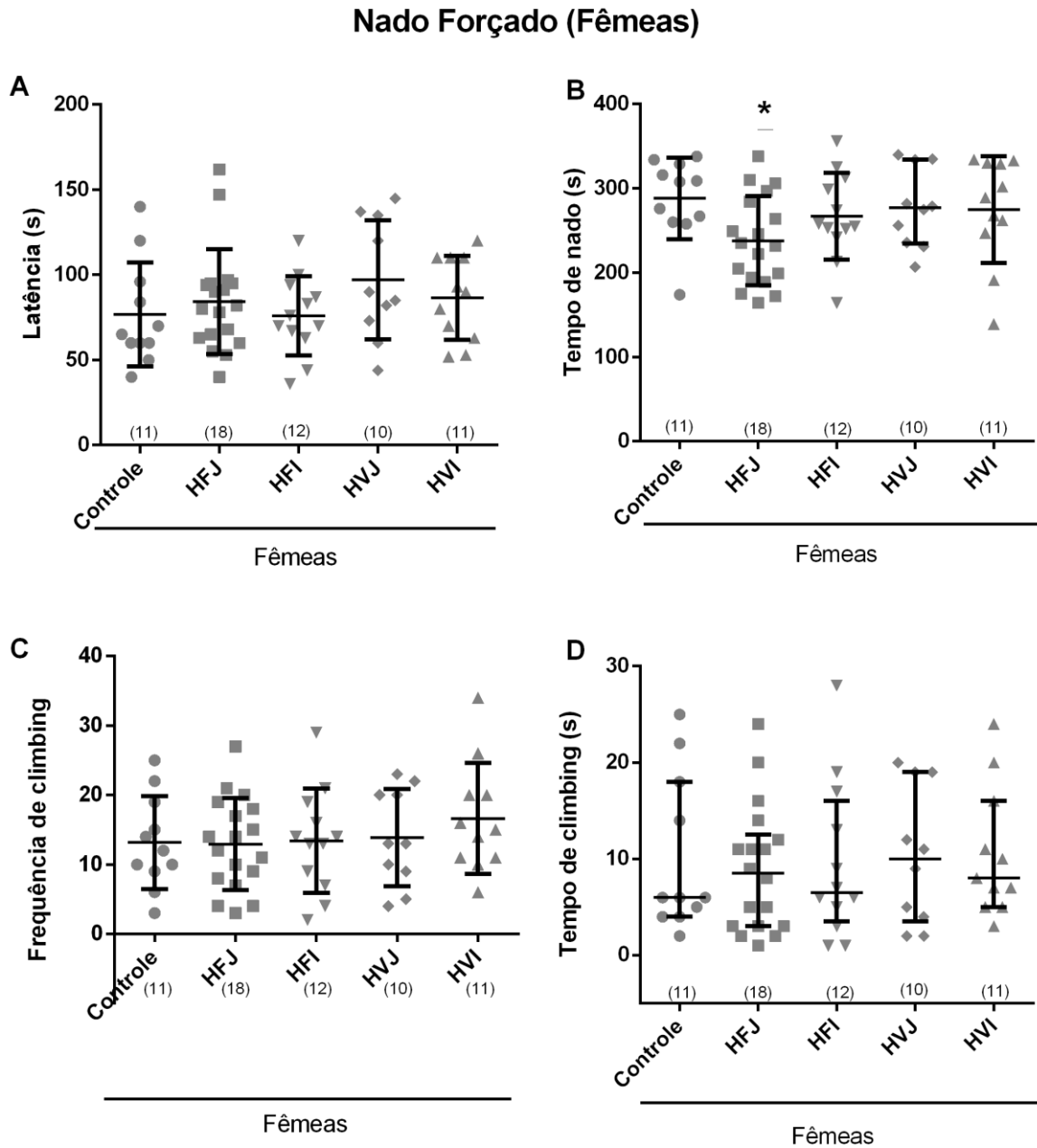


Figura 19 - Efeitos de diferentes protocolos de separação maternal (HFJ; HFS; HVJ e HVS) no teste Nado Forçado em camundongos C57/BL6 fêmeas pré-púberes. Os camundongos fêmeas do grupo HFJ apresentaram uma diminuição do tempo de nado. Não foi observado diferença na latência de imobilidade, na frequência e no tempo de climbing nas fêmeas. Dados não paramétricos (tempo de climbing de todos os grupos; tempo de nado do grupo HVJ e latência do grupo HFJ) mostrados com mediana e interquartil e dados paramétricos (parâmetros restantes) mostrados com média e desvio padrão. O n amostral é indicado acima de seu respectivo grupo. Os asteriscos indicam dados que apresentaram diferença estatisticamente significativa, ($p < 0,05$). Foi realizado o teste estatístico

One Way ANOVA em todos os parâmetros e o Holm-Sidak como posthoc. HFJ (Animais que foram separados da mãe em horário fixo juntos aos irmãos de ninhada); HFI (Animais que foram separados da mãe em horário fixo isolados dos irmãos de ninhada); HVJ (Animais que foram separados da mãe em horário variável juntos aos irmãos de ninhada); HVI (Animais que foram separados da mãe em horário variável isolados dos irmãos de ninhada).

6.2 INVESTIGAÇÃO SE DIFERENTES PROTOCOLOS DE ESTRESSE POR SEPARAÇÃO MATERNAL AFETAM O COMPORTAMENTO DE CAMUNDONGOS C57/BL6 PRÉ-PÚBERES DE FORMA DISTINTAS

6.2.1 Caixa de atividade

Foi observada diferença na distância total percorrida dos machos entre os grupos Horário Fixo Isolados e Horário Variável Isolados ($p= 0,0051$) (Figura 21A), ocasionada pelo fator horário ($p= 0,0194$), mas não pelo fator isolamento, havendo interação entre os fatores ($p = 0,0065$). Também foi possível notar diferença na velocidade média dos machos entre os grupos Horário Fixo Isolados e Horário Variável Isolados (Figura 21B), ocasionada pelo fator Horário ($p=0,0264$), mas não pelo fator Isolamento Físico, havendo Interação entre os fatores ($p=0,0054$). Ainda, foi observada diferença no número de rearings totais dos machos dos grupos Horário Fixo Isolados e Horário Variável Isolados ($p= 0,0214$) (Figura 21C), decorrida em razão da interação dos dois fatores ($p = 0,0089$), não havendo diferença dos fatores isolados. Nas fêmeas, não houve diferenças entre todos os parâmetros de todos grupos de separação maternal quando foram comparados entre si (HFJ; HFI; HVJ e HVI) (Figura 22A-C).

Caixa de Atividade Locomotora (Machos)

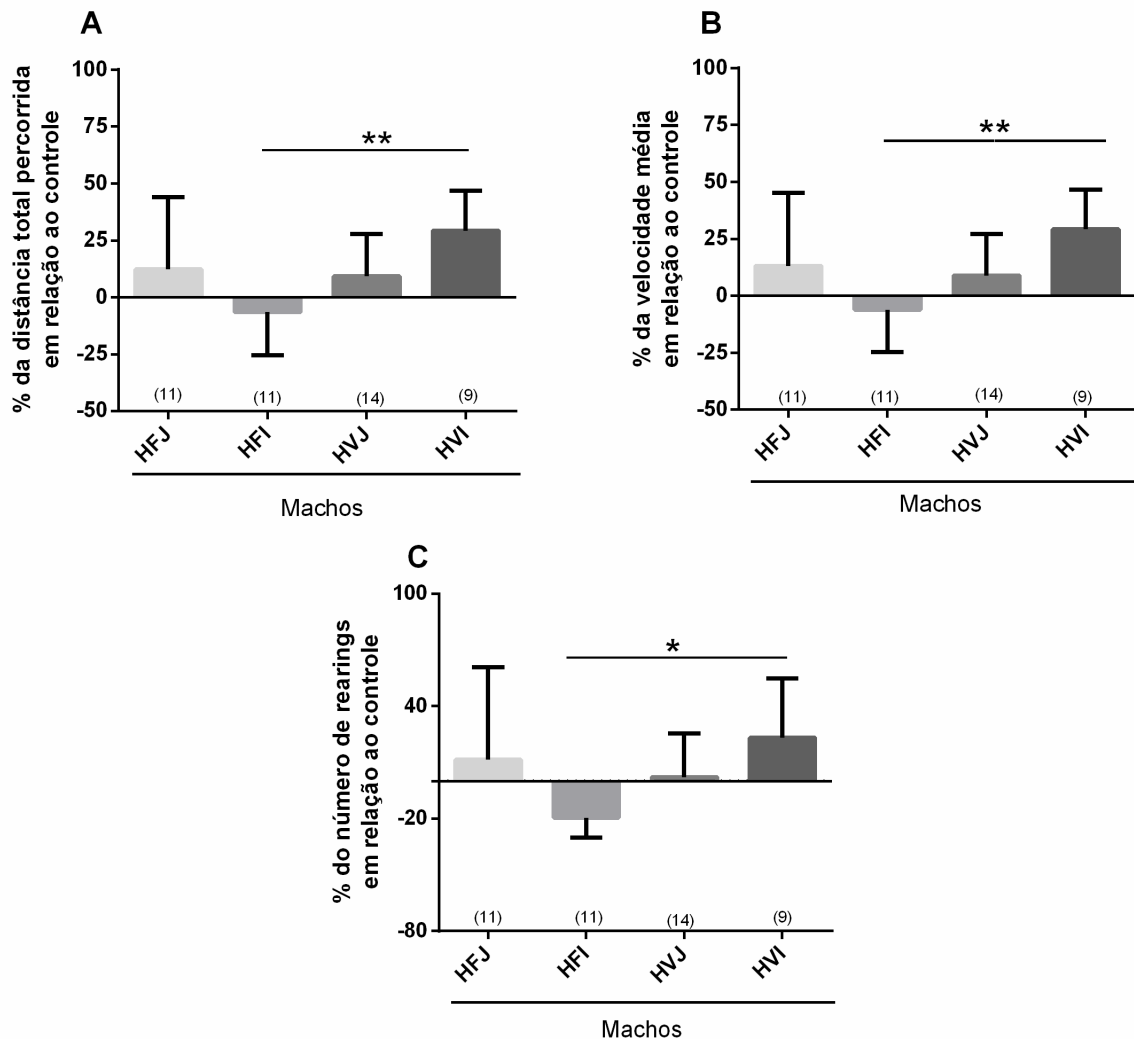


Figura 20 - Diferenças entre os protocolos de separação materna (HFJ; HFS; HVJ e HVS) no Teste de Caixa de Atividade Locomotora em camundongos C57/BL6 machos pré-púberes. Foi observada diferença entre os machos dos protocolos HFI X HVI nos parâmetros % de distância total percorrida em relação ao controle (A) e % de velocidade média em relação ao controle (B). Não foi verificada diferença na % de número de rearings em relação ao controle (C) entre os machos em todos os protocolos. Distância total percorrida (A); Velocidade média (B) e número de rearings (C) são dados paramétricos mostrados com média e desvio padrão. O n amostral é indicado acima de seu respectivo grupo. Os asteriscos indicam dados que apresentaram diferença estatisticamente significativa, ($p < 0,05$). Foi realizado o teste estatístico Two Way ANOVA em todos os parâmetros e o Tukey como posthoc. HFJ (Animais que foram separados da mãe em horário fixo juntos aos irmãos de ninhada); HFI (Animais que foram separados da mãe em horário fixo isolados dos irmãos de ninhada); HVJ (Animais que foram separados da mãe em horário variável juntos aos irmãos de ninhada); HVI (Animais que foram separados da mãe em horário variável isolados dos irmãos de ninhada).

Caixa de Atividade Locomotora (Fêmeas)

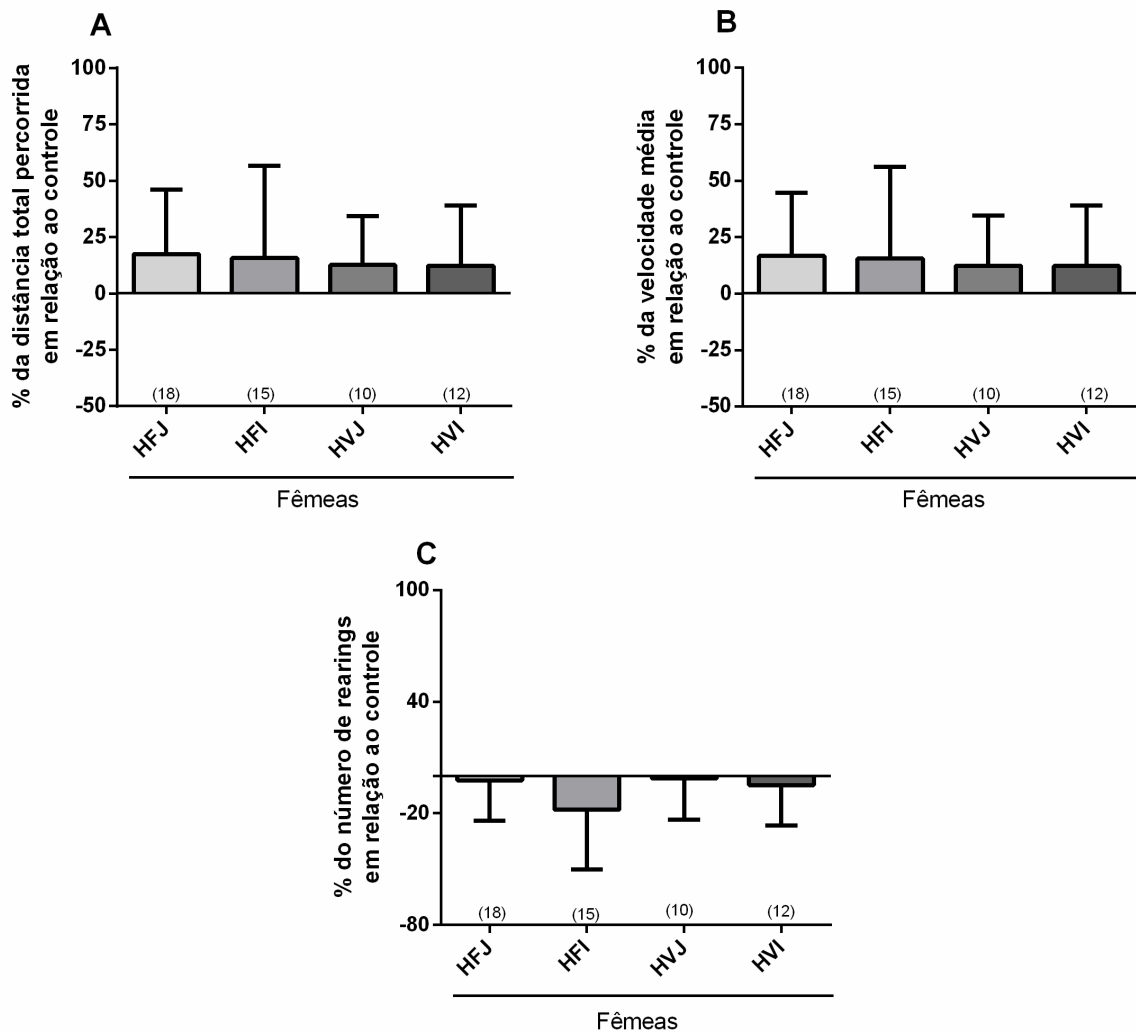


Figura 21 - Diferenças entre os protocolos de separação maternal (HFJ; HFS; HVJ e HVS) no Teste de Caixa de Atividade Locomotora em camundongos C57/BL6 fêmeas pré-púberes. Não foi verificada diferença na % da distância total percorrida em relação ao controle (A); % da velocidade média em relação ao controle (B) e na % do número de rearings em relação ao controle (C) entre as fêmeas em todos os protocolos. Distância total percorrida (A); Velocidade média (B) e número de rearings (C) são dados paramétricos mostrados com média e desvio padrão. O n amostral é indicado acima de seu respectivo grupo. Foi realizado o teste estatístico Two Way ANOVA em todos os parâmetros. HFJ (Animais que foram separados da mãe em horário fixo juntos aos irmãos de ninhada); HFI (Animais que foram separados da mãe em horário fixo isolados dos irmãos de ninhada); HVJ (Animais que foram separados da mãe em horário variável juntos aos irmãos de ninhada); HVI (Animais que foram separados da mãe em horário variável isolados dos irmãos de ninhada).

6.2.2 Campo Aberto

Foi identificado diferença nos números de cruzamentos na periferia dos machos entre os grupos Horário Variável Isolados e Horário Variável Juntos ($p= 0,0406$) (Figura 23C), sendo decorrente do fator Isolamento Físico ($p= 0,0316$), mas não do fator horário, não havendo interação entre os fatores. Também, foi observado diferença no número total de rearings entre os grupos Horário Fixo Juntos e Horário Fixo Isolados ($p= 0,0244$) (Figura 23B), ocasionada pelo Isolamento Físico ($p= 0,0100$), sem obter diferença no fator horário e na interação entre os fatores. Não foi observada diferenças entre machos dos grupos nos parâmetros tempo no centro e cruzamentos no centro (Figura 23A, D). Nas fêmeas, não foram observadas diferenças entre os protocolos de separação maternal em nenhum dos parâmetros avaliados (Figura 24A-D).

Campo Aberto (Machos)

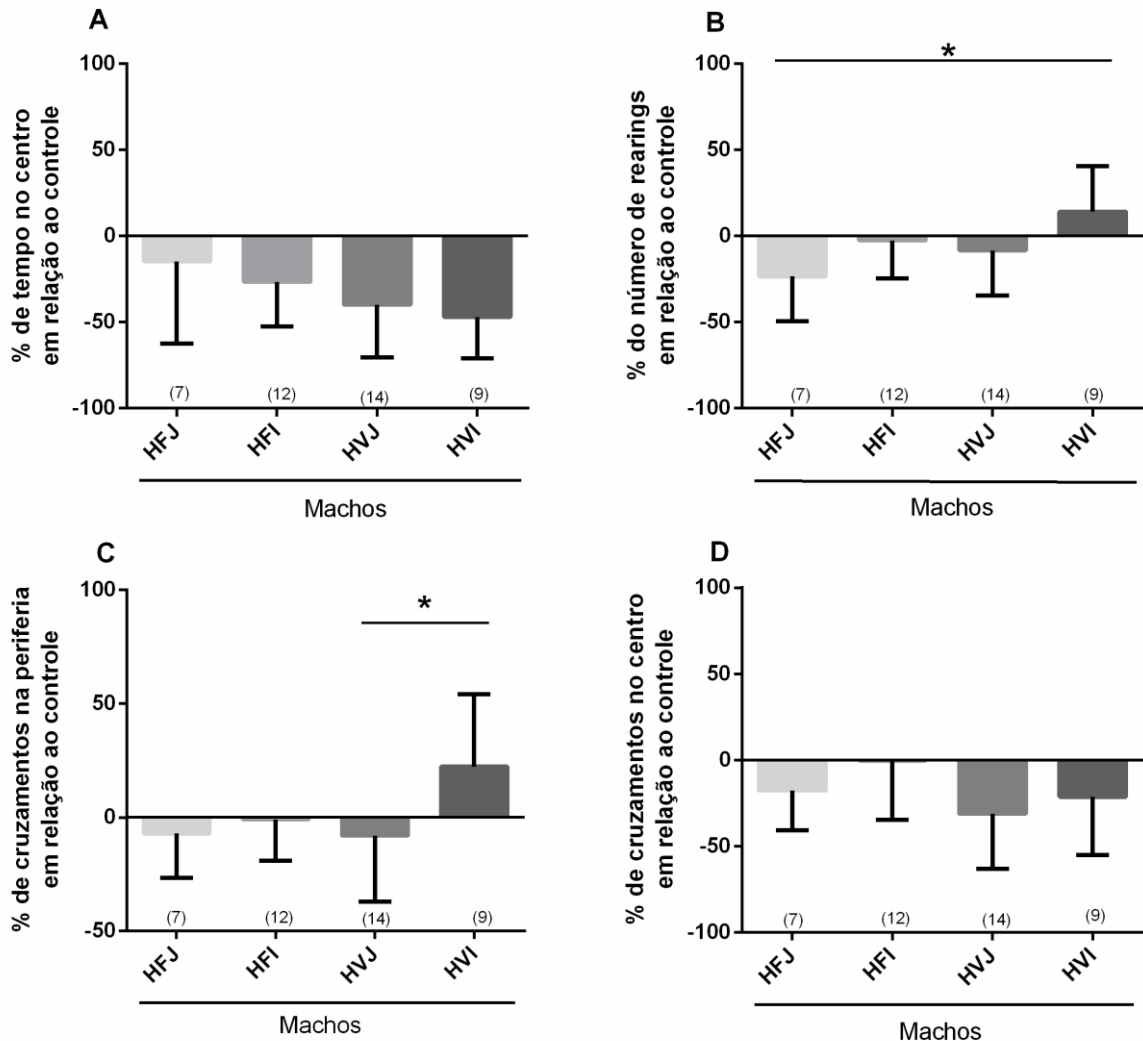


Figura 22 - Diferenças entre os protocolos de separação maternal (HFJ; HFS; HVJ e HVS) no Teste de Campo Aberto em camundongos C57/BL6 machos pré-púberes. Foi observada diferença entre os protocolos HFJ X HVI dos machos no parâmetro % de número de rearings em relação ao controle (B). Também entre os protocolos HVJ X HVI dos machos no parâmetro % de cruzamentos na periferia em relação ao controle (C). Não foi verificada diferença entre os protocolos em % de tempo no centro (A) e % de cruzamentos no centro em relação ao controle (D). Dados paramétricos mostrados com média e desvio padrão. O n amostral é indicado acima de seu respectivo grupo. Os asteriscos indicam dados que apresentaram diferença estatisticamente significativa, ($p < 0,05$). Foi realizado o teste estatístico Two Way ANOVA em todos os parâmetros e o Tukey como posthoc. HFJ (Animais que foram separados da mãe em horário fixo juntos aos irmãos de ninhada); HFI (Animais que foram separados da mãe em horário fixo isolados dos irmãos de ninhada); HVJ (Animais que foram separados da mãe em horário variável juntos aos irmãos de ninhada); HVI (Animais que foram separados da mãe em horário variável isolados dos irmãos de ninhada).

Campo Aberto (Fêmeas)

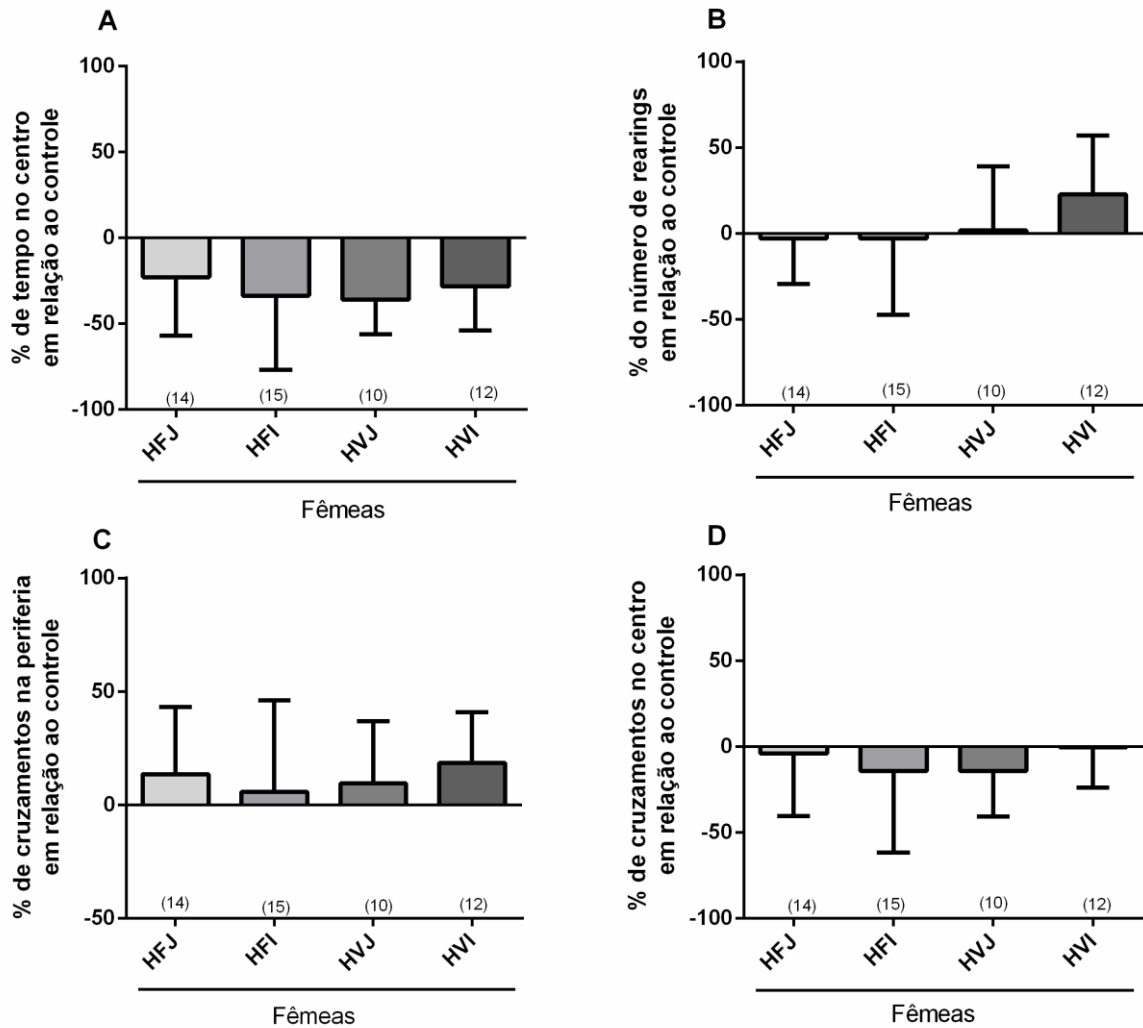


Figura 23 - Diferenças entre os protocolos de separação materna (HFJ; HFS; HVJ e HVS) no Teste de Campo Aberto em camundongos C57/BL6 fêmeas pré-púberes. Não foi verificada diferença entre os protocolos em nenhum dos parâmetros avaliados, sendo % de tempo no centro em relação ao controle (A); % do número de rearing em relação ao controle (B); % de cruzamentos na periferia em relação ao controle (C) e % de cruzamentos no centro em relação ao controle (D). Dados paramétricos mostrados com média e desvio padrão. O n amostral é indicado acima de seu respectivo grupo. Foi realizado o teste estatístico Two Way ANOVA em todos os parâmetros. HFJ (Animais que foram separados da mãe em horário fixo juntos aos irmãos de ninhada); HFI (Animais que foram separados da mãe em horário fixo isolados dos irmãos de ninhada); HVJ (Animais que foram separados da mãe em horário variável juntos aos irmãos de ninhada); HVI (Animais que foram separados da mãe em horário variável isolados dos irmãos de ninhada).

6.2.3 Caixa Claro-Escuro

Foi observada diferença no tempo no claro entre os machos dos grupos Horário Fixo Juntos x Horário Variável Isolados (0,0411) e Horário Variável Juntos x Horário Variável Isolados ($p=0,0155$) (Figura 25 B), sendo ocasionada pelo fator Isolamento Físico ($p= 0,0018$), sem ter influência do fator horário e da interação entre os fatores. Ainda, foi verificada diferença no número total de cruzamento entre os machos dos grupos Horário Fixo Juntos x Horário Variável Isolados ($p=0,0001$); Horário Variável Juntos x Horário Variável Isolados ($p=0,0001$) e Horário Fixo Isolados x Horário Variável Isolados ($p< 0,0001$) (Figura 25C), ocasionada pelo fator Horário ($p= 0,0003$) e pelo fator Isolamento Físico ($p = 0,0025$), também houve Interação entre os fatores ($p= 0,0006$). Não foi observada diferença na latência entre nos machos em todos os grupos. Por fim, também não foi observado diferença entre os grupos nas fêmeas (Figura 26A-C).

Caixa Claro-Escuro (Machos)

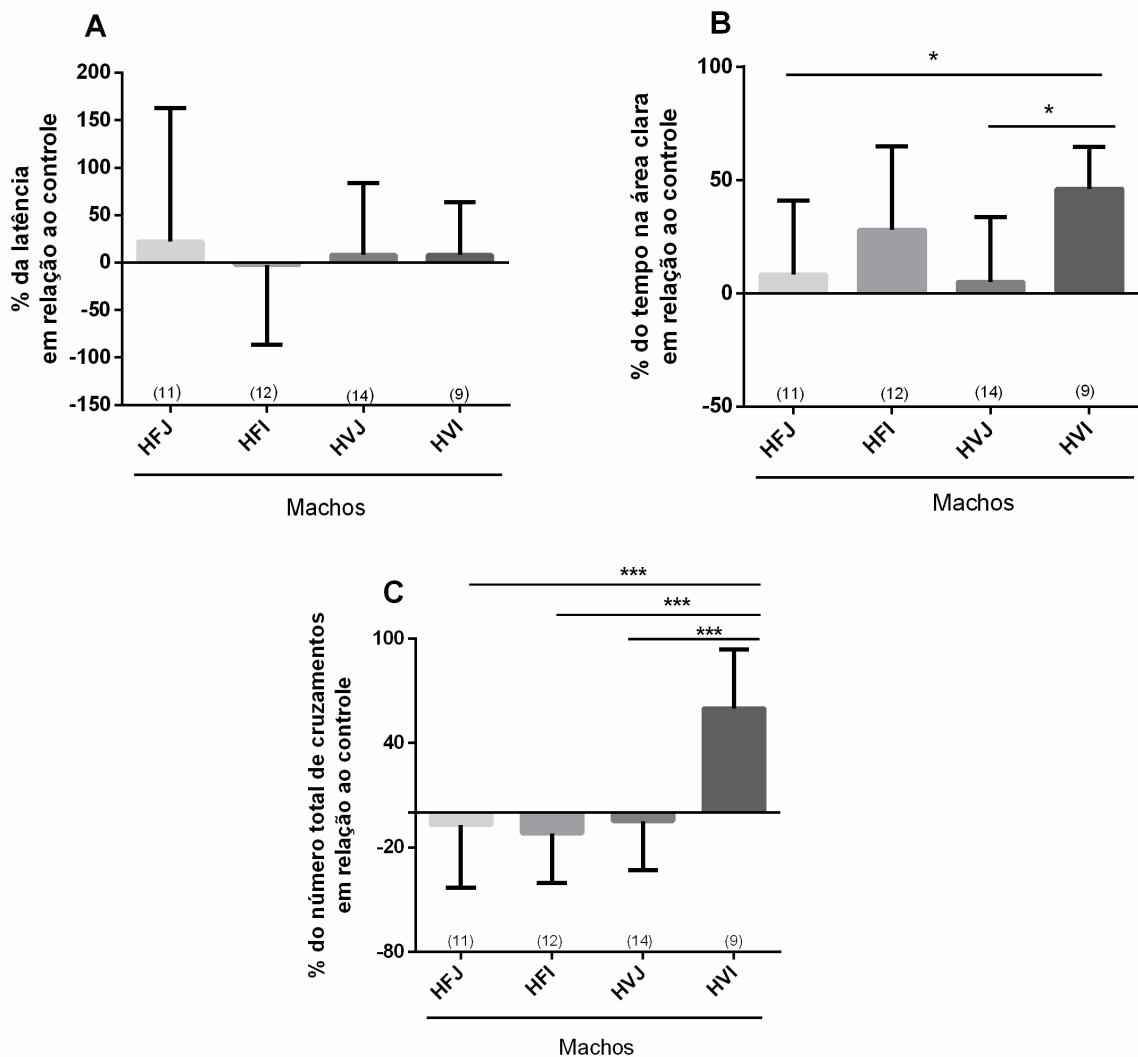


Figura 24 - Diferenças entre os protocolos de separação materna (HFJ; HFS; HVJ e HVS) na caixa claro-escuro em camundongos C57/BL6 machos pré-púberes. Foi observada diferença entre os protocolos HVI X HFJ e HVI X HVJ dos machos no parâmetro % do tempo na área clara em relação ao grupo controle (B), também entre os protocolos HVI X HFJ; HVI X HFI; HVIXHVJ dos machos no parâmetro % do número total de cruzamentos em relação ao grupo controle. Não foi verificada diferença entre os protocolos em % da latência em relação ao controle (A). Dados paramétricos mostrados com média e desvio padrão. O n amostral é indicado acima de seu respectivo grupo. Os asteriscos indicam dados que apresentaram diferença estatisticamente significativa, ($p < 0,05$). Foi realizado o teste estatístico Two Way ANOVA em todos os parâmetros e o Tukey como posthoc. HFJ (Animais que foram separados da mãe em horário fixo juntos aos irmãos de ninhada); HFI (Animais que foram separados da mãe em horário fixo isolados dos irmãos de ninhada); HVJ (Animais que foram separados da mãe em horário variável juntos aos irmãos de ninhada); HVI (Animais que foram separados da mãe em horário variável isolados dos irmãos de ninhada).

Caixa Claro-Escuro (Fêmeas)

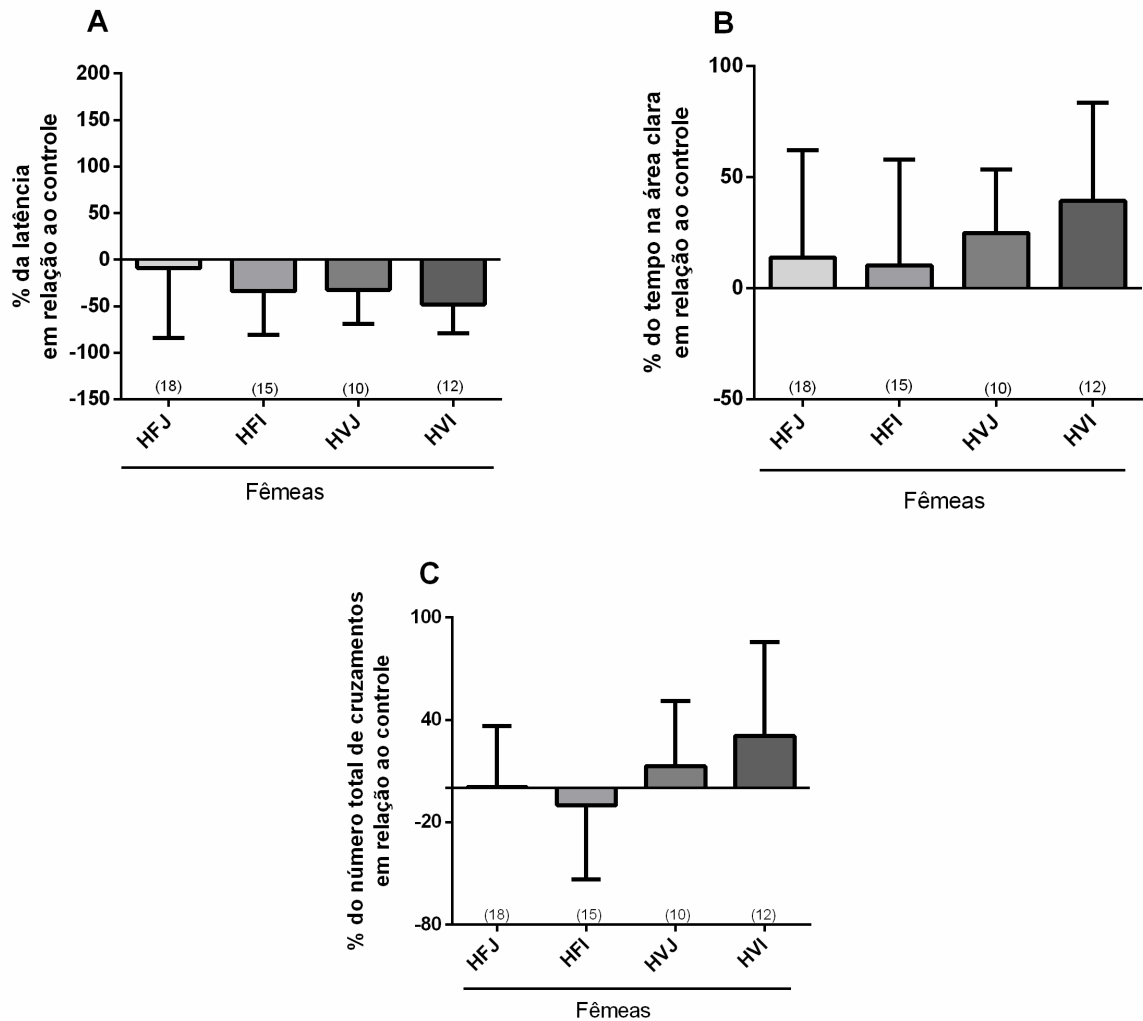
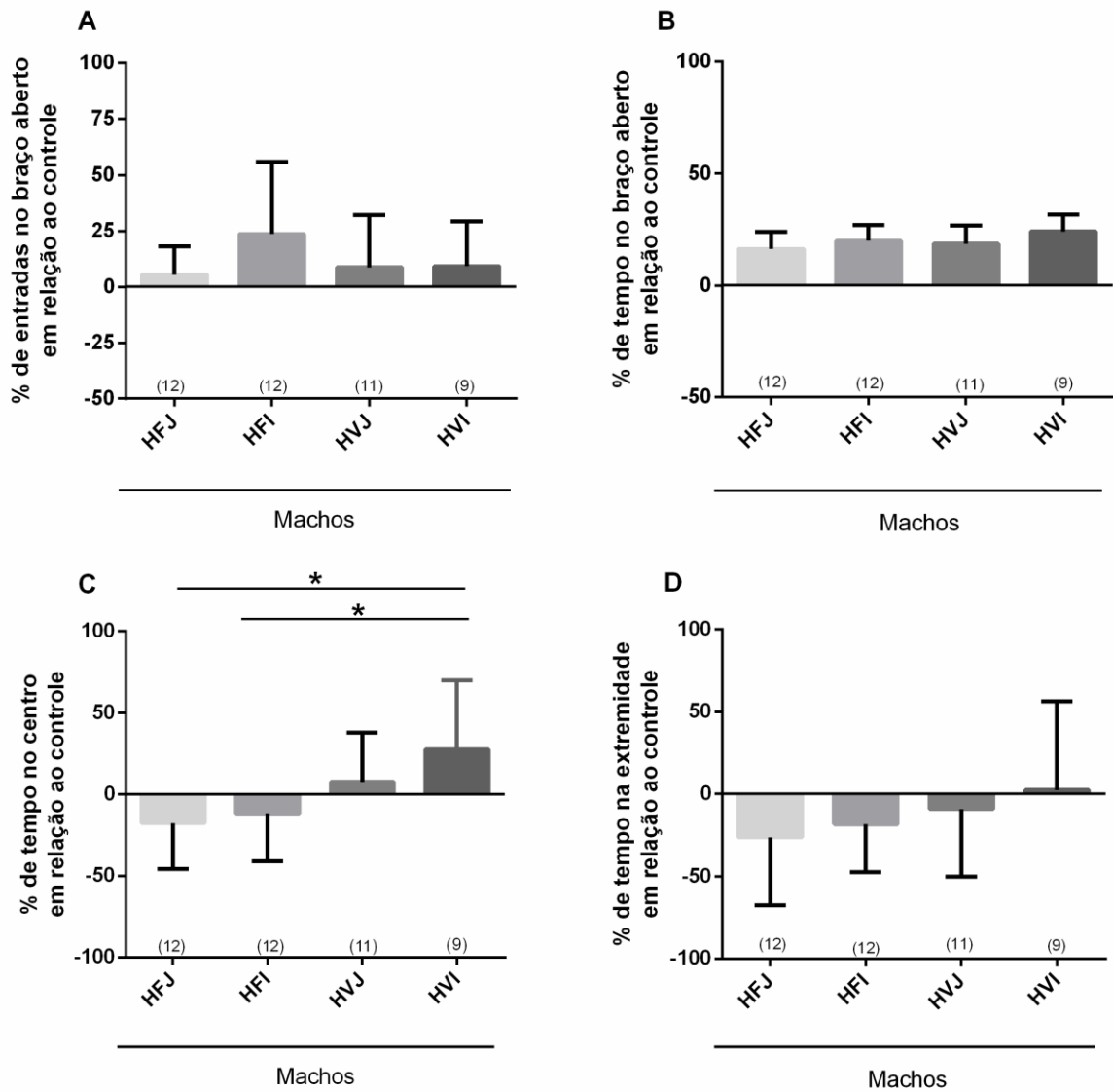


Figura 25 - Diferenças entre os protocolos de separação materna (HFJ; HFS; HVJ e HVS) na caixa claro-escuro em C57/BL6 fêmeas pré-púberes. Não foi verificada diferença entre os protocolos em % da latência em relação ao controle (A); % de tempo na área clara em relação ao grupo controle (B); % de cruzamentos totais em relação ao grupo controle (C). Dados paramétricos mostrados com média e desvio padrão. O n amostral é indicado acima de seu respectivo grupo. Foi realizado o teste estatístico Two Way ANOVA em todos os parâmetros. HFJ (Animais que foram separados da mãe em horário fixo juntos aos irmãos de ninhada); HFI (Animais que foram separados da mãe em horário fixo isolados dos irmãos de ninhada); HVJ (Animais que foram separados da mãe em horário variável juntos aos irmãos de ninhada); HVI (Animais que foram separados da mãe em horário variável isolados dos irmãos de ninhada).

6.2.4 Labirinto em Cruz Elevado

Foi observado diferença no tempo no centro entre os machos nos grupos Horário Fixo Juntos x Horário Variado Isolados ($p= 0,0137$); Horário Fixo Isolados x Horário Variável Isolados ($p= 0,0395$) (Figura 27C), sendo ocasionada devido ao fator Horário ($p= 0,0019$), mas não ao isolamento físico e à interação. Ainda, foi notado também diferença no número de grooming entre os machos nos grupos Horário Fixo Juntos x Horário Variável Juntos ($p= 0,0427$); Horário Fixo Juntos x Horário Fixo Isolados ($p= 0,0359$) e Horário Fixo Juntos x Horário Variável Isolados ($p=0,0048$) (Figura 27G), devida aos fatores Horário ($p=0,0130$) e Isolamento Físico ($p=0,0126$), não havendo interação entre os dois fatores. Houve diferença entre o número de groomings entre as fêmeas nos grupos Horário Fixo juntos x Horário Variável Juntos ($p=0,0407$) (Figura 28G), sendo em razão do fator horário ($p=0,0033$), mas não devido ao fator isolamento físico e à interação entre os fatores. Foi percebido também diferença no tempo no centro entre as fêmeas nos grupos Horário Fixo Juntos x Horário Variável Isolados ($p=0,0079$) e Horário Fixo Separados x Horário Variável Isolados ($p= 0,0035$) (Figura 28C), devida ao fator Horário ($p=0,0007$), mas não ao fator isolamento físico e à interação entre os fatores. Não foram observadas diferenças entre os protocolos nos parâmetros: % de entradas no braço aberto; tempo no braço aberto; número de rearings; dippings; stretchings; e tempo na extremidade (A, B, D, E, F, H).

Labirinto em Cruz Elevado (Machos)



Labirinto em Cruz Elevado (Machos)

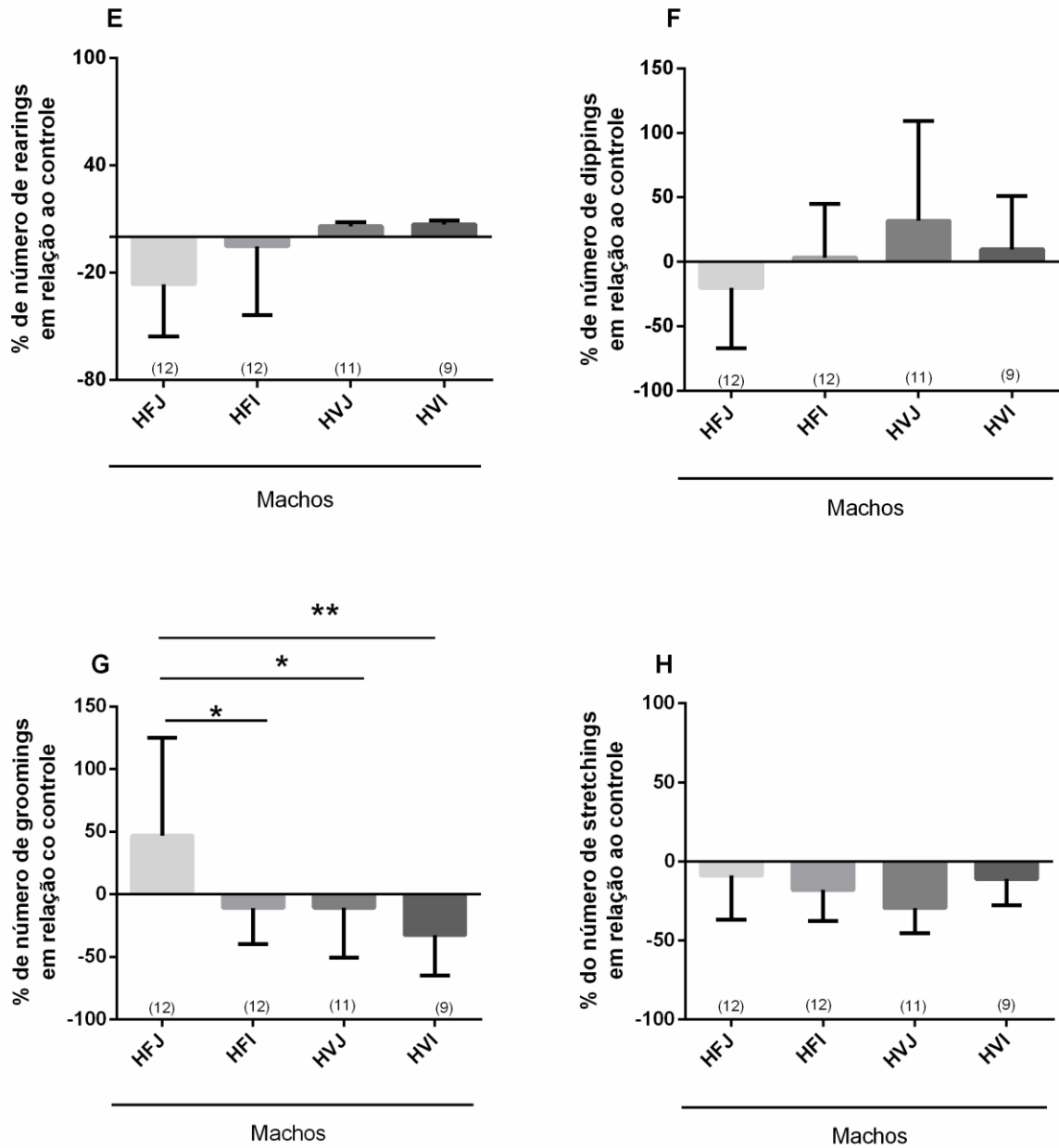
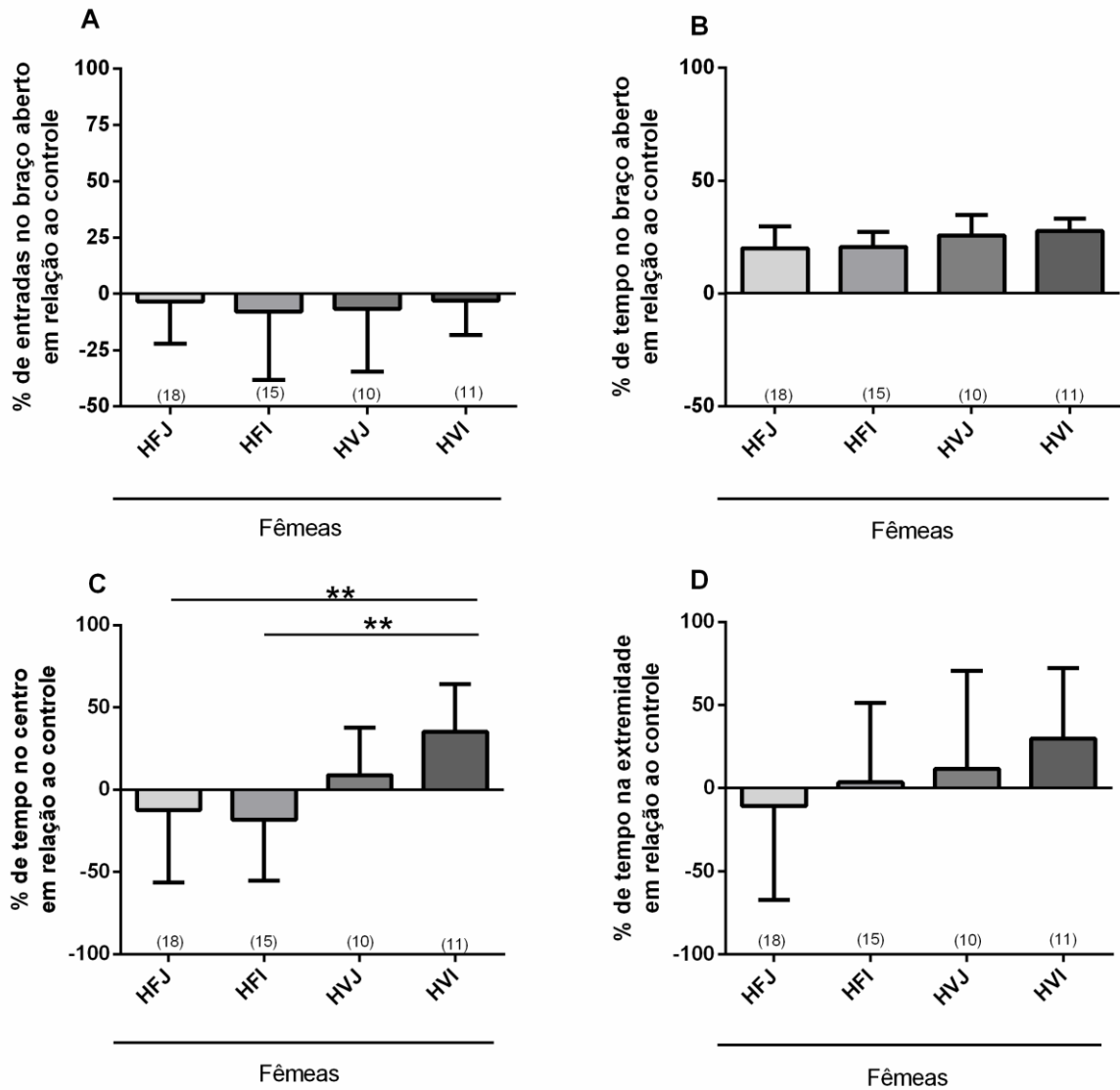


Figura 26- Diferenças entre os protocolos de separação materna (HFJ; HFS; HVJ e HVS) no teste de labirinto em cruz elevado em camundongos C57/BL6 machos pré-púberes. Foi observada diferença entre os protocolos HVI X HFJ e HVI X HFI dos machos no parâmetro % do tempo no centro em relação ao grupo controle (C), também entre os protocolos HFJ X HFI; HFJ X HVJ; HFJ X HVI dos machos no parâmetro % de números de grooming em relação ao controle (G). Não foi verificada diferença entre os protocolos em % de entradas no braço aberto em relação ao controle; % de tempo no braço aberto em relação ao controle; % de tempo na extremidade em relação ao controle; % de número de rearings em relação ao controle; % de número de dippings em relação ao controle; % de número de stretchings em relação ao controle (A, B, D, E, F, H). Dados paramétricos mostrados com média e desvio padrão. O n amostral é indicado acima de seu respectivo grupo. Os asteriscos indicam dados

que apresentaram diferença estatisticamente significativa, ($p < 0,05$). Foi realizado o teste estatístico Two Way ANOVA em todos os parâmetros e o Tukey como posthoc. HFJ (Animais que foram separados da mãe em horário fixo juntos aos irmãos de ninhada); HFI (Animais que foram separados da mãe em horário fixo isolados dos irmãos de ninhada); HVJ (Animais que foram separados da mãe em horário variável juntos aos irmãos de ninhada); HVI (Animais que foram separados da mãe em horário variável isolados dos irmãos de ninhada).

Labirinto em Cruz Elevado (Fêmeas)



Labirinto em Cruz Elevado (Fêmeas)

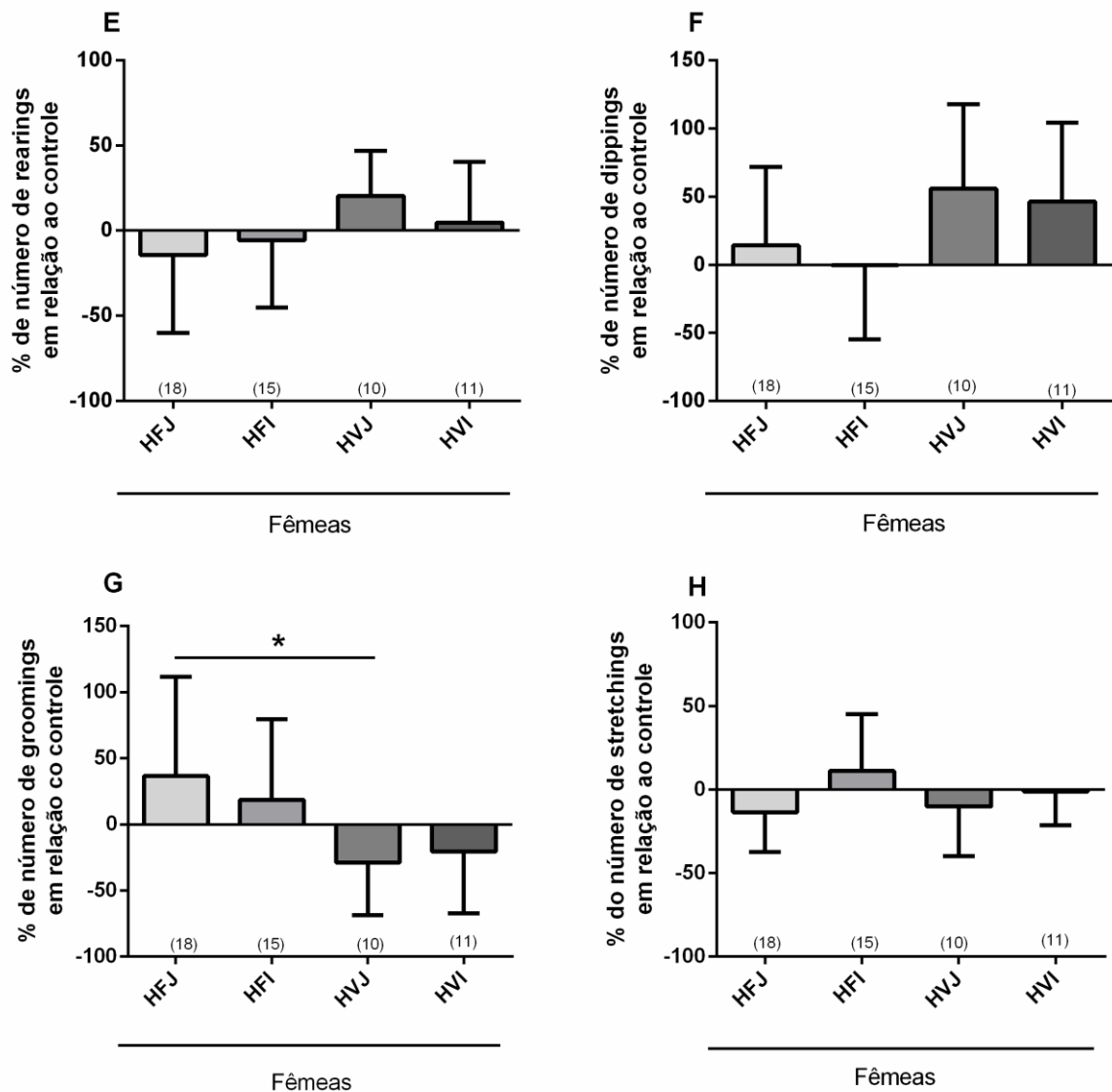


Figura 27 - Diferenças entre os protocolos de separação materna (HFJ; HFS; HVJ e HVS) no teste de labirinto em cruz elevado em camundongos C57/BL6 fêmeas pré-púberes. Foi observada diferença entre os protocolos HVI X HFJ e HVI X HFI das fêmeas no parâmetro % do tempo no centro em relação ao grupo controle (C), também entre os protocolos HFJ X HVJ no parâmetro % de números de grooming em relação ao controle (G). Não foi verificada diferença entre os protocolos em % de entradas no braço aberto em relação ao controle; % de tempo no braço aberto em relação ao controle; % de tempo na extremidade em relação ao controle; % de número de rearings em relação ao controle; % de número de dippings em relação ao controle; % de número de stretchings em relação ao controle (A, B, D, E, F, H). Dados paramétricos mostrados com média e desvio padrão. O n amostral é indicado acima de seu respectivo grupo. Os asteriscos indicam dados que apresentaram diferença estatisticamente significativa, ($p < 0,05$). Foi realizado o teste estatístico Two Way ANOVA em todos os parâmetros e o Tukey como posthoc. HFJ (Animais que foram separados da mãe em horário fixo juntos aos irmãos de ninhada); HFI

(Animais que foram separados da mãe em horário fixo isolados dos irmãos de ninhada); HVJ (Animais que foram separados da mãe em horário variável juntos aos irmãos de ninhada); HVI (Animais que foram separados da mãe em horário variável isolados dos irmãos de ninhada).

6.2.5 Nado Forçado

Não foram observadas diferenças entre os protocolos ((HFJ; HFI; HVJ e HVI), quando todos os parâmetros analisados foram comparados entre si, sendo eles Latência; Tempo de Nado, Frequência de Climbing e Duração de Climbing (Figura 29 e 30).

Nado Forçado (Machos)

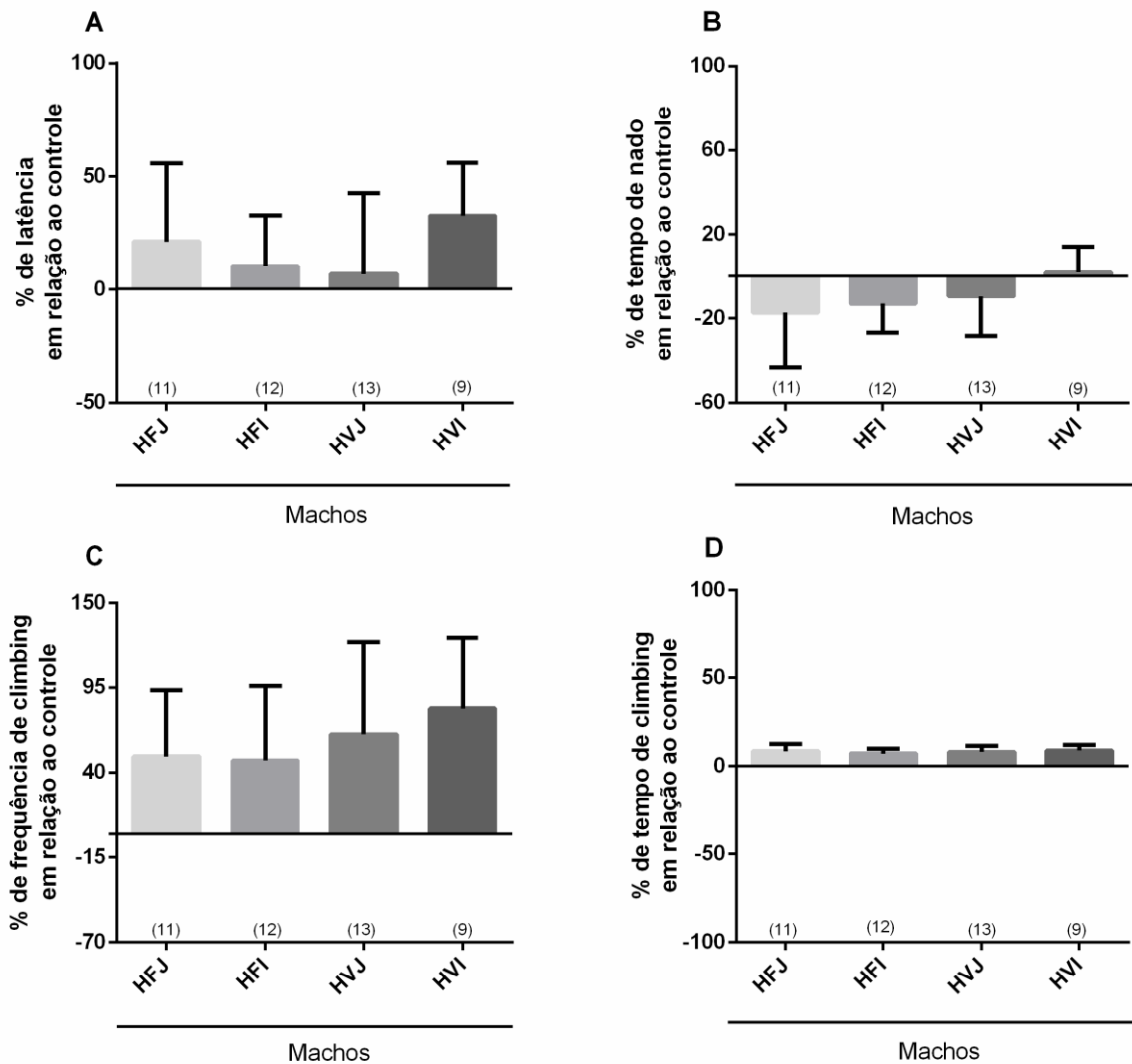


Figura 28 - Diferenças entre os protocolos de separação maternal (HFJ; HFS; HVJ e HVS) no teste de nado forçado em camundongos C57/BL6 machos pré-púberes. Não foi verificada diferença entre os protocolos em % de latência em relação ao controle (A); % de tempo de nado em relação ao controle (B); % de frequência de climbing em relação ao controle (C) e % de tempo de climbing em relação ao controle (D). Dados paramétricos mostrados com média e desvio padrão. O n amostral é indicado acima de seu respectivo grupo. Foi realizado o teste estatístico Two Way ANOVA em todos os parâmetros. HFJ (Animais que foram separados da mãe em horário fixo juntos aos irmãos de ninhada); HFI (Animais que foram separados da mãe em horário fixo isolados dos irmãos de ninhada); HVJ (Animais que foram separados da mãe em horário variável juntos aos irmãos de ninhada); HVI (Animais que foram separados da mãe em horário variável isolados dos irmãos de ninhada).

Nado Forçado (Fêmeas)

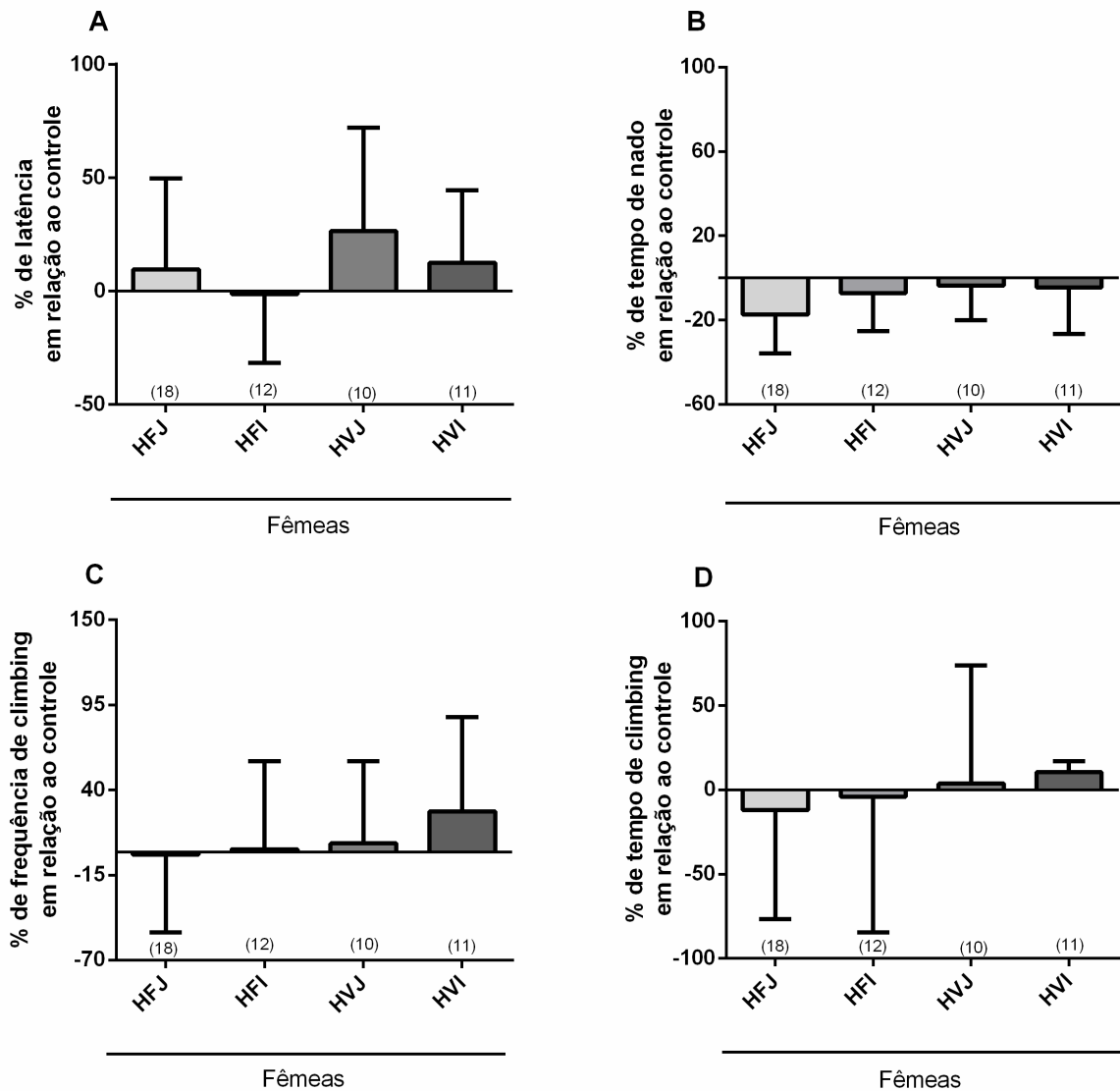


Figura 29 - Diferenças entre os protocolos de separação maternal (HFJ; HFS; HVJ e HVS) no teste de nado forçado em camundongos C57/BL6 fêmeas pré-púberes. Não foi verificada diferença entre os protocolos em % de latência em relação ao controle (A); % de tempo de nado em relação ao controle (B); % de frequência de climbing em relação ao controle (C) e % de tempo de climbing em relação ao controle (D). Dados paramétricos mostrados com média e desvio padrão. O n amostral é indicado acima de seu respectivo grupo. Foi realizado o teste estatístico Two Way ANOVA em todos os parâmetros. HFJ (Animais que foram separados da mãe em horário fixo juntos aos irmãos de ninhada); HFI (Animais que foram separados da mãe em horário fixo isolados dos irmãos de ninhada); HVJ (Animais que foram separados da mãe em horário variável juntos aos irmãos de ninhada); HVI (Animais que foram separados da mãe em horário variável isolados dos irmãos de ninhada).

7. DISCUSSÃO

| | | Grupos de Separação Maternal (Machos) | | | |
|----------------------------|---------------------------|---|--|--|---|
| | | HFJ | HFI | HVJ | HVI |
| T e s t e s | C.A.L. | | | | ↑ Distância Total Percorrida ↑ Velocidade Média |
| | Campo-Aberto | | | ↓ Tempo no Centro ↓ Nº de Cruzamentos no Centro | ↓ Tempo no Centro |
| | Caixa Claro-Escuro | | | | ↑ Tempo no Claro ↑ Frequência de Cruzamento |
| | Labirinto em Cruz Elevado | | | ↓ Stretchings | ↓ Grooming |
| | Nado Forçado | ↑ Frequência de Climbing ↑ Tempo de Climbing | ↑ Frequência de Climbing ↑ Tempo de Climbing ↓ Tempo de Nado | ↑ Frequência de Climbing ↑ Tempo de Climbing | ↑ Frequência de Climbing ↑ Tempo de Climbing ↑ Latência de Nado |

Figura 30 - Parâmetros alterados, em machos, em cada protocolo de Separação Maternal

Com esses experimentos foi possível observar que os protocolos de separação maternal alteram o comportamento dos animais de forma distinta, sendo o protocolo **HVI** o responsável pelo maior número de alterações. Diante disso, será que os protocolos de separação maternal exercem tipos de estresse diferentes? Ou é a intensidade do estresse que varia? Como já foi mencionado, o risco de desenvolver certos distúrbios mentais pode ser influenciado de forma diferente por subtipos específicos de experiências (abuso físico, sexual e emocional, bem como negligência física e emocional) (GERKE *et al.*, 2018). O abuso físico, por exemplo, é associado a transtornos de humor, enquanto o abuso emocional está relacionado à ocorrência de transtornos de personalidade e esquizofrenia (CARR *et al.*, 2013). Então, a depender da intensidade ou do tipo de estresse ele irá alterar estruturas cerebrais distintas? Estudos evidenciam que crianças que sofreram maus-tratos físicos apresentaram reduções do córtex orbitofrontal, enquanto que as que sofreram abuso físico em conjunto com negligência emocional foram associados a maiores diminuições no córtex orbitofrontal e no córtex subgeneal (BICK; NELSON, 2016). Então, é possível que a depender do tipo de estresse sofrido na infância, exista um tipo de protocolo mais adequado para estudar o estresse pós-natal? Na literatura, utilizam-se diferentes protocolos de separação maternal em roedores, sendo responsável por alterações comportamentais diversas, há estudos mostrando que o protocolo de separação maternal, (P2 ao P21) por 180 min por dia, gera comportamento tipo-depressivo em camundongos adolescentes C57/BL6 machos, mas não é capaz de gerar comportamento tipo-ansioso (BIAN *et al.*, 2015). Por outro lado, existem estudos com animais machos C57/BL6 adolescentes que passaram pelo protocolo de separação maternal (P2 ao P20) durante 4 h diárias

(10h às 14h), com os animais permanecendo juntos aos irmãos de ninhada durante o tempo de separação, em que foi possível observar comportamento tipo-ansioso, mas não tipo-depressivo (SHIN *et al.*, 2016). Nesse trabalho, as fêmeas mostraram-se mais resilientes aos protocolos de separação maternal, isso pode ser devido à ativação do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal durante o protocolo de separação maternal, que expuseram os animais aos hormônios sexuais, sugerindo que a diferença prévia a essa exposição pode ser determinante para modular o comportamento (ALTEMUS; SARVAIYA; NEILL EPPERSON, 2014). Então, qual seria a alternativa para estudar esse tipo de estresse nas fêmeas? Submetê-las a um segundo tipo de estresse? As alterações comportamentais e cerebrais que se seguem à SM são em grande parte causadas pela falta de contato físico dos filhotes com a mãe (LEVINE, 1994). O contato com os irmãos de ninhada durante o período da SM, portanto, pode ser um fator que minimiza a intensidade do estresse ao simular esse contato físico. Diante disso, o isolamento social pode ser um estresse mais intenso ou um diferente tipo de estresse que impacta no comportamento dos animais. No contexto em que o Brasil se encontra, com a Pandemia da COVID-19, em que os indivíduos são recomendados pelo governo a ficarem em isolamento social, quais serão os efeitos posteriores a essa pandemia? Quais serão os efeitos desse estresse em crianças pré-adolescentes? O efeito será diferente de acordo com o sexo e com a idade? Será que esse confinamento poderá prejudicar o desenvolvimento de estruturas cerebrais, como o hipocampo? O estresse por confinamento poderá aumentar a atividade das células do Núcleo paraventricular hipotalâmico gerando um aumento de cortisol na circulação sistêmica? Será que essas crianças serão mais susceptíveis a infecções, pelo fato de o cortisol ser imunossupressor? Quais serão os prejuízos no aprendizado e na memória dessas crianças? Com o nosso trabalho é possível inferir que as crianças, após o período de confinamento, necessitaram de um acompanhamento especial para que o estresse recebido durante esse período não resulte em prejuízo na memória, no aprendizado e em nenhum transtorno mental posterior. Crianças que crescem em um ambiente aversivo apresentam disfunções hormonais, como altos níveis de cortisol, desordens no desenvolvimento sexual e alterações morfológicas no cérebro, como aumento da amígdala e redução do hipocampo (WOON; HEDGES, 2008). Modelos animais de estresse por separação maternal apresentam as mesmas alterações cerebrais encontradas em crianças (NISHI; HORII-HAYASHI; SASAGAWA, 2014). Por último, a imprevisibilidade do estresse é em geral considerada como um agravante da intensidade do estímulo estressor em animais adultos, uma vez que a apresentação repetida de um estímulo estressor tende a gerar uma menor reatividade

do organismo (ZUCCHI *et al.*, 2009; MILLER; WARD; DYKSTRA, 2008). Isso também foi observado nesse trabalho, com animais machos pré-púberes, sendo o grupo Horário Variável Isolados responsável pela alteração de maior quantidade de parâmetros analisados.

Assim, os animais que passaram pelo protocolo de separação em **HFJ** apresentaram um aumento do comportamento de escape (Frequência e Tempo de Climbing) no teste do Nado Forçado. Esse teste é o mais utilizado na literatura para o estudo da ação dos antidepressivos em modelos animais. Porém, um relatório clínico com dados de 1783 pacientes mostra que 67% dos que possuem transtorno depressivo apresentam também transtorno de ansiedade atual e 75% tinham um transtorno de ansiedade comórbido ao longo da vida. Das pessoas com ansiedade atual, 63% tinham um transtorno depressivo atual e 81% tinham um transtorno depressivo ao longo da vida (LAMERS *et al.*, 2011). Além disso, estudo com ratos mostrou que a administração de fluoxetina aguda ou crônica resultou em um efeito ansiogênico (SILVA; ALVES; SANTAREM, 1999). Nishimura et al (1989) administrou éster etílico de ácido β carbolina-3-carboxílico (β -CCE; um agonista inverso do receptor de benzodiazepina ou diazepam (um ansiolítico) para ratos e testou seu desempenho no Nado Forçado. Eles relataram aumento de escalada em animais tratados com β -CCE, enquanto ratos tratado com diazepam passou significativamente mais tempo imóvel (NISHIMURA *et al.*, 1989). Diante disso, é necessário considerar se os efeitos ansiogênicos dos antidepressivos estão sendo interpretados como propriedades antidepressivas em camundongos no teste do Nado Forçado (ANYAN; AMIR, 2018). Assim, o aumento dos comportamentos de escape no teste (Frequência de Climbing e Duração de Climbing) podem ser entendidos como aumento do comportamento tipo-ansioso nos animais e não uma diminuição do comportamento tipo-depressivo (ANYAN; AMIR, 2018). Já os animais que passaram pela separação maternal em **HFI** dos irmãos de ninhada, além de apresentarem um aumento dos comportamentos de escape (Frequência de Climbing e Duração de Climbing), também apresentaram uma diminuição do Tempo de Nado, compatível com comportamento tipo-depressivo (BOGDANOVA *et al.*, 2013). Porém, a diminuição do Tempo de Nado, nesse caso, pode ter ocorrido em razão do aumento dos comportamentos de escape no mesmo grupo, uma vez que fez com que o animal gastasse mais energia tentando escapar do aparato e economizasse energia nadando.

Os animais que passaram pelo protocolo de separação maternal em **HVJ** aos irmãos de ninhada, também apresentaram um aumento dos comportamentos de escape no teste do Nado Forçado, como descrito anteriormente, podendo ser compatível com comportamento tipo-ansioso

(ANYAN; AMIR, 2018). Além disso, foi notado também, diminuição do Tempo no Centro e do Número de Cruzamentos no teste Campo Aberto. A diminuição do tempo passado no centro da arena de campo aberto é um parâmetro clássico de comportamento tipo-ansioso (HALL; BALLACHEY, 1932) e a diminuição no número de crossings no centro também é indicativo de comportamento tipo-ansioso (HALL, 1932; (SEIBENHENER; WOOTEN, 2015). Dessa forma, é possível inferir que o protocolo de separação maternal do grupo **HVJ** apresenta efeito ansiogênico em machos pré-púberes, como já havia sido previamente descrito em ratos pré-púberes e adultos (LI *et al.*, 2013). Em camundongos C57BL/6 adultos, esse efeito é controverso, havendo na literatura dados de aumento (ROMEO *et al.*, 2003) e ausência de efeito da SM nesse comportamento (PARFITT *et al.*, 2004). Também foi possível observar uma diminuição do comportamento de Stretchings no teste de Labirinto em Cruz Elevado. Durante esse comportamento, o animal abaixa as costas, alonga o corpo e fica parado ou avançando lentamente. Sabe-se que ele ocorre quando o roedor passa por uma avaliação de risco, em que há um conflito interno entre o medo e a exploração de um ambiente novo. Em adição, sabe-se que quando medicamentos ansiolíticos são utilizados, há uma redução do comportamento de stretchings nesses animais (HOLLY; ORNDORFF; MURRAY, 2016). Dessa forma, pode-se inferir que o protocolo de separação maternal do grupo HVJ diminuiu a avaliação de risco dos animais. Em relação ao **HVI** foi possível observar um aumento da distância total percorrida e um aumento da velocidade média dos animais, evidenciando um aumento da atividade locomotora dos animais. Na literatura, também foi possível observar um aumento do comportamento locomotor em animais adultos C57/BL6 após separação maternal (GEORGE *et al.*, 2010). Além disso, também foi notado uma diminuição do tempo no centro no teste campo aberto, como descrito anteriormente, compatível com comportamento tipo-ansioso (HALL; BALLACHEY, 1932). Em adição, foi possível verificar um aumento do tempo na área clara e do número de cruzamentos, contudo esse resultado pode ser em decorrência do aumento da atividade locomotora dos animais e não em razão de um comportamento tipo-ansioso. Assim, realizamos a divisão do tempo na área clara por $(1/2)$ pelo número de cruzamentos e não foi observada diferença significativa do grupo comparado ao controle ($p=0,371$; $t=0,915$). Também houve uma diminuição do comportamento de groomings no teste do Labirinto em Cruz Elevado. O comportamento de grooming consiste em um conjunto de respostas inatas e complexas dirigidas à superfície corporal, como o coçar-se, esfregar-se e lambe-se (SPRUIJT; VAN HOOFF; GISPEN, 1992). Em roedores, o grooming atua na termorregulação,

higienização do pelo e socialização. No entanto, o aspecto que mais tem se destacado é a sua relação com o contexto estressor em que ocorre (e.g., exposição à novidade ou a predadores), tornando-o potencialmente informativo nos estudos sobre ansiedade animal (KALUEFF; TUOHIMAA, 2005). Em ambientes novos há um aumento do número de groomings, comparado a ambientes familiares (VAN ERP *et al.*, 1994). A diminuição do grooming está associada com a diminuição do comportamento tipo-ansioso, (VAN ERP *et al.*, 1994), contudo, nesse caso os animais apresentaram comportamento-tipo ansioso nos outros parâmetros analisados e não apresentaram alteração nos parâmetros clássicos do labirinto em cruz elevado (% de entradas no braço aberto; tempo no braço aberto), então a diminuição da autolimpeza pode ser devido ao aumento da exploração dos animais e não devido a diminuição do comportamento tipo-ansioso. Por fim, houve um aumento da Frequência de Climbing, da Duração de Climbing e da Latência no teste do Nado Forçado, compatível com comportamento tipo-ansioso como já foi descrito (ANYAN; AMIR, 2018).

| | | Grupos de Separação Maternal (Fêmeas) | | | |
|----------------------------|---------------------------|---------------------------------------|-----|-----|---|
| | | HFJ | HFI | HVJ | HVI |
| T e s t e s | C.A.L. | | | | |
| | Campo-Aberto | | | | |
| | Caixa Claro-Escuro | | | | |
| | Labirinto em Cruz Elevado | | | | ↑ Tempo no Centro ↑ Número de dippings |
| | Nado Forçado | ↓ Tempo de Nado | | | |

Figura 31 - Parâmetros alterados, em fêmeas, em cada protocolo de Separação Maternal

As fêmeas não apresentaram alteração em quase todos os parâmetros analisados, com exceção dos animais do grupo **HFJ** que apresentaram uma diminuição do Tempo de Nado no teste do Nado forçado, compatível com um comportamento tipo-depressivo (BOGDANOVA *et al.*, 2013). Já as fêmeas do grupo **HVI** aumentaram o tempo de permanência no centro do Labirinto em Cruz Elevado. O aumento do Tempo no Centro é entendido na literatura como aumento do comportamento tipo-ansioso, uma vez que animais que recebem tratamento farmacológico com ansiolíticos benzodiazepínicos passam menos tempo no centro (TRULLAS *et al.*, 1991). Porém, nesse caso, o aumento do tempo no centro não pode ser entendido como um comportamento tipo-ansioso, uma vez que as fêmeas também apresentaram um aumento dos

comportamentos de dippings, sendo esse último entendido como diminuição do comportamento tipo-ansioso. Então, o aumento do tempo na área central pode ter ocorrido em razão das fêmeas terem passado mais tempo nessa área realizando dippings. Os benzodiazepínicos ansiolíticos típicos diazepam e clordiazepóxido aumentam de forma dependente da dose o número de dippings (TAKEDA; TSUJI; MATSUMIYA, 1998). Diante disso, o protocolo **HVI** diminuiu o comportamento tipo-ansioso nas fêmeas.

| | | Testes Comportamentais (Machos) | | | | |
|-----------------------|------------|--|---|--|------------------------------|--------------|
| | | Caixa de Atividade | Campo Aberto | Caixa Claro-Escuro | Labirinto | Nado Forçado |
| F a t o r | Horário | Distância Total Percorrida Velocidade Média | | Frequência de Cruzamento | Groomings Tempo no centro | |
| | Isolamento | | Número total de Rearings Cruzamento na periferia | Tempo no Claro Frequência de Cruzamento | Groomings | |
| | Interação | Distância Total Percorrida Velocidade Média Número total de rearings | | Frequência de Cruzamento | | |

Figura 32 - Resumo dos parâmetros que apresentaram diferença significativa, em animais machos pré-púberes C57/BL6, entre os grupos de separação maternal, de forma a evidenciar se houve diferença no fator horário, no fator tempo ou ainda na interação entre ambos.

Ao analisar a tabela (figura 33) é possível perceber que ambos os fatores, e a interação entre eles, foram responsáveis pelas diferenças nos parâmetros entre os grupos de separação maternal.

Todos os parâmetros analisados no teste de Caixa de Atividade Locomotora, distância total percorrida; velocidade média e número total de rearings, em animais machos, apresentaram interação entre os fatores horário e isolamento físico. Assim, pode-se inferir, que no presente estudo, as duas variáveis em conjunto foram responsáveis pelas diferenças entre os grupos de SM.

No teste de Campo Aberto foi verificada diferenças significativas nos parâmetros “Cruzamentos na periferia” e “Número total de rearings”, sendo que o fator Isolamento Físico foi o único responsável estatisticamente por essas diferenças, uma vez que não houve diferença no fator Horário e nem Interação entre ambos fatores. Porém, é possível observar uma diferença existente entre os grupos HFJ x HVI no número de rearings totais, que apesar de não haver uma interação entre os fatores, houve uma sobreposição das variáveis dos dois grupos, computando a diferença existente. Dessa forma, pode-se inferir que no teste Campo Aberto realizado neste trabalho, o fator Isolamento foi o único responsável pela diferença entre os grupos de separação maternal quando o parâmetro “Cruzamentos na periferia” foi comparado, contudo em relação ao número de rearings, apesar do fator isolamento ser o único com diferença estatística

detectável, houve uma sobreposição de características entre os grupos HFJ x HVI que foi responsável pela diferença observada na figura 23 B.

No teste Caixa Claro-Escuro foi verificado diferença significativa no parâmetro “Tempo no Claro”, sendo o fator Isolamento físico o único responsável pela diferença entre os grupos analisados. Porém, mais uma vez é possível perceber uma diferença significativa entre os grupos HFJ x HVI (figura 25 B) o que evidencia que apesar de não haver uma interação entre os fatores, houve uma sobreposição das características de cada animal, que foram responsáveis pelas diferenças obtidas. Ainda, quando comparado o parâmetro “Frequência de Cruzamentos” entre os grupos de SM, houve diferença no fator Horário; no fator Isolamento Físico e Interação entre os fatores. Nesse contexto, infere-se que nesse parâmetro, os fatores Isolamento Físico e Horário foram responsáveis pelas diferenças observadas entre os grupos.

No teste de Labirinto em Cruz Elevado, foi observado diferença no parâmetro “Número de Grooming”, sendo computada diferença no fator Horário, no fator Isolamento Físico, conquanto sem haver Interação entre os fatores. Evidenciando a ação isolada de cada fator. Ainda, quando analisado o parâmetro “Tempo no Centro” foi identificado diferença no fator Horário, mas não no fator Isolamento físico, não havendo interação entre os fatores. Porém, é possível identificar uma diferença existente entre os grupos HFJ x HVI (figura 27 B), mostrando mais uma vez que houve uma sobreposição de outras variáveis que foram responsáveis pelas diferenças observadas.

No teste de Nado forçado, não foi possível observar diferença entre os grupos de separação maternal analisados.

| | | Testes Comportamentais (Fêmeas) | | | | |
|-----------------------|------------|---------------------------------|--------------|--------------------|------------------------------|--------------|
| | | Caixa de Atividade | Campo Aberto | Caixa Claro-Escuro | Labirinto | Nado Forçado |
| F a t o r | Horário | | | | Groomings Tempo no centro | |
| | Isolamento | | | | | |
| | Interação | | | | | |

Figura 33 - Resumo dos parâmetros que apresentaram diferença significativa, em animais fêmeas pré-púberes C57/BL6, entre os grupos de separação maternal, de forma a evidenciar se houve diferença no fator horário, no fator tempo ou ainda na interação entre ambos.

Ao analisar a tabela (figura 34) é possível perceber que não houve diferença entre quase todos os parâmetros entre os grupos de separação maternal. Porém, ao comparar o Número de grooming e o Tempo no centro, entre os grupos de SM, foi possível observar que o fator horário foi o único responsável pela diferença entre as variáveis, não havendo interação entre os fatores. Porém, é possível notar uma diferença existente entre os grupos HFJ x HVI (figura 28 C), evidenciando uma sobreposição de variáveis que foram responsáveis pela diferença obtida.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em suma, os protocolos de separação maternal alteraram de forma distinta o comportamento dos animais. Os fatores isolamento físico e variação do horário parecem ser estresses mais intensos no protocolo de separação maternal. Por fim, com o intuito de complementar esse trabalho, seria interessante avaliar o comportamento da mãe, além dos níveis de corticosterona, antes e após a separação maternal, na mãe e nos filhotes.

REFERÊNCIAS

- ALASTALO, Hanna *et al.* Cardiovascular health of Finnish war evacuees 60 years later. *Annals of Medicine*, v. 41, n. 1, p. 66–72, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18720095>>. Acesso em: 23 abr. 2020.
- ALTEMUS, Margaret; SARVAIYA, Nilofar; NEILL EPPERSON, C. *Sex differences in anxiety and depression clinical perspectives. Frontiers in Neuroendocrinology*. [S.l.]: Academic Press Inc. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24887405/>>. Acesso em: 31 ago. 2020. , 2014
- ANYAN, Jeffrey; AMIR, Shimon. *Too Depressed to Swim or Too Afraid to Stop? A Reinterpretation of the Forced Swim Test as a Measure of Anxiety-Like Behavior. Neuropsychopharmacology*. [S.l.]: Nature Publishing Group. , 1 abr. 2018
- BANQUERI, María; MÉNDEZ, Marta; ARIAS, Jorge L. Behavioral effects in adolescence and early adulthood in two length models of maternal separation in male rats. *Behavioural Brain Research*, v. 324, p. 77–86, 1 maio 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28185885/>>. Acesso em: 28 ago. 2020.
- BIAN, Yaoyao *et al.* Repeated three-hour maternal separation induces depression-like behavior and affects the expression of hippocampal plasticity-related proteins in C57BL/6N mice. *Neural Plasticity*, v. 2015, 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26798520/>>. Acesso em: 28 ago. 2020.
- BICK, Johanna; NELSON, Charles A. *Early adverse experiences and the developing brain. Neuropsychopharmacology*. [S.l.]: Nature Publishing Group. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26334107/>>. Acesso em: 27 ago. 2020. , 1 jan. 2016
- BOGDANOVA, Olena V. *et al.* *Factors influencing behavior in the forced swim test. Physiology and Behavior*. [S.l.]: Elsevier Inc. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC5609482/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26334107/)>. Acesso em: 14 jul. 2020. , 3 jun. 2013
- BOURIN, Michel; HASCOËT, Martine. *The mouse light/dark box test. European Journal of Pharmacology*. [S.l.]: Elsevier. , 28 fev. 2003
- BREMNER, J. Douglas. Traumatic stress: Effects on the brain. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, v. 8, n. 4, p. 445–461, 2006. Disponível em: <www.dialogues-cns.org>.

Acesso em: 8 jul. 2020.

BRINDLEY, D. N.; ROLLAND, Y. *Possible connections between stress, diabetes, obesity, hypertension and altered lipoprotein metabolism that may result in atherosclerosis. Clinical Science*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2684477>>. Acesso em: 14 abr. 2020. , nov. 1989

BRUNSON, Kristen L. *et al. Stress and the developing hippocampus: A double-edged sword? Molecular Neurobiology*. [S.l.]: Humana Press. , 1 abr. 2003

CADLE, Chelsea E.; ZOLADZ, Phillip R. Stress time-dependently influences the acquisition and retrieval of unrelated information by producing a memory of its own. *Frontiers in Psychology*, v. 6, 30 jun. 2015. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC4484976/?report=abstract](https://doi.org/10.3389/fpsyg.2015.00448)>. Acesso em: 8 jul. 2020.

CANNON, Walter B. *Bodily changes in pain, hunger, fear and rage: An account of recent researches into the function of emotional excitement*. [S.l.]: D Appleton & Company, 2004. Disponível em: <[/record/2004-15415-000](https://doi.org/10.2307/1541500)>. Acesso em: 28 ago. 2020.

CARR, Clara Passmann *et al. The role of early life stress in adult psychiatric disorders: A systematic review according to childhood trauma subtypes. Journal of Nervous and Mental Disease*. [S.l.]: J Nerv Ment Dis. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24284634/>>. Acesso em: 27 ago. 2020. , dez. 2013

CONRAD, Cheryl D. *Chronic stress-induced hippocampal vulnerability: The glucocorticoid vulnerability hypothesis. Reviews in the Neurosciences*. [S.l.]: Freund Publishing House Ltd. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC2746750/?report=abstract](https://doi.org/10.1080/08997667.2008.2746750)>. Acesso em: 8 jul. 2020. , 2008

DANESE, Andrea *et al. Elevated inflammation levels in depressed adults with a history of childhood maltreatment. Archives of General Psychiatry*, v. 65, n. 4, p. 409–416, 2008.

EVANS, Gary W. The Environment of Childhood Poverty. *American Psychologist*, v. 59, n. 2, p. 77–92, fev. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14992634>>. Acesso em: 23 abr. 2020.

FABRICIUS, Katrine; WÖRTWEIN, Gitta; PAKKENBERG, Bente. The impact of maternal separation on adult mouse behaviour and on the total neuron number in the mouse

hippocampus. *Brain Structure and Function*, v. 212, n. 5, p. 403–416, fev. 2008.

FREUND, N. *et al.* Windows of vulnerability: Maternal separation, age, and fluoxetine on adolescent depressive-like behavior in rats. *Neuroscience*, v. 249, p. 88–97, 6 set. 2013.

Disponível em: </pmc/articles/PMC5267225/?report=abstract>. Acesso em: 28 ago. 2020.

GENTSCH, C.; LICHTSTEINER, M.; FEER, H. Open field and elevated plus-maze: A behavioural comparison between spontaneously hypertensive (SHR) and Wistar-Kyoto (WKY) rats and the effects of chlordiazepoxide. *Behavioural Brain Research*, v. 25, n. 2, p. 101–107, 1 ago. 1987. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0166432887900039>>. Acesso em: 9 out. 2020.

GEORGE, Elizabeth D. *et al.* Maternal separation with early weaning: A novel mouse model of early life neglect. *BMC Neuroscience*, v. 11, n. 1, p. 123, 29 set. 2010. Disponível em:

<<http://bmcneurosci.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2202-11-123>>. Acesso em: 14 jul. 2020.

GERKE, Jelena *et al.* Childhood maltreatment as risk factor for lifetime depression: The role of different types of experiences and sensitive periods. *Mental Health and Prevention*, v. 10, p. 56–65, 1 jun. 2018.

GOLDSTEIN, David S.; KOPIN, Irwin J. *Evolution of concepts of stress*. *Stress*. [S.l.]: Taylor & Francis. , jun. 2007

HALL, Calvin. *A study of the rat's behavior in a field a contribution to method in comparative psychology*. [Berkeley]: [Univ. of California Press], 1932.

HERNANDO, F. *et al.* Immunohistochemical localization of the vasopressin V1b receptor in the rat brain and pituitary gland: Anatomical support for its involvement in the central effects of vasopressin. *Endocrinology*, v. 142, n. 4, p. 1659–1668, 2001.

HOLLY, Kevin S.; ORNDORFF, Casey O.; MURRAY, Teresa A. MATSAP: An automated analysis of stretch-Attend posture in rodent behavioral experiments. *Scientific Reports*, v. 6, 8 set. 2016. Disponível em: </pmc/articles/PMC4977506/?report=abstract>. Acesso em: 14 jul. 2020.

HUGHES, Nathan *et al.* *Health determinants of adolescent criminalisation*. *The Lancet Child and Adolescent Health*. [S.l.]: Elsevier B.V. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31956016/>>. Acesso em: 27 ago. 2020. , 1 fev. 2020

ISGOR, Ceylan *et al.* *Delayed effects of chronic variable stress during peripubertal-juvenile period on hippocampal morphology and on cognitive and stress axis functions in rats.*

Hippocampus. [S.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15301440>>. Acesso em: 23 abr. 2020. , 2004

KALUEFF, Allan V.; TUOHIMAA, Pentti. Mouse grooming microstructure is a reliable anxiety marker bidirectionally sensitive to GABAergic drugs. *European Journal of Pharmacology*, v. 508, n. 1–3, p. 147–153, 31 jan. 2005. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15680265/>>. Acesso em: 14 jul. 2020.

KAUFMAN, Daniel *et al.* Early-life stress and the development of obesity and insulin resistance in juvenile bonnet macaques. *Diabetes*, v. 56, n. 5, p. 1382–1386, maio 2007.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17470564>>. Acesso em: 23 abr. 2020.

KAUFMAN, Joan. *Child abuse and psychiatric illness. Biological Psychiatry*. [S.l.]: NIH

Public Access. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4159672/>>.

Acesso em: 27 ago. 2020. , 15 fev. 2012

KIRSCHBAUM, Clemens *et al.* Persistent high cortisol responses to repeated psychological stress in a subpopulation of healthy men. *Psychosomatic Medicine*, v. 57, n. 5, p. 468–474, 1995.

LACAZE-MASMONTEIL, T. *et al.* Characterization of proopiomelanocortin transcripts in human nonpituitary tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 84, n. 20, p. 7261–7265, 1987.

LAI, Ming Chi; YANG, San Nan; HUANG, Li Tung. Neonatal Isolation Enhances Anxiety-like Behavior Following Early-life Seizure in Rats. *Pediatrics and Neonatology*, v. 49, n. 2, p. 19–25, 1 abr. 2008.

LAMERS, Femke *et al.* Comorbidity patterns of anxiety and depressive disorders in a large cohort study: The Netherlands Study of Depression and Anxiety (NESDA). *Journal of Clinical Psychiatry*, v. 72, n. 3, p. 342–348, mar. 2011. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21294994/>>. Acesso em: 31 ago. 2020.

LAZARUS, Richard S.; LAUNIER, Raymond. Stress-Related Transactions between Person

and Environment. *Perspectives in Interactional Psychology*. [S.l.]: Springer US, 1978. p. 287–327.

LEVINE, S. The ontogeny of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The influence of maternal factors. 1994, [S.l.]: Blackwell Publishing Inc., 1994. p. 275–288. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7825883/>>. Acesso em: 20 jul. 2020.

LI, Man *et al.* Cognitive, emotional and neurochemical effects of repeated maternal separation in adolescent rats. *Brain Research*, v. 1518, p. 82–90, 26 jun. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23623774/>>. Acesso em: 20 jul. 2020.

LUKKES, Jodi L. *et al.* Early life stress and later peer distress on depressive behavior in adolescent female rats: Effects of a novel intervention on GABA and D2 receptors. *Behavioural Brain Research*, v. 330, p. 37–45, 14 jul. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27344444/>>. Acesso em: 28 ago. 2020.

MCEWEN, BRUCE S. Stress, Adaptation, and Disease: Allostasis and Allostatic Load. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 840, n. 1, p. 33–44, maio 1998.

MCEWEN, Bruce S.; STELLAR, Eliot. Stress and the Individual: Mechanisms Leading to Disease. *Archives of Internal Medicine*, v. 153, n. 18, p. 2093–2101, 27 set. 1993.

MCEWEN, Bruce S. Effects of stress on the developing brain. *Cerebrum : the Dana forum on brain science*, v. 2011, p. 14, set. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23447783>>. Acesso em: 25 maio 2020.

MILLER, Laurence L.; WARD, Sara J.; DYKSTRA, Linda A. Chronic unpredictable stress enhances cocaine-conditioned place preference in type 1 cannabinoid receptor knockout mice. *Behavioural Pharmacology*, v. 19, n. 5–6, p. 575–581, set. 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18714444/>>. Acesso em: 20 jul. 2020.

MOUNTJOY, Kathleen G. *et al.* The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. *Science*, v. 257, n. 5074, p. 1248–1251, 28 ago. 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1325670>>. Acesso em: 28 abr. 2020.

NISHI, Mayumi; HORII-HAYASHI, Noriko; SASAGAWA, Takayo. *Effects of early life adverse experiences on the brain: Implications from maternal separation models in rodents*. *Frontiers in Neuroscience*. [S.l.]: Frontiers Research Foundation. Disponível em:

</pmc/articles/PMC4060417/?report=abstract>. Acesso em: 1 set. 2020. , 2014

NISHIMURA, Hiroshi *et al.* Opposite effects of diazepam and β -CCE on immobility and straw-climbing behavior of rats in a modified forced-swim test. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 33, n. 1, p. 227–231, 1 maio 1989.

PARFITT, David B. *et al.* Differential early rearing environments can accentuate or attenuate the responses to stress in male C57BL/6 mice. *Brain Research*, v. 1016, n. 1, p. 111–118, 30 jul. 2004. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15234259/>>. Acesso em: 20 jul. 2020.

PETIT-DEMOULIERE, Benoit; CHENU, Franck; BOURIN, Michel. *Forced swimming test in mice: A review of antidepressant activity. Psychopharmacology*. [S.l.: s.n.]. , jan. 2005

PLOTSKY, Paul M.; MEANEY, Michael J. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Molecular Brain Research*, v. 18, n. 3, p. 195–200, 1993.

PRUT, Laetitia; BELZUNG, Catherine. *The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review. European Journal of Pharmacology*. [S.l.]: Elsevier. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12600700/>>. Acesso em: 25 set. 2020a. , 28 fev. 2003

PRUT, Laetitia; BELZUNG, Catherine. *The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review. European Journal of Pharmacology*. [S.l.]: Elsevier. , 28 fev. 2003b

ROGERSON, John. Canine fears and phobias; a regime for treatment without recourse to drugs. *Applied Animal Behaviour Science*, v. 52, n. 3–4, p. 291–297, 1 abr. 1997.

ROMEO, Russell D. *et al.* Anxiety and fear behaviors in adult male and female C57BL/6 mice are modulated by maternal separation. *Hormones and Behavior*, v. 43, n. 5, p. 561–567, 2003. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12799173/>>. Acesso em: 20 jul. 2020.

ROSENFELD, Patricia *et al.* Maternal regulation of the adrenocortical response in preweanling rats. *Physiology and Behavior*, v. 50, n. 4, p. 661–671, 1991.

SEIBENHENER, Michael L.; WOOTEN, Michael C. Use of the open field maze to measure

locomotor and anxiety-like behavior in mice. *Journal of Visualized Experiments*, n. 96, p. 52434, 6 fev. 2015. Disponível em: </pmc/articles/PMC4354627/?report=abstract>. Acesso em: 20 jul. 2020.

SHIN, S. Y. *et al.* Adolescent mice show anxiety- and aggressive-like behavior and the reduction of long-term potentiation in mossy fiber-CA3 synapses after neonatal maternal separation. *Neuroscience*, v. 316, p. 221–231, 1 mar. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26733385/>. Acesso em: 27 ago. 2020.

SHONKOFF, Jack P.; BOYCE, W. Thomas; MCEWEN, Bruce S. *Neuroscience, molecular biology, and the childhood roots of health disparities: Building a new framework for health promotion and disease prevention. JAMA - Journal of the American Medical Association.* [S.l.]: American Medical Association. , 3 jun. 2009

SILVA, M. T.A.; ALVES, C. R.R.; SANTAREM, E. M.M. Anxiogenic-like effect of acute and chronic fluoxetine on rats tested on the elevated plus-maze. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 32, n. 3, p. 333–339, 1999. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X1999000300014&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 31 ago. 2020.

SPRUIJT, B. M.; VAN HOOFF, J. A.R.A.M.; GISPEN, W. H. *Ethology and neurobiology of grooming behavior. Physiological Reviews.* [S.l.]: Physiol Rev. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1320764/>. Acesso em: 14 jul. 2020. , 1992

TAKEDA, Hiroshi; TSUJI, Minoru; MATSUMIYA, Teruhiko. Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. *European Journal of Pharmacology*, v. 350, n. 1, p. 21–29, 29 maio 1998. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9683010/>. Acesso em: 31 ago. 2020.

TAN, Siang Yong; YIP, A. *Hans Selye (1907-1982): Founder of the stress theory. Singapore Medical Journal.* [S.l.]: Singapore Medical Association. , 1 abr. 2018

TREIT, Dallas; MENARD, Janet; ROYAN, Cary. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 44, n. 2, p. 463–469, 1 fev. 1993.

TRULLAS, R. *et al.* Are Glutamatergic Pathways Involved in the Pathophysiology of Anxiety? *New Concepts in Anxiety.* [S.l.]: Macmillan Education UK, 1991. p. 382–394.

Disponível em: <https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-349-11847-2_30>. Acesso em: 20 jul. 2020.

TSIGOS, Constantine *et al.* *Stress, Endocrine Physiology and Pathophysiology*. [S.l.]: MDText.com, Inc., 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25905226>>. Acesso em: 29 set. 2020.

VALE, Wylie *et al.* Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and β -endorphin. *Science*, v. 213, n. 4514, p. 1394–1397, 18 set. 1981.

VALLE, F. P. Effects of strain, sex, and illumination on open-field behavior of rats. *The American journal of psychology*, v. 83, n. 1, p. 103–111, 1970.

VAN ERP, Annemoon M.M. *et al.* Effect of environmental stressors on time course, variability and form of self-grooming in the rat: Handling, social contact, defeat, novelty, restraint and fur moistening. *Behavioural Brain Research*, v. 65, n. 1, p. 47–55, 16 nov. 1994. Disponível em: </record/1995-24258-001>. Acesso em: 31 ago. 2020.

VIOLA, Thiago Wendt *et al.* The influence of geographical and economic factors in estimates of childhood abuse and neglect using the Childhood Trauma Questionnaire: A worldwide meta-regression analysis. *Child Abuse and Neglect*, v. 51, p. 1–11, 1 jan. 2016.

WALF, Alicia A.; FRYE, Cheryl A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols*, v. 2, n. 2, p. 322–328, mar. 2007.

WANG, Qiong *et al.* The different effects of maternal separation on spatial learning and reversal learning in rats. *Behavioural Brain Research*, v. 280, p. 16–23, 1 mar. 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166432814007761>>. Acesso em: 28 ago. 2020.

WOON, Fu L.; HEDGES, Dawson W. *Hippocampal and amygdala volumes in children and adults with childhood maltreatment-related posttraumatic stress disorder: A meta-analysis*. *Hippocampus*. [S.l.: s.n.], 2008

YANKELEVITCH-YAHAV, Roni *et al.* The forced swim test as a model of depressive-like behavior. *Journal of Visualized Experiments*, v. 2015, n. 97, p. 52587, 2 mar. 2015. Disponível em: </pmc/articles/PMC4401172/?report=abstract>. Acesso em: 14 jul. 2020.

YARIBEYGI, Habib *et al.* *The impact of stress on body function: A review. EXCLI Journal.* [S.l.]: Leibniz Research Centre for Working Environment and Human Factors. Disponível em: </pmc/articles/PMC5579396/?report=abstract>. Acesso em: 8 jul. 2020. , 21 jul. 2017

ZUCCHI, Fabíola C.R. *et al.* Predictable stress versus unpredictable stress: A comparison in a rodent model of stroke. *Behavioural Brain Research*, v. 205, n. 1, p. 67–75, 14 dez. 2009.

ANEXOS

ANEXO A – Dados da caixa de atividade locomotora; campo aberto; caixa claro-escuro; labirinto em cruz elevado e nado forçado por teste One Way ANOVA

| CAIXA DE ATIVIDADE LOCOMOTORA | | | | | | | | | | |
|--------------------------------------|----------|--------------|----------------|------------|----------|---------------|--------------|----------------|-----------|----------|
| Machos | | | | | | Fêmeas | | | | |
| Velocidade média | | | | | | | | | | |
| Grupo | N | Média | Mediana | SD | p | N | Média | Mediana | SD | p |
| Controle | 13 | 2,6846 | 2,8 | 0,78136582 | — | 11 | 2,77 | 2,7 | 0,685 | — |
| HFJ | 11 | 3,0364 | 3,200 | 0,81939304 | 0,315 | 18 | 3,23 | 3,15 | 0,756 | 0,123 |
| HFI | 11 | 2,5182 | 2,400 | 0,47638445 | 0,561 | 15 | 3,2 | 3,1 | 1,091 | 0,282 |
| HVJ | 14 | 2,9214 | 2,850 | 0,47083296 | 0,364 | 10 | 3,11 | 3,2 | 0,587 | 0,266 |
| HVI | 9 | 3,4667 | 3,400 | 0,44221664 | 0,017 | 11 | 3,1 | 3 | 0,710 | 0,263 |
| Distância total percorrida | | | | | | | | | | |
| Grupo | N | Média | Mediana | SD | p | N | Média | Mediana | SD | p |
| Controle | 13 | 1616,4 | 1684,1 | 465,163519 | — | 11 | 1655,6 | 1640,6 | 415,854 | — |
| HFJ | 11 | 1813,1 | 1911,9 | 490,142337 | 0,345 | 18 | 1944,2 | 1872,05 | 457,874 | 0,112 |
| HFI | 11 | 1511,2 | 1466,8 | 291,550218 | 0,54 | 15 | 1914,8 | 1850,7 | 655,978 | 0,533 |
| HVJ | 14 | 1765,5 | 1737,85 | 286,789003 | 0,34 | 10 | 1864,2 | 1924,9 | 340,916 | 0,249 |
| HVI | 9 | 2090,3 | 2061,9 | 267,112537 | 0,016 | 11 | 1859,2 | 1803,1 | 421,894 | 0,29 |
| Número de rearings totais | | | | | | | | | | |
| Grupo | N | Média | Mediana | SD | p | N | Média | Mediana | SD | p |
| Controle | 13 | 65,923 | 63 | 22,300264 | — | 11 | 67,909 | 71 | 18,735 | — |
| HFJ | 11 | 73,545 | 72 | 30,9408927 | 0,51 | 18 | 66,389 | 66 | 14,373 | 0,814 |
| HFI | 11 | 53,091 | 53 | 6,74812493 | 0,077 | 15 | 55,667 | 53 | 20,988 | 0,153 |
| HVJ | 14 | 67,357 | 66,5 | 14,772596 | 0,85 | 10 | 67,1 | 69,5 | 14,349 | 0,918 |
| HVI | 9 | 81,222 | 77 | 19,6173267 | 0,129 | 11 | 64,636 | 67 | 14,079 | 0,664 |

| CAMPO ABERTO | | | | | | | | | | |
|----------------------------------|----------|--------------|----------------|------------|----------|---------------|--------------|----------------|-----------|----------|
| Machos | | | | | | Fêmeas | | | | |
| Tempo no centro | | | | | | | | | | |
| Grupo | N | Média | Mediana | SD | p | N | Média | Mediana | SD | p |
| Controle | 13 | 30,462 | 26 | 15,9789062 | — | 11 | 25,455 | 24 | 12,0255 | — |
| HFJ | 7 | 26 | 18 | 13,4483138 | 0,558 | 14 | 19,61 | 19 | 8,33359 | 0,25 |
| HFI | 12 | 22,332 | 22,5 | 7,55013524 | 0,137 | 15 | 16,889 | 14 | 10,6394 | 0,077 |
| HVJ | 14 | 18,332 | 15,5 | 9,01220926 | 0,026 | 10 | 16,293 | 16,8505 | 4,88395 | 0,09 |
| HVI | 9 | 16,148 | 15 | 6,94117004 | 0,026 | 12 | 17,395 | 16 | 6,6146 | 0,108 |
| Cruzamentos no centro | | | | | | | | | | |
| Grupo | N | Média | Mediana | SD | p | N | Média | Mediana | SD | p |
| Controle | 13 | 19,077 | 19 | 6,50989234 | — | 11 | 16,455 | 16 | 3,84622 | — |
| HFJ | 7 | 15,714 | 17 | 4,06076297 | 0,254 | 14 | 15,786 | 17 | 5,79629 | 0,755 |
| HFI | 12 | 19 | 20 | 6,25832779 | 0,977 | 15 | 14,133 | 12 | 7,5707 | 0,152 |
| HVJ | 14 | 13,143 | 11 | 5,86584719 | 0,024 | 10 | 14,1 | 14 | 4,13401 | 0,214 |
| HVI | 9 | 15 | 16 | 6,05530071 | 0,172 | 12 | 15,333 | 15 | 4,88763 | 0,957 |
| Cruzamentos na periferia | | | | | | | | | | |
| Grupo | N | Média | Mediana | SD | p | N | Média | Mediana | SD | p |
| Controle | 13 | 115,46 | 116 | 35,3762532 | — | 11 | 98,182 | 90 | 19,8486 | — |
| HFJ | 7 | 107,29 | 116 | 20,9264992 | 0,601 | 14 | 111,5 | 116 | 27,9508 | 0,212 |
| HFI | 12 | 114,42 | 105,5 | 20,0352121 | 0,932 | 15 | 103,8 | 96 | 38,3913 | 0,674 |
| HVJ | 14 | 106,14 | 97 | 32,2597873 | 0,497 | 10 | 107,5 | 105,5 | 25,5705 | 0,384 |
| HVI | 9 | 141,22 | 136 | 34,6403034 | 0,122 | 12 | 113,58 | 111,5 | 22,0698 | 0,06 |
| Número de rearings totais | | | | | | | | | | |
| Grupo | N | Média | Mediana | SD | p | N | Média | Mediana | SD | p |
| Controle | 13 | 34,154 | 32 | 14,3839983 | — | 11 | 29,273 | 26 | 9,3914 | — |
| HFJ | 7 | 26,143 | 28 | 8,27092276 | 0,214 | 14 | 28,429 | 28,5 | 7,48059 | 0,812 |
| HFI | 12 | 33,25 | 34,5 | 7,15454401 | 0,514 | 15 | 28,4 | 30 | 12,6005 | 0,854 |
| HVJ | 14 | 31,286 | 34,5 | 8,63074712 | 0,548 | 10 | 29,8 | 32,5 | 10,3808 | 0,909 |
| HVI | 9 | 39 | 37 | 8,43274043 | 0,397 | 12 | 34,667 | 32 | 10,0692 | 0,134 |

| CAIXA CLARO-ESCURO | | | | | | | | | | |
|---------------------------|----------|--------------|----------------|------------|----------|---------------|--------------|----------------|-----------|----------|
| Machos | | | | | | Fêmeas | | | | |
| Latência | | | | | | | | | | |
| Grupo | N | Média | Mediana | SD | p | N | Média | Mediana | SD | p |
| Controle | 13 | 7 | 7 | 4,48930353 | — | 11 | 9,4545 | 7 | 8,5956 | — |
| HFJ | 11 | 8,5455 | 4 | 9,40370948 | 0,619 | 18 | 8,6111 | 5,5 | 6,88104 | 0,91 |
| HFI | 12 | 6,8333 | 5 | 5,62484568 | 0,494 | 15 | 6,2667 | 6 | 4,26562 | 0,714 |
| HVJ | 14 | 7,5714 | 6 | 5,09501557 | 0,903 | 10 | 6,4 | 6,5 | 3,29242 | 0,804 |
| HVI | 9 | 7,5556 | 9 | 3,68513866 | 0,48 | 11 | 4,9091 | 5 | 2,81084 | 0,642 |
| Tempo no claro | | | | | | | | | | |
| Grupo | N | Média | Mediana | SD | p | N | Média | Mediana | SD | p |
| Controle | 13 | 83,48 | 81 | 27,0766477 | — | 11 | 86,545 | 74 | 45,0926 | — |
| HFJ | 11 | 90,423 | 92 | 26,0313169 | 0,548 | 18 | 98,442 | 87 | 40,6408 | 0,486 |
| HFI | 12 | 106,94 | 105,5 | 29,3565136 | 0,058 | 15 | 95,422 | 94 | 39,8537 | 0,615 |
| HVJ | 14 | 87,784 | 85,1225 | 22,961643 | 0,671 | 10 | 108,02 | 108,5 | 23,4605 | 0,215 |
| HVI | 9 | 122,02 | 127,396 | 14,5547208 | 0,001 | 11 | 120,55 | 125 | 36,5132 | 0,079 |
| Cruzamentos | | | | | | | | | | |
| Grupo | N | Média | Mediana | SD | p | N | Média | Mediana | SD | p |
| Controle | 13 | 18,615 | 18 | 6,91195688 | | 11 | 17,545 | 17 | 7,94714 | |
| HFJ | 11 | 17,273 | 17 | 6,34021665 | 0,642 | 18 | 17,667 | 16 | 6,11919 | 0,965 |
| HFI | 12 | 16,417 | 16 | 5,09015935 | 0,397 | 15 | 15,8 | 15 | 7,39549 | 0,585 |
| HVJ | 14 | 17,714 | 16,5 | 5,04874201 | 0,712 | 10 | 19,8 | 19 | 6,35295 | 0,506 |
| HVI | 9 | 29,778 | 28 | 5,95870563 | 0,001 | 11 | 22,909 | 23 | 9,19935 | 0,178 |

| LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO | | | | | | | | | | |
|--------------------------------------|----------|--------------|----------------|------------|----------|---------------|--------------|----------------|-----------|----------|
| Machos | | | | | | Fêmeas | | | | |
| % de entradas no braço aberto | | | | | | | | | | |
| Grupo | N | Média | Mediana | SD | p | N | Média | Mediana | SD | p |
| Controle | 13 | 32,749 | 32 | 9,72435283 | — | 11 | 44,288 | 42,86 | 9,28191 | — |
| HFJ | 12 | 34,52 | 34,81 | 3,97315156 | 0,369 | 18 | 42,804 | 41,67 | 8,10644 | 0,666 |
| HFI | 12 | 40,48 | 41,055 | 10,1098203 | 0,074 | 15 | 40,82 | 36,84 | 13,0028 | 0,253 |
| HVJ | 11 | 35,587 | 33,33 | 7,33231092 | 0,454 | 10 | 41,354 | 44,155 | 11,7319 | 0,551 |
| HVI | 9 | 35,762 | 33,33 | 6,21194508 | 0,443 | 12 | 44,119 | 44,635 | 7,32122 | 0,709 |
| Tempo no braço aberto | | | | | | | | | | |
| Grupo | N | Média | Mediana | SD | p | N | Média | Mediana | SD | p |
| Controle | 13 | 19,333 | 19,33333 | 4,38334065 | — | 11 | 69,091 | 70 | 21,652 | — |
| HFJ | 12 | 16,389 | 15,5 | 7,39222982 | 0,253 | 18 | 59,889 | 52 | 27,7907 | 0,373 |
| HFI | 12 | 19,833 | 18,83333 | 6,92887143 | 0,837 | 15 | 61,8 | 58 | 18,9814 | 0,39 |
| HVJ | 11 | 18,606 | 19,33333 | 7,76916748 | 0,582 | 10 | 77,7 | 73,5 | 25,8614 | 0,44 |
| HVI | 9 | 24,185 | 27,33333 | 7,11477529 | 0,181 | 12 | 85,333 | 86,5 | 17,2159 | 0,119 |
| Número total de rearings | | | | | | | | | | |
| Grupo | N | Média | Mediana | SD | p | N | Média | Mediana | SD | p |
| Controle | 13 | 15,308 | 15 | 5,36920873 | — | 11 | 13,636 | 13 | 5,41501 | — |
| HFJ | 12 | 11,25 | 12 | 4,26468053 | 0,058 | 18 | 11,667 | 11,5 | 6,02771 | 0,4 |
| HFI | 12 | 14,5 | 14,5 | 5,63471383 | 0,728 | 15 | 12,867 | 13 | 5,18802 | 0,728 |
| HVJ | 11 | 13,909 | 15 | 4,90740712 | 0,533 | 10 | 16,4 | 16,5 | 3,44093 | 0,205 |
| HVI | 9 | 16,222 | 15 | 4,70880447 | 0,698 | 12 | 14,167 | 14 | 4,45034 | 0,781 |
| Número de dippings | | | | | | | | | | |
| Grupo | N | Média | Mediana | SD | p | N | Média | Mediana | SD | p |
| Controle | 13 | 6,6923 | 7 | 2,2320951 | — | 11 | 7,6364 | 8 | 4,43689 | — |
| HFJ | 12 | 5,3333 | 5 | 3,00924501 | 0,229 | 18 | 8,7222 | 7,5 | 4,26622 | 0,533 |
| HFI | 12 | 6,9167 | 7,5 | 2,66014828 | 0,828 | 15 | 7,6 | 7 | 3,99667 | 0,983 |
| HVJ | 11 | 8,8182 | 8 | 4,95099957 | 0,251 | 10 | 11,9 | 12,5 | 4,48219 | 0,051 |
| HVI | 9 | 7,3333 | 7 | 2,62466929 | 0,564 | 12 | 11,667 | 10 | 4,34613 | 0,082 |
| Número de stretchings | | | | | | | | | | |
| Grupo | N | Média | Mediana | SD | p | N | Média | Mediana | SD | p |
| Controle | 13 | 17,385 | 18 | 4,02947719 | — | 11 | 15,364 | 15 | 4,14011 | — |
| HFJ | 12 | 15,833 | 16 | 4,65176191 | 0,401 | 18 | 13,278 | 13 | 3,57158 | 0,177 |
| HFI | 12 | 14,25 | 14 | 3,26917421 | 0,053 | 15 | 17,067 | 16 | 5,0394 | 0,387 |
| HVJ | 11 | 12,273 | 12 | 2,66597787 | 0,004 | 10 | 13,8 | 15,5 | 4,35431 | 0,432 |
| HVI | 9 | 15,444 | 15 | 2,71256791 | 0,244 | 12 | 14,583 | 15 | 3,45105 | 0,911 |
| Número de groomings | | | | | | | | | | |
| Grupo | N | Média | Mediana | SD | p | N | Média | Mediana | SD | p |
| Controle | 13 | 3,4615 | 3 | 1,0088367 | — | 11 | 3,0909 | 3 | 1,50481 | — |
| HFJ | 12 | 5,0833 | 4 | 2,59673941 | 0,057 | 18 | 4,2222 | 5 | 2,24983 | 0,165 |
| HFI | 12 | 3,0833 | 3 | 0,9537936 | 0,366 | 15 | 3,6667 | 4 | 1,81353 | 0,418 |
| HVJ | 11 | 3,0909 | 3 | 1,31110955 | 0,265 | 10 | 2,2 | 2 | 1,16619 | 0,182 |
| HVI | 9 | 2,3333 | 3 | 1,05409255 | 0,039 | 12 | 2,6667 | 2,5 | 1,49071 | 0,335 |
| Tempo no centro | | | | | | | | | | |
| Grupo | N | Média | Mediana | SD | p | N | Média | Mediana | SD | p |
| Controle | 13 | 50,231 | 52 | 10,7785674 | — | 11 | 50,727 | 56 | 16,8366 | — |
| HFJ | 12 | 41,333 | 44 | 13,4308931 | 0,092 | 18 | 44,444 | 46,5 | 21,7517 | 0,436 |
| HFI | 12 | 44,333 | 47,5 | 14,0376478 | 0,268 | 15 | 41,467 | 40 | 18,0919 | 0,214 |
| HVJ | 11 | 54,091 | 58 | 14,4124602 | 0,481 | 10 | 55,2 | 57,5 | 13,8694 | 0,537 |
| HVI | 9 | 64,111 | 68 | 19,9857974 | 0,16 | 12 | 66,25 | 67,5 | 15,4926 | 0,018 |
| Tempo na periferia | | | | | | | | | | |
| Grupo | N | Média | Mediana | SD | p | N | Média | Mediana | SD | p |
| Controle | 13 | 24,385 | 25 | 10,0425132 | — | 11 | 24,091 | 22 | 11,2206 | — |
| HFJ | 12 | 18 | 17,5 | 9,65228816 | 0,134 | 18 | 21,5 | 19 | 13,2256 | 0,606 |
| HFI | 12 | 19,917 | 20 | 6,78795911 | 0,228 | 15 | 24,933 | 21 | 11,1144 | 0,857 |
| HVJ | 11 | 22,182 | 21 | 9,59941458 | 0,606 | 10 | 26,9 | 28 | 13,457 | 0,626 |
| HVI | 9 | 25 | 29 | 12,4096736 | 0,904 | 12 | 32,667 | 29,5 | 10,443 | 0,143 |

| NADO FORÇADO | | | | | | | | | | |
|--------------------------------|----------|--------------|----------------|------------|----------|---------------|--------------|----------------|-----------|----------|
| Machos | | | | | | Fêmeas | | | | |
| Latência de imobilidade | | | | | | | | | | |
| Grupo | N | Média | Mediana | SD | p | N | Média | Mediana | SD | p |
| Controle | 12 | 66,5 | 65 | 22,7687652 | ___ | 11 | 76,818 | 65 | 29,2103 | ___ |
| HFJ | 11 | 80,545 | 77 | 21,9766969 | 0,166 | 18 | 84,167 | 81 | 29,8854 | 0,444 |
| HFI | 12 | 73,417 | 79 | 14,238787 | 0,402 | 12 | 75,833 | 73 | 22,2704 | 0,931 |
| HVJ | 13 | 70,923 | 70 | 22,8925972 | 0,647 | 10 | 97,1 | 87,5 | 33,2399 | 0,173 |
| HVI | 9 | 88,111 | 90 | 14,6548774 | 0,029 | 12 | 88,417 | 91,5 | 23,3112 | 0,425 |
| Tempo de nado | | | | | | | | | | |
| Grupo | N | Média | Mediana | SD | p | N | Média | Mediana | SD | p |
| Controle | 12 | 274,5 | 294,064 | 52,936303 | ___ | 11 | 288,12 | 308,177 | 45,9345 | ___ |
| HFJ | 11 | 227,14 | 205,065 | 67,9612873 | 0,088 | 18 | 237,82 | 233,0905 | 51,1843 | 0,016 |
| HFI | 12 | 238,69 | 248,3555 | 36,451903 | 0,046 | 12 | 266,98 | 256,334 | 49,3978 | 0,323 |
| HVJ | 13 | 248,29 | 250 | 49,4222877 | 0,232 | 10 | 277,44 | 276,899 | 44,4372 | 0,613 |
| HVI | 9 | 279,63 | 278 | 32,0793293 | 0,81 | 12 | 279,7 | 295,492 | 59,9725 | 0,793 |
| Frequência de climbing | | | | | | | | | | |
| Grupo | N | Média | Mediana | SD | p | N | Média | Mediana | SD | p |
| Controle | 12 | 9,25 | 8 | 4,63905522 | ___ | 11 | 13,182 | 12 | 6,39344 | ___ |
| HFJ | 11 | 13,909 | 14 | 3,77683238 | 0,019 | 18 | 12,944 | 13 | 6,43318 | 0,926 |
| HFI | 12 | 13,667 | 13 | 4,26874949 | 0,03 | 12 | 13,417 | 13,5 | 7,18167 | 0,938 |
| HVJ | 13 | 15,231 | 13 | 5,27918767 | 0,005 | 10 | 13,9 | 13 | 6,64003 | 0,813 |
| HVI | 9 | 16,778 | 17 | 3,96590407 | 0,001 | 12 | 16,083 | 14,5 | 7,54385 | 0,286 |
| Tempo de climbing | | | | | | | | | | |
| Grupo | N | Média | Mediana | SD | p | N | Média | Mediana | SD | p |
| Controle | 12 | 4,8339 | 4,1275 | 2,1726479 | ___ | 11 | 10,064 | 6,218 | 7,59729 | ___ |
| HFJ | 11 | 8,6735 | 8,597 | 3,87402577 | 0,01 | 18 | 8,8525 | 8,152 | 6,31908 | 0,605 |
| HFI | 12 | 7,241 | 7,9015 | 2,65103241 | 0,029 | 12 | 9,6602 | 6,688 | 7,75134 | 0,926 |
| HVJ | 13 | 8,2624 | 6,496 | 3,25603321 | 0,028 | 10 | 10,438 | 10,297 | 6,70633 | 0,972 |
| HVI | 9 | 9,0994 | 8,21 | 3,02394092 | 0,002 | 12 | 10,421 | 8,05 | 6,17644 | 0,555 |