

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia

Beatriz Campos Codo

EFEITOS DO ESTRESSE POR SEPARAÇÃO MATERNAL NO COMPORTAMENTO
DE CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS PRÉ-PÚBERES *WILD-TYPE* OU
CX3CR1-GFP HETEROZIGOTOS

Belo Horizonte
2023

Beatriz Campos Codo

EFEITOS DO ESTRESSE POR SEPARAÇÃO MATERNAL NO COMPORTAMENTO
DE CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS PRÉ-PÚBERES *WILD-TYPE* OU
CX3CR1-GFP HETEROZIGOTOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Rezende de Souza

Belo Horizonte

2023

043

Codo, Beatriz Campos.

Efeitos do estresse por separação maternal no comportamento de camundongos machos e fêmeas pré-púberes WILD-TYPE ou CX3CR1-GFP heterozigotos [manuscrito] / Beatriz Campos Codo. – 2023.

105 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. Fisiologia. 2. Privação Materna. 3. Estresse Fisiológico. 4. Microglia. I. Souza, Bruno Rezende de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE Mestrado N° 576 DE BEATRIZ CAMPOS CODO

Às 14:00 horas do dia 25 do mês de setembro de 2023, na Sala de seminários G4-23, ICB/UFMG, realizou-se a sessão pública para a defesa da Dissertação de **Beatriz Campos Codo**. A presidência da sessão coube ao **Prof. Dr. Bruno Rezende de Souza**, orientador. Inicialmente, o presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **Prof. Dr. Bruno Rezende de Souza**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, **Prof. Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, **Prof. Dr. Cleiton Lopes Aguiar**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, e **Prof. Dr. Bruno Rezende de Souza**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, orientador. Em seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Dissertação de Mestrado**, intitulada: "**Efeitos do Estresse por Separação Maternal no Comportamento de Camundongos Machos e Fêmeas Pré-púberes Wild-type Ou Cx3cr1-gfp Heterozigotos**". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público e decidiu considerar **APROVADA** a Dissertação de Mestrado. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pelo presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 25 de setembro de 2023.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Cleiton Lopes Aguiar, Professor do Magistério Superior**, em 29/09/2023, às 11:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Rezende de Souza, Professor do Magistério Superior**, em 29/09/2023, às 17:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Antonio Carlos Pinheiro de Oliveira, Professor do Magistério Superior**, em 11/10/2023, às 06:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



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 **2670076** e o código CRC **81B2D6A9**.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISILOGIA E FARMACOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO N° 576 DE BEATRIZ CAMPOS CODO

"Efeitos do Estresse por Separação Maternal no Comportamento de Camundongos Machos e Fêmeas Pré-púberes Wild-type Ou Cx3cr1-gfp Heterozigotos"

Aluna: Beatriz Campos Codo

Orientador: Bruno Rezende de Souza

"Efeitos do Estresse por Separação Maternal no Comportamento de Camundongos Machos e Fêmeas Pré-púberes Wild-type Ou Cx3cr1-gfp Heterozigotos"

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **25 de setembro de 2023**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

Prof. Dr. Cleiton Lopes Aguiar - ICB/UFMG

Prof. Dr. Bruno Rezende de Souza - ICB/UFMG

Prof. Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira - ICB/UFMG

Belo Horizonte, 25 de setembro de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Cleiton Lopes Aguiar, Professor do Magistério Superior**, em 29/09/2023, às 11:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Rezende de Souza, Professor do Magistério Superior**, em 29/09/2023, às 17:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Antonio Carlos Pinheiro de Oliveira, Professor do Magistério Superior**, em 11/10/2023, às 06:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



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 **2670080** e o código CRC **7D3C1C2E**.

AGRADECIMENTOS

Uma parte de mim sempre fica surpresa por esse ser o meu emprego e que eu posso trabalhar em algo que gosto tanto: fazer experimentos, estudar, ler artigos, discutir ciência, escrever, trocar experiências, aprender. Estou muito feliz de terminar mais essa etapa da minha trajetória e gostaria de agradecer todas as pessoas sem as quais isso não teria sido possível. Foram 3 anos e meio de mestrado, e 8 anos e meio de trajetória neste laboratório, anos cheios de experiências e momentos muito loucos e maravilhosos. Por trás de cada trabalho, há uma equipe trabalhando para o fazer acontecer. Gostaria de agradecer todos que tornaram essa dissertação possível. Alguns de nós têm uma pessoa que os influenciou mais do que ninguém. Eu sou grata de ter muitas. E por causa de todas essas pessoas eu estou aqui hoje, defendendo meu mestrado. Depois de tantos anos, há sempre mais pessoas para agradecer do que consigo me lembrar. Espero que não tenha esquecido ninguém, mas se eu esqueci alguém, não é por não ser importante.

Bruno, obrigada por mudar minha vida no dia 14 de maio de 2015. Depois de me dar aula em 2014, e de eu te mandar vários e-mails sobre neurociências, você decidiu me dar uma chance de trabalhar com pesquisa básica sendo sua aluna de iniciação científica. Quando te contei qual era meu sonho, você imediatamente me ofereceu um plano e isso significou muito para mim e continua significando. Isso deu início à trajetória profissional mais bizarra e maravilhosa da minha vida. Obrigada por sua compreensão, sua paciência, seu apoio, sua orientação e sua animação genuína com o trabalho que estamos fazendo. Obrigada pelo apoio em prazos apertados e por me deixar assumir riscos. Agradeço a liberdade que tenho no laboratório e pelas reuniões de brainstorm e discussão de resultados. Tenho sorte de você ter apostado em mim e por toda sua experiência. Obrigada por acreditar em mim e me ajudar a melhorar sempre, me fazer uma cientista melhor. Eu não seria a cientista que sou sem sua orientação nos últimos 8 anos e meio. Não consigo imaginar todo trabalho que te dei ao longo do tempo. Obrigada pelo seu empenho na minha carreira, na sua crença no meu futuro, e na nossa relação. Obrigada pela amizade, risadas, por todos os momentos juntos, e por me fazer seguir em frente quando eu não sabia se ia conseguir dar conta. Adorei ter feito minha iniciação científica e mestrado com você, trabalhar com você, criar isso juntos, e desenvolver uma amizade e parceria verdadeiramente significativas e integrar sua equipe. Se meu sonho se tornou realidade, é por sua culpa.

Ramon, obrigada pelo seu apoio, paciência e amizade. Eu te admiro e sou grata pela forma como seu cérebro funciona. Sem você, não teria conseguido chegar aonde estou hoje. Obrigada por ser minha base, meu patinho de borracha e por toda ajuda nos meses de loucura de analisar vídeos e fazer mil tabelas. Obrigada por me ouvir, por me ajudar a pensar em soluções, por me fazer companhia, por me impulsionar a ser melhor, por ser um porto seguro e por me amar sempre.

Flávio, obrigada por me deixar te incomodar repetidamente e por me incomodar repetidamente também (mas muito menos do que eu te incomodei). Obrigada por sempre rir dos meus surtos, me deixar rir dos seus, me ouvir e insistir que eu fosse atrás do que é melhor para mim. Obrigada por brigar comigo quando fui irracional e por estar lá quando eu precisava. Obrigada por me encorajar sempre, pelas pausas para chips e amendoim, por toda loucura do Bonsai, e fotos do Davi. Eu valorizo muito sua amizade, e sinto te informar que mesmo mudando, você não vai se livrar de mim tão cedo.

Mãe e pai, obrigada pela constância de vocês, que me permitiu correr riscos. Obrigada por sempre dizerem que eu conseguiria fazer o que eu quisesse e me fazerem acreditar nisso. Obrigada por terem sido pacientes enquanto eu me encontrava e por me amarem independente de tudo. Obrigada por segurarem minha mão, me impulsionarem, me guiarem nas loucuras, e me lembrarem quando eu deveria estar orgulhosa de mim. Obrigada por me amarem sempre e pela forma como vocês me criaram. Tudo que eu sou, eu devo a vocês. Mãe, te admiro horrores e espero um dia ser pelo menos metade da mulher que você é. Obrigada pelo apoio e amizade. Seu exemplo moldou a mulher que sou hoje. Pai, sinto saudades de você todo dia e gostaria muito que você estivesse aqui. Para as risadas, as conversas na varanda e até as brigas, pelo apoio incondicional. Me sinto extremamente sortuda de ter nascido filha de vocês.

Ju, Dé e Paulo, obrigada por serem meus irmãos, pela amizade e apoio o tempo todo, mesmo de longe, pelo humor de vocês, pela compreensão empática, e por fazerem todos os momentos de família serem momentos divertidos. Obrigada por estarem sempre comigo. Ju, com seus livros e contos, amor por zebrafish, amigos secretos e humor. Dé, com seus memes, trocas de livros de fantasia e surtos, videogames, mudanças e visitas. Paulo, nas loucuras de biotério, nas conversas de luto e nos jogos de tabuleiro. E muito mais. Vocês são seres humanos incríveis que admiro muito e me sinto sortuda de poder chamar vocês de irmãos.

Ana, obrigada por ser a melhor irmã gêmea que alguém poderia ter. Obrigada pelo seu tempo, pelo seu apoio, pela sua disponibilidade, pelo trabalho, por ler manuscritos de madrugada, pelos surtos compartilhados, pelos memes e mensagens aleatórias, os testes do BuzzFeed, presentinhos e puxões de orelha, por sempre acreditar em mim muito mais do que eu acreditei. Obrigada por me fazer ser melhor o tempo todo. Eu te admiro demais e espero um dia ser incrível como você. Sou grata de ter você em minha vida sempre, mesmo à distância, do útero ao túmulo.

Josi, obrigada pela amizade mesmo com a distância. Obrigada por sempre arrumar tempo para me mandar cartas e ler as minhas cartas, mesmo com a correria do dia a dia. Obrigada pela sua amizade constante, mesmo quando passávamos tempo sem nos falarmos. Vivemos sempre com saudades, mas nunca sem amor e encorajamento. Obrigada por estar sempre presente e por aceitar entrar na minha família, e por todo impacto que você teve na minha trajetória.

Todos meus amigos que estiveram comigo ao longo dessa jornada, lidando com o caos, trazendo momentos de alegria e transformando BH na minha casa, obrigada por existirem. Becker, Cams, Didi, pessoal da Enactus e amigos do PPG FisFar. Simões, meu eterno irmão mais velho. Me sinto honrada de ter vocês em minha vida. Não sei o que fiz para merecer vocês, mas espero continuar fazendo. Obrigada por me fazerem rir e por transformarem minha vida. Obrigada por me acompanharem nessa trajetória, com amor, mensagens, rolês e companhia.

Lara, obrigada por ser a melhor companheira de casa que já existiu, além da melhor mãe de pet do mundo. Te admiro muito. Obrigada pelo apoio, pela paciência, pelas palavras cruzadas, receitas loucas, montagem de móveis e por ser a melhor companheira de quarentena que eu poderia pedir ao universo. Obrigada por fazer da nossa casa um lar, e estar sempre disponível, mas também por respeitar meu espaço. Não é fácil achar alguém que as coisas funcionem tão bem para morar junto e me sinto sortuda por ter achado você.

Integrantes do NeuroDEv, me sinto honrada e grata de fazer parte da sua equipe. Esse trabalho não existiria sem vocês. Gosto muito de fazer parte desse grupo e me sinto sortuda por trabalhar com pessoas tão competentes, inteligentes, criativas, motivadas e talentosas. Muiara, obrigada por ser minha mãe científica e me ensinar a ser cuidadosa com testes comportamentais, e por ser minha amiga em todos os surtos, conquistas e pudins. Laila, sou muito grata de ter você ao meu lado desde que comecei minha trajetória no laboratório, amei trabalhar com você e continuo amando

trocar figurinhas, artigos e fofocas com você. Obrigada pelo apoio emocional e científico, mas acima de tudo, pela sua amizade. Bruna, obrigada por toda ajuda, seja nas mensagens, séries e filmes, rolês e saídas clandestinas, e por todos os comportamentos que você me ajudou enquanto eu estava no Canadá. Obrigada por ser minha amiga e parceira científica. Duda, obrigada por me aceitar como amiga e mentora, pelas idas à academia, pelos surtos compartilhados, e por toda sua bondade e encorajamento. Maracia, João e André, obrigada pela amizade, risadas e por transformarem o ambiente do laboratório em um local divertido e gostoso de estar, muito melhor que eu sempre sonhei. No geral, obrigada a todos os alunos do NeuroDEv por tudo, vocês são ótimos de serviço, amam fazer ciência e me fazem me sentir amparada sempre. A cada ano que passei no laboratório, a lista de pessoas a agradecer aumentou, o que torna muito difícil conseguir agradecer um a um. Ana Luiza, Matheus, Paula, Sofia, Lorena, Lu, Laura, Sasha, entre muitos outros. Mas gostaria de ressaltar que vocês todos desempenharam papéis fundamentais na minha trajetória e serei eternamente grata. Tenho sorte de trabalhar e aprender constantemente com vocês. Obrigada por acreditarem em mim e pelos anos de amizade. Obrigada por serem cientistas que admiro e, mais importante ainda, obrigada por serem amigos que ouvem, encorajam e celebram junto as conquistas. Só posso esperar ter feito por vocês uma pequena parte do que fizeram por mim.

Todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia, especialmente o professor André Oliveira, e ao professor Renan Pedra da Genética, obrigada por transformarem minha trajetória, me desafiando, ensinando sempre, e contribuindo substancialmente para meu desenvolvimento. Obrigada aos professores do Comitê de Acompanhamento de Estudantes, por me ajudarem durante as turbulências e trocas de projeto de última hora, e acomodarem minhas necessidades quando precisei de extensão de prazo.

Técnicos administrativos, esse trabalho não existiria sem vocês. Aos técnicos do biotério, obrigada pelos cuidados, por estarem sempre disponíveis a ajudar e por tornarem possível que façamos experimentos com animais. Aos técnicos do PPG FisFar, obrigada por ajudarem em todos os detalhes burocráticos e dúvidas bobas, e por tornarem possível que a pós-graduação exista e funcione.

Ana Carolina, obrigada por ser a melhor psicóloga possível. Eu não seria quem eu sou ou teria chegado aqui sem você. Obrigada pelo seu esforço, atenção, paciência e cuidado. Obrigada pelo apoio emocional, respeito e por ser tão boa na sua profissão.

A sua disposição e confiança em mim me tornaram uma pessoa melhor. Não seria possível encaram a pós-graduação, especialmente em uma pandemia, sem seus cuidados. E obrigada aos Dr. Ana Emília e Luciano pelo apoio psiquiátrico.

Por último, mas não menos importante, esse trabalho não seria possível sem o apoio das agências de fomento, CNPq, CAPES, FAPEMIG, ISN e ELAP. E não seria possível sem o apoio do SciHub.

Enfim, obrigada a todos, do fundo do meu coração privado de sono, ansioso e eternamente grato.

RESUMO

O estresse crônico no início do desenvolvimento leva a alterações fisiológicas e comportamentais, sendo que algumas dessas alterações podem perdurar até a adolescência ou vida adulta. A exposição ao estresse pós-natal é fator de risco no desenvolvimento de diversos transtornos neuropsiquiátricos, como transtornos de ansiedade, de humor, e alimentares. O desenvolvimento do cérebro, assim como a resposta ao estresse, é de uma integração de diversos sistemas além do sistema nervoso, e tipos celulares além dos neurônios. As células gliais têm participação intensa na manutenção da homeostase. Em particular, as microglias exercem vários papéis fundamentais durante o neurodesenvolvimento. Um dos principais atores da comunicação microglias-neurônios é o receptor CX3CR1, presentes nas microglias. O animal CX3CR1-GFP heterozigoto (CX3CR1-GFP^{+/-}) é utilizado nas pesquisas para estudo das respostas ao estresse na morfologia e funcionalidade de microglias. Porém, pouco se sabe sobre os efeitos comportamentais do estresse de separação maternal nesses animais, bem como a comparação desses efeitos entre estes animais e animais *wild-type*. Assim, neste trabalho, expomos animais CX3CR1GFP^{+/-} e animais *wild-type*, machos e fêmeas, a 13 dias de separação maternal de 180 minutos, durante 13 dias. No início da adolescência, os animais foram submetidos a testes de comportamento exploratório, tipo-ansioso e tipo-depressivo. Nós observamos que animais CX3CR1-GFP^{+/-} apresentaram maior comportamento exploratório e tipo-ansioso do que animais *wild-type*. Os animais que passaram pela separação maternal apresentaram menor comportamento tipo-depressivo do que animais controle. Machos apresentaram maior comportamento tipo-ansioso e menor comportamento exploratório do que fêmeas. Não encontramos diferenças entre os grupos nos testes de post-hoc de nenhum desses fatores. Isso demonstra que precisamos aumentar nosso número amostral. A princípio, nossos resultados sugerem que a separação maternal levou a um efeito sutil de resiliência em camundongos pré-púberes; que animais CX3CR1-GFP^{+/-} apresentam fenótipos comportamentais diferentes de animais *wild-type* que devem ser considerados ao planejar experimentos; e machos e fêmeas pré-púberes apresentam comportamento tipo-ansioso sexualmente dimórfico. Mais estudos precisam ser feitos para entender melhor como esses fatores resultam nos fenótipos comportamentais observados.

Palavras-chave: Estresse. Separação Maternal. Microglias. CX3CR1-GFP. Comportamento.

ABSTRACT

Chronic early-life stress leads to physiological and behavioral alterations, with some of these changes persisting into adolescence or adulthood. Postnatal stress exposure is a risk factor in the development of various neuropsychiatric disorders, such as anxiety, mood, and eating disorders. Brain development and stress response involve the integration of diverse systems beyond the nervous system and cell types beyond neurons. Glial cells play a significant role in maintaining homeostasis. Microglia play multiple fundamental roles during neurodevelopment. A key player in microglia-neuron communication is the CX3CR1 receptor, present in microglia. The heterozygous CX3CR1-GFP animal (CX3CR1-GFP^{+/-}) is widely used in research to study stress responses in microglial morphology and functionality. However, little is known about the behavioral effects of maternal separation stress in these animals and the comparison of these effects between these animals and wild-type animals. In this study, we exposed CX3CR1GFP^{+/-} animals and wild-type animals, both males and females, to 180 minutes of maternal separation early in life for 13 days. The animals underwent exploratory, anxiety-like, and depressive-like behavioral tests in early adolescence. We observed that CX3CR1-GFP^{+/-} animals exhibited higher exploratory behavior and anxiety-like behavior than wild-type animals. Animals that experienced maternal separation displayed lower depressive-like behavior than animals that did not were submitted stress. Furthermore, males exhibited higher anxiety-like behavior and lower exploratory behavior than females. We did not find any differences between any groups in the post-hoc test. This shows we need to increase the number of animals per group. Our findings suggest that maternal separation led to a subtle resilience effect in prepubertal mice; that CX3CR1-GFP^{+/-} animals exhibit distinct behavioral phenotypes from wild-type animals that should be considered when designing experiments; and that prepubertal males and females display sexually dimorphic anxiety-like behavior. Further studies are needed to better understand how these factors contribute to the observed behavioral phenotypes.

Keywords: Stress. Maternal separation. Microglia. CX3CR1-GFP. Behaviour.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema dos procedimentos experimentais.....	31
Figura 2: Exemplo da análise comportamental no software Bonsai em um vídeo de Teste de Campo Aberto	34
Figura 3: Máscaras para análise comportamental do Teste de Campo Aberto	35
Figura 4: Máscaras para análise comportamental do Labirinto em Cruz Elevado....	35
Figura 5: Efeitos do protocolo de separação maternal no comportamento exploratório no Teste de Campo Aberto de camundongos machos e fêmeas pré-púberes wild-type ou CX3CR1-GFP+/-	39
Figura 6: Efeitos do protocolo de separação maternal no comportamento de aversão na Caixa de Claro/Escuro de camundongos machos e fêmeas pré-púberes wild-type ou CX3CR1-GFP+/-	41
Figura 7: Efeitos do protocolo de separação maternal no comportamento tipo-ansioso no Labirinto em Cruz Elevado de camundongos machos e fêmeas pré-púberes wild-type ou CX3CR1-GFP+/-.....	44
Figura 8: Efeitos do protocolo de separação maternal no comportamento de desamparo aprendido no Teste de Nado Forçado de camundongos machos e fêmeas pré-púberes wild-type ou CX3CR1-GFP+/-	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Grupos Experimentais.....	30
Tabela 2: Estatística do Teste de Campo Aberto	39
Tabela 3: Estatística da Caixa de Claro/Escuro	41
Tabela 4: Estatística do Labirinto em Cruz Elevado	43
Tabela 5: Dados de latência para primeiro episódio de imobilidade no Teste de Nado Forçado	46
Tabela 6: Estatística do Teste de Nado Forçado	47
Tabela 7: Resumo dos parâmetros alterados por teste comportamental na análise de fatores por modelo de regressão linear de efeito aleatório	50
Tabela 8: Estatística do teste de Shapiro-Wilk.....	68
Tabela 9: Estatística Descritiva Teste Campo Aberto.....	68
Tabela 10: Post-hoc Teste de Campo Aberto.....	70
Tabela 11: Estatística Descritiva Caixa Claro/Escuro	74
Tabela 12: Estatística Descritiva Labirinto em Cruz Elevado	75
Tabela 13: Post-hoc Labirinto em Cruz Elevado.....	76
Tabela 14: Estatística Descritiva Teste de Nado Forçado.....	83
Tabela 15: Post-hoc Teste de Nado Forçado.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS

CX3C chemokine receptor 1 – CX3CR1.

CX3CR1-GFP+/- – Animais CX3CR1-GFP-heterozigotos.

Eixo HPA – Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal.

IC – Intervalo de Confiança.

SM – Separação maternal.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Estresse	19
1.2. Estresse e neurodesenvolvimento	20
1.3. Neurodesenvolvimento e microglias	22
1.4. Microglias e estresse	24
1.5. Estresse e receptores CX3CR1	25
2. OBJETIVOS	28
2.1. Objetivos específicos	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1. Animais Experimentais	29
3.2. Protocolo de Separação Maternal	29
3.3. Desenho Experimental	30
3.4. Testes Comportamentais	31
3.4.1. Campo Aberto.....	31
3.4.2. Caixa Claro/Escuro	32
3.4.3. Labirinto em Cruz Elevado	32
3.4.4. Teste de Nado Forçado	33
3.4.5. Análise dos Testes Comportamentais.....	33
3.5. Análise Estatística	36
4. RESULTADOS	37
4.1. Animais CX3CR1-GFP+/- demonstraram diminuição na distância percorrida no Teste do Campo Aberto; animais que passaram pela separação maternal demonstraram aumento no tempo que permaneceram nos quadrantes das periferias.	37
4.2. Nenhum grupo apresentou diferença em parâmetros de comportamento de tipo-ansioso na Caixa de Claro/Escuro	39

4.4. Machos apresentaram maior tempo e frequência de <i>climbings</i> em relação às fêmeas no Teste do Nado Forçado; animais que foram submetidos à separação maternal passaram menos tempo em imobilidade.	45
5. DISCUSSÃO	49
6. CONCLUSÃO	57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
ANEXO 1: Tabelas Estatística Descritiva	68
ANEXO 2: Scripts <i>Software R</i> (versão 4.3.1.) para os Modelos de Regressão Linear com Efeito Aleatório e Post-hoc.....	90
Script Teste Campo Aberto	90
Script Caixa Claro/Escuro	92
Script Labirinto em Cruz Elevado	93
Script Teste do Nado Forçado	96
Anexo 3: Diagnóstico Modelo de Regressão Linear com Efeito Aleatório	99
Diagnóstico Teste do Campo Aberto	99
Diagnóstico Caixa Claro/Escuro	100
Diagnóstico Labirinto em Cruz Elevado	101
Diagnóstico Teste do Nado Forçado	102

1. INTRODUÇÃO

1.1. Estresse

Estamos constantemente interagindo com o que acontece no ambiente à nossa volta. Nosso corpo reage a mudanças internas e externas gerando respostas sistêmicas. O estudo do estresse reconhece principalmente uma interação entre diversos sistemas na manutenção da homeostase.

Em 1914, Walter Bradford Cannon introduziu pela primeira vez o conceito de homeostase e estresse biológico. De acordo com esses conceitos, o corpo reage a estímulos físicos, químicos ou psicológicos, se adaptando e mantendo condições ideais de equilíbrio – a homeostase. Estímulos que perturbam a homeostase são considerados estressores (Cannon, 1914). Alguns anos depois, Hans Selye explorou esses conceitos e, baseando-se em observações de pacientes e experimentação animal, demonstrou que diferentes estímulos aversivos levam a efeitos fisiológicos e metabólicos. A partir dessas observações, ele descreveu a “Síndrome Geral de Adaptação” (Selye, 1936). Para Selye, a resposta corporal ao estresse era não específica, levando à mesma resposta fisiológica independente do estímulo estressor (Selye, 1975). Hoje sabemos vários fatores influenciam essas respostas, como espécie, genética, epigenética, sexo, ambiente e fases do desenvolvimento (Sapolsky, 1994; Egan et al., 2009; Charil et al., 2010; Clarke et al., 2012; Even et al., 2012). Além disso, a antecipação de um potencial estressor também pode levar a respostas sistêmicas (Sapolsky, 2015). Portanto, ainda que o corpo tenha reações características ao estresse, diferenças individuais também exercem influência na reação ao estresse.

Estresse é definido como a interrupção da homeostase provocada por estímulos ambientais, psicológicos ou fisiológicos. A homeostase não se trata, porém, de condições ideais de equilíbrio fixas, mas diferentes condições ideais para diferentes contextos (Goldstein and Kopin, 2007). Esse processo ativo de adaptação em resposta a estressores é conhecido como alostase. A resposta ao estresse é regulada pelos sistemas gastrointestinal, imunológico, cardiovascular, endócrino, renal e neural (Black and Garbutt, 2002; Marketon and Glaser, 2008; Steptoe and Kivimäki, 2012; Sapolsky, 2015). Quando há sucessivas exposições a estressores, o efeito cumulativo dessas exposições é considerado carga alostática.

Em resposta a um estresse agudo, as principais respostas estão ligadas à ativação do sistema nervoso simpático – aumento do metabolismo, ritmo cardiovascular e respiratório, inibição dos sistemas reprodutor, gastrointestinal e imunológico – e da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (Sapolsky, 2015). No estresse agudo, ocorre a ativação do eixo HPA, que leva à liberação de glicocorticoides na corrente sanguínea. Essa liberação é regulada por *feedback* negativo, de forma que alta concentração de glicocorticoides inibe sua secreção. Diversas regiões do cérebro participam da regulação do eixo HPA, como hipocampo ventral, amígdala e córtex pré-frontal medial (Sapolsky, 2004; Kazakou et al., 2022).

Quando expostos a estresse crônico, é possível que os organismos gerem respostas mal adaptativas, consequentes de alta carga alostática. As principais respostas estão ligadas à desregulação do *feedback* negativo do eixo HPA, como níveis sistêmicos de cortisol reduzidos, excesso de produção de corticotrofina, modificação na expressão de receptores de glicocorticoides, e respostas exageradas do eixo HPA (Parker et al., 2003; Grissom and Bhatnagar, 2009; Gray et al., 2014; Sapolsky, 2015; Pan et al., 2018). Além disso, o estresse crônico aumenta o risco do desenvolvimento de transtornos psiquiátricos, como ansiedade, depressão, transtornos de alimentação, assim como de doenças neurodegenerativas (McEwen, 1998; Matuszewich et al., 2007; Costa-Mattioli and Walter, 2020; Goncharova, 2020; Hill et al., 2021; Sanacora et al., 2022).

Muitas das consequências do estresse crônico podem ser duradouras ou perdurar durante longos períodos. O estresse crônico pode levar a alterações comportamentais e fisiológicas, que diferem dependendo da fase do desenvolvimento. Algumas consequências do estresse crônico no início do desenvolvimento podem se manter até a vida adulta. Desta forma, é importante entendermos como o cérebro em desenvolvimento responde ao estresse.

1.2. Estresse e neurodesenvolvimento

O desenvolvimento do cérebro é um processo complexo que começa no início da gestação e segue até o final da adolescência. Parte deste processo é codificado geneticamente, mas estímulos ambientais têm papéis fundamentais na adaptação e construção dos circuitos neurais.

O fim da gestação e início do desenvolvimento pós-natal são marcados por sinaptogênese e mielinização, que continuam até o fim da adolescência, assim como por eventos de poda sináptica – promovendo refinamento e reorganização dos circuitos cerebrais (Marsh et al., 2008; Stiles and Jernigan, 2010). Essa reorganização prolongada do desenvolvimento torna possível que exposições ambientais em janelas específicos afetem a plasticidade neural e modifiquem o comportamento a longo prazo. Por exemplo, o ato de brincar durante o início do desenvolvimento facilita o treinamento motor e o desenvolvimento do sistema musculoesquelético ao modular a plasticidade na conectividade neural local (Montgomery, 2014). Por outro lado, o estresse crônico no início do desenvolvimento leva a alterações fisiológicas e morfológicas, como diminuição do volume do hipocampo e córtex pré-frontal, e prejuízo na maturação do hipocampo e do eixo HPA (Hart and Rubia, 2012; Dahmen et al., 2018).

Durante este período pós-natal, o eixo HPA passa por uma fase conhecida como "período hiporresponsivo ao estresse", que ocorre nos primeiros anos de desenvolvimento, nos humanos, e entre o segundo e décimo quarto dia pós-natal em roedores. Essa fase é caracterizada por um estado de hiperresponsividade do eixo HPA (Kazakou et al., 2022; Pervanidou et al., 2022). O cuidado materno exerce papel fundamental em reduzir essa hiperativação do eixo HPA, e sua interrupção pode levar a diversas consequências de desregulação do eixo HPA a longo prazo (Francis and Meaney, 1999; Tang et al., 2014). Baseado nisso, um dos protocolos mais utilizados hoje para o estudo do estresse crônico no início do desenvolvimento é o protocolo de separação maternal. Primeiramente introduzido por Meaney e Plotsky em 1993, este protocolo envolve a separação de filhotes de suas mães por períodos superiores a 180 minutos diariamente durante o segundo ao décimo quarto dia pós-natal. Quando adultos, ratos expostos à separação maternal apresentaram maior quantidade de corticotrofina no hipotálamo e alterações na quantidade de corticosterona no plasma (Plotsky and Meaney, 1993). Hoje, este protocolo é amplamente utilizado na pesquisa de efeitos de estresse pós-natal, e existem variações quanto ao tempo de separação, condições de isolamento, e fases do desenvolvimento (Tractenberg et al., 2016). A separação maternal está associada ao aumento de comportamentos tipo-ansioso e tipo-depressivo/comportamento de desamparo, e déficit de memória e preferência social na fase adulta em camundongos e ratos (Tofoli et al., 2011; Kindsvatter and Geroski, 2014; Sapolsky, 2015; Tractenberg et al., 2016). Além disso, o estresse

crônico no início do desenvolvimento leva a alterações em comportamento tipo-ansioso e agressivo, além de prejuízos na maturação do hipocampo em camundongos C57BL6/J adolescentes (Shin et al., 2016; He et al., 2020).

A adolescência é considerada um período crítico marcado por mudanças estruturais, neuroquímicas e moleculares, incluindo períodos de poda sináptica e formação de novas conexões neurais. Essa reorganização neuronal torna o cérebro particularmente vulnerável a influências ambientais, como estresse. Esse também é o período com maior incidência de início de transtornos psiquiátricos, como esquizofrenia e transtornos de ansiedade e humor (Sapolsky et al., 1996; Matuszewich et al., 2007; Tofoli et al., 2011; Sanacora et al., 2022). A adolescência é marcada por características comportamentais específicas, como variações emocionais e impulsividade (Laviola et al., 2003). Ratos e camundongos na adolescência apresentam diferenças em relação aos adultos em termos de comportamento tipo-ansioso, busca por novidade e reação ao estresse (Laviola et al., 2003; Hefner and Holmes, 2007; Lander et al., 2017). Camundongos C57BL6/J demonstraram diferenças em várias medidas de condicionamento ao medo, comportamento tipo-ansioso e comportamento tipo-depressivo de juvenis até a idade adulta (Hefner and Holmes, 2007).

Para entendermos melhor essa constante reorganização dos circuitos neurais e suas respostas a estresse durante diferentes fases do desenvolvimento, é imprescindível olhar o papel de outras células do sistema nervoso central além dos neurônios.

1.3. Neurodesenvolvimento e microglias

As microglias são células imunes residentes do sistema nervoso central que possuem origem independente e são caracterizadas por marcadores celulares e de expressão proteica próprios (Butovsky et al., 2014). Elas estão em contato direto com neurônios e outras células gliais no sistema nervoso central. Durante o neurodesenvolvimento, elas atuam principalmente na morte natural programada, na poda sináptica e na formação de redes neurais (Mosser et al., 2017).

Na morte natural programada, as microglias atuam na regulação da morte e sobrevivência celular. Além de fagocitarem neurônios que passaram por apoptose, elas desempenham um papel ativo na indução da morte celular, por meio da liberação

de mediadores que induzem a apoptose ou fagocitando células precursoras neurais (Ashwell, 1990; Brown and Neher, 2014). As microglias também sustentam a sobrevivência, a proliferação e o desenvolvimento neuronal, liberando fatores neurotróficos que promovem a sobrevivência e o crescimento de neurônios (Biber et al., 2007; Sierra et al., 2010). Elas liberam fatores que aumentam a captação de neurotransmissores, promovem o crescimento de neuritos e aumentam a proliferação de células cerebelares granulares e neurônios corticais (Biber et al., 2007; Mosser et al., 2017). Em resumo, as microglias regulam a morte e sobrevivência celular durante o desenvolvimento do sistema nervoso central, atuando como fagócitos que removem células mortas e como mediadores da morte e do desenvolvimento neuronal.

Na poda sináptica, as microgliais auxiliam na regulação da morte e sobrevivência neuronal, bem como no refinamento de redes sinápticas através da eliminação seletiva de sinapses inapropriadas e da maturação funcional das sinapses restantes (Lewis, 2011; Paolicelli et al., 2011). Elas participam da orientação do crescimento axonal e na distribuição de interneurônios inibitórios (Hong et al., 2016; Mosser et al., 2017). Elas reconhecem elementos pré-sinápticos por meio do sistema complemento e eliminam botões sinápticos, englobando-os (Sakai, 2020; Mordelt and de Witte, 2023). Assim, elas contribuem para o refinamento, formação e maturação sináptica. Essa contribuição é mediada pela fagocitose de elementos sinápticos e liberação de mediadores específicos (Wake et al., 2013). Em resumo, as células microgliais desempenham um papel crucial na organização e maturação das redes sinápticas durante o desenvolvimento do sistema nervoso central.

Na formação de redes neuronais, as microglias atuam na conectividade de terminais sinápticos, fenda sináptica e espinhas dendríticas, sendo inclusive capazes de promover sinapses (Hanisch and Kettenmann, 2007). Assim, elas são importantes para plasticidade sináptica. Por exemplo, a interação neurônio-microglia influencia a densidade de espinhas dendríticas (Antony et al., 2011). Alterações de longo prazo nas redes sinápticas podem ocorrer por meio de liberação excessiva de mediadores pró-inflamatórios ou interferência nas funções microgliais normais (Béchade et al., 2013; Mosser et al., 2017). Em resumo, as microglias atuam no refinamento de circuitos neurais e na maturação das sinapses.

As microglias estão constantemente monitorando o ambiente, reconhecendo padrões moleculares, e se adaptando de acordo com os estímulos (Sierra et al., 2014). Elas são altamente sensíveis a mudanças ambientais, podendo influenciar o

comportamento. Desta forma, é importante estudarmos como estímulos estressores no início do desenvolvimento podem influenciar o funcionamento de microglias e, conseqüentemente, o desenvolvimento dos circuitos neurais.

1.4. Microglias e estresse

As microglias respondem de várias maneiras dependendo do contexto e das mudanças no ambiente do sistema nervoso central (Paolicelli et al., 2022). A exposição a estresse agudo em ratos machos a choques na cauda sugere que este tipo de estresse leva a rápida resposta por parte de microglias, sensibilizando a hiperreatividade pró-inflamatória destas no hipocampo (Frank et al., 2007). Além disso, exposição a estresse agudo induz a rápida resposta de microglias, e aumento do número de microglias em regiões como hipocampo, hipotálamo, tálamo e substância nigra, mesmo sem alterações de marcadores inflamatórios (Sugama et al., 2007). Embora tenha sido demonstrado o envolvimento de microglias em resposta ao estresse agudo, ainda não está claro se elas apresentam características anti-inflamatórias ou pró-inflamatórias (Sugama and Kakinuma, 2020).

Em resposta a estresse crônico, níveis elevados de glicocorticoides são capazes de gerar resposta de microglias *in vivo* e sugerem que o estresse é capaz de induzir uma resposta pró-inflamatória no sistema nervoso central. A elevação de níveis de corticosterona em camundongos está correlacionada à resposta de microglias, mediada por receptores glutamatérgicos, levando à proliferação microglial (Nair and Bonneau, 2006). Estresse crônico também aumenta a densidade e número de microglias reativas no hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal medial (Tynan et al., 2010). Isso sugere que este tipo de estresse leva a um aumento microglial seletivo em regiões cerebrais sensíveis à resposta ao estresse, promovendo sua hiperresponsividade e desempenhando um importante papel nestas respostas (Tynan et al., 2010). Períodos longos de estresse levam à hiperresponsividade microglial no hipocampo e na amígdala, sendo que a diminuição dessa hiperresponsividade por meio de administração do antibiótico minociclina reduz comportamentos tipo-ansioso e tipo-depressivo gerados pelo estresse crônico (Wang et al., 2010; Liu et al., 2018).

Microglias possuem receptores para glicocorticoides, sendo que este hormônio pode influenciar os níveis de reatividade de microglias de forma pró- ou anti-

inflamatória (Paolicelli et al., 2022). Alguns estudos indicam que os glicocorticoides podem aumentar a produção de citocinas pró-inflamatórias, enquanto outros sugerem que os glicocorticoides têm efeitos anti-inflamatórios, inibindo a expressão de marcadores inflamatórios. Em resumo, os glicocorticoides desempenham um papel complexo na modulação do nível de responsividade microglial (Dinkel et al., 2003; Nadeau and Rivest, 2003; MacPherson et al., 2005; Blandino et al., 2006; De Pablos et al., 2014).

Na fase pós-natal, a separação maternal aumenta a densidade de microglias e sua hiperresponsividade, aumentando a expressão de citocinas pró-inflamatórias no hipocampo e no cérebro pré-frontal de camundongos adultos (Delpech et al., 2016; Roque et al., 2016; Giridharan et al., 2019). Em trabalho anterior do nosso laboratório, demonstramos que machos apresentam maior densidade de microglias no hipocampo no início do desenvolvimento em relação às fêmeas, e a separação maternal em fêmeas modifica a morfologia de microglias (Blanc-Arabe et al., em preparação).

A resposta das microglias ao estresse são complexas e se baseiam em sua interação com os neurônios e com as demais células do sistema nervoso central. Um dos principais componentes para essa comunicação microglia-neurônio é o receptor CX3CR1, ou “*CX3C chemokine receptor 1*”.

1.5. Estresse e receptores CX3CR1

Receptores CX3CR1 são receptores transmembranas, acoplados à proteína G, cujo ligante é a quimiocina CX3CL1, também conhecida como fractalquina – que é expressa por neurônios. Sua ativação leva à entrada de cálcio e alteração nos níveis de cAMP, seguidas pela ativação das vias de MAPKs and Akt/PKB (Cornell et al., 2022). Esses receptores são altamente expressos em células imunes, principalmente em microglias. Eles desempenham papéis fundamentais na poda sináptica, permitindo que as microglias identifiquem e eliminem sinapses específicas, além de influenciarem os processos de fagocitose celular (Cornell et al., 2022).

Por estar no centro da comunicação neurônio-microglia, a via de sinalização do receptor CX3CR1 exerce influência na manutenção da homeostase e no desenvolvimento do cérebro. A fractalquina contribui para manter as microglias em estados homeostáticos, prevenindo os danos de sua hiperativação (Wolf et al., 2013).

Entre outras funções, os receptores CX3CR1 estão ligados à eliminação de espinhas dendríticas e sinapses imaturas durante a poda neural. Animais *knockout*

para CXCR1 possuem aumento significativo de espinhas dendríticas, poda sináptica reduzida e redução na densidade de microglias (Tremblay et al., 2010; Paolicelli et al., 2011). Camundongos com deficiência em componentes desses receptores também apresentam fagocitose reduzida de sinapses pelas microglias, além de diminuição de atividade sináptica (Schafer et al., 2012).

A expressão de fractalquina passa por um aumento após a maturação embrionária e período pós-natal (Ueno et al., 2013). Durante um desenvolvimento normal, a fractalquina atua no recrutamento de células microgлияis para os circuitos neuronais relevantes (Mody et al., 2001). A ausência de fractalquina em animais *knockout* leva a acúmulo de microglias na substância branca subcortical (Mody et al., 2001; Ueno et al., 2013). A sinalização de fractalquina também está envolvida com a liberação de fatores neurotróficos que promovem a sobrevivência neuronal. Por meio dessas liberações, as interações da fractalquina com seu receptor regulam o número de neurônios durante o desenvolvimento, porém as cascatas de sinalização ainda não foram elucidadas em detalhes (Ueno et al., 2013). Também por meio de receptores CX3CR1, as microglias promovem a neurogênese e a oligodendrogênese no cérebro em desenvolvimento de ratos, liberando citocinas pró-inflamatórias (Shigemoto-Mogami et al., 2014).

Uma comunicação adequada entre as microglias e os neurônios é necessária para a maturação funcional correta dos neurônios granulares recém-formados e para a regulação adequada do comportamento emocional (Paolicelli et al., 2014). A sinalização da fractalquina e seu receptor participam da modulação de respostas hormonais, metabólicas e comportamentais na reação ao estresse agudo e crônico (Winkler et al., 2017). Camundongos *knockout* para CX3CR1 que passaram por estresse de separação maternal e um segundo episódio de estresse quando adultos possuem diminuição de cobertura microglial no hipotálamo, aumento da resposta do eixo HPA, ativação neuronal hipotalâmica exagerada e aumento no comportamento de medo (Winkler et al., 2017).

Camundongos CX3CR1 *knockout* foram criados substituindo o gene do receptor por marcador fluorescente verde (GFP), resultando em animais CX3CR1-GFP. Essa tem sido uma das ferramentas mais utilizadas no estudo de microglias, pois o resultado é que todas as células microgлияis expressam abundantemente a proteína GFP, gerando uma marcação fluorescente da arborização microglial complexa, desde o corpo celular até os processos distais (Tremblay et al., 2010). Os

animais homozigotos são completamente desprovidos do receptor CX3CR1 (resultado animais CX3CR1-GFP +/+), e conseqüentemente da sinalização de fractalquina. Os animais homozigotos podem ser cruzados com animais *wild-type*, gerando animais heterozigotos (resultado animais CX3CR1-GFP+/-), que não apresentam diferença nos níveis de CX3CR1 expressos, mas possuem a marcação por GFP (Jung et al., 2000). Ambos os animais são utilizados de forma extensa por oferecerem oportunidade do estudo do receptor CX3CR1 e da sinalização de fractalquina de forma não invasiva.

Uma vantagem do uso do animal heterozigoto é que não foram observadas diferenças em alguns fatores quando comparada a animais *wild-type* – como morfologia microglial, renovação de espinhas dendríticas e interações de microglias com elementos das sinapses (Paolicelli et al., 2014). Extrapolações dos resultados em animais heterozigotos sempre devem levar em conta que não sabemos toda extensão dessa substituição na diferença ou não de animais CX3CR1 quando comparados a animais *wild-type*. Desta forma, se a extrapolação for um objetivo, é importante incluir animais *wild-type* e comparar os efeitos entre os diferentes *backgrounds* genéticos.

As pesquisas que buscam investigar as respostas das microglias ao estresse crônico no começo do desenvolvimento utilizam animais heterozigotos CX3CR1-GFP+/- para marcação dessas células para microscopia, o que permite acessar informações sobre densidade, morfologia, complexidade e funcionalidade das microglias (Jung et al., 2000; Wolf et al., 2013; Reshef et al., 2014, Blanc-Arabe, em preparação). Porém, ainda que exista uma abundância de evidências científicas em relação aos efeitos comportamentais da separação maternal em animais adultos e adolescentes, não encontramos estudos sobre os efeitos da separação em animais heterozigotos CX3CR1-GFP+/- comparados a animais *wild-type* (Weiss et al., 2011; Shin et al., 2016; Tractenberg et al., 2016; He et al., 2020). O objetivo deste trabalho é investigar as respostas comportamentais desses camundongos à separação maternal, comparar esses efeitos aos de animais *wild-type*, de forma a contribuir com a integralização e generalização dos resultados de diferentes pesquisas sobre o papel das microglias na resposta ao estresse no início do desenvolvimento.

2. OBJETIVOS

Avaliar as respostas comportamentais ao estresse de separação maternal de camundongos machos e fêmeas pré-púberes *wild-type* ou CX3CR1-GFP+/-.

2.1. Objetivos específicos

- Investigar os efeitos do protocolo de separação maternal no comportamento exploratório de camundongos machos e fêmeas pré-púberes *wild-type* ou CX3CR1-GFP+/-.
- Investigar os efeitos do protocolo de separação maternal no comportamento tipo-ansioso de camundongos machos e fêmeas pré-púberes *wild-type* ou CX3CR1-GFP+/-.
- Investigar os efeitos do protocolo de separação maternal no comportamento de desamparo aprendido de camundongos machos e fêmeas pré-púberes *wild-type* ou CX3CR1-GFP+/-.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais Experimentais

Todos os procedimentos experimentais deste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais, sob o protocolo nº260/2019.

Para animais do grupo *wild-type*, utilizamos como matriz camundongos machos e fêmeas da linhagem C57BL6/J. Para animais do grupo CX3CR1-GFP+/-, utilizamos como matriz camundongos fêmeas da linhagem C57/BL6 e camundongos machos da linhagem C57BL6/J CX3CR1:GFP+/+. Desta forma, os animais utilizados apresentaram genótipo heterozigoto (CX3CR1:GFP+/-), sendo resultado de um cruzamento homozigoto.

Os animais foram mantidos em temperatura ambiente de 22±1°C e umidade 40-70%, em ciclo claro-escuro de 12/12 horas, com livre acesso à ração e água. Machos e fêmeas foram mantidos em gaiolas separadas, sendo no máximo 4 animais por caixa, exceto pelo momento de cruzamento.

Todos as matrizes foram utilizadas para cruzamento com 8 a 12 semanas de idade. Para os cruzamentos, separamos as matrizes na proporção 2 fêmeas:1 macho durante um período entre 7 e 14 dias. Após esse período, as fêmeas foram separadas dos machos, em caixas de 2 a 4 animais. No provável 19º dia da gestação, as fêmeas prenhes foram separadas individualmente e acompanhadas diariamente até o dia do nascimento dos filhotes – considerado do dia pós-natal 1 (P1). As fêmeas matrizes foram utilizadas apenas uma vez, enquanto os machos foram reutilizados por média de 4 cruzamentos.

As ninhadas foram padronizadas contendo 5 a 8 filhotes. Os filhotes foram mantidos com a mãe até P23, quando foi feito o desmame. Os animais foram separados de acordo com sexo e mantidos no biotério nas mesmas condições descritas acima para as matrizes.

3.2. Protocolo de Separação Maternal

Entre os dias P2 e P14, os filhotes dos grupos que passaram por separação maternal foram separados diariamente da mãe por 180 minutos, em horários randomizados. A separação sempre ocorreu no ciclo claro dos animais, mais

especificamente entre 8 horas e 18 horas. Neste período, os filhotes foram mantidos isolados dos irmãos da ninhada, mantidos em potes individuais em banho-maria, com maravalha limpa, aquecidos a temperatura $32\pm 2^{\circ}\text{C}$. O banho-maria foi mantido em caixa com isolamento acústico e iluminação.

3.3. Desenho Experimental

Para investigar as respostas à separação maternal de animais *wild-type* ou CX3CR1-GFP+/-, determinamos as ninhadas aleatoriamente de forma a dividir os animais em 4 grupos experimentais:

- (1) Controle *wild-type*: animais *wild-type* que não passaram pela separação maternal.
- (2) Controle CX3CR1:GFP+/-: animais CX3CR1-GFP+/- que não passaram pela separação maternal.
- (3) Separação maternal *wild-type*: animais *wild-type* que passaram pela separação maternal.
- (4) Separação maternal CX3CR1:GFP+/-: animais CX3CR1-GFP+/- que passaram pela separação maternal.

Além disso, realizamos todos os protocolos com animais de ambos os sexos, e separamos os resultados de machos e fêmeas, para analisar se existem possíveis dimorfismos sexuais nas respostas à separação maternal (Tabela 1).

Grupos Experimentais				
Background Genético	Grupo	Número de ninhadas	Sexo	Número Amostral
<i>Wild-type</i>	Controle	6	Fêmeas	10
			Machos	18
	Separação Maternal	4	Fêmeas	9
			Machos	13
CX3CR1-GFP+/-	Controle	4	Fêmeas	11
			Machos	13
	Separação Maternal	5	Fêmeas	17
			Machos	14

Tabela 1: Grupos Experimentais.

Entre os dias P28 e P31, os animais foram submetidos a um teste comportamental por dia, na seguinte ordem: Campo Aberto (P28), Caixa Claro/Escuro (P29), Labirinto em Cruz Elevado (P30), Teste do Nado Forçado (P31) (Figura 1).

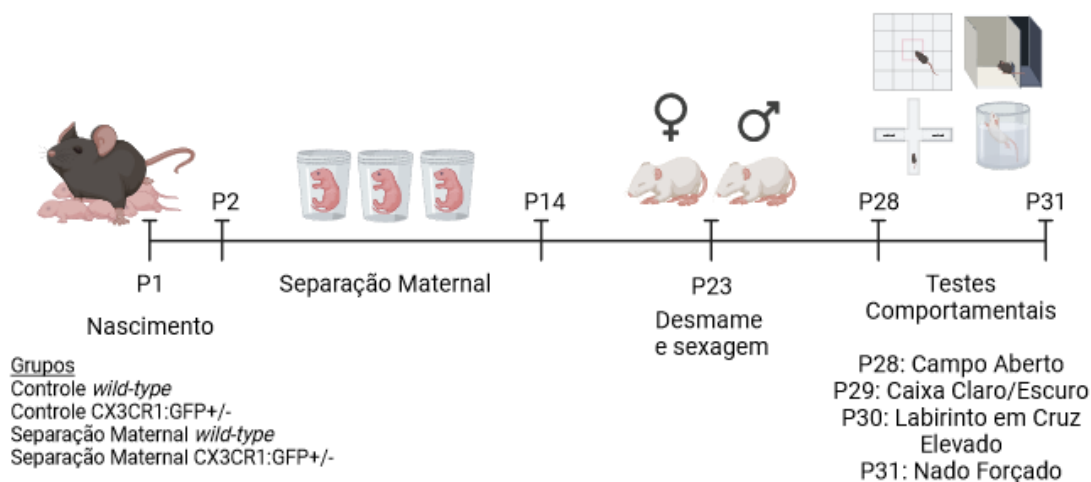


Figura 1: Esquema dos procedimentos experimentais. P = dia pós-natal. Figura criada utilizando Biorender (<https://www.biorender.com/>).

3.4. Testes Comportamentais

Os testes comportamentais foram realizados durante o ciclo de luz, entre 9 e 12 horas. Os animais foram habituados à sala comportamental 1 hora antes do teste. A sala de testes foi iluminada à intensidade aproximada de 365-lux. Os animais foram manipulados pela cauda, com apoio da palma do experimentador. Entre cada animal, higienizamos os aparatos com álcool 70%.

3.4.1. Campo Aberto

O teste de Campo Aberto é utilizado para a avaliação da atividade locomotora e exploratória dos animais (Seibenhener and Wooten, 2015). O aparato consiste em uma caixa de acrílico com dimensões 50 x 50 cm. A parede e o chão são brancos, sendo o chão dividido em quadrantes centrais, periféricos e cantos (Gründemann et al., 2019).

No início do teste, os animais foram colocados individualmente no centro da arena e sua atividade exploratória gravada durante 10 minutos, com uma câmera webcam.

O teste baseia-se na natureza neófila e exploratória dos animais – mensurando então o comportamento exploratório do animal em um ambiente novo. Roedores possuem um comportamento natural de tigmotaxia, de forma que a movimentação nas periferias pode nos dar informações sobre o comportamento locomotor do animal (Prut and Belzung, 2003). Além disso, utilizando o tempo passado em cada grupo de quadrantes, podemos acessar informações sobre o comportamento de aversão dos animais. De acordo com a premissa do teste, animais com maior comportamento de aversão passam menos tempo no centro (Kuleshkaya and Voikar, 2014; Seibenhener and Wooten, 2015; Xie et al., 2022).

Assim, avaliamos os seguintes parâmetros: distância percorrida (cm) e tempo nos quadrantes centrais, periféricos e cantos (s).

3.4.2. Caixa Claro/Escuro

A Caixa Claro/Escuro é um aparato utilizado para a detecção de comportamento tipo-ansioso nos animais (Kuleshkaya and Voikar, 2014; Ennaceur and Chazot, 2016). A caixa possui dois compartimentos interligados por uma abertura divisória: um deles é escuro, coberto e com paredes pretas, e ocupa 1/3 da caixa; o segundo compartimento é claro, descoberto e com paredes brancas, permanecendo iluminado, e ocupa 2/3 da caixa. O teste baseia-se na característica neófila e exploratória dos animais, em contraposição à preferência por ambientes fechados e menos iluminados.

Os animais foram colocados individualmente na parte clara da caixa, com a cabeça em direção à divisória que leva ao lado escuro. A partir do momento que o animal foi colocado na caixa, foi contabilizada a latência do animal para a primeira entrada no compartimento escuro. Após a primeira entrada do animal no compartimento escuro, o comportamento do animal foi gravado por 5 minutos de teste.

Assim, avaliamos os seguintes parâmetros: tempo de latência para entrada no compartimento escuro (s); tempo total de permanência no compartimento claro (s); e número de transições entre os compartimentos (n).

3.4.3. Labirinto em Cruz Elevado

O Labirinto em Cruz Elevado é um instrumento utilizado com frequência para a avaliação de comportamento tipo-ansioso em roedores (Pellow et al., 1985; Rodgers

and Dalvi, 1997). O aparato consiste em um labirinto de acrílico elevado a 30 cm do solo, no formato de uma cruz composta por quatro braços (cada um com 30 cm) – dois abertos e dois fechados. O teste baseia-se na característica neófila e exploratória dos animais, em contraposição à preferência por ambientes fechados e menos iluminados e a aversão a espaços abertos. A premissa do teste é que animais com maior comportamento de aversão evitam mais os braços abertos (Pellow et al., 1985; Braun et al., 2011)

Cada animal foi posicionado no centro do aparato, com a cabeça em direção a um dos braços abertos, e deixado para livre exploração. O comportamento do animal foi gravado durante 5 minutos.

Assim, avaliamos os seguintes parâmetros: tempo de permanência nos braços abertos, fechados e no centro (s); e quantidade de entradas nos braços abertos e fechados (n).

3.4.4. Teste de Nado Forçado

O Nado Forçado é um teste usado para detectar um padrão de comportamento de desamparo aprendido em roedores (Petit-Demouliere et al., 2005; Can et al., 2011; Powell et al., 2012). Para isso, foi utilizado um cilindro vertical de vidro (17 cm de diâmetro x 27 cm de altura) contendo água na temperatura de 26 a 28°C.

O animal foi individualmente colocado no cilindro com água, onde ficou por 6 minutos em livre movimentação. O teste baseia-se na associação entre o tempo que o animal passa imóvel a um desespero comportamental, índice designado de acordo com o tempo em que se mantém flutuando ao invés de permanecer nadando ou em tentativas de escape – *climbing* (Petit-Demouliere et al., 2005; Can et al., 2011; Powell et al., 2012).

Assim, avaliamos os seguintes parâmetros: latência para o primeiro episódio de imobilidade (s), tempo (s) e frequência (n) de imobilidade; tempo (s) e frequência (n) de *climbing*.

3.4.5. Análise dos Testes Comportamentais

Todos os testes foram gravados com uma *webcam* digital (Logitech C920s Pro Full HD, resolução 1080p/30fps). Nos testes de Campo Aberto, Labirinto em Cruz Elevado e Caixa de Claro/Escuro, a *webcam* foi posicionada em cima do aparato,

enquanto no Teste de Nado Forçado, foi posicionada ao lado do cilindro. Todos os vídeos foram analisados depois da realização do teste.

Para análise dos vídeos do Teste de Campo Aberto e Labirinto em Cruz Elevado, nós utilizamos o *software* Bonsai (Lopes et al., 2015). Desenvolvemos uma pipeline personalizada de análise que converteu os vídeos em escalas de cinza de 8-bit e, por meio de um *threshold* binário, definiu o contraste do animal. A partir disso, o *software* identificou o centroide do animal e salvou as coordenadas x e y do animal a cada frame do vídeo em um arquivo “.csv” (Figura 2).

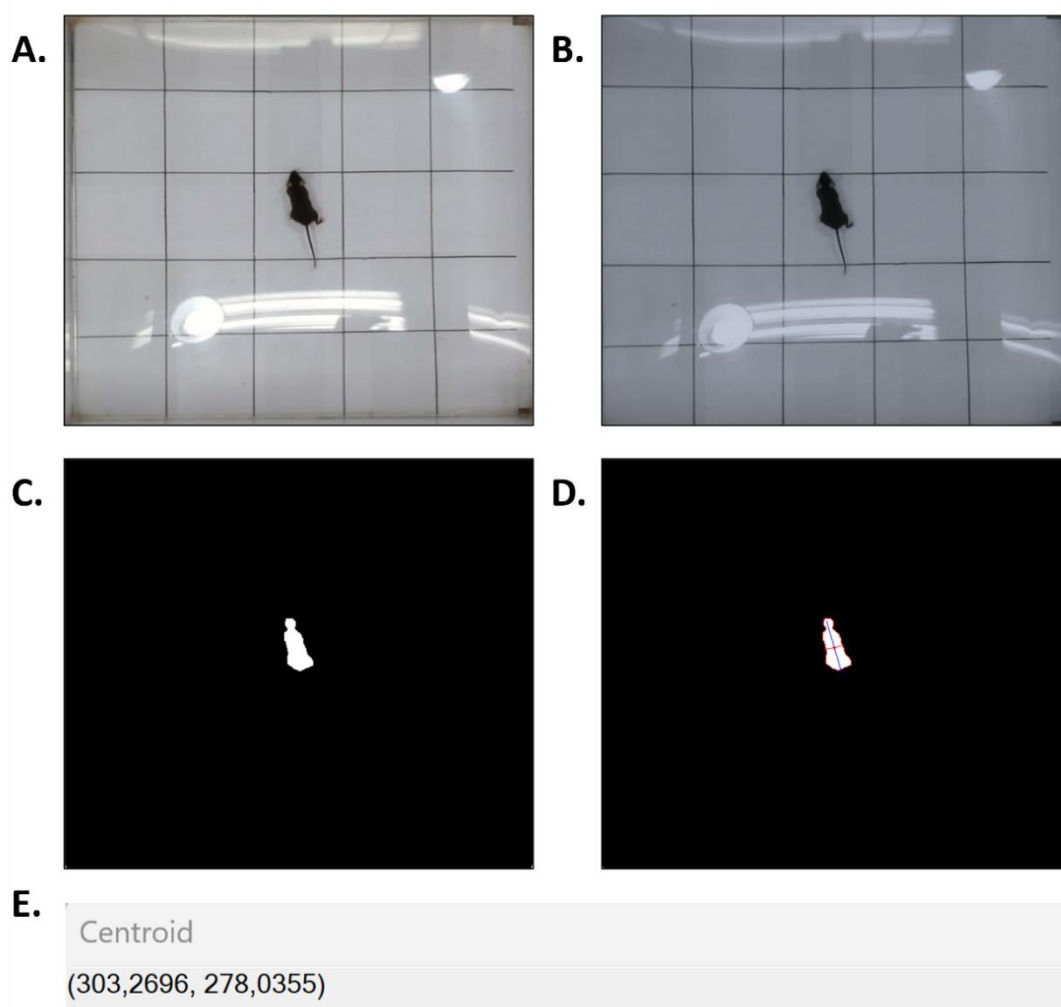


Figura 2: Exemplo da análise comportamental no software Bonsai em um vídeo de Teste de Campo Aberto. O vídeo original (A) foi convertido para escalas de cinza (B), e o contraste do animal foi definido por meio de um *threshold* binário (C). A partir disso, foi identificado o centroide do animal (D) e suas coordenadas x e y salvas para análise (E).

Além da análise de locomoção total, desenvolvemos no *software* máscaras que indicavam os diferentes quadrantes do teste (Campo Aberto: centro, periferias, cantos; Labirinto em Cruz Elevado: centro, braços abertos e braços fechados) (Figura 3 e 4).

Esses dados foram analisados utilizando o *software* Matlab (Matlab R2022a – Signal Processing Toolbox), por meio de códigos personalizados que converteram as coordenadas x e y do animal em um mapa de *tracking* e calculou, de acordo com o tamanho do labirinto, distância total percorrida (cm) do animal e tempo que este passou em cada quadrante (s). A pipeline e códigos personalizados podem ser encontrados em: <https://github.com/fgmourao>.

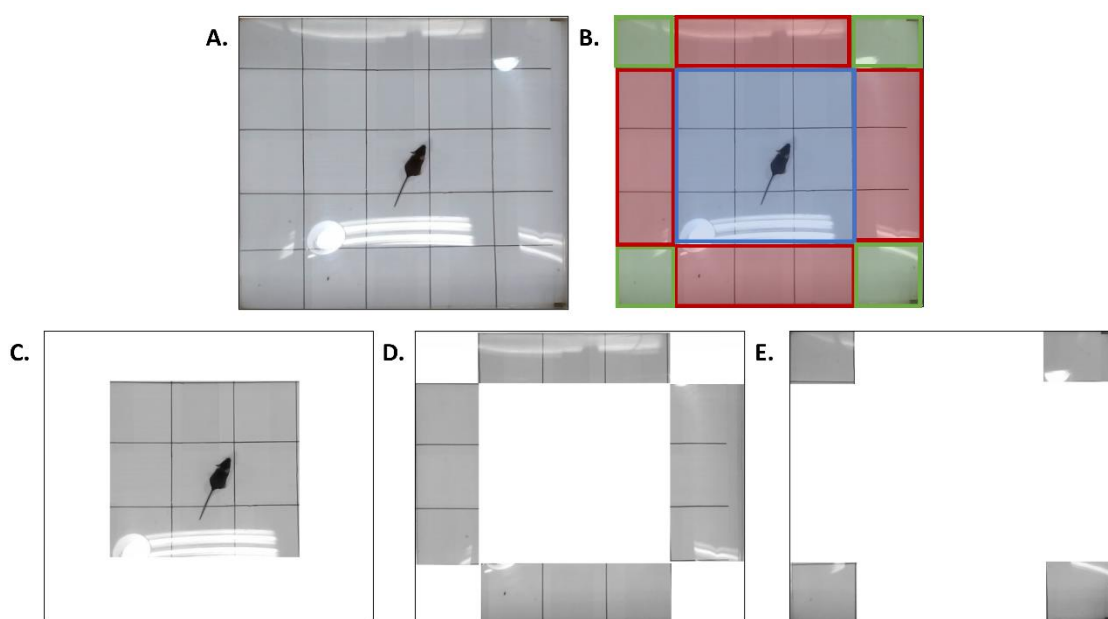


Figura 3: Máscaras para análise comportamental do Teste de Campo Aberto. (A) Área total, (B) Divisão dos quadrantes, (C) Máscara do *software* para centro, (C) Máscaras do *software* para periferias, (D) Máscaras do *software* para cantos.

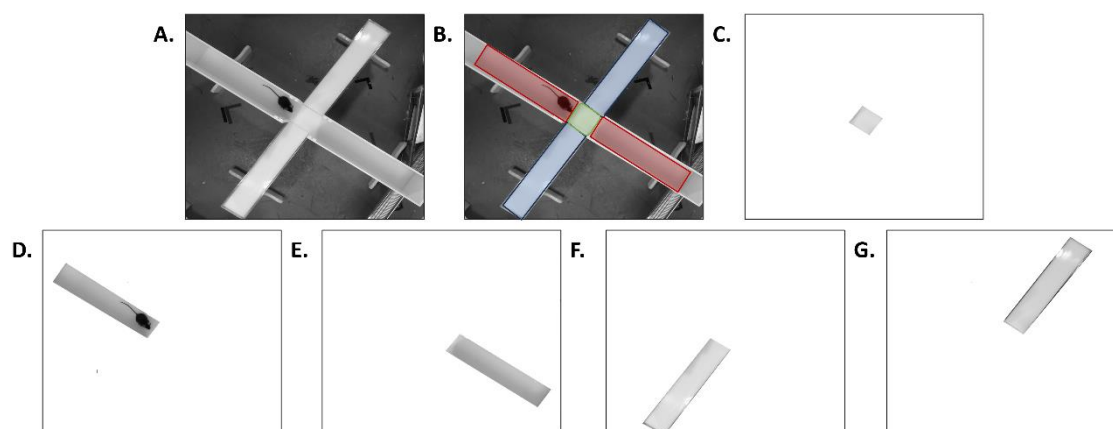


Figura 4: Máscaras para análise comportamental do Labirinto em Cruz Elevado. (A) Área total, (B) Divisão dos quadrantes, (C) Máscara do *software* para centro, (D, E) Máscaras do *software* para os braços fechados, (F, G) Máscaras do *software* para os braços abertos.

A análise dos vídeos da Caixa Claro/Escuro e Teste de Nado Forçado, nós utilizamos o *software* X-PloRat (versão 1.1.0), desenvolvido pela Universidade de São Paulo (Tejada et al., 2017). A análise foi feita de forma manual, utilizando o *software* para acompanhar o tempo do animal em cada estado (s) e sua frequência (sendo Caixa Claro/Escuro: claro e escuro; Nado Forçado: latência, imobilidade e *climbing*). Todos os vídeos de cada teste foram analisados por apenas um experimentador, para evitar influência das diferenças individuais na análise.

3.5. Análise Estatística

As estatísticas descritivas de todos os parâmetros, por teste, para todos os grupos foram realizadas no *software* R (versão 4.3.1.), com auxílio dos pacotes “tidyr” (versão 1.3.0.), “stringr” (versão 1.5.0.) e “dplyr” (versão 1.0.10.). As estatísticas descritivas podem ser encontradas no Anexo 1 (Anexo 1, Tabelas 9, 11, 12 e 14). Utilizamos teste de Shapiro-Wilk para analisar normalidade (Anexo 1, Tabela 8).

Os dados foram analisados por meio de modelo de regressão linear com efeito aleatório, seguida de análise de contraste de médias marginais para comparações múltiplas como post-hoc. As análises foram realizadas no *software* R (versão 4.3.1.), utilizando os pacotes “nlme” (versão 3.1.160.), “JWileymisc” (versão 1.4.0.) e “multilevelTools” (versão 0.1.1.), “emmeans” (versão 1.8.8), “magrittr” (versão 2.0.3). Os dados foram organizados de forma que os fatores analisados foram: *background* genético (*wild-type* e CX3CR1-GFP+/-), grupo (controle e separação maternal) e sexo (machos e fêmeas). A ninhada de cada animal foi considerada como efeito aleatório, de forma a corrigir o efeito de ninhada (Jiménez and Zylka, 2021). A significância considerada foi $p \leq 0,05$. Para diagnóstico do modelo, analisamos igualdade de variância, aleatoriedade de distribuição, distribuição dos resíduos e os valores de interceptos. Detalhes sobre a sintaxe do modelo adotado podem ser encontradas no Anexo 2. Figuras para o diagnóstico do modelo podem ser encontradas no Anexo 3.

Utilizamos o *software* GraphPad Prism (versão 8.0.2.263) para construção dos gráficos. Os dados estão apresentados por valores individuais, sendo média e desvio padrão para dados paramétricos, e mediana e intervalo de confiança (IC) 95% para dados não paramétricos.

4. RESULTADOS

4.1. Animais CX3CR1-GFP+/- demonstraram diminuição na distância percorrida no Teste do Campo Aberto; animais que passaram pela separação maternal demonstraram aumento no tempo que permaneceram nos quadrantes das periferias.

O Teste do Campo Aberto é um teste desenvolvido em 1934 para acessar o comportamento emocional de roedores (Hall, 1934; Walsh and Cummins, 1976). Desde então, tem sido amplamente utilizado para avaliar comportamento exploratório em contexto de novidade e comportamento de aversão em diversas espécies (Heredia et al., 2014; Kuleskaya and Voikar, 2014; Ennaceur and Chazot, 2016). O teste se baseia no comportamento dos animais de explorar ambientes novos, mas também do contexto da novidade como um possível fator ansiogênico. Desta forma, utilizamos esse teste para avaliar os efeitos do estresse pós-natal no comportamento exploratório de adolescentes pré-púberes machos e fêmeas, além de comparar esses efeitos em animais CX3CR1-GFP+/- e *wild-type*.

Observamos que apenas o background genético foi um fator significativo no comportamento exploratório dos animais no Teste de Campo Aberto. Animais que passaram pela separação maternal não demonstraram diferença na distância percorrida em relação a animais controle. Os animais CX3CR1-GFP+/- percorreram em média 11,69% menor distância em relação aos animais *wild-type* (Tabela 2). Além disso, na análise de post-hoc, não encontramos diferenças entre nenhum dos grupos (Tabela 10, Anexo 1) (Figura 5A).

Além do comportamento exploratório em um ambiente novo, o Teste do Campo Aberto pode fornecer informações quanto ao comportamento de aversão dos animais, uma vez que roedores tendem a evitar ambientes abertos e iluminados. Desta forma, o animal tende a passar menos tempo nos quadrantes do centro do que nas periferias (Seibenhener and Wooten, 2015). Quanto a este comportamento de aversão no Teste do Campo Aberto, não observamos diferença significativa no tempo que os animais passaram no centro ou nos cantos, em nenhum grupo. Apenas a separação maternal foi um fator significativo no tempo passado nas periferias, sendo que animais que passaram pela separação permaneceram aproximadamente 7,09% de tempo a mais nestes quadrantes do que animais controle (Tabela 2). Também não encontramos não

encontramos diferenças entre nenhum dos grupos no teste de post-hoc (Tabela 10, Anexo 1) (Figura 5).

Teste de Campo Aberto

Distância Percorrida (cm)				
		Valor t	Grau de Liberdade	Valor p
Background Genético	Wild-type x CX3CR1-GFP+/-	2,236	16	0,04
Grupo	Controle x Separação Maternal	-0,986	16	0,339
Sexo	Machos x Fêmeas	-0,749	85	0,456
Tempo no Centro (s)				
		Valor t	Grau de Liberdade	Valor p
Background Genético	Wild-type x CX3CR1-GFP+/-	0,471	16	0,644
Grupo	Controle x Separação Maternal	-0,165	16	0,871
Sexo	Machos x Fêmeas	0,930	85	0,355
Tempo nas Periferias (s)				
		Valor t	Grau de Liberdade	Valor p
Background Genético	Wild-type x CX3CR1-GFP+/-	-0,113	16	0,911
Grupo	Controle x Separação Maternal	-2,769	16	0,014
Sexo	Machos x Fêmeas	0,084	85	0,933
Tempo nos Cantos (s)				
		Valor t	Grau de Liberdade	Valor p
Background Genético	Wild-type x CX3CR1-GFP+/-	0,740	16	0,470
Grupo	Controle x Separação Maternal	-0,007	16	0,994

Sexo	Machos x Fêmeas	-0,499	85	0,619
------	-----------------	--------	----	-------

Tabela 2: Estatística do Teste de Campo Aberto. Análise por modelo de regressão linear com efeito aleatório, análise de médias marginais para comparações múltiplas como post-hoc. Post-hoc na Tabela 10, Anexo 1.

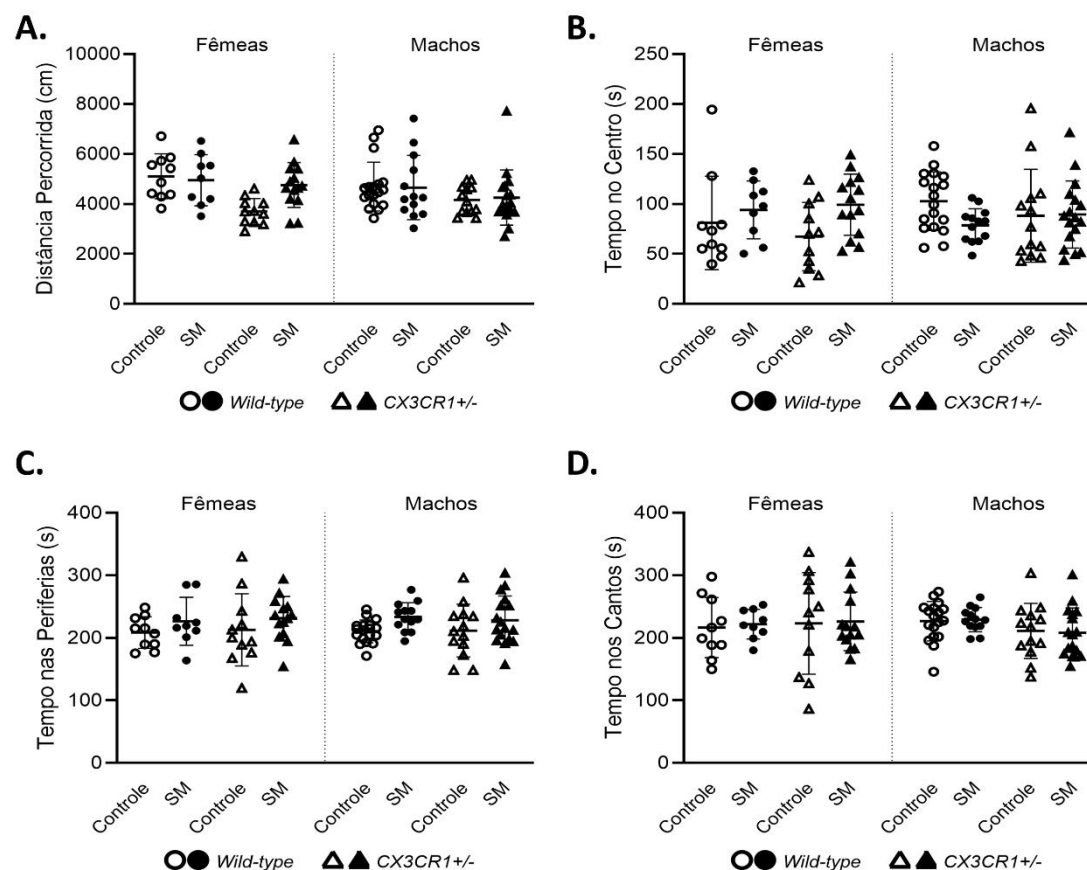


Figura 5: Efeitos do protocolo de separação maternal no comportamento exploratório no Teste de Campo Aberto de camundongos machos e fêmeas pré-púberes wild-type ou CX3CR1-GFP+/-. Animais CX3CR1+/- demonstraram redução da distância total percorrida em relação a animais wild-type (A); animais que submetidos à separação maternal (SM) passaram mais tempo nas periferias do aparato (C). Não observamos diferenças entre nenhum dos grupos para o tempo passado no centro (B) ou nos cantos (D) do aparato. SM = separação maternal. Dados paramétricos estão representados com média e desvio padrão (C, D). Dados não paramétricos estão representados com mediana e IC 95% (A, B). Modelo de regressão linear com efeito aleatório/Análise de médias marginais para comparações múltiplas.

4.2. Nenhum grupo apresentou diferença em parâmetros de comportamento de tipo-ansioso na Caixa de Claro/Escuro

A Caixa de Claro/Escuro é um teste para avaliar comportamento de aversão ativo. O teste se baseia na preferência de roedores por ambientes escuros a ambientes claros. Os animais são expostos ao aparato no ambiente mais aversivo e avaliamos o a latência para a “fuga” para o ambiente seguro, bem como a o tempo de

permanência em cada ambiente e a exploração destes (Crawley, 1985; Kuleskaya and Voikar, 2014). Um dia após avaliarmos o comportamento exploratório dos animais em ambientes novos, expomos os animais a este teste para avaliarmos comportamento de aversão ativo.

Encontramos que nenhum fator foi significativo em relação ao comportamento de aversão na Caixa de Claro/Escuro. Não observamos diferença entre *background* genético, separação maternal ou sexo na latência para ir para o escuro, tempo passado no compartimento claro, ou cruzamentos entre os compartimentos (Tabela 3) (Figura 6).

Caixa de Claro/Escuro

Latência (s)				
		Valor t	Grau de Liberdade	Valor p
Background Genético	Wild-type x CX3CR1-GFP+/-	-1,769	16	0,096
Grupo	Controle x Separação Maternal	0,490	16	0,631
Sexo	Machos x Fêmeas	1,090	85	0,279
Tempo no Claro (s)				
		Valor t	Grau de Liberdade	Valor p
Background Genético	Wild-type x CX3CR1-GFP+/-	1,374	16	0,189
Grupo	Controle x Separação Maternal	-1,012	16	0,327
Sexo	Machos x Fêmeas	-1,948	85	0,055
Cruzamentos (n)				
		Valor t	Grau de Liberdade	Valor p
Background Genético	Wild-type x CX3CR1-GFP+/-	1,545	16	0,142
Grupo	Controle x Separação Maternal	-0,658	16	0,520
Sexo	Machos x Fêmeas	-1,838	85	0,070

Tabela 3: Estatística da Caixa de Claro/Escuro. Análise por modelo de regressão linear com efeito aleatório.

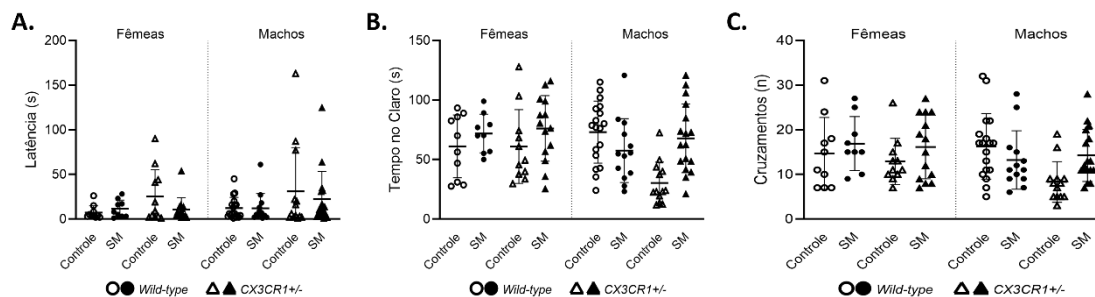


Figura 6: Efeitos do protocolo de separação maternal no comportamento de aversão na Caixa de Claro/Escuro de camundongos machos e fêmeas pré-púberes wild-type ou CX3CR1-GFP+/-.

Não observamos diferenças entre nenhum dos grupos para latência (A), tempo passado no compartimento claro (B), ou nos cruzamentos (C). SM = separação maternal. Dados paramétricos estão representados com média e desvio padrão (B). Dados não paramétricos estão representados com mediana e IC 95% (A, C). Modelo de regressão linear com efeito aleatório/Análise de médias marginais para comparações múltiplas.

4.3. Machos demonstraram maior comportamento tipo-ansioso e menor comportamento exploratório em relação às fêmeas no Labirinto em Cruz Elevado; animais CX3CR1-GFP+/- apresentaram maior comportamento tipo-ansioso em relação a animais *wild-type*.

O Labirinto em Cruz Elevado é um teste amplamente utilizado para avaliar comportamento de aversão passivo em diversas espécies (Pellow et al., 1985; Rodgers and Dalvi, 1997; Walf and Frye, 2007). Ele se baseia na vontade do animal de explorar novos ambientes, mas também na aversão do animal a ambientes abertos e altos, em relação a ambientes fechados e mais seguros. Diferentemente da Caixa de Claro/Escuro, o animal não é colocado no ambiente aversivo. A premissa do teste é que animais com maior comportamento tipo-ansioso permanecem mais tempo nos braços fechados (Pellow et al., 1985). O comportamento de aversão é complexo e, desta forma, julgamos que seria interessante combinar um teste de aversão ativa e um teste de aversão passiva para avaliarmos melhor o comportamento dos nossos animais. Assim, um dia depois da Caixa de Claro/Escuro, expomos os animais ao Labirinto em Cruz Elevado.

Nós observamos que sexo foi um fator significativo no comportamento de tipo-ansioso no Labirinto em Cruz Elevado. Machos passaram 22% menos tempo nos braços abertos e 21,49% mais tempo nos braços fechados em relação às fêmeas, sem diferença significativa no tempo passado no centro. Observamos o mesmo

padrão no comportamento exploratório, em que machos apresentaram 32,18% menos cruzamentos em braços aberto e 24,32% menos cruzamentos em braços fechados (Tabela 4). Na análise de post-hoc, não encontramos diferenças entre nenhum dos grupos (Tabela 13, Anexo 1) (Figura 7).

Além disso, o background genético também se mostrou um fator significativo no comportamento tipo-ansioso. Animais CX3CR1-GFP+/- passaram 50,51% mais tempo nos braços fechados em comparação com animais *wild-type* (Tabela 4). Também não encontramos diferenças significativas entre nenhum dos grupos no teste de post-hoc (Tabela 13, Anexo 1) (Figura 7B). Não observamos diferenças provindas da separação maternal em nenhum parâmetro (Tabela 4) (Figura 7).

Labirinto em Cruz Elevado

Tempo nos Braços Abertos (s)				
		Valor t	Grau de Liberdade	Valor p
Background Genético	<i>Wild-type</i> x CX3CR1-GFP+/-	0,216	16	0,832
Grupo	Controle x Separação Maternal	-0,049	16	0,961
Sexo	Machos x Fêmeas	-2,468	85	0,016
Tempo nos Braços Fechados (s)				
		Valor t	Grau de Liberdade	Valor p
Background Genético	<i>Wild-type</i> x CX3CR1-GFP+/-	-2,788	16	0,013
Grupo	Controle x Separação Maternal	-0,794	16	0,439
Sexo	Machos x Fêmeas	2,436	85	0,017
Tempo no Centro (s)				
		Valor t	Grau de Liberdade	Valor p
Background Genético	<i>Wild-type</i> x CX3CR1-GFP+/-	1,060	16	0,305
Grupo	Controle x Separação Maternal	-0,830	16	0,419

Sexo	Machos x Fêmeas	-1,078	85	0,284
Cruzamentos para os Braços Abertos (n)				
		Valor t	Grau de Liberdade	Valor p
Background Genético	Wild-type x CX3CR1-GFP+/-	0,377	16	0,712
Grupo	Controle x Separação Maternal	0,106	16	0,917
Sexo	Machos x Fêmeas	-2,612	85	0,011
Cruzamentos para os Braços Fechados (n)				
		Valor t	Grau de Liberdade	Valor p
Background Genético	Wild-type x CX3CR1-GFP+/-	1,166	16	0,261
Grupo	Controle x Separação Maternal	-0,488	16	0,632
Sexo	Machos x Fêmeas	-2,374	85	0,020

Tabela 4: Estatística do Labirinto em Cruz Elevado. Análise por modelo de regressão linear com efeito aleatório, análise de médias marginais para comparações múltiplas como post-hoc. Post-hoc na Tabela 13, Anexo 1.

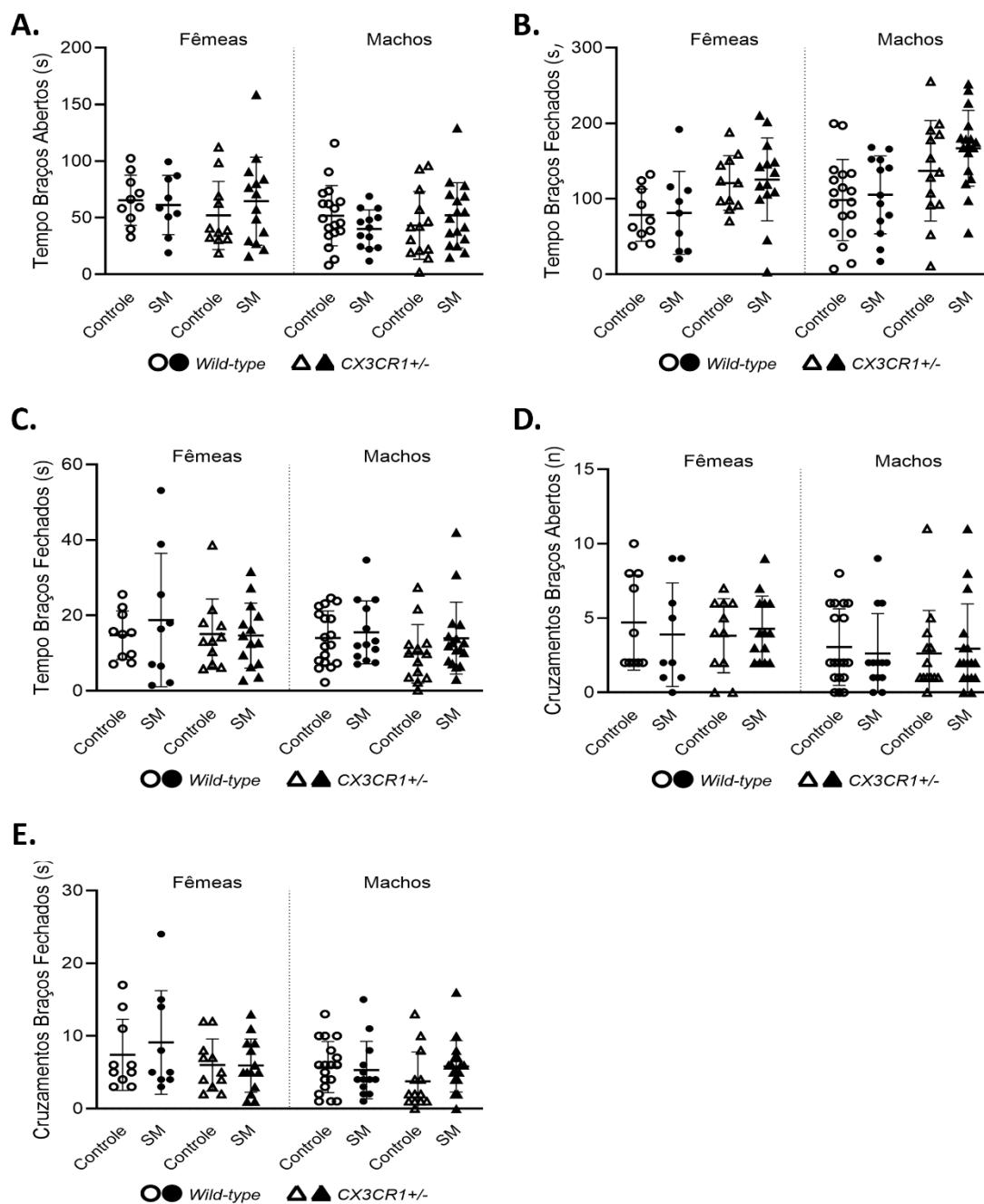


Figura 7: Efeitos do protocolo de separação maternal no comportamento tipo-ansioso no Labirinto em Cruz Elevado de camundongos machos e fêmeas pré-púberes wild-type ou CX3CR1-GFP+/-. Machos passaram menos tempo nos braços abertos (A), mais tempo nos braços fechados (B), e cruzaram menos vezes para os braços abertos (D) e fechados (E) em relação às fêmeas. Animais wild-type passaram mais tempo nos braços fechados em relação a animais CX3CR1+/- . Não observamos diferenças no tempo passado no centro (C) em nenhum dos grupos. SM = separação maternal. Dados paramétricos estão representados com média e desvio padrão (B). Dados não paramétricos estão representados com mediana e IC 95% (A, C, D, E). Modelo de regressão linear com efeito aleatório/Análise de médias marginais para comparações múltiplas.

4.4. Machos apresentaram maior tempo e frequência de *climbings* em relação às fêmeas no Teste do Nado Forçado; animais que foram submetidos à separação maternal passaram menos tempo em imobilidade.

O Teste do Nado Forçado é um teste utilizado para avaliar a resposta dos animais a desamparo aprendido. O teste se constitui de colocar o animal em um cilindro com água e mensurar seu comportamento. O animal nada para se manter na superfície e faz comportamento de *climbing* tentando fugir do cilindro. A premissa é que o teste pode avaliar resposta de desamparo aprendido quando o animal percebe que não tem como escapar e “desiste” de nadar – apenas mantendo-se na superfície, porém sem nadar – e para de fazer *climbing* para fugir (Petit-Demouliere et al., 2005; Powell et al., 2012). Por ser um teste bastante estressante para os animais, deixamos esse teste para o final da bateria de testes comportamentais, no último dia.

Encontramos que vários animais não apresentaram nenhum episódio de imobilidade, de forma que não tiveram um valor numérico de latência, impossibilitando a análise estatística desse parâmetro. Esse fenômeno foi encontrado em todos os grupos, com exceção de fêmeas *wild-type* que passaram pela separação maternal (Tabela 5). Observamos que animais CX3CR1-GFP+/- apresentaram uma quantidade maior de animais sem episódios de imobilidade – 43% dos animais em fêmeas e 35% em machos – porém não sabemos se essas quantidades são estatisticamente significativas para conclusões, pela impossibilidade de análises estatísticas (Tabela 5).

Background Genético	Grupo	Sexo	n	Animais que não apresentaram episódios de imobilidade	
				% do Grupo	
Wild-type	Controle	Fêmeas	10	1	10%
		Machos	18	1	6%
	Separação Maternal	Fêmeas	9	0	0%
		Machos	13	1	8%
CX3CR1-GFP+/-	Controle	Fêmeas	11	1	9%
		Machos	13	2	13%
		Fêmeas	14	6	43%

	Separação Maternal	Machos	17	6	35%
--	--------------------	--------	----	---	-----

Tabela 5: Dados de latência para primeiro episódio de imobilidade no Teste de Nado Forçado.

Observamos que sexo foi um fator significativo no comportamento de fuga. Machos passaram apresentaram menor frequência de *climbings* e passaram 24,51% menos tempo fazendo *climbings* em relação às fêmeas (Tabela 6). No teste de post-hoc, não encontramos diferenças significativas entre nenhum dos grupos (Tabela 15, Anexo 1) (Figura 8). Além disso, animais que passaram pela separação passaram 58,15% menos tempo em imobilidade quando comparados a animais controle (Tabela 6). Também não encontramos diferenças significativas entre nenhum dos grupos no teste de post-hoc (Tabela 15, Anexo 1) (Figura 8A). Não encontramos diferenças provindas de *background* genético em nenhum comportamento (Tabela 6) (Figura 8).

Teste do Nado Forçado

Tempo Imobilidade (s)				
		Valor t	Grau de Liberdade	Valor p
Background Genético	Wild-type x CX3CR1-GFP+/-	1,518	16	0,148
Grupo	Controle x Separação Maternal	2,649	16	0,018
Sexo	Machos x Fêmeas	1,472	85	0,145
Frequência Imobilidade (n)				
		Valor t	Grau de Liberdade	Valor p
Background Genético	Wild-type x CX3CR1-GFP+/-	2,017	16	0,061
Grupo	Controle x Separação Maternal	1,914	16	0,074
Sexo	Machos x Fêmeas	1,078	85	0,284
Tempo Climbing (s)				
		Valor t	Grau de Liberdade	Valor p

Background Genético	Wild-type x CX3CR1-GFP+/-	-1,700	16	0,108
Grupo	Controle x Separação Maternal	0,582	16	0,568
Sexo	Machos x Fêmeas	-2,104	85	0,038

Frequência Climbing (n)

		Valor t	Grau de Liberdade	Valor p
Background Genético	Wild-type x CX3CR1-GFP+/-	-0,790	16	0,441
Grupo	Controle x Separação Maternal	-0,116	16	0,910
Sexo	Machos x Fêmeas	-2,374	85	0,020

Tabela 6: Estatística do Teste de Nado Forçado. Análise por modelo de regressão linear com efeito aleatório, análise de médias marginais para comparações múltiplas como post-hoc. Post-hoc na Tabela 15, Anexo 1.

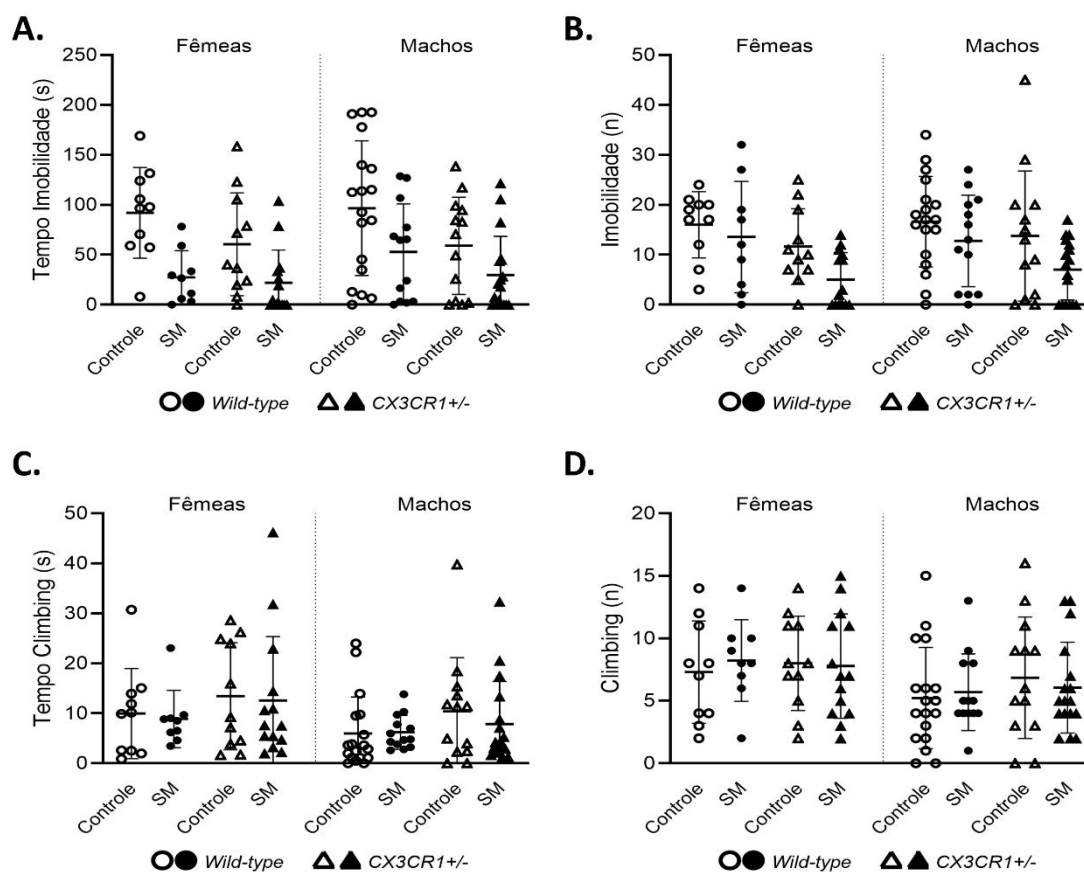


Figura 8: Efeitos do protocolo de separação maternal no comportamento de desamparo aprendido no Teste de Nado Forçado de camundongos machos e fêmeas pré-púberes wild-type ou CX3CR1-GFP+/-. Machos passaram menos tempo em climbing (C) e apresentaram menor frequência de climbings (D). Animais submetidos à separação maternal passaram menos tempo em episódios de imobilidade (A). Não observamos diferenças na frequência de episódios de imobilidade (B) em nenhum dos grupos. SM = separação maternal. Dados não paramétricos estão representados com mediana e IC 95% (A-D). Modelo de regressão linear com efeito aleatório/Análise de médias marginais para comparações múltiplas.

5. DISCUSSÃO

A exposição a estresse crônico no início do desenvolvimento pós-natal tem potencial de gerar alterações físicas e comportamentais duradouras nos organismos. Nesta fase do desenvolvimento, a maioria dos mamíferos depende fortemente do cuidado materno, que vai além de necessidade nutricional, e o cuidado materno desempenha um papel crucial no desenvolvimento do eixo HPA (Francis and Meaney, 1999; Tang et al., 2014). Perturbações no cuidado materno podem resultar em efeitos prejudiciais de longa duração no desenvolvimento cerebral e nos sistemas biológicos interconectados. Um protocolo amplamente utilizado no estudo de estresse crônico no início do desenvolvimento é a separação maternal, que consiste em separar os filhotes da mãe (e às vezes dos irmãos de ninhada) por períodos prolongados de tempo, de forma crônica (Tractenberg et al., 2016). O objetivo deste trabalho foi avaliar as respostas comportamentais ao estresse de separação maternal de camundongos machos e fêmeas pré-púberes *wild-type* ou CX3CR1-GFP+/-, animal utilizado no estudo de microglias.

Neste trabalho, utilizamos um protocolo de separação maternal em que separamos os filhotes da mãe durante 180 minutos por dia, por 13 dias do início do desenvolvimento. Encontramos que os animais que passaram pela separação maternal passaram mais tempo nas periferias no Teste de Campo Aberto e menos tempo em imobilidade no Teste do Nado Forçado, indicando aumento redução de comportamento de desamparo aprendido/tipo-depressivo (Figuras 5C e 8A) (Tabela 7). A princípio, nossos resultados sugerem que a separação maternal no início do desenvolvimento levou a um aumento de resiliência nos animais em comparação a animais controle.

Resumos dos Resultados da Análise de Fatores					
		Teste Campo Aberto	Caixa Claro/Escuro	Labirinto em Cruz Elevado	Teste Nado Forçado
Background Genético	<i>Wild-type</i> x CX3CR1+/-	CX3CR1+/-: ↑ distância percorrida	---	CX3CR1+/-: ↑ tempo braços fechados	---
Grupo	Controle x	Separação maternal:	---	---	Separação maternal:

	Separação Maternal	↓ tempo periferias			↓ tempo imobilidade
Sexo	Machos X Fêmeas	---	---	Machos: ↓ tempo braços abertos ↑ tempo braços fechados ↓ cruzamentos braços abertos ↓ cruzamentos braços fechados	Machos: ↓ tempo <i>climbing</i> ↓ frequência <i>climbing</i>

Tabela 7: Resumo dos parâmetros alterados por teste comportamental na análise de fatores por modelo de regressão linear de efeito aleatório.

Apesar desses resultados parecerem inconsistentes com a literatura, é importante levar alguns fatores em consideração ao interpretá-los. Experiências no início do desenvolvimento atuam na determinação de predisposição e capacidade de adaptação ao estresse na vida adulta. Algumas intervenções aumentam a suscetibilidade a estresses posteriores, enquanto outras atuam de forma pró-resilientes, atenuando os efeitos adversos do estresse na vida adulta (Peña et al., 2019).

Existe grande abundância de diferentes protocolos de separação maternal utilizados na literatura, o que leva a diferentes perfis de respostas comportamentais (Tractenberg et al., 2016; Medeiros et al., em preparação). Por exemplo, em um estudo, separação maternal de 180 minutos por dia, dos dias P2 a P21, levou a aumento de comportamento tipo-depressivo em camundongos adolescentes, sem alterar o comportamento tipo-ansioso (Bian et al., 2015). Em outro estudo, protocolo de separação maternal de 240 minutos por dia, dos dias P2 a P20, levou a aumento do comportamento tipo-ansioso em camundongos adolescentes sem alterar o comportamento tipo-depressivo (Shin et al., 2016). Em um trabalho anterior realizado em nosso laboratório, submetemos os animais ao protocolo de separação maternal de P2 a P14 por 180 minutos, mudando alguns detalhes no protocolo: se os animais eram mantidos juntos ou isolados dos irmãos, e se a separação era realizada em horários fixos ou isolados. Encontramos diferentes respostas comportamentais

dependendo do protocolo a que foram submetidos. Essas diferenças em perfis de resposta tornam difícil prever o efeito que a separação maternal terá nos animais.

Além de diferenças metodológicas nos protocolos de separação maternal, diferentes linhagens de camundongo também demonstram diferentes perfis de resposta à separação maternal. Camundongos C57BL/6 são mais resilientes a estressores no início da vida. Essa resiliência parece ser inata a filhotes de C57BL/6, uma vez que a seleção de mães C57BL/6 com cuidado materno baixo ou alto tem um impacto mínimo no comportamento e na resposta ao estresse da prole (Shanks et al., 1990; Anisman et al., 2001; Binder et al., 2011; Own and Patel, 2013). No caso do uso dessa linhagem, recomenda-se modelos alternativos mais severos de estresse no início do desenvolvimento, além do protocolo de 180 minutos. É possível que nosso protocolo de separação maternal não foi estressante para nossos animais dessa linhagem.

Outra variável importante a ser considerada em relação a essa resposta de aumento de resiliência é a premissa do Teste de Nado Forçado. Esse teste se baseia na premissa que, com a passagem do tempo, os animais param de nadar como resultado de comportamento de desamparo aprendido, e existiria uma transferência de métodos de *coping* ativos – o comportamento de *climbing* como um comportamento de fuga – a *coping* passivo – o desamparo aprendido. Desta forma, maiores tempos de imobilidade seriam indicativos de comportamento tipo-depressivo (Can et al., 2011; Powell et al., 2012). Porém, recentemente essa premissa tem sido questionada. A evidência mais forte de que esse teste é uma medida confiável de comportamento tipo-depressivo em camundongos é farmacológica: animais expostos de forma aguda a antidepressivos diminuem significativamente o tempo de imobilidade (De Kloet and Molendijk, 2016). Porém na clínica, antidepressivos levam semanas para realmente começarem a mostrar efeitos comportamentais nos sujeitos (Posternak and Zimmerman, 2005; Ma, 2015). Considerando o efeito de outras substâncias no teste, assim como respostas de neurotransmissores e de outros testes comportamentais, é possível que o Teste de Nado Forçado seja mais um teste de comportamento tipo-ansioso (Anyan and Amir, 2018). E, levando em conta a farmacologia de antidepressivos, é possível que esses efeitos de diminuição de imobilidade sejam, na verdade, respostas de ansiedade induzida pelos antidepressivos. Assim, podemos interpretar o aumento de imobilidade neste teste como uma diminuição de

comportamento tipo-depressivo ou um aumento de comportamento tipo-ansioso (Anyan and Amir, 2018).

Testes comportamentais são instrumentos abertos a muitas interpretações, uma vez que comportamentos são fenômenos complexos que não possuem relações diretas de causalidade com um único fator. Desta forma, no estudo comportamental, é importante unir diversas ferramentas, como o uso de diferentes testes para acessar fenótipos comportamentais complementares e entender um pouco melhor as respostas que investigamos. Até porque testes diferentes podem acessar diferentes faces, como por exemplo, diferentes testes avaliarem diferentes tipos de ansiedade (Walf and Frye, 2007; Arrant et al., 2013). No caso dos nossos resultados, não observamos efeito da separação maternal nos comportamentos tipo-ansiosos nos demais testes comportamentais a que os animais foram submetidos (Figuras 6 e 7) (Tabela 7). Juntando esses achados à diminuição do tempo passado nas periferias no Teste do Campo Aberto, a diminuição da imobilidade não parece sugerir um aumento de comportamento tipo-ansioso.

Devemos considerar também a idade dos camundongos no teste, uma vez que repercussões comportamentais resultantes da separação maternal em animais jovens costumam ser sutis. Em vários casos, a exposição ao estresse precoce pode não originar mudanças significativas no comportamento dos animais jovens, mas pode torná-los mais propensos a reagirem de maneira sensível a um segundo evento estressor que ocorra posteriormente na vida (Peña et al., 2017; Han et al., 2019, Medeiros et al., em preparação; Reis et al., em preparação).

Além do efeito do estresse no início do desenvolvimento, outro objetivo do nosso trabalho foi avaliar as diferenças comportamentais de animais CX3CR1-GFP+/- em relação a animais *wild-type*. Esses receptores, presentes nas microglias, são a forma principal da comunicação microglias-neurônios. Esse animal é utilizado frequentemente na pesquisa de microglias (Luo et al., 2019). Nós observamos que animais CX3CR1-GFP+/- apresentaram aumento da distância percorrida no Teste de Campo Aberto e aumento do tempo de permanência nos braços fechados no Labirinto em Cruz Elevado (Figuras 5A e 7B). Esses resultados são independentes dos animais terem passado ou não por separação maternal e independente de sexo (Tabela 7). Assim, nossos dados sugerem que animais machos e fêmeas CX3CR1-GFP+/- apresentam maior comportamento exploratório em contexto de novidade e maior comportamento tipo-ansioso do que animais *wild-type*.

Trabalhos anteriores não encontraram diferença entre níveis de expressão de CX3CR1 em animais CX3CR1-GFP+/- (Jung et al., 2000). Ainda assim, encontramos alterações nos comportamentos motor e tipo-ansioso observadas. Desta forma, um dos próximos passos do nosso trabalho será confirmar os níveis de expressão do receptor em nossos animais, para confirmar que estão expressos em níveis diferentes em relação a animais *wild-type*, além de investigar a morfologia e fisiologia das microglias.

A redução de níveis de CX3CR1 desregula a atividade microglial e leva à perda neuronal extensa por neurotoxicidade. A sinalização do CX3CR1 protege contra a neurotoxicidade microglial, de forma que animais que possuem deficiência parcial desses receptores podem ter vulnerabilidade neuronal aumentada (Cardona et al., 2006). A redução da expressão de CX3CR1 leva à alteração no estado de responsividade das microglia, possivelmente resultando em um perfil pró-inflamatório associado a comportamentos tipo-ansiosos (Wohleb et al., 2013; Schubert et al., 2018). Essa redução também pode afetar a organização e conectividade neural, uma vez que é por meio desses receptores que as microglias desempenham diversas funções na formação de redes neurais e plasticidade sináptica do cérebro adolescente (Cornell et al., 2022). Além disso, a sinalização CX3CL1/CX3CR1 está envolvida na regulação de níveis de neurotransmissores, como serotonina e dopamina, que desempenham papéis cruciais na regulação de diversos comportamentos (Schultz, 2007; Eyo and Wu, 2013; Luo et al., 2019).

Mais estudos precisam ser feitos para entendermos como essas diferenças podem ser explicadas. Ainda assim, no uso desses animais é importante levar esses fatores em consideração ao planejar experimentos e interpretar resultados.

Em estudos anteriores do nosso grupo utilizando camundongos CX3CR1-GFP+/-, encontramos um dimorfismo sexual no desenvolvimento da morfologia de microglias no início do desenvolvimento (dias P15 e P30) (Blanc-Arabe, em preparação).

Um resultado interessante do nosso trabalho foi o dimorfismo sexual no comportamento tipo-ansioso dos camundongos adolescentes, independentemente de *background* genético ou estresse no início do desenvolvimento. Nós observamos que no Labirinto em Cruz Elevado, camundongos machos passaram menos tempo nos braços abertos, mais tempo nos braços fechados, assim como cruzaram menos vezes para os braços abertos e fechados em relação às fêmeas (Figura 7). No Teste de Nado

Forçado, os machos demonstraram comportamento de fuga diminuído em relação às fêmeas, passando menos tempo realizando episódios de *climbing* e apresentando uma frequência menor deste comportamento (Figura 8C-D). Esses resultados sugerem que os machos possuem maior comportamento tipo-ansioso comparado às fêmeas. De forma semelhante, em trabalhos anteriores do nosso laboratório, encontramos respostas sexualmente dimórficas no comportamento de machos e fêmeas pré-púberes e adultos (de Matos et al., 2018, 2020; Medeiros, em preparação; Moraes, em preparação; Reis, em preparação)

Existem diversos fatores que exercem influência nas divergências sexuais nas respostas de comportamento tipo-ansioso. Há situações em que a ativação de circuitos cerebrais é sexo-específica. Por exemplo, a experiência de desamparo aprendido resulta na ativação da projeção pré-límbica para o núcleo dorsal da rafe, promovendo plasticidade somente em machos, embora essa projeção seja funcional também em fêmeas (Baratta et al., 2018, 2019). Em outros cenários, os circuitos são compartilhados entre machos e fêmeas, entretanto, em um dos sexos, a resposta é exacerbada. Isso é evidenciado, por exemplo, pela capacidade do fator liberador de corticotrofina em ativar de forma mais intensa o sistema de alerta no locus coeruleus em fêmeas comparativamente a machos (Van Den Eede et al., 2005; Li et al., 2016). Em algumas situações, a ativação de circuitos e mecanismos distintos em machos e fêmeas culmina em efeitos fisiológicos ou respostas comportamentais semelhantes em ambos os sexos. Por exemplo, a evocação de lembranças de conteúdo emocional pode induzir a ativação da amígdala direita em homens e da amígdala esquerda em mulheres (Cahill et al., 2004). Por fim, existem cenários em que um único circuito pode se destinar a comportamentos integralmente distintos entre machos e fêmeas. Isso é ilustrado pela ativação de interneurônios que carregam receptores de ocitocina no córtex pré-frontal medial, desencadeando respostas comportamentais totalmente contrastantes em ambos os sexos: comportamentos pró-sociais em fêmeas e comportamentos tipo-ansioso em camundongos machos (Van Den Eede et al., 2005; Nakajima et al., 2014; Li et al., 2016; Westphal et al., 2020).

Além disso, na interpretação de dimorfismos sexuais em respostas a testes comportamentais, é importante considerar que a maioria dos testes comportamentais utilizados atualmente foram desenvolvimentos para camundongos e ratos machos e, em alguns casos, não foram otimizados para o uso em fêmeas. No Labirinto em Cruz Elevado, por exemplo, o comportamento do macho é mais influenciado por

comportamento tipo-ansioso, enquanto o comportamento da fêmea é mais influenciado pelos níveis de atividade (Fernandes et al., 1999). Em 1991, Johnston e File publicaram um estudo demonstrando que o comportamento de ratos machos e fêmeas se difere de forma significativa em testes de comportamento tipo-ansioso – entre eles, o Labirinto em Cruz Elevado – principalmente porque eles foram validados comportamental-, fisiológica- e farmacologicamente para ratos machos, e não é possível saber se os testes medem as mesmas variáveis em machos e fêmeas (Johnston and File, 1991). Desta forma, as autoras concluíram que estudos validando esses testes em fêmeas eram necessários para a continuidade do estudo de comportamentos tipo-ansiosos (Johnston and File, 1991). Infelizmente, isso ainda é um problema atual (Scholl et al., 2019). Em estudos de condicionamento ao medo, a quantificação do comportamento de congelamento é a resposta mais medida para aprendizagem. Porém, fêmeas exibem menores níveis de congelamento do que machos em resposta a medo, e têm maior probabilidade de exibir comportamento de movimento rápido, comportamento que é condicionado e é uma estratégia comportamental de resposta ao medo, se assemelhando à fuga ativa (Grune et al., 2015; Shansky, 2015; Colom-Lapetina et al., 2019). Portanto, há necessidade de testar, validar e desenvolver testes comportamentais para fêmeas, da mesma forma que têm sido feito para machos. Ainda que essas diferenças não invalidem resultados de testes comportamentais realizados em fêmeas, é importante levar esses elementos em consideração ao interpretá-los.

É imperativo enfatizar que as comparações entre machos e fêmeas realizadas com base em pesquisas envolvendo roedores estão estritamente relacionadas ao sexo biológico, que é determinado pelas características gonadais. Qualquer extrapolação destes resultados para o contexto humano deve ser feito com sensibilidade às múltiplas dimensões que influenciam as diferenças observadas, resultados da interseção complexa entre sexo biológico, identidade de gênero, percepções sociais e pessoais de gênero, elementos psicológicos e influências culturais.

Por fim, após a análise dos fatores, realizamos um teste post-hoc adaptado ao nosso modelo estatístico e não encontramos nenhuma diferença entre os grupos. Estatisticamente, isso pode ser explicado de diversas formas. Principalmente, nosso número amostral de vários grupos, especialmente de fêmeas, ainda é baixo e precisamos aumentá-lo (Tabela 1). Além disso, por estarmos avaliando três fatores ao

mesmo tempo, aumentamos consideravelmente o número de comparação de pares, o que “penaliza” o valor de p. Provavelmente, para mantermos uma análise de três fatores, o número amostral precisaria ser ainda maior do que estamos acostumados em testes comportamentais. Uma alternativa seria utilizarmos Testes de Razão de Verossimilhança, para verificar a contribuição de cada efeito para o modelo que adotamos. De toda forma, é importante ressaltar que a análise de fatores e o post-hoc são testes diferentes que medem coisas diferentes, de forma que um resultado não anula o outro. Mas é importante buscarmos alternativas para melhor interpretarmos os resultados.

Em conclusão, nós observamos que a separação materna pode levar a um efeito sutil de resiliência em camundongos pré-púberes; animais CX3CR1-GFP+/- à ansiedade e exploratórios; adicionalmente, machos e fêmeas pré-púberes exibem comportamentos tipo-ansiosos sexualmente dimórfico. Investigações adicionais são necessárias para compreendermos melhor os mecanismos pelos quais esses fatores contribuem para os fenótipos comportamentais observados.

6. CONCLUSÃO

- Em algumas condições, o estresse de separação maternal pode levar a um sutil aumento de resiliência em camundongos pré-púberes.
- Animais CX3CR1-GFP-heterozigotos apresentam perfis comportamentais de aumento de comportamento exploratório e comportamento tipo-ansioso em comparação com animais *wild-type*, e esses perfis devem ser levados em conta nos planejamentos de experimentos utilizando estes animais.
- Machos e fêmeas adolescentes apresentaram dimorfismo sexual no comportamento tipo-ansioso, demonstrando que é importante incluir animais tanto machos quanto fêmeas nos estudos comportamentais, para entendermos melhor como circuitos cerebrais influenciam essas diferenças.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anisman, H., Hayley, S., Kelly, O., Borowski, T., and Merali, Z. (2001). Psychogenic, neurogenic, and systemic stressor effects on plasma corticosterone and behavior: Mouse strain-dependent outcomes. *Behav. Neurosci.* 115, 443–454. doi: 10.1037/0735-7044.115.2.443.
- Antony, J. M., Paquin, A., Nutt, S. L., Kaplan, D. R., and Miller, F. D. (2011). Endogenous microglia regulate development of embryonic cortical precursor cells. *J. Neurosci. Res.* 89, 286–298. doi: 10.1002/jnr.22533.
- Anyan, J., and Amir, S. (2018). Too Depressed to Swim or Too Afraid to Stop? A Reinterpretation of the Forced Swim Test as a Measure of Anxiety-Like Behavior. *Neuropsychopharmacology* 43, 931–933. doi: 10.1038/npp.2017.260.
- Arrant, A. E., Schramm-Sapyta, N. L., and Kuhn, C. M. (2013). Use of the light/dark test for anxiety in adult and adolescent male rats. *Behav. Brain Res.* 256, 119–127. doi: 10.1016/j.bbr.2013.05.035.
- Ashwell, K. (1990). Microglia and cell death in the developing mouse cerebellum. *Dev. Brain Res.* 55, 219–230. doi: 10.1016/0165-3806(90)90203-B.
- Baratta, M. V, Gruene, T. M., Dolzani, S. D., Chun, L. E., Steven, F., and Shansky, R. M. (2019). Controllable stress elicits circuit-specific patterns of prefrontal plasticity in males, but not females. *Brain Struct Funct* 224, 1831–1843. doi: 10.1007/s00429-019-01875-z.Controllable.
- Baratta, M. V, Leslie, N. R., Fallon, I. P., Dolzani, S. D., Chun, L. E., Tamalunas, A. M., et al. (2018). Behavioral and neural sequelae of stressor exposure are not modulated by controllability in females. *Eur J Neurosci.* 47, 959–967. doi: 10.1111/ejn.13833.Behavioral.
- Béchade, C., Cantaut-Belarif, Y., and Bessis, A. (2013). Microglial control of neuronal activity. *Front. Cell. Neurosci.* 7, 1–7. doi: 10.3389/fncel.2013.00032.
- Bian, Y., Yang, L., Wang, Z., Wang, Q., Zeng, L., and Xu, G. (2015). Repeated Three-Hour Maternal Separation Induces Depression-Like Behavior and Affects the Expression of Hippocampal Plasticity-Related Proteins in C57BL / 6N Mice. *Neural Plast.* 2015, 5–11. doi: 10.1155/2015/627837.
- Biber, K., Neumann, H., Inoue, K., and Boddeke, H. W. G. M. (2007). Neuronal “On” and “Off” signals control microglia. *Trends Neurosci.* 30, 596–602. doi: 10.1016/j.tins.2007.08.007.
- Binder, E., Malki, K., Paya-Cano, J. L., Fernandes, C., Aitchison, K. J., Mathé, A. A., et al. (2011). Antidepressants and the resilience to early-life stress in inbred mouse strains. *Pharmacogenet. Genomics* 21, 779–789. doi: 10.1097/FPC.0b013e32834b3f35.
- Black, P. H., and Garbutt, L. D. (2002). Stress, inflammation and cardiovascular disease.
- Blandino, P., Barnum, C. J., and Deak, T. (2006). The involvement of norepinephrine and microglia in hypothalamic and splenic IL-1 β responses to stress. *J. Neuroimmunol.* 173, 87–95. doi: 10.1016/j.jneuroim.2005.11.021.

- Braun, A. A., Skelton, M. R., Vorhees, C. V., and Williams, M. T. (2011). Comparison of the elevated plus and elevated zero mazes in treated and untreated male Sprague-Dawley rats: Effects of anxiolytic and anxiogenic agents. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 97, 406–415. doi: 10.1016/j.pbb.2010.09.013.
- Brown, G. C., and Neher, J. J. (2014). Microglial phagocytosis of live neurons. *Nat. Rev. Neurosci.* 15, 209–216. doi: 10.1038/nrn3710.
- Butovsky, O., Jedrychowski, M. P., Moore, C. S., Cialic, R., Lanser, A. J., Gabriely, G., et al. (2014). Identification of a unique TGF- β -dependent molecular and functional signature in microglia (Nature Neuroscience (2014) 17 (131-143)). *Nat. Neurosci.* 17, 1286. doi: 10.1038/nn0914-1286d.
- Cahill, L., Uncapher, M., Kilpatrick, L., Alkire, M. T., and Turner, J. (2004). Sex-related hemispheric lateralization of amygdala function in emotionally influenced memory: An fMRI investigation. *Learn. Mem.* 11, 261–266. doi: 10.1101/lm.70504.
- Can, A., Dao, D. T., Arad, M., Terrillion, C. E., Piantadosi, S. C., and Gould, T. D. (2011). The mouse forced swim test. *J. Vis. Exp.*, 4–8. doi: 10.3791/3638.
- Cannon, W. B. (1914). The Interrelations of Emotions as Suggested by Recent Physiological Researches. *Am. J. Psychol.* 25, 256–282.
- Cardona, A. E., Piro, E. P., Sasse, M. E., Kostenko, V., Cardona, S. M., Dijkstra, I. M., et al. (2006). Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nat. Neurosci.* 9, 917–924. doi: 10.1038/nn1715.
- Charil, A., Laplante, D. P., Vaillancourt, C., and King, S. (2010). Prenatal stress and brain development. *Brain Res. Rev.* 65, 56–79. doi: 10.1016/j.brainresrev.2010.06.002.
- Clarke, T. K., Nymberg, C., and Schumann, G. (2012). Genetic and environmental determinants of stress responding. *Alcohol Res. Curr. Rev.* 34, 484–494.
- Colom-Lapetina, J., Li, A. J., Pelegrina-Perez, T. C., and Shansky, R. M. (2019). Behavioral diversity across classic rodent models is sex-dependent. *Front. Behav. Neurosci.* 13, 1–8. doi: 10.3389/fnbeh.2019.00045.
- Cornell, J., Salinas, S., Huang, H. Y., and Zhou, M. (2022). Microglia regulation of synaptic plasticity and learning and memory. *Neural Regen. Res.* 17, 705–716. doi: 10.4103/1673-5374.322423.
- Costa-Mattioli, M., and Walter, P. (2020). The integrated stress response: From mechanism to disease. *Science* 368. doi: 10.1126/science.aat5314.
- Crawley, J. N. (1985). Exploratory Behavior Models of Anxiety in Mice.
- Dahmen, B., Puetz, V. B., Scharke, W., Von Polier, G. G., Herpertz-Dahlmann, B., and Konrad, K. (2018). Effects of Early-Life Adversity on Hippocampal Structures and Associated HPA Axis Functions. *Dev. Neurosci.* 40, 13–22. doi: 10.1159/000484238.
- De Kloet, E. R., and Molendijk, M. L. (2016). Coping with the Forced Swim Stressor: Towards Understanding an Adaptive Mechanism. *Neural Plast.* 2016. doi: 10.1155/2016/6503162.
- de Matos, L. O., de Araujo Lima Reis, A. L., Lopes Guerra, L. T., de Oliveira Guarnieri, L., Moraes, M. A., Arabe, L. B., et al. (2020). Early postnatal L-Dopa treatment causes

behavioral alterations in female vs. male young adult Swiss mice. *Neuropharmacology* 170. doi: 10.1016/j.neuropharm.2020.108047.

de Matos, L. O., Reis, A. L. de A. L., Guerra, L. T. L., Guarnieri, L. de O., Moraes, M. A., Aquino, N. S. S., et al. (2018). l-Dopa treatment during perinatal development leads to different behavioral alterations in female vs. male juvenile Swiss mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 173, 1–14. doi: 10.1016/j.pbb.2018.08.002.

De Pablos, R. M., Herrera, A. J., Espinosa-Oliva, A. M., Sarmiento, M., Muñoz, M. F., Machado, A., et al. (2014). Chronic stress enhances microglia activation and exacerbates death of nigral dopaminergic neurons under conditions of inflammation. *J. Neuroinflammation* 11, 1–18. doi: 10.1186/1742-2094-11-34.

Delpech, J.-C., Wei, L., Hao, J., Yu, X., Madore, C., Butovsky, O., et al. (2016). Early life stress perturbs the maturation of microglia in the developing hippocampus. *Brain Behav Immun.* 57, 79–93. doi: 10.1016/j.bbi.2016.06.006.

Dinkel, K., MacPherson, A., and Sapolsky, R. M. (2003). Novel glucocorticoid effects on acute inflammation in the CNS. *J. Neurochem.* 84, 705–716. doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.01604.x.

Egan, R. J., Bergner, C. L., Hart, P. C., Cachat, J. M., Canavello, P. R., Elegante, M. F., et al. (2009). Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behav. Brain Res.* 205, 38–44. doi: 10.1016/j.bbr.2009.06.022.

Ennaceur, A., and Chazot, P. L. (2016). Preclinical animal anxiety research – flaws and prejudices. *Pharmacol. Res. Perspect.* 4. doi: 10.1002/prp2.223.

Even, N., Devaud, J. M., and Barron, A. B. (2012). General stress responses in the honey bee. *Insects* 3, 1271–1298. doi: 10.3390/insects3041271.

Eyo, U. B., and Wu, L. J. (2013). Bidirectional microglia-neuron communication in the healthy brain. *Neural Plast.* 2013. doi: 10.1155/2013/456857.

Fernandes, C., González, M. I., Wilson, C. A., and File, S. E. (1999). Factor analysis shows that female rat behaviour is characterized primarily by activity, male rats are driven by sex and anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 64, 731–736. doi: 10.1016/S0091-3057(99)00139-2.

Francis, D. D., and Meaney, M. J. (1999). Maternal care and the development of stress responses. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9, 128–134. doi: 10.1016/S0959-4388(99)80016-6.

Frank, M. G., Baratta, M. V., Sprunger, D. B., Watkins, L. R., and Maier, S. F. (2007). Microglia serve as a neuroimmune substrate for stress-induced potentiation of CNS pro-inflammatory cytokine responses. *Brain Behav. Immun.* 21, 47–59. doi: 10.1016/j.bbi.2006.03.005.

Giridharan, V. V., Réus, G. Z., Selvaraj, S., Scaini, G., Barichello, T., and Quevedo, J. (2019). Maternal deprivation increases microglial activation and neuroinflammatory markers in the prefrontal cortex and hippocampus of infant rats. *J. Psychiatr. Res.* 115, 13–20. doi: 10.1016/j.jpsychires.2019.05.001.

Goldstein, D. S., and Kopin, I. J. (2007). Evolution of concepts of stress. *Stress* 10, 109–120. doi: 10.1080/10253890701288935.

Goncharova, N. D. (2020). The HPA Axis under Stress and Aging: Individual

- Vulnerability is Associated with Behavioral Patterns and Exposure Time. *BioEssays* 42, 1–9. doi: 10.1002/bies.202000007.
- Gray, J. D., Rubin, T. G., Hunter, R. G., and McEwen, B. S. (2014). Hippocampal gene expression changes underlying stress sensitization and recovery. *Mol. Psychiatry* 19, 1171–1178. doi: 10.1038/mp.2013.175.
- Grissom, N., and Bhatnagar, S. (2009). Habituation to repeated stress: Get used to it. *Neurobiol. Learn. Mem.* 92, 215–224. doi: 10.1016/j.nlm.2008.07.001.
- Gruene, T. M., Flick, K., Stefano, A., Shea, S. D., and Shansky, R. M. (2015). Sexually divergent expression of active and passive conditioned fear responses in rats. *Elife* 4, 1–9. doi: 10.7554/elife.11352.
- Gründemann, J., Bitterman, Y., Lu, T., Krabbe, S., Grewe, B. F., Schnitzer, M. J., et al. (2019). Amygdala ensembles encode behavioral states. *Science* (80-.). 364. doi: 10.1126/science.aav8736.
- Hall, C. S. (1934). Emotional Behavior in the Rat. *J. Comp. Psychol.* 18, 385–403.
- Han, Y., Zhang, L., Wang, Q., Zhang, D., Zhao, Q., and Zhang, J. (2019). Minocycline inhibits microglial activation and alleviates depressive-like behaviors in male adolescent mice subjected to maternal separation. *Psychoneuroendocrinology* 107, 37–45. doi: 10.1016/j.psyneuen.2019.04.021.
- Hanisch, U. K., and Kettenmann, H. (2007). Microglia: Active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat. Neurosci.* 10, 1387–1394. doi: 10.1038/nn1997.
- Hart, H., and Rubia, K. (2012). Neuroimaging of child abuse: a critical review. *Front. Hum. Neurosci.* 6, 52. doi: 10.3389/fnhum.2012.00052.
- He, T., Guo, C., Wang, C., Hu, C., and Chen, H. (2020). Effect of early life stress on anxiety and depressive behaviors in adolescent mice. *Brain Behav.* 10, 1–10. doi: 10.1002/brb3.1526.
- Hefner, K., and Holmes, A. (2007). Ontogeny of fear-, anxiety- and depression-related behavior across adolescence in C57BL/6J mice. *Behav. Brain Res.* 176, 210–215. doi: 10.1016/j.bbr.2006.10.001.
- Heredia, L., Torrente, M., Colomina, M. T., and Domingo, J. L. (2014). Assessing anxiety in C57BL/6J mice: A pharmacological characterization of the open-field and light/dark tests. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 69, 108–114. doi: 10.1016/j.vascn.2013.12.005.
- Hill, D., Conner, M., Clancy, F., Moss, R., Wilding, S., Bristow, M., et al. (2021). Stress and eating behaviours in healthy adults: a systematic review and meta-analysis. *Health Psychol. Rev.* doi: 10.1080/17437199.2021.1923406.
- Hong, S., Dissing-Olesen, L., and Stevens, B. (2016). New insights on the role of microglia in synaptic pruning in health and disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 36, 128–134. doi: 10.1016/j.conb.2015.12.004.
- Jiménez, J. A., and Zylka, M. J. (2021). Controlling litter effects to enhance rigor and reproducibility with rodent models of neurodevelopmental disorders. *J. Neurodev. Disord.* 13, 1–9. doi: 10.1186/s11689-020-09353-y.

- Johnston, A. L., and File, S. E. (1991). Sex differences in animal tests of anxiety. *Physiol. Behav.* 49, 245–250. doi: 10.1016/0031-9384(91)90039-Q.
- Jung, S., Aliberti, J., Graemmel, P., Sunshine, M. J., Kreutzberg, G. W., Sher, A., et al. (2000). Analysis of Fractalkine Receptor CX3CR1 Function by Targeted Deletion and Green Fluorescent Protein Reporter Gene Insertion. *Mol. Cell. Biol.* 20, 4106–4114. doi: 10.1128/mcb.20.11.4106-4114.2000.
- Kazakou, P., Nicolaides, N. C., and Chrousos, G. P. (2022). Basic Concepts and Hormonal Regulators of the Stress System. *Horm. Res. Paediatr.* doi: 10.1159/000523975.
- Kindsvatter, A., and Geroski, A. (2014). The impact of early life stress on the neurodevelopment of the stress response system. *J. Couns. Dev.* 92, 472–480. doi: 10.1002/j.1556-6676.2014.00173.x.
- Kuleshkaya, N., and Voikar, V. (2014). Assessment of mouse anxiety-like behavior in the light-dark box and open-field arena: Role of equipment and procedure. *Physiol. Behav.* 133, 30–38. doi: 10.1016/j.physbeh.2014.05.006.
- Lander, S. S., Linder-Shacham, D., and Gaisler-Salomon, I. (2017). Differential effects of social isolation in adolescent and adult mice on behavior and cortical gene expression. *Behav. Brain Res.* 316, 245–254. doi: 10.1016/j.bbr.2016.09.005.
- Laviola, G., Macrì, S., Morley-Fletcher, S., and Adriani, W. (2003). Risk-taking behavior in adolescent mice: Psychobiological determinants and early epigenetic influence. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 27, 19–31. doi: 10.1016/S0149-7634(03)00006-X.
- Lewis, S. (2011). Development: Microglia go pruning. *Nat. Rev. Neurosci.* 12, 492–493. doi: 10.1038/nrn3095.
- Li, K., Nakajima, M., Ibañez-Tallon, I., and Heintz, N. (2016). A Cortical Circuit for Sexually Dimorphic Oxytocin-Dependent Anxiety Behaviors. *Cell* 167, 60–72. doi: 10.1016/j.cell.2016.08.067.
- Liu, H. Y., Yue, J., Hu, L. N., Cheng, L. F., Wang, X. S., Wang, X. J., et al. (2018). Chronic minocycline treatment reduces the anxiety-like behaviors induced by repeated restraint stress through modulating neuroinflammation. *Brain Res. Bull.* 143, 19–26. doi: 10.1016/j.brainresbull.2018.08.015.
- Lopes, G., Bonacchi, N., Frazão, J., Neto, J. P., Atallah, B. V., Soares, S., et al. (2015). Bonsai: An event-based framework for processing and controlling data streams. *Front. Neuroinform.* 9, 1–14. doi: 10.3389/fninf.2015.00007.
- Luo, P., Chu, S. feng, Zhang, Z., Xia, C. yuan, and Chen, N. hong (2019). Fractalkine/CX3CR1 is involved in the cross-talk between neuron and glia in neurological diseases. *Brain Res. Bull.* 146, 12–21. doi: 10.1016/j.brainresbull.2018.11.017.
- Ma, Y. (2015). Neuropsychological mechanism underlying antidepressant effect: A systematic meta-analysis. *Mol. Psychiatry* 20, 311–319. doi: 10.1038/mp.2014.24.
- MacPherson, A., Dinkel, K., and Sapolsky, R. (2005). Glucocorticoids worsen excitotoxin-induced expression of pro-inflammatory cytokines in hippocampal cultures. *Exp. Neurol.* 194, 376–383. doi: 10.1016/j.expneurol.2005.02.021.

- Marketon, J. I. W., and Glaser, R. (2008). Stress hormones and immune function. *Cell. Immunol.* 252, 16–26. doi: 10.1016/j.cellimm.2007.09.006.
- Marsh, R., Gerber, A. J., and Peterson, B. S. (2008). Neuroimaging Studies of Normal Brain Development and Their Relevance for Understanding Childhood Neuropsychiatric Disorders. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 47, 1233–1251. doi: 10.1097/CHI.0b013e318185e703.
- Matuszewich, L., Karney, J. J., Carter, S. R., Janasik, S. P., O'Brien, J. L., and Friedman, R. D. (2007). The Delayed Effects of Chronic Unpredictable Stress on Anxiety Measures. *Physiol. Behav.* 90, 674–681. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>.
- McEwen, B. S. (1998). Stress, Adaptation, and Disease. *Ann. New York Acad. Sci.* 840, 33–44. Available at: https://www.researchgate.net/publication/269107473_What_is_governance/link/548173090cf22525dcb61443/download%0Ahttp://www.econ.upf.edu/~reynal/Civilwars_12December2010.pdf%0Ahttps://think-asia.org/handle/11540/8282%0Ahttps://www.jstor.org/stable/41857625.
- Mody, M., Cao, Y., Cui, Z., Tay, K. Y., Shyong, A., Shimizu, E., et al. (2001). Genome-wide gene expression profiles of the developing mouse hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 8862–8867. doi: 10.1073/pnas.141244998.
- Montgomery, S. H. (2014). The relationship between play, brain growth and behavioural flexibility in primates. *Anim. Behav.* 90, 281–286. doi: 10.1016/j.anbehav.2014.02.004.
- Mordelt, A., and de Witte, L. D. (2023). Microglia-mediated synaptic pruning as a key deficit in neurodevelopmental disorders: Hype or hope? *Curr. Opin. Neurobiol.* 79, 102674. doi: 10.1016/j.conb.2022.102674.
- Mosser, C. A., Baptista, S., Arnoux, I., and Audinat, E. (2017). Microglia in CNS development: Shaping the brain for the future. *Prog. Neurobiol.* 149–150, 1–20. doi: 10.1016/j.pneurobio.2017.01.002.
- Nadeau, S., and Rivest, S. (2003). Glucocorticoids play a fundamental role in protecting the brain during innate immune response. *J. Neurosci.* 23, 5536–5544. doi: 10.1523/jneurosci.23-13-05536.2003.
- Nair, A., and Bonneau, R. H. (2006). Stress-induced elevation of glucocorticoids increases microglia proliferation through NMDA receptor activation. *J. Neuroimmunol.* 171, 72–85. doi: 10.1016/j.jneuroim.2005.09.012.
- Nakajima, M., Görlich, A., and Heintz, N. (2014). Oxytocin modulates female sociosexual behavior through a specific class of prefrontal cortical interneurons. *Cell* 159, 295–305. doi: 10.1016/j.cell.2014.09.020.
- Own, L. S., and Patel, P. D. (2013). Maternal behavior and offspring resiliency to maternal separation in c57bl/6 mice. *Horm. Behav.* 63, 411–417. doi: 10.1016/j.yhbeh.2012.11.010.
- Pan, X., Wang, Z., Wu, X., Wen, S. W., and Liu, A. (2018). Salivary cortisol in post-traumatic stress disorder: A systematic review and meta-analysis. *BMC Psychiatry* 18, 1–10. doi: 10.1186/s12888-018-1910-9.

- Paolicelli, R. C., Bisht, K., and Tremblay, M. È. (2014). Fractalkine regulation of microglial physiology and consequences on the brain and behavior. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 1–10. doi: 10.3389/fncel.2014.00129.
- Paolicelli, R. C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., et al. (2011). Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science (80-)*. 333, 1456–1458. doi: 10.1126/science.1202529.
- Paolicelli, R. C., Sierra, A., Stevens, B., Tremblay, M. E., Aguzzi, A., Ajami, B., et al. (2022). Microglia states and nomenclature: A field at its crossroads. *Neuron* 110, 3458–3483. doi: 10.1016/j.neuron.2022.10.020.
- Parker, K. J., Schatzberg, A. F., and Lyons, D. M. (2003). Neuroendocrine aspects of hypercortisolism in major depression. *Horm. Behav.* 43, 60–66. doi: 10.1016/S0018-506X(02)00016-8.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., and Briley, M. (1985). Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods* 14, 149–167. doi: 10.1016/0165-0270(85)90031-7.
- Peña, C. J., Kronman, H. G., Walker, D. M., Cates, H. M., Bagot, R. C., Purushothaman, I., et al. (2017). Early life stress confers lifelong stress susceptibility in mice via ventral tegmental area OTX2. *Science (80-)*. 356, 1185–1188. doi: 10.1126/science.aan4491.
- Peña, C. J., Nestler, E. J., and Bagot, R. C. (2019). Environmental programming of susceptibility and resilience to stress in adulthood in male mice. *Front. Behav. Neurosci.* 13, 1–13. doi: 10.3389/fnbeh.2019.00040.
- Pervanidou, P., Agorastos, A., and Chrousos, G. P. (2022). Editorial: Stress and Neurodevelopment. *Front. Neurosci.* 16, 1–3. doi: 10.3389/fnins.2022.898872.
- Petit-Demouliere, B., Chenu, F., and Bourin, M. (2005). Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. *Psychopharmacology (Berl)*. 177, 245–255. doi: 10.1007/s00213-004-2048-7.
- Plotsky, P. M., and Meaney, M. J. (1993). Early , postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA , median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Mol. Brain Res.* 18, 195–200.
- Posternak, M. A., and Zimmerman, M. (2005). Is there a delay in the antidepressant effect? A meta-analysis. *J. Clin. Psychiatry* 66, 148–158. doi: 10.4088/JCP.v66n0201.
- Powell, T. R., Fernandes, C., and Schalkwyk, L. C. (2012). Depression-Related Behavioral Tests. *Curr. Protoc. Mouse Biol.* 2, 119–127. doi: 10.1002/9780470942390.mo110176.
- Prut, L., and Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review. *Eur. J. Pharmacol.* 463, 3–33. doi: 10.1016/S0014-2999(03)01272-X.
- Reshef, R., Kreisel, T., Beroukhim Kay, D., and Yirmiya, R. (2014). Microglia and their CX3CR1 signaling are involved in hippocampal- but not olfactory bulb-related memory and neurogenesis. *Brain. Behav. Immun.* 41, 239–250. doi: 10.1016/j.bbi.2014.04.009.
- Rodgers, R. J., and Dalvi, A. (1997). Anxiety, defence and the elevated plus-maze.

Neurosci. Biobehav. Rev. 21, 801–810. doi: 10.1016/S0149-7634(96)00058-9.

Roque, A., Ochoa-Zarzosa, A., and Torner, L. (2016). Maternal separation activates microglial cells and induces an inflammatory response in the hippocampus of male rat pups, independently of hypothalamic and peripheral cytokine levels. *Brain. Behav. Immun.* 55, 39–48. doi: 10.1016/j.bbi.2015.09.017.

Sakai, J. (2020). How synaptic pruning shapes neural wiring during development and, possibly, in disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 117, 16096–16099. doi: 10.1073/pnas.2010281117.

Sanacora, G., Yan, Z., and Popoli, M. (2022). The stressed synapse 2.0: pathophysiological mechanisms in stress-related neuropsychiatric disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 23, 86–103. doi: 10.1038/s41583-021-00540-x.

Sapolsky, R. M. (1994). Individual differences and the stress response. *Semin. Neurosci.* 6, 261–269. doi: 10.1006/smns.1994.1033.

Sapolsky, R. M. (2004). *Why Don't Zebras Get Ulcers.* Henry Holt Co. 3rd Edition.

Sapolsky, R. M. (2015). Why Zebras Don't Get Ulcers. *Syria Stud.* 7, 37–72. Available at:

https://www.researchgate.net/publication/269107473_What_is_governance/link/548173090cf22525dcb61443/download%0Ahttp://www.econ.upf.edu/~reynal/Civilwars_12December2010.pdf%0Ahttps://think-asia.org/handle/11540/8282%0Ahttps://www.jstor.org/stable/41857625.

Sapolsky, R. M., Leung, S., Li, X., and Stark, G. R. (1996). Why Stress Is Bad for Your Brain Find That Hanging Together Can Be Stimulating. *Science* (80-.). 273, 9–10.

Schafer, D. P., Lehrman, E. K., Kautzman, A. G., Koyama, R., Mardinly, A. R., Yamasaki, R., et al. (2012). Microglia Sculpt Postnatal Neural Circuits in an Activity and Complement-Dependent Manner. *Neuron* 74, 691–705. doi: 10.1016/j.neuron.2012.03.026.

Scholl, J. L., Afzal, A., Fox, L. C., Watt, M. J., and Forster, G. L. (2019). Sex differences in anxiety-like behaviors in rats. *Physiol. Behav.* 211, 112670. doi: 10.1016/j.physbeh.2019.112670.

Schubert, I., Ahlbrand, R., Winter, A., Vollmer, L., Lewkowich, I., and Sah, R. (2018). Enhanced fear and altered neuronal activation in forebrain limbic regions of CX3CR1-deficient mice. *Brain. Behav. Immun.* 68, 34–43. doi: 10.1016/j.bbi.2017.09.013.

Schultz, W. (2007). Behavioral dopamine signals. *Trends Neurosci.* 30, 203–210. doi: 10.1016/j.tins.2007.03.007.

Seibenhener, M. L., and Wooten, M. C. (2015). Use of the Open Field Maze to Measure Locomotor and Anxiety-like Behavior in Mice. *J. Vis. Exp.*, 1–6. doi: 10.3791/52434.

Selye, H. (1936). A Syndrome Produced by Diverse Nocuous Agents. *Nature* 138, 32.

Selye, H. (1975). Confusion and controversy in the stress field. *J. Human Stress* 1, 37–44. doi: 10.1080/0097840X.1975.9940406.

Shanks, N., Griffiths, J., Zalcman, S., Zacharko, R. M., and Anisman, H. (1990). Mouse strain differences in plasma corticosterone following uncontrollable footshock. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 36, 515–519. doi: 10.1016/0091-3057(90)90249-H.

- Shansky, R. M. (2015). Sex differences in PTSD resilience and susceptibility: Challenges for animal models of fear learning. *Neurobiol. Stress* 1, 60–65. doi: 10.1016/j.ynstr.2014.09.005.
- Shigemoto-Mogami, Y., Hoshikawa, K., Goldman, J. E., Sekino, Y., and Sato, K. (2014). Microglia enhance neurogenesis and oligodendrogenesis in the early postnatal subventricular zone. *J. Neurosci.* 34, 2231–2243. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1619-13.2014.
- Shin, S. Y., Han, S. H., Woo, R. S., Jang, S. H., and Min, S. S. (2016). 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* 316, 221–231. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.12.041.
- Sierra, A., Encinas, J. M., Deudero, J. J. P., Chancey, J. H., Enikolopov, G., Overstreet-Wadiche, L. S., et al. (2010). Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell* 7, 483–495. doi: 10.1016/j.stem.2010.08.014.
- Sierra, A., Tremblay, M. È., and Wake, H. (2014). Never-resting microglia: Physiological roles in the healthy brain and pathological implications. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 2013–2014. doi: 10.3389/fncel.2014.00240.
- Stephens, A., and Kivimäki, M. (2012). Stress and cardiovascular disease. *Nat. Rev. Cardiol.* 9, 360–370. doi: 10.1038/nrcardio.2012.45.
- Stiles, J., and Jernigan, T. L. (2010). The basics of brain development. *Neuropsychol. Rev.* 20, 327–348. doi: 10.1007/s11065-010-9148-4.
- Sugama, S., Fujita, M., Hashimoto, M., and Conti, B. (2007). Stress induced morphological microglial activation in the rodent brain: Involvement of interleukin-18. *Neuroscience* 146, 1388–1399. doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.02.043.
- Sugama, S., and Kakinuma, Y. (2020). Stress and brain immunity: Microglial homeostasis through hypothalamus-pituitary-adrenal gland axis and sympathetic nervous system. *Brain, Behav. Immun. - Heal.* 7, 100111. doi: 10.1016/j.bbih.2020.100111.
- Tang, A. C., Reeb-Sutherland, B. C., Romeo, R. D., and McEwen, B. S. (2014). On the causes of early life experience effects: Evaluating the role of mom. *Front. Neuroendocrinol.* 35, 245–251. doi: 10.1016/j.yfrne.2013.11.002.
- Tejada, J., Chaim, K. T., and Morato, S. (2017). X-PloRat: A software for scoring animal behavior in enclosed spaces. *Psicol. Teor. e Pesqui.* 33, 1–4. doi: 10.1590/0102.3772e3322.
- Tofoli, S. M. D. C., Baes, C. V. W., Martins, C. M. S., and Juruena, M. (2011). Early life stress, HPA axis, and depression. *Psychol. Neurosci.* 4, 229–234. doi: 10.3922/j.psns.2011.2.008.
- Tractenberg, S. G., Levandowski, M. L., de Azeredo, L. A., Orso, R., Roithmann, L. G., Hoffmann, E. S., et al. (2016). An overview of maternal separation effects on behavioural outcomes in mice: Evidence from a four-stage methodological systematic review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 68, 489–503. doi: 10.1016/j.neubiorev.2016.06.021.
- Tremblay, M. È., Lowery, R. L., and Majewska, A. K. (2010). Microglial interactions

with synapses are modulated by visual experience. *PLoS Biol.* 8. doi: 10.1371/journal.pbio.1000527.

Tynan, R. J., Naicker, S., Hinwood, M., Nalivaiko, E., Buller, K. M., Pow, D. V., et al. (2010). Chronic stress alters the density and morphology of microglia in a subset of stress-responsive brain regions. *Brain. Behav. Immun.* 24, 1058–1068. doi: 10.1016/j.bbi.2010.02.001.

Ueno, M., Fujita, Y., Tanaka, T., Nakamura, Y., Kikuta, J., Ishii, M., et al. (2013). Layer v cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. *Nat. Neurosci.* 16, 543–551. doi: 10.1038/nn.3358.

Van Den Eede, F., Van Broeckhoven, C., and Claes, S. J. (2005). Corticotropin-releasing factor-binding protein, stress and major depression. *Ageing Res. Rev.* 4, 213–239. doi: 10.1016/j.arr.2005.02.002.

Wake, H., Moorhouse, A. J., Miyamoto, A., and Nabekura, J. (2013). Microglia: Actively surveying and shaping neuronal circuit structure and function. *Trends Neurosci.* 36, 209–217. doi: 10.1016/j.tins.2012.11.007.

Walf, A. A., and Frye, C. A. (2007). The use of the elevated. *Nat. Protoc.* 2, 322–328. doi: 10.1038/nprot.2007.44.The.

Walsh, R. N., and Cummins, R. a (1976). The Open-Field Test: a critical review. *Psychol. Bull.* 83, 482–504. doi: 10.1037/0033-2909.83.3.482.

Wang, J., Li, J., Sheng, X., Zhao, H., Cao, X.-D., Wang, Y.-Q., et al. (2010). β -adrenoceptor mediated surgery-induced production of pro-inflammatory cytokines in rat microglia cells. 77–83. doi: 10.1016/j.jneuroim.2010.04.006.

Weiss, I. C., Franklin, T. B., Vizi, S., and Mansuy, I. M. (2011). Inheritable effect of unpredictable maternal separation on behavioral responses in mice. *Front. Behav. Neurosci.* 5, 1–12. doi: 10.3389/fnbeh.2011.00003.

Westphal, M., Sant, P., Hauser, A. T., Jung, M., and Driever, W. (2020). Chemical Genetics Screen Identifies Epigenetic Mechanisms Involved in Dopaminergic and Noradrenergic Neurogenesis in Zebrafish. *Front. Genet.* 11. doi: 10.3389/fgene.2020.00080.

Winkler, Z., Kuti, D., Ferenczi, S., Gulyás, K., Polyák, Á., and Kovács, K. J. (2017). Impaired microglia fractalkine signaling affects stress reaction and coping style in mice. *Behav. Brain Res.* 334, 119–128. doi: 10.1016/j.bbr.2017.07.023.

Wohleb, E. S., Powell, N. D., Godbout, J. P., and Sheridan, J. F. (2013). Stress-induced recruitment of bone marrow-derived monocytes to the brain promotes anxiety-like behavior. *J. Neurosci.* 33, 13820–13833. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1671-13.2013.

Wolf, Y., Yona, S., Kim, K. W., and Jung, S. (2013). Microglia, seen from the CX3CR1 angle. *Front. Cell. Neurosci.* 7, 1–9. doi: 10.3389/fncel.2013.00026.

Xie, Y., Wang, P., Cui, X., Liu, L., Wang, P., Jing, S., et al. (2022). Dopaminergic neurons project to the nucleus accumbens regulates anxiety-like behaviors through dopamine D1 signaling. *Behav. Brain Res.* 416, 113540. doi: 10.1016/j.bbr.2021.113540.

ANEXO 1: Tabelas Estatística Descritiva

Tabela 8: Estatística do teste de Shapiro-Wilk

Teste de Campo Aberto	Valor de p	Resultado
Distância Percorrida	0,0002	Dados não paramétricos
Tempo no Centro	0,010	Dados não paramétricos
Tempo nas Periferias	0,287	Dados paramétricos
Tempo nos Cantos	0,789	Dados paramétricos
Caixa de Claro/Escuro	Valor de p	Resultado
Latência	$2,252 \times 10^{-15}$	Dados não paramétricos
Tempo Claro	0,051	Dados paramétricos
Cruzamentos	$6,794 \times 10^{-5}$	Dados não paramétricos
Labirinto em Cruz Elevado	Valor de p	Resultado
Tempo Braços Abertos	0,002	Dados não paramétricos
Tempo Braços Fechados	0,492	Dados paramétricos
Tempo Centro	$1,532 \times 10^{-6}$	Dados não paramétricos
Cruzamentos Braços Abertos	$3,432 \times 10^{-7}$	Dados não paramétricos
Cruzamentos Braços Fechados	$7,696 \times 10^{-7}$	Dados não paramétricos
Teste de Nado Forçado	Valor de p	Resultado
Tempo Imobilidade	$2,165 \times 10^{-07}$	Dados não paramétricos
Frequência Imobilidade	0,0001	Dados não paramétricos
Tempo <i>Climbing</i>	$3,365 \times 10^{10}$	Dados não paramétricos
Frequência <i>Climbing</i>	0,003	Dados não paramétricos

Tabela 9: Estatística Descritiva Teste Campo Aberto

Distância Percorrida (cm)						
Background Genético	Grupo	Sexo	n	Média	Mediana	Desvio Padrão
<i>Wild-type</i>	Controle	Fêmeas	10	5106,584	5146,402	894,638
		Machos	18	4694,685	4509,979	976,157
	Separação Maternal	Fêmeas	9	4952,145	5030,495	1022,464
		Machos	13	4657,643	4254,782	1287,138
CX3CR1-GFP+/-	Controle	Fêmeas	11	3702,126	3695,765	520,362
		Machos	13	4160,822	4105,360	567,986

	Separação	Fêmeas	17	4757,938	4697,072	899,599
	Maternal	Machos	14	4257,763	3989,863	1105,572
Tempo no Centro (s)						
Background Genético	Grupo	Sexo	n	Média	Mediana	Desvio Padrão
<i>Wild-type</i>	Controle	Fêmeas	10	81,067	66,384	46,812
		Machos	18	102,813	103,750	29,333
	Separação Maternal	Fêmeas	9	94,089	98,067	28,973
		Machos	13	78,575	82,667	16,828
CX3CR1-GFP+/-	Controle	Fêmeas	11	67,327	70,067	34,157
		Machos	13	88,264	77,100	46,405
	Separação Maternal	Fêmeas	17	99,307	99,900	30,582
		Machos	14	89,455	86,700	33,525
Tempo nas Periferias (s)						
Background Genético	Grupo	Sexo	n	Média	Mediana	Desvio Padrão
<i>Wild-type</i>	Controle	Fêmeas	10	208,547	211,100	25,373
		Machos	18	210,382	213,067	18,053
	Separação Maternal	Fêmeas	9	226,496	219,333	38,477
		Machos	13	233,490	229,667	22,577
CX3CR1-GFP+/-	Controle	Fêmeas	11	212,964	200,400	57,655
		Machos	13	211,549	210,867	42,182
	Separação Maternal	Fêmeas	17	231,371	234,100	34,853
		Machos	14	228,200	216,100	38,746
Tempo nos Cantos (s)						
Background Genético	Grupo	Sexo	n	Média	Mediana	Desvio Padrão
<i>Wild-type</i>	Controle	Fêmeas	10	216,513	207,817	48,152
		Machos	18	226,709	231,234	31,580
	Separação Maternal	Fêmeas	9	221,978	220,333	23,670
		Machos	13	229,115	228,567	19,396
CX3CR1-GFP+/-	Controle	Fêmeas	11	223,282	240,633	81,304
		Machos	13	211,149	217,933	44,057
	Separação Maternal	Fêmeas	17	226,286	212,017	46,897
		Machos	14	208,222	205,733	39,687

Tabela 10: Post-hoc Teste de Campo Aberto

Distância Percorrida (cm)					
Contraste	Estimate emmeans	Erro padrão	df	Valor t	Valor p
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – WT Separação Maternal Fêmeas	-623,41	278,82	16	-2,24	0,38
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas	274,37	278,32	16	0,99	0,97
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – WT Controle Fêmeas	-349,04	369,71	16	-0,94	0,98
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos	133,21	177,76	85	0,75	1,00
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – WT Separação Maternal Machos	-490,20	321,95	16	-1,52	0,79
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Controle Machos	407,58	326,42	16	1,25	0,90
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – WT Controle Machos	-215,83	400,12	16	-0,54	1,00
WT Separação Maternal Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas	897,78	416,79	16	2,15	0,42
WT Separação Maternal Fêmeas – WT Controle Fêmeas	274,37	278,32	16	0,99	0,97
WT Separação Maternal Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos	756,62	339,15	16	2,23	0,38
WT Separação Maternal Fêmeas – WT Separação Maternal Machos	133,21	177,76	85	0,75	1,00
WT Separação Maternal Fêmeas –	1030,99	456,60	16	2,26	0,37

CX3CR1-GFP+/- Controle Machos					
WT Separação Maternal Fêmeas – WT Controle Machos	407,58	326,42	16	1,25	0,90
CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas – WT Controle Fêmeas	-623,41	278,82	16	-2,24	0,38
CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos	-141,16	334,02	16	-0,42	1,00
CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas – WT Separação Maternal Machos	-764,57	449,60	16	-1,70	0,69
CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Controle Machos	133,21	177,76	85	0,75	1,00
CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas – WT Controle Machos	-490,20	321,95	16	-1,52	0,79
WT Controle Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos	482,25	420,10	16	1,15	0,94
WT Controle Fêmeas – WT Separação Maternal Machos	-141,16	334,02	16	-0,42	1,00
WT Controle Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Controle Machos	756,62	339,15	16	2,23	0,38
WT Controle Fêmeas – WT Controle Machos	133,21	177,76	85	0,75	1,00
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos – WT Separação Maternal Machos	-623,41	278,82	16	-2,24	0,38
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos – CX3CR1-GFP+/- Controle Machos	274,37	278,32	16	0,99	0,97
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos – WT Controle Machos	-349,04	369,71	16	-0,94	0,98
WT Separação Maternal Machos – CX3CR1-GFP+/- Controle Machos	897,78	416,79	16	2,15	0,42
WT Separação Maternal Machos – WT Controle Machos	274,37	278,32	16	0,99	0,97

CX3CR1-GFP+/- Controle Machos – WT Controle Machos	-623,41	278,82	16	-2,24	0,38
Tempo nas Periferias (s)					
Contraste	Estimate emmeans	Erro padrão	df	Valor t	Valor p
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – WT Separação Maternal Fêmeas	0,78	6,92	16	0,11	1,00
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas	19,10	6,90	16	2,77	0,17
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – WT Controle Fêmeas	19,88	9,16	16	2,17	0,42
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos	-0,59	6,96	85	-0,08	1,00
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – WT Separação Maternal Machos	0,20	9,45	16	0,02	1,00
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Controle Machos	18,51	9,69	16	1,91	0,56
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – WT Controle Machos	19,30	11,10	16	1,74	0,67
WT Separação Maternal Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas	18,32	10,35	16	1,77	0,65
WT Separação Maternal Fêmeas – WT Controle Fêmeas	19,10	6,90	16	2,77	0,17
WT Separação Maternal Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos	-1,37	10,16	16	-0,13	1,00
WT Separação Maternal Fêmeas – WT Separação Maternal Machos	-0,59	6,96	85	-0,08	1,00

WT Separação Maternal Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Controle Machos	17,73	12,66	16	1,40	0,84
WT Separação Maternal Fêmeas – WT Controle Machos	18,51	9,69	16	1,91	0,56
CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas – WT Controle Fêmeas	0,78	6,92	16	0,11	1,00
CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos	-19,69	9,90	16	-1,99	0,52
CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas – WT Separação Maternal Machos	-18,90	12,27	16	-1,54	0,78
CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Controle Machos	-0,59	6,96	85	-0,08	1,00
CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas – WT Controle Machos	0,20	9,45	16	0,02	1,00
WT Controle Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos	-20,47	11,89	16	-1,72	0,67
WT Controle Fêmeas – WT Separação Maternal Machos	-19,69	9,90	16	-1,99	0,52
WT Controle Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Controle Machos	-1,37	10,16	16	-0,13	1,00
WT Controle Fêmeas – WT Controle Machos	-0,59	6,96	85	-0,08	1,00
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos – WT Separação Maternal Machos	0,78	6,92	16	0,11	1,00
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos – CX3CR1-GFP+/- Controle Machos	19,10	6,90	16	2,77	0,17
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos – WT Controle Machos	19,88	9,16	16	2,17	0,42
WT Separação Maternal Machos – CX3CR1-GFP+/- Controle Machos	18,32	10,35	16	1,77	0,65
WT Separação Maternal Machos –	19,10	6,90	16	2,77	0,17

WT Controle Machos					
CX3CR1-GFP+/- Controle Machos – WT Controle Machos	0,78	6,92	16	0,11	1,00

Tabela 11: Estatística Descritiva Caixa Claro/Escuro

Latência (s)						
Background Genético	Grupo	Sexo	n	Média	Mediana	Desvio Padrão
<i>Wild-type</i>	Controle	Fêmeas	10	7,300	4	7,617
		Machos	18	12,278	6	11,999
	Separação Maternal	Fêmeas	9	11,556	8	9,774
		Machos	13	12,154	5	16,441
CX3CR1-GFP+/-	Controle	Fêmeas	11	25,182	9	30,103
		Machos	13	31,154	6	48,874
	Separação Maternal	Fêmeas	17	22,353	11	31,068
		Machos	14	10,714	7	13,356
Tempo no Claro (s)						
Background Genético	Grupo	Sexo	n	Média	Mediana	Desvio Padrão
<i>Wild-type</i>	Controle	Fêmeas	10	61,098	63,176	26,378
		Machos	18	73,019	77,787	26,097
	Separação Maternal	Fêmeas	9	71,849	70,236	16,195
		Machos	13	57,542	54,811	26,813
CX3CR1-GFP+/-	Controle	Fêmeas	11	60,938	49,439	30,946
		Machos	13	30,264	23,097	17,609
	Separação Maternal	Fêmeas	17	67,776	62,637	28,844
		Machos	14	76,103	78,579	27,533
Cruzamentos (n)						
Background Genético	Grupo	Sexo	n	Média	Mediana	Desvio Padrão
<i>Wild-type</i>	Controle	Fêmeas	10	216,513	207,817	48,152
		Machos	18	14,700	13	8,042
	Separação Maternal	Fêmeas	9	16,278	17	7,339
		Machos	13	16,889	15	6,051
CX3CR1-GFP+/-	Controle	Fêmeas	11	13,231	11	6,559

		Machos	13	12,909	11	5,166
	Separação Maternal	Fêmeas	17	8,308	8	4,553
		Machos	14	14,235	12	5,815

Tabela 12: Estatística Descritiva Labirinto em Cruz Elevado

Tempo Braços Abertos (s)						
Background Genético	Grupo	Sexo	n	Média	Mediana	Desvio Padrão
<i>Wild-type</i>	Controle	Fêmeas	10	65,447	62,734	22,175
		Machos	18	51,783	47,334	26,582
	Separação Maternal	Fêmeas	9	61,315	58,533	26,179
		Machos	13	40,067	41,167	16,918
CX3CR1-GFP+/-	Controle	Fêmeas	11	52,042	38,900	30,118
		Machos	13	43,179	41,933	29,821
	Separação Maternal	Fêmeas	17	64,586	64,350	38,818
		Machos	14	52,171	49,533	28,732
Tempo Braços Fechados (s)						
Background Genético	Grupo	Sexo	n	Média	Mediana	Desvio Padrão
<i>Wild-type</i>	Controle	Fêmeas	10	78,500	66,767	34,634
		Machos	18	98,408	101,884	53,773
	Separação Maternal	Fêmeas	9	81,422	81,133	54,868
		Machos	13	105,251	104,833	51,669
CX3CR1-GFP+/-	Controle	Fêmeas	11	120,955	121,100	36,182
		Machos	13	137,090	135,367	66,464
	Separação Maternal	Fêmeas	17	125,662	127,433	54,899
		Machos	14	166,988	170,867	50,098
Tempo Centro (s)						
Background Genético	Grupo	Sexo	n	Média	Mediana	Desvio Padrão
<i>Wild-type</i>	Controle	Fêmeas	10	14,760	15,250	6,435
		Machos	18	14,039	13,217	7,140
	Separação Maternal	Fêmeas	9	18,800	16,433	17,664
		Machos	13	15,513	12,267	8,354
CX3CR1-GFP+/-	Controle	Fêmeas	11	15,055	13,200	9,313

		Machos	13	9,813	9,867	7,755
	Separação Maternal	Fêmeas	17	14,669	13,734	8,629
		Machos	14	13,978	11,967	9,523
Cruzamentos para Braços Abertos (n)						
Background Genético	Grupo	Sexo	n	Média	Mediana	Desvio Padrão
<i>Wild-type</i>	Controle	Fêmeas	10	4,700	3	3,20
		Machos	18	3,056	2	2,58
	Separação Maternal	Fêmeas	9	3,889	2	3,48
		Machos	13	2,615	2	2,69
CX3CR1-GFP+/-	Controle	Fêmeas	11	3,818	4	2,48
		Machos	13	2,615	1	2,90
	Separação Maternal	Fêmeas	17	4,286	4	2,20
		Machos	14	2,941	2	3,01
Cruzamentos para Braços Fechados (n)						
Background Genético	Grupo	Sexo	n	Média	Mediana	Desvio Padrão
<i>Wild-type</i>	Controle	Fêmeas	10	7,400	6	4,881
		Machos	18	5,722	6	3,511
	Separação Maternal	Fêmeas	9	9,111	5	7,114
		Machos	13	5,308	4	3,945
CX3CR1-GFP+/-	Controle	Fêmeas	11	6,000	5	3,578
		Machos	13	3,769	2	4,045
	Separação Maternal	Fêmeas	17	5,929	5	3,668
		Machos	14	5,824	6	3,540

Tabela 13: Post-hoc Labirinto em Cruz Elevado

Tempo nos Braços Abertos (s)					
Contraste	Estimate emmeans	Erro padrão	df	Valor t	Valor p
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – WT Separação Maternal Fêmeas	-623,41	278,82	16	-2,24	0,38
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas	274,37	278,32	16	0,99	0,97
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas –	-349,04	369,71	16	-0,94	0,98

WT Controle Fêmeas					
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos	133,21	177,76	85	0,75	1,00
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – WT Separação Maternal Machos	-490,20	321,95	16	-1,52	0,79
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Controle Machos	407,58	326,42	16	1,25	0,90
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – WT Controle Machos	-215,83	400,12	16	-0,54	1,00
WT Separação Maternal Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas	897,78	416,79	16	2,15	0,42
WT Separação Maternal Fêmeas – WT Controle Fêmeas	274,37	278,32	16	0,99	0,97
WT Separação Maternal Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos	756,62	339,15	16	2,23	0,38
WT Separação Maternal Fêmeas – WT Separação Maternal Machos	133,21	177,76	85	0,75	1,00
WT Separação Maternal Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Controle Machos	1030,99	456,60	16	2,26	0,37
WT Separação Maternal Fêmeas – WT Controle Machos	407,58	326,42	16	1,25	0,90
CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas – WT Controle Fêmeas	-623,41	278,82	16	-2,24	0,38
CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos	-141,16	334,02	16	-0,42	1,00
CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas – WT Separação Maternal Machos	-764,57	449,60	16	-1,70	0,69
CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Controle Machos	133,21	177,76	85	0,75	1,00
CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas – WT Controle Machos	-490,20	321,95	16	-1,52	0,79
WT Controle Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos	482,25	420,10	16	1,15	0,94
WT Controle Fêmeas – WT Separação Maternal Machos	-141,16	334,02	16	-0,42	1,00
WT Controle Fêmeas –	756,62	339,15	16	2,23	0,38

CX3CR1-GFP+/- Controle Machos					
WT Controle Fêmeas – WT Controle Machos	133,21	177,76	85	0,75	1,00
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos – WT Separação Maternal Machos	-623,41	278,82	16	-2,24	0,38
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos – CX3CR1-GFP+/- Controle Machos	274,37	278,32	16	0,99	0,97
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos – WT Controle Machos	-349,04	369,71	16	-0,94	0,98
WT Separação Maternal Machos – CX3CR1-GFP+/- Controle Machos	897,78	416,79	16	2,15	0,42
WT Separação Maternal Machos – WT Controle Machos	274,37	278,32	16	0,99	0,97
CX3CR1-GFP+/- Controle Machos – WT Controle Machos	-623,41	278,82	16	-2,24	0,38
Tempo nos Braços Fechados (s)					
Contraste	Estimate emmeans	Erro padrão	df	Valor t	Valor p
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – WT Separação Maternal Fêmeas	48,74	17,48	16	2,79	0,17
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas	13,86	17,46	16	0,79	0,99
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – WT Controle Fêmeas	62,61	23,07	16	2,71	0,19
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos	-21,15	8,68	85	-2,44	0,24
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – WT Separação Maternal Machos	27,59	19,15	16	1,44	0,83
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Controle Machos	-7,29	19,33	16	-0,38	1,00
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – WT Controle Machos	41,45	24,21	16	1,71	0,68
WT Separação Maternal Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas	-34,88	26,25	16	-1,33	0,88
WT Separação Maternal Fêmeas – WT Controle Fêmeas	13,86	17,46	16	0,79	0,99

WT Separação Maternal Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos	-69,90	19,89	16	-3,51	0,05
WT Separação Maternal Fêmeas – WT Separação Maternal Machos	-21,15	8,68	85	-2,44	0,24
WT Separação Maternal Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Controle Machos	-56,03	27,79	16	-2,02	0,50
WT Separação Maternal Fêmeas – WT Controle Machos	-7,29	19,33	16	-0,38	1,00
CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas – WT Controle Fêmeas	48,74	17,48	16	2,79	0,17
CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos	-35,02	19,68	16	-1,78	0,64
CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas – WT Separação Maternal Machos	13,72	27,52	16	0,50	1,00
CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Controle Machos	-21,15	8,68	85	-2,44	0,24
CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas – WT Controle Machos	27,59	19,15	16	1,44	0,83
WT Controle Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos	-83,76	25,07	16	-3,34	0,06
WT Controle Fêmeas – WT Separação Maternal Machos	-35,02	19,68	16	-1,78	0,64
WT Controle Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Controle Machos	-69,90	19,89	16	-3,51	0,05
WT Controle Fêmeas – WT Controle Machos	-21,15	8,68	85	-2,44	0,24
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos – WT Separação Maternal Machos	48,74	17,48	16	2,79	0,17
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos – CX3CR1-GFP+/- Controle Machos	13,86	17,46	16	0,79	0,99
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos – WT Controle Machos	62,61	23,07	16	2,71	0,19
WT Separação Maternal Machos – CX3CR1-GFP+/- Controle Machos	-34,88	26,25	16	-1,33	0,88
WT Separação Maternal Machos – WT Controle Machos	13,86	17,46	16	0,79	0,99

CX3CR1-GFP+/- Controle Machos – WT Controle Machos	48,74	17,48	16	2,79	0,17
Cruzamentos para Braços Abertos (n)					
Contraste	Estimate emmeans	Erro padrão	df	Valor t	Valor p
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – WT Separação Maternal Fêmeas	-0,35	0,94	16	-0,38	1,00
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas	-0,10	0,94	16	-0,11	1,00
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – WT Controle Fêmeas	-0,45	1,24	16	-0,37	1,00
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos	1,21	0,46	85	2,61	0,17
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – WT Separação Maternal Machos	0,85	1,02	16	0,83	0,99
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Controle Machos	1,11	1,03	16	1,07	0,95
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – WT Controle Machos	0,76	1,30	16	0,58	1,00
WT Separação Maternal Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas	0,25	1,41	16	0,18	1,00
WT Separação Maternal Fêmeas – WT Controle Fêmeas	-0,10	0,94	16	-0,11	1,00
WT Separação Maternal Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos	1,56	1,06	16	1,47	0,81
WT Separação Maternal Fêmeas – WT Separação Maternal Machos	1,21	0,46	85	2,61	0,17
WT Separação Maternal Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Controle Machos	1,46	1,49	16	0,98	0,97
WT Separação Maternal Fêmeas – WT Controle Machos	1,11	1,03	16	1,07	0,95
CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas – WT Controle Fêmeas	-0,35	0,94	16	-0,38	1,00
CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos	1,31	1,05	16	1,24	0,91
CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas –	0,95	1,47	16	0,65	1,00

WT Separação Maternal Machos					
CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Controle Machos	1,21	0,46	85	2,61	0,17
CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas – WT Controle Machos	0,85	1,02	16	0,83	0,99
WT Controle Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos	1,66	1,34	16	1,24	0,91
WT Controle Fêmeas – WT Separação Maternal Machos	1,31	1,05	16	1,24	0,91
WT Controle Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Controle Machos	1,56	1,06	16	1,47	0,81
WT Controle Fêmeas – WT Controle Machos	1,21	0,46	85	2,61	0,17
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos – WT Separação Maternal Machos	-0,35	0,94	16	-0,38	1,00
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos – CX3CR1-GFP+/- Controle Machos	-0,10	0,94	16	-0,11	1,00
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos – WT Controle Machos	-0,45	1,24	16	-0,37	1,00
WT Separação Maternal Machos – CX3CR1-GFP+/- Controle Machos	0,25	1,41	16	0,18	1,00
WT Separação Maternal Machos – WT Controle Machos	-0,10	0,94	16	-0,11	1,00
CX3CR1-GFP+/- Controle Machos – WT Controle Machos	-0,35	0,94	16	-0,38	1,00
Cruzamentos para Braços Fechados (n)					
Contraste	Estimate emmeans	Erro padrão	df	Valor t	Valor p
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – WT Separação Maternal Fêmeas	-1,25	0,82	16	-1,54	0,79
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas	0,63	0,81	16	0,78	0,99
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – WT Controle Fêmeas	-0,62	1,08	16	-0,58	1,00
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos	1,66	0,82	85	2,03	0,47

CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – WT Separação Maternal Machos	0,41	1,11	16	0,37	1,00
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Controle Machos	2,30	1,15	16	2,00	0,48
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – WT Controle Machos	1,04	1,31	16	0,80	0,99
WT Separação Maternal Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas	1,89	1,22	16	1,54	0,78
WT Separação Maternal Fêmeas – WT Controle Fêmeas	0,63	0,81	16	0,78	0,99
WT Separação Maternal Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos	2,92	1,20	16	2,43	0,24
WT Separação Maternal Fêmeas – WT Separação Maternal Machos	1,66	0,82	85	2,03	0,47
WT Separação Maternal Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Controle Machos	3,55	1,50	16	2,37	0,27
WT Separação Maternal Fêmeas – WT Controle Machos	2,30	1,15	16	2,00	0,48
CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas – WT Controle Fêmeas	-1,25	0,82	16	-1,54	0,79
CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos	1,03	1,16	16	0,88	0,99
CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas – WT Separação Maternal Machos	-0,23	1,44	16	-0,16	1,00
CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Controle Machos	1,66	0,82	85	2,03	0,47
CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas – WT Controle Machos	0,41	1,11	16	0,37	1,00
WT Controle Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos	2,28	1,40	16	1,63	0,73
WT Controle Fêmeas – WT Separação Maternal Machos	1,03	1,16	16	0,88	0,99
WT Controle Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Controle Machos	2,92	1,20	16	2,43	0,24
WT Controle Fêmeas – WT Controle Machos	1,66	0,82	85	2,03	0,47

CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos – WT Separação Maternal Machos	-1,25	0,82	16	-1,54	0,79
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos – CX3CR1-GFP+/- Controle Machos	0,63	0,81	16	0,78	0,99
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos – WT Controle Machos	-0,62	1,08	16	-0,58	1,00
WT Separação Maternal Machos – CX3CR1-GFP+/- Controle Machos	1,89	1,22	16	1,54	0,78
WT Separação Maternal Machos – WT Controle Machos	0,63	0,81	16	0,78	0,99
CX3CR1-GFP+/- Controle Machos – WT Controle Machos	-1,25	0,82	16	-1,54	0,79

Tabela 14: Estatística Descritiva Teste de Nado Forçado

Tempo Imobilidade (s)						
Background Genético	Grupo	Sexo	n	Média	Mediana	Desvio Padrão
<i>Wild-type</i>	Controle	Fêmeas	10	91,990	97,215	45,405
		Machos	18	96,655	102,645	67,336
	Separação Maternal	Fêmeas	9	27,486	26,600	26,630
		Machos	13	52,877	64,719	48,077
CX3CR1-GFP+/-	Controle	Fêmeas	11	60,520	40,000	51,379
		Machos	13	59,023	70,550	48,678
	Separação Maternal	Fêmeas	17	21,890	3,250	32,788
		Machos	14	29,685	18,330	38,809
Frequência Imobilidade (n)						
Background Genético	Grupo	Sexo	n	Média	Mediana	Desvio Padrão
<i>Wild-type</i>	Controle	Fêmeas	10	16,000	18	6,650
		Machos	18	16,611	17	9,069
	Separação Maternal	Fêmeas	9	13,556	12	11,148
		Machos	13	12,769	13	9,167
CX3CR1-GFP+/-	Controle	Fêmeas	11	11,636	10	7,580

		Machos	13	13,769	13	13,020
	Separação	Fêmeas	17	5,000	3	5,449
	Maternal	Machos	14	7,000	8	6,062
Tempo Climbing (s)						
Background Genético	Grupo	Sexo	n	Média	Mediana	Desvio Padrão
<i>Wild-type</i>	Controle	Fêmeas	10	9,968	10,030	9,015
		Machos	18	5,967	3,236	7,291
	Separação Maternal	Fêmeas	9	8,883	8,520	5,727
		Machos	13	6,210	4,800	3,378
CX3CR1-GFP+/-	Controle	Fêmeas	11	13,439	9,214	10,701
		Machos	13	10,405	11,300	10,732
	Separação Maternal	Fêmeas	17	12,551	7,600	12,822
		Machos	14	7,834	4,260	8,513
Frequência Climbing (n)						
Background Genético	Grupo	Sexo	n	Média	Mediana	Desvio Padrão
<i>Wild-type</i>	Controle	Fêmeas	10	7,300	8	4,084
		Machos	18	5,222	5	4,052
	Separação Maternal	Fêmeas	9	8,222	8	3,270
		Machos	13	5,692	5	3,066
CX3CR1-GFP+/-	Controle	Fêmeas	11	8,000	8	3,768
		Machos	13	6,846	6	4,862
	Separação Maternal	Fêmeas	17	7,786	7	4,173
		Machos	14	6,059	5	3,631

Tabela 15: Post-hoc Teste de Nado Forçado

Tempo Imobilidade (s)					
Contraste	Estimate emmeans	Erro padrão	df	Valor t	Valor p
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – WT Separação Maternal Fêmeas	48,74	-23,83	15,69	16	-1,52
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas –	13,86	-41,51	15,67	16	-2,65

CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas					
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – WT Controle Fêmeas	62,61	-65,34	20,72	16	-3,15
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos	-21,15	-11,95	8,12	85	-1,47
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – WT Separação Maternal Machos	27,59	-35,78	17,31	16	-2,07
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Controle Machos	-7,29	-53,47	17,48	16	-3,06
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – WT Controle Machos	41,45	-77,29	21,84	16	-3,54
WT Separação Maternal Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas	-34,88	-17,69	23,54	16	-0,75
WT Separação Maternal Fêmeas – WT Controle Fêmeas	13,86	-41,51	15,67	16	-2,65
WT Separação Maternal Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos	-69,90	11,87	18,02	16	0,66
WT Separação Maternal Fêmeas – WT Separação Maternal Machos	-21,15	-11,95	8,12	85	-1,47
WT Separação Maternal Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Controle Machos	-56,03	-29,64	25,04	16	-1,18
WT Separação Maternal Fêmeas – WT Controle Machos	-7,29	-53,47	17,48	16	-3,06
CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas – WT Controle Fêmeas	48,74	-23,83	15,69	16	-1,52
CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos	-35,02	29,56	17,82	16	1,66
CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas – WT Separação Maternal Machos	13,72	5,74	24,77	16	0,23
CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Controle Machos	-21,15	-11,95	8,12	85	-1,47
CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas – WT Controle Machos	27,59	-35,78	17,31	16	-2,07
WT Controle Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos	-83,76	53,39	22,66	16	2,36
WT Controle Fêmeas –	-35,02	29,56	17,82	16	1,66

WT Separação Maternal Machos					
WT Controle Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Controle Machos	-69,90	11,87	18,02	16	0,66
WT Controle Fêmeas – WT Controle Machos	-21,15	-11,95	8,12	85	-1,47
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos – WT Separação Maternal Machos	48,74	-23,83	15,69	16	-1,52
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos – CX3CR1-GFP+/- Controle Machos	13,86	-41,51	15,67	16	-2,65
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos – WT Controle Machos	62,61	-65,34	20,72	16	-3,15
WT Separação Maternal Machos – CX3CR1-GFP+/- Controle Machos	-34,88	-17,69	23,54	16	-0,75
WT Separação Maternal Machos – WT Controle Machos	13,86	-41,51	15,67	16	-2,65
CX3CR1-GFP+/- Controle Machos – WT Controle Machos	48,74	-23,83	15,69	16	-1,52
Tempo Climbing (s)					
Contraste	Estimate emmeans	Erro padrão	df	Valor t	Valor p
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – WT Separação Maternal Fêmeas	3,28	1,93	16	1,70	0,69
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas	-1,12	1,92	16	-0,58	1,00
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – WT Controle Fêmeas	2,16	2,56	16	0,84	0,99
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos	3,66	1,74	85	2,10	0,42
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – WT Separação Maternal Machos	6,95	2,51	16	2,77	0,17
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Controle Machos	2,54	2,56	16	0,99	0,97
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – WT Controle Machos	5,82	2,99	16	1,95	0,54
WT Separação Maternal Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas	-4,40	2,88	16	-1,53	0,78

WT Separação Maternal Fêmeas – WT Controle Fêmeas	-1,12	1,92	16	-0,58	1,00
WT Separação Maternal Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos	0,38	2,69	16	0,14	1,00
WT Separação Maternal Fêmeas – WT Separação Maternal Machos	3,66	1,74	85	2,10	0,42
WT Separação Maternal Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Controle Machos	-0,74	3,41	16	-0,22	1,00
WT Separação Maternal Fêmeas – WT Controle Machos	2,54	2,56	16	0,99	0,97
CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas – WT Controle Fêmeas	3,28	1,93	16	1,70	0,69
CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos	4,79	2,63	16	1,82	0,62
CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas – WT Separação Maternal Machos	8,07	3,32	16	2,43	0,29
CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Controle Machos	3,66	1,74	85	2,10	0,42
CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas – WT Controle Machos	6,95	2,51	16	2,77	0,17
WT Controle Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos	1,50	3,20	16	0,47	1,00
WT Controle Fêmeas – WT Separação Maternal Machos	4,79	2,63	16	1,82	0,62
WT Controle Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Controle Machos	0,38	2,69	16	0,14	1,00
WT Controle Fêmeas – WT Controle Machos	3,66	1,74	85	2,10	0,42
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos – WT Separação Maternal Machos	3,28	1,93	16	1,70	0,69
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos – CX3CR1-GFP+/- Controle Machos	-1,12	1,92	16	-0,58	1,00
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos – WT Controle Machos	2,16	2,56	16	0,84	0,99
WT Separação Maternal Machos – CX3CR1-GFP+/- Controle Machos	-4,40	2,88	16	-1,53	0,78

WT Separação Maternal Machos – WT Controle Machos	-1,12	1,92	16	-0,58	1,00
CX3CR1-GFP+/- Controle Machos – WT Controle Machos	3,28	1,93	16	1,70	0,69
Climbing (n)					
Contraste	Estimate emmeans	Erro padrão	df	Valor t	Valor p
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – WT Separação Maternal Fêmeas	0,67	0,85	16	0,79	0,99
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas	0,10	0,85	16	0,12	1,00
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – WT Controle Fêmeas	0,77	1,13	16	0,68	1,00
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos	1,80	0,76	85	2,37	0,27
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – WT Separação Maternal Machos	2,48	1,10	16	2,25	0,38
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Controle Machos	1,90	1,13	16	1,69	0,69
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Fêmeas – WT Controle Machos	2,58	1,32	16	1,95	0,54
WT Separação Maternal Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas	-0,57	1,27	16	-0,45	1,00
WT Separação Maternal Fêmeas – WT Controle Fêmeas	0,10	0,85	16	0,12	1,00
WT Separação Maternal Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos	1,13	1,18	16	0,96	0,97
WT Separação Maternal Fêmeas – WT Separação Maternal Machos	1,80	0,76	85	2,37	0,27
WT Separação Maternal Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Controle Machos	1,23	1,50	16	0,82	0,99
WT Separação Maternal Fêmeas – WT Controle Machos	1,90	1,13	16	1,69	0,69
CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas – WT Controle Fêmeas	0,67	0,85	16	0,79	0,99
CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas –	1,71	1,15	16	1,48	0,81

CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos					
CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas – WT Separação Maternal Machos	2,38	1,46	16	1,63	0,73
CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Controle Machos	1,80	0,76	85	2,37	0,27
CX3CR1-GFP+/- Controle Fêmeas – WT Controle Machos	2,48	1,10	16	2,25	0,38
WT Controle Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos	1,03	1,41	16	0,73	0,99
WT Controle Fêmeas – WT Separação Maternal Machos	1,71	1,15	16	1,48	0,81
WT Controle Fêmeas – CX3CR1-GFP+/- Controle Machos	1,13	1,18	16	0,96	0,97
WT Controle Fêmeas – WT Controle Machos	1,80	0,76	85	2,37	0,27
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos – WT Separação Maternal Machos	0,67	0,85	16	0,79	0,99
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos – CX3CR1-GFP+/- Controle Machos	0,10	0,85	16	0,12	1,00
CX3CR1-GFP+/- Separação Maternal Machos – WT Controle Machos	0,77	1,13	16	0,68	1,00
WT Separação Maternal Machos – CX3CR1-GFP+/- Controle Machos	-0,57	1,27	16	-0,45	1,00
WT Separação Maternal Machos – WT Controle Machos	0,10	0,85	16	0,12	1,00
CX3CR1-GFP+/- Controle Machos – WT Controle Machos	0,67	0,85	16	0,79	0,99

ANEXO 2: Scripts *Software R* (versão 4.3.1.) para os Modelos de Regressão Linear com Efeito Aleatório e Post-hoc

Script Teste Campo Aberto

```

setwd
library(nlme)
library(dplyr)
library(JWileymisc)
library(multilevelTools)
library(emmeans)
library(magrittr)
field <- read.csv("Data_Open_Field.csv")

##Distance Traveled
distance <- lme(DistanceTravelled ~ GeneticBackground + Group + Sex,
               random = ~ 1|Litter,
               data = field)
sink("field_distance.txt")
summary(distance)
sink(NULL)
plot(distance)
dist_diag <- modelDiagnostics(distance)
plot(dist_diag, ncol = 1, nrow = 3)
hist(field$DistanceTravelled)
shapiro.test(field$DistanceTravelled)

#emmeans Distance Travelled
dist_emm <- emmeans(distance, specs = pairwise ~ GeneticBackground + Group +
Sex)
field_dist_table <- dist_emm$contrasts %>%
  as.data.frame()
write.csv(field_dist_table, "field_dist_emmeans_contrasts.csv")

##Time Center
center <- lme(TimeCenter ~ GeneticBackground + Group + Sex,

```

```

        random = ~ 1|Litter,
        data = field)
sink("field_time_center.txt")
summary(center)
sink(NULL)
plot(center)
center_diag <- modelDiagnostics(center)
plot(center_diag, ncol = 1, nrow = 3)
hist(field$TimeCenter)
shapiro.test(field$TimeCenter)

##Time Edges
edge <- lme(TimeEdges ~ GeneticBackground + Group + Sex,
           random = ~ 1|Litter,
           data = field)
sink("field_time_edges.txt")
summary(edge)
sink(NULL)
plot(edge)
edge_diag <- modelDiagnostics(edge)
plot(edge_diag, ncol = 1, nrow = 3)
hist(field$TimeEdges)
shapiro.test(field$TimeEdges)!

#emmeans Time Edges
edge_emm <- emmeans(edge, specs = pairwise ~ GeneticBackground + Group + Sex)
field_edge_table <- edge_emm$contrasts %>%
  as.data.frame()
write.csv(field_edge_table, "field_edge_emmeans_contrasts.csv")

##Time Corners
corner <- lme(TimeCorners ~ GeneticBackground + Group + Sex,
             random = ~ 1|Litter,
             data = field)

```

```

sink("field_time_corners.txt")
summary(corner)
sink(NULL)
plot(corner)
corner_diag <- modelDiagnostics(corner)
plot(corner_diag, ncol = 1, nrow = 3)
hist(field$TimeCorners)
shapiro.test(field$TimeCorners)

```

Script Caixa Claro/Escuro

```

setwd
library(nlme)
library(JWileymisc)
library(multilevelTools)
library(magrittr)
library(dplyr)
light_dark <- read.csv("Data_Light_Dark_Box.csv")

##Latência
latency <- lme(Latency ~ GeneticBackground + Group + Sex,
              random = ~ 1|Litter,
              data = light_dark)
sink("dark_light_latency_litter.txt")
summary(latency)
sink(NULL)
plot(latency)
latency_diag <- modelDiagnostics(latency)
plot(latency_diag, ncol = 1, nrow = 3)
hist(light_dark$Latency)
shapiro.test(light_dark$Latency)

```

##Tempo Claro

```

tlight <- lme(TimeLight ~ GeneticBackground + Group + Sex,
              random = ~ 1|Litter,

```

```
      data = light_dark)
sink("dark_light_time_light_litter.txt")
summary(tlight)
sink(NULL)
plot(tlight)
tlight_diag <- modelDiagnostics(tlight)
plot(tlight_diag, ncol = 1, nrow = 3)
hist(light_dark$TimeLight)
shapiro.test(light_dark$TimeLight)

##Cruzamentos
crossing <- lme(Crossings ~ GeneticBackground + Group + Sex,
              random = ~ 1|Litter,
              data = light_dark)
sink("dark_light_crossing_litter.txt")
summary(crossing)
sink(NULL)
plot(crossing)
cross_diag <- modelDiagnostics(crossing)
plot(cross_diag, ncol = 1, nrow = 3)
hist(light_dark$Crossings)
shapiro.test(light_dark$Crossings)
```

Script Labirinto em Cruz Elevado

```
setwd
library(nlme)
library(JWileymisc)
library(multilevelTools)
library(emmeans)
library(magrittr)
library(dplyr)
maze <- read.csv("Data_Elevated_Plus_Maze.csv")
```

```

##Tempo Braços Abertos
topen <- lme(TimeOpenArms ~ GeneticBackground + Group + Sex,
            random = ~ 1|Litter,
            data = maze)
sink("maze_time_open_arms_litter.txt")
summary(topen)
sink(NULL)
plot(topen)
topen_emm <- emmeans(topen, specs = pairwise ~ GeneticBackground + Group
                    + Sex)

##Tempo Braços Fechados
tclosed <- lme(TimeOpenArms ~ GeneticBackground * Group * Sex,
              random = ~ 1|Litter,
              data = maze)
sink("maze_time_closed_arms_litter.txt")
summary(tclosed)
sink(NULL)
plot(tclosed)
tclosed_emm <- emmeans(tclosed, specs = pairwise ~ GeneticBackground +
                      Group + Sex)
sink("maze_time_closed_arms_emmeans.txt")
summary(tclosed_emm)
sink(NULL)
tclosed_diag <- modelDiagnostics(tclosed)
plot(tclosed_diag, ncol = 1, nrow = 3)
hist(maze$TimeClosedArms)
shapiro.test(maze$TimeClosedArms)

##Tempo Centro
tcenter <- lme(TimeCenter ~ GeneticBackground + Group + Sex,
              random = ~ 1|Litter,
              data = maze)
sink("maze_time_center_litter.txt")

```

```
summary(tcenter)
sink(NULL)
plot(tcenter)
tcenter_diag <- modelDiagnostics(tcenter)
plot(tcenter_diag, ncol = 1, nrow = 3)
hist(maze$TimeCenter)
shapiro.test(maze$TimeCenter)

##Cruzamentos Braços Abertos
cross_op <- lme(CrossingOpenArms ~ GeneticBackground + Group + Sex,
              random = ~ 1|Litter,
              data = maze)
sink("maze_crossing_open_litter.txt")
summary(cross_op)
sink(NULL)
plot(cross_op)
crossop_emm <- emmeans(cross_op, specs = pairwise ~ GeneticBackground +
                      Group + Sex)
sink("maze_crossing_open_emmeans.txt")
summary(crossop_emm)
sink(NULL)
crossop_diag <- modelDiagnostics(cross_op)
plot(crossop_diag, ncol = 1, nrow = 3)
hist(maze$CrossingOpenArms)
shapiro.test(maze$CrossingOpenArms)

##Cruzamentos Braços Fechados
cross_cl <- lme(CrossingsClosedArms ~ GeneticBackground + Group + Sex,
              random = ~ 1|Litter,
              data = maze)
sink("maze_crossing_closed_litter.txt")
summary(cross_cl)
sink(NULL)
plot(cross_cl)
```

```

crosscl_emm <- emmeans(cross_cl, specs = pairwise ~ GeneticBackground +
  Group + Sex)
sink("maze_crossing_closed_emmeans.txt") #sending output to txt file
summary(crosscl_emm)
sink(NULL)
crosscl_diag <- modelDiagnostics(cross_cl)
plot(crosscl_diag, ncol = 1, nrow = 3)
hist(maze$CrossingsClosedArms)
shapiro.test(maze$CrossingsClosedArms)

```

Script Teste do Nado Forçado

```

setwd
library(nlme)
library(JWileymisc)
library(multilevelTools)
library(emmeans)
library(magrittr)
library(dplyr)
swim <- read.csv("Data_Forced_Swimming_Test.csv")

##Imobilidade
immob <- lme(Immobility ~ GeneticBackground + Group + Sex,
  random = ~ 1|Litter,
  data = swim)
sink("swim_immobility.txt")
summary(immob)
sink(NULL)
plot(immob)
immob_diag <- modelDiagnostics(immob)
plot(immob_diag, ncol = 1, nrow = 3)
hist(swim$Immobility)
shapiro.test(swim$Immobility)

##Tempo Imobilidade

```

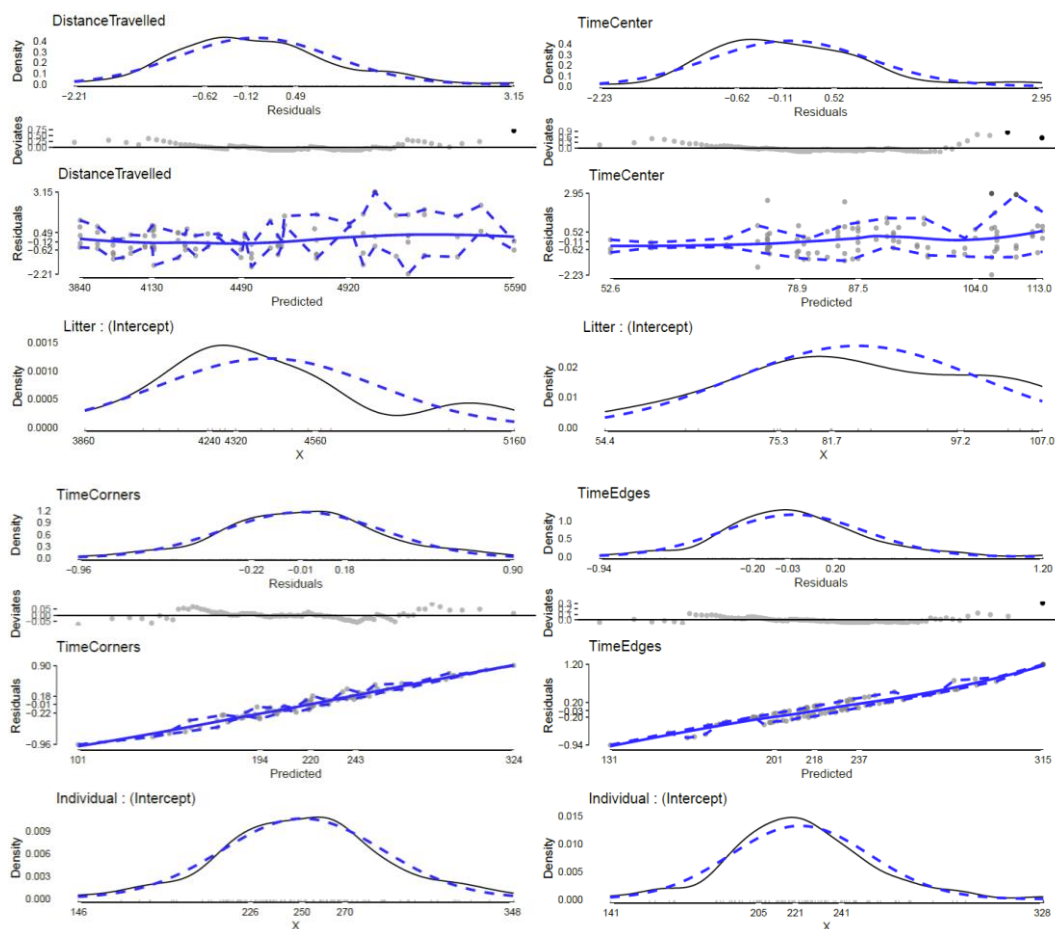


```
timm <- lme(TimeImmobility ~ GeneticBackground + Group + Sex,  
           random = ~ 1|Litter,  
           data = swim)  
sink("swim_time_immobility.txt")  
summary(timm)  
sink(NULL)  
plot(timm)  
timm_emm <- emmeans(timm, specs = pairwise ~ GeneticBackground + Group  
                   + Sex)  
sink("swim_time_immobility_emmeans.txt")  
summary(timm_em)  
sink(NULL)  
timm_diag <- modelDiagnostics(timm)  
plot(timm_diag, ncol = 1, nrow = 3)  
hist(swim$TimeImmobility)  
shapiro.test(swim$TimeImmobility)  
  
##Climbing  
climb <- lme(Climbing ~ GeneticBackground + Group + Sex,  
            random = ~ 1 | Litter,  
            data = swim)  
sink("swim_climbing.txt")  
summary(climb)  
sink(NULL)  
plot(climb)  
climb_emm <- emmeans(climb, specs = pairwise ~ GeneticBackground + Group  
                   + Sex)  
sink("swim_climbing_emmeans.txt")  
summary(climb_emm)  
sink(NULL)  
climb_diag <- modelDiagnostics(climb)  
plot(climb_diag, ncol = 1, nrow = 3)  
hist(swim$Climbing)  
shapiro.test(swim$Climbing)
```

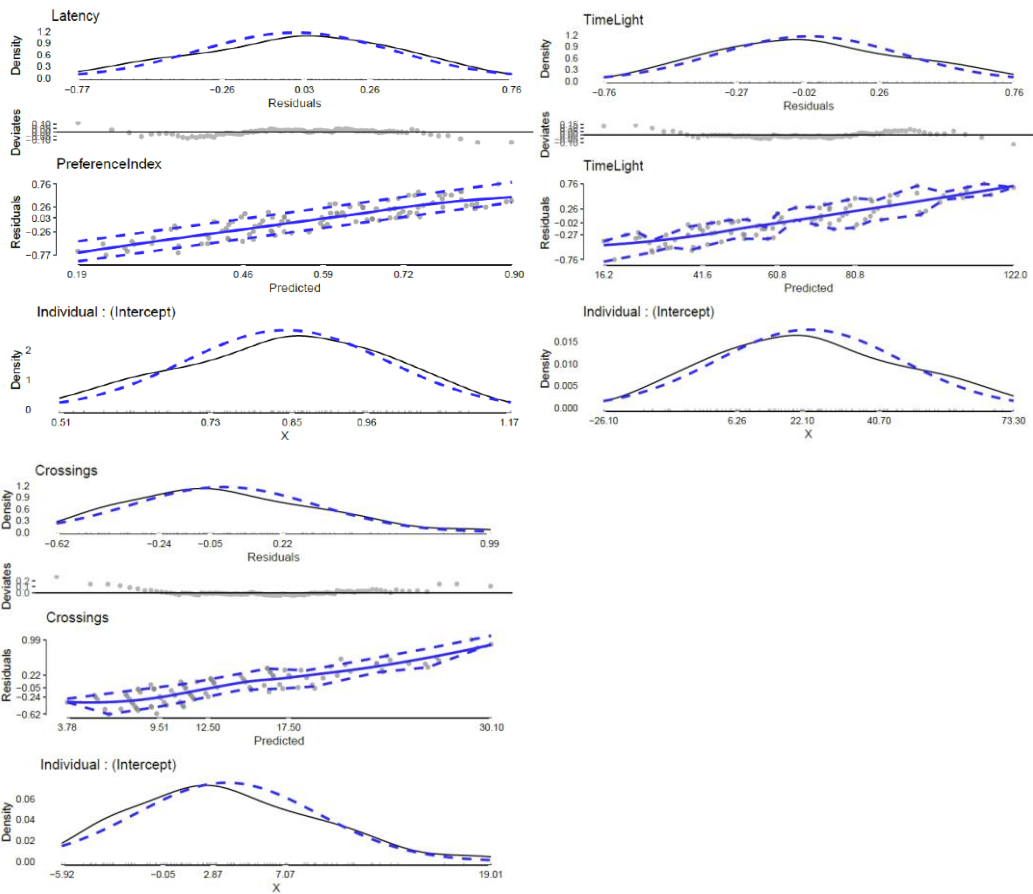
```
##Tempo Climbing
tclimb <- lme(TimeClimbing ~ GeneticBackground + Group + Sex,
             random = ~ 1 | Litter,
             data = swim)
sink("swim_time_climbing.txt")
summary(tclimb)
sink(NULL)
plot(tclimb)
tclimb_emm <- emmeans(tclimb, specs = pairwise ~ GeneticBackground + Group
                    + Sex)
sink("swim_time_climbing_emmeans.txt")
summary(tclimb_emm)
sink(NULL)
tclimb_diag <- modelDiagnostics(tclimb)
plot(tclimb_diag, ncol = 1, nrow = 3)
hist(swim$TimeClimbing)
shapiro.test(swim$TimeClimbing)
```

Anexo 3: Diagnóstico Modelo de Regressão Linear com Efeito Aleatório

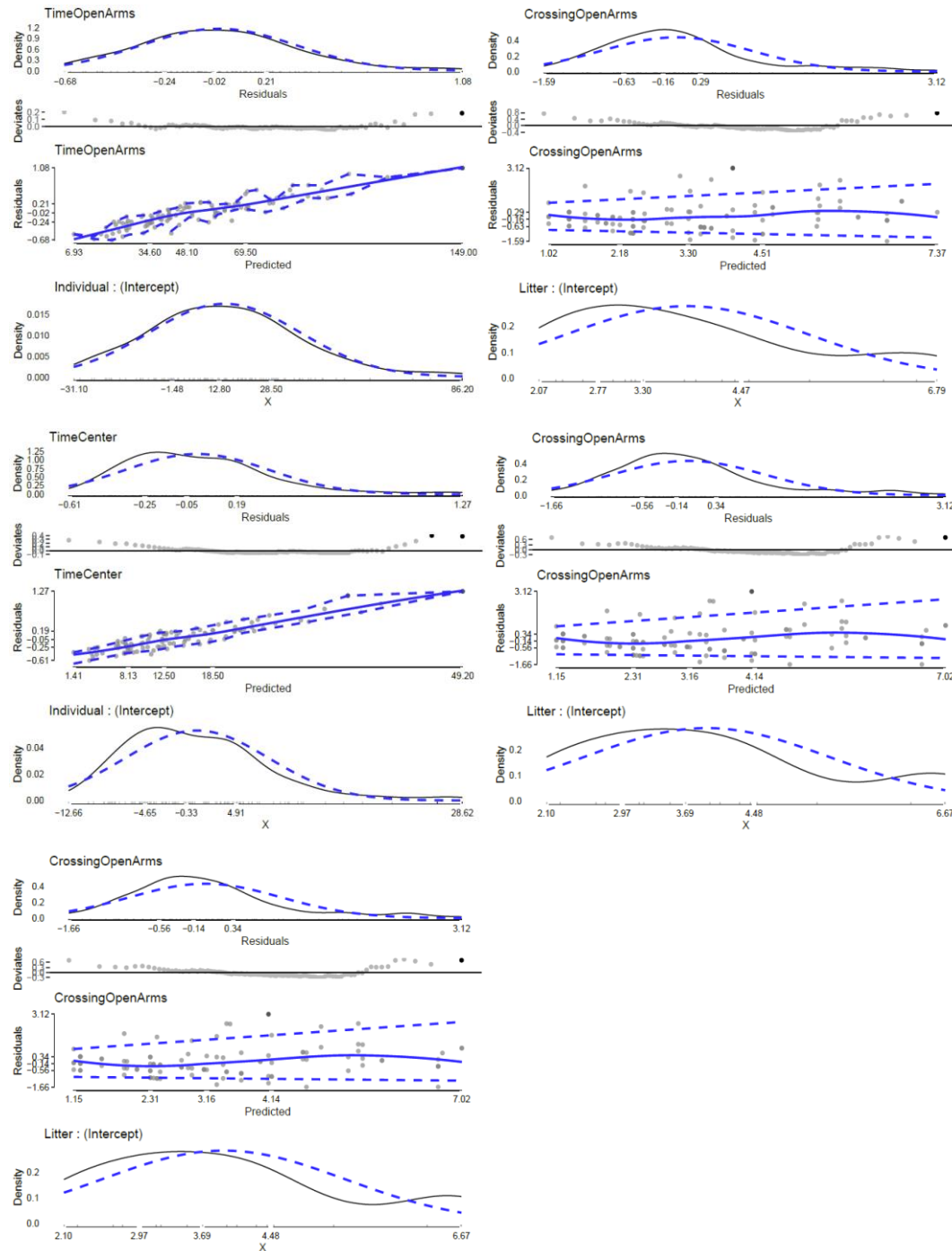
Diagnóstico Teste do Campo Aberto



Diagnóstico Caixa Claro/Escuro



Diagnóstico Labirinto em Cruz Elevado



Diagnóstico Teste do Nado Forçado

