



**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS
ASSOCIAÇÃO AMPLA UFSCar/UNESP**

Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho”
Faculdade De Ciências Farmacêuticas De Araraquara
Departamento de Fármacos e Medicamentos, Laboratório De Farmacologia

Lidando com o inimigo: caracterização comportamental, molecular e cardiovascular
de roedores resilientes e susceptíveis ao estresse de derrota social

Gessynger Morais Silva

Araraquara, SP

-2021-

**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS
ASSOCIAÇÃO AMPLA UFSCar/UNESP**

Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho”
Faculdade De Ciências Farmacêuticas De Araraquara
Departamento de Fármacos e Medicamentos, Laboratório De Farmacologia

Lidando com o inimigo: caracterização comportamental, molecular e cardiovascular
de roedores resilientes e susceptíveis ao estresse de derrota social

Gessynger Morais Silva

Tese a ser apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Tadeu Marin

Araraquara, SP

-2021-



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado do candidato Gessynger Moraes Silva, realizada em 10/03/2021.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Marcelo Tadeu Marin (UNESP)

Profa. Dra. Cleopatra da Silva Planeta (UNESP)

Profa. Dra. Vanessa Cristiane de Santana Amaral (UEG)

Profa. Dra. Patricia Fidelis de Oliveira (UNESP)

Profa. Dra. Karina Possa Abrahao (UNIFESP)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

AGRADECIMENTOS

Cinco anos se passaram desde a minha defesa de mestrado, durante os quais muita coisa mudou. O que não mudou foi o sentimento de gratidão a todos que tem me apoiado durante essa jornada.

Primeiramente, gostaria de agradecer a minha mãe Selma por acreditar em mim e me apoiar em todas as escolhas que fiz. Você é meu maior exemplo de força e dedicação!

Ao meu irmão Matheus, que recentemente decidiu trilhar o caminho da ciência. Obrigado por todo seu amor, e por me mostrar que ainda podemos ter esperança nas novas gerações. Se continuar nesse caminho, siga com todo rigor e dedicação que a ciência precisa.

À luz dos meus dias, minha namorada Larissa. Sem seu suporte e amor tenho certeza que teria sucumbido aos problemas e pressões dessa vida conturbada. Obrigado por sempre me apoiar, me aconselhar e me escutar. Não posso também deixar de agradecer a minha filhotinha, Nutella, indispensável para aliviar os dias mais tensos, com seu “rabinho” abanando e cheia de amor e carinho pra dar.

Aos meus avós Natanael “Tatá” e Raquel. Vocês são meus exemplos de amor, honestidade, caráter e perseverança.

À toda minha família, Douglas, primos (Sérgio, Thamara, Eduardo, Gil, Júnior e João Pedro), tia (Telma), padrinhos (Eduardo e Teresinha), por todo apoio e alegria nos momentos que passamos juntos.

Aos meus compadres Danilo e Leia. Vocês são amigos mais que especiais, sempre dispostos a ouvir e aconselhar.

Agradeço muito aos grandes amigos de Araraquara e São Carlos, companheiros nessa caminhada de pós-graduação. Durante esse tempo, vocês se tornaram a minha família, fonte de alegria e descontração. São muitos nomes, o que torna esse agradecimento ainda mais especial. Obrigado!

Deixo ao Luquinhas e Willian, um agradecimento especial: obrigado por tudo. Desde a recepção assim que cheguei para o mestrado em Araraquara até cada segundo juntos dando risadas ou discutindo resultados. Obrigado também por embarcarem até nas ideias mais “absurdas”, aceitando trabalhar até de madrugada para ajudar um amigo.

Agradeço a Tati, sempre disposta a dar uma palavra amiga e carinhosa. Obrigado por ser essa pessoa doce e gentil que tive o prazer de conhecer.

À Vanessa, por ser sempre essa pessoa divertida, alto-astrol e animada até nos dias mais difíceis. Sempre disposta a ajudar! Você é um exemplo de determinação que levo para toda vida.

Sheilinha, muito obrigado por cada momento que compartilhamos juntos, sejam lado a lado ou a quilômetros de distância. Obrigado por sempre me ouvir e me aconselhar. Conte sempre comigo para tudo que precisar.

Ao PEnsAD, grupo de pesquisa do qual tenho orgulho em fazer parte. Cabe aqui um agradecimento especial aos alunos de iniciação científica Jacqueline Pavan, Isabelli Rossanessi, Lorena Martins e Nicolas Segre, dos quais fui co-orientador e que auxiliaram na execução desse trabalho. Podem ter certeza que fui quem mais aprendeu com vocês, em como ensinar, orientar e ouvir.

À toda a equipe do laboratório de farmacologia: às técnicas Elisabete e Rosana, aos professores Ricardo, Carlos e Cleopatra e a secretária do departamento Tirene, pelo apoio e presteza durante a execução deste trabalho. Saibam que considero todos vocês grandes amigos, merecedores de todo o meu respeito e admiração. Agradeço ao professor Carlos também pelo fornecimento toda estrutura e ajuda para execução dos experimentos cardiovasculares nesse projeto.

Agradeço à *University of Maryland School of Medicine*, em Baltimore-MD, EUA, por toda infraestrutura para realização do estágio de pesquisa no exterior.

A minha supervisora no exterior, Mary Kay Lobo, por ter aberto as portas do seu laboratório (*The Lobo Lab*), por todos os ensinamentos e pela confiança que recebi, e que tem se estendido além do tempo que permaneci fisicamente em seu laboratório.

A todo o *Lobo Lab* (Ramesh Chandra, Michel Engeln, Meg Fox, Hyungwoo Nam, Shannon Cole, Cali Calarco, Eric Choi, Marco Pagliusi, Makeda Turner e Victoria Rhodes) pelo suporte, ajuda e paciência com minhas dificuldades e “falhas” de comunicação. Obrigado pelos momentos de aprendizado e também descontração, dentro e fora do laboratório.

À “Trupe do Veroninha” (Cris, Lenise e Marco) pelas incontáveis horas de risadas, descontração e café, fundamentais para meu período em Baltimore. Vocês me trouxeram a energia que eu precisei para reconhecer Baltimore como um lar.

À Renata, por sua amizade e por todo apoio durante a minha mudança para Baltimore. Agradeço também aos meus *roommates* italianos Giovannino e Francesca pelo companheirismo e ambiente agradável nesses meses que passamos juntos.

Agradeço também a Nilva por toda paciência e amizade, mesmo nos momentos em que “ocupe” seu marido com páginas e páginas para leitura e correção.

Depois de 11 anos juntos, me faltam palavras para te agradecer Marcelo. Obrigado por todos esses anos de amizade, ensinamentos, apoio e exemplo. Minha gratidão a você ultrapassa a relação orientador-aluno. Espero um dia poder retribuir à altura tudo que você me ensinou, e que nossa parceria se estenda cada vez mais. Todo esse tempo trouxe uma amizade que pretendo nutrir por toda vida.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – FCFAr/UNESP pela infraestrutura necessária para realização desse trabalho.

Ao Programa Interinstitucional de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas UFSCar/UNESP pelo auxílio concedido e oportunidade de doutoramento.

À FAPESP, processo nº 2015/25308-3, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro e bolsa no país concedidos.

À FAPESP, processo nº 2018/05496-8, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro e bolsa no exterior concedidos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade do(s) autor(es) e não necessariamente refletem a visão da FAPESP”.

RESUMO

Apesar da conhecida relação entre o estresse prolongado e o desenvolvimento de doenças, nem todo indivíduo exposto ao estresse desenvolve doenças a ele relacionadas. Essa diferença individual pode estar relacionada com a capacidade do indivíduo em adaptar-se aos eventos adversos, ou seja, sua resiliência ou susceptibilidade ao estresse. Nesse sentido, o presente trabalho avaliou as diferenças entre os fenótipos susceptível e resiliente em um modelo animal de exposição ao estresse psicossocial. No capítulo 1, avaliamos as diferenças comportamentais, moleculares e cardiovasculares nos fenótipos resiliente e susceptível ao estresse de derrota social (EDS) em ratos, e o efeito do tratamento com a N-Acetilcisteína (N-AC) nessas alterações. No capítulo 2, avaliamos o papel dos neurônios Npas1+ do pálido ventral na susceptibilidade ao EDS em camundongos. Utilizando a exposição repetida ao EDS seguida do teste de interação social (TIS), identificamos ratos da linhagem Wistar como resilientes ou susceptíveis ao EDS no capítulo 1. Os ratos susceptíveis apresentaram evitação social, alterações comportamentais relacionadas à depressão, prejuízo da memória episódica de longo prazo e alterações cardiovasculares relacionadas ao desenvolvimento de patologias cardiovasculares. Exceto em relação ao prejuízo da memória episódica, os ratos resilientes não apresentaram as alterações observados no fenótipo susceptível, além de apresentarem alterações cardiovasculares relacionadas a um efeito protetor em relação às consequências do estresse no sistema cardiovascular. Os fenótipos resiliente e susceptível ao EDS apresentaram alterações distintas na expressão da DeltaFosB e do trocador cistina-glutamato (xCT) em diversas áreas encefálicas. O tratamento com a N-AC reverteu as alterações comportamentais relacionadas à depressão nos ratos susceptíveis ao EDS, apesar de não alterar a expressão da DeltaFosB relacionada a esses fenótipos. No capítulo 2, verificamos que a ativação dos neurônios Npas1+ do pálido ventral aumenta a susceptibilidade de camundongos ao EDS, além de aumentar os comportamentos relacionados à ansiedade. Esses neurônios se projetam para diversas áreas encefálicas importantes na resposta ao estresse, com destaque para o núcleo acumbens, área tegmental ventral e habênula lateral. Em conclusão, ratos susceptíveis ao EDS apresentam diversas alterações comportamentais e cardiovasculares após a exposição repetida ao estresse, as quais são inexistentes nos ratos resilientes. Essas alterações parecem estar relacionadas a expressão da

DeltaFosB em áreas encefálicas que participam da resposta ao estresse. A N-AC é eficaz em reverter as alterações comportamentais induzidas pelo estresse no fenótipo susceptível, embora não tenha efeito nas alterações moleculares em regiões encefálicas relacionadas ao estresse. A susceptibilidade ao EDS pode estar relacionada com a atividade dos neurônios Npas1+ do pálido ventral, uma vez que sua ativação aumenta a susceptibilidade em camundongos.

ABSTRACT

Despite the well-known correlation between prolonged stress and the development of diseases, not every individual exposed to stressful situations develops stress-related disorders. This individual difference could be related to their ability to cope with the adverse events, that is, their resilience or susceptibility to the stress. In the context, this work aimed to evaluate the differences between the resilient and susceptible phenotypes in an animal model of psychosocial stress exposure. In the chapter 1, we evaluated the behavioral, molecular and cardiovascular differences in the resilient and susceptible phenotypes to the social defeat stress (SDS) in rats, and the effect of the N-Acetylcysteine (N-AC) treatment in such alterations. In the chapter 2, we evaluated the role of the ventral pallidum Npas1+ neurons in the susceptibility to the SDS in mice. Using the repeated SDS exposure followed by the social interaction test (SIT), we identified Wistar rats as resilient or susceptible to the SDS in the chapter 1. The susceptible rats showed social avoidance, depressive-like behavioral alterations, long-term memory impairment and cardiovascular alterations related to the development of cardiovascular diseases. Except for memory impairment, resilient rats did not develop the alterations found in the susceptible phenotype, in addition to show cardiovascular alterations related to a protective effect from the stress consequences in the cardiovascular system. These two phenotypes showed distinct alterations in the expression of DeltaFosB and the cystine-glutamate exchanger in the brain. The N-AC treatment reverted the depressive-like behavioral alterations in the susceptible rats to the SDS, but did not altered the DeltaFosB expression related to the stress-coping phenotypes. In the chapter 2, we verified that the activation of the ventral pallidum Npas1+ neurons increased the susceptibility to the SDS in mice, in addition to increase the anxiety-like behaviors. These neurons projects to diverse encephalic areas important in the stress-response, especially the nucleus accumbens, ventral tegmental area and lateral habenula. In conclusion, susceptible rats to the SDS showed numerous behavioral and cardiovascular alterations after repeated stress exposure, which are absent in the resilient rats. Such alterations seem to be related to DeltaFosB expression in brain areas related to stress-response. The N-AC treatment in able to revert the behavioral alterations, besides not being effective to change the neuronal molecular alterations related to stress exposure. The SDS susceptibility could be

related to the activity of the ventral pallidum Npas1+ neurons, since their activation increased the SDS susceptibility in mice.

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT	9
CAPÍTULO 1 - ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS, MOLECULARES E CARDIOVASCULARES NOS FENÓTIPOS RESILIENTE E SUSCEPTÍVEL AO ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL E O EFEITO DO TRATAMENTO COM A N-ACETILCISTEÍNA.....	17
1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. ESTRESSE: SUSCEPTIBILIDADE E RESILIÊNCIA.....	18
1.2. ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL E TESTE DE INTERAÇÃO SOCIAL: ESTUDANDO A RESILIÊNCIA E A SUSCEPTIBILIDADE AO ESTRESSE EM MODELOS ANIMAIS	22
1.3. NEUROBIOLOGIA DA RESILIÊNCIA E SUSCEPTIBILIDADE AO ESTRESSE	25
1.4. ALTERAÇÕES GLUTAMATÉRGICAS INDUZIDAS PELO ESTRESSE: O POTENCIAL DA N-ACETILCISTEÍNA NA DEPRESSÃO	27
2. OBJETIVOS	31
3. MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1. SUJEITOS EXPERIMENTAIS.....	32
3.2. ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL	32
3.3. AVALIAÇÃO DO ESTADO FÍSICO	33
3.4. TESTE DE INTERAÇÃO SOCIAL	34
3.5. EXPERIMENTO 1: ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS RELACIONADAS À ANSIEDADE E DEPRESSÃO EM RATOS SUSCEPTÍVEIS E RESILIENTES AO ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL	35
3.5.1. <i>Labirinto em cruz elevado</i>	36
3.5.2. <i>Teste do nado forçado</i>	36
3.6. EXPERIMENTO 2: MEMÓRIA EPISÓDICA E ATIVIDADE LOCOMOTORA EM RATOS SUSCEPTÍVEIS E RESILIENTES AO ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL	37
3.6.1. <i>Campo aberto</i>	38
3.6.2. <i>Teste de reconhecimento de objetos</i>	38
3.7. EXPERIMENTO 3: NÍVEIS DE AGRESSÃO E RESPOSTA DE SUBMISSÃO EM RATOS SUSCEPTÍVEIS E RESILIENTES AO ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL	39
3.7.1. <i>Interação não-agressiva</i>	40
3.7.2. <i>Avaliação dos níveis de agressão e enfrentamento ao confronto social</i>	40
3.7.3. <i>Teste de consumo de sacarose</i>	40

3.8.	EXPERIMENTO 4: QUANTIFICAÇÃO DO TROCADOR CISTINA-GLUTAMATO NO ENCÉFALO DE RATOS SUSCEPTÍVEIS E RESILIENTES AO ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL	41
3.8.1.	<i>Retirada dos encéfalos e dissecação das áreas encefálicas</i>	42
3.8.2.	<i>Quantificação do trocador cistina-glutamato por Western blotting.....</i>	42
3.9.	EXPERIMENTO 5: QUANTIFICAÇÃO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO DELTAFOSB NO ENCÉFALO DE RATOS SUSCEPTÍVEIS E RESILIENTES AO ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL	43
3.9.1.	<i>Perfusão, retirada dos encéfalos e dissecação das áreas encefálicas</i>	44
3.9.2.	<i>Quantificação das células positivas para DeltaFosB por imunofluorescência.....</i>	45
3.10.	EXPERIMENTO 6: ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES EM RATOS SUSCEPTÍVEIS E RESILIENTES AO ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL	46
3.10.1.	<i>Canulação da artéria e veia femorais.....</i>	47
3.10.2.	<i>Registro da pressão arterial e frequência cardíaca durante o repouso.....</i>	47
3.10.3.	<i>Análise espectral da variabilidade da frequência cardíaca</i>	48
3.10.4.	<i>Avaliação da sensibilidade e efetividade barorreflexa</i>	48
3.10.5.	<i>Registro dos parâmetros cardiovasculares durante o estresse de restrição</i>	49
3.10.6.	<i>Quantificação de corticosterona plasmática.....</i>	50
3.10.7.	<i>Retirada e pesagem de órgãos.....</i>	50
3.11.	EXPERIMENTO 7: EFEITO DO TRATAMENTO COM A N-ACETILCISTEÍNA NAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS RELACIONADAS À ANSIEDADE E DEPRESSÃO EM RATOS SUSCEPTÍVEIS E RESILIENTES AO ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL.....	50
3.11.1.	<i>N-acetilcisteína</i>	51
3.11.2.	<i>Labirinto em cruz elevado</i>	52
3.11.3.	<i>Teste do nado forçado.....</i>	52
3.12.	EXPERIMENTO 8: EFEITO DO TRATAMENTO COM A N-ACETILCISTEÍNA NAS ALTERAÇÕES MOLECULARES RELACIONADAS AO FATOR DE TRANSCRIÇÃO DELTAFOSB NO ENCÉFALO DE RATOS SUSCEPTÍVEIS E RESILIENTES AO ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL	52
3.12.1.	<i>Perfusão, retirada dos encéfalos e dissecação das áreas encefálicas</i>	53
3.12.2.	<i>Quantificação das células positivas para DeltaFosB por imunofluorescência.....</i>	53
3.13.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	53
4.	RESULTADOS.....	55
4.1.	EXPERIMENTO 1: ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS RELACIONADAS À ANSIEDADE E DEPRESSÃO EM RATOS SUSCEPTÍVEIS E RESILIENTES AO ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL.....	55
4.1.1.	<i>Identificação dos fenótipos de enfrentamento ao estresse de derrota social e avaliação da interação social.....</i>	55
4.1.2.	<i>Avaliação dos comportamentos relacionados à ansiedade no labirinto em cruz elevado</i>	57
4.1.3.	<i>Avaliação dos comportamentos relacionados à depressão no teste do nado forçado ...</i>	59

4.2.	EXPERIMENTO 2: MEMÓRIA EPISÓDICA E ATIVIDADE LOCOMOTORA EM RATOS SUSCEPTÍVEIS E RESILIENTES AO ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL	61
4.2.1.	<i>Identificação dos fenótipos de enfrentamento ao estresse de derrota social e avaliação da interação social</i>	61
4.2.2.	<i>Avaliação do estado físico</i>	63
4.2.3.	<i>Avaliação da atividade locomotora e comportamentos relacionados à ansiedade no campo aberto</i>	65
4.2.4.	<i>Avaliação da memória episódica de curto e longo duração no teste de reconhecimento de objetos</i>	66
4.3.	EXPERIMENTO 3: NÍVEIS DE AGRESSÃO E RESPOSTA DE SUBMISSÃO EM RATOS SUSCEPTÍVEIS E RESILIENTES AO ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL	67
4.3.1.	<i>Identificação dos fenótipos de enfrentamento ao estresse de derrota social e avaliação da interação social</i>	67
4.3.2.	<i>Avaliação do estado físico</i>	69
4.3.3.	<i>Avaliação dos níveis de agressão e enfrentamento ao confronto social</i>	71
4.3.4.	<i>Avaliação da anedonia comportamental no teste de consumo de sacarose</i>	72
4.4.	EXPERIMENTO 4: QUANTIFICAÇÃO DO TROCADOR CISTINA-GLUTAMATO NO ENCÉFALO DE RATOS SUSCEPTÍVEIS E RESILIENTES AO ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL	75
4.4.1.	<i>Identificação dos fenótipos de enfrentamento ao estresse de derrota social e avaliação da interação social</i>	75
4.4.2.	<i>Avaliação do estado físico</i>	76
4.4.3.	<i>Quantificação do trocador cistina-glutamato no córtex pré-frontal</i>	78
4.4.4.	<i>Quantificação do trocador cistina-glutamato no núcleo acumbens</i>	79
4.4.5.	<i>Quantificação do trocador cistina-glutamato no hipocampo ventral</i>	81
4.5.	EXPERIMENTO 5: QUANTIFICAÇÃO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO DELTAFOSB NO ENCÉFALO DE RATOS SUSCEPTÍVEIS E RESILIENTES AO ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL	82
4.5.1.	<i>Identificação dos fenótipos de enfrentamento ao estresse de derrota social e avaliação da interação social</i>	82
4.5.2.	<i>Avaliação do estado físico</i>	84
4.5.3.	<i>Quantificação de DeltaFosB no córtex pré-frontal medial</i>	85
4.5.4.	<i>Quantificação de DeltaFosB no córtex orbitofrontal</i>	87
4.5.5.	<i>Quantificação de DeltaFosB no caudado-putamen</i>	89
4.5.6.	<i>Quantificação de DeltaFosB no núcleo acumbens</i>	90
4.5.7.	<i>Quantificação de DeltaFosB no córtex insular</i>	92
4.5.8.	<i>Quantificação de DeltaFosB no hipocampo dorsal</i>	94
4.5.9.	<i>Quantificação de DeltaFosB na amígdala</i>	95
4.5.10.	<i>Quantificação de DeltaFosB no hipotálamo lateral e ventromedial</i>	97
4.5.11.	<i>Quantificação de DeltaFosB na matéria cinzenta periaquedutal</i>	99

4.6.	EXPERIMENTO 6: ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES EM RATOS SUSCEPTÍVEIS E RESILIENTES AO ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL	101
4.6.1.	<i>Avaliação da interação social por meio do TIS</i>	102
4.6.2.	<i>Avaliação do estado físico dos animais</i>	103
4.6.3.	<i>Avaliação dos parâmetros cardiovasculares durante o repouso</i>	105
4.6.4.	<i>Avaliação espectral da variabilidade cardíaca durante o repouso</i>	106
4.6.5.	<i>Avaliação da sensibilidade e efetividade barorreflexa</i>	108
4.6.6.	<i>Avaliação dos parâmetros cardiovasculares durante o estresse de restrição</i>	111
4.6.7.	<i>Pesagem dos órgãos</i>	114
4.7.	EXPERIMENTO 7: EFEITO DO TRATAMENTO COM A N-AC NAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS RELACIONADAS À ANSIEDADE E DEPRESSÃO EM RATOS SUSCEPTÍVEIS E RESILIENTES AO ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL	115
4.7.1.	<i>Avaliação da interação social por meio do TIS</i>	115
4.7.2.	<i>Avaliação do estado físico dos animais</i>	117
4.7.3.	<i>Efeito da N-Acetilcisteína nos comportamentos relacionados à ansiedade no labirinto em cruz elevado</i>	119
4.7.4.	<i>Efeito da N-acetilcisteína nos comportamentos relacionados à depressão no teste do nado forçado</i>	121
4.8.	EXPERIMENTO 8: EFEITO DO TRATAMENTO COM A N-ACETILCISTEÍNA NAS ALTERAÇÕES MOLECULARES RELACIONADAS AO FATOR DE TRANSCRIÇÃO DELTAFOSB NO ENCÉFALO DE RATOS SUSCEPTÍVEIS E RESILIENTES AO ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL	123
4.8.1.	<i>Avaliação da interação social por meio do TIS</i>	124
4.8.2.	<i>Avaliação do estado físico dos animais</i>	126
4.8.3.	<i>Efeito da N-acetilcisteína no número de células positivas para DeltaFosB no córtex pré-frontal medial</i>	127
4.8.4.	<i>Efeito da N-acetilcisteína no número de células positivas para DeltaFosB no córtex orbitofrontal</i>	130
4.8.5.	<i>Efeito da N-acetilcisteína no número de células positivas para DeltaFosB no núcleo acumbens</i>	132
4.8.6.	<i>Efeito da N-acetilcisteína no número de células positivas para DeltaFosB no hipocampo dorsal</i>	134
4.8.7.	<i>Efeito da N-acetilcisteína no número de células positivas para DeltaFosB na amígdala</i>	136
5.	DISCUSSÃO	139
5.1.	ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS RELACIONADAS AOS FENÓTIPOS DE ENFRENTAMENTO AO ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL	139
5.2.	ALTERAÇÕES NEURAIS RELACIONADAS AO TROCADOR CISTINA GLUTAMATO E AO FATOR DE TRANSCRIÇÃO DELTAFOSB NOS FENÓTIPOS DE ENFRENTAMENTO AO ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL	143

5.3.	ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES E NO PESO DE ÓRGÃOS RELACIONADAS AOS FENÓTIPOS DE ENFRENTAMENTO AO ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL.....	149
5.4.	EFEITOS DO TRATAMENTO COM A N-ACETILCISTEÍNA NAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E RELACIONADAS À DELTAFOSB NOS FENÓTIPOS DE ENFRENTAMENTO AO ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL.....	158
6.	CONCLUSÃO.....	160
CAPÍTULO 2 – A MANIPULAÇÃO QUIMIOMENÉTICA DOS NEURÔNIOS NPAS1 POSITIVOS NO PÁLIDO VENTRAL ESTÁ RELACIONADA À SUSCEPTIBILIDADE AO ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL		
161		
1.	INTRODUÇÃO.....	162
2.	OBJETIVOS	165
3.	MATERIAL E MÉTODOS	166
3.1.	SUJEITOS EXPERIMENTAIS.....	166
3.2.	CLOZAPINA-N-ÓXIDO.....	166
3.3.	VETORES VIRAIS E FIBRA ÓPTICA.....	167
3.4.	CIRURGIA ESTEREOTÁXICA	167
3.5.	ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL.....	168
3.6.	TESTES COMPORTAMENTAIS	168
3.6.1.	<i>Teste de interação social</i>	<i>169</i>
3.6.2.	<i>Teste do nado forçado.....</i>	<i>169</i>
3.6.3.	<i>Teste do esguicho</i>	<i>169</i>
3.6.4.	<i>Labirinto em cruz elevado</i>	<i>170</i>
3.6.5.	<i>Campo aberto.....</i>	<i>170</i>
3.6.6.	<i>Teste de consumo de sacarose.....</i>	<i>170</i>
3.6.7.	<i>Preferência por lugar em tempo real</i>	<i>171</i>
3.7.	PERFUSÃO, DISSECAÇÃO DAS ÁREAS ENCEFÁLICAS E IMUNOFLOURESCÊNCIA	171
3.7.1.	<i>Quantificação das células positivas para DeltaFosB</i>	<i>172</i>
3.8.	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	172
3.8.1.	<i>Experimento 1: avaliação da dose de clozapina-N-óxido no estresse de derrota social subefetivo</i>	<i>172</i>
3.8.2.	<i>Experimento 2: ativação quimiogenética dos neurônios Npas1+ do pálido ventral durante o estresse de derrota social subefetivo</i>	<i>173</i>
3.8.3.	<i>Experimento 3: inibição quimiogenética dos neurônios Npas1+ do pálido ventral durante o estresse de derrota social subefetivo</i>	<i>174</i>
3.8.4.	<i>Experimento 4: inibição quimiogenética dos neurônios Npas1+ do pálido ventral durante o estresse de derrota social crônico</i>	<i>174</i>
3.8.5.	<i>Experimento 5: ativação quimiogenética dos neurônios Npas1+ do pálido ventral durante testes comportamentais relacionados à ansiedade e depressão</i>	<i>175</i>

3.8.6.	<i>Experimento 6: mapeamento das projeções dos neurônios Npas1+ do pálido ventral.</i>	176
3.8.7.	<i>Experimento 7: ativação optogenética das projeções dos neurônios Npas1+ do pálido ventral para o núcleo acumbens durante o teste da preferência por lugar em tempo real</i>	176
3.9.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	177
4.	RESULTADOS	178
4.1.	EXPERIMENTO 1: AVALIAÇÃO DA DOSE DE CLOZAPINA-N-ÓXIDO NO ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL SUBEFETIVO EM ANIMAIS SEM ADMINISTRAÇÃO DE VETORES VIRAIS	178
4.2.	EXPERIMENTO 2: EFEITOS DA ATIVAÇÃO DOS NEURÔNIOS NPAS1+ DO PÁLIDO VENTRAL DURANTE O ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL SUBEFETIVO	180
4.3.	EXPERIMENTO 3: EFEITOS DA INIBIÇÃO DOS NEURÔNIOS NPAS1+ DO PÁLIDO VENTRAL DURANTE O ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL SUBEFETIVO	184
4.4.	EXPERIMENTO 4: EFEITOS DA INIBIÇÃO DOS NEURÔNIOS NPAS1+ DO PÁLIDO VENTRAL DURANTE O ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL CRÔNICO	187
4.5.	EXPERIMENTO 5: EFEITO DA ATIVAÇÃO DOS NEURÔNIOS NPAS1+ DO PÁLIDO VENTRAL DURANTE TESTES COMPORTAMENTAIS RELACIONADOS À ANSIEDADE E DEPRESSÃO	190
4.6.	EXPERIMENTO 6: MAPEAMENTO DAS PROJEÇÕES DOS NEURÔNIOS NPAS1+ DO PÁLIDO VENTRAL	196
4.7.	EXPERIMENTO 7: EFEITO DA ATIVAÇÃO OPTOGENÉTICA DOS NEURÔNIOS NPAS1+ DO PÁLIDO VENTRAL QUE SE PROJETAM PARA O NÚCLEO ACUMBENS DURANTE O TESTE DE PREFERÊNCIA POR LUGAR EM TEMPO REAL	201
5.	DISCUSSÃO	202
6.	CONCLUSÃO	206
	REFERÊNCIAS	207
	ANEXO A – PARECER CEUA 01/2017	232
	ANEXO B – PARECER CEUA 01/2017 (PRORROGAÇÃO)	233
	ANEXO C – ARTIGO “CARDIOVASCULAR OUTCOMES RELATED TO SOCIAL DEFEAT STRESS: NEW INSIGHTS FROM RESILIENT AND SUSCEPTIBLE RATS”	234
	ANEXO D – PARECER IACUC #0517004	247

**CAPÍTULO 1 - ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS, MOLECULARES E
CARDIOVASCULARES NOS FENÓTIPOS RESILIENTE E SUSCEPTÍVEL AO
ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL E O EFEITO DO TRATAMENTO COM A N-
ACETILCISTEÍNA**

1. INTRODUÇÃO

O conteúdo da tese foi dividido em dois capítulos de modo a facilitar o entendimento da hipótese, objetivos e técnicas empregadas no desenvolvimento desse estudo, que foi realizada durante o período de doutorado regular no Brasil e durante um período de estágio em pesquisa no exterior. Assim, o capítulo 1 aborda o período de doutorado regular no Brasil, cujos experimentos foram delineados para avaliar as alterações comportamentais, moleculares e cardiovasculares nos fenótipos resiliente e susceptível em ratos expostos ao estresse de derrota social (EDS), enquanto o capítulo 2 aborda o período de estágio em pesquisa no exterior, realizado na cidade de Baltimore-MD, nos Estados Unidos, cujos experimentos foram delineados para avaliar o papel dos neurônios positivos para a proteína Npas1 do pálido ventral na susceptibilidade ao EDS em camundongos.

1.1. ESTRESSE: SUSCEPTIBILIDADE E RESILIÊNCIA

O estresse pode ser definido como uma resposta geral do organismo, de alerta, frente à exposição a estímulos nocivos, caracterizada por diversas alterações neuroendócrinas, fisiológicas e comportamentais. Esse conjunto de respostas visa, fundamentalmente, a manutenção do funcionamento do organismo e é generalizado para os mais diversos estímulos (SELYE, 1936; SZABO; TACHE; SOMOGYI, 2012).

Dois sistemas neuroendócrinos, o eixo hipotálamo-pituitária-adrenais (HPA) e o sistema nervoso autônomo simpático (SNS), são responsáveis pela resposta imediata à exposição a estressores e funcionam como reguladores da resposta adaptativa ao estresse (HARIRI; HOLMES, 2015). No momento em que uma situação estressante é detectada, os neurônios parvocelulares do núcleo paraventricular hipotalâmico respondem com a liberação de CRH (hormônio liberador da corticotrofina, do inglês *corticotrophin releasing hormone*), que por sua vez estimula a liberação de ACTH (hormônio adenocorticotrófico, do inglês *adrenocorticotropic hormone*) pela glândula hipófise (também chamada de glândula pituitária) anterior. Esse hormônio, liberado na corrente sanguínea, estimula a síntese e liberação de glicocorticoides pelo córtex da glândula adrenal (KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005). A ativação do SNS culmina com a liberação de noradrenalina pelos nervos do SNS e principalmente adrenalina pela medula da glândula adrenal. Tanto os glicocorticoides,

a adrenalina, a noradrenalina e o CRH medeiam as respostas fisiológicas, endócrinas e comportamentais frente aos estressores, por meio de sua interação com virtualmente todo o organismo (ULRICH-LAI; HERMAN, 2009). Por sua vez, a ativação dessa cascata de resposta depende da participação de outras áreas encefálicas, que atuam na percepção dos estímulos e no controle e organização do estresse (MORA et al., 2012). Esses mecanismos de percepção e resposta aos estímulos nocivos são indispensáveis para manutenção da vida, e como tal, altamente conservados filogeneticamente (HARIRI; HOLMES, 2015).

Desde a sua primeira descrição como a “síndrome da adaptação geral” por Hans Selye na década de 30 (SELYE, 1936) e posterior uso do termo estresse para se referir a esse conjunto de respostas (SELYE, 1956), muito se esclareceu sobre as consequências da exposição prolongada a estressores para o desenvolvimento de doenças (MCEWEN; AKIL, 2020). Apesar de benéfica, a resposta à estímulos nocivos, quando prolongada, exacerbada ou desregulada, acaba causando uma sobrecarga ao organismo, o que pode desencadear inúmeras patologias (MCEWEN, 2012).

A importância e proporção das desordens relacionadas ao estresse para a saúde pública é tamanha que a quinta edição do manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais (DSM-5) traz um tópico em separado para os transtornos relacionados à exposição ao trauma e a estressores (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013). Inúmeras doenças têm sua etiologia ou agravamento ligados à exposição crônica ao estresse, que vão desde as cardiovasculares até manifestações do sistema imune, câncer, obesidade e neuropsiquiátricas (DHABHAR, 2014; ENOCH, 2011; KIVIMÄKI; STEPTOE, 2018; KRUK *et al.*, 2019; ROSENGREN *et al.*, 2004). Assim, não é surpreendente que ocorra maior prevalência de tais doenças em regiões de conflito social constante ou acometidas por desastres naturais (CHARLSON *et al.*, 2019; FULLERTON *et al.*, 2013; RICHMAN *et al.*, 2007). Crianças que vivenciam episódios de maus tratos e violência doméstica possuem maior risco para o desenvolvimento dessas doenças na vida adulta (HUGHES *et al.*, 2017). No ano de 2017, se considerarmos apenas os transtornos de depressão e ansiedade, essas condições corresponderam a mais de 6% de todos os anos de vida perdidos ajustados por incapacidade (do inglês, *DALY's, disability-adjusted life years*) no mundo (JAMES *et al.*, 2018).

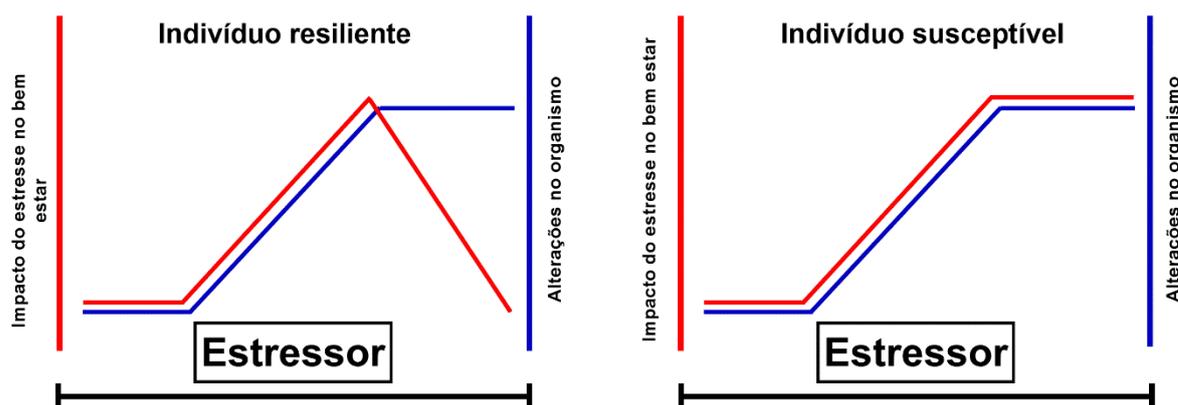
Apesar da importante correlação entre o estresse e o desenvolvimento de doenças, nem todos os indivíduos expostos a eventos traumáticos desenvolvem

doenças relacionadas ao estresse (COHEN; JANICKI-DEVERTS; MILLER, 2007). Diferenças individuais na adaptação do organismo ao estresse podem ser as responsáveis pelo desenvolvimento de doenças em alguns indivíduos e em outros não. Nesse contexto, surgem os conceitos dos fenótipos de susceptibilidade e resiliência ao estresse, que seriam características individuais relacionadas com a maneira como cada um lida com a exposição a eventos adversos, caracterizadas por diferenças na resposta de diferentes redes neurais e tipos celulares a tais eventos, culminando nas diferenças comportamentais expressas por cada indivíduo (CATHOMAS *et al.*, 2019). Um dos conceitos de resiliência a considera como uma característica que permite que o indivíduo se mantenha saudável frente às adversidades, enquanto a susceptibilidade corresponde ao inverso, indivíduos que apresentam alterações que levam ao desenvolvimento de doenças frente aos problemas e desafios (MCEWEN; GRAY; NASCA, 2015; MCEWEN; KARATSOREOS, 2013; WOOD; BHATNAGAR, 2015). Atualmente, avanços no estudo das bases neurobiológicas desse fenômeno têm ajudado a entender os processos que envolvem a resiliência e susceptibilidade ao estresse.

Diferente do que possa ser imaginado, a resiliência ao estresse é um processo ativo, que depende de modificações no organismo para o seu sucesso, ao invés de uma simples ausência de alterações patológicas. Assim, enquanto a susceptibilidade se refere a um conjunto de características que predispõe o indivíduo a alterações no organismo relacionadas ao desenvolvimento de patologias, a resiliência se refere à características que predispõe o indivíduo a se recuperar de maneira positiva frente às adversidades enfrentadas (FELDMAN, 2020; MCEWEN; KARATSOREOS, 2013) (Figura 1).

Figura 1 - Linha do tempo, teórica, do impacto do estresse no bem-estar e alterações geradas no organismo em decorrência do estresse em um indivíduo resiliente ou susceptível. Em um indivíduo resiliente, apesar da exposição a um estressor ter um impacto na sua qualidade de vida (linha vermelha, gráfico da esquerda), o mesmo se recupera positivamente com o fim do período de estresse.

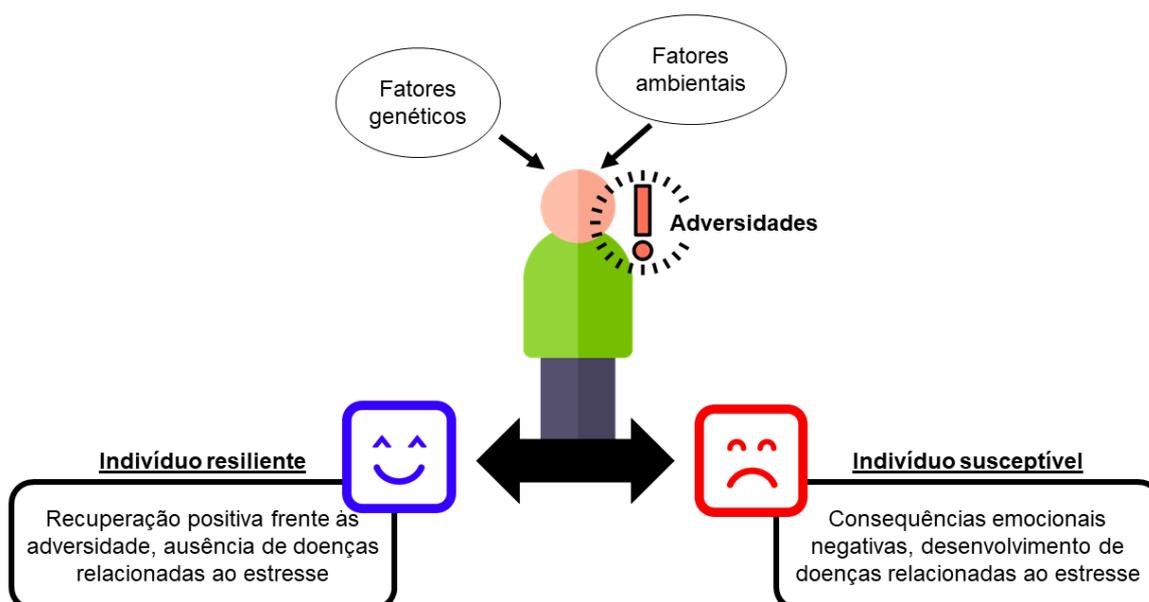
Essa recuperação acontece mediante alterações ativas no seu organismo (linha azul, gráfico da esquerda), desencadeadas pelo estresse. Por sua vez, o impacto da exposição a um estressor na qualidade de vida (linha vermelha, gráfico da direita) de um indivíduo susceptível é duradouro, assim como as alterações no seu organismo (linha azul, quadro da direita).



Fonte: próprio autor, 2021.

Pesquisas recentes têm mostrado uma influência tanto genética quanto ambiental nos traços de resiliência ou susceptibilidade de um indivíduo, podendo ser moduladas positivamente ou negativamente (FEDER *et al.*, 2019) (Figura 2). Por exemplo, estudos com gêmeos, utilizando questionários estruturados para avaliação da resiliência, têm mostrado hereditariedade moderada desse traço individual (AMSTADTER; MYERS; KENDLER, 2014; WOLF *et al.*, 2018). Corroborando com esses resultados, um estudo envolvendo soldados estadunidenses, que utilizou questionários estruturados e a ausência do desenvolvimento de doenças psiquiátricas para avaliação da resiliência, mostrou hereditariedade moderada desse traço, além de polimorfismos genéticos que podem estar implicados na resiliência nesses indivíduos (STEIN *et al.*, 2019). Nesse sentido, um polimorfismo no gene do transportador de serotonina dependente de sódio (gene *SLC6A4*) está relacionado com um aumento da resiliência em crianças que experienciaram um ambiente familiar saudável e um aumento da susceptibilidade em crianças que experienciaram um ambiente familiar negativo (CICCHETTI; ROGOSCH, 2012; GRESSIER; CALATI; SERRETTI, 2016; HANKIN *et al.*, 2011). Indivíduos com um menor número de polimorfismos associados ao desenvolvimento de depressão também possuem maior resiliência quando expostos a períodos de grande estresse, como o internato médico (FANG *et al.*, 2020).

Figura 2 - O fenótipo de enfrentamento ao estresse é influenciado tanto por fatores genéticos e hereditários quanto ambientais (nutrição, ambiente familiar, bullying). Esses fatores são cruciais para determinar, em momentos de grande estresse, se o indivíduo será resiliente, e irá se recuperar positivamente frente às adversidades, ou suscetível, cujas consequências negativas do estresse podem levar ao desenvolvimento de doenças.



Fonte: próprio autor, 2021. Os ícones utilizados foram obtidos de Flaticon (www.flaticon.com).

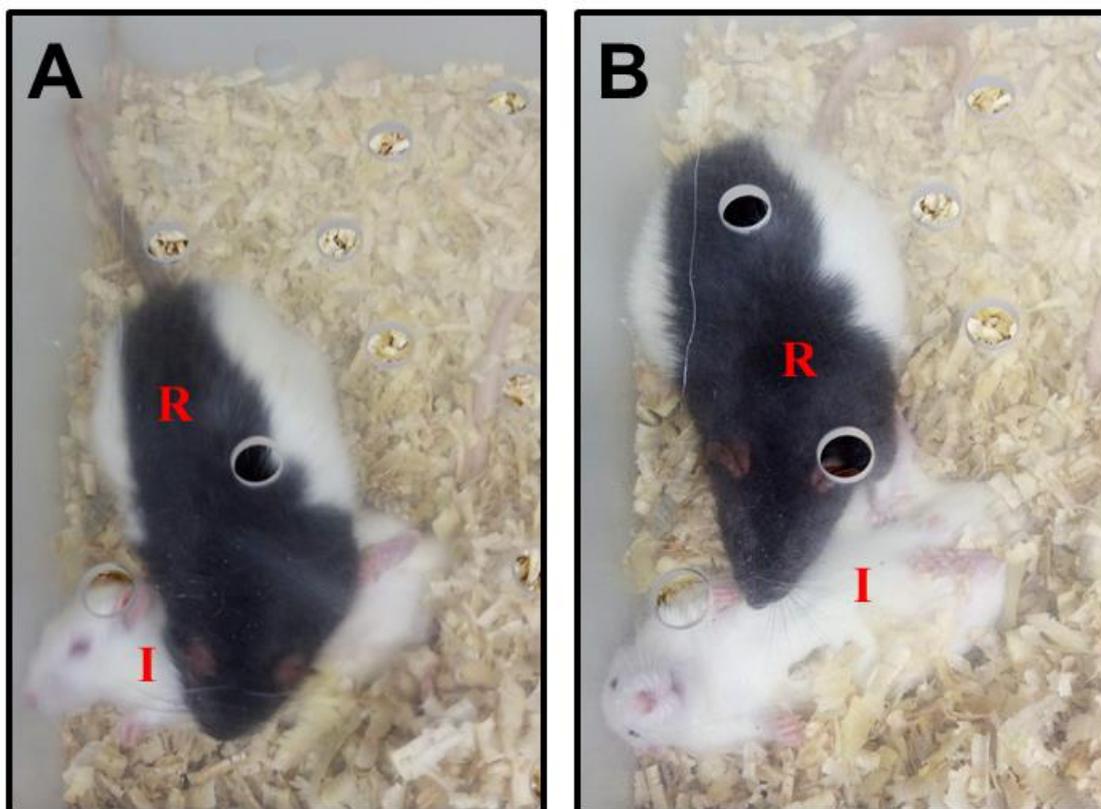
As evidências apresentadas acima mostram que o traço de resiliência possui efeito protetor em relação ao desenvolvimento de patologias relacionadas a exposição crônica ao estresse. Portanto, o estudo e o entendimento dos fatores que diferenciam indivíduos com um fenótipo considerado resiliente dos indivíduos susceptíveis pode aumentar a nossa capacidade em desenvolver estratégias eficazes no tratamento das doenças relacionadas ao estresse.

1.2. ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL E TESTE DE INTERAÇÃO SOCIAL: ESTUDANDO A RESILIÊNCIA E A SUSCEPTIBILIDADE AO ESTRESSE EM MODELOS ANIMAIS

Dentre os modelos animais utilizados para o estudo da neurobiologia do estresse e suas consequências, o EDS se destaca devido a sua relevância etológica e similaridade com o estresse psicossocial comumente vivenciado por seres humanos (HUHMAN, 2006; TAKAHASHI *et al.*, 2018). Este consiste na exposição de roedores a um confronto intenso, inescapável e imprevisível a um coespecífico agressor (JAGGI *et al.*, 2011). No modelo de EDS mais utilizado, o modelo do residente-intruso, o animal experimental a ser exposto ao estresse, denominado intruso, é colocado na caixa-moradia de um coespecífico selecionado por sua agressividade, denominado

residente. Esse encontro resulta na agressão do intruso por parte do residente, culminando com a expressão de um repertório comportamental pelo intruso que indica sua submissão frente ao residente (PRYCE; FUCHS, 2017). A Figura 3 ilustra um encontro agressivo neste modelo.

Figura 3 - Encontro agressivo no modelo intruso-residente do estresse de derrota social. Em A, o animal residente agressivo, da linhagem Long Evans (identificado pela letra R), ataca o intruso, da linhagem Wistar (identificado pela letra I). Em B, após o ataque, o intruso se coloca em postura de submissão (posição supina por mais de 4 segundos).



Fonte: próprio autor, 2021.

Ratos e camundongos expostos ao EDS apresentam alterações comportamentais e fisiológicas relacionadas à ansiedade e depressão, como diminuição do ganho de peso corporal, aumento dos comportamentos relacionados à ansiedade no labirinto em cruz elevado (LCE) e no teste de supressão da alimentação pela novidade, anedonia no teste de consumo de sacarose e aumento da imobilidade no teste do nado forçado (TNF) (VENZALA *et al.*, 2012), alterações eletrofisiológicas e anatômicas no coração (SGOIFO; CARNEVALI; GRIPPO, 2014) e prejuízo de memória (PATKI *et al.*, 2013). Em humanos, o assédio moral e intimidação são fatores

desencadeadores de distúrbios de ansiedade, depressão (BJÖRKQVIST, 2001) e doenças cardiovasculares (MERZ *et al.*, 2002). O estresse vivenciado no ambiente de trabalho causa também déficits de memória (ESKILDSEN *et al.*, 2015). Assim, o modelo de EDS possui uma grande relevância e aplicabilidade no entendimento do estresse social em humanos.

Assim como em humanos, as alterações relacionadas ao estresse em modelos animais não são uniformes, uma vez que nem todo indivíduo experimental responde igualmente a um mesmo estímulo estressor. Portanto, o desenvolvimento de modelos animais que permitam a análise desses indivíduos de maneira independente sempre foi um objetivo no estudo da neurobiologia do estresse. Diversos modelos animais têm sido utilizados, que vão desde a utilização de animais transgênicos, estudo de diferenças sexuais frente a exposição ao estresse e a separação de subpopulações dentro de uma mesma amostra, que inclusive podem ser intensificadas por meio de seleção artificial (no inglês, *selective breeding*) (SCHARF; SCHMIDT, 2012). Nesse sentido, Krishnan e colaboradores (2007), utilizaram pela primeira vez o teste de preferência/interação social, aqui chamado de teste de interação social (TIS), para identificação dos fenótipos resiliente e susceptível em camundongos expostos ao EDS crônico.

A interação social é um fator importante na vida dos roedores, já que estes são animais que vivem em colônias. Logo, quando apresentados a um novo indivíduo, naturalmente os animais tem o comportamento de interagir (LEE; BEERY, 2019). Partindo dessa premissa, o TIS avalia o comportamento dos animais em dois momentos: inicialmente, em um aparato vazio e então no mesmo ambiente, dessa vez contendo um alvo social enclausurado em uma das extremidades do aparato (TOTH; NEUMANN, 2013). A razão entre o tempo gasto próximo a gaiola que abriga o alvo social nos dois momentos do teste é o parâmetro utilizado para avaliação da preferência/evitação social.

O TIS permite a separação objetiva de animais expostos ao EDS nos fenótipos de enfrentamento ao estresse. Quando submetidos a esse teste, ratos e camundongos susceptíveis apresentam clara evitação social, enquanto animais resilientes não apresentam diminuição do tempo de interação. Os animais que apresentam diminuição da interação social também apresentam diversas alterações comportamentais relacionadas à ansiedade e depressão, em contraste aos animais resilientes (GOLDEN *et al.*, 2011; MORAIS-SILVA *et al.*, 2019). A facilidade da

aplicação desse modelo (EDS seguido do TIS para separação dos fenótipos) e a objetividade da identificação dos indivíduos resilientes e susceptíveis o torna muito útil no estudo dos fenótipos de enfrentamento ao EDS.

1.3. NEUROBIOLOGIA DA RESILIÊNCIA E SUSCEPTIBILIDADE AO ESTRESSE

Além das diferenças comportamentais, estudos têm mostrado marcantes diferenças moleculares no sistema nervoso de animais resilientes e susceptíveis ao estresse.

Dentre os possíveis componentes intracelulares que parecem influenciar o enfrentamento ao estresse nos fenótipos resiliente e susceptível, destaca-se o fator de transcrição DeltaFosB. A DeltaFosB é uma variante truncada formada pelo splicing alternativo do gene fosb (do inglês, *Finkel–Biskis–Jinkins murine osteosarcoma viral oncogene homolog B*). Este gene faz parte da família de genes de ativação imediata fos, que codificam fatores de transcrição produzidos mediante a ativação celular pelos mais variados estímulos. Isso torna as proteínas provenientes dessa família de genes muito utilizadas para o mapeamento da ativação celular (KOVÁCS, 1998). Diferentemente da FosB, que é rapidamente degradada após sua síntese, a DeltaFosB possui uma alta estabilidade, acumulando-se no interior da célula submetida a estímulos repetidos (NESTLER; KELZ; CHEN, 1999; RUFFLE, 2014).

Estudos clássicos mostram um importante papel da DeltaFosB nas alterações neuronais relacionadas ao estresse, sendo esta proteína considerada um regulador transcricional da resposta ao estresse (NESTLER, 2015). A exposição a diversos protocolos de estresse, como o estresse crônico variável, estresse crônico de restrição e o EDS, aumenta os níveis de DeltaFosB em diversas regiões encefálicas (LAINE *et al.*, 2017; PERROTTI *et al.*, 2004). Mais recentemente, têm se mostrado alterações na expressão desse fator de transcrição nos fenótipos resiliente e susceptível ao EDS. A DeltaFosB é altamente expressa na sub-região infralímbica (IL) do córtex pré-frontal medial (CPFm) e no núcleo acumbens (Acb) de camundongos resilientes ao EDS (ROBISON *et al.*, 2014). Por sua vez, camundongos expostos ao EDS apresentam um aumento na expressão de DeltaFosB na sub-região pré-límbica (PrL) do CPFm e no núcleo leito da estria terminal (NLST) (VIALOU *et al.*, 2014). No geral, tratamentos que promovem resiliência ou melhoria dos sintomas pró-depressivos em animais aumentam a expressão de DeltaFosB em diversas áreas encefálicas, como a matéria

cinzenta periaquedutal (MCP), Acb e hipocampo (Hpc) (BERTON *et al.*, 2007; EAGLE *et al.*, 2020; ROBISON *et al.*, 2014; VIALOU *et al.*, 2010). O aumento dos níveis de DeltaFosB, especificamente em neurônios espinhosos médios do tipo D1 no Acb, por meio de modificações epigenéticas, induz resiliência ao EDS (FRANCIS *et al.*, 2015; HAMILTON *et al.*, 2017), assim como o tratamento com antidepressivos induz um aumento da expressão desse fator de transcrição (DONAHUE *et al.*, 2014; VIALOU *et al.*, 2010).

Um importante aspecto no funcionamento normal do sistema nervoso central é a assimetria funcional de algumas áreas encefálicas, isto é, regiões do encéfalo que naturalmente apresentam diferenças na sua atividade entre os hemisférios cerebrais (OCKLENBURG *et al.*, 2016). Estudos têm mostrado um papel da lateralização, e de alterações nesse padrão de lateralização, em especial do CPFm, nas respostas comportamentais ao estresse e em suas consequências (CERQUEIRA *et al.*, 2007). Diversos estudos, tanto em humanos como em modelos animais, corroboram essa hipótese. Pacientes acometidos por lesão isquêmica na região anterior do córtex frontal esquerdo apresentam sintomas mais graves de depressão quando comparados a pacientes com lesões do lado direito (GAINOTTI, 1972; ROBINSON *et al.*, 1984; ROBINSON; SZETELA, 1981). Em mulheres, uma menor atividade basal do córtex frontal esquerdo, avaliada por meio de eletroencefalografia, se correlaciona com uma maior severidade dos sintomas de depressão no futuro (STEWART; ALLEN, 2018). Em ratos, a lesão do CPFmD com ácido ibotênico reduz as respostas neuro-hormonais ao estresse de restrição repetido (SULLIVAN; GRATTON, 1999) e tem efeito ansiolítico no labirinto em cruz elevado (SULLIVAN; GRATTON, 2002). Nesse contexto, a estimulação optogenética do CPFmE reduz a evitação social em camundongos susceptíveis ao EDS, enquanto a inibição dessa mesma região induz evitação social em camundongos resilientes (LEE *et al.*, 2015). A ativação nitrérgica do CPFmD, por meio da administração de um fármaco doador de óxido nítrico, leva à ansiogênese, enquanto sua inativação, por meio da administração local de cloreto de cobalto, provoca efeito oposto, isto é, ansiólise (COSTA *et al.*, 2016). Essa maior ativação nitrérgica do CPFmD parece ocorrer naturalmente durante a exposição crônica ao EDS, uma vez que camundongos submetidos ao EDS por 10 dias apresentam aumento do número de neurônios duplamente positivos para o fator de transcrição DeltaFosB e para enzima nNOS, indicando uma ativação crônica desses neurônios (FARIA; LAVERDE; NUNES-DE-SOUZA, 2020). Em animais expostos ao

EDS, a inativação do CPFmE prolonga os efeitos ansiogênicos induzidos por um único episódio de exposição ao estresse, sendo esse efeito dependente dos receptores NMDA no CPFmD (COSTA *et al.*, 2016; VICTORIANO *et al.*, 2020). Ainda no CPFm, diferenças quanto à arborização dendrítica e formação de novas células, que existem entre os hemisférios esquerdo e direito, são abolidas após a exposição ao EDS (CZÉH *et al.*, 2007,2008). No Hpc, ratos isolados cronicamente apresentam alterações na neurotransmissão noradrenérgica do hemisfério direito, aumentando a assimetria naturalmente encontrada nessa região (SPASOJEVIC; JOVANOVIC; DRONJAK, 2013; SPASOJEVIC *et al.*, 2012). Entretanto, pouco se sabe acerca de diferenças na lateralização da expressão de DeltaFosB nos fenótipos de susceptibilidade e resiliência ao estresse.

As evidências acima sugerem que diversas regiões podem estar envolvidas no aumento da susceptibilidade ao estresse de alguns indivíduos e no efeito protetor do fenótipo de resiliência em outros. Algumas dessas regiões são conhecidas por sua extensa intercomunicação, sendo o glutamato o principal neurotransmissor responsável pela comunicação sináptica entre essas áreas (SCOFIELD *et al.*, 2016).

1.4.ALTERAÇÕES GLUTAMATÉRGICAS INDUZIDAS PELO ESTRESSE: O POTENCIAL DA N-ACETILCISTEÍNA NA DEPRESSÃO

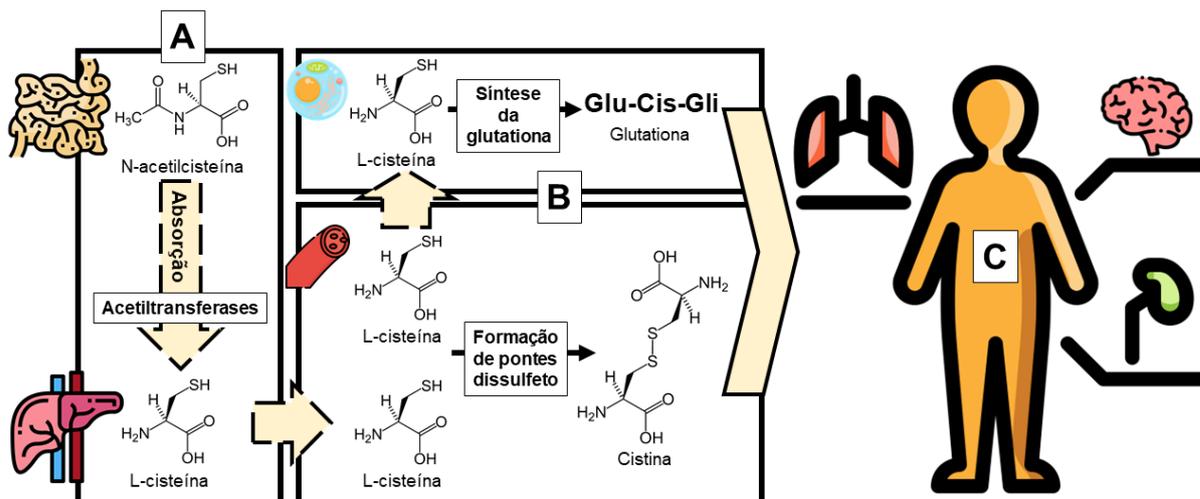
Desregulações na neurotransmissão glutamatérgica têm sido associadas ao desenvolvimento de diversas doenças psiquiátricas cujo estresse tem um importante papel como fator de risco (COHEN; JANICKI-DEVERTS; MILLER, 2007; GONZALEZ; MARTINEZ, 2014; SANACORA; TRECCANI; POPOLI, 2012). Estudos têm mostrado que o estresse altera a liberação sináptica do glutamato, sua captação pelas células da glia e os mecanismos de plasticidade dependentes desse neurotransmissor (MURROUGH; ABDALLAH; MATHEW, 2017; POPOLI *et al.*, 2011). Disfunções da liberação, síntese e captação do glutamato, além de mudanças morfológicas em sinapses glutamatérgicas são encontradas no cérebro de pacientes com transtornos de depressão e ansiedade em estudos *post-mortem* (MUSAZZI; TRECCANI; POPOLI, 2015). Um importante transportador não-vesicular de glutamato, que está envolvido na manutenção das concentrações extrassinápticas desse neurotransmissor e no controle do glutamato liberado na fenda sináptica é o trocador cistina-glutamato (xCT) (MASSIE *et al.*, 2015).

O xCT é um transportador astrocitário de glutamato independente de sódio, que realiza o contratransporte de uma molécula de glutamato por uma de cistina. Como, no geral, a concentração intracelular do glutamato nos astrócitos é maior que a concentração extracelular, o xCT age liberando uma molécula de glutamato no espaço extrasináptico em troca da captação de uma molécula de cistina. Uma vez no espaço extrasináptico, o glutamato pode atuar ativando seus receptores metabotrópicos presentes na membrana do neurônio pré-sináptico ou do neurônio pós-sináptico (BRIDGES *et al.*, 2012). A diminuição da expressão dessa proteína no HpcV tem sido relacionada a uma perda da resiliência ao estresse em modelos genéticos de exposição ao estresse e em camundongos expostos cronicamente ao estresse de restrição (NASCA *et al.*, 2017).

A N-acetilcisteína (N-AC), é um pró-fármaco da L-cisteína clinicamente disponível para utilização como agente mucolítico, e também no tratamento da sobredose do paracetamol (SAMUNI *et al.*, 2013). Recentemente, devido a sua ação antioxidante e atuação na neurotransmissão glutamatérgica, tem sido estudada no tratamento de doenças psiquiátricas, incluindo a depressão (DEAN; GIORLANDO; BERK, 2011).

Ao ser absorvida, a N-AC é extensamente metabolizada pelas acetiltransferases da mucosa intestinal e hepáticas em L-cisteína. Por sua vez, a alta reatividade do grupo sulfidril da molécula de L-cisteína livre faz com que a mesma se una a outra L-cisteína por meio de pontes dissulfeto, resultando na formação da cistina. A L-cisteína também pode, no interior das células, ser utilizada na síntese de glutathione (SAMUNI *et al.*, 2013). Assim, os efeitos biológicos da N-AC são, de maneira geral, dependentes do seu metabolismo a L-cisteína (Figura 4).

Figura 4 - Metabolismo da N-acetilcisteína. Ao ser administrada, a N-Acetilcisteína é rapidamente metabolizada em L-cisteína por ação das Acetiltransferases presentes nas células da mucosa intestinal ou hepáticas (A). Após a absorção, a L-cisteína pode ser substrato para formação da cistina no plasma ou ser utilizada na síntese da glutathione (B). Duas moléculas de L-cisteína se unem por pontes dissulfeto para formação de uma molécula de cistina. Tanto a L-cisteína, cistina ou a glutathione são responsáveis pelos efeitos biológicos da N-Acetilcisteína, que pode atuar em diversos órgãos (C), como um potente antioxidante ou na ativação do trocador cistina-glutamato.



Fonte: próprio autor, 2021. Os ícones utilizados foram obtidos de Flaticon (www.flaticon.com).

Além de ser um agente antioxidante (efeito exercido pelos radicais reativos sulfidríla tanto na própria molécula de N-AC quanto na L-cisteína e pela glutathione após síntese dependente da L-cisteína), a N-AC induz a ativação do xCT, por meio do qual pode atuar na regulação das concentrações extracelulares de glutamato (BROWN; KUPCHIK; KALIVAS, 2013).

Diante dos mecanismos de ação propostos para a N-AC, alguns estudos têm proposto a sua utilização no tratamento da depressão, seja isoladamente ou como um complemento aos antidepressivos disponíveis na clínica. Em modelos animais, o tratamento com a N-AC induz efeitos antidepressivos no TNF (AL-SAMHARI *et al.*, 2015; FERREIRA *et al.*, 2008), no teste de suspensão da cauda (COSTA-CAMPOS *et al.*, 2013), no modelo de bulbectomia em ratos (SMAGA *et al.*, 2012), em ratos expostos ao estresse crônico imprevisível (ARENT *et al.*, 2012; FERNANDES; GUPTA, 2019) e em modelos da doença de Huntington (WRIGHT *et al.*, 2016), diminuindo inclusive a dose necessária para efeitos antidepressivos de fármacos antidepressivos clássicos (ARENT *et al.*, 2012; COSTA-CAMPOS *et al.*, 2013). A N-AC também reverte o aumento dos comportamentos relacionados à ansiedade induzidos pelo estresse (CHAKRABORTI; GULATI; RAY, 2008; MOCELIN *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2017). Por outro lado, os estudos clínicos ainda são limitados. Dois estudos de caso mostraram uma eficácia da N-AC em associação à tranilcipromina (um inibidor não seletivo e irreversível da monoamina oxidase) na melhora dos sintomas de depressão (CARVALHO *et al.*, 2013). Berk e colaboradores (2014), em um estudo duplo-cego, mostraram um efeito benéfico do tratamento com a N-AC na

severidade global da doença em pacientes com depressão quando comparado com o placebo (nesse estudo os pacientes continuaram a terapia medicamentosa usual) (BERK *et al.*, 2014). Posteriormente, uma metanálise de estudos duplo-cego em pacientes com depressão ou transtorno bipolar mostrou resultados semelhantes (melhoria da severidade global da doença) (KISHI *et al.*, 2020).

Esses resultados sugerem que a N-AC possa ser útil no tratamento das alterações comportamentais relacionadas à depressão em modelos animais e na depressão em humanos. Apesar disso, nenhum estudo analisou seus efeitos no EDS, especialmente em experimentos onde os fenótipos resiliente e susceptível foram identificados.

2. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo caracterizar, em ratos, os fenótipos resiliente e susceptível ao EDS e avaliar o efeito do tratamento com a N-AC nos comportamentos relacionados à ansiedade e depressão induzidos pelo EDS e nas neuroadaptações associadas. Mais especificamente, avaliaremos nos fenótipos resiliente e susceptível de ratos submetidos ao EDS:

- as alterações comportamentais relacionadas à ansiedade;
- as alterações comportamentais relacionadas à depressão;
- as alterações na memória episódica de curto e longo prazo;
- a influência dos níveis de agressão sofridos durante os encontros agressivos do EDS;
- as alterações na expressão do xCT;
- as alterações na expressão da DeltaFosB em regiões encefálicas implicadas no estresse;
- as alterações cardiovasculares;
- o efeito do tratamento com a N-AC nas alterações comportamentais relacionadas à ansiedade e depressão;
- o efeito do tratamento com a N-AC nas alterações na expressão de DeltaFosB em regiões encefálicas implicadas no estresse.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. SUJEITOS EXPERIMENTAIS

Trezentos e vinte e um ratos da linhagem Wistar (230 – 250 g) obtidos do biotério central da Universidade Estadual Paulista – UNESP (Botucatu, SP-Brasil) foram utilizados como sujeitos experimentais. Estes foram mantidos em condições controladas de temperatura (23 ± 2 °C) e ciclo de luz invertido (12/12 horas, luzes apagadas às 10 horas), com água e ração *ad libitum*, em grupos de quatro animais em caixas grandes de polipropileno (32 x 40 x 16 cm).

Como residentes (estímulo agressivo) no protocolo de EDS, foram utilizados vinte e cinco ratos da linhagem Long Evans (pesando mais de 400g durante os episódios de EDS), obtidos do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista – UNESP (Araraquara, SP-Brasil), previamente escolhidos com base em seu comportamento agressivo. Estes foram mantidos formando colônias estáveis com uma fêmea cada desde o desmame em caixas grandes de polipropileno (32 x 40 x 16 cm) em condições controladas de temperatura (23 ± 2 °C) e ciclo de luz (12/12h, luzes apagadas às 10 horas), com água e ração *ad libitum*.

Todos os procedimentos foram realizados durante a fase escura do ciclo de luz dos animais. Os experimentos envolvendo animais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais local (CEUA/FCF/CAR) sob número de protocolo 01/2017 (ANEXOS A e B) e realizados de acordo com os princípios do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

3.2. ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL

O modelo intruso-residente foi utilizado como protocolo de EDS de acordo com estudo previamente realizado em nosso laboratório (MORAIS-SILVA *et al.*, 2019), baseado no descrito anteriormente por Boyson e colaboradores (2011).

Durante 7 dias, os animais a serem estressados (denominados intrusos) foram expostos a um encontro com um coespecífico agressor (denominado residente) a fim de serem derrotados. Cada encontro teve duração de 25 minutos e foi dividido em três

fases: inicialmente, os intrusos foram colocados em uma caixa protetora de metal na caixa-moradia do residente por 5 minutos. Após esse tempo, os intrusos foram retirados da caixa-protetora e expostos aos ataques do residente por 10 minutos, ou até que a agressão do residente pudesse causar danos físicos. Os intrusos foram então colocados novamente na caixa protetora dentro da caixa-moradia do residente por mais 10 minutos. Ao fim do episódio de derrota, os intrusos retornaram para suas caixas-moradia até o próximo episódio de derrota (48 horas após o encontro anterior). Cada intruso foi exposto a um agressor diferente durante cada episódio de derrota. Os encontros foram realizados aleatoriamente durante a fase escura do ciclo dos intrusos a fim de tornar o estresse imprevisível. Uma hora antes de cada episódio de derrota as fêmeas foram retiradas da caixa, mantidas em sala climatizada com água e ração ad libitum, e os residentes foram transportados para sala de experimentação onde ocorreu o EDS. Os animais do grupo controle foram mantidos sem manipulação em suas caixas-moradia durante o período de EDS.

Cerca de 15 dias antes do início do protocolo de EDS, os residentes foram testados quanto a sua agressividade para utilização nos episódios agressivos, levando em consideração a latência para o primeiro ataque e capacidade de induzir postura de submissão em um coespecífico adulto. Para tanto, ratos Long Evans adultos (230 – 250 g), desconhecidos do residente a ser testado, foram colocados desprotegidos na caixa-moradia do residente por 5 minutos, para avaliação dos parâmetros anteriormente citados. Somente residentes cuja latência para o primeiro ataque foi menor que 150 segundos e foram capazes de induzir postura de submissão no intruso por pelo menos uma vez durante o período de teste foram utilizados nos experimentos.

3.3. AVALIAÇÃO DO ESTADO FÍSICO

O estado físico dos animais foi avaliado por meio do ganho de peso e da deterioração da pelagem durante o EDS. A deterioração da pelagem foi avaliada por uma escala de 3 a 0: ao animal com pelo saudável foi atribuída a nota 3, enquanto um animal com pelagem suja, queda de pelo, feridas e piloereção recebeu a nota 0. Animais cujo estado do pelo não estivesse totalmente saudável receberam notas intermediárias. Ambas as medidas foram expressas como diferença entre o estado

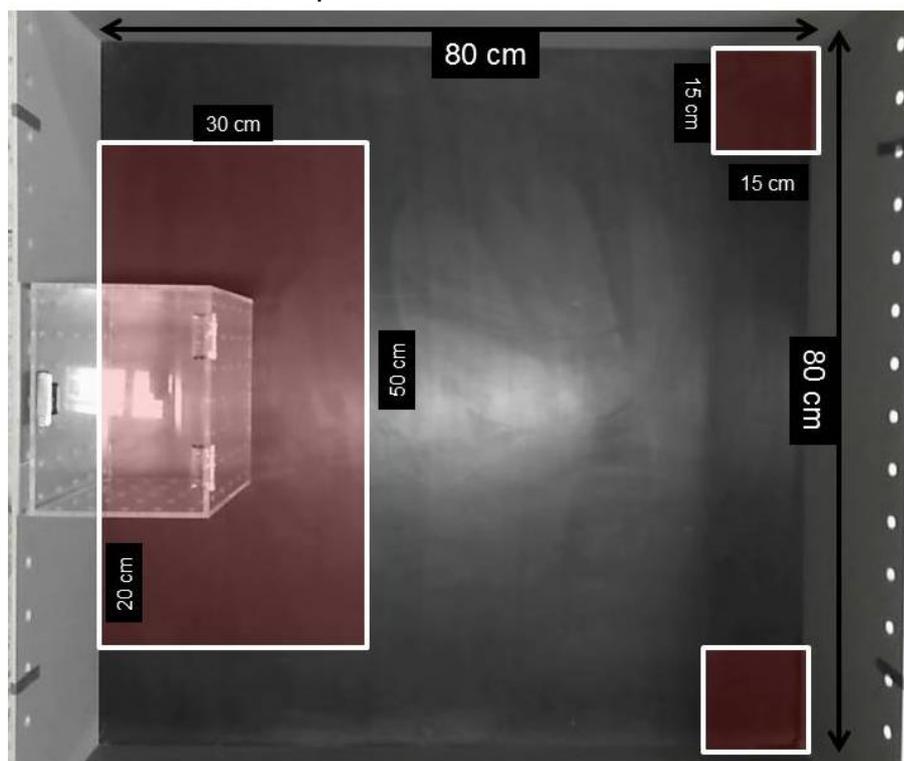
inicial (logo antes do primeiro encontro agressivo no EDS) e final (logo antes do TIS) dos animais (MORAIS-SILVA *et al.*, 2019).

3.4. TESTE DE INTERAÇÃO SOCIAL

Vinte e quatro horas após o último episódio de derrota, os intrusos foram identificados nos fenótipos (susceptível ou resiliente) por meio do TIS de acordo com estudo previamente realizado em nosso laboratório (MORAIS-SILVA *et al.*, 2019), baseado no descrito anteriormente por Golden e colaboradores (2011).

A arena de interação social (Figura 5) consiste em uma caixa opaca de acrílico de assoalho preto (80 x 80 x 25 cm), com uma caixa contensora transparente de acrílico (20 x 15 x 24 cm) centralizada em uma das paredes. A arena é dividida em uma zona de interação (faixa de 15 cm de largura próxima à caixa contensora) e duas zonas de afastamento (áreas mais afastadas da caixa contensora – medindo 15 x 15 cm).

Figura 5 - Aparato utilizado para o teste de interação social em ratos. As áreas destacadas em vermelho se referem às zonas de interação (próxima a caixa contensora) e afastamento, virtualmente demarcadas no programa de análise comportamental ANY-maze®.



Fonte: (MORAIS-SILVA *et al.*, 2019).

Os intrusos foram colocados no centro da arena voltados para o lado oposto da caixa contensora vazia por 150 segundos para avaliação da exploração basal (sessão sem alvo). Após esse tempo, o intruso foi retirado da arena e um residente foi colocado na caixa contensora. O intruso foi então novamente colocado na arena por mais 150 segundos para avaliação do comportamento de interação social (sessão com alvo). Foi avaliado o tempo gasto na zona de interação e nas zonas de afastamento por meio de uma câmera fixada ao teto conectada a um microcomputador para análise do comportamento pelo programa ANY-maze (Stoelting Co., Wood Dale, IL-EUA).

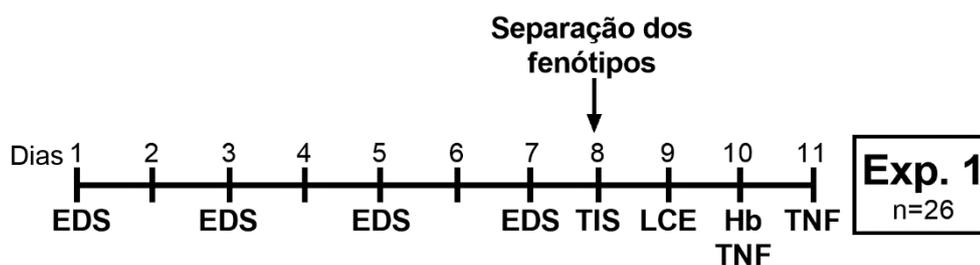
A razão de interação (RI) foi calculada como a razão entre o tempo gasto na zona de interação na fase com alvo pelo tempo gasto na zona de interação na fase sem alvo (equação 1), e utilizada para identificação dos fenótipos. Os animais estressados foram estatisticamente identificados em resilientes e susceptíveis com base no escore de interação por meio da análise de agrupamentos *k-means* (JAIN, 2010).

$$RI = \frac{\text{Tempo gasto na zona de interação com alvo}}{\text{Tempo gasto na zona de interação sem alvo}} \quad (1)$$

3.5. EXPERIMENTO 1: ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS RELACIONADAS À ANSIEDADE E DEPRESSÃO EM RATOS SUSCEPTÍVEIS E RESILIENTES AO ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL

Após a identificação dos fenótipos por meio do TIS, 26 ratos Wistar foram testados quanto aos comportamentos relacionados à ansiedade e depressão no LCE e no TNF, respectivamente (Figura 6).

Figura 6 - Protocolo experimental e número de animais utilizados no experimento 1. Após o período de estresse de derrota social e teste de interação social, os animais foram testados quanto aos comportamentos relacionados à ansiedade no labirinto em cruz elevado e comportamentos relacionados à depressão no teste do nado forçado. EDS, estresse de derrota social; TIS, teste de interação social; LCE, labirinto em cruz elevado; Hb TNF, habituação ao teste do nado forçado; TNF, teste do nado forçado; Exp, experimento.



Fonte: próprio autor, 2021.

3.5.1. Labirinto em cruz elevado

Os comportamentos relacionados à ansiedade foram avaliados por meio do LCE, 24 horas após o TIS.

O LCE consiste em 4 braços de dimensões iguais (50 x 10 cm) conectados por uma plataforma central (10 cm) elevados a 50 cm do solo, dois dos quais são fechados por paredes de 40 cm de altura. Os animais foram colocados individualmente no centro do labirinto com a cabeça voltada para um dos braços abertos e tiveram seu comportamento filmado por 5 minutos para análise por meio do programa de análise comportamental X-PlorRat (TEJADA; CHAIM; MORATO, 2017). Foram mensurados parâmetros espaço-temporais e complementares para avaliação dos comportamentos relacionados à ansiedade no LCE. Os parâmetros espaço-temporais convencionais avaliados foram o número de entradas nos braços fechados e a porcentagem de entradas e tempo gasto nos braços abertos. Os parâmetros complementares foram a frequência de mergulhos (movimento exploratório com a cabeça e ombros para fora das laterais do labirinto) e a frequência de esticadas (postura exploratória esticando o corpo para frente e retornando à posição original sem nenhuma locomoção para frente). Devido à importância da tigmotaxia na exploração do LCE, os parâmetros etológicos foram avaliados também de acordo com a área no labirinto em que ocorrerem, sendo os braços fechados e centro considerados áreas protegidas e os braços abertos áreas desprotegidas (MASCARENHAS; GOMES; NUNES-DE-SOUZA, 2013).

3.5.2. Teste do nado forçado

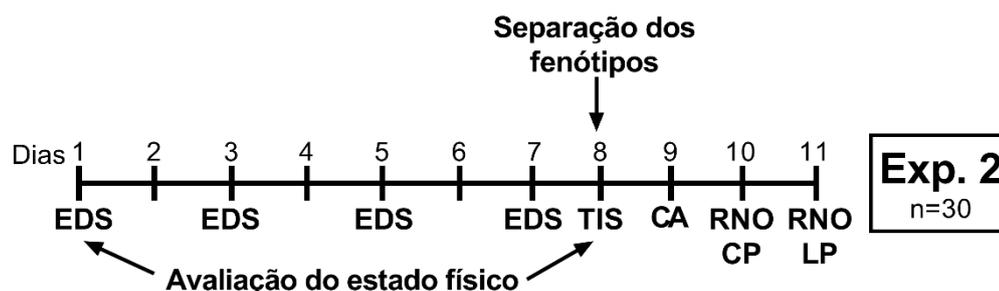
Os comportamentos relacionados à depressão foram avaliados no TNF, 24 horas após a avaliação dos comportamentos relacionados à ansiedade no LCE. Esse teste consistiu na exposição dos animais a um cilindro de 30 cm de diâmetro com água (40 cm de altura a 25 ± 1 °C) durante duas etapas: habituação e teste.

Na habituação, os animais foram expostos ao nado durante 15 minutos. Vinte e quatro horas depois, os animais foram reexpostos ao nado por 5 minutos e tiveram seu comportamento gravado para análise posterior utilizando o programa de análise comportamental X-PloRat. Foram avaliados o tempo de natação (movimentos horizontais ao longo do cilindro), escalada (movimento vertical de fuga nas paredes), imobilidade (ausência de atividade exceto a necessária para que o animal se mantenha boiando) e a latência até o primeiro episódio de imobilidade (YANKELEVITCH-YAHAV *et al.*, 2015).

3.6. EXPERIMENTO 2: MEMÓRIA EPISÓDICA E ATIVIDADE LOCOMOTORA EM RATOS SUSCEPTÍVEIS E RESILIENTES AO ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL

Após a identificação dos fenótipos por meio do TIS, 30 ratos Wistar foram testados quanto a atividade locomotora e memória episódica de curto e longo prazo no campo aberto (CA) e no teste de reconhecimento de novos objetos (RNO), respectivamente (Figura 7).

Figura 7 - Protocolo experimental e número de animais utilizados no experimento 2. Após o período de estresse de derrota social e teste de interação social, os animais foram testados quanto a atividade locomotora no campo aberto e memória episódica no teste de reconhecimento de objetos. EDS, estresse de derrota social; TIS, teste de interação social; CA, campo aberto; RNO CP, teste de reconhecimentos de objetos – curto prazo; RNO LP, teste de conhecimento de objetos – longo prazo; Exp, experimento.



Fonte: próprio autor, 2021.

3.6.1. Campo aberto

A atividade locomotora dos animais e os comportamentos relacionados à ansiedade foram avaliados no CA, 24 horas após o TIS. Este consiste em uma arena quadrada de assoalho preto (54 x 54 cm) envolto por paredes opacas (30 cm de altura), coberta por um teto acrílico transparente e dividida em uma área central (24 x 24 cm) e uma periférica. Os animais foram colocados no centro da arena e tiveram seu comportamento filmado por 5 minutos para análise da distância percorrida (em metros) no centro e periferia e tempo gasto no centro do aparato por meio do programa de análise comportamental ANY-Maze. Essa exposição ao CA também serviu como fase de habituação ao aparato necessária no RNO, descrito a seguir.

3.6.2. Teste de reconhecimento de novos objetos

O desempenho de aprendizagem e memória episódica dos animais foi avaliado por meio do RNO, adaptado de Carey e colaboradores (2009). O RNO se baseia na exploração espontânea do ambiente, com a premissa de que os animais naturalmente passam mais tempo explorando um objeto novo do que um familiar.

Inicialmente, os animais foram habituados ao CA, aparato onde foram realizados os testes. Vinte e quatro horas após foi iniciada a fase I. Nesta fase, os objetos A e A' (um par de garrafas de vidro retangulares vermelhas) foram centralizados nas extremidades do CA, a 10 cm de distância das paredes. Na fase II, realizada 10 minutos depois, o objeto A' foi substituído por uma garrafa de vidro arredondada transparente, o novo objeto, denominado objeto B. Nesta fase, foi avaliada a memória episódica de curto prazo. Na fase III, realizada 24 horas após a fase II, o objeto B foi novamente substituído por um novo objeto, uma garrafa hexagonal verde, denominado objeto C. Nessa fase foi possível avaliar a memória episódica de longo prazo. Dez minutos após o fim da fase III, os animais foram expostos aos objetos A, B e C simultaneamente para avaliação da preferência natural pelos objetos. Cada período de exploração dos objetos teve duração de 5 minutos.

Para cada fase, o tempo que os animais exploraram cada objeto foi registrado por meio do programa de análise comportamental ANY-maze. A exploração ao objeto

foi definida como o período em que o animal permaneceu em contato físico e visual com o objeto, com a cabeça em uma área de 2 cm no entorno do mesmo. Animais que apresentassem um tempo de interação com os objetos em qualquer uma das fases <10 segundos foram retirados da análise. Os dados foram apresentados como o índice de reconhecimento (IR) (equação 2).

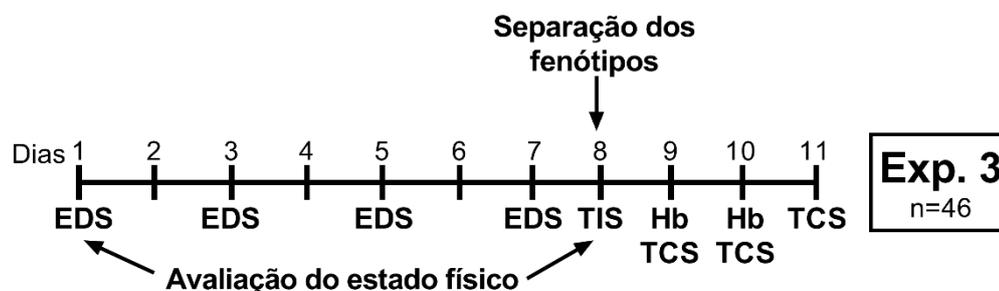
$$IR = \frac{\text{Tempo gasto explorando o objeto novo}}{\text{Tempo gasto explorando ambos os objetos}}$$

(2)

3.7. EXPERIMENTO 3: NÍVEIS DE AGRESSÃO E RESPOSTA DE SUBMISSÃO EM RATOS SUSCEPTÍVEIS E RESILIENTES AO ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL

Durante os episódios agressivos no protocolo de EDS, os intrusos foram avaliados quanto aos níveis de agressão sofridos e submissão em relação ao residente. Após a identificação dos fenótipos por meio do TIS, 46 ratos Wistar foram testados quanto a anedonia comportamental no teste de consumo de sacarose (TCS) (Figura 8).

Figura 8 - Protocolo experimental e número de animais utilizados no experimento 3. Após o período de estresse de derrota social e teste de interação social, os animais foram testados quanto a anedonia comportamental por meio do teste de consumo de sacarose. Durante os episódios de estresse de derrota social, foram analisados os níveis de agressão do residente e a postura de submissão dos intrusos após os ataques. EDS, estresse de derrota social; TIS, teste de interação social; Hb TCS, habituação ao teste de consumo de sacarose; TCS, teste de consumo de sacarose; Exp, experimento.



Fonte: próprio autor, 2021.

3.7.1. Interação não-agressiva

Especificamente no experimento 3, um grupo controle adicional, denominado interação não-agressiva (INA), foi utilizado nos experimentos. Essa adição visou avaliar se as alterações observadas nos animais expostos ao EDS estariam relacionadas a uma experiência social nova, e não ao estresse em si. Durante 7 dias (4 episódios intercalados por 48 horas de intervalo, assim como o EDS), os animais do grupo INA foram colocados em uma caixa-moradia com maravalha limpa para contato com ratos Long Evans não-agressivos durante 10 minutos. Dessa forma, os animais puderam interagir pelo mesmo período de tempo com outros animais desconhecidos da mesma linhagem dos residentes agressores, mas sem que essa interação resultasse em agressões. As sessões foram monitoradas para que caso ocorressem ataques os animais fossem excluídos do experimento.

3.7.2. Avaliação dos níveis de agressão e enfrentamento ao confronto social

As sessões de EDS foram gravadas para análise posterior utilizando o programa de análise comportamental X-Plo-Rat, para quantificação do número de vezes em que o intruso foi atacado pelo residente, a latência para sofrer o primeiro ataque, a latência para mostrar a postura de submissão (animal em posição supina por mais de 4 segundos) e o tempo de exploração social ao agressor (cheirar e interagir com o agressor exceto enquanto sofre os ataques). Os dados foram expressos como a média dos valores obtidos em cada uma das sessões de EDS.

3.7.3. Teste de consumo de sacarose

O TCS foi utilizado como teste para avaliação da anedonia comportamental. O teste teve início logo após o TIS, consistindo de duas fases: habituação e teste.

Na habituação, os animais foram isolados e 24 horas após expostos a dois bebedouros contendo sacarose na concentração de 1% (v/v) por mais 24 horas. Vinte e quatro horas após o fim da habituação os animais foram expostos novamente a dois bebedouros, desta vez contendo água. Vinte e quatro horas depois os animais foram testados quanto à preferência pela solução de sacarose: dois bebedouros foram

oferecidos aos animais, um contendo sacarose na concentração de 1% e outro contendo água. O consumo foi medido durante as 3 primeiras horas e nas 21 horas seguintes por meio da medida da massa dos bebedouros antes e depois da exposição aos animais. Após os primeiros 90 minutos da medida de consumo por 3 horas, a posição dos bebedouros na gaiola foi trocada para controle da preferência dos animais por um dos lados da gaiola. A quantidade de líquido perdida nos bebedouros por vazamento ou evaporação foi aferida por meio de bebedouros colocados em gaiolas vazias no mesmo momento que as soluções-teste foram oferecidas aos animais, cujo valor foi descontado da quantidade consumida pelos animais. Os valores de consumo de sacarose foram expressos em relação à massa do animal (g/kg) nas primeiras 3 horas e durante o período de 24 horas e em preferência pela solução de sacarose (equação 3). A quantidade total de líquido consumida também foi aferida e expressa em relação à massa do animal (g/kg).

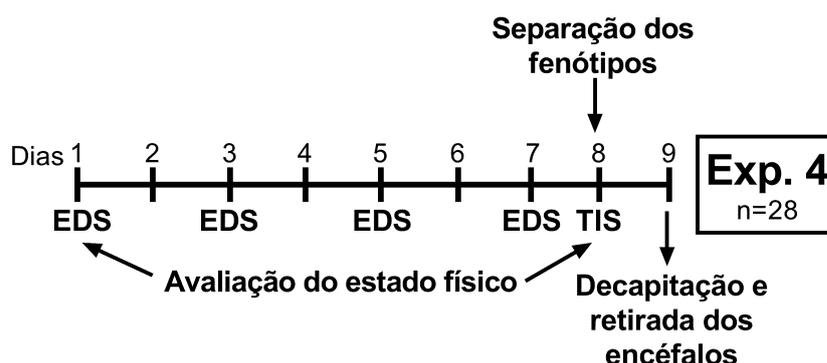
$$\text{Preferência pela sacarose (\%)} = \frac{\text{Quantidade total de sacarose consumida}}{\text{Quantidade total de líquidos consumida}} \times 100$$

(3)

3.8. EXPERIMENTO 4: QUANTIFICAÇÃO DO TROCADOR CISTINA-GLUTAMATO NO ENCÉFALO DE RATOS SUSCEPTÍVEIS E RESILIENTES AO ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL

Após a identificação dos fenótipos por meio do TIS, 28 ratos Wistar foram eutanasiados por decapitação e tiveram seus encéfalos retirados, congelados e armazenados em ultrafreezer (-80 °C) até à quantificação do trocador cistina-glutamato (xCT) por Western Blotting (Figura 9).

Figura 9 - Protocolo experimental e número de animais utilizados no experimento 4. Após o período de estresse de derrota social e teste de interação social, os animais foram eutanasiados por decapitação e tiveram os encéfalos retirados para quantificação do trocador cistina-glutamato por *western blotting* em diversas regiões encefálicas. EDS, estresse de derrota social; TIS, teste de interação social; Exp., experimento.



Fonte: próprio autor, 2021.

3.8.1. Retirada dos encéfalos e dissecação das áreas encefálicas

Vinte e quatro horas após o TIS, os animais foram decapitados em guilhotina e tiveram seus encéfalos rapidamente retirados da caixa craniana, congelados em isopentano sobre gelo seco (-70 °C) e armazenados em ultrafreezer (-80 °C) até a dissecação das áreas de interesse. Amostras de cerca de 1 mm de espessura do CPFm, Acb e HpcV foram dissecadas utilizando uma agulha de ponta chata com diâmetro variável de acordo com a região de interesse, em criostato a -20 °C, de acordo com o atlas de coordenadas estereotáxicas de Paxinos e Watson (2005), disponíveis na tabela 1.

Tabela 1 - Coordenadas estereotáxicas utilizadas como referência para retirada das amostras para as regiões de interesse para quantificação do trocador cistina-glutamato. As coordenadas foram obtidas do atlas de coordenadas estereotáxicas de ratos de Paxinos e Watson (2005).

Região de interesse	Abreviatura	Distância do Bregma	Diâmetro da agulha
Córtex pré-frontal medial	CPFm	+3,24 mm	2,00 mm
Núcleo acumbens	Acb	+2,52 mm	2,00 mm
Hipocampo ventral	HpcV	-4,68 mm	2,00 mm

Fonte: próprio autor, 2021.

3.8.2. Quantificação do trocador cistina-glutamato por Western blotting

O protocolo foi realizado de acordo com o protocolo previamente descrito (MORAIS-SILVA; ALVES; MARIN, 2016). Após a dissecação, as amostras foram

homogeneizadas por meio de ondas de ultrassom em solução de dodecil sulfato de sódio (no inglês, *sodium dodecyl sulfate* – SDS) em uma concentração de 1% e o conteúdo de proteínas determinado por meio do kit *Bio-Rad DC protein assay* (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA-EUA), baseado no método de *Lowry*. Quarenta microgramas de proteína de cada amostra foram fervidos em uma solução contendo 5% de β -mercaptoetanol e 0,002% de azul de bromofenol por 5 minutos. As amostras foram então submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida por 45 minutos à 200V por meio do sistema *Bio-Rad Mini-PROTEAN tetra cell* (Bio-Rad Laboratories Inc.) e transferidas para membranas de polivinilideno de baixa fluorescência (LF-PVDF) por meio do sistema *Trans-Blot Turbo* (Bio-Rad Laboratories Inc.).

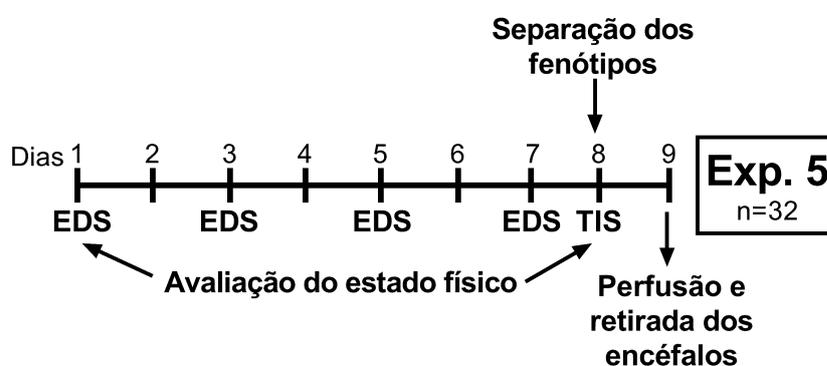
Para marcação da proteína de interesse, as membranas foram incubadas em solução bloqueadora contendo 5% de leite desnatado em tampão T-TBS (0,05% de tween-20 em tampão tris-salina – do inglês *tween-tris buffered saline*) à temperatura ambiente por 1 hora. Após o bloqueio, as membranas foram lavadas (3x de 5 minutos em T-TBS) e incubadas durante a noite a 4 °C com o anticorpo primário produzido em coelhos reativo para a proteína xCT diluído em T-TBS (diluição 1:1000, cat. No. ab37185, Abcam Inc., Cambridge, MA-EUA, 35 kDa). As membranas foram então lavadas novamente (3x de 5 minutos em T-TBS) e incubadas por 1 hora à temperatura ambiente com o anticorpo secundário anti-IgG de coelhos produzido em cabras conjugado com o fluoróforo Cy3 diluído em T-TBS (diluição 1:1000, GE Healthcare, Little Chalfont, BUX-ING). Após a incubação com o anticorpo secundário, as membranas foram lavadas (3 x de 5 minutos em T-TBS) e secas protegidas da luz à temperatura ambiente. A fluorescência das bandas foi quantificada em membranas secas de forma automatizada utilizando o leitor G:BOX (Syngene, Synoptics Ltda., Frederick, MD-EUA) e quantificadas pelo software *GeneTools* (Syngene, Synoptics Ltda.).

A quantidade de xCT foi expressa como % em relação ao grupo controle, e o conteúdo total de proteína nas membranas foi quantificado por meio da coloração com Azul de Coomassie 0,1% para controle de carga nos géis.

3.9. EXPERIMENTO 5: QUANTIFICAÇÃO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO DELTAFOSB NO ENCÉFALO DE RATOS SUSCEPTÍVEIS E RESILIENTES AO ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL

Após a identificação dos fenótipos por meio do TIS, 32 ratos Wistar foram perfundidos e tiveram seus encéfalos retirados para posterior quantificação do número de células positivas para o fator de transcrição DeltaFosB por imunofluorescência (Figura 10).

Figura 10 - Protocolo experimental e número de animais utilizados no experimento 5. Após o período de estresse de derrota social e teste de interação social, os animais foram eutanasiados por aprofundamento anestésico seguido de perfusão e tiveram os encéfalos retirados para quantificação do número de células positivas para o fator de transcrição DeltaFosB por imunofluorescência em diversas regiões encefálicas. EDS, estresse de derrota social; TIS, teste de interação social; Exp., experimento.



Fonte: próprio autor, 2021.

3.9.1. Perfusão, retirada dos encéfalos e dissecação das áreas encefálicas

Os animais foram anestesiados com uretana (2,5 g/kg, 0,5 mL/100 g) e perfundidos transcárdiacamente com tampão fosfato de sódio (no inglês, *phosphate buffered saline*, PBS) 0,1 M, pH 7,4 em temperatura ambiente seguido de paraformaldeído 4% gelado. Os encéfalos foram então retirados da caixa craniana, mantidos por 24 horas em paraformaldeído a 4 °C e transferidos para sacarose 30% em PBS por mais 48 h a 4 °C. Os encéfalos foram então armazenados a -80°C até a dissecação das áreas encefálicas. Fatias coronais (30 µm) do CPFm, córtex orbitofrontal (COF), Acb, caudado-putamen (CPu), córtex insular (Ins), Hpc dorsal (HpcD), Amígdala (Ami), hipotálamo lateral (HL), hipotálamo ventromedial (HVM) e MCP foram cortadas em criostato (-20 °C) de acordo com as coordenadas estereotáxicas do atlas de Paxinos e Watson (2005), disponíveis na Tabela 2.

Tabela 2 - Coordenadas estereotáxicas utilizadas como referência para obtenção dos cortes das regiões de interesse para quantificação do fator de transcrição DeltaFosB. As coordenadas foram obtidas do atlas de coordenadas estereotáxicas de ratos de Paxinos e Watson (2005).

Região de interesse	Abreviatura	Sub-regiões	Distância do Bregma
Córtex pré-frontal medial	CPFm	Cingulado (Cg)	+3,24 mm
		Pré-límbico (PrL)	
		Infralímbico (IL)	
Córtex orbitofrontal	COF	Ventral (VO)	+3,24 mm
		Lateral (LO)	
Núcleo acumbens	Acb	Centro (AcbC)	+2,28 mm
		Concha (AcbCh)	
Caudado-putamen	CPu	-	+2,28 mm
Córtex insular	Ins	Agranular (AIns)	+2,28 mm
		Desgranular (DIns)	
		Granular (GIns)	
Hipocampo dorsal	HpcD	<i>Cornus ammonis</i> 1 (CA1)	-2,52 mm
		Giro denteado (GD)	
Amígdala	Ami	Basolateral (BLA)	-2,52 mm
		Central (CeA)	
		Medial (MeA)	
Hipotálamo lateral	HL	-	-2,52 mm
Hipotálamo ventromedial	HVM	Dorsal (HVMD)	-2,52 mm
		Ventrolateral (HVMVL)	
Matéria cinzenta periaquedutal	MCP	Dorsomedial (MCPDM)	-6,72 mm
		Dorsolateral (MCPDL)	
		Lateral (MCPL)	
		Ventrolateral (MCPVL)	

Fonte: próprio autor, 2021.

3.9.2. Quantificação das células positivas para DeltaFosB por imunofluorescência

As fatias de interesse foram lavadas (3x de 10 minutos) em PBS e então incubadas em solução bloqueadora (PBS 0,01M + Triton X-100 0,2% + BSA 3% + Soro Equino 5%) por 1 hora. As fatias foram então incubadas durante a noite a 4 °C com o anticorpo primário produzido em coelhos reativo para a proteína

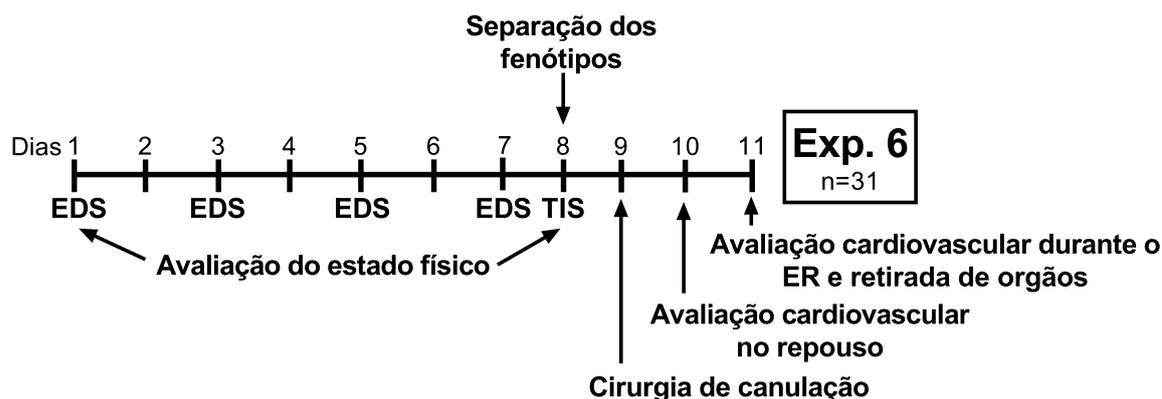
FosB/DeltaFosB (diluição 1:200, cat. No. 102: sc-48, Santa Cruz Biotechnology Inc. Santa Cruz, CA-USA) diluído em solução bloqueadora. Após lavagem com PBS (6x de 5 minutos) as fatias foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com fluoróforo Alexa Fluor 488 (diluição 1:1000, cat. No. A11008, Life Technologies Co., Eugene, OR-USA). As fatias foram novamente lavadas em PBS (6x de 5 minutos) e montadas em lâmina silanizada.

Imagens das regiões de interesse foram capturadas com o auxílio de uma objetiva de 20x utilizando microscópio de fluorescência acoplado a câmera digital (Axio Imager.D2, Carl Zeiss Microscopy, LLC, Thornwood, NY-USA) e microcomputador para posterior quantificação do número de células positivas para DeltaFosB. Para quantificação, o background das imagens foi subtraído manualmente com base no histograma de intensidade de cor com auxílio do programa Zen Pro 2.0 (Carl Zeiss Microscopy, LLC) para melhor visualização das células positivas. O mesmo critério foi aplicado para todas as imagens por um experimentador cego à identificação das fatias. As células foram então contadas automaticamente pela ferramenta de identificação de partículas do software ImageJ 1.48 (National Institutes of Health, Bethesda, MD-USA). Os parâmetros para identificação das células positivas no programa foram previamente padronizados (tamanho: 12-98 μm ; circularidade: 0,50-1,00).

3.10. EXPERIMENTO 6: ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES EM RATOS SUSCEPTÍVEIS E RESILIENTES AO ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL

Vinte e quatro horas após a identificação dos fenótipos por meio do TIS, 31 animais foram submetidos à cirurgia para implante de cânulas na veia e artéria femoral para registro dos parâmetros cardiovasculares durante o repouso, avaliação da atividade barorreflexa e resposta cardiovascular ao estresse de restrição (ER) (Figura 11).

Figura 11 - Protocolo experimental e número de animais utilizados no experimento de avaliação dos parâmetros cardiovasculares em ratos susceptíveis e resilientes ao estresse de derrota social. Após o período de estresse de derrota social e teste de interação social, os animais foram submetidos a cirurgia de canulação da artéria e veia femorais para avaliação dos parâmetros cardiovasculares no repouso e durante o estresse de restrição. EDS, estresse de derrota social; TIS, teste de interação social; ER, estresse de restrição.



Fonte: próprio autor, 2021.

3.10.1. Canulação da artéria e veia femorais

Os animais foram anestesiados com tribromoetanol (250 mg/kg, 1 mL/kg i.p.) para implante de dois cateteres: um cateter na artéria femoral para registro dos parâmetros cardiovasculares e outro na veia femoral para infusão de fármacos, os quais foram exteriorizados na região dorsal do animal e fixados à pele por sutura cirúrgica. Os animais foram mantidos em caixas individuais após a cirurgia e mantidos na sala de experimentação para habituação, sob as mesmas condições em que eram mantidos no biotério. Como medida profilática, após a cirurgia os animais receberam pentabiótico veterinário (80.000 UI, 0,2 mL i.m., Zoetis Ltda, Campinas, SP-Brasil) e flunixinina meglumina (2,5 mg/kg, 0,1 mL/100 g s.c., Chemitec Agro-Veterinária Ltda, São Paulo, SP-Brasil).

3.10.2. Registro da pressão arterial e frequência cardíaca durante o repouso

Vinte e quatro horas após a canulação, os animais foram conectados a um transdutor de pressão (DPT100, Utah Medical Products Inc., Midvale, UT-EUA) por meio do cateter implantado na artéria femoral. A pressão arterial pulsátil (PAP) foi então registrada por 60 minutos utilizando um amplificador (Bridge Amp ML221, ADInstruments, Dunedin, OTA-NZ), conectado a um sistema de aquisição de dados computadorizado (PowerLab 4/30 ML866, ADInstruments), por meio do software LabChart PRO (ADInstruments). Os valores de pressão arterial média (PAM), sistólica

(PAS) e diastólica (PAD), bem como a frequência cardíaca (FC), foram obtidos a partir dos sinais da PAP.

3.10.3. Análise espectral da variabilidade da frequência cardíaca

A variabilidade da FC (VFC) e a modulação autonômica sobre o coração foram avaliadas por meio da análise espectral do intervalo de pulso (IP) (DUARTE; PLANETA; CRESTANI, 2015) utilizando o software Cardioseries v2.6.2 (Daniel Penteadó Martins Dias, Departamento de Fisiologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, SP-Brasil). Para tanto, séries temporais do intervalo de pulso foram extraídas do registro de 60 minutos da PAP. A VFC foi calculada através da variância global dessa série no domínio do tempo. O tônus autônomo sobre o coração foi avaliado por meio do poder dos componentes oscilatórios nas bandas de baixa frequência (BF, 0,20–0,75 Hz) e alta frequência (AF, 0,75–3,0 Hz) da análise espectral no domínio da frequência, obtidos por meio da transformada rápida de Fourier. O tônus vagal também foi avaliado por meio da raiz quadrada da média das diferenças entre IP consecutivos (do inglês, RMSSD, *Root Mean Square of the Successive Differences*).

3.10.4. Avaliação da sensibilidade e efetividade barorreflexa

A sensibilidade barorreflexa foi avaliada de duas maneiras: a sensibilidade barorreflexa espontânea, obtida através da análise das flutuações espontâneas de PA e IP e a sensibilidade frente a um estímulo farmacológico de alteração da pressão arterial (PARATI; RIENZO; DI; MANCIA, 2000).

Para análise da sensibilidade barorreflexa espontânea pelo método da sequência, valores de PAS e IP obtidos durante os 60 minutos de registro da PA e FC foram analisados batimento a batimento para identificação de sequências consecutivas em que quatro ou mais valores de aumento da PAS foram associados ao alongamento do IP (sequências para cima) ou em que diminuições da PAS foram associadas com o encurtamento do IP (sequências para baixo). Somente sequências de PAS e IP com coeficiente de correlação $< 0,8$ foram consideradas como sequência barorreflexa. A sensibilidade da atividade barorreflexa espontânea foi avaliada pela inclinação da regressão linear entre a PAS e o IP (ms/mmHg) e a efetividade avaliada

pelo índice de efetividade do barorreflexo, definido pela razão entre o número de sequências barorreflexas e o número total de sequências de aumentos consecutivos da PAS.

A sensibilidade barorreflexa frente a um estímulo foi analisada por meio da infusão endovenosa dos agentes vasoativos fenilefrina (50 µg/mL infundida a 0,32 mL/min/kg) e nitroprussiato de sódio (70 µg/mL infundido a 0,8 mL/min/kg), 60 minutos após o registro de PA e FC. Curvas sigmóides foram traçadas utilizando a correlação entre a variação da PAM e a resposta reflexa de FC, cuja análise consistiu de cinco parâmetros (COSTA-FERREIRA *et al.*, 2016):

- 1) platô mínimo da FC (P1, bpm);
- 2) platô máximo da FC (P2, bpm);
- 3) variação da FC (ΔP , diferença entre P1 e P2);
- 4) pressão arterial média 50 (PA50, valor de PAM que promove 50% de variação na FC)
- 5) ganho (G, bpm/mmHg, inclinação da porção linear da curva)

3.10.5. Registro dos parâmetros cardiovasculares durante o estresse de restrição

Vinte e quatro horas após o registro da FC e PA durante o repouso, os animais foram novamente conectados ao transdutor de pressão para avaliação da resposta cardiovascular ao ER (GOMES-DE-SOUZA *et al.*, 2016).

Inicialmente os animais permaneceram em suas caixa-moradia por 10 minutos para registro da PAM e FC basais, após os quais foram introduzidos em tubos cilíndricos plásticos (6,5 x 15 cm, ventilados por buracos de ½ polegada que preencham aproximadamente 20% do tubo) a fim de impedir a livre movimentação dos animais por 30 minutos. Foram analisados os valores de variação da PAM e FC em relação à média do período de registro basal (10 minutos iniciais fora do tubo).

Imediatamente antes da introdução dos animais no tubo, 15, 30 e 90 minutos após foram capturadas imagens térmicas com o auxílio de um termovisor (IRI4010, InfraRed Integrated Systems Ltd., Northampton, NTH-ING) da cauda dos animais para registro da temperatura cutânea por meio do software IRISYS (InfraRed Integrated Systems Ltd.). Para a análise das imagens, a medida de temperatura foi realizada em cinco pontos da cauda do animal, e a média foi calculada para cada registro.

3.10.6. Quantificação de corticosterona plasmática

A corticosterona plasmática foi quantificada no repouso e em resposta a exposição ao ER. Para quantificação da corticosterona plasmática durante o repouso, 200 µl de sangue foram retirados pela cânula implantada na artéria femoral durante a primeira hora após as luzes da sala de experimentação serem acessas. Para quantificação da resposta ao ER, 200 µl de sangue foram coletados antes do início do ER e ao fim dos 30 minutos, logo antes da retirada dos animais do tubo. As amostras foram coletadas em tubos plásticos heparinizados [5 µl de heparina (5000 UI/mL)] (Hepamax-S®, Blausiegel, Cotia, SP-Brasil), centrifugadas à 2000 g por 10 minutos à 4 °C e o plasma armazenado à -80 °C até a utilização. As concentrações plasmáticas de corticosterona foram estimadas usando um ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês, enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) de acordo com as instruções do fabricante (Item No. 501320, Cayman Chemical, Ann Harbor, MI-EUA). As amostras foram previamente diluídas (1:250) em tampão fornecido pelo kit antes da quantificação.

3.10.7. Retirada e pesagem de órgãos

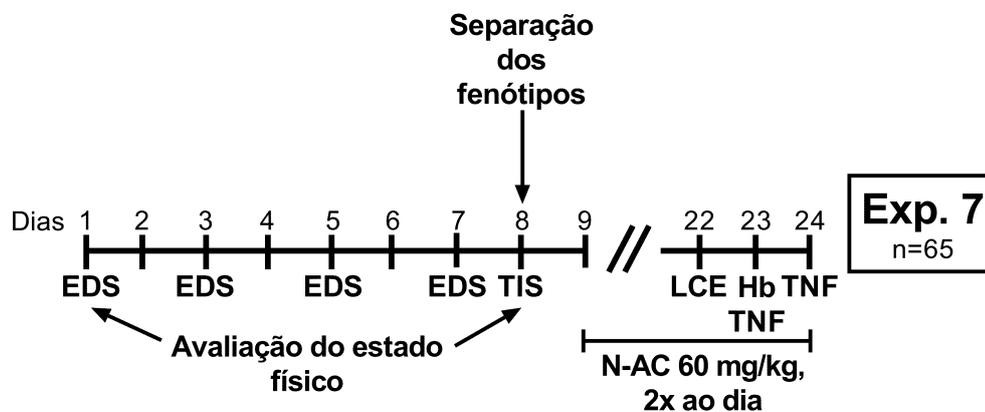
Ao fim dos experimentos, os animais foram eutanasiados com uma overdose de uretana (2,5 g/kg, 1 mL/100g, i.p.) e decapitados. As glândulas adrenais, rins, baço, coração e timo foram removidos, dissecados para limpeza de tecido conjuntivo e gordura e pesados ainda úmidos em balança de precisão. O peso dos órgãos foi expresso como peso absoluto (g) e em relação ao peso corporal dos animais (g/kg de peso corporal).

3.11. EXPERIMENTO 7: EFEITO DO TRATAMENTO COM A N-ACETILCISTEÍNA NAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS RELACIONADAS À ANSIEDADE E DEPRESSÃO EM RATOS SUSCEPTÍVEIS E RESILIENTES AO ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL

Vinte e quatro horas após o TIS, os animais foram aleatoriamente alocados em algum dos grupos de tratamento, num total de 6 grupos: controle/veículo,

resiliente/veículo, susceptível/veículo, controle/N-AC 60 mg/kg, resiliente/N-AC 60 mg/kg e susceptível/N-AC 60 mg/kg. Os animais receberam, por 16 dias, N-AC intraperitonealmente, na dose de 60 mg/kg. O tratamento foi administrado duas vezes ao dia, com um intervalo de 8 horas entre cada administração. Nos últimos 3 dias de tratamento, 4 horas após a primeira administração do fármaco, os animais foram testados quanto aos comportamentos relacionados à ansiedade no LCE e depressão no TNF (Figura 12). A frequência de tratamento e doses foi baseada em publicações anteriores (MORAIS-SILVA; ALVES; MARIN, 2016) e dados não publicados do laboratório.

Figura 12 - Protocolo experimental e número de animais utilizados no experimento 7. Após o período de estresse de derrota social e teste de interação social, os animais foram tratados com a N-Acetilcisteína (60 mg/kg), duas vezes ao dia por 16 dias, e testados quanto aos comportamentos relacionados à ansiedade no labirinto em cruz elevado e comportamentos relacionados à depressão no teste do nado forçado. EDS, estresse de derrota social; TIS, teste de interação social; LCE, labirinto em cruz elevado; Hb TNF, habituação ao teste do nado forçado; TNF, teste do nado forçado; N-AC, n-acetilcisteína; Exp, experimento.



Fonte: próprio autor, 2021.

3.11.1. N-acetilcisteína

N-acetilcisteína (N-AC) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO-EUA) foi diluída em tampão fosfato salino (no inglês, *phosphate buffered saline*, PBS) na concentração de 60 mg/mL e administrada intraperitonealmente em um volume de 0,1 mL/100 g de peso corporal. A administração de PBS foi utilizada como controle. Após a diluição, o pH da solução de N-AC foi ajustado para 7,4.

3.11.2. Labirinto em cruz elevado

O LCE foi realizado de maneira idêntica ao descrito no item 3.5.1.

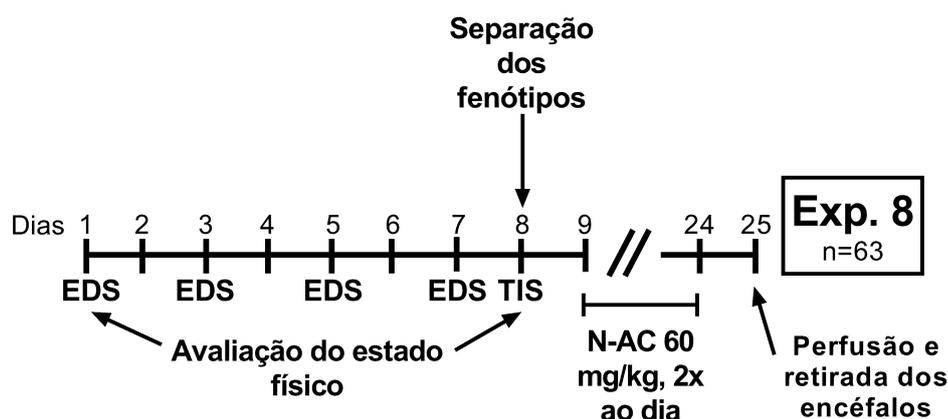
3.11.3. Teste do nado forçado

O TNF foi realizado de maneira idêntica ao descrito no item 3.5.2.

3.12. EXPERIMENTO 8: EFEITO DO TRATAMENTO COM A N-ACETILCISTEÍNA NAS ALTERAÇÕES MOLECULARES RELACIONADAS AO FATOR DE TRANSCRIÇÃO DELTAFOSB NO ENCÉFALO DE RATOS SUSCEPTÍVEIS E RESILIENTES AO ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL

Vinte e quatro horas após o TIS, os animais foram aleatoriamente alocados em algum dos grupos de tratamento, num total de 6 grupos: controle/veículo, resiliente/veículo, susceptível/veículo, controle/N-AC 60 mg/kg, resiliente/N-AC 60 mg/kg e susceptível/N-AC 60 mg/kg. Os animais receberam, por 16 dias, N-AC intraperitonealmente, na dose de 60 mg/kg. O tratamento foi administrado duas vezes ao dia, com um intervalo de 8 horas entre cada administração. Dezoito horas após a última administração de N-AC, os animais foram perfundidos e os encéfalos processados para quantificação das células positivas para DeltaFosB por imunofluorescência (Figura 13). A frequência de tratamento e doses foram baseadas em publicações anteriores (MORAIS-SILVA; ALVES; MARIN, 2016) e dados não publicados do laboratório.

Figura 13 - Protocolo experimental e número de animais utilizados no experimento 8. Após o período de estresse de derrota social e teste de interação social, os animais foram tratados com a N-Acetilcisteína (60 mg/kg), duas vezes ao dia por 16 dias. Vinte e quatro horas após o último tratamento, os animais foram eutanasiados por aprofundamento anestésico seguido de perfusão e tiveram os encéfalos retirados para quantificação do número de células positivas para o fator de transcrição DeltaFosB por imunofluorescência em diversas regiões encefálicas. EDS, estresse de derrota social; TIS, teste de interação social; N-AC, n-acetilcisteína; Exp., experimento.



Fonte: próprio autor, 2021.

3.12.1. Perfusão, retirada dos encéfalos e dissecação das áreas encefálicas

A perfusão, retirada dos encéfalos e dissecação das áreas encefálicas foram realizadas de maneira idêntica ao descrito no item 3.9.1. Fatias coronais (30 μm) do CPFm, COF, Acb, Ami e HpcD, foram cortadas em criostato (-20 °C) de acordo com as coordenadas estereotáxicas do atlas de Paxinos e Watson (2005), disponíveis na tabela 2.

3.12.2. Quantificação das células positivas para DeltaFosB por imunofluorescência

A quantificação das células positivas para DeltaFosB foi realizada de maneira idêntica ao descrito no item 3.9.2.

3.13. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi feita utilizando-se o software Statistica 7.1 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK-EUA) e os gráficos no software GraphPad Prism 7 (GraphPad software Inc., La Jolla, CA-EUA). Todos os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM).

A identificação dos fenótipos resiliente e susceptível foi feita por meio da análise de agrupamentos *K-means* (JAIN, 2010) da razão de interação dos animais intrusos

no EDS. Por meio dessa análise, os dados foram classificados em dois agrupamentos, de modo a obter agrupamentos com a maior distância entre as suas médias cujos valores dentro de cada agrupamento sejam o mais próximo possível entre si. O agrupamento gerado com menor média da razão de interação foi considerado susceptível e o outro, resiliente.

Os dados foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA). De acordo com a especificidade de cada teste, foi realizada uma ANOVA de uma via, medidas repetidas, duas vias ou três vias. Nos casos em que a ANOVA mostrou efeito significativo ($p \leq 0,05$), o teste *post hoc* de Newman-Keuls foi realizado.

4. RESULTADOS

4.1. EXPERIMENTO 1: ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS RELACIONADAS À ANSIEDADE E DEPRESSÃO EM RATOS SUSCEPTÍVEIS E RESILIENTES AO ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL

4.1.1. Identificação dos fenótipos de enfrentamento ao estresse de derrota social e avaliação da interação social

Após o TIS, 44% dos animais foram classificados como resilientes no experimento 1. Os resultados mostram ainda que os animais susceptíveis apresentam evitação social, caracterizada por menor razão de interação e diminuição do tempo permanecido na zona de interação com o alvo social presente (Figura 14).

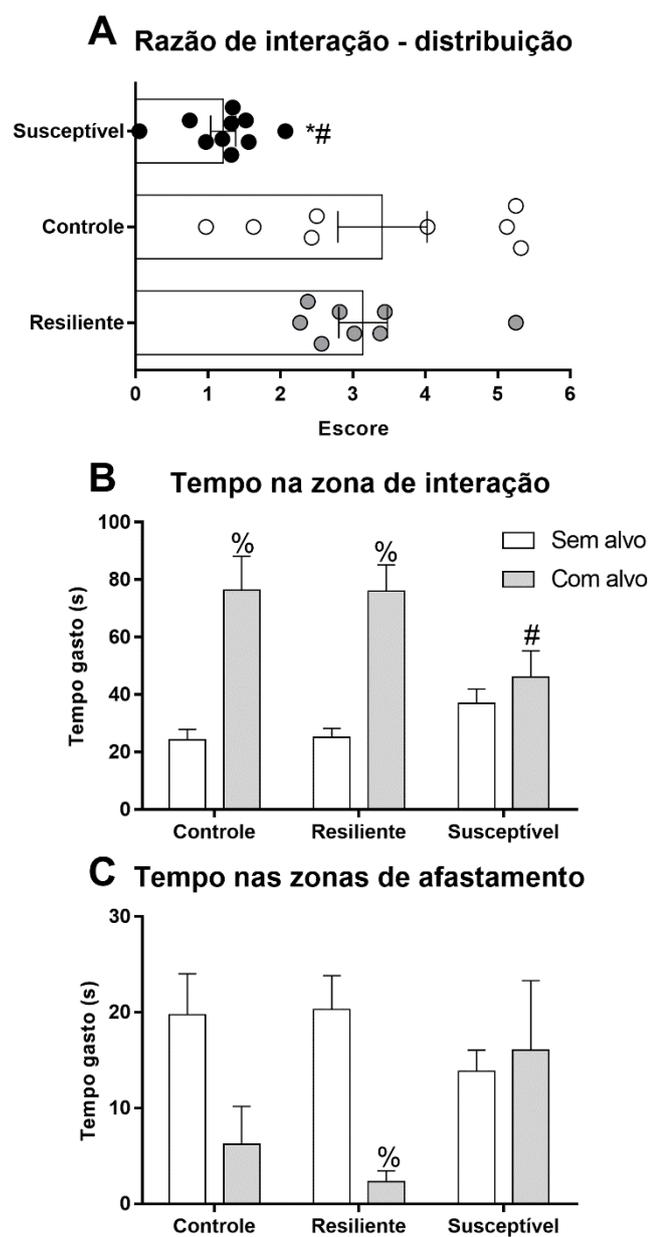
A ANOVA de uma via da razão de interação (Figura 14A) mostrou efeito significativo do fator fenótipo ($F_{2,23} = 10,06$; $p < 0,001$). O teste *post hoc* de Newman-Keuls mostrou uma menor razão de interação dos animais susceptíveis em relação ao grupo controle (Controle = $3,4 \pm 0,62$ x Susceptível = $1,2 \pm 0,17$; $p < 0,01$) e resiliente (Resiliente = $3,1 \pm 0,34$ x Susceptível = $1,2 \pm 0,17$; $p < 0,01$).

O tempo de permanência na zona de interação (Figura 14B) foi diferente entre os fenótipos. A ANOVA de medidas repetidas mostrou efeito significativo do fator sessão ($F_{1,23} = 61,05$; $p < 0,001$) e da interação entre a sessão e fenótipo ($F_{2,23} = 9,38$; $p < 0,01$). Houve um aumento no tempo de permanência na zona de interação quando o alvo estava presente nos grupos controle (Sem alvo = $24,2 \pm 3,7$ x Com alvo = $76,4 \pm 11,8$; $p < 0,001$) e resiliente (Sem alvo = $25,0 \pm 3,2$ x Com alvo = $76,1 \pm 9,0$; $p < 0,001$), enquanto os animais do grupo susceptível permaneceram a mesma quantidade de tempo independente da presença do alvo (Sem alvo = $37,0 \pm 5,0$ x Com alvo = $46,1 \pm 9,1$; $p > 0,05$). Além disso, o tempo gasto na zona de interação com alvo presente foi menor no grupo susceptível em relação ao grupo resiliente (Resiliente $76,1 \pm 9,0$ x Susceptível = $46,1 \pm 9,1$; $p < 0,05$), enquanto houve uma tendência de significância quando comparado com o grupo controle (Controle = $76,4 \pm 11,8$ x Susceptível = $46,1 \pm 9,1$; $p = 0,07$).

Em relação ao tempo nas zonas de afastamento (Figura 14C), a ANOVA de medidas repetidas mostrou efeito significativo do fator sessão ($F_{1,23} = 10,38$; $p < 0,01$)

e da interação entre a sessão e o fenótipo ($F_{2,23} = 4,34$; $p < 0,05$). O teste *post hoc* de Newman-Keuls mostrou uma diminuição do tempo gasto nas zonas de afastamento quando o alvo está presente no grupo resiliente (Sem alvo = $20,3 \pm 3,5$ x Com alvo = $2,4 \pm 1,1$; $p < 0,05$) e uma tendência no grupo controle (Sem alvo = $19,7 \pm 4,3$ x Com alvo = $6,2 \pm 4,0$; $p = 0,07$).

Figura 14 - Razão de interação e tempo de permanência nas zonas delimitadas no teste de interação social dos fenótipos susceptível e resiliente ao estresse de derrota social no experimento 1. Os animais foram testados 24 horas após o último episódio de estresse. A, distribuição da razão de interação; B, tempo de permanência (em segundos) na zona de interação; C, tempo de permanência (em segundos) nas zonas de afastamento. As barras representam a média + EPM (n = 8-10 animais/grupo). *, $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle; #, $p < 0,05$ em relação ao grupo Resiliente; %, $p < 0,05$ em relação ao tempo gasto durante a sessão sem alvo do respectivo grupo.



Fonte: próprio autor, 2021.

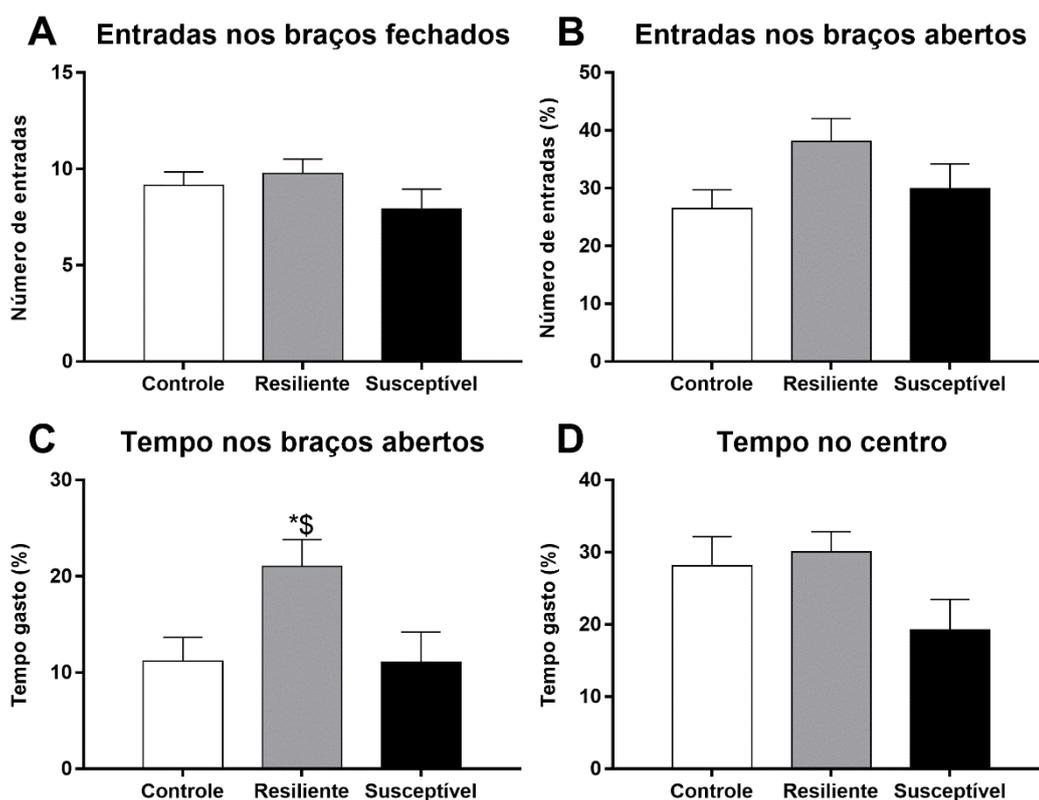
4.1.2. Avaliação dos comportamentos relacionados à ansiedade no labirinto em cruz elevado

Após o EDS e o TIS, o LCE mostrou uma diminuição da ansiedade nos animais do grupo resiliente (Figuras 15 e 16).

Em relação às medidas espaço-temporais (Figura 15), a ANOVA de uma via não mostrou efeito significativo ($p > 0,05$) para as variáveis entradas nos braços fechados (Figura 15A), percentual de entradas nos braços abertos (Figura 15B) e

tempo gasto no centro (Figura 15D). Em relação ao percentual de tempo gasto nos braços abertos (Figura 15C), a ANOVA de uma via mostrou efeito significativo do fator fenótipo ($F_{2,23} = 3,77$; $p < 0,05$), com o grupo resiliente permanecendo mais tempo nos braços abertos quando comparado com os grupos controle (Controle = $11 \pm 2,5$ x Resiliente = $21 \pm 2,8$; $p < 0,05$) e susceptível (Susceptível = $11 \pm 3,1$ x Resiliente = $21 \pm 2,8$; $p < 0,05$).

Figura 15 - Comportamentos relacionados à ansiedade no labirinto em cruz elevado nos fenótipos susceptível e resiliente de ratos submetidos ao estresse de derrota social no experimento 1 – medidas espaço-temporais. Os animais foram testados 24 horas após o teste de interação social. A, número de entradas nos braços fechados. B, percentual do número entradas nos braços abertos. C, percentual do tempo gasto nos braços abertos. D, percentual de tempo gasto no centro. As barras representam a média + EPM ($n = 8-10$ animais/grupo). *, $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle; \$, $p < 0,05$ em relação ao grupo Resiliente.

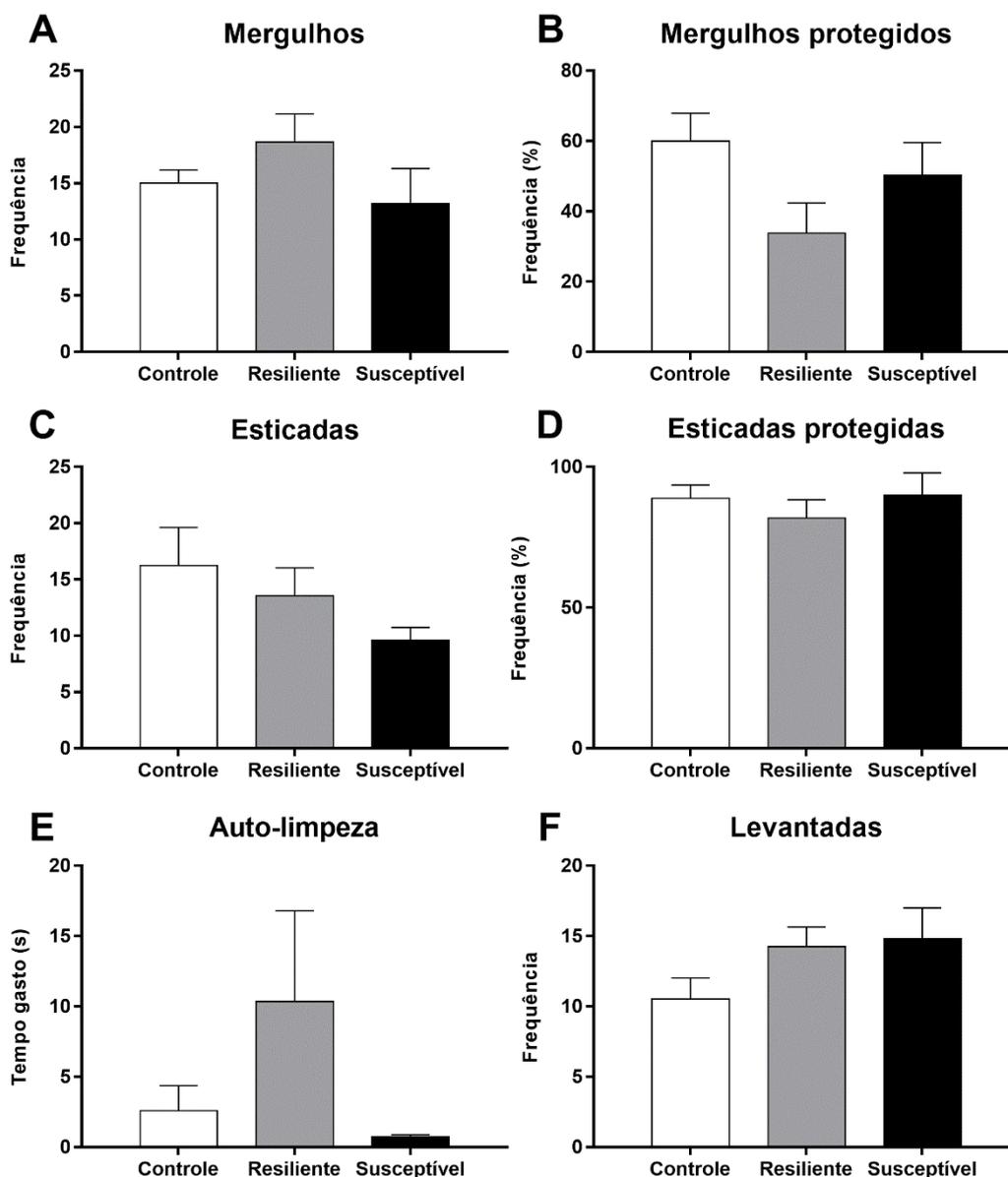


Fonte: próprio autor, 2021.

Não foram encontradas alterações significativas ($p > 0,05$) em nenhum dos parâmetros etológicos avaliados no LCE (Figura 16).

Figura 16 - Comportamentos relacionados à ansiedade no labirinto em cruz elevado nos fenótipos susceptível e resiliente de ratos submetidos ao estresse de derrota

social no experimento 1 – medidas complementares. Os animais foram testados 24 horas após o teste de interação social. A, número de mergulhos; B, percentual de mergulhos realizados na zona protegida; C, número de esticadas; D, percentual de esticadas realizadas na zona protegida; E, tempo gasto no comportamento de autolimpeza; F, número de levantadas. As barras representam a média + EPM (n = 8-10 animais/grupo).



Fonte: próprio autor, 2021.

4.1.3. Avaliação dos comportamentos relacionados à depressão no teste do nado forçado

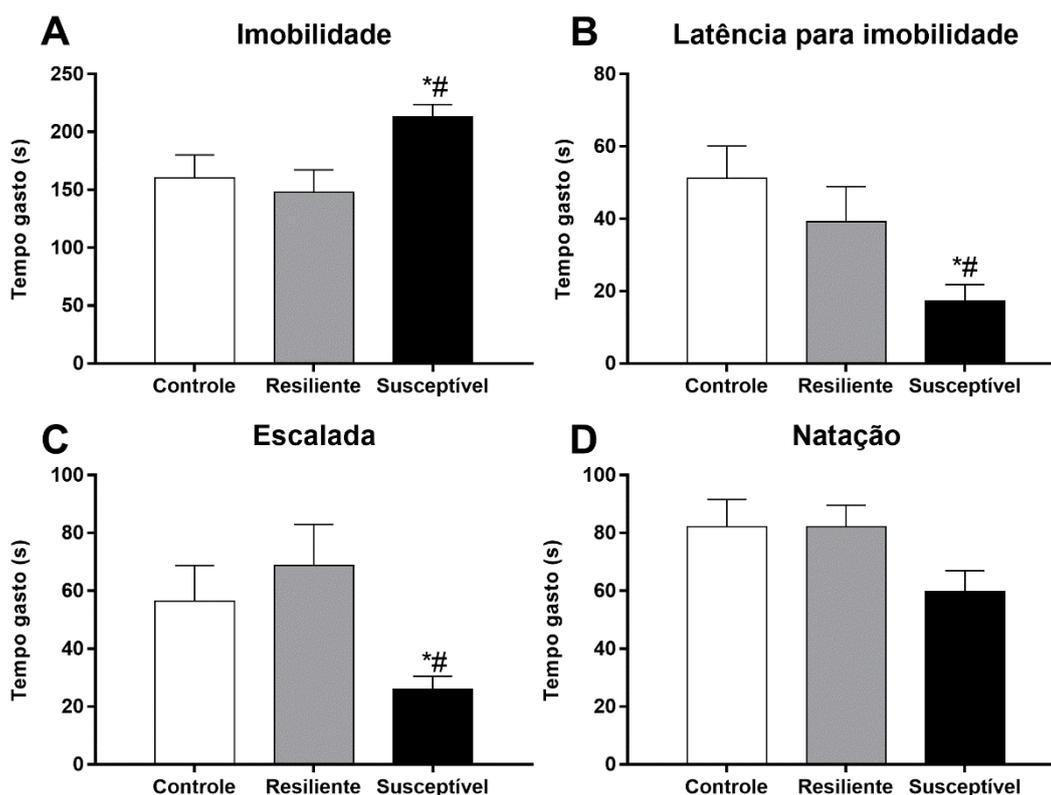
Apenas os animais susceptíveis apresentaram aumento dos comportamentos relacionados à depressão no TNF (Figura 17).

A ANOVA de uma via mostrou efeito significativo do fator fenótipo em relação ao tempo de imobilidade ($F_{2,23} = 4,68$; $p < 0,05$), sendo que os animais susceptíveis ao EDS apresentaram aumento do tempo de imobilidade em relação aos animais do grupo controle (Controle = $160,1 \pm 20,0$ x Susceptível = $212,8 \pm 10,8$; $p < 0,05$) e resiliente (Resiliente = $147,7 \pm 19,4$ x Susceptível = $212,8 \pm 10,8$; $p < 0,05$) (Figura 17A). De maneira semelhante, houve um efeito significativo do fator fenótipo em relação ao tempo de latência para o primeiro episódio de imobilidade ($F_{2,23} = 5,34$; $p < 0,05$), sendo que os animais susceptíveis ao EDS apresentaram aumento do tempo de imobilidade em relação aos animais do grupo controle (Controle = $51,2 \pm 8,9$ x Susceptível = $17,3 \pm 4,5$; $p < 0,05$) e resiliente (Resiliente = $39,2 \pm 9,7$ x Susceptível = $17,3 \pm 4,5$; $p = 0,05$) (Figura 17B).

A Figura 17C mostra o tempo de escalada dos animais no TNF. A ANOVA de uma via mostrou efeito significativo do fator fenótipo ($F_{2,23} = 4,69$; $p < 0,05$). Os animais do grupo susceptível permaneceram menos tempo escalando as paredes do aparato quando comparados com os animais do grupo controle (Controle = $56,4 \pm 12,3$ x Susceptível = $26,0 \pm 4,5$; $p < 0,05$) e resiliente (Resiliente = $68,7 \pm 14,3$ x Susceptível = $26,0 \pm 4,5$; $p < 0,05$).

Não foram encontradas alterações significativas em relação ao tempo de natação (Figura 17D) dos animais, apesar de uma tendência de efeito do fator fenótipo ($F_{2,23} = 2,77$; $p = 0,08$).

Figura 17 - Comportamentos relacionados à depressão no teste do nado forçado nos fenótipos susceptível e resiliente de ratos submetidos ao estresse de derrota social no experimento 1. Os animais foram testados 72 horas após o teste de interação social. A, tempo gasto no comportamento de imobilidade; B, latência para primeiro episódio de imobilidade; C, tempo gasto no comportamento de escalada; D, tempo gasto no comportamento de natação. As barras representam a média + EPM do tempo gasto em cada comportamento ($n = 8-10$ animais/grupo). *, $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle; #, $p < 0,05$ em relação ao grupo resiliente.



Fonte: próprio autor, 2021.

4.2. EXPERIMENTO 2: MEMÓRIA EPISÓDICA E ATIVIDADE LOCOMOTORA EM RATOS SUSCEPTÍVEIS E RESILIENTES AO ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL

4.2.1. Identificação dos fenótipos de enfrentamento ao estresse de derrota social e avaliação da interação social

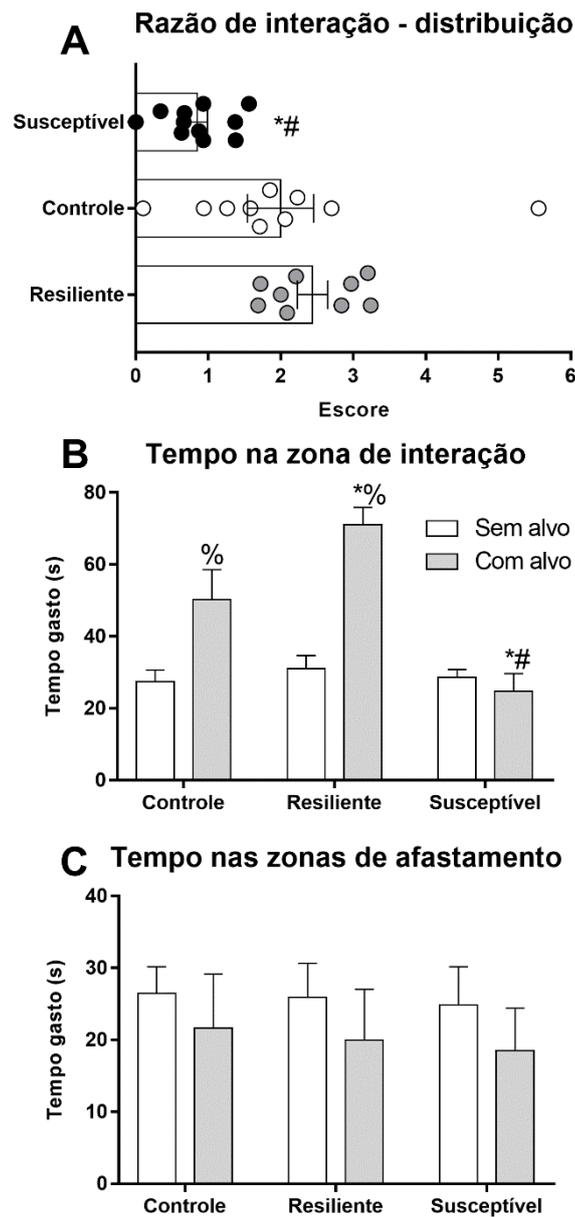
Após o TIS, 45% dos animais expostos ao EDS no experimento 2 foram classificados como resilientes. A ANOVA de uma via da RI (Figura 18A) mostrou efeito significativo do fator fenótipo ($F_{2,27} = 7,73$; $p < 0,01$). O teste *post hoc* de Newman-Keuls mostrou uma menor RI dos animais susceptíveis em relação ao grupo controle (Controle = $2,0 \pm 0,46$ x Susceptível = $0,8 \pm 0,14$; $p < 0,01$) e resiliente (Resiliente = $2,4 \pm 0,21$ x Susceptível = $0,8 \pm 0,14$; $p < 0,01$).

O tempo de permanência na zona de interação foi diferente entre os fenótipos (Figura 18B). A ANOVA de medidas repetidas mostrou efeito significativo dos fatores fenótipo ($F_{2,27} = 9,67$; $p < 0,001$), sessão ($F_{1,27} = 732,86$; $p < 0,001$) e da interação

entre esses dois fatores ($F_{2,27} = 14,07$; $p < 0,001$). A análise *post hoc* revelou um aumento no tempo gasto na zona de interação quando o alvo estava presente nos grupos controle (Sem alvo = $27,3 \pm 3,3$ x Com alvo = $50,2 \pm 8,3$; $p < 0,01$) e resiliente (Sem alvo = $31,0 \pm 3,7$ x Com alvo = $71,1 \pm 4,8$; $p < 0,001$), enquanto os animais do grupo susceptível permaneceram a mesma quantidade de tempo independente da presença do alvo. O grupo susceptível permaneceu menos tempo na zona de interação com o alvo presente quando comparado com o tempo de permanência dos grupos controle (Controle = $50,2 \pm 8,3$ x Susceptível = $18,5 \pm 5,9$; $p < 0,05$) e resiliente (Resiliente = $71,1 \pm 4,8$ x Susceptível = $18,5 \pm 5,9$; $p < 0,001$). Os animais do grupo resiliente também permaneceram mais tempo na zona de interação em relação ao grupo controle (Controle = $50,2 \pm 8,3$; Resiliente = $71,1 \pm 4,8$, $p < 0,05$).

Não foram encontradas alterações significativas em relação ao tempo gasto nas zonas de afastamento entre os grupos experimentais (Figura 18C).

Figura 18 - Razão de interação e tempo de permanência nas zonas delimitadas no teste de interação social dos fenótipos susceptível e resiliente ao estresse de derrota social no experimento 2. Os animais foram testados 24 horas após o último episódio de estresse. A, distribuição da razão de interação; B, tempo de permanência (em segundos) na zona de interação; C, tempo de permanência (em segundos) nas zonas de afastamento. As barras representam a média + EPM ($n = 9-11$ animais/grupo). *, $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle; #, $p < 0,05$ em relação ao grupo Resiliente; %, $p < 0,05$ em relação ao tempo gasto durante a sessão sem alvo do respectivo grupo.



Fonte: próprio autor, 2021.

4.2.2. Avaliação do estado físico

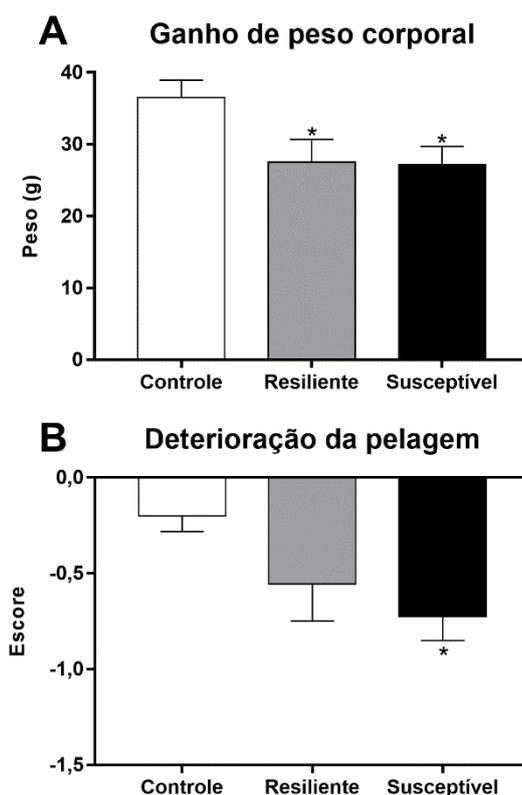
O estado físico dos animais foi alterado pela exposição ao EDS (Figura 19). Tanto os animais susceptíveis quanto resilientes ao EDS apresentaram diminuição do peso corporal, enquanto apenas os animais susceptíveis apresentaram aumento da deterioração da pelagem durante o período de exposição ao estresse.

A ANOVA de uma via do ganho de peso corporal (Figura 19A) mostrou efeito significativo do fator fenótipo ($F_{2,27} = 3,87$; $p < 0,05$). O teste *post hoc* de Newman-

Keuls revelou que ambos os fenótipos (susceptível e resiliente) ganharam menos peso no decorrer do experimento em relação ao grupo controle (Controle = $36,5 \pm 2,4$ x Resiliente = $27,6 \pm 3,1$; $p < 0,05$; x Susceptível = $27,2 \pm 2,5$; $p = 0,05$).

Os animais susceptíveis ao EDS apresentaram maior deterioração da pelagem (Figura 19B) em relação ao grupo controle. A ANOVA de uma via mostrou efeito significativo do fator fenótipo ($F_{2,27} = 4,03$; $p < 0,05$), sendo a diferença do escore do estado da pelagem do grupo susceptível menor quando comparado com o grupo controle (Controle = $-0,20 \pm 0,08$ x Susceptível = $-0,73 \pm 0,12$; $p < 0,05$).

Figura 19 - Estado físico dos fenótipos susceptível e resiliente ao estresse de derrota social no experimento 2. A avaliação do peso corporal e estado da pelagem foi feita logo antes do primeiro episódio de derrota social e logo antes do teste de interação social, 24 horas após o último episódio de derrota social. A, ganho de peso corporal (em gramas), avaliado pela diferença do peso corporal entre a última e a primeira avaliação; B, deterioração da pelagem, avaliada pela diferença do escore de estado do pelo entre a última e primeira avaliação. As barras representam a média + EPM (n = 9-11 animais/grupo). *, $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle.



Fonte: próprio autor, 2021.

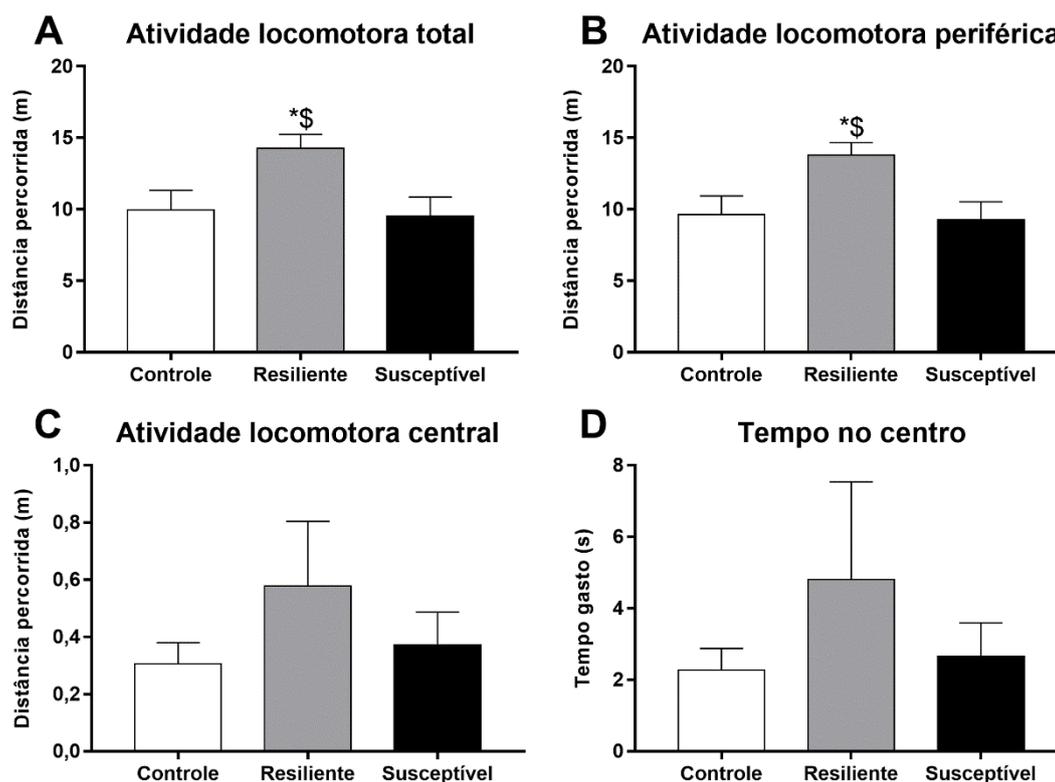
4.2.3. Avaliação da atividade locomotora e comportamentos relacionados à ansiedade no campo aberto

Os animais resilientes ao EDS mostraram um aumento da atividade locomotora total no CA (Figura 20A). A ANOVA de uma via revelou efeito do fator fenótipo ($F_{2,27} = 4,08$; $p < 0,05$). O teste *post hoc* de Newman-Keuls mostrou que o grupo resiliente apresentou um aumento na atividade locomotora em relação aos animais controle (Controle = $10,0 \pm 1,4$ x Resiliente = $14,3 \pm 1,0$; $p < 0,05$) e susceptível (Resiliente = $14,3 \pm 1,0$ x Susceptível = $9,5 \pm 1,3$; $p < 0,05$).

De modo semelhante, a ANOVA de uma via mostrou efeito significativo do fator fenótipo ($F_{2,27} = 4,30$; $p < 0,05$) para a atividade locomotora periférica (Figura 20B). O teste *post hoc* de Newman-Keuls mostrou que o grupo resiliente apresentou um aumento na atividade locomotora periférica em relação aos animais controle (Controle = $9,6 \pm 1,3$ x Resiliente = $13,8 \pm 0,9$; $p < 0,05$) e susceptível (Resiliente = $13,8 \pm 0,9$ x Susceptível = $9,3 \pm 1,3$; $p < 0,05$).

Não foram encontradas diferenças significativas em relação à distância percorrida no centro do aparato (Figura 20C) e porcentagem de tempo gasto no centro do aparato (Figura 20D).

Figura 20 - Atividade locomotora e comportamentos relacionados à ansiedade no campo aberto em animais susceptíveis e resilientes ao estresse de derrota social no experimento 2. O teste do campo aberto foi realizado 24 horas após o teste de interação social. A, atividade locomotora total (em metros); B, atividade locomotora na periferia do aparato (em metros); C, atividade locomotora no centro do aparato (em metros); D, tempo gasto no centro do aparato (em segundos). As barras representam a média + EPM ($n = 9-11$ animais/grupo). *, $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle; \$, $p < 0,05$ em relação ao grupo Susceptível.



Fonte: próprio autor, 2021.

4.2.4. Avaliação da memória episódica de curto e longo duração no teste de reconhecimento de objetos

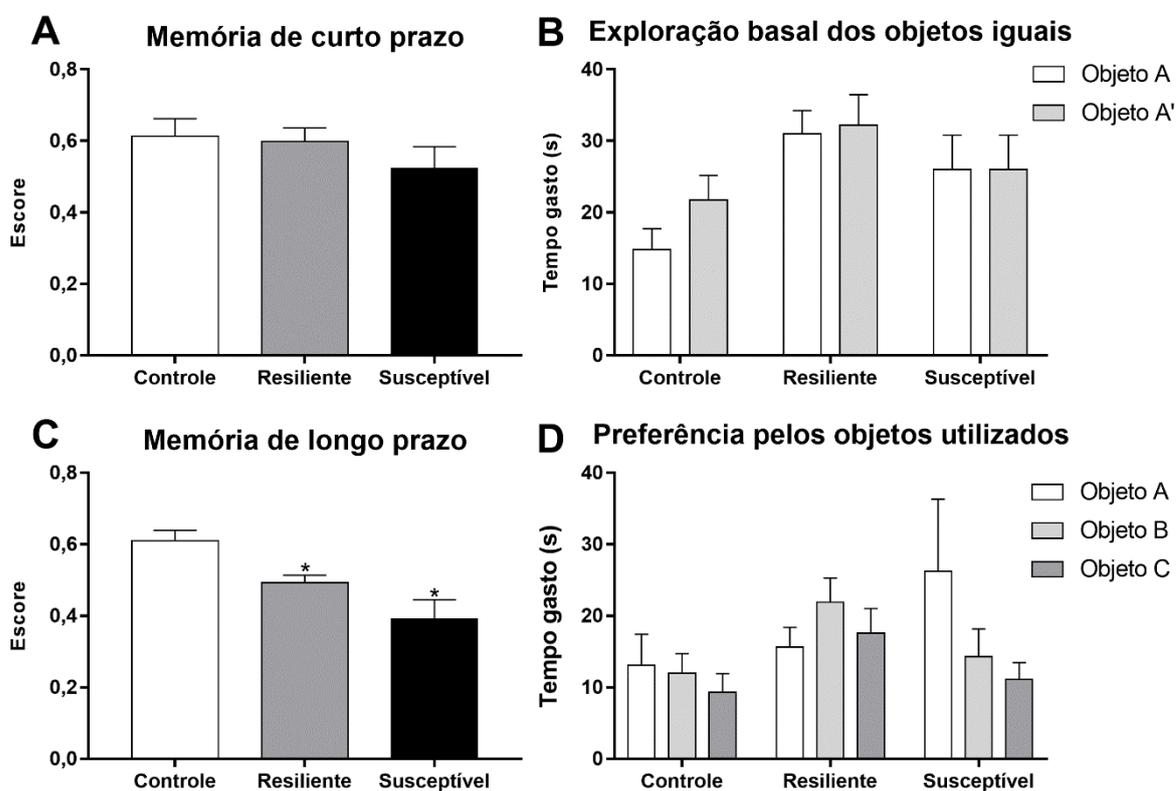
A exposição ao EDS afetou a memória episódica de longo prazo, mas não a de curto prazo, em ambos os fenótipos susceptível e resiliente ao EDS (Figura 21).

Não foram encontradas diferenças significativas quanto a memória episódica de curto prazo em ambos os fenótipos (Figura 21A), assim como não houve diferença na exploração entre os objetos iguais quando posicionados dos lados direito ou esquerdo do aparato (Figura 21B).

Ambos os fenótipos mostraram prejuízo em relação à memória de longo prazo (Figura 21C). A ANOVA de uma via mostrou efeito significativo do fator fenótipo ($F_{2,23} = 8,11$; $p < 0,01$) no IR. O teste *post hoc* de Newman-Keuls mostrou uma diminuição do IR nos grupos resiliente (Controle = $0,61 \pm 0,03$ x Resiliente = $0,49 \pm 0,02$; $p < 0,05$) e susceptível (Controle = $0,61 \pm 0,03$ x Susceptível = $0,39 \pm 0,05$; $p < 0,001$) em relação ao grupo controle. Houve também uma tendência de diminuição do IR no grupo susceptível em relação ao grupo resiliente (Resiliente = $0,49 \pm 0,02$ x Susceptível = $0,39 \pm 0,05$; $p = 0,07$).

Não foram encontradas diferenças significativas em relação à preferência pelos objetos, quando todos eram familiares aos animais (Figura 21D).

Figura 21 - Memória episódica de curto e longo prazo em animais susceptíveis e resiliente ao estresse de derrota social no experimento 2. A memória de curto prazo foi avaliada 10 minutos após o reconhecimento inicial dos objetos, enquanto a memória de longo prazo foi avaliada 24 horas após. A, índice de reconhecimento dos objetos na avaliação da memória de curto prazo; B, exploração basal dos objetos iguais (em segundos); C, índice de reconhecimento dos objetos na avaliação da memória de longo prazo; D, tempo de exploração (em segundos) dos três objetos quando oferecidos ao mesmo tempo para os animais. As barras representam a média + EPM (n = 8-10 animais/grupo). *, $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle.



Fonte: próprio autor, 2021.

4.3. EXPERIMENTO 3: NÍVEIS DE AGRESSÃO E RESPOSTA DE SUBMISSÃO EM RATOS SUSCEPTÍVEIS E RESILIENTES AO ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL

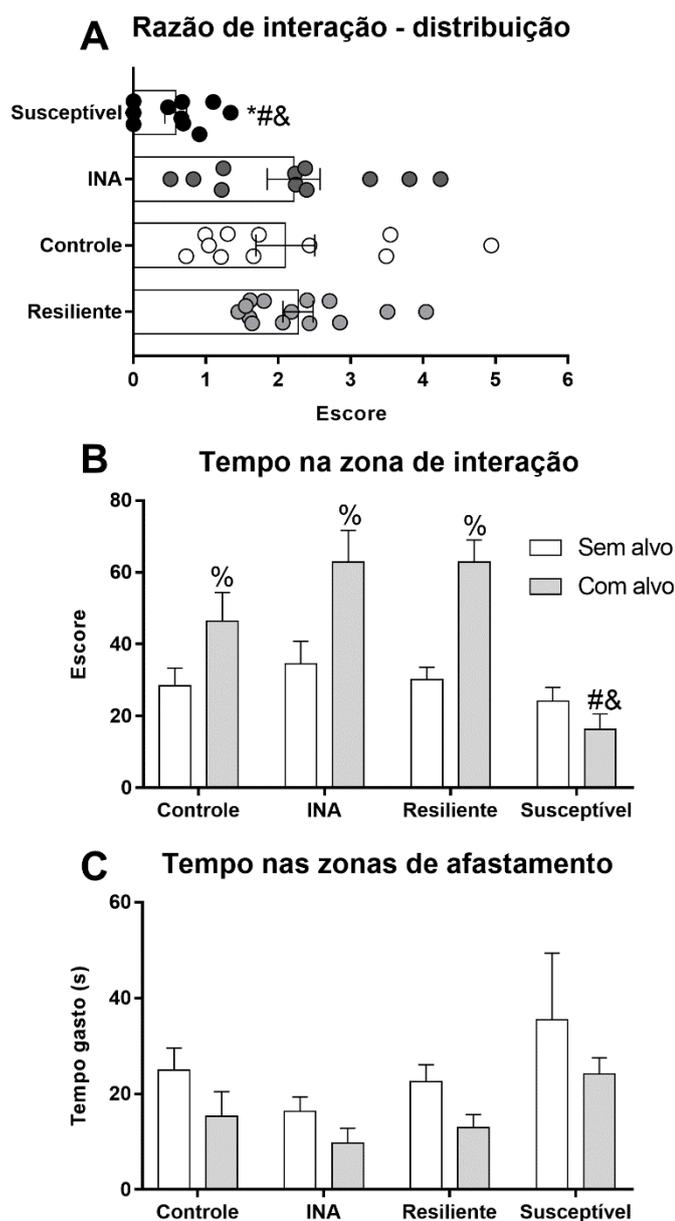
4.3.1. Identificação dos fenótipos de enfrentamento ao estresse de derrota social e avaliação da interação social

No experimento 3, 58% dos animais expostos ao EDS foram considerados resilientes por meio do TIS. A ANOVA de uma via da RI no experimento 3 (Figura 22A), mostrou efeito significativo do fator fenótipo ($F_{3,42} = 6,76$; $p < 0,001$). O teste *post hoc* de Newman-Keuls mostrou menor RI dos animais susceptíveis em relação ao grupo controle (Controle = $2,1 \pm 0,4$ x Susceptível = $0,6 \pm 0,1$; $p < 0,005$), INA (INA = $2,2 \pm 0,3$ x Susceptível = $0,6 \pm 0,1$; $p < 0,01$) e resiliente (Resiliente = $2,3 \pm 0,2$ x Susceptível = $0,6 \pm 0,1$; $p < 0,01$).

A ANOVA de medidas repetidas mostrou efeito do fator fenótipo ($F_{3,42} = 5,71$; $p < 0,01$), sessão ($F_{1,42} = 35,89$; $p < 0,001$) e para a interação entre esses fatores ($F_{3,42} = 9,00$; $p < 0,001$) no tempo gasto na zona de interação. O teste *post hoc* de Newman-Keuls mostrou que houve aumento do tempo gasto na zona de interação quando o alvo social estava presente em relação ao tempo gasto nessa mesma zona quando o alvo social estava ausente nos grupos controle (Sem alvo = $28,4 \pm 4,7$ x Com alvo = $46,3 \pm 7,6$; $p < 0,05$), INA (Sem alvo = $34,5 \pm 6,1$ x Com alvo = $62,9 \pm 8,4$; $p < 0,001$) e resiliente (Sem alvo = $30,2 \pm 3,4$ x Com alvo = $62,8 \pm 6,2$; $p < 0,001$). Por outro lado, houve uma diminuição no tempo gasto na zona de interação na sessão com o alvo no grupo susceptível quando comparado ao INA (Susceptível = $16,3 \pm 4,3$ x INA = $62,9 \pm 8,4$; $p < 0,01$) e resiliente (Susceptível = $16,3 \pm 4,3$ x Resiliente = $62,8 \pm 6,2$; $p < 0,01$) (Figura 22B).

Nenhum efeito significativo foi encontrado em relação ao tempo gasto nas zonas de afastamento nas sessões com alvo e sem alvo ($p > 0,05$ em todos os fatores) (Figura 22C).

Figura 22 - Razão de interação e tempo de permanência nas zonas delimitadas no teste de interação social dos fenótipos susceptível e resiliente ao estresse de derrota social no experimento 3. Os animais foram testados 24 horas após o último episódio de estresse. A, distribuição da razão de interação; B, tempo de permanência (em segundos) na zona de interação; C, tempo de permanência (em segundos) nas zonas de afastamento. As barras representam a média + EPM ($n = 10-14$ animais/grupo). *, $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle; #, $p < 0,05$ em relação ao grupo Resiliente; &, $p < 0,05$ em relação ao grupo INA (interação não-agressiva); %, $p < 0,05$ em relação ao tempo gasto durante a sessão sem alvo do respectivo grupo.



Fonte: próprio autor, 2021.

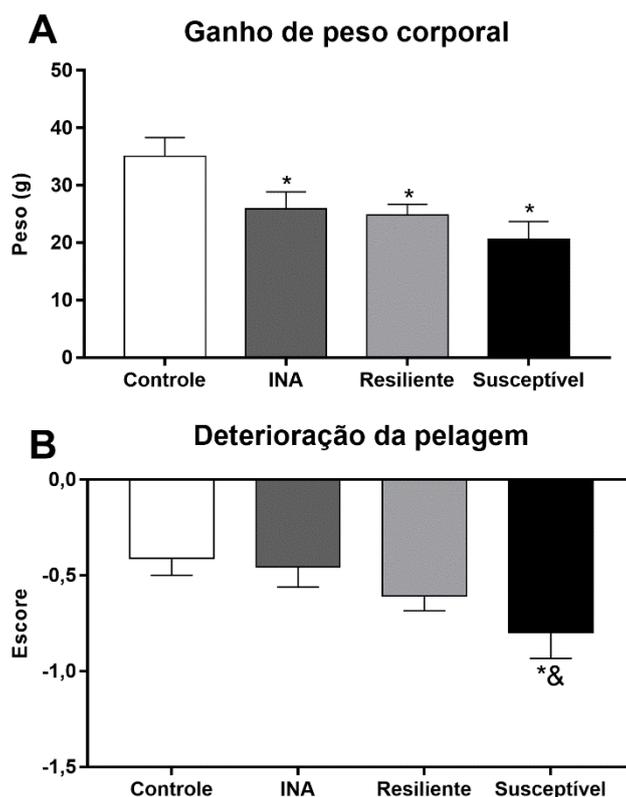
4.3.2. Avaliação do estado físico

A exposição ao EDS diminuiu o ganho de peso corporal de todos os animais estressados, enquanto os animais susceptíveis apresentaram uma maior deterioração da pelagem. A ANOVA de uma via mostrou efeito significativo do fator fenótipo ($F_{3,42} = 4,17$, $p < 0,05$) no ganho de peso dos animais (Figura 23A). A análise *post hoc* mostrou que, em relação ao grupo controle, os grupos INA (Controle = $35,1 \pm 3,4$ x INA = $26,0 \pm 3,1$; $p < 0,05$), resiliente (Controle = $35,1 \pm 3,4$ x Resiliente = $24,8 \pm 2,0$;

$p < 0,05$) e susceptível (Controle = $35,1 \pm 3,4$ x Susceptível = $21,0 \pm 3,4$; $p < 0,05$) apresentaram menor ganho de peso.

A ANOVA de uma via mostrou efeito significativo do fator fenótipo ($F_{3,42} = 2,84$, $p < 0,05$) na deterioração da pelagem dos animais. A análise *post hoc* mostrou que o grupo susceptível apresentou maior deterioração da pelagem quando comparado aos grupos controle (Controle = $-0,4 \pm 0,1$ x Susceptível = $-0,8 \pm 0,1$; $p < 0,05$) e INA (INA = $-0,4 \pm 0,1$ x Susceptível = $-0,8 \pm 0,1$; $p < 0,1$) (Figura 23B).

Figura 23 - Estado físico dos fenótipos susceptível e resiliente ao estresse de derrota social no experimento 3. A avaliação do peso corporal e estado da pelagem foi feita logo antes do primeiro episódio de derrota social e logo antes do teste de interação social, 24 horas após o último episódio de derrota social. A, ganho de peso corporal (em gramas), avaliado pela diferença do peso corporal entre a última e a primeira avaliação; B, deterioração da pelagem, avaliada pela diferença do escore de estado do pelo entre a última e primeira avaliação. As barras representam a média + EPM (n = 9-11 animais/grupo). *, $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle; &, $p < 0,05$ em relação ao grupo INA (interação não-agressiva).

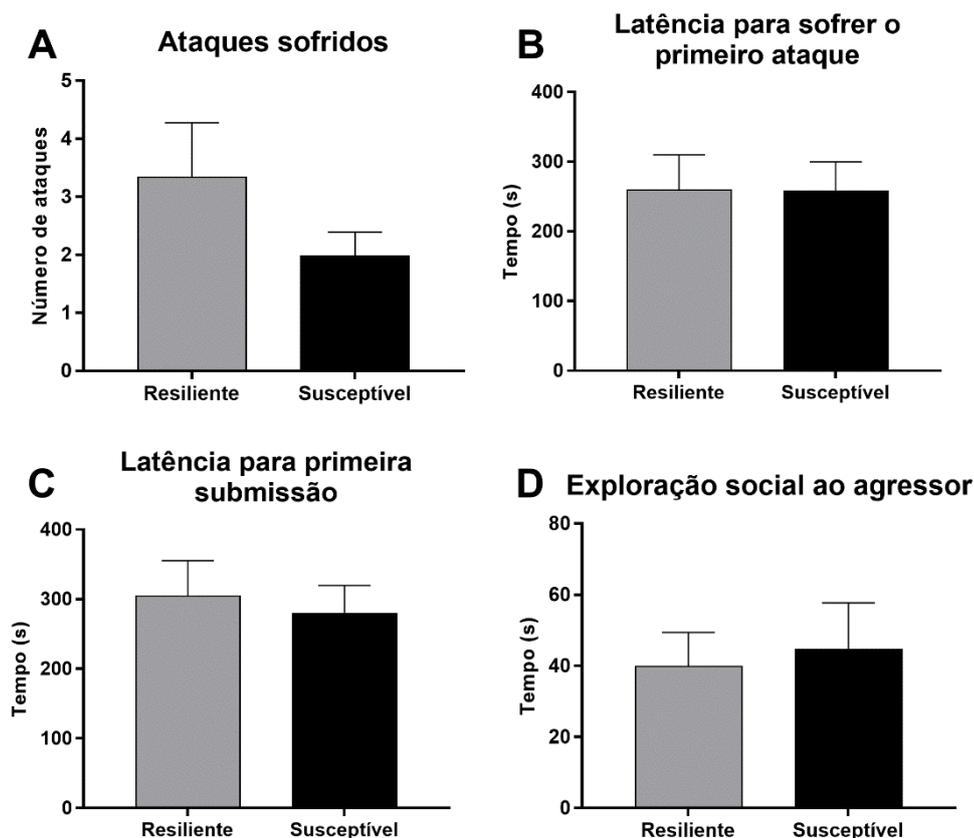


Fonte: próprio autor, 2021.

4.3.3. Avaliação dos níveis de agressão e enfrentamento ao confronto social

Os dados resultantes da avaliação dos níveis de agressão e enfrentamento ao confronto social foram analisados por meio do teste *t-student* comparando os grupos resiliente e susceptível. A análise dos dados mostrou que não houve diferenças entre os fenótipos em relação ao nível de agressão sofrido ou como cada fenótipo se comportou durante o episódio de EDS. Não foram encontradas diferenças significativas em relação ao número de ataques sofridos (Figura 24A), latência para sofrer o primeiro ataque (Figura 24B), latência para primeiro episódio de submissão (Figura 24C) e tempo gasto explorando socialmente o residente agressor (Figura 24D) ($p > 0,05$).

Figura 24 - Níveis de agressividade dos residentes agressores e enfrentamento ao confronto social nos fenótipos susceptível e resiliente ao estresse de derrota social no experimento 3. A avaliação foi realizada durante todos os episódios de derrota social e a média dos valores obtidos em cada episódio considerada para análise. A, número de ataques sofridos; B, latência para sofrer o primeiro ataque do agressor; C, latência para demonstração da postura de submissão pela primeira vez; D, tempo gasto em exploração (cheirar e interagir com o agressor exceto durante os ataques) ao residente agressor. As barras representam a média + EPM (n = 9-11 animais/grupo).

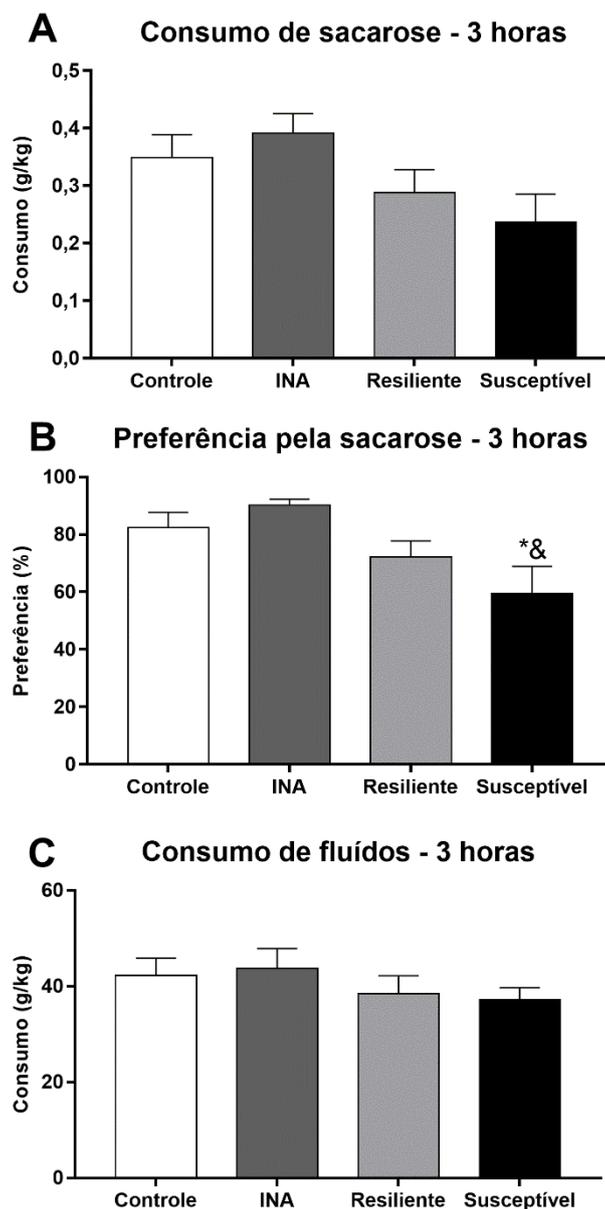


Fonte: próprio autor, 2021.

4.3.4. Avaliação da anedonia comportamental no teste de consumo de sacarose

A análise do consumo e preferência pela sacarose mostrou uma diminuição da preferência nos animais susceptíveis ao EDS, que foi limitada ao período inicial (durante as 3 primeiras horas) de avaliação. A ANOVA de uma via mostrou uma tendência de efeito do fator fenótipo no consumo de sacarose no período de 3 horas ($F_{3,42} = 2,60$; $p = 0,06$) (Figura 25A) e um efeito significativo do fator fenótipo para a preferência pela sacarose no período de 3 horas ($F_{3,42} = 4,52$; $p < 0,01$) (Figura 25B). O teste *post hoc* de Newman-Keuls mostrou que o grupo susceptível apresentou menor preferência pela solução de sacarose quando comparado ao grupo controle (Controle = $82,4 \pm 5,3$ x Susceptível = $59,4 \pm 9,5$; $p < 0,05$) e ao grupo INA (INA = $90,2 \pm 2,1$ x Susceptível = $59,4 \pm 9,5$; $p < 0,01$). Nenhuma diferença significativa foi encontrada no consumo de fluidos no período de 3 horas ($p > 0,1$) (Figura 25C).

Figura 25 - Consumo de sacarose e fluidos durante as 3 horas iniciais do teste de consumo de sacarose nos fenótipos susceptível e resiliente ao estresse de derrota social no experimento 3. Os animais foram avaliados 72 horas após o último episódio de derrota social. A, consumo de sacarose em 3 horas; B, preferência pela sacarose em 3 horas; C, consumo total de fluidos em 3 horas. As barras representam a média + EPM (n = 10-14 animais/grupo). *, p < 0,05 em relação ao grupo controle; &, p < 0,05 em relação ao grupo INA.

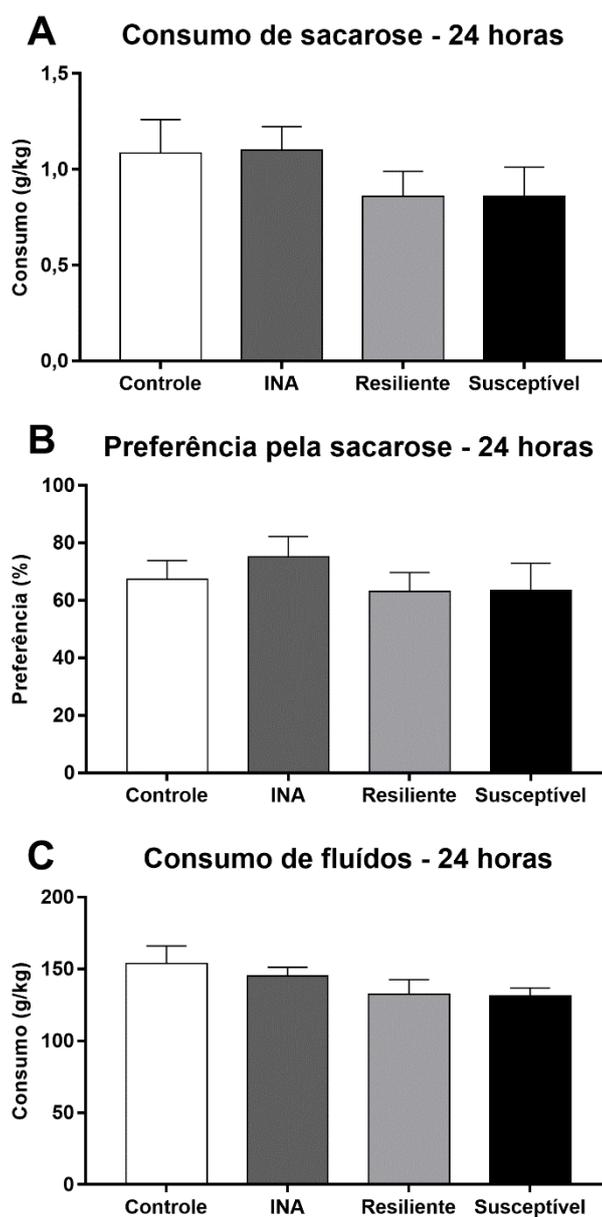


Fonte: próprio autor, 2021.

A ANOVA de uma via não mostrou nenhum efeito significativo no consumo de sacarose ($p > 0,1$) (Figura 26A), preferência pela sacarose ($p > 0,1$) (Figura 26B) ou

consumo de fluidos ($p > 0,1$) (Figura 26C) entre os grupos quando o consumo foi mensurado por um período de 24 horas.

Figura 26 - Consumo de sacarose e fluidos durante o teste de consumo de sacarose, por 24 horas, nos fenótipos susceptível e resiliente ao estresse de derrota social no experimento 3. Os animais foram avaliados 72 horas após o último episódio de derrota social. A, consumo de sacarose em 24 horas; B, preferência pela sacarose em 24 horas; C, consumo total de fluidos em 24 horas. As barras representam a média + EPM (n = 10-14 animais/grupo).



Fonte: próprio autor, 2021.

4.4. EXPERIMENTO 4: QUANTIFICAÇÃO DO TROCADOR CISTINA-GLUTAMATO NO ENCÉFALO DE RATOS SUSCEPTÍVEIS E RESILIENTES AO ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL

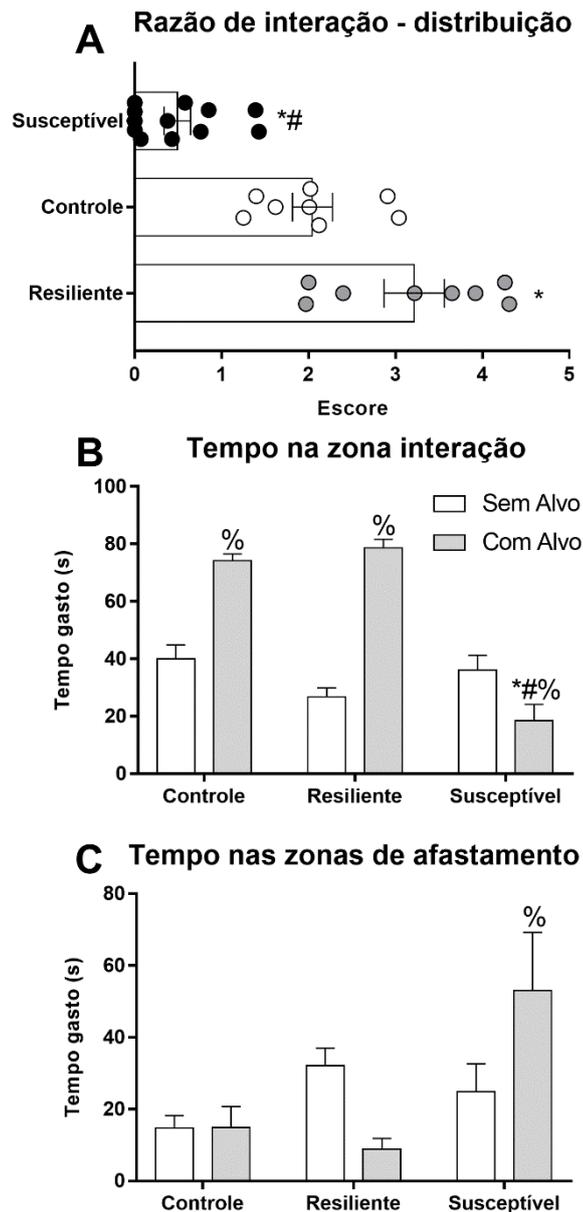
4.4.1. Identificação dos fenótipos de enfrentamento ao estresse de derrota social e avaliação da interação social

Após o TIS, 40% dos animais expostos ao EDS foram classificados como resilientes. A ANOVA de uma via da RI (Figura 27A) mostrou efeito significativo do fator fenótipo ($F_{2,25} = 36,31$; $p < 0,001$). O teste *post hoc* de Newman-Keuls mostrou uma menor RI dos animais susceptíveis em relação ao grupo controle (Controle = $2,0 \pm 0,23$ x Susceptível = $0,5 \pm 0,15$; $p < 0,01$) e resiliente (Resiliente = $3,2 \pm 0,35$ x Susceptível = $0,5 \pm 0,15$, $p < 0,01$). A RI do grupo resiliente também foi maior quando comparada com a RI do grupo controle (Controle = $2,0 \pm 0,23$ x Resiliente = $3,2 \pm 0,35$; $p < 0,01$).

Em relação ao tempo na zona de interação (Figura 27B), a ANOVA de medidas repetidas mostrou efeito significativo dos fatores fenótipo ($F_{2,25} = 18,47$, $p < 0,001$), sessão ($F_{1,25} = 54,53$; $p < 0,001$), e da interação entre esses fatores ($F_{2,25} = 51,46$; $p < 0,001$). A análise *post hoc* revelou um aumento no tempo gasto na zona de interação quando o alvo estava presente nos grupos controle (Sem alvo = $39,9 \pm 4,9$ x Com alvo = $74,2 \pm 2,4$; $p < 0,001$) e resiliente (Sem alvo = $26,7 \pm 3,2$ x Com alvo = $78,3 \pm 3,0$; $p < 0,001$), enquanto os animais do grupo susceptível permaneceram menos tempo nesta zona com o alvo presente (Sem alvo = $36,2 \pm 5,1$ x Com alvo = $18,5 \pm 5,7$; $p < 0,001$). O grupo susceptível permaneceu menos tempo na zona de interação com o alvo presente quando comparado com o tempo de permanência dos grupos controle (Controle = $74,2 \pm 2,4$ x Susceptível = $18,5 \pm 5,7$; $p < 0,001$) e resiliente (Resiliente = $78,3 \pm 3,0$ x Susceptível = $18,5 \pm 5,7$; $p < 0,001$).

A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo da interação entre os fatores fenótipo e sessão no tempo de permanência nas zonas de afastamento ($F_{2,25} = 6,83$; $p < 0,01$) (Figura 27C). O grupo susceptível permaneceu mais tempo nas zonas de afastamento quando o alvo estava presente no aparato (Sem alvo = $24,8 \pm 7,8$ x Com alvo = $53,0 \pm 16,1$; $p < 0,05$). Não foram encontradas diferenças no tempo de permanência nas zonas de afastamento nos grupos controle e resiliente.

Figura 27 - Razão de interação e tempo de permanência nas zonas delimitadas no teste de interação social dos fenótipos susceptível e resiliente ao estresse de derrota social no experimento 4. Os animais foram testados 24 horas após o último episódio de estresse. A, distribuição da razão de interação; B, tempo de permanência (em segundos) na zona de interação; C, tempo de permanência (em segundos) nas zonas de afastamento. As barras representam a média + EPM (n = 8-12 animais/grupo). *, p < 0,05 em relação ao grupo Controle; #, p < 0,05 em relação ao grupo Resiliente; %, p < 0,05 em relação ao tempo gasto durante a sessão sem alvo do respectivo grupo.



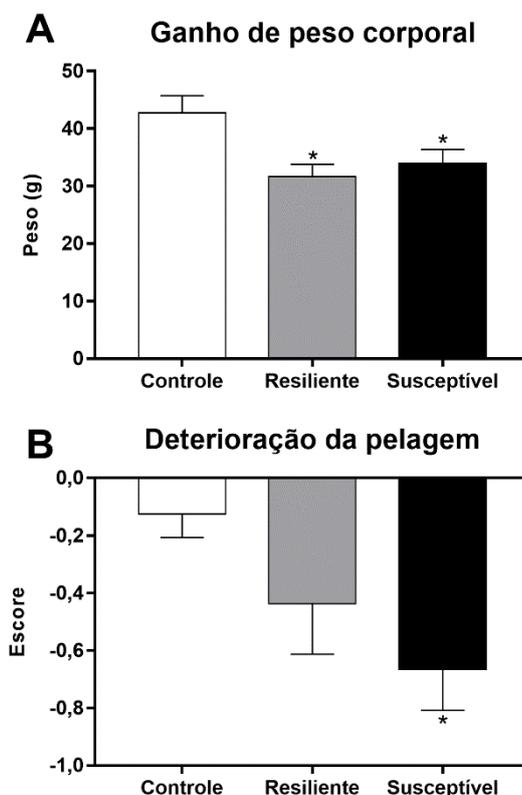
Fonte: próprio autor, 2021.

4.4.2. Avaliação do estado físico

A ANOVA de uma via do ganho de peso corporal (Figura 28A) mostrou efeito significativo do fator fenótipo ($F_{2,25} = 4,62$; $p < 0,05$). O teste *post hoc* de Newman-Keuls revelou que ambos os fenótipos (susceptível e resiliente) ganharam menos peso no decorrer do experimento em relação ao grupo controle (Controle = $42,8 \pm 3,0$ x Resiliente = $31,6 \pm 2,2$; $p < 0,05$; x Susceptível = $34,0 \pm 2,4$; $p < 0,05$).

Os animais susceptíveis ao EDS apresentaram maior deterioração da pelagem (Figura 28B) em relação ao grupo controle. A ANOVA de uma via mostrou efeito significativo do fator fenótipo ($F_{2,25} = 3,70$; $p < 0,05$), sendo o escore de deterioração da pelagem do grupo susceptível foi menor quando comparado com o grupo controle (Controle = $-0,13 \pm 0,08$ x Susceptível = $-0,67 \pm 0,14$; $p < 0,05$).

Figura 28 - Estado físico dos fenótipos susceptível e resiliente ao estresse de derrota social no experimento 4. A avaliação do peso corporal e estado da pelagem foi feita logo antes do primeiro episódio de derrota social e logo antes do teste de interação social, 24 horas após o último episódio de derrota social. A, ganho de peso corporal (em gramas), avaliado pela diferença do peso corporal entre a última e a primeira avaliação; B, deterioração da pelagem, avaliada pela diferença do escore de estado do pelo entre a última e primeira avaliação. As barras representam a média + EPM (n = 8-12 animais/grupo). *, $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle.



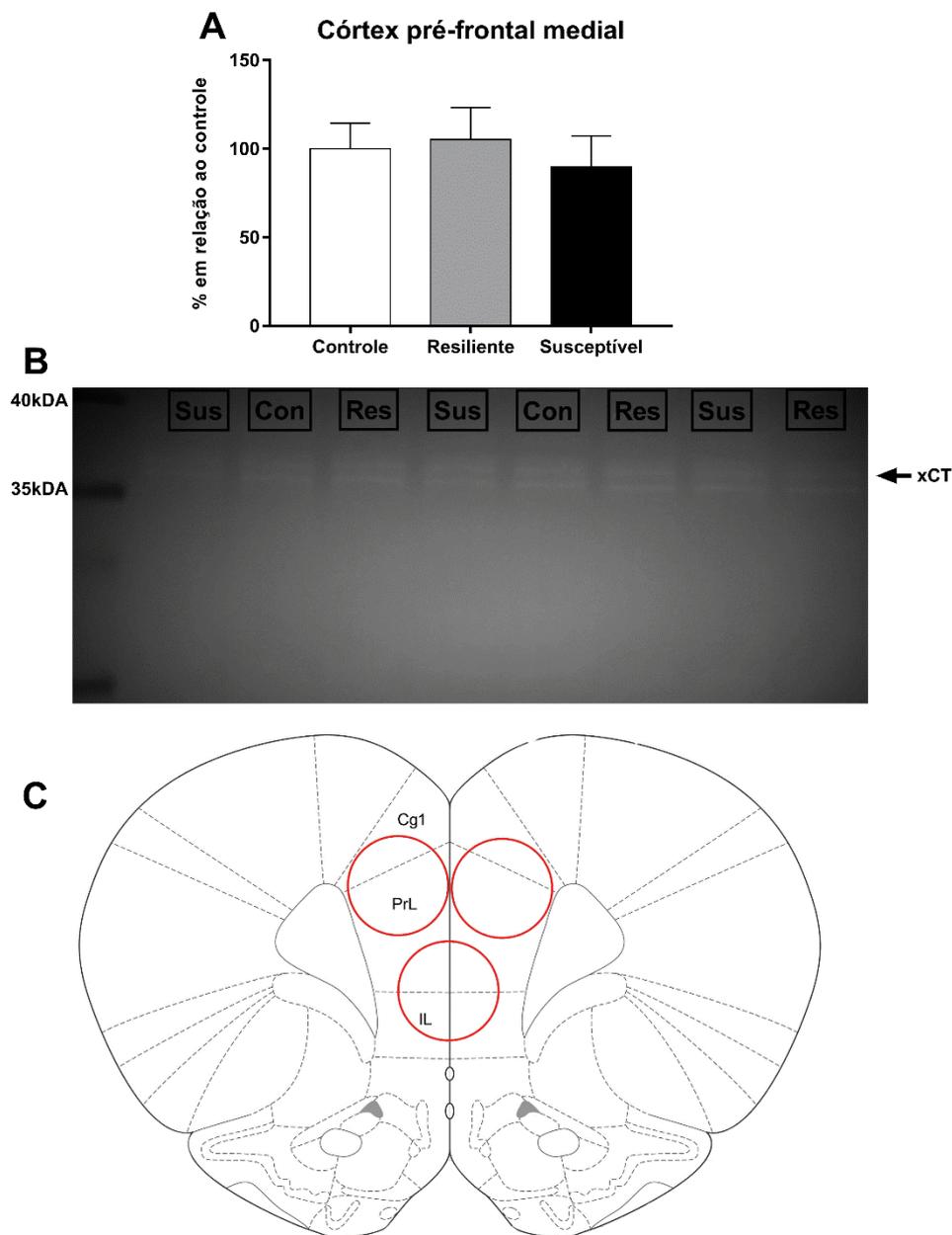
Fonte: próprio autor, 2021.

4.4.3. Quantificação do trocador cistina-glutamato no córtex pré-frontal

A ANOVA de uma via não mostrou diferenças significativas na quantificação do xCT no CPFm (Figura 29A). Uma membrana contendo bandas representativas da quantificação do xCT no CPFm de cada grupo está disponível na Figura 29B. Na Figura 29C, está representada a secção coronal da região de extração do tecido para quantificação no CPFm.

Figura 29 - Quantificação do trocador cistina-glutamato no córtex pré-frontal medial de animais susceptíveis e resilientes ao estresse de derrota social no experimento 4.

Os animais foram decapitados e os encéfalos retirados 24 horas após o teste de interação social. A, quantidade relativa (%) do trocador cistina-glutamato em relação ao grupo controle avaliada por western blotting no córtex pré-frontal medial; B, imagem representativa das bandas obtidas de cada grupo identificado em A; C, secção coronal da região de extração do tecido para quantificação do trocador cistina-glutamato por western blotting. Os círculos vermelhos indicam o local da extração. As barras representam a média + EPM (n = 7-8 animais/grupo). xCT, trocador cistina-glutamato; Cg1, cingulado 1; PrL, pré-límbico; IL, infralímbico.

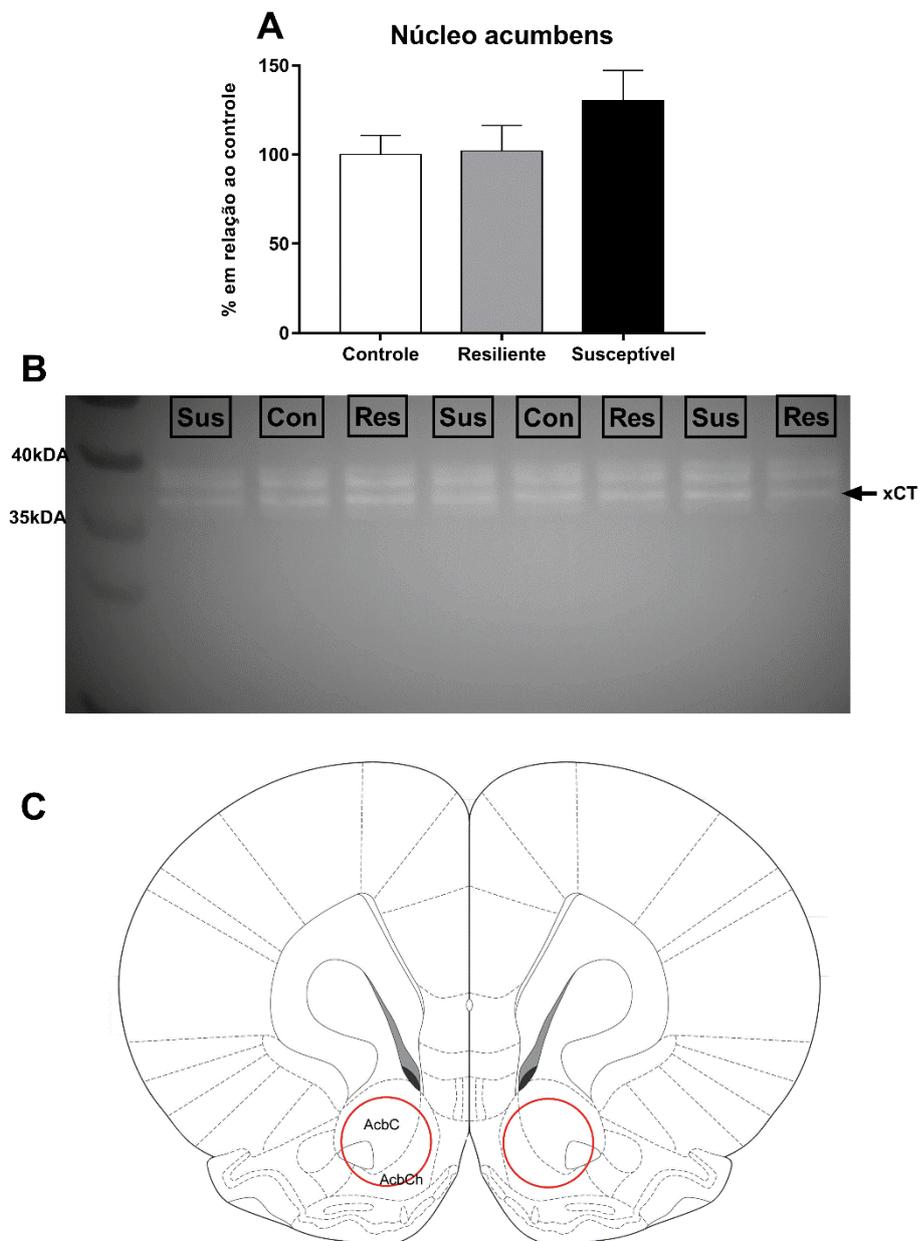


Fonte: próprio autor, 2021.

4.4.4. Quantificação do trocador cistina-glutamato no núcleo acumbens

A ANOVA de uma via não mostrou diferenças significativas na quantificação do xCT no Acb (Figura 30A). Uma membrana contendo bandas representativas da quantificação do xCT no Acb de cada grupo está disponível na Figura 30B. Na Figura 30C está representada a secção coronal da região de extração do tecido para quantificação no Acb.

Figura 30 - Quantificação do trocador cistina-glutamato no núcleo acumbens de animais susceptíveis e resilientes ao estresse de derrota social no experimento 4. Os animais foram decapitados e os encéfalos retirados 24 horas após o teste de interação social. A, quantidade relativa (%) do trocador cistina-glutamato em relação ao grupo controle avaliada por western blotting no núcleo acumbens; B, imagem representativa das bandas obtidas de cada grupo identificado em A; C, secção coronal da região de extração do tecido para quantificação do trocador cistina-glutamato por western blotting. Os círculos vermelhos indicam o local da extração. As barras representam a média + EPM (n = 7-8 animais/grupo). xCT, trocador cistina-glutamato; AcbC, centro do núcleo acumbens; AcbCh, concha do núcleo acumbens.



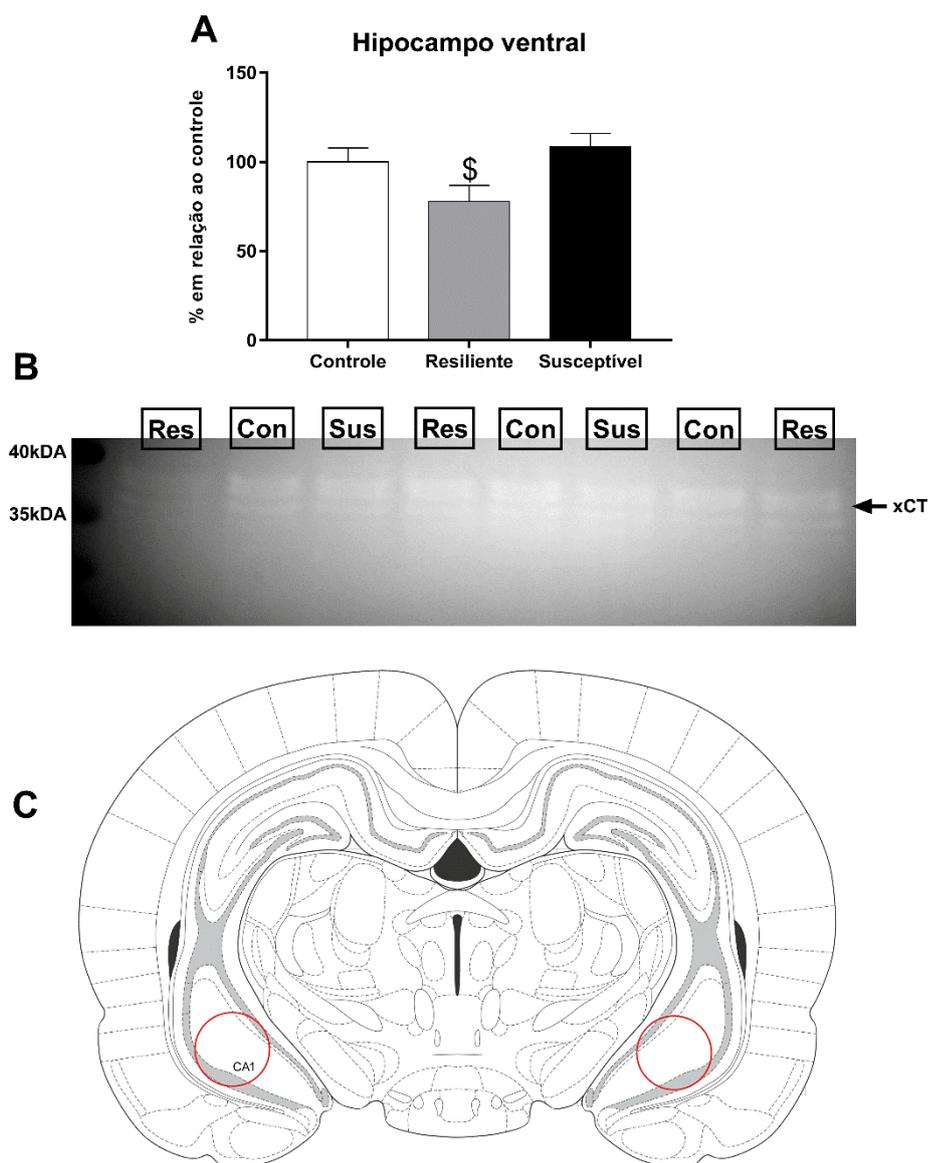
Fonte: próprio autor, 2021.

4.4.5. Quantificação do trocador cistina-glutamato no hipocampo ventral

A quantificação do xCT no HPCV revelou uma diminuição dos níveis dessa proteína nos animais resilientes ao EDS em relação aos susceptíveis (Figura 31).

A ANOVA de uma via revelou um efeito significativo do fator fenótipo ($F_{2,20} = 3,91$; $p < 0,05$). O teste *post-hoc* revelou menores níveis de xCT no grupo resiliente em relação ao susceptível (Resiliente = $77,9 \pm 8,9$ x Susceptível = $108,4 \pm 7,5$; $p < 0,05$) e uma tendência de diminuição em relação ao controle (Controle = $100,0 \pm 7,8$ x Resiliente = $77,9 \pm 8,9$; $p = 0,07$) (Figura 31A). Uma membrana contendo bandas representativas da quantificação do xCT no HPCV de cada grupo está disponível na Figura 31B. Na Figura 31C está representada a secção coronal da região de extração do tecido para quantificação no HPCV.

Figura 31 - Quantificação do trocador cistina-glutamato no hipocampo ventral de animais susceptíveis e resilientes ao estresse de derrota social no experimento 4. Os animais foram decapitados e os encéfalos retirados 24 horas após o teste de interação social. A, quantidade relativa (%) do trocador cistina-glutamato em relação ao grupo controle avaliada por western blotting no hipocampo ventral; B, imagem representativa das bandas obtidas de cada grupo identificado em A; C, secção coronal da região de extração do tecido para quantificação do trocador cistina-glutamato por western blotting. Os círculos vermelhos indicam o local da extração. As barras representam a média + EPM ($n = 7-8$ animais/grupo). xCT, trocador cistina-glutamato; CA1, *Cornus ammonis 1*. \$, $p < 0,05$ em relação ao grupo susceptível.



Fonte: próprio autor, 2021.

4.5. EXPERIMENTO 5: QUANTIFICAÇÃO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO DELTAFOSB NO ENCÉFALO DE RATOS SUSCEPTÍVEIS E RESILIENTES AO ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL

4.5.1. Identificação dos fenótipos de enfrentamento ao estresse de derrota social e avaliação da interação social

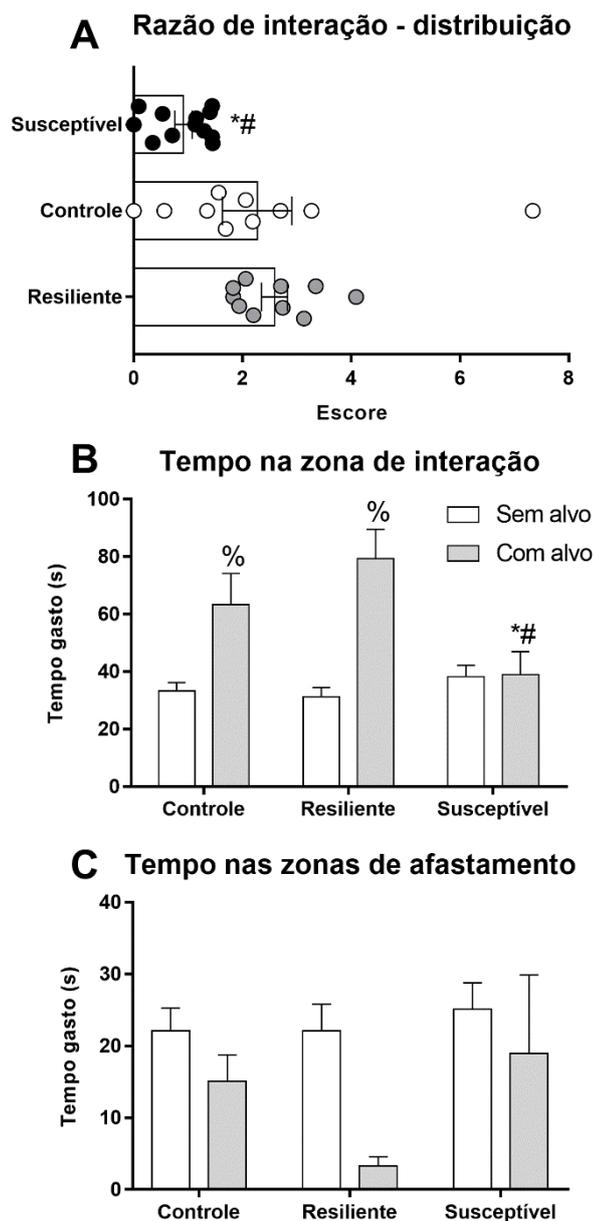
Foram obtidos 45% de animais resilientes ao EDS por meio do TIS no experimento 5. A ANOVA de uma via da RI (Figura 32A) mostrou efeito significativo do fator fenótipo ($F_{2,29} = 5,68$; $p < 0,01$). O teste *post hoc* de Newman-Keuls mostrou

uma menor RI dos animais susceptíveis em relação ao grupo controle (Controle = $2,3 \pm 0,64$ x Susceptível = $0,9 \pm 0,16$; $p < 0,05$) e resiliente (Resiliente = $2,6 \pm 0,24$ x Susceptível = $0,9 \pm 0,16$; $p < 0,05$).

Em relação ao tempo na zona de interação (Figura 32B), a ANOVA de medidas repetidas mostrou efeito significativo dos fatores sessão ($F_{1,29} = 26,49$; $p < 0,001$) e da interação entre fenótipo e sessão ($F_{2,29} = 7,68$; $p < 0,01$). A análise *post hoc* revelou um aumento no tempo gasto na zona de interação quando o alvo estava presente nos grupos controle (Sem alvo = $33,3 \pm 2,9$ x Com alvo = $63,3 \pm 10,8$; $p < 0,05$) e resiliente (Sem alvo = $31,2 \pm 3,2$ x Com alvo = $79,4 \pm 10,2$; $p < 0,001$). O grupo susceptível permaneceu menos tempo na zona de interação com o alvo presente quando comparado com os grupos controle (Controle = $63,3 \pm 10,8$ x Susceptível = $39,0 \pm 8,0$; $p < 0,05$) e resiliente (Resiliente = $79,4 \pm 10,2$ x Susceptível = $39,0 \pm 8,0$; $p < 0,01$).

A ANOVA de medidas repetidas revelou um efeito significativo apenas do fator sessão no tempo de permanência nas zonas de afastamento ($F_{1,29} = 4,22$; $p < 0,05$) (Figura 32C), indicando uma diminuição geral do tempo de permanência nas zonas de afastamento em todos os grupos.

Figura 32 - Razão de interação e tempo de permanência nas zonas delimitadas no teste de interação social dos fenótipos susceptível e resiliente ao estresse de derrota social no experimento 5. Os animais foram testados 24 horas após o último episódio de estresse. A, distribuição da razão de interação; B, tempo de permanência (em segundos) na zona de interação; C, tempo de permanência (em segundos) nas zonas de afastamento. As barras representam a média + EPM ($n = 10-12$ animais/grupo). *, $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle; #, $p < 0,05$ em relação ao grupo Resiliente; %, $p < 0,05$ em relação ao tempo gasto durante a sessão sem alvo do respectivo grupo.



Fonte: próprio autor, 2021.

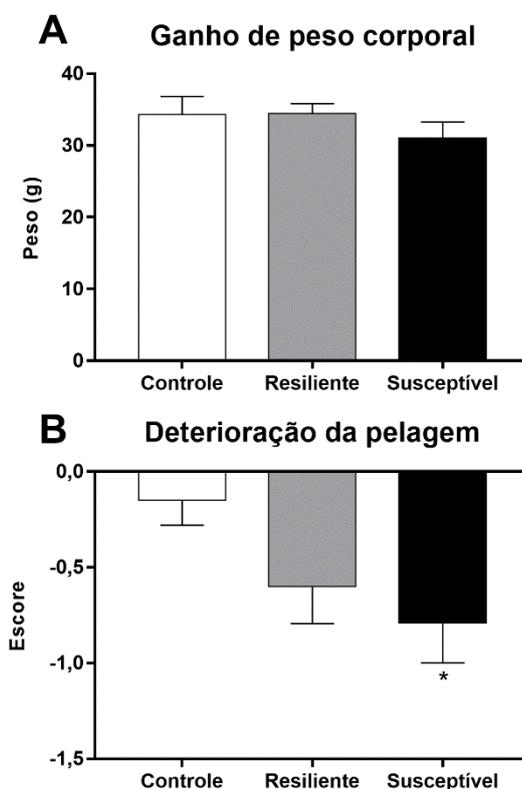
4.5.2. Avaliação do estado físico

Não foram encontradas diferenças significativas quanto ao ganho de peso corporal dos animais no experimento 5 (Figura 33A).

Em relação à deterioração da pelagem (Figura 33B), a ANOVA de uma via revelou efeito significativo do fator fenótipo ($F_{2,29} = 3,15$; $p = 0,05$). O teste *post hoc* de Newman-Keuls mostrou uma maior deterioração da pelagem no grupo susceptível

ao EDS em relação ao grupo controle (Controle = $-0,15 \pm 0,13$ x Susceptível = $-0,79 \pm 0,21$; $p = 0,05$).

Figura 33 - Estado físico dos fenótipos susceptível e resiliente ao estresse de derrota social no experimento 5. A avaliação do peso corporal e estado da pelagem foi feita logo antes do primeiro episódio de derrota social e logo antes do teste de interação social, 24 horas após o último episódio de derrota social. A, ganho de peso corporal (em gramas), avaliado pela diferença do peso corporal entre a última e a primeira avaliação; B, deterioração da pelagem, avaliada pela diferença do escore de estado do pelo entre a última e primeira avaliação. As barras representam a média + EPM (n = 10-12 animais/grupo). *, $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle.



Fonte: próprio autor, 2021.

4.5.3. Quantificação de DeltaFosB no córtex pré-frontal medial

Foram avaliados os hemisférios direito e esquerdo das sub-regiões cingulado (Cg), pré-límbico (PrL) e infralímbico (IL) (Figura 34A) do córtex pré-frontal medial em relação à expressão da proteína DeltaFosB.

No Cg (Figura 34B), houve um efeito do hemisfério avaliado na quantificação de DeltaFosB. A ANOVA de duas vias revelou efeito significativo do fator hemisfério ($F_{1,50} = 8,39$; $p < 0,01$). A análise *post hoc* mostrou, no geral, um maior número de

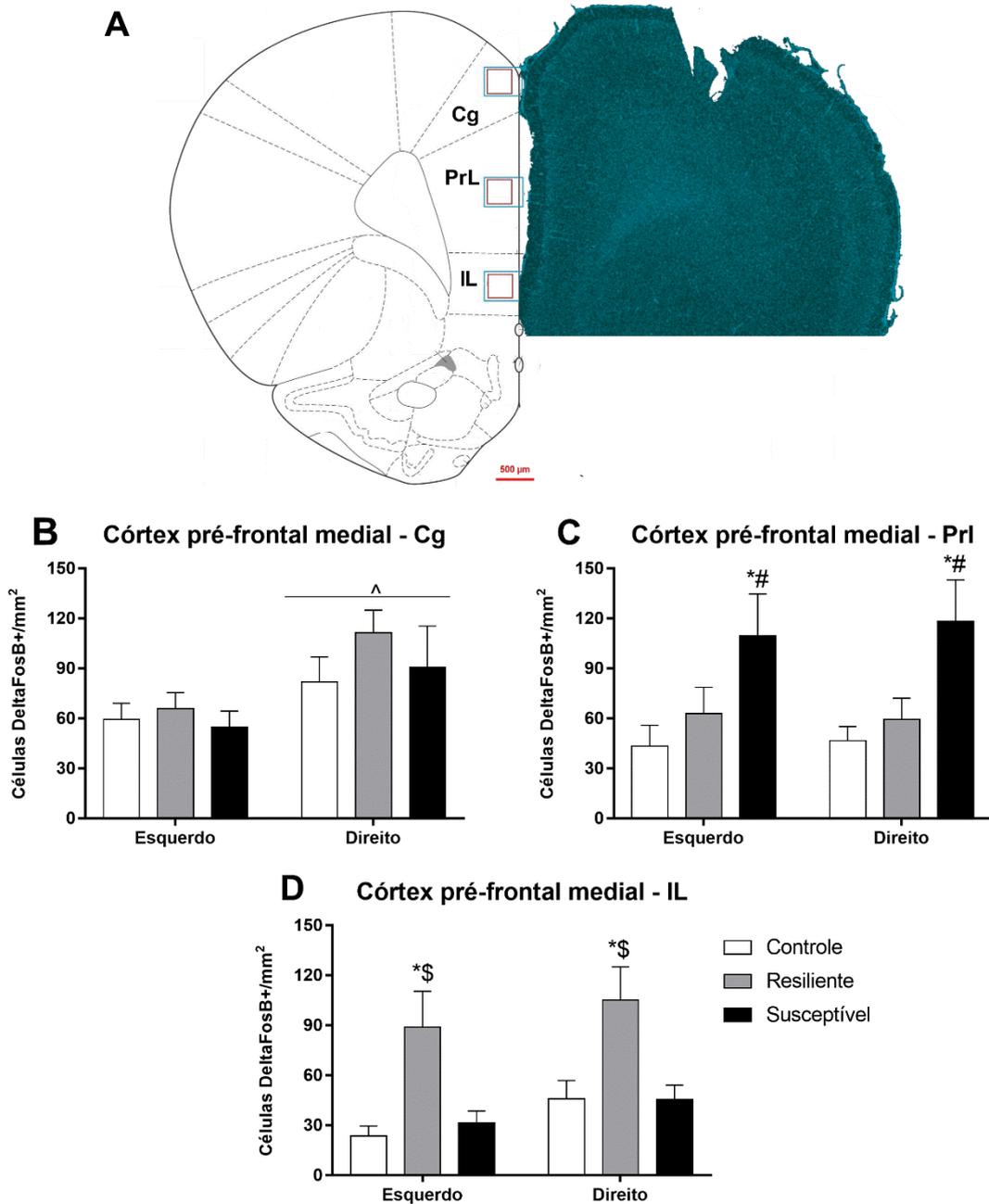
células positivas para DeltaFosB no hemisfério direito em relação ao hemisfério esquerdo.

No PrL (Figura 34C), houve um aumento de DeltaFosB no encéfalo dos animais susceptíveis ao EDS, independente do hemisfério. A ANOVA de duas vias do PrL revelou efeito significativo do fator fenótipo ($F_{2,50} = 7,88$; $p < 0,001$), cuja análise *post hoc* mostrou um maior número de células positivas para DeltaFosB nos animais susceptíveis quando comparados ao grupo controle e resiliente, independente do hemisfério [(Controle, hemisfério esquerdo = $43 \pm 12,4$; hemisfério direito = $46 \pm 8,5$ x Susceptível, hemisfério esquerdo = $110 \pm 25,0$; hemisfério direito = $118 \pm 24,9$; $p < 0,001$) (Resiliente, hemisfério esquerdo = $63 \pm 15,9$; hemisfério direito = $59 \pm 12,8$ x Susceptível, hemisfério esquerdo = $110 \pm 25,0$; hemisfério direito = $118 \pm 24,9$; $p < 0,01$)].

Por outro lado, no IL (Figura 34D), houve um aumento de DeltaFosB no encéfalo dos animais resilientes ao EDS, independente do hemisfério. A ANOVA de duas vias do IL revelou efeito significativo do fator fenótipo ($F_{2,46} = 12,47$; $p < 0,001$). A análise *post hoc* mostrou um maior número de células positivas para DeltaFosB nos animais resilientes quando comparados aos animais do grupo controle e susceptível, independente do hemisfério [(Controle, hemisfério esquerdo = $24 \pm 5,9$; hemisfério direito = $46 \pm 11,0$ x Resiliente, hemisfério esquerdo = $89 \pm 21,5$; hemisfério direito = $105 \pm 19,9$; $p < 0,001$) (Resiliente, hemisfério esquerdo = $89 \pm 21,5$; hemisfério direito = $105 \pm 19,9$ x Susceptível, hemisfério esquerdo = $32 \pm 6,9$; hemisfério direito = $46 \pm 8,4$; $p < 0,001$)].

Figura 34 - Quantificação das células positivas para DeltaFosB nas sub-regiões cingulado, pré-límbico e Infralímbico do córtex pré-frontal medial de animais susceptíveis e resilientes ao estresse de derrota social no experimento 5. Os animais foram perfundidos e os encéfalos retirados 24 horas após o teste de interação social. A, secção coronal contendo a região de fotomicrografia do córtex pré-frontal medial e suas sub-regiões. A esquerda, prancha representativa do atlas de coordenadas estereotáxicas. A direita, fotomicrografia representativa da região selecionada marcada com o DAPI com auxílio da objetiva de 2,5x (aumento total de 25x). O retângulo azul indica a região fotografada para contagem das células com auxílio da objetiva de 20x (aumento total de 200x), enquanto o retângulo vermelho indica a região demarcada para contagem; B, quantificação do número de células DeltaFosB positivas no córtex pré-frontal medial cingulado; C, quantificação do número de células DeltaFosB positivas no córtex pré-frontal medial pré-límbico; D, quantificação de células DeltaFosB positivas no córtex pré-frontal medial infralímbico. As barras representam a média + EPM (n = 8-10 animais/grupo). Cg, cingulado; PrL, pré-límbico; IL, infralímbico. *, $p < 0,05$ em relação ao grupo controle

no mesmo hemisfério; #, $p > 0,05$ em relação ao grupo resiliente no mesmo hemisfério; \$, $p < 0,05$ em relação ao grupo susceptível no mesmo hemisfério; ^, $p < 0,05$ em relação a todos os grupos do hemisfério oposto.



Fonte: próprio autor, 2021.

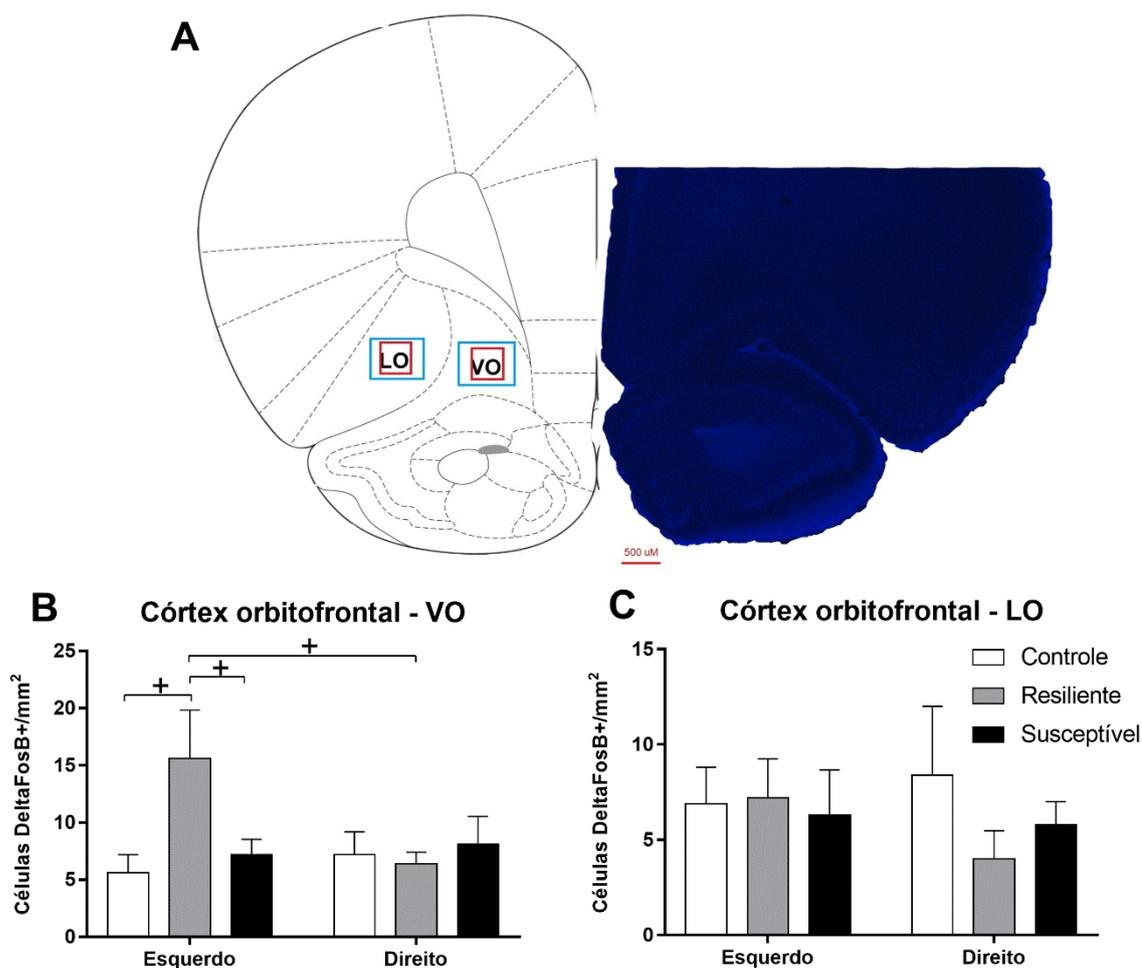
4.5.4. Quantificação de DeltaFosB no córtex orbitofrontal

Foram avaliados os hemisférios direito e esquerdo das sub-regiões ventral (VO) e lateral (LO) do COF (Figura 35A) em relação à expressão da proteína DeltaFosB.

Houve um aumento de DeltaFosB apenas no hemisfério esquerdo da sub-região VO dos animais resilientes ao EDS, mostrando uma lateralização na expressão dessa molécula em animais resilientes. A ANOVA de duas vias revelou efeito significativo da interação entre os fatores fenótipo e hemisfério ($F_{2,54} = 3,31$; $p < 0,05$). A análise *post hoc* mostrou, no hemisfério esquerdo (Figura 35B), um aumento no número de células positivas para DeltaFosB nos animais resilientes em relação ao grupo controle (Controle = $6 \pm 1,6$ x Resiliente = $16 \pm 4,2$; $p < 0,05$) e susceptível (Susceptível = $7 \pm 1,3$ x Resiliente = 16 ± 4 ; $p < 0,05$) e em relação ao próprio grupo quando comparado ao hemisfério direito (Resiliente hemisfério esquerdo = $16 \pm 4,2$ x Resiliente hemisfério direito = $6 \pm 1,0$; $p < 0,05$).

Não foram encontradas alterações significativas na quantidade de células positivas para DeltaFosB em nenhum dos hemisférios da sub-região LO do COF (Figura 35C).

Figura 35 - Quantificação das células positivas para DeltaFosB nas sub-regiões ventral e lateral do córtex orbitofrontal de animais susceptíveis e resilientes ao estresse de derrota social no experimento 5. Os animais foram perfundidos e os encéfalos retirados 24 horas após o teste de interação social. A, secção coronal contendo a região de fotomicrografia do córtex orbitofrontal e suas sub-regiões. A esquerda, prancha representativa do atlas de coordenadas estereotáxicas. A direita, fotomicrografia representativa da região selecionada marcada com o DAPI com auxílio da objetiva de 2,5x (aumento total de 25x). O retângulo azul indica a região fotografada para contagem das células com auxílio da objetiva de 20x (aumento total de 200x), enquanto o retângulo vermelho indica a região demarcada para contagem; B, quantificação do número de células DeltaFosB positivas no córtex orbitofrontal ventral; C, quantificação do número de células DeltaFosB positivas no córtex orbitofrontal lateral. As barras representam a média + EPM ($n = 10$ animais/grupo). VO, ventral; LO, lateral. +, $p < 0,05$ em relação ao grupo apontado.



Fonte: próprio autor, 2021.

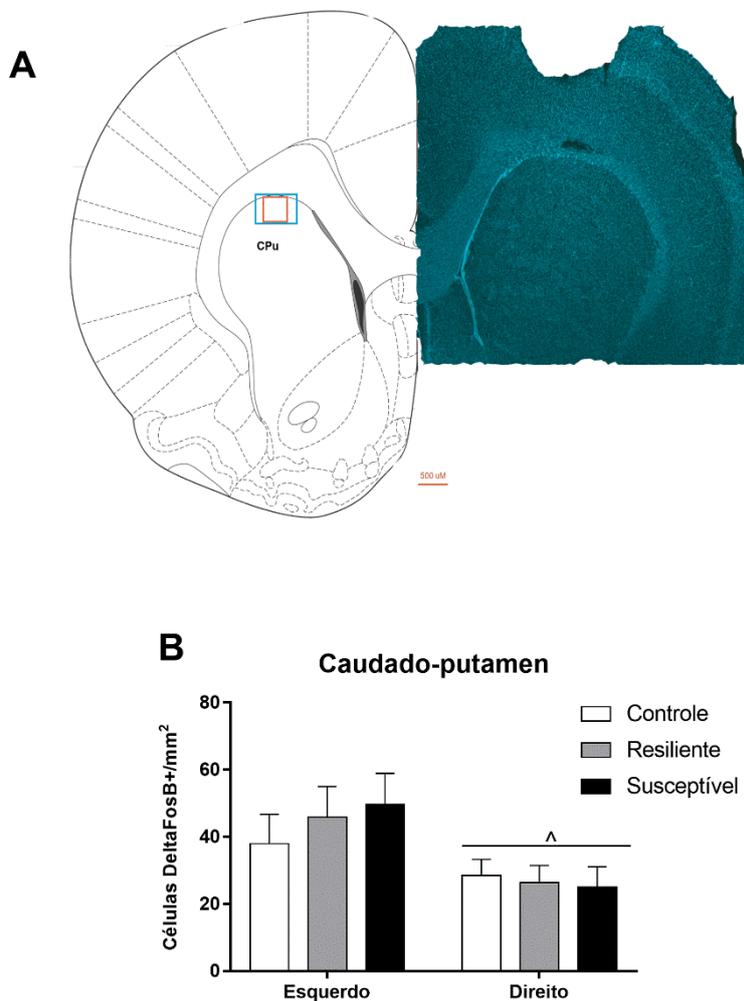
4.5.5. Quantificação de DeltaFosB no caudado-putamen

A quantificação do fator de transcrição DeltaFosB no CPu (Figura 36A) não mostrou nenhuma diferença significativa entre os fenótipos. Entretanto, a ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo do hemisfério ($F_{1,48} = 8,40$, $p < 0,01$), mostrando uma maior quantidade de células positivas no hemisfério esquerdo em relação ao direito (Figura 36B).

Figura 36 - Quantificação das células positivas para DeltaFosB no caudado-putamen de animais susceptíveis e resilientes ao estresse de derrota social no experimento 5.

Os animais foram perfundidos e os encéfalos retirados 24 horas após o teste de interação social. A, seção coronal contendo a região de fotomicrografia do caudado-putamen. A esquerda, prancha representativa do atlas de coordenadas estereotáxicas. A direita, fotomicrografia representativa da região selecionada marcada com o DAPI com auxílio da objetiva de 2,5x (aumento total de 25x). O retângulo azul indica a região fotografada para contagem das células com auxílio da

objetiva de 20x (aumento total de 200x), enquanto o retângulo vermelho indica a região demarcada para contagem; B, quantificação do número de células DeltaFosB positivas no caudado-putamen. As barras representam a média + EPM (n = 8-10 animais/grupo). CPu, caudado-putamen. \wedge , $p < 0.05$ em relação a todos os grupos do hemisfério oposto.



Fonte: próprio autor, 2021.

4.5.6. Quantificação de DeltaFosB no núcleo acumbens

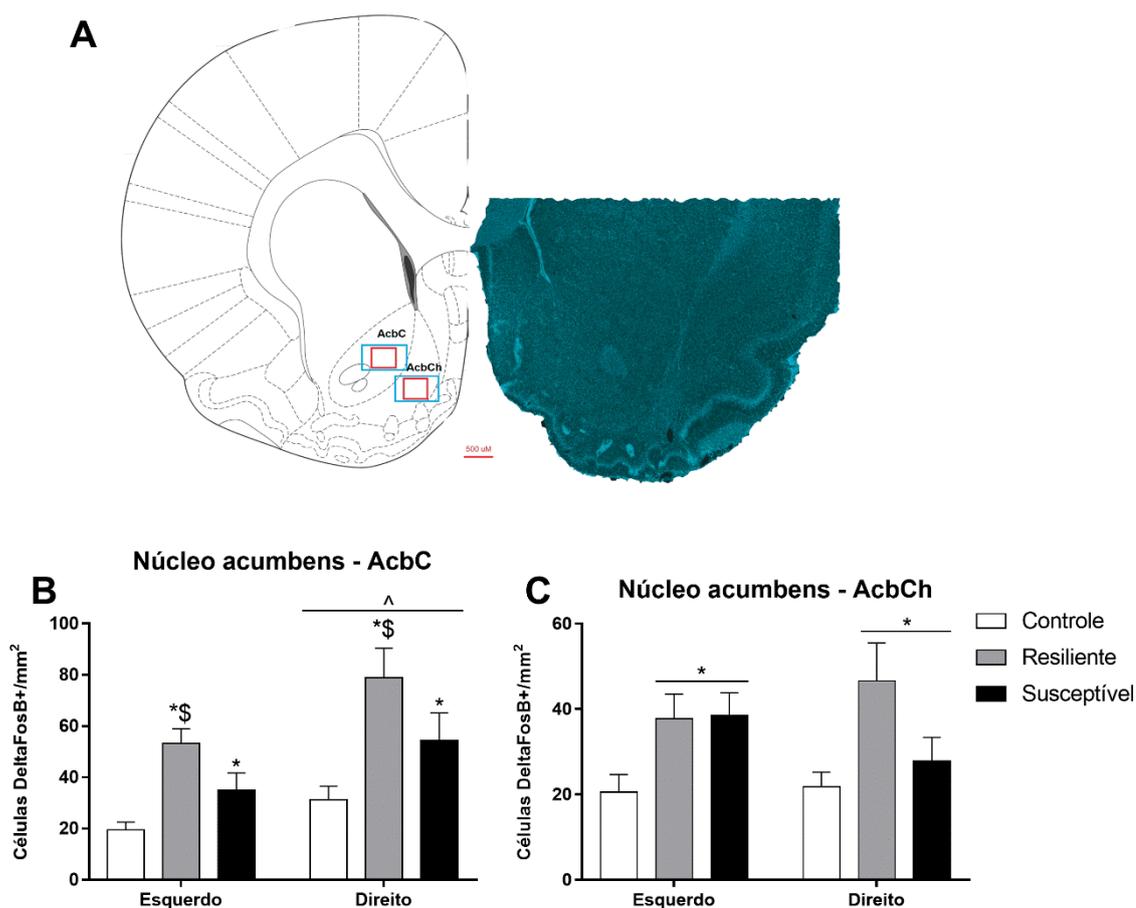
Foram avaliados os hemisférios direito e esquerdo das sub-regiões centro (AcbC) e concha (AcbCh) do Acb (Figura 37A) em relação à expressão da proteína DeltaFosB.

No AcbC (Figura 37B), a ANOVA de duas vias mostrou um efeito significativo dos fatores fenótipo ($F_{2,50} = 13,51$, $p < 0,001$) e hemisfério ($F_{1,50} = 8,66$, $p < 0,01$). Um aumento de células DeltaFosB positivas foi encontrado em ambos os fenótipos resiliente e susceptível no AcbC, quando comparados aos animais do grupo controle,

em ambos os hemisférios cerebrais [(Controle, hemisfério esquerdo = $19 \pm 2,9$; hemisfério direito = $31 \pm 5,1$ x Resiliente, hemisfério esquerdo = $53 \pm 6,1$; hemisfério direito = $79 \pm 12,1$; $p < 0,001$) (Controle, hemisfério esquerdo = $19 \pm 2,9$; hemisfério direito = $31 \pm 5,1$ x Susceptível, hemisfério esquerdo = $35 \pm 6,7$; hemisfério direito = $54 \pm 10,6$; $p < 0,05$)]. Esse aumento foi maior nos indivíduos resilientes (Resiliente, hemisfério esquerdo = $53 \pm 6,1$; hemisfério direito = $79 \pm 12,1$ x Susceptível, hemisfério esquerdo = $35 \pm 6,7$; hemisfério direito = $54 \pm 10,6$; $p < 0,05$). Foi encontrado um efeito de lateralização, onde os níveis de DeltaFosB do hemisfério direito foram maiores que no hemisfério esquerdo.

No AcbCh (Figura 37C), houve um efeito significativo apenas do fator fenótipo ($F_{2,50} = 6,37$, $p < 0,01$). Um aumento do número de células DeltaFosB positivas foi encontrado em ambos os fenótipos resiliente e susceptível quando comparados ao grupo controle, em ambos os hemisférios cerebrais [(Controle, hemisfério esquerdo = $20 \pm 4,1$; hemisfério direito = $22 \pm 3,3$ x Resiliente, hemisfério esquerdo = $37 \pm 5,7$; hemisfério direito = $46 \pm 9,0$; $p < 0,01$) (Controle, hemisfério esquerdo = $20 \pm 4,1$; hemisfério direito = $22 \pm 3,3$ x Susceptível, hemisfério esquerdo = $38 \pm 5,4$; hemisfério direito = $29 \pm 5,5$; $p < 0,05$)].

Figura 37 - Quantificação das células positivas para DeltaFosB nas sub-regiões centro e concha do núcleo acumbens de animais susceptíveis e resilientes ao estresse de derrota social no experimento 5. Os animais foram perfundidos e os encéfalos retirados 24 horas após o teste de interação social. A, secção coronal contendo a região de fotomicrografia do núcleo acumbens e suas sub-regiões. A esquerda, prancha representativa do atlas de coordenadas estereotáticas. A direita, fotomicrografia representativa da região selecionada marcada com o DAPI com auxílio da objetiva de 2,5x (aumento total de 25x). O retângulo azul indica a região fotografada para contagem das células com auxílio da objetiva de 20x (aumento total de 200x), enquanto o retângulo vermelho indica a região demarcada para contagem; B, quantificação do número de células DeltaFosB positivas no centro do núcleo acumbens; C, quantificação do número de células DeltaFosB positivas na concha do núcleo acumbens. As barras representam a média + EPM (n = 9-10 animais/grupo). AcbC, centro; AcbCh, concha. *, $p < 0,05$ em relação ao grupo controle no mesmo hemisfério; #, $p > 0,05$ em relação ao grupo resiliente no mesmo hemisfério; \$, $p < 0,05$ em relação ao grupo susceptível no mesmo hemisfério; ^, $p < 0,05$ em relação a todos os grupos do hemisfério oposto.

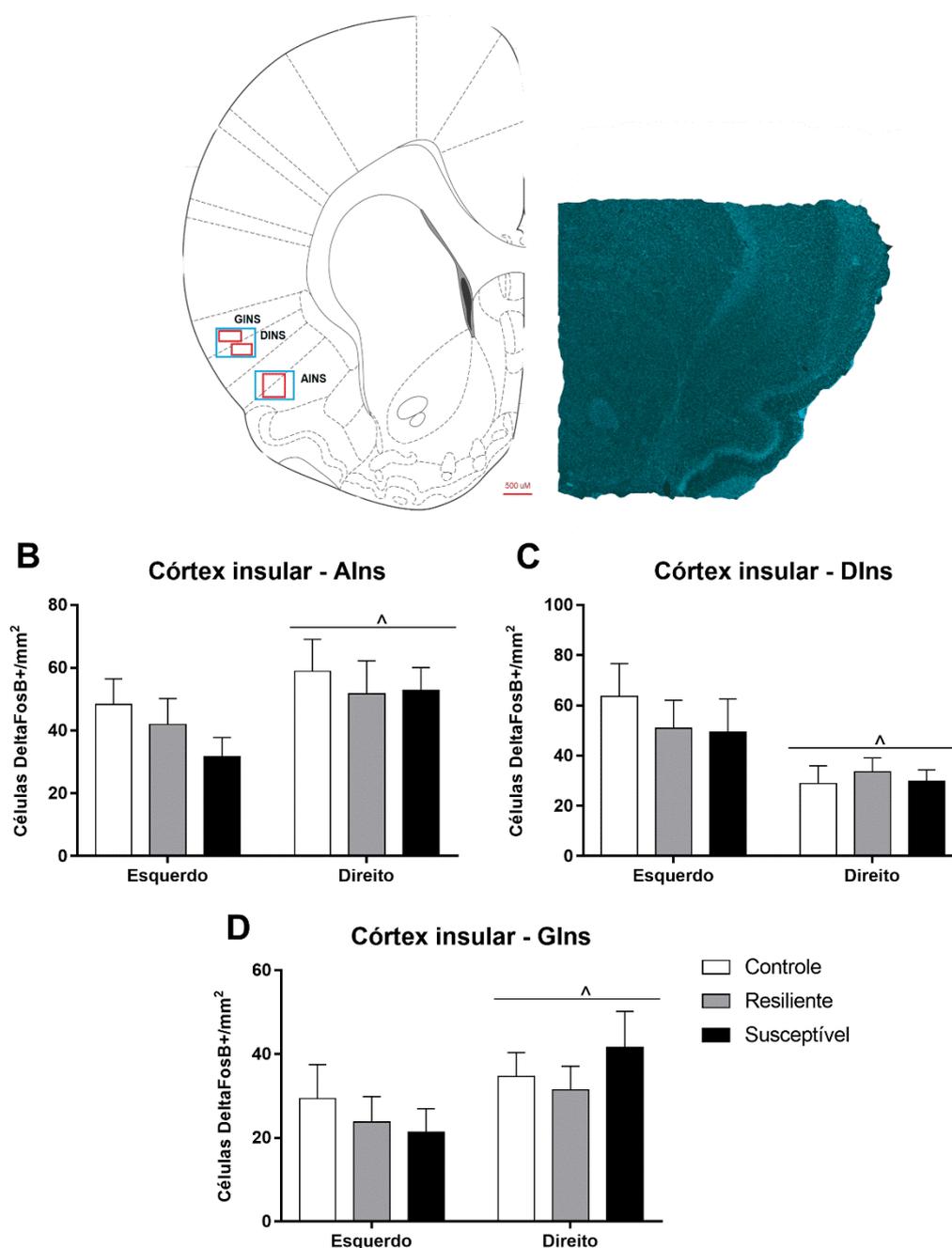


4.5.7. Quantificação de DeltaFosB no córtex insular

Foram avaliados os hemisférios direito e esquerdo das sub-regiões agranular (AIns), desgranular (DIns) e granular (GIns) da Ins (Figura 38A) em relação à expressão da proteína DeltaFosB. Em todas as regiões, a ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo do fator hemisférico [(AIns; $F_{1,54} = 3,92$; $p = 0,05$) (Figura 38B) (DIns; $F_{1,46} = 8,93$; $p < 0,01$) (Figura 38C) (GIns; $F_{1,48} = 3,95$; $p = 0,05$) (Figura 38D)]. Nas sub-regiões AIns e GIns encontramos um maior número de células positivas para DeltaFosB no hemisfério direito, enquanto na sub-região DIns esse maior número de células foi encontrado no hemisfério esquerdo.

Figura 38 - Quantificação das células positivas para DeltaFosB no córtex insular e suas sub-regiões de animais susceptíveis e resilientes ao estresse de derrota social no experimento 5. Os animais foram perfundidos e os encéfalos retirados 24 horas após o teste de interação social. A, secção coronal contendo a região de fotomicrografia do córtex insular e suas sub-regiões. A esquerda, prancha

representativa do atlas de coordenadas estereotáticas. A direita, fotomicrografia representativa da região selecionada marcada com o DAPI com auxílio da objetiva de 2,5x (aumento total de 25x). O retângulo azul indica a região fotografada para contagem das células com auxílio da objetiva de 20x (aumento total de 200x), enquanto o retângulo vermelho indica a região demarcada para contagem; B, quantificação do número de células DeltaFosB positivas no córtex insular agranular; C, quantificação do número de células DeltaFosB positivas no córtex insular desgranular; D, quantificação de células DeltaFosB positivas no córtex insular granular. As barras representam a média + EPM (n = 8-10 animais/grupo). AIns, agranular; DIns, desgranular; GIns, granular. \wedge , $p < 0.05$ em relação a todos os grupos do hemisfério oposto.



Fonte: próprio autor, 2021.

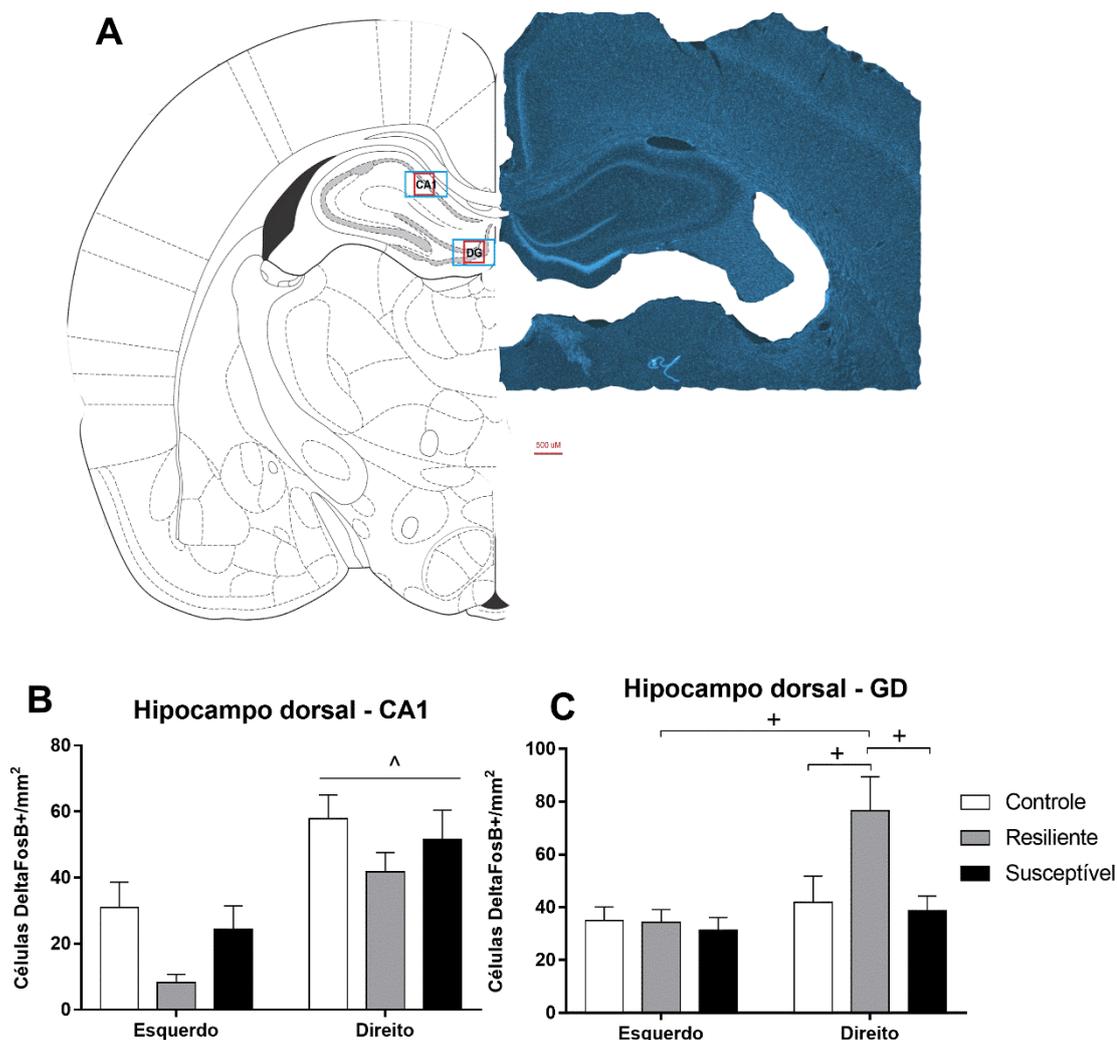
4.5.8. Quantificação de DeltaFosB no hipocampo dorsal

Foram avaliados os hemisférios direito e esquerdo das sub-regiões *Cornus Ammonis 1* (CA1) e giro denteado (GD) do HpcD (Figura 39A).

A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo do fator hemisfério ($F_{1,50} = 19,58$; $p < 0,001$) na sub-região CA1 (Figura 39B). O teste *post hoc* mostrou um maior número de células DeltaFosB positivas no hemisfério direito do CA1.

Em relação ao GD (Figura 39C), a ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo do fenótipo ($F_{2,51} = 4,11$; $p < 0,05$), hemisfério ($F_{1,51} = 9,43$; $p < 0,01$), e da interação entre os fatores ($F_{2,51} = 3,50$; $p < 0,05$). Houve um aumento significativo do número de células DeltaFosB positivas apenas no hemisfério direito do GD dos animais resilientes ao EDS, quando comparados ao grupo controle (Controle, hemisfério direito = $42 \pm 10,5$ x Resiliente, hemisfério direito = $77 \pm 12,2$; $p < 0,01$), susceptível (Resiliente, hemisfério direito = $77 \pm 12,2$ x Susceptível, hemisfério direito = $39 \pm 6,2$; $p < 0,01$) e em relação ao próprio grupo no hemisfério esquerdo (Resiliente, hemisfério direito = $77 \pm 12,2$ x Resiliente, hemisfério esquerdo = $34 \pm 5,0$; $p < 0,01$).

Figura 39 - Quantificação das células positivas para DeltaFosB hipocampo dorsal e suas sub-regiões de animais susceptíveis e resilientes ao estresse de derrota social no experimento 5. Os animais foram perfundidos e os encéfalos retirados 24 horas após o teste de interação social. A, secção coronal contendo a região de fotomicrografia do hipocampo dorsal e suas sub-regiões. A esquerda, prancha representativa do atlas de coordenadas estereotáxicas. A direita, fotomicrografia representativa da região selecionada marcada com o DAPI com auxílio da objetiva de 2,5x (aumento total de 25x). O retângulo azul indica a região fotografada para contagem das células com auxílio da objetiva de 20x (aumento total de 200x), enquanto o retângulo vermelho indica a região demarcada para contagem; B, quantificação do número de células DeltaFosB positivas no *Cornus ammonis 1* do hipocampo dorsal; C, quantificação do número de células DeltaFosB positivas no giro denteado do hipocampo dorsal. As barras representam a média + EPM (n = 8-10 animais/grupo). CA1, *Cornus ammonis 1*; GD, giro denteado. ^, $p < 0,05$ em relação a todos os grupos do hemisfério oposto; +, $p < 0,05$ em relação ao grupo apontado.



Fonte: próprio autor, 2021.

4.5.9. Quantificação de DeltaFosB na amígdala

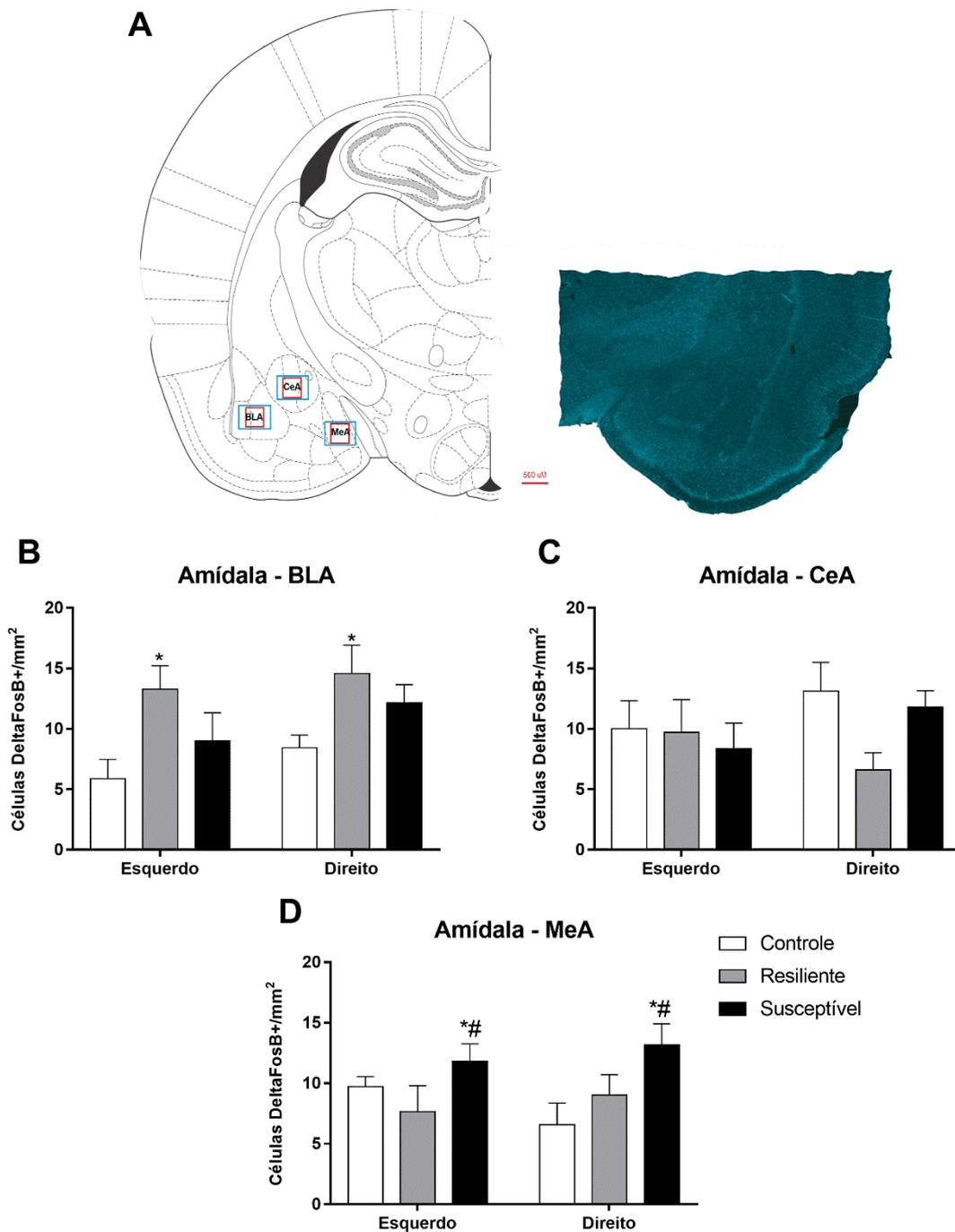
Foram avaliados os hemisférios direito e esquerdo das sub-regiões basolateral (BLA), central (CeA) e medial (MeA) da Ami (Figura 40A) em relação a expressão de DeltaFosB.

Na BLA (Figura 40B), a ANOVA de duas vias mostrou um efeito significativo do fator fenótipo ($F_{2,47} = 6,75$; $p < 0,01$). Houve um aumento significativo no número de células DeltaFosB positivas no grupo resiliente quando comparado ao grupo controle (Controle, hemisfério esquerdo = $6 \pm 1,5$; hemisfério direito = $8 \pm 1,1$ x Resiliente, hemisfério esquerdo = $13 \pm 1,8$; hemisfério direito = $15 \pm 2,3$; $p < 0,01$).

Não foram encontradas diferenças significativas na contagem de neurônios da CeA (Figura 40C).

A ANOVA de duas vias mostrou um efeito significativo do fator fenótipo ($F_{2,48} = 4,45$; $p < 0,05$) na MeA (Figura 40D). A análise *post hoc* revelou um aumento de DeltaFosB nos animais susceptíveis em relação ao grupo controle (Controle, hemisfério esquerdo = $10 \pm 0,8$; hemisfério direito = $7 \pm 1,8$ x Susceptível, hemisfério esquerdo = $12 \pm 1,5$; hemisfério direito = $13 \pm 1,8$; $p < 0,05$) e ao fenótipo resiliente (Resiliente, hemisfério esquerdo = $8 \pm 2,2$; hemisfério direito = $9 \pm 1,7$ x Susceptível, hemisfério esquerdo = $12 \pm 1,5$; hemisfério direito = $13 \pm 1,8$; $p < 0,05$).

Figura 40 - Quantificação das células positivas para DeltaFosB na amígdala e suas sub-regiões de animais susceptíveis e resilientes ao estresse de derrota social no experimento 5. Os animais foram perfundidos e os encéfalos retirados 24 horas após o teste de interação social. A, secção coronal contendo a região de fotomicrografia da amígdala e suas sub-regiões. A esquerda, prancha representativa do atlas de coordenadas estereotáxicas. A direita, fotomicrografia representativa da região selecionada marcada com o DAPI com auxílio da objetiva de 2,5x (aumento total de 25x). O retângulo azul indica a região fotografada para contagem das células com auxílio da objetiva de 20x (aumento total de 200x), enquanto o retângulo vermelho indica a região demarcada para contagem; B, quantificação do número de células DeltaFosB positivas na amígdala basolateral; C, quantificação do número de células DeltaFosB positivas na amígdala central; D, quantificação de células DeltaFosB positivas na amígdala medial. As barras representam a média + EPM (n = 8-10 animais/grupo). BLA, basolateral; CeA, central; MeA, medial. *, $p < 0,05$ em relação ao grupo controle no mesmo hemisfério; #, $p > 0,05$ em relação ao grupo resiliente no mesmo hemisfério; \$, $p < 0,05$ em relação ao grupo susceptível no mesmo hemisfério.



Fonte: próprio autor, 2021.

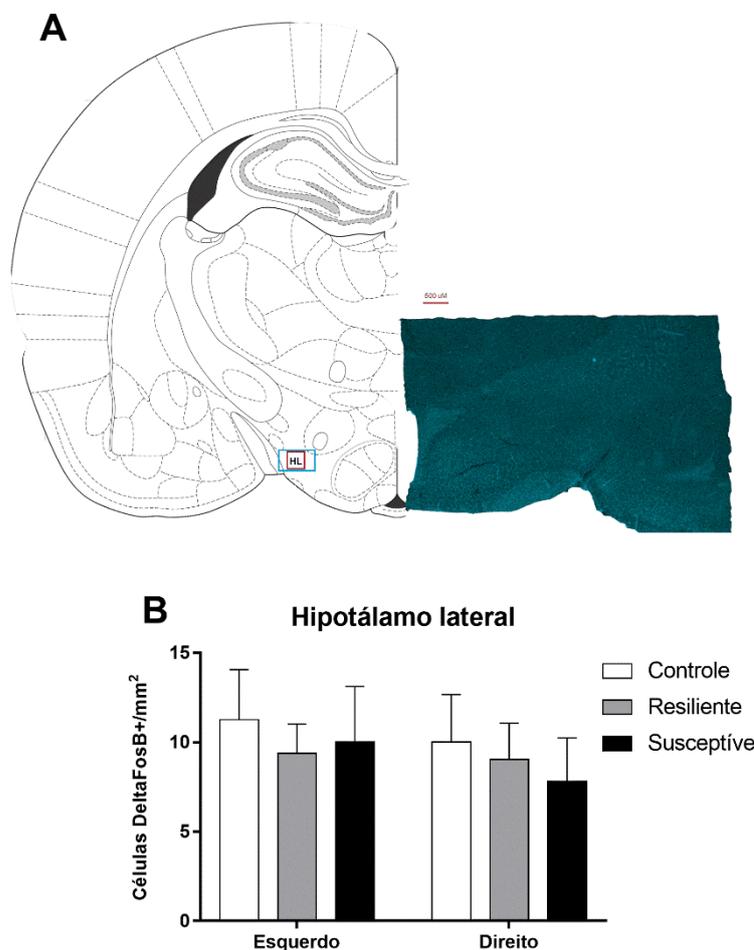
4.5.10. Quantificação de DeltaFosB no hipotálamo lateral e ventromedial

Foram comparados os hemisférios esquerdo e direito do HL (Figura 41) e das sub-regiões dorsal (HVMD) e ventrolateral (HVMVL) do HVM (Figura 42). A ANOVA

de duas vias não mostrou nenhuma alteração significativa de nenhum dos fatores analisados nas regiões de interesse citadas acima.

Figura 41 - Quantificação das células positivas para DeltaFosB no hipotálamo lateral de animais susceptíveis e resilientes ao estresse de derrota social no experimento 5.

Os animais foram perfundidos e os encéfalos retirados 24 horas após o teste de interação social. A, secção coronal contendo a região de fotomicrografia do hipotálamo lateral. A esquerda, prancha representativa do atlas de coordenadas estereotáxicas. A direita, fotomicrografia representativa da região selecionada marcada com o DAPI com auxílio da objetiva de 2,5x (aumento total de 25x). O retângulo azul indica a região fotografada para contagem das células com auxílio da objetiva de 20x (aumento total de 200x), enquanto o retângulo vermelho indica a região demarcada para contagem; B, quantificação do número de células DeltaFosB positivas no hipotálamo lateral. As barras representam a média + EPM (n = 9-10 animais/grupo). HL, hipotálamo lateral.

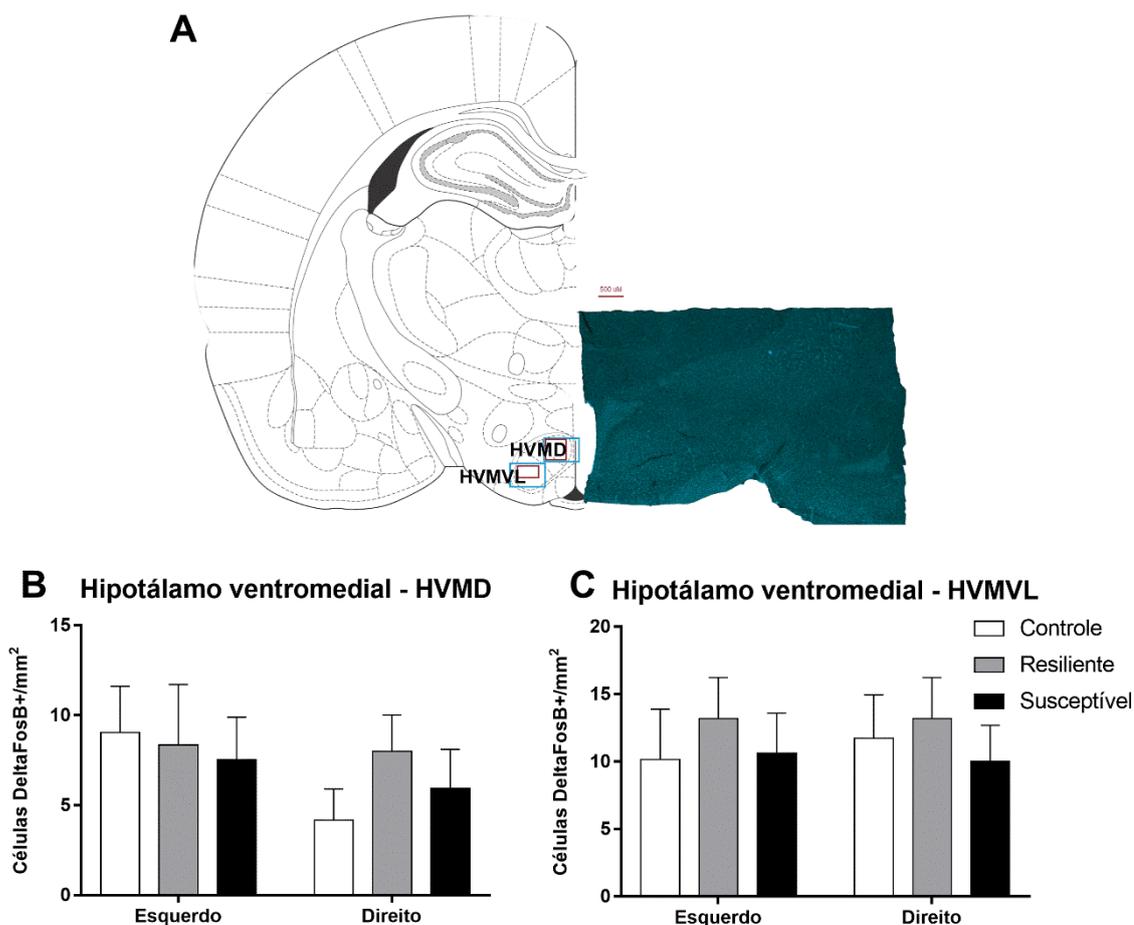


Fonte: próprio autor, 2021.

Figura 42 - Quantificação das células positivas para DeltaFosB no hipotálamo ventromedial e suas sub-regiões de animais susceptíveis e resilientes ao estresse de derrota social no experimento 5. Os animais foram perfundidos e os encéfalos retirados 24 horas após o teste de interação social. A, secção coronal contendo a

região de fotomicrografia do hipotálamo ventromedial e suas sub-regiões. A esquerda, prancha representativa do atlas de coordenadas estereotáticas. A direita, fotomicrografia representativa da região selecionada marcada com o DAPI com auxílio da objetiva de 2,5x (aumento total de 25x). O retângulo azul indica a região fotografada para contagem das células com auxílio da objetiva de 20x (aumento total de 200x), enquanto o retângulo vermelho indica a região demarcada para contagem;

B, quantificação do número de células DeltaFosB positivas no hipotálamo ventromedial dorsal; C, quantificação do número de células DeltaFosB positivas no hipotálamo ventromedial Ventrolateral. As barras representam a média + EPM (n = 8-10 animais/grupo). HVMD, dorsal; HVMVL, ventrolateral.



4.5.11. Quantificação de DeltaFosB na matéria cinzenta periaquedutal

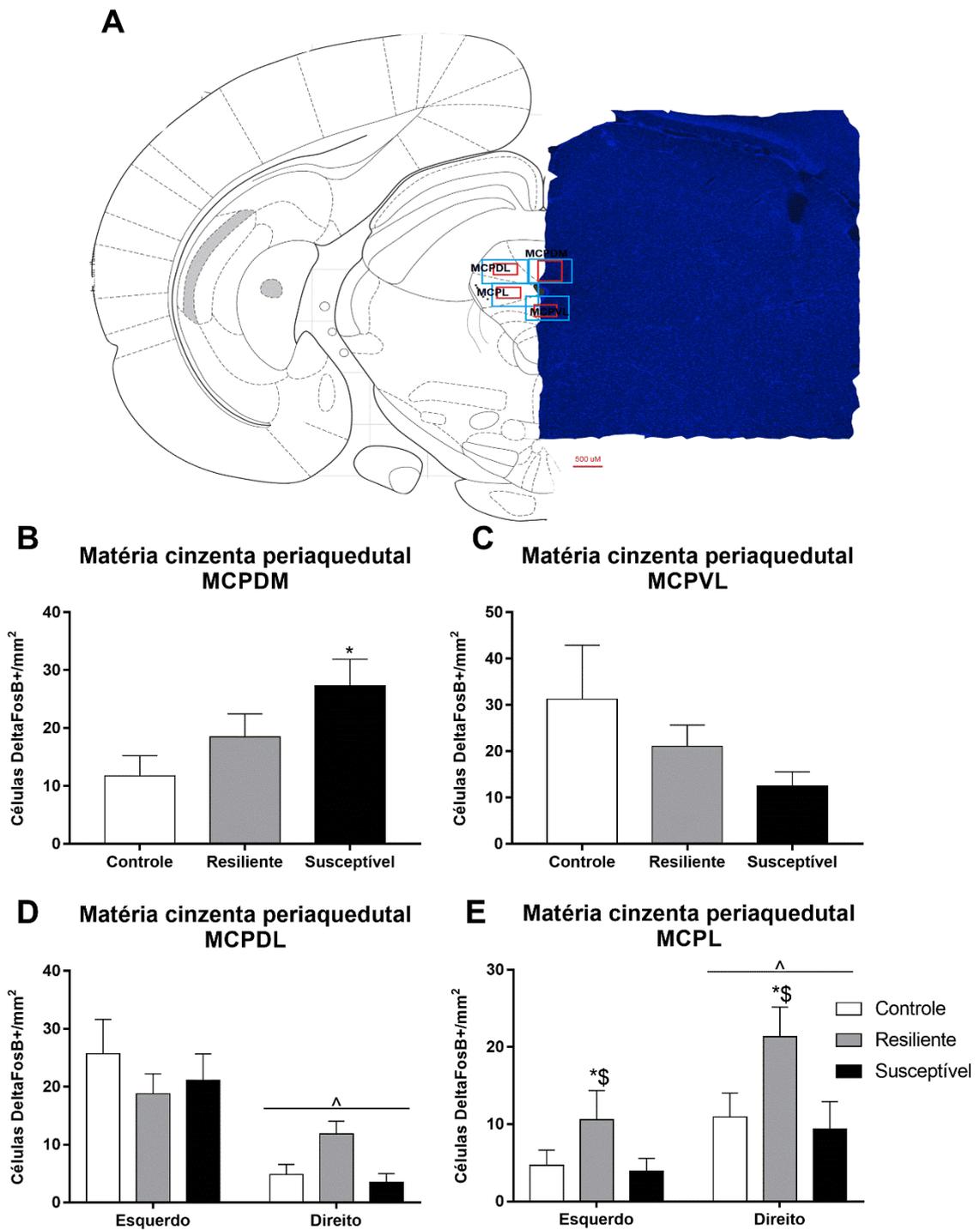
Foram analisadas as sub-regiões dorsomedial (MCPDM), ventrolateral (MCPVL) e os hemisférios direito e esquerdo das sub-regiões dorsolateral (MCPDL) e lateral (MCPL) da MCP (Figura 43A).

A ANOVA de uma via revelou um efeito significativo do fator fenótipo ($F_{2,23} = 3,45$; $p < 0,05$) na MCPDM (Figura 43B). Foi encontrado um aumento de DeltaFosB nos animais susceptíveis quando comparados ao grupo controle (Controle = $12 \pm 3,3$ x Susceptível = $27 \pm 4,0$; $p < 0,05$). Não foram encontradas alterações significativas na MCPVL (Figura 43C).

Foi encontrado um efeito significativo do fator hemisfério ($F_{1,47} = 26,90$; $p < 0,001$) na MCPDL (Figura 43D), onde o número de células DeltaFosB positivas foi maior no hemisfério esquerdo quando comparado ao direito.

A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo do fator fenótipo ($F_{2,46} = 5,18$; $p < 0,01$) e do fator hemisfério ($F_{1,46} = 7,82$; $p < 0,01$) na MCPL (Figura 43E). A análise *post hoc* mostrou que os animais do grupo resiliente apresentaram um maior número de células DeltaFosB positivas quando comparados aos animais do grupo susceptível (Resiliente, hemisfério esquerdo = $11 \pm 3,7$; hemisfério direito = $21 \pm 3,9$ x Susceptível, hemisfério esquerdo = $4 \pm 1,6$; hemisfério direito = $9 \pm 3,5$; $p < 0,05$) e controle (Resiliente, hemisfério esquerdo = $11 \pm 3,7$; hemisfério direito = $21 \pm 3,9$ x Controle, hemisfério esquerdo = $5 \pm 2,0$; hemisfério direito = $11 \pm 3,1$; $p < 0,05$) independente do hemisfério analisado. Além disso, o número de células DeltaFosB positivas foi maior no hemisfério direito quando comparado ao esquerdo.

Figura 43 - Quantificação das células positivas para DeltaFosB matéria cinzenta periaquedutal e suas sub-regiões de animais susceptíveis e resilientes ao estresse de derrota social no experimento 5. Os animais foram perfundidos e os encéfalos retirados 24 horas após o teste de interação social. A, secção coronal contendo a região de fotomicrografia matéria cinzenta periaquedutal e suas sub-regiões. A esquerda, prancha representativa do atlas de coordenadas estereotáxicas. A direita, fotomicrografia representativa da região selecionada marcada com o DAPI com auxílio da objetiva de 2,5x (aumento total de 25x). O retângulo azul indica a região fotografada para contagem das células com auxílio da objetiva de 20x (aumento total de 200x), enquanto o retângulo vermelho indica a região demarcada para contagem; B, quantificação do número de células DeltaFosB positivas na matéria cinzenta periaquedutal dorsomedial; C, quantificação do número de células DeltaFosB positivas na matéria cinzenta periaquedutal ventrolateral; D, quantificação do número de células DeltaFosB positivas na matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral; E, quantificação do número de células DeltaFosB positivas na matéria cinzenta periaquedutal lateral. As barras representam a média + EPM (n = 7-10 animais/grupo). MCPDM, dorsomedial; MCPVL, ventrolateral; MCPDL, dorsolateral; MCPL, lateral. *, $p < 0,05$ em relação ao grupo controle no mesmo hemisfério; #, $p > 0,05$ em relação ao grupo resiliente no mesmo hemisfério; \$, $p < 0,05$ em relação ao grupo susceptível no mesmo hemisfério; ^, $p < 0,05$ em relação a todos os grupos do hemisfério oposto.



Fonte: próprio autor, 2021.

4.6. EXPERIMENTO 6: ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES EM RATOS SUSCEPTÍVEIS E RESILIENTES AO ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL

4.6.1. Avaliação da interação social por meio do TIS

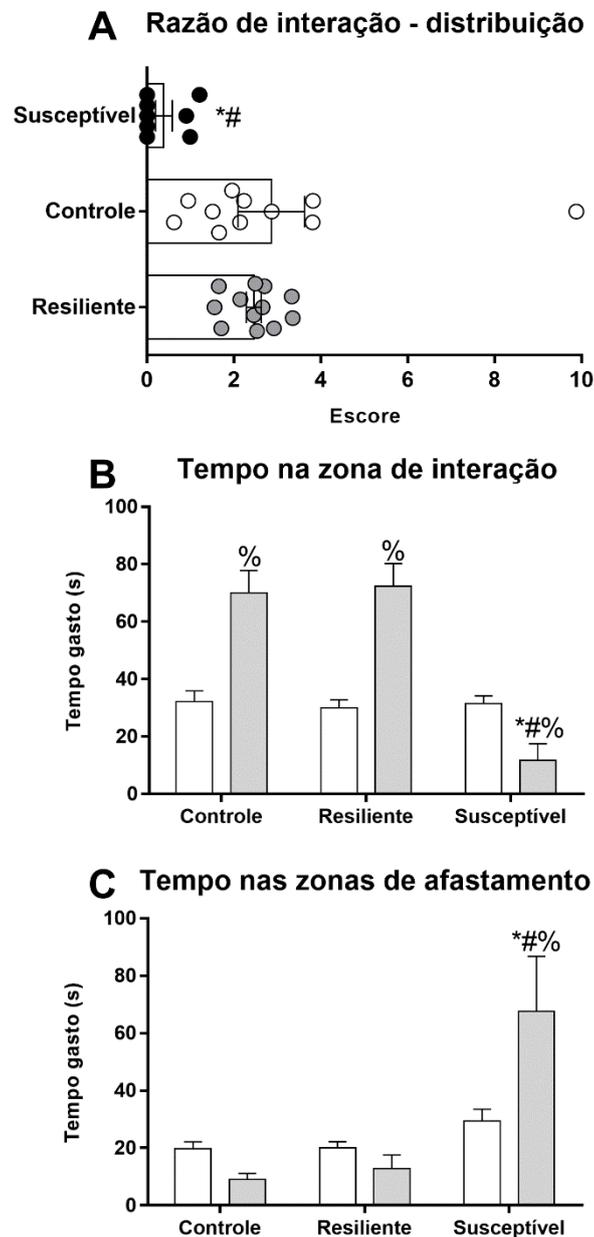
Foram obtidos 60% de animais resilientes ao EDS. A ANOVA de uma via da RI (Figura 44A) mostrou efeito significativo do fator fenótipo ($F_{2,28} = 6,18$; $p < 0,01$). O teste *post hoc* de Newman-Keuls revelou evitação social nos animais susceptíveis em relação ao grupo controle (Controle = $2,9 \pm 0,77$ x Susceptível = $0,4 \pm 0,19$; $p < 0,01$) e resiliente (Resiliente = $2,5 \pm 0,17$ x Susceptível = $0,4 \pm 0,19$; $p < 0,01$).

O tempo gasto na zona de interação (Figura 44B) também foi diferente entre os fenótipos. A ANOVA de medidas repetidas revelou efeito significativo dos fatores fenótipo ($F_{2,28} = 12,59$; $p < 0,001$), sessão ($F_{1,28} = 20,71$; $p < 0,001$), e da interação entre esses fatores ($F_{2,28} = 18,22$; $p < 0,001$). O teste de Newman-Keuls mostrou um maior tempo de permanência na zona de interação com o alvo presente nos animais do grupo controle (Sem alvo = $32,1 \pm 3,7$ x Com alvo = $70,1 \pm 7,7$; $p < 0,001$) e resiliente (Sem alvo = $29,9 \pm 2,9$ x Com alvo = $72,3 \pm 7,9$; $p < 0,001$), enquanto os animais do grupo susceptível permaneceram menos tempo na zona de interação com o alvo presente (Sem alvo = $31,5 \pm 2,7$ x Com alvo = $11,7 \pm 5,9$; $p < 0,05$). Os animais susceptíveis ao EDS também permaneceram menos tempo na zona de interação com o alvo presente em relação aos animais do grupo controle (Controle = $70,1 \pm 7,7$ x Susceptível = $11,7 \pm 5,9$; $p < 0,001$) e resiliente (Resiliente = $72,3 \pm 7,9$ x Susceptível = $11,7 \pm 5,9$; $p < 0,001$).

A ANOVA de medidas repetidas revelou um efeito significativo do fator fenótipo ($F_{2,28} = 14,58$; $p < 0,001$) e da interação entre os fatores fenótipo e sessão ($F_{2,28} = 6,74$; $p < 0,01$) em relação ao tempo de permanência nas zonas de afastamento (Figura 44C). Os animais do grupo susceptível permaneceram mais tempo nas zonas de afastamento com o alvo presente em relação à sessão sem alvo (Sem alvo = $29,4 \pm 4,2$ x Com alvo = $67,6 \pm 19,1$; $p < 0,001$) e em relação à sessão com alvo dos grupos controle (Controle = $9,0 \pm 2,1$ x Susceptível = $67,6 \pm 19,1$; $p < 0,001$) e resiliente (Resiliente = $12,8 \pm 4,7$ x Susceptível = $67,6 \pm 19,1$; $p < 0,001$).

Figura 44 - Razão de interação e tempo de permanência nas zonas delimitadas no teste de interação social dos fenótipos susceptível e resiliente ao estresse de derrota social no experimento 6. Os animais foram testados 24 horas após o último episódio de estresse. A, distribuição da razão de interação; B, tempo de permanência (em segundos) na zona de interação; C, tempo de permanência (em segundos) nas zonas de afastamento. As barras representam a média + EPM ($n = 8-12$ animais/grupo). *, $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle; #, $p < 0,05$ em relação ao

grupo Resiliente; %, $p < 0,05$ em relação ao tempo gasto durante a sessão sem alvo do respectivo grupo.



Fonte: próprio autor, 2021.

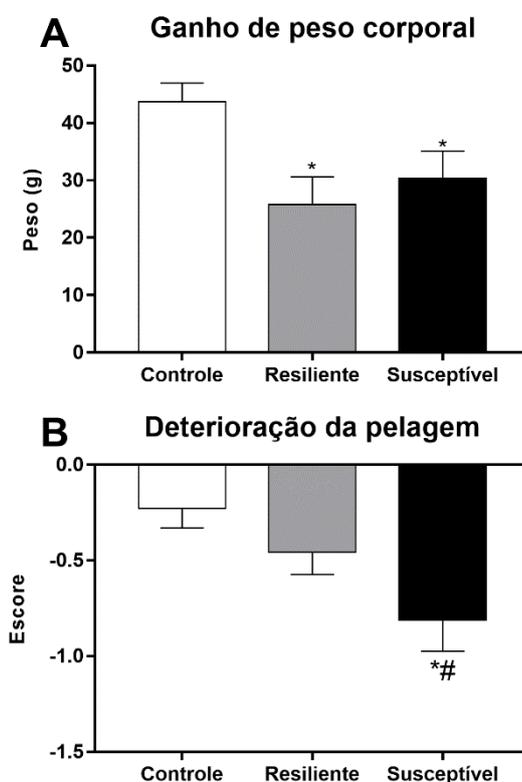
4.6.2. Avaliação do estado físico dos animais

A ANOVA de uma via do ganho de peso corporal (Figura 45A) mostrou efeito significativo do fator fenótipo ($F_{2,26} = 4,83$; $p < 0,05$). O teste *post hoc* de Newman-Keuls revelou que ambos os fenótipos (susceptível e resiliente) ganharam menos peso

no decorrer do estresse social em relação ao grupo controle (Controle = $43,7 \pm 3,2$ x Resiliente = $25,7 \pm 4,9$; $p < 0,05$; x Susceptível = $30,4 \pm 4,7$; $p < 0,05$).

Em relação à deterioração da pelagem (Figura 45B), a ANOVA de uma via revelou efeito significativo do fator fenótipo ($F_{2,28} = 5,07$; $p < 0,05$). O teste *post hoc* de Newman-Keuls mostrou uma maior deterioração da pelagem no grupo susceptível ao EDS em relação ao grupo controle (Controle = $-0,23 \pm 0,10$ x Susceptível = $-0,81 \pm 0,16$; $p < 0,01$) e resiliente (Resiliente = $-0,46 \pm 0,11$ x Susceptível = $-0,81 \pm 0,16$; $p = 0,05$).

Figura 45 - Estado físico dos fenótipos susceptível e resiliente ao estresse de derrota social no experimento 6. A avaliação do peso corporal e estado da pelagem foi feita logo antes do primeiro episódio de derrota social e logo antes do teste de interação social, 24 horas após o último episódio de derrota social. A, ganho de peso corporal (em gramas), avaliado pela diferença do peso corporal entre a última e a primeira avaliação; B, deterioração da pelagem, avaliada pela diferença do escore de estado do pelo entre a última e primeira avaliação. As barras representam a média + EPM (n = 8-12 animais/grupo). *, $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle; #, $p < 0,05$ em relação ao grupo Resiliente.



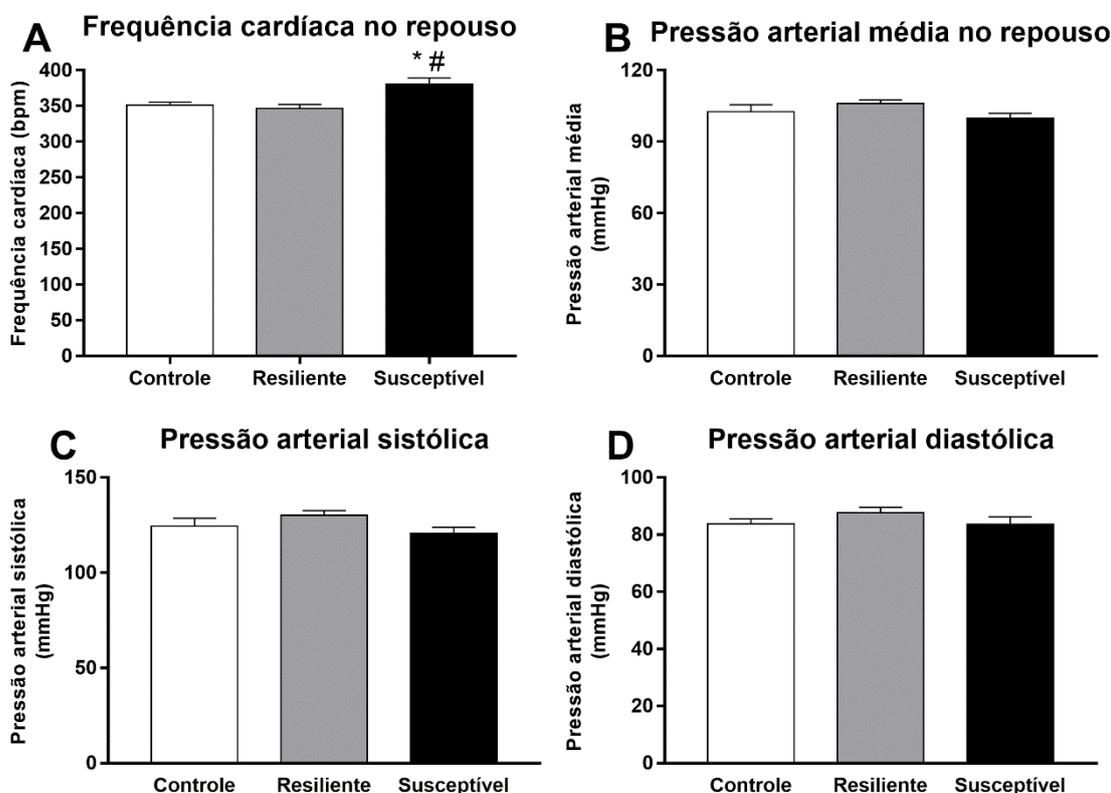
Fonte: próprio autor, 2021.

4.6.3. Avaliação dos parâmetros cardiovasculares durante o repouso

Os animais susceptíveis ao EDS apresentaram taquicardia durante o repouso (Figura 46A). A ANOVA de uma via mostrou efeito significativo do fator fenótipo ($F_{2,19} = 8,20$; $p < 0,01$) em relação a esse parâmetro. Os animais susceptíveis ao EDS apresentaram maior FC em relação aos animais dos grupos controle (Controle = 351 ± 4 x Susceptível = 381 ± 9 ; $p < 0,01$) e resiliente (Resiliente = 346 ± 6 x Susceptível = 381 ± 9 ; $p < 0,01$).

Em relação à PA, não foram encontradas alterações significativas de PAM (Figura 46B), PAS (Figura 46C) e PAD (Figura 46D).

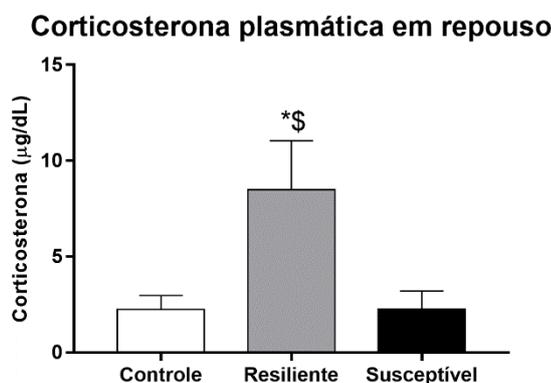
Figura 46 - Frequência cardíaca, pressão arterial média, sistólica e diastólica durante o repouso em animais resilientes e susceptíveis ao estresse de derrota social no experimento 6. A avaliação dos parâmetros cardiovasculares durante o repouso foi realizada 72 horas após o último episódio de derrota social. A, frequência cardíaca no repouso; B, pressão arterial média no repouso; C, pressão arterial sistólica no repouso; D, pressão arterial diastólica no repouso. As barras representam a média + EPM ($n = 6-8$ animais/grupo). *, $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle; #, $p < 0,05$ em relação ao grupo Resiliente.



Fonte: próprio autor, 2021.

Houve um aumento na concentração plasmática de corticosterona nos animais resilientes durante o repouso (Figura 47). A ANOVA de uma via mostrou efeito significativo do fator fenótipo ($F_{2,19} = 4,52$; $p < 0,05$). O teste *post hoc* de Newman-Keuls revelou um aumento na concentração plasmática de corticosterona nos animais resilientes quando comparados ao grupo controle (Controle = $2,2 \pm 0,7$ x Resiliente = $8,5 \pm 2,5$; $p = 0,05$) e susceptível (Resiliente = $8,5 \pm 2,5$ x Susceptível = $2,3 \pm 0,9$; $p = 0,05$).

Figura 47 - Corticosterona plasmática durante o repouso em animais resilientes e susceptíveis ao estresse de derrota social no experimento 6, 72 horas após o último episódio de derrota social. As barras representam a média + EPM (n = 6-8 animais/grupo). *, $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle; \$, $p < 0,05$ em relação ao grupo Susceptível.



Fonte: próprio autor, 2021.

4.6.4. Avaliação espectral da variabilidade cardíaca durante o repouso

A ANOVA de uma via revelou efeito significativo do fator fenótipo ($F_{2,19} = 19,04$; $p < 0,001$) na análise espectral do IP (indicativo da VFC) (Figura 48A). A análise *post hoc* mostrou um aumento da VFC nos animais resilientes ao EDS em relação ao grupo controle (Controle = $16,8 \pm 2,5$ x Resiliente = $30,9 \pm 3,0$; $p < 0,01$) e susceptível (Resiliente = $30,9 \pm 3,0$ x Susceptível = $8,4 \pm 1,2$; $p < 0,001$), e uma diminuição nos animais susceptíveis em relação ao controle (Controle = $16,8 \pm 2,5$ x Susceptível = $8,4 \pm 1,2$; $p < 0,05$).

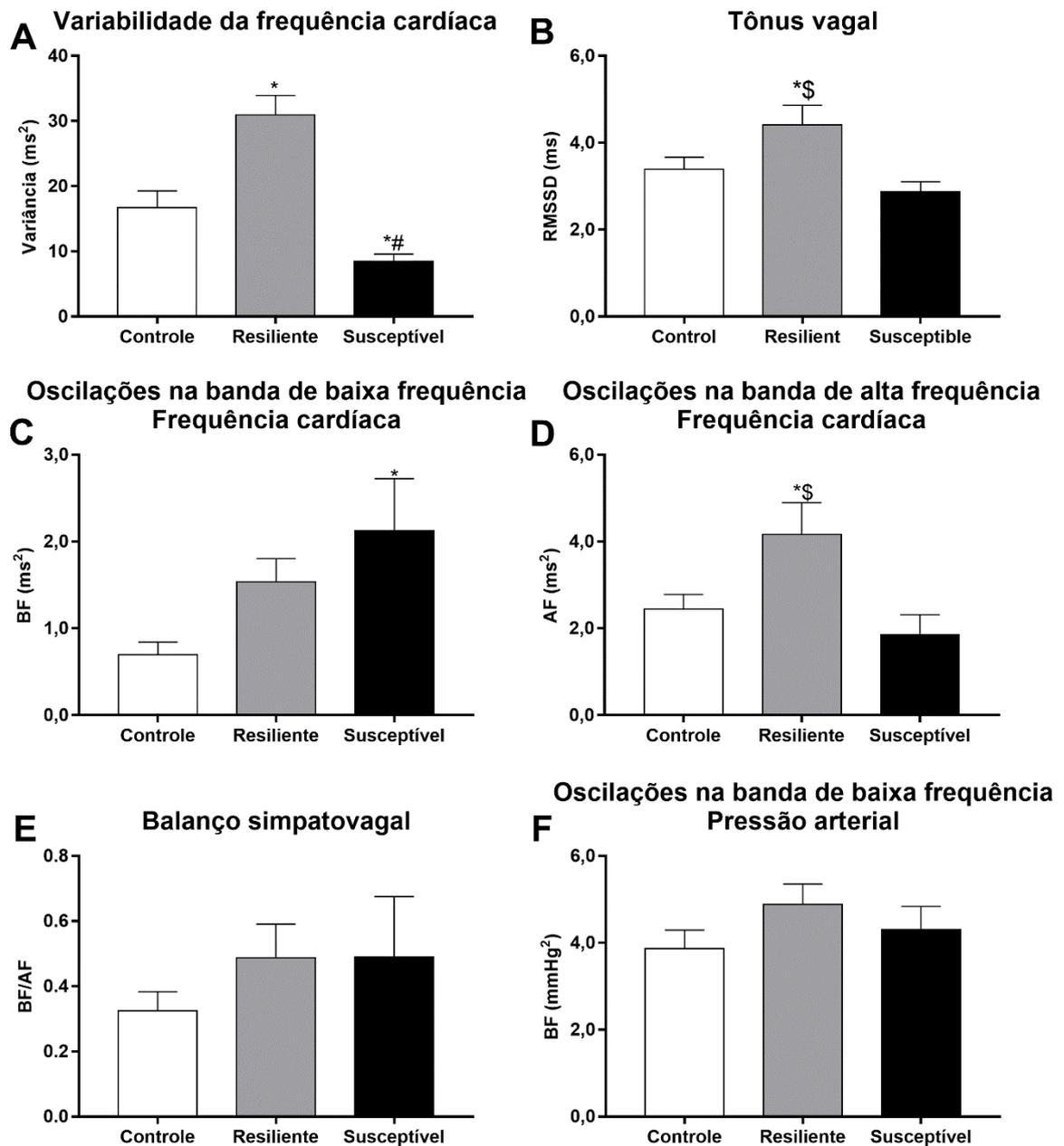
A ANOVA de uma via mostrou efeito significativo do fator fenótipo ($F_{2,19} = 4,88$; $p < 0,05$) na RMSSD (Figura 48B). A análise *post hoc* mostrou um aumento desse parâmetro em relação ao grupo controle (Controle = $3,4 \pm 0,3$ x Resiliente = $4,4 \pm 0,4$; $p < 0,05$) e susceptível (Susceptível = $2,9 \pm 0,2$ x Resiliente = $4,4 \pm 0,4$; $p < 0,05$).

A ANOVA de uma via revelou efeito significativo do fator fenótipo em relação ao poder da banda de BF ($F_{2,19} = 4,38$; $p < 0,05$) (Figura 48C). Os animais susceptíveis apresentaram um aumento no poder da banda de BF da análise espectral em relação aos animais controle (Controle = $0,7 \pm 0,1$ x Susceptível = $2,1 \pm 0,6$; $p < 0,05$). De maneira semelhante, a ANOVA de uma via mostrou efeito significativo do fator fenótipo em relação ao poder da banda de AF ($F_{2,19} = 4,67$; $p < 0,05$) (Figura 48D), onde os animais resilientes apresentaram um aumento do poder da banda de AF em relação aos animais do grupo controle (Controle = $2,4 \pm 0,3$ x Resiliente = $4,2 \pm 0,7$; $p < 0,05$) e susceptível (Susceptível = $1,9 \pm 0,5$ x Resiliente = $4,2 \pm 0,7$; $p < 0,05$).

Não foram encontradas diferenças significativas na relação entre o poder das bandas BF e AF, relacionada ao balanço simpátovagal (Figura 48E).

Não foram encontradas diferenças significativas no poder da banda de BF na análise espectral da pressão arterial (Figura 48F).

Figura 48 - Análise da variabilidade da frequência cardíaca e pressão arterial em animais resilientes e susceptíveis ao estresse de derrota social no experimento 6. A análise da variabilidade da frequência cardíaca e pressão arterial durante o repouso foi realizada 72 horas após o último episódio de derrota social. A, variabilidade da frequência cardíaca total durante o repouso (em ms^2); B, tônus vagal obtido por meio da raiz quadrada da média das diferenças entre intervalos de pulso consecutivos (em ms) durante o repouso; C, poder da banda de baixa frequência da análise espectral da frequência cardíaca durante o repouso (em ms^2); D, poder da banda de alta frequência da análise espectral da frequência cardíaca durante o repouso (em ms^2); E, balanço simpátovagal, obtido pela relação entre as oscilações na banda de baixa e alta frequência da frequência cardíaca durante o repouso; F, poder da banda de baixa frequência da análise espectral da pressão arterial média durante o repouso (em $mmHg^2$). As barras representam a média + EPM ($n = 6-8$ animais/grupo). *, $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle; #, $p < 0,05$ em relação ao grupo Resiliente; \$, $p < 0,05$ em relação ao grupo Susceptível.



Fonte: próprio autor, 2021.

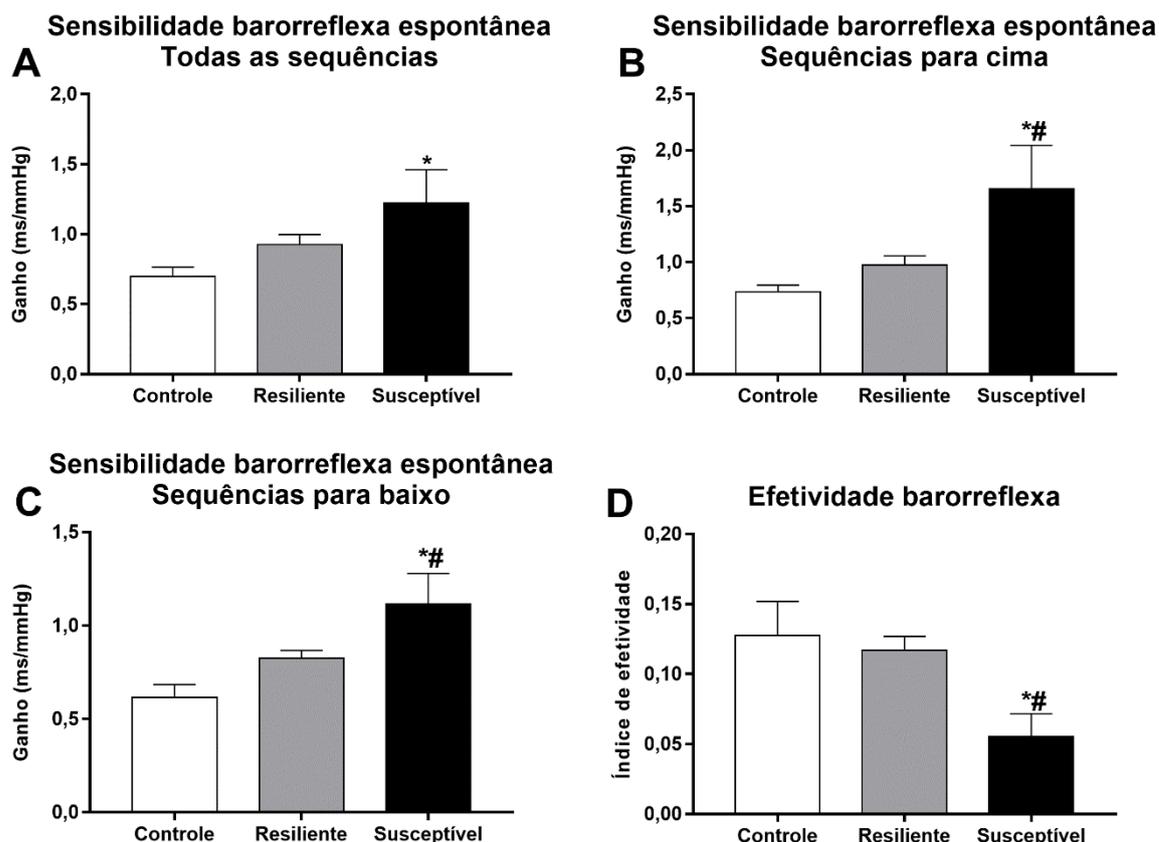
4.6.5. Avaliação da sensibilidade e efetividade barorreflexa

Os resultados da avaliação da sensibilidade barorreflexa espontânea sugerem um aumento da sensibilidade nos animais susceptíveis ao EDS. A ANOVA de uma via da inclinação da regressão linear de todas as sequências barorreflexas (Figura 49A) revelou um efeito significativo do fator fenótipo ($F_{2,19} = 3,95$; $p < 0,05$). Os animais susceptíveis apresentaram valores mais altos em relação aos animais do grupo

controle (Controle = $0,70 \pm 0,07$ x Susceptível = $1,22 \pm 0,24$; $p < 0,05$). Em relação às sequências para cima (Figura 49B), a ANOVA de uma via revelou efeito significativo do fator fenótipo ($F_{2,19} = 5,55$; $p < 0,05$), onde os animais susceptíveis apresentaram maiores valores da inclinação da regressão linear em relação ao grupo controle (Controle = $0,81 \pm 0,09$ x Susceptível = $1,65 \pm 0,39$; $p < 0,05$) e resiliente (Resiliente = $0,97 \pm 0,08$ x Susceptível = $1,65 \pm 0,39$; $p < 0,05$). O mesmo foi obtido para sequências para baixo (Figura 49C). A ANOVA de uma via revelou um efeito significativo do fator fenótipo ($F_{2,19} = 6,96$; $p < 0,01$). Os animais susceptíveis apresentaram valores mais altos em relação aos animais do grupo controle (Controle = $0,62 \pm 0,07$ x Susceptível = $1,12 \pm 0,16$; $p < 0,01$) e resiliente (Resiliente = $0,82 \pm 0,04$ x Susceptível = $1,12 \pm 0,16$; $p < 0,05$).

A efetividade do barorreflexo também foi alterada (Figura 49D). A ANOVA de uma via revelou efeito significativo do fator fenótipo ($F_{2,19} = 4,09$; $p < 0,05$), onde os animais susceptíveis apresentaram menores valores em relação ao grupo controle (Controle = $0,13 \pm 0,02$ x Susceptível = $0,06 \pm 0,02$, $p < 0,05$) e resiliente (Resiliente = $0,12 \pm 0,01$ x Susceptível = $0,06 \pm 0,02$, $p < 0,05$), indicando uma diminuição da efetividade do barorreflexo.

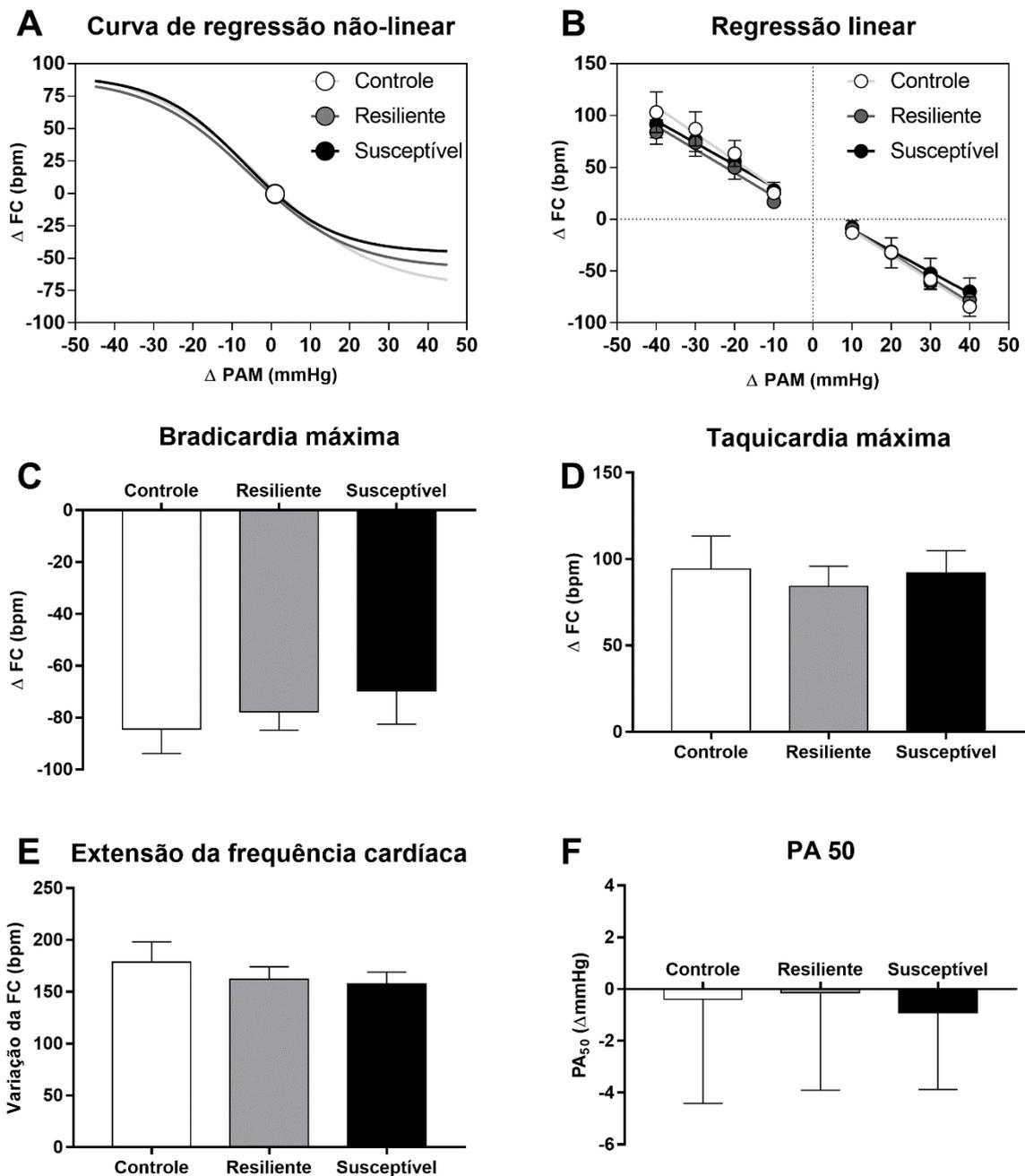
Figura 49 - Sensibilidade e efetividade do barorreflexo espontâneo avaliado durante o repouso em animais susceptíveis e resilientes ao estresse de derrota social no experimento 6. A análise da sensibilidade e efetividade do barorreflexo espontâneo durante o repouso foi realizada 72 horas após o último episódio de derrota social. Ganho do barorreflexo espontâneo (em ms/mmHg) obtido por meio da análise de A, todas as sequências barorreflexas, B, sequências para cima (aumento de PA e IP) e C, sequências para baixo (diminuição da PA e IP) durante o repouso; D, índice de efetividade do barorreflexo durante o repouso. As barras representam a média + EPM (n = 6-8 animais/grupo). *, $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle; #, $p < 0,05$ em relação ao grupo Resiliente.



Fonte: próprio autor, 2021.

Não foram encontradas diferenças significativas em nenhum dos parâmetros analisados na avaliação da sensibilidade barorreflexa frente ao estímulo farmacológico (Figura 50).

Figura 50 - Sensibilidade do barorreflexo frente a um estímulo farmacológico em animais susceptíveis e resilientes ao estresse crônico de derrota social no experimento 6. A análise da sensibilidade do barorreflexo frente a um estímulo farmacológico foi realizada 72 horas após o último episódio de derrota social. Após 60 minutos de registro no repouso os animais receberam administração endovenosa de fenilefrina e nitroprussiato de sódio. A, regressão não-linear e B, regressão linear do barorreflexo correlacionando a variação da pressão arterial média (em mmHg) e da frequência cardíaca (em bpm); C, bradicardia máxima (em bpm) frente à administração de fenilefrina; D, taquicardia máxima (em bpm) frente a administração de nitroprussiato de sódio; E, extensão da variação da frequência cardíaca (em bpm); F, pressão arterial (em mmHg) cuja variação elicia 50% da extensão da resposta de frequência cardíaca. As barras representam a média + EPM (n = 6-8 animais/grupo).



Fonte: próprio autor, 2021.

4.6.6. Avaliação dos parâmetros cardiovasculares durante o estresse de restrição

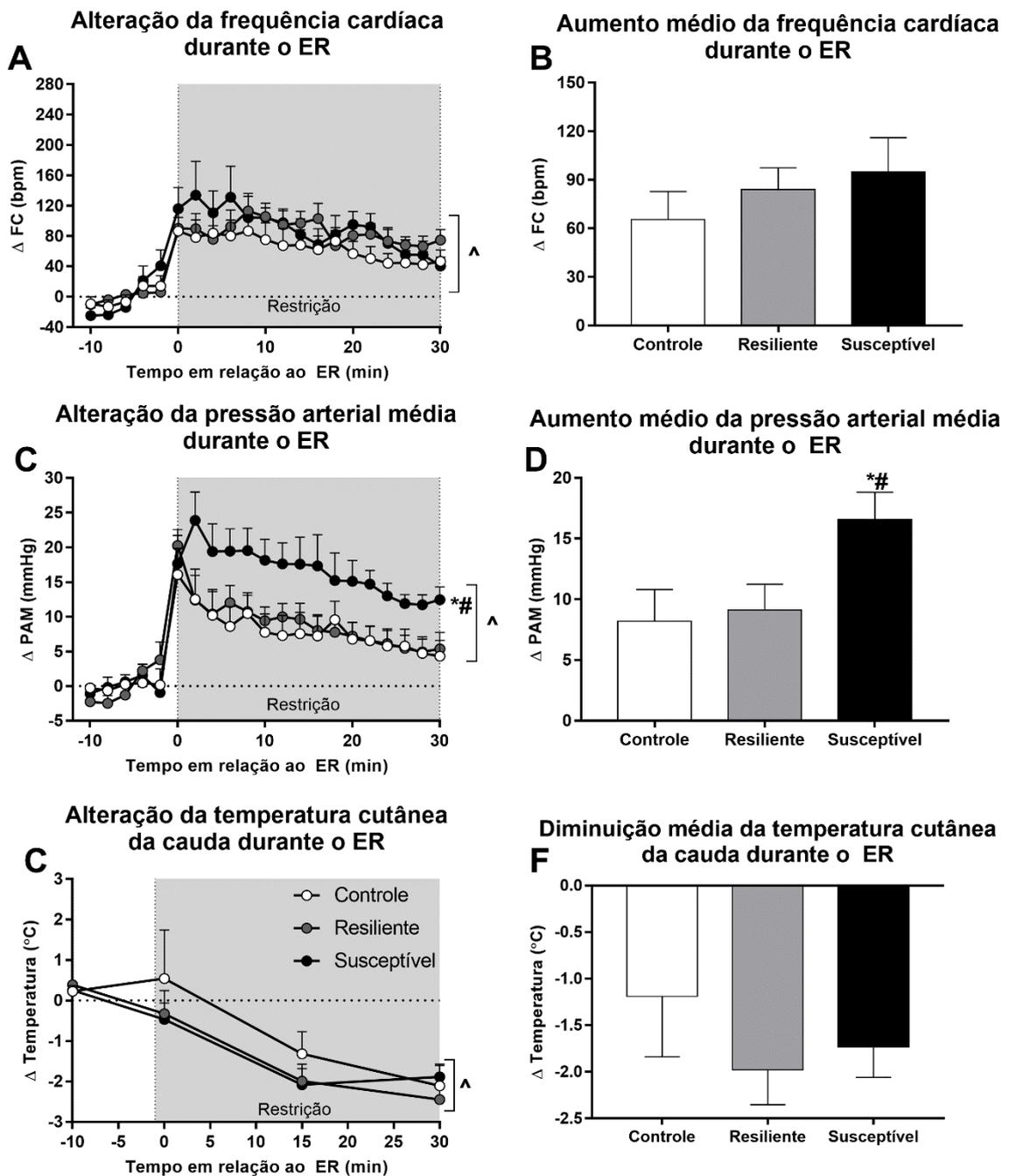
A resposta de FC frente a um novo estressor não foi diferente entre os fenótipos. A ANOVA de medidas repetidas mostrou um efeito significativo apenas para o fator restrição ($F_{20,380} = 22.52$, $p < 0.001$), mostrando um aumento significativo da FC em todos os grupos frente ao ER (Figura 51A). A análise do aumento médio da FC

durante o período de ER (Figura 51B) também não mostrou nenhuma diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

A ANOVA de medidas repetidas da análise da PA durante o ER (Figura 51C) revelou efeito significativo dos fatores restrição ($F_{20,380} = 28,62$; $p < 0,001$) e da interação entre os fatores ($F_{40,380} = 1,85$; $p < 0,001$). A análise do aumento médio da PA durante o período de ER (Figura 51D) mostrou um efeito significativo do fator fenótipo ($F_{2,19} = 3,32$; $p = 0,05$), indicando um maior aumento na PA nos animais susceptíveis ao EDS em relação aos animais controle (Controle = $8,2 \pm 2,6$ x Susceptível = $16,6 \pm 2,3$; $p = 0,05$) e resilientes (Resiliente = $9,1 \pm 2,1$ x Susceptível = $16,6 \pm 2,3$; $p < 0,05$).

Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos em relação à temperatura cutânea da cauda. A ANOVA de medidas repetidas revelou um efeito significativo do fator restrição ($F_{3,57} = 25,30$; $p < 0,001$), indicando uma queda na temperatura cutânea da cauda durante o ER (Figura 51E). A análise da diminuição média da temperatura cutânea da cauda durante o período de ER (Figura 51F) não mostrou nenhuma diferença significativa entre os fenótipos.

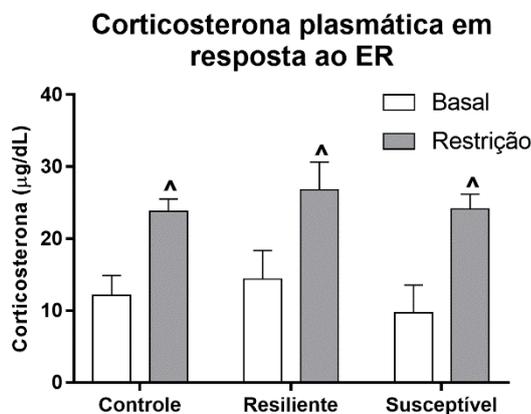
Figura 51 - Frequência cardíaca, pressão arterial e temperatura cutânea da cauda durante o estresse de restrição em animais susceptíveis e resilientes ao estresse de derrota social no experimento 6. A avaliação da resposta cardiovascular frente ao estresse de restrição foi realizada 24 horas após o registro dos parâmetros cardiovasculares basais. A, B, alterações na frequência cardíaca durante o estresse de restrição; C, D, alterações na pressão arterial média durante o estresse de restrição; E, F, alterações na temperatura cutânea da cauda frente ao estresse de restrição. As barras representam a média + EPM ($n = 6-8$ animais/grupo). *, $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle; #, $p < 0,05$ em relação ao grupo Resiliente; ^, efeito significativo do estresse de restrição.



Fonte: próprio autor, 2021.

A ANOVA de medidas repetidas revelou um efeito significativo do fator restrição ($F_{1,19} = 40,94$, $p < 0,001$) na corticosterona plasmática em resposta ao ER (Figura 52), indicando um aumento na corticosterona plasmática frente a exposição ao ER. Entretanto, não foram encontradas diferenças significativas entre os fenótipos.

Figura 52 - Corticosterona plasmática em resposta ao estresse de restrição em animais resilientes e susceptíveis ao estresse de derrota social no experimento 6, 96 horas após o último episódio de derrota social. As barras representam a média + EPM (n = 6-8 animais/grupo). ^, p < 0,05 em relação à corticosterona plasmática logo antes do estresse de restrição.



Fonte: próprio autor, 2021.

4.6.7. Pesagem dos órgãos

O peso dos órgãos dos animais no experimento 6 se encontram na tabela 3. A ANOVA de uma via mostrou efeito significativo do fator fenótipo no peso absoluto das glândulas adrenais ($F_{2,19} = 3,47$; $p = 0,05$). O teste *post hoc* de Newman-Keuls mostrou uma tendência de aumento significativo do peso úmido das glândulas adrenais nos grupos resiliente (Controle = $0,061 \pm 0,007$ x Resiliente = $0,083 \pm 0,007$; $p = 0,06$) e susceptível (Controle = $0,061 \pm 0,007$ x Susceptível = $0,078 \pm 0,004$; $p = 0,08$) quando comparados ao grupo controle. De modo semelhante, a ANOVA de uma via mostrou efeito do fator fenótipo no peso relativo das glândulas adrenais ($F_{2,19} = 5,30$; $p < 0,01$). Houve um aumento do peso relativo das adrenais nos grupos resiliente (Controle = $0,21 \pm 0,02$ x Resiliente = $0,33 \text{ g/kg} \pm 0,03$; $p < 0,05$) e susceptível (Controle = $0,21 \pm 0,02$ x Susceptível = $0,31 \text{ g/kg} \pm 0,02$; $p < 0,05$) em relação ao grupo controle.

Não foram encontradas diferenças significativas em relação ao peso absoluto ou relativo dos rins e do baço.

Não foram encontradas diferenças significativas em relação ao peso absoluto do coração. Entretanto, a ANOVA de uma via mostrou efeito significativo do fator fenótipo ($F_{2,19} = 4,04$; $p < 0,05$) em relação ao peso relativo do coração. O teste *post hoc* de Newman-Keuls mostrou um aumento do peso úmido no grupo susceptível em

relação ao grupo controle (Controle = $3,28 \pm 0,07$ x Susceptível = $3,60 \pm 0,12$; $p < 0,05$) e resiliente (Resiliente = $3,33 \pm 0,05$ x Susceptível = $3,60 \pm 0,12$; $p < 0,05$).

Em relação ao peso absoluto do timo, a ANOVA de uma via mostrou efeito significativo do fator fenótipo ($F_{2,19} = 9,18$; $p < 0,01$). O teste *post hoc* de Newman-Keuls mostrou uma diminuição do peso úmido nos grupos resiliente (Controle = $0,35 \pm 0,02$ x Resiliente = $0,23 \pm 0,01$; $p < 0,05$) e susceptível (Controle = $0,35 \pm 0,02$ x Susceptível = $0,26 \text{ g} \pm 0,03$; $p < 0,05$) quando comparados ao grupo controle. Não foram encontradas diferenças significativas no peso relativo do timo.

Tabela 3. Peso absoluto e relativo das glândulas adrenais, rins, baço, coração e timo nos fenótipos resiliente e susceptível ao estresse de derrota social no experimento 6. Os dados estão expressos como a média \pm EPM ($n = 6-8$ animais/grupo). *, $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle; #, $p < 0,05$ em relação ao grupo resiliente; \$, $p < 0,05$ em relação ao grupo susceptível.

		Controle	Resiliente	Susceptível
Adrenais	Absoluto (g)	$0,061 \pm 0,007$	$0,083 \pm 0,007$	$0,078 \pm 0,004$
	Relativo (g/kg)	$0,21 \pm 0,02$	$0,33 \pm 0,03^*$	$0,31 \pm 0,02^*$
Rins	Absoluto (g)	$2,17 \pm 0,05$	$2,10 \pm 0,07$	$2,08 \pm 0,11$
	Relativo (g/kg)	$7,77 \pm 0,21$	$8,20 \pm 0,29$	$8,32 \pm 0,46$
Baço	Absoluto (g)	$1,12 \pm 0,10$	$1,12 \pm 0,10$	$1,23 \pm 0,12$
	Relativo (g/kg)	$4,01 \pm 0,34$	$4,35 \pm 0,39$	$4,96 \pm 0,52$
Coração	Absoluto (g)	$0,92 \pm 0,03$	$0,87 \pm 0,04$	$0,90 \pm 0,05$
	Relativo (g/kg)	$3,28 \pm 0,07$	$3,33 \pm 0,05$	$3,60 \pm 0,12^{*\#}$
Timo	Absoluto (g)	$0,35 \pm 0,02$	$0,23 \pm 0,01^*$	$0,26 \pm 0,03^*$
	Relativo (g/kg)	$1,20 \pm 0,10$	$0,91 \pm 0,07$	$1,02 \pm 0,10$

Fonte: próprio autor, 2021.

4.7. EXPERIMENTO 7: EFEITO DO TRATAMENTO COM A N-AC NAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS RELACIONADAS À ANSIEDADE E DEPRESSÃO EM RATOS SUSCEPTÍVEIS E RESILIENTES AO ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL

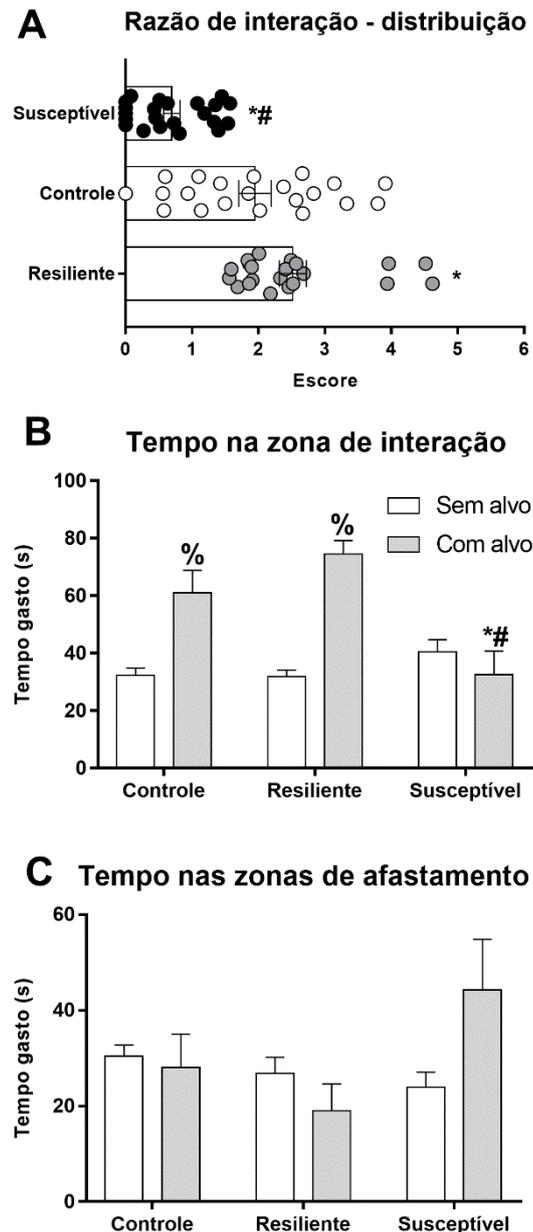
4.7.1. Avaliação da interação social por meio do TIS

A análise estatística foi feita considerando-se os diferentes tratamentos, com o objetivo de mostrar a ausência de diferenças iniciais entre os grupos. Entretanto, para facilitar a interpretação, os gráficos dos testes realizados antes do tratamento com a N-AC foram apresentados apenas considerando os fenótipos. Foram obtidos 48% de animais resilientes ao EDS no experimento 7. A ANOVA de uma via da RI (Figura 53A) mostrou efeito significativo do fator fenótipo ($F_{2,58} = 22,18$; $p < 0,001$). O teste *post hoc* de Newman-Keuls revelou uma diminuição da razão de interação nos animais susceptíveis em relação ao grupo controle (Controle, Veículo = $2,1 \pm 0,40$; N-AC 60 mg/kg = $1,8 \pm 0,31$ x Susceptível Veículo = $0,7 \pm 0,16$; N-AC 60 mg/kg = $0,7 \pm 0,19$; $p < 0,001$) e resiliente (Resiliente, Veículo = $2,7 \pm 0,33$; N-AC 60 mg/kg = $2,3 \pm 0,22$ x Susceptível Veículo = $0,7 \pm 0,16$; N-AC 60 mg/kg = $0,7 \pm 0,19$; $p < 0,001$), e uma diferença entre os grupos controle e resiliente (Controle, Veículo = $2,1 \pm 0,40$; N-AC 60 mg/kg = $1,8 \pm 0,31$ x Resiliente, Veículo = $2,7 \pm 0,33$; N-AC 60 mg/kg = $2,3 \pm 0,22$; $p < 0,05$).

O tempo gasto na zona de interação (Figura 53B) também foi diferente entre os fenótipos. A ANOVA de medidas repetidas mostrou efeito significativo dos fatores sessão ($F_{1,58} = 38,56$; $p < 0,001$), e da interação fenótipo e sessão ($F_{2,58} = 19,95$; $p < 0,001$). O teste de Newman-Keuls mostrou um maior tempo de permanência na zona de interação com o alvo presente nos animais do grupo controle (Sem alvo, Controle, Veículo = $32,2 \pm 4,3$; N-AC 60 mg/kg = $32,6 \pm 2,8$; x Com alvo, Controle, Veículo = $63,5 \pm 13,2$; N-AC 60 mg/kg = $58,6 \pm 9,8$; $p < 0,001$) e resiliente (Sem alvo, Resiliente, Veículo = $29,3 \pm 2,7$; N-AC 60 mg/kg = $34,5 \pm 4,0$ x Com alvo, Resiliente, Veículo = $73,1 \pm 5,3$; N-AC 60 mg/kg = $76,0 \pm 8,5$; $p < 0,001$). Os animais susceptíveis ao EDS permaneceram menos tempo na zona de interação com o alvo presente em relação aos animais do grupo controle (Controle, Veículo = $63,5 \pm 13,2$; N-AC 60 mg/kg = $58,6 \pm 9,8$ x Susceptível, Veículo = $30,2 \pm 8,8$; N-AC 60 mg/kg = $34,9 \pm 14,3$; $p < 0,001$) e resiliente (Resiliente, Veículo = $73,1 \pm 5,3$; N-AC 60 mg/kg = $76,0 \pm 8,5$ x Susceptível, Veículo = $30,2 \pm 8,8$; N-AC 60 mg/kg = $34,9 \pm 14,3$; $p < 0,001$).

A ANOVA de medidas repetidas revelou um efeito da interação entre os fatores fenótipo e sessão ($F_{2,58} = 3,65$; $p < 0,05$) e sessão e tratamento ($F_{1,58} = 5,80$; $p < 0,05$) em relação ao tempo de permanência nas zonas de afastamento (Figura 53C). Entretanto, a análise *post hoc* não mostrou nenhuma diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

Figura 53 - Razão de interação e tempo de permanência nas zonas delimitadas no teste de interação social dos fenótipos susceptível e resiliente ao estresse de derrota social no experimento 7. Os animais foram testados 24 horas após o último episódio de estresse. A, distribuição da razão de interação; B, tempo de permanência (em segundos) na zona de interação; C, tempo de permanência (em segundos) nas zonas de afastamento. As barras representam a média + EPM (n = 21-22 animais/grupo). *, p < 0,05 em relação ao grupo Controle; #, p < 0,05 em relação ao grupo Resiliente; %, p < 0,05 em relação ao tempo gasto durante a sessão sem alvo do respectivo grupo.

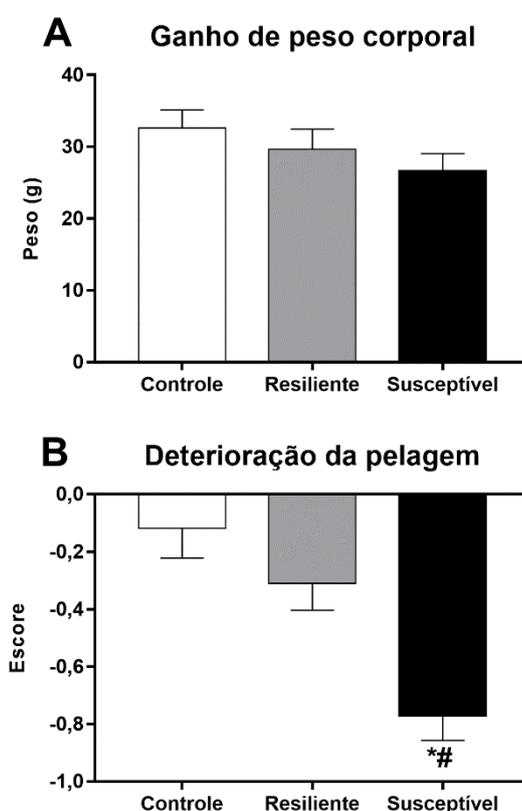


Fonte: próprio autor, 2021.

4.7.2. Avaliação do estado físico dos animais

Não foram encontradas diferenças significativas em relação ao ganho de peso corporal dos animais durante o período de EDS (Figura 54A) ($p > 0,05$). Por outro lado, os animais susceptíveis ao EDS apresentaram uma maior deterioração da pelagem nesse mesmo período (Figura 54B). A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo do fator fenótipo ($F_{2,58} = 12,33$; $p < 0,001$). Os animais susceptíveis apresentaram uma maior deterioração da pelagem quando comparados aos animais do grupo controle (Controle, Veículo = $-0,2 \pm 0,17$; N-AC 60 mg/kg = $-0,005 \pm 0,13$ x Susceptível, Veículo = $-0,8 \pm 0,10$; N-AC 60 mg/kg = $-0,7 \pm 0,14$; $p < 0,001$) e resiliente (Resiliente, Veículo = $-0,3 \pm 0,14$; N-AC 60 mg/kg = $-0,4 \pm 0,13$ x Susceptível, Veículo = $-0,8 \pm 0,10$; N-AC 60 mg/kg = $-0,7 \pm 0,14$; $p < 0,001$).

Figura 54 - Estado físico dos fenótipos susceptível e resiliente ao estresse de derrota social no experimento 7. A avaliação do peso corporal e estado da pelagem foi feita logo antes do primeiro episódio de derrota social e logo antes do teste de interação social, 24 horas após o último episódio de derrota social. A, ganho de peso corporal (em gramas), avaliado pela diferença do peso corporal entre a última e a primeira avaliação; B, deterioração da pelagem, avaliada pela diferença do escore de estado do pelo entre a última e primeira avaliação. As barras representam a média + EPM ($n = 21-22$ animais/grupo). *, $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle; #, $p < 0,05$ em relação ao grupo Resiliente.



Fonte: próprio autor, 2021.

4.7.3. Efeito da N-Acetilcisteína nos comportamentos relacionados à ansiedade no labirinto em cruz elevado

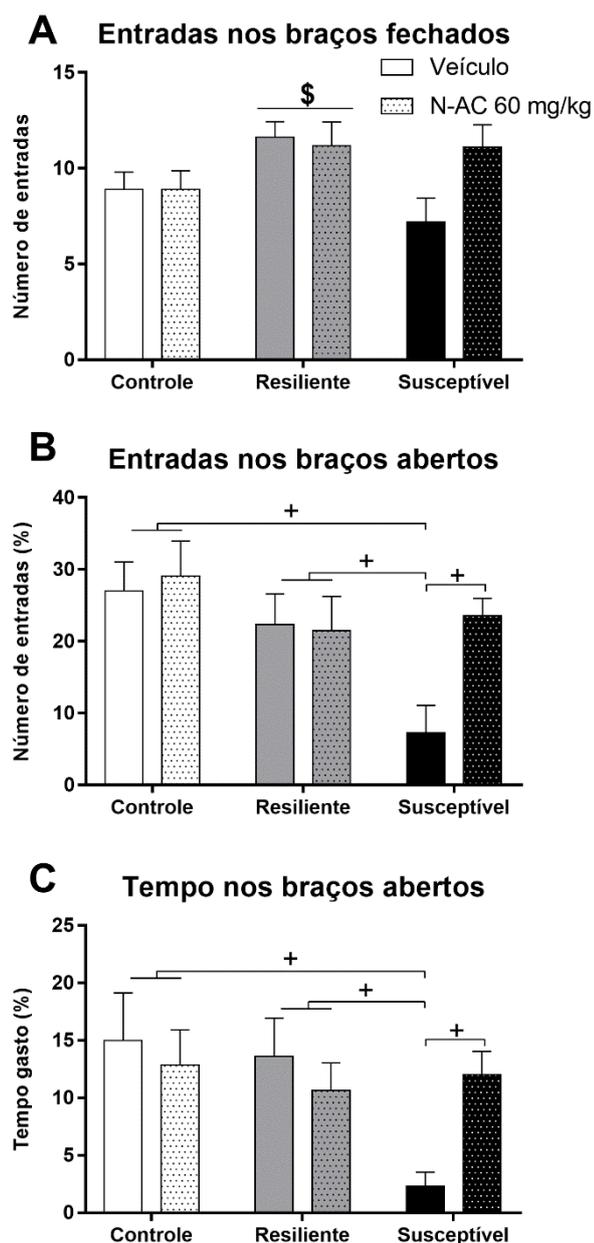
Os resultados no LCE mostram um aumento dos comportamentos relacionados à ansiedade nos animais susceptíveis ao EDS, os quais foram revertidos pelo tratamento com a N-AC na dose de 60 mg/kg.

A ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo do fator fenótipo no número de entradas nos braços fechados ($F_{2,57} = 3,36$; $p < 0,05$). A análise *post hoc* revelou um aumento do número de entradas nos braços fechados nos animais resilientes ao EDS, independente do tratamento com a N-AC, em relação aos animais do grupo susceptível, independente do tratamento com a N-AC (Resiliente, Veículo = $12 \pm 0,8$; N-AC 60 mg/kg = $11 \pm 1,2$ x Susceptível, Veículo = $7 \pm 1,2$; N-AC 60 mg/kg = $11 \pm 1,2$; $p < 0,05$) (Figura 55A).

Houve uma diminuição do percentual de entradas nos braços abertos nos animais susceptíveis ao EDS, o qual foi revertido pelo tratamento com a N-AC (Figura 55B). A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo do fator fenótipo ($F_{2,57} = 4,46$; $p < 0,01$), e uma tendência de efeito do fator tratamento ($F_{1,57} = 2,90$; $p = 0,09$) e da interação entre os fatores ($F_{2,57} = 2,43$; $p = 0,09$). O teste *post hoc* de Newman Keuls mostrou uma diminuição do percentual de entradas nos braços abertos no grupo susceptível/veículo em relação a todos os outros grupos experimentais [(Susceptível, veículo = $7,3 \pm 3,8$ x Controle, veículo = $27,0 \pm 4,0$; $p < 0,05$), (Susceptível, veículo = $7,3 \pm 3,8$ x Controle, N-AC 60 mg/kg = $29,0 \pm 4,9$; $p < 0,05$), (Susceptível, veículo = $7,3 \pm 3,8$ x Resiliente, veículo = $22,3 \pm 4,3$; $p < 0,05$), (Susceptível, veículo = $7,3 \pm 3,8$ x Resiliente, N-AC 60 mg/kg = $21,5 \pm 4,8$; $p < 0,05$), (Susceptível, veículo = $7,3 \pm 3,8$ x Susceptível, N-AC 60 mg/kg = $23,5 \pm 2,5$; $p < 0,05$)]. Em relação ao percentual de tempo gasto nos braços abertos (Figura 55C), a ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo do fator fenótipo ($F_{2,57} = 3,05$; $p < 0,05$) e da interação entre os fatores fenótipo e tratamento ($F_{2,57} = 3,22$; $p < 0,05$). Assim como para o percentual de entradas nos braços abertos, o grupo susceptível/veículo permaneceu menos tempo nos braços abertos quando comparado com todos os grupos experimentais [(Susceptível, veículo = $2,3 \pm 1,2$ x Controle, veículo = $15,0 \pm 4,1$; $p < 0,05$), (Susceptível, veículo = $2,3 \pm 1,2$ x Controle, N-AC 60 mg/kg = $12,8 \pm 3,1$; $p < 0,05$),

(Susceptível, veículo = $2,3 \pm 1,2$ x Resiliente, veículo = $13,6 \pm 3,3$; $p < 0,05$),
(Susceptível, veículo = $2,3 \pm 1,2$ x Resiliente, N-AC 60 mg/kg = $10,6 \pm 2,4$; $p < 0,05$),
(Susceptível, veículo = $2,3 \pm 1,2$ x Susceptível, N-AC 60 mg/kg = $12,0 \pm 2,0$; $p < 0,05$).

Figura 55 - Efeito do tratamento com a N-acetilcisteína nos comportamentos relacionados à ansiedade no labirinto em cruz elevado nos fenótipos resiliente e susceptível ao estresse de derrota social no experimento 7. O teste foi realizado após 16 dias de tratamento com a N-acetilcisteína na dose de 60 mg/kg, duas vezes ao dia. A, número de entradas nos braços fechados. B, percentual do número entradas nos braços abertos. C, percentual do tempo gasto nos braços abertos. As barras representam a média + EPM (n = 9-11 animais/grupo). N-AC, N-acetilcisteína. \$, $p < 0,05$ em relação ao grupo susceptível; +, $p < 0,05$ em relação ao grupo apontado.



Fonte: próprio autor, 2021.

4.7.4. Efeito da N-acetilcisteína nos comportamentos relacionados à depressão no teste do nado forçado

A análise dos comportamentos relacionados à depressão no TNF mostrou um aumento desses comportamentos nos animais susceptíveis ao EDS, os quais foram revertidos pelo tratamento com a N-AC na dose de 60 mg/kg.

A ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo do fator fenótipo ($F_{2,54} = 3,09$; $p < 0,05$) e da interação entre os fatores fenótipo e tratamento ($F_{2,54} = 4,04$; $p <$

0,05) em relação ao tempo de imobilidade, sendo que os animais susceptíveis ao EDS que não receberam o tratamento com a N-AC apresentaram aumento do tempo de imobilidade em relação a todos os grupos experimentais [(Susceptível, veículo = $196,9 \pm 11,9$ x Controle, veículo = $149,6 \pm 11,0$; $p < 0,05$), (Susceptível, veículo = $196,9 \pm 11,9$ x Controle, N-AC 60 mg/kg = $158,9 \pm 13,8$; $p < 0,05$), (Susceptível, veículo = $196,9 \pm 11,9$ x Resiliente, veículo = $133,6 \pm 12,9$; $p < 0,01$), (Susceptível, veículo = $196,9 \pm 11,9 \pm 1,2$ x Resiliente, N-AC 60 mg/kg = $135,3 \pm 16,6$; $p < 0,01$), (Susceptível, veículo = $196,9 \pm 11,9 \pm 1,2$ x Susceptível, N-AC 60 mg/kg = $136,7 \pm 10,4$; $p < 0,01$)] (Figura 56A).

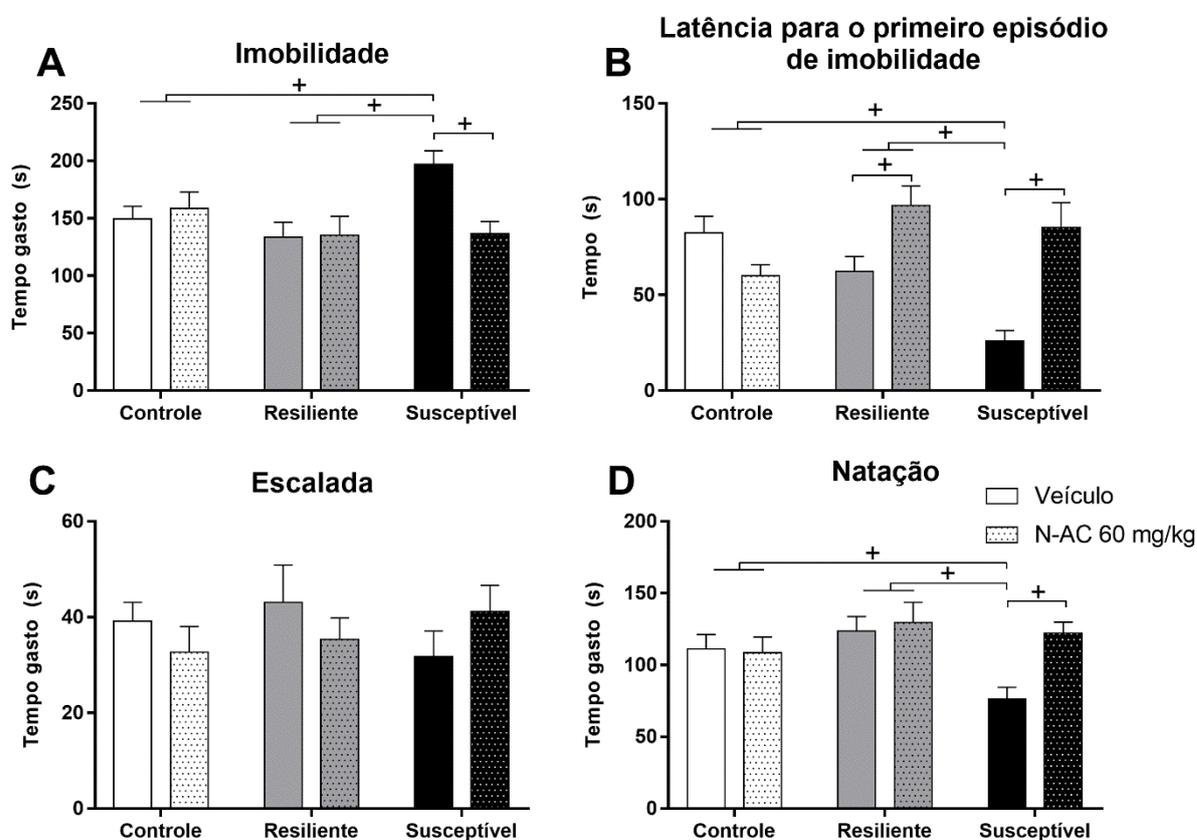
Houve um efeito significativo dos fatores fenótipo ($F_{2,54} = 3,43$; $p < 0,05$), tratamento ($F_{1,54} = 10,0$; $p < 0,01$), e da interação entre esses fatores ($F_{2,54} = 10,1$; $p < 0,001$) em relação ao tempo de latência para o primeiro episódio de imobilidade. Os animais susceptíveis ao EDS não tratados com a N-AC apresentaram aumento da latência para primeiro episódio de imobilidade em relação aos animais de todos os outros grupos experimentais [(Susceptível, veículo = $25,9 \pm 5,5$ x Controle, veículo = $82,4 \pm 8,6$; $p < 0,01$), (Susceptível, veículo = $25,9 \pm 5,5$ x Controle, N-AC 60 mg/kg = $60,1 \pm 5,7$; $p < 0,01$), (Susceptível, veículo = $25,9 \pm 5,5$ x Resiliente, veículo = $62,2 \pm 7,9$; $p < 0,05$), (Susceptível, veículo = $25,9 \pm 5,5$ x Resiliente, N-AC 60 mg/kg = $96,8 \pm 10,1$; $p < 0,01$), (Susceptível, veículo = $25,9 \pm 5,5$ x Susceptível, N-AC 60 mg/kg = $85,2 \pm 13,0$; $p < 0,01$)], enquanto os animais do grupo resiliente tratados com a N-AC apresentaram um aumento da latência para primeira imobilidade quando comparados aos animais do grupo resiliente/veículo (Resiliente, veículo = $62,2 \pm 7,9$ x Resiliente, N-AC 60 mg/kg = $96,8 \pm 10,1$; $p < 0,05$) (Figura 56B).

A Figura 56C mostra o tempo de escalada dos animais no TNF. Nenhuma diferença significativa foi encontrada em relação a essa medida.

Houve um efeito significativo dos fatores fenótipo ($F_{2,54} = 3,92$; $p < 0,05$), tratamento ($F_{1,54} = 4,28$; $p < 0,05$), e da interação entre esses fatores ($F_{2,54} = 3,53$; $p < 0,05$) em relação ao tempo de natação (Figura 56D) dos animais. Os animais susceptíveis ao EDS não tratados com a N-AC apresentaram redução do tempo de natação em relação aos animais de todos os outros grupos experimentais [(Susceptível, veículo = $76,0 \pm 8,4$ x Controle, veículo = $111,3 \pm 9,7$; $p < 0,05$), (Susceptível, veículo = $76,0 \pm 8,4$ x Controle, N-AC 60 mg/kg = $108,4 \pm 11,0$; $p < 0,05$), (Susceptível, veículo = $76,0 \pm 8,4$ x Resiliente, veículo = $123,4 \pm 10,4$; $p < 0,01$), (Susceptível, veículo = $76,0 \pm 8,4$ x Resiliente, N-AC 60 mg/kg = $129,4 \pm 14,2$; $p <$

0,01), (Susceptível, veículo = $76,0 \pm 8,4$ x Susceptível, N-AC 60 mg/kg = $122,1 \pm 7,9$; $p < 0,01$).

Figura 56 - Efeito do tratamento com a N-acetilcisteína nos comportamentos relacionados à depressão no teste do nado forçado nos fenótipos resiliente e susceptível ao estresse de derrota social no experimento 7. O teste foi realizado após 16 dias de tratamento com a N-acetilcisteína na dose de 60 mg/kg, duas vezes ao dia. A, tempo gasto no comportamento de imobilidade; B, latência para primeiro episódio de imobilidade; C, tempo gasto no comportamento de escalada; D, tempo gasto no comportamento de natação. As barras representam a média + EPM (n = 8-11 animais/grupo). N-AC, N-acetilcisteína. +, $p < 0,05$ em relação ao grupo apontado.



Fonte: próprio autor, 2021.

4.8. EXPERIMENTO 8: EFEITO DO TRATAMENTO COM A N-ACETILCISTEÍNA NAS ALTERAÇÕES MOLECULARES RELACIONADAS AO FATOR DE TRANSCRIÇÃO DELTAFOSB NO ENCÉFALO DE RATOS SUSCEPTÍVEIS E RESILIENTES AO ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL

4.8.1. Avaliação da interação social por meio do TIS

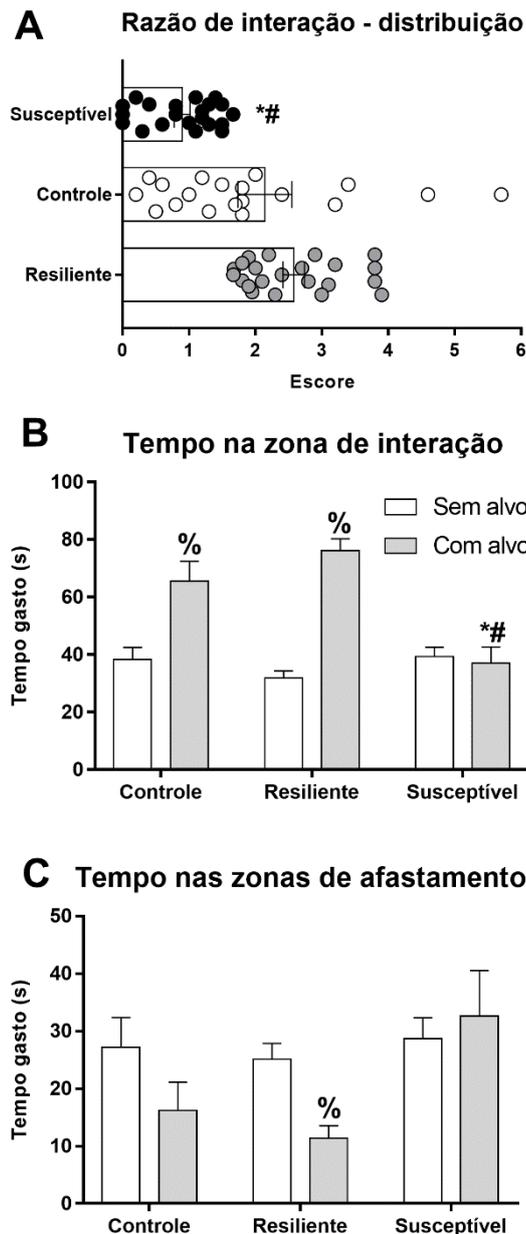
A análise estatística foi feita considerando-se os diferentes tratamentos, com o objetivo de mostrar a ausência de diferenças iniciais entre os grupos. Entretanto, para facilitar a interpretação, os gráficos dos testes realizados antes do tratamento com a N-AC foram apresentados apenas considerando os fenótipos. Foram obtidos 51% de animais resilientes ao EDS no experimento 8. A ANOVA de uma via da RI (Figura 57A) mostrou efeito significativo do fator fenótipo ($F_{2,57} = 11,36$; $p < 0,001$). O teste *post hoc* de Newman-Keuls revelou uma diminuição da razão de interação nos animais susceptíveis em relação ao grupo controle (Controle, Veículo = $2,1 \pm 0,67$; N-AC 60 mg/kg = $2,2 \pm 0,50$ x Susceptível Veículo = $0,9 \pm 0,16$; N-AC 60 mg/kg = $0,9 \pm 0,18$; $p < 0,001$) e resiliente (Resiliente, Veículo = $2,6 \pm 0,26$; N-AC 60 mg/kg = $2,6 \pm 0,20$ x Susceptível Veículo = $0,9 \pm 0,16$; N-AC 60 mg/kg = $0,9 \pm 0,18$; $p < 0,001$).

O tempo gasto na zona de interação (Figura 57B) também foi diferente entre os fenótipos. A ANOVA de medidas repetidas mostrou efeito significativo dos fatores fenótipo ($F_{2,57} = 5,44$; $p < 0,01$), sessão ($F_{1,57} = 52,43$; $p < 0,001$), e da interação fenótipo e sessão ($F_{2,57} = 18,55$; $p < 0,001$). O teste de Newman-Keuls mostrou um maior tempo de permanência na zona de interação com o alvo presente nos animais do grupo controle (Sem alvo, Controle, Veículo = $43,7 \pm 7,4$; N-AC 60 mg/kg = $32,9 \pm 3,5$; x Com alvo, Controle, Veículo = $64,3 \pm 11,0$; N-AC 60 mg/kg = $66,6 \pm 9,1$; $p < 0,001$) e resiliente (Sem alvo, Resiliente, Veículo = $33,7 \pm 4,0$; N-AC 60 mg/kg = $30,0 \pm 2,8$ x Com alvo, Resiliente, Veículo = $78,4 \pm 6,6$; N-AC 60 mg/kg = $73,9 \pm 5,3$; $p < 0,001$). Os animais susceptíveis ao EDS permaneceram menos tempo na zona de interação com o alvo presente em relação aos animais do grupo controle (Controle, Veículo = $64,3 \pm 11,0$; N-AC 60 mg/kg = $66,6 \pm 9,1$ x Susceptível, Veículo = $40,3 \pm 8,4$; N-AC 60 mg/kg = $33,4 \pm 7,6$; $p < 0,001$) e resiliente (Resiliente, Veículo = $78,4 \pm 6,6$; N-AC 60 mg/kg = $73,9 \pm 5,3$ x Susceptível, Veículo = $40,3 \pm 8,4$; N-AC 60 mg/kg = $33,4 \pm 7,6$; $p < 0,001$).

A ANOVA de medidas repetidas revelou um efeito do fator sessão ($F_{1,57} = 4,78$; $p < 0,05$) e da interação entre os fatores fenótipo e sessão ($F_{2,57} = 3,13$; $p < 0,05$) em relação ao tempo de permanência nas zonas de afastamento (Figura 57C). A análise *post hoc* mostrou uma diminuição do tempo de permanência nas zonas de afastamento na sessão com alvo em relação a sessão sem alvo apenas no grupo

resiliente (Sem alvo, Resiliente, Veículo = $26,6 \pm 4,7$; N-AC 60 mg/kg = $23,6 \pm 3,2$ x
Com alvo, Resiliente, Veículo = $8,5 \pm 1,9$; N-AC 60 mg/kg = $14,3 \pm 3,8$; $p < 0,05$).

Figura 57 - Razão de interação e tempo de permanência nas zonas delimitadas no teste de interação social dos fenótipos susceptível e resiliente ao estresse de derrota social no experimento 8. Os animais foram testados 24 horas após o último episódio de estresse. A, distribuição da razão de interação; B, tempo de permanência (em segundos) na zona de interação; C, tempo de permanência (em segundos) nas zonas de afastamento. As barras representam a média + EPM (n = 20-22 animais/grupo). *, $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle; #, $p < 0,05$ em relação ao grupo Resiliente; %, $p < 0,05$ em relação ao tempo gasto durante a sessão sem alvo do respectivo grupo.



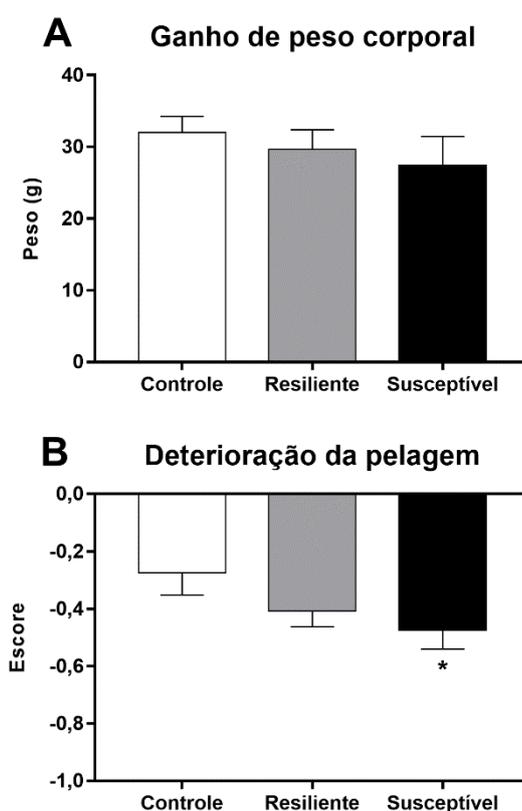
Fonte: próprio autor, 2021.

4.8.2. Avaliação do estado físico dos animais

Não foram encontradas diferenças significativas em relação ao ganho de peso corporal dos animais durante o período de EDS (Figura 58A) ($p > 0,05$). Por outro lado, os animais susceptíveis ao EDS apresentaram uma maior deterioração da pelagem nesse mesmo período (Figura 58B). A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo do fator fenótipo ($F_{2,57} = 3,12$; $p < 0,05$). Os animais susceptíveis apresentaram uma maior deterioração da pelagem quando comparados aos animais

do grupo controle (Controle, Veículo = $-0,3 \pm 0,11$; N-AC 60 mg/kg = $-0,3 \pm 0,11$ x Susceptível, Veículo = $-0,5 \pm 0,11$; N-AC 60 mg/kg = $-0,5 \pm 0,07$; $p < 0,05$).

Figura 58 - Estado físico dos fenótipos susceptível e resiliente ao estresse de derrota social no experimento 8. A avaliação do peso corporal e estado da pelagem foi feita logo antes do primeiro episódio de derrota social e logo antes do teste de interação social, 24 horas após o último episódio de derrota social. A, ganho de peso corporal (em gramas), avaliado pela diferença do peso corporal entre a última e a primeira avaliação; B, deterioração da pelagem, avaliada pela diferença do escore de estado do pelo entre a última e primeira avaliação. As barras representam a média + EPM (n = 20-22 animais/grupo). *, $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle.



Fonte: próprio autor, 2021.

4.8.3. Efeito da N-acetilcisteína no número de células positivas para DeltaFosB no córtex pré-frontal medial

No Cg (Figura 59A), houve um efeito do hemisfério avaliado na quantificação de DeltaFosB. A ANOVA de três vias revelou efeito significativo do fator hemisfério ($F_{1,84} = 4,40$; $p < 0,05$). A análise *post hoc* mostrou um maior número de células

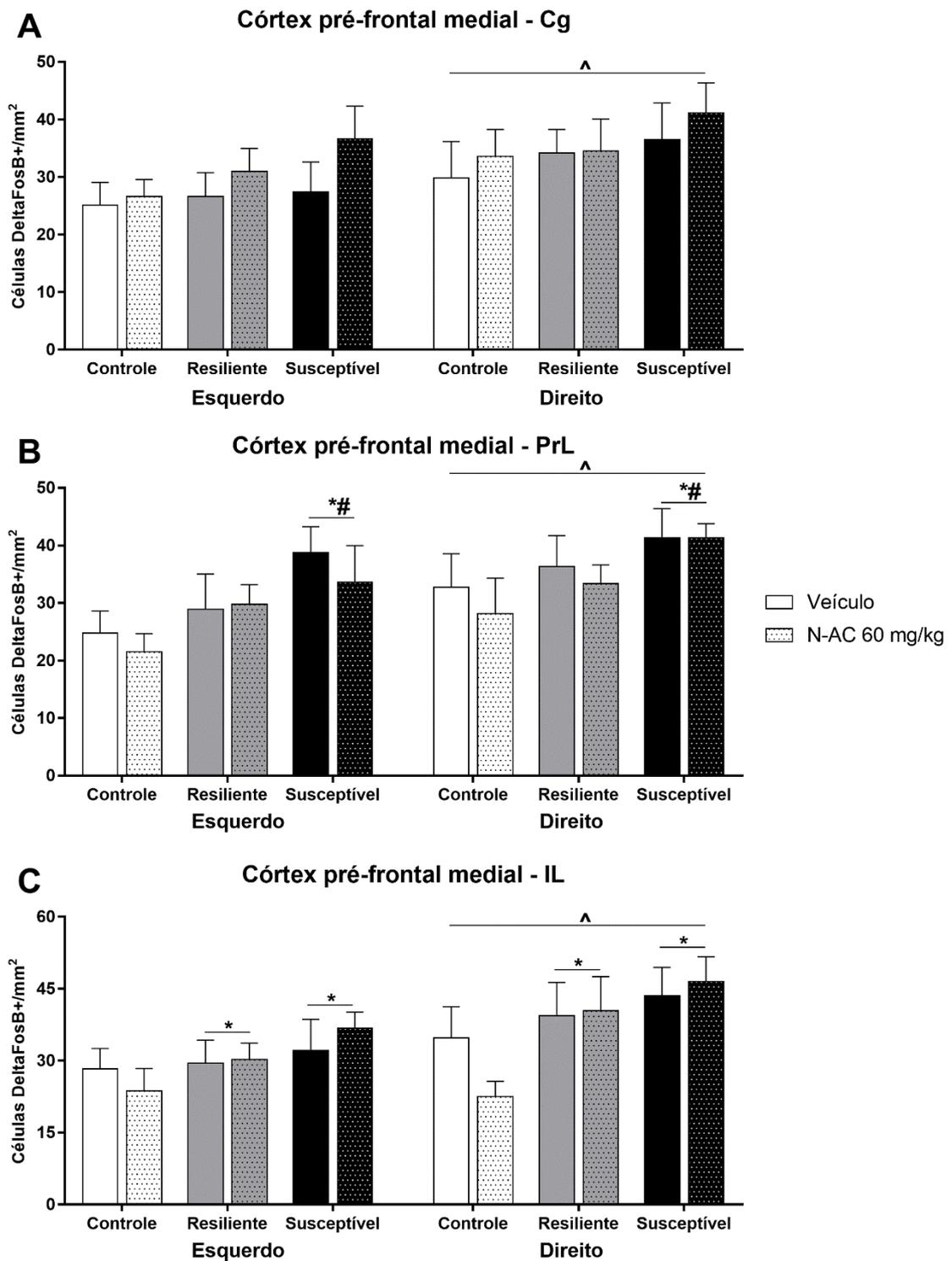
positivas para DeltaFosB no hemisfério direito em relação ao hemisfério esquerdo independente do grupo analisado.

No PrL (Figura 59B), houve um aumento de DeltaFosB no encéfalo dos animais susceptíveis ao EDS, independente do hemisfério e do tratamento, e um maior número de células positivas para DeltaFosB no hemisfério direito, independente do grupo analisado. A ANOVA de três vias revelou um efeito significativo do fator fenótipo ($F_{2,84} = 6,12$; $p < 0,01$) e do fator hemisfério ($F_{1,84} = 4,62$; $p < 0,05$), cuja análise *post hoc* mostrou um maior número de células positivas para DeltaFosB nos animais susceptíveis quando comparados ao grupo controle e resiliente, independente do hemisfério e do tratamento [(Controle, veículo, hemisfério esquerdo = $25 \pm 3,8$; veículo, hemisfério direito = $33 \pm 5,8$; N-AC 60 mg/kg, hemisfério esquerdo = $22 \pm 3,2$; N-AC 60 mg/kg, hemisfério direito = $28 \pm 6,2$ x Susceptível, veículo, hemisfério esquerdo = $39 \pm 4,5$; veículo, hemisfério direito = $41 \pm 5,1$; N-AC 60 mg/kg, hemisfério esquerdo = $34 \pm 6,3$; N-AC 60 mg/kg, hemisfério direito = $41 \pm 2,5$; $p < 0,001$) (Resiliente, veículo, hemisfério esquerdo = $29 \pm 6,1$; veículo, hemisfério direito = $36 \pm 5,3$; N-AC 60 mg/kg, hemisfério esquerdo = $30 \pm 3,4$; N-AC 60 mg/kg, hemisfério direito = $33 \pm 3,2$ x Susceptível, veículo, hemisfério esquerdo = $39 \pm 4,5$; veículo, hemisfério direito = $41 \pm 5,1$; N-AC 60 mg/kg, hemisfério esquerdo = $34 \pm 6,3$; N-AC 60 mg/kg, hemisfério direito = $41 \pm 2,5$; $p < 0,05$)].

No IL (Figura 59C), houve um aumento de DeltaFosB no encéfalo dos animais expostos ao EDS, independente do fenótipo, do hemisfério e do tratamento, e um maior número de células positivas para DeltaFosB no hemisfério direito, independente do grupo analisado. A ANOVA de três vias do IL revelou efeito significativo do fator fenótipo ($F_{2,84} = 5,62$; $p < 0,01$) e do fator hemisfério ($F_{1,84} = 5,68$; $p < 0,05$). A análise *post hoc* mostrou um maior número de células positivas para DeltaFosB nos animais resilientes quando comparados aos animais do grupo controle (Resiliente, veículo, hemisfério esquerdo = $30 \pm 4,8$; veículo, hemisfério direito = $39 \pm 6,9$; N-AC 60 mg/kg, hemisfério esquerdo = $30 \pm 3,4$; N-AC 60 mg/kg, hemisfério direito = $40 \pm 7,2$ x Controle, veículo, hemisfério esquerdo = $28 \pm 4,3$; veículo, hemisfério direito = $35 \pm 6,5$; N-AC 60 mg/kg, hemisfério esquerdo = $24 \pm 4,6$; N-AC 60 mg/kg, hemisfério direito = $23 \pm 3,2$; $p < 0,05$) e dos animais susceptíveis comparados ao grupo controle (Susceptível, veículo, hemisfério esquerdo = $32 \pm 6,5$; veículo, hemisfério direito = $44 \pm 6,0$; N-AC 60 mg/kg, hemisfério esquerdo = $37 \pm 3,4$; N-AC 60 mg/kg, hemisfério direito = $47 \pm 5,1$ x Controle, veículo, hemisfério esquerdo = $28 \pm 4,3$; veículo,

hemisfério direito = $35 \pm 6,5$; N-AC 60 mg/kg, hemisfério esquerdo = $24 \pm 4,6$; N-AC 60 mg/kg, hemisfério direito = $23 \pm 3,2$; $p < 0,01$), independente do tratamento e do hemisfério.

Figura 59 - Quantificação das células positivas para DeltaFosB nas sub-regiões cingulado, pré-límbico e Infralímbico do córtex pré-frontal medial de animais susceptíveis e resilientes ao estresse de derrota social no experimento 8. Os animais foram perfundidos e os encéfalos retirados após 16 dias de tratamento com a N-acetilcisteína na dose de 60 mg/kg, duas vezes ao dia. A, quantificação do número de células DeltaFosB positivas no córtex pré-frontal medial cingulado; B, quantificação do número de células DeltaFosB positivas no córtex pré-frontal medial pré-límbico; C, quantificação de células DeltaFosB positivas no córtex pré-frontal medial infralímbico. As barras representam a média + EPM (n = 8 animais/grupo). Cg, cingulado; PrL, pré-límbico; IL, infralímbico; N-AC, N-acetilcisteína. *, $p < 0,05$ em relação ao grupo controle no mesmo hemisfério; #, $p > 0,05$ em relação ao grupo resiliente no mesmo hemisfério; ^, $p < 0,05$ em relação a todos os grupos do hemisfério oposto.



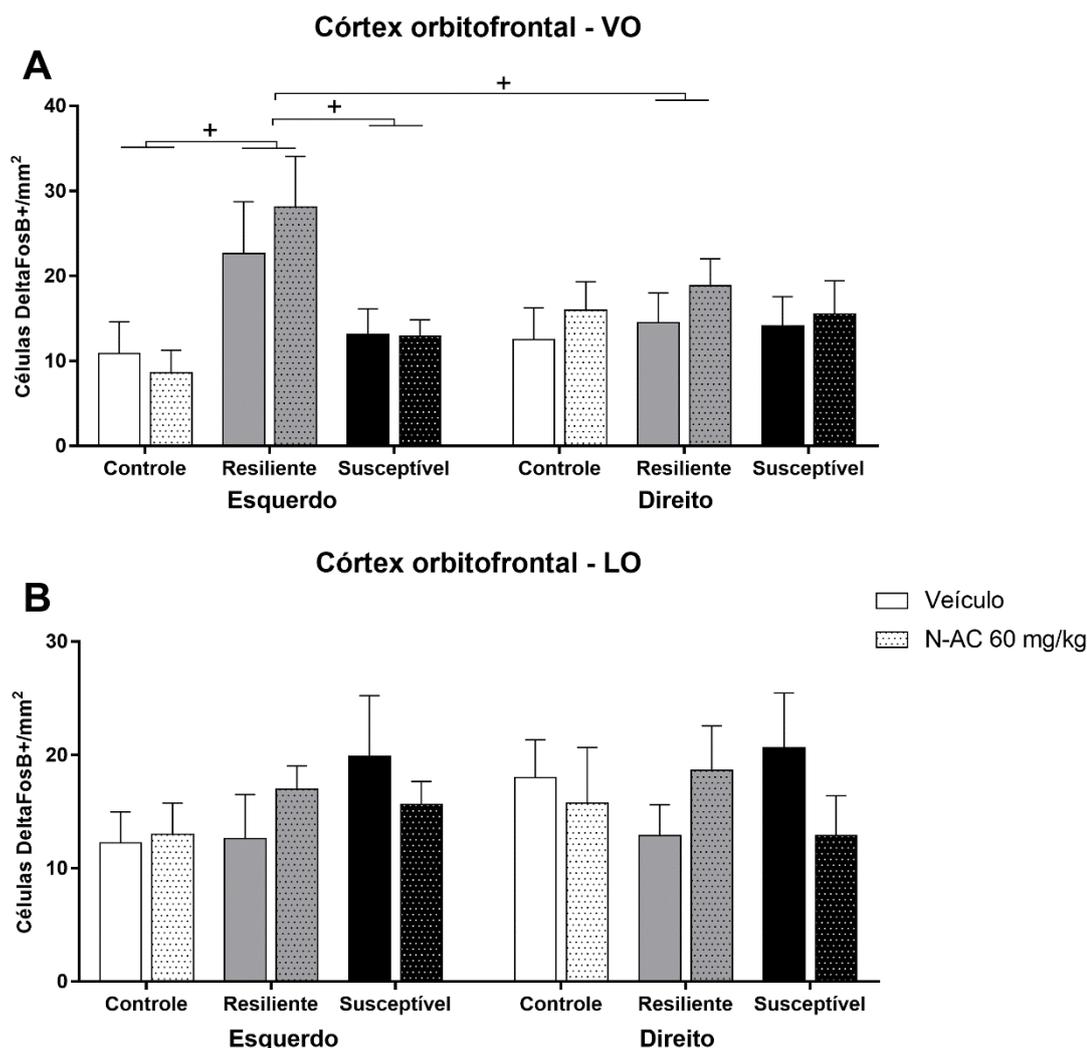
Fonte: próprio autor, 2021.

4.8.4. Efeito da N-acetilcisteína no número de células positivas para DeltaFosB no córtex orbitofrontal

Houve um aumento de DeltaFosB apenas no hemisfério esquerdo da sub-região VO dos animais resilientes ao EDS. A ANOVA de três vias revelou efeito significativo do fator fenótipo ($F_{2,84} = 6,01$; $p < 0,01$) e da interação entre os fatores fenótipo e hemisfério ($F_{2,84} = 3,32$; $p < 0,05$). A análise *post hoc* mostrou, no hemisfério esquerdo, um aumento no número de células positivas para DeltaFosB nos animais resilientes em relação ao grupo controle (Resiliente, veículo, hemisfério esquerdo = $23 \pm 6,1$; N-AC 60 mg/kg, hemisfério esquerdo = $28 \pm 5,9$; x Controle, veículo, hemisfério esquerdo = $11 \pm 3,7$; N-AC 60 mg/kg, hemisfério esquerdo = $9 \pm 2,6$; $p < 0,01$), em relação ao grupo susceptível (Resiliente, veículo, hemisfério esquerdo = $23 \pm 6,1$; N-AC 60 mg/kg, hemisfério esquerdo = $28 \pm 5,9$; Susceptível, veículo, hemisfério esquerdo = $13 \pm 3,0$; N-AC 60 mg/kg, hemisfério esquerdo = $13 \pm 2,0$; $p < 0,05$) e em relação ao próprio grupo quando comparado ao hemisfério direito (Resiliente, veículo, hemisfério esquerdo = $23 \pm 6,1$; N-AC 60 mg/kg, hemisfério esquerdo = $28 \pm 5,9$ x (Resiliente, veículo, hemisfério direito = $15 \pm 3,5$; N-AC 60 mg/kg, hemisfério direito = $19 \pm 3,1$), independente do tratamento com a N-AC (Figura 60A).

Não foram encontradas alterações significativas na quantidade de células positivas para DeltaFosB em nenhum dos hemisférios da sub-região LO do COF (Figura 60B).

Figura 60 - Quantificação das células positivas para DeltaFosB nas sub-regiões ventral e lateral do córtex orbitofrontal de animais susceptíveis e resilientes ao estresse de derrota social no experimento 8. Os animais foram perfundidos e os encéfalos retirados após 16 dias de tratamento com a N-acetilcisteína na dose de 60 mg/kg, duas vezes ao dia. A, quantificação do número de células DeltaFosB positivas no córtex orbitofrontal ventral; B, quantificação do número de células DeltaFosB positivas no córtex orbitofrontal lateral. As barras representam a média + EPM (n = 8 animais/grupo). VO, ventral; LO, lateral; N-AC, N-acetilcisteína. +, $p < 0,05$ em relação ao grupo apontado.



Fonte: próprio autor, 2021.

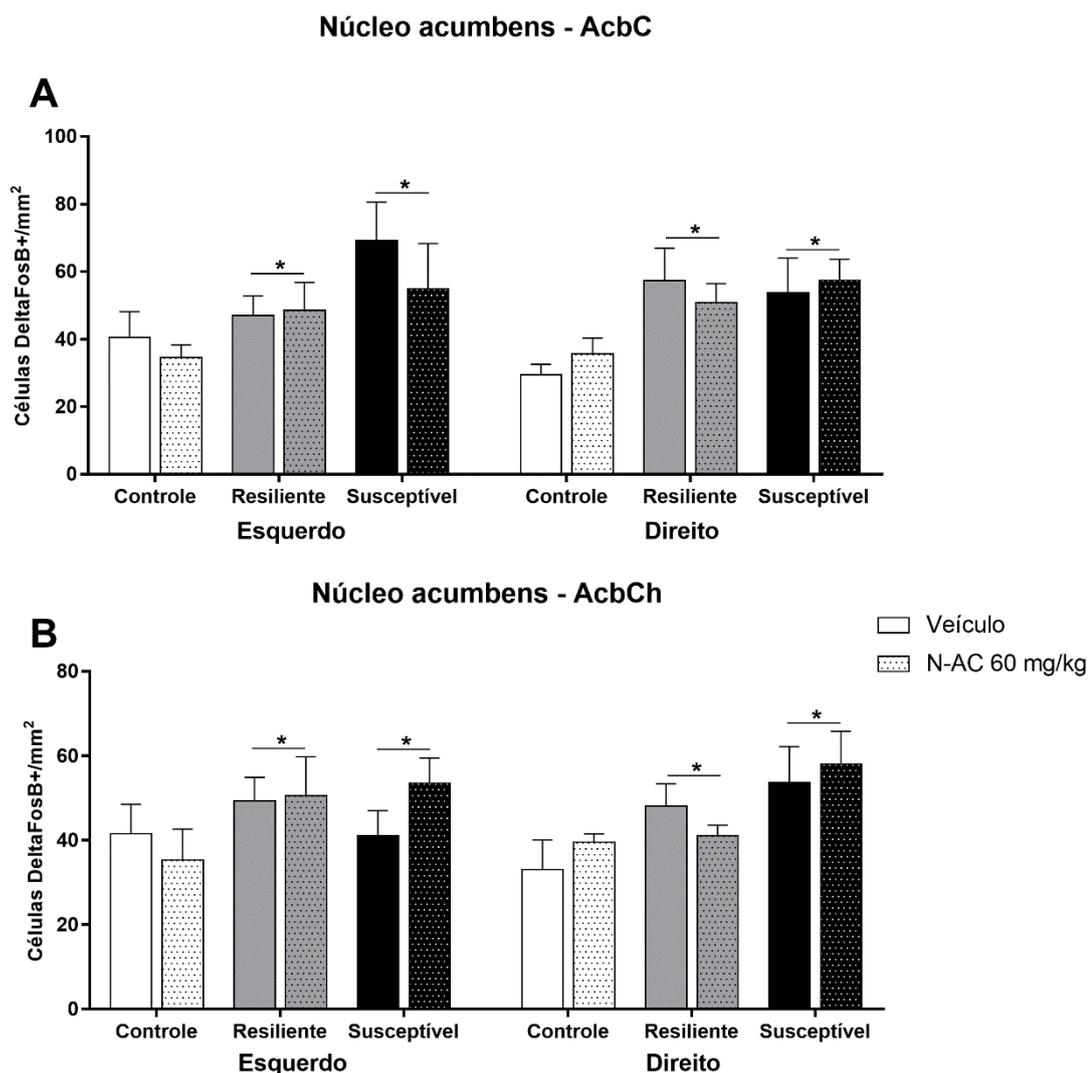
4.8.5. Efeito da N-acetilcisteína no número de células positivas para DeltaFosB no núcleo acumbens

No AcbC (Figura 61A), a ANOVA de três vias mostrou um efeito significativo do fator fenótipo ($F_{2,84} = 8,94$, $p < 0,001$). Um aumento de células DeltaFosB positivas foi encontrado em ambos os fenótipos resiliente e susceptível no AcbC, quando comparados aos animais do grupo controle, independente do tratamento e do hemisfério analisado [(Resiliente, veículo, hemisfério esquerdo = $47 \pm 5,8$; veículo, hemisfério direito = $57 \pm 9,7$; N-AC 60 mg/kg, hemisfério esquerdo = $49 \pm 8,3$; N-AC 60 mg/kg, hemisfério direito = $51 \pm 5,1$ x Controle, veículo, hemisfério esquerdo = $40 \pm 3,8$; veículo, hemisfério direito = $29 \pm 3,2$; N-AC 60 mg/kg, hemisfério esquerdo = 35

$\pm 3,8$; N-AC 60 mg/kg, hemisfério direito = $36 \pm 4,7$; $p < 0,01$) (Susceptível, veículo, hemisfério esquerdo = $69 \pm 11,5$; veículo, hemisfério direito = $54 \pm 10,3$; N-AC 60 mg/kg, hemisfério esquerdo = $55 \pm 13,4$; N-AC 60 mg/kg, hemisfério direito = $58 \pm 6,1$ x Controle, veículo, hemisfério esquerdo = $40 \pm 3,8$; veículo, hemisfério direito = $29 \pm 3,2$; N-AC 60 mg/kg, hemisfério esquerdo = $35 \pm 3,8$; N-AC 60 mg/kg, hemisfério direito = $36 \pm 4,7$; $p < 0,001$)].

No AcbCh (Figura 61B), houve um efeito significativo do fator fenótipo ($F_{2,84} = 4,99$, $p < 0,01$). Um aumento do número de células DeltaFosB positivas foi encontrado em ambos os fenótipos resiliente e susceptível quando comparados ao grupo controle, em ambos os hemisférios cerebrais, independente do tratamento com a N-AC [(Resiliente, veículo, hemisfério esquerdo = $49 \pm 5,5$; veículo, hemisfério direito = $48 \pm 5,3$; N-AC 60 mg/kg, hemisfério esquerdo = $51 \pm 9,1$; N-AC 60 mg/kg, hemisfério direito = $41 \pm 2,5$ x Controle, veículo, hemisfério esquerdo = $42 \pm 7,0$; veículo, hemisfério direito = $33 \pm 7,0$; N-AC 60 mg/kg, hemisfério esquerdo = $35 \pm 7,3$; N-AC 60 mg/kg, hemisfério direito = $40 \pm 2,0$; $p < 0,05$) (Susceptível, veículo, hemisfério esquerdo = $41 \pm 5,9$; veículo, hemisfério direito = $54 \pm 8,5$; N-AC 60 mg/kg, hemisfério esquerdo = $54 \pm 6,0$; N-AC 60 mg/kg, hemisfério direito = $58 \pm 7,8$ x Controle, veículo, hemisfério esquerdo = $42 \pm 7,0$; veículo, hemisfério direito = $33 \pm 7,0$; N-AC 60 mg/kg, hemisfério esquerdo = $35 \pm 7,3$; N-AC 60 mg/kg, hemisfério direito = $40 \pm 2,0$; $p < 0,05$; $p < 0,01$)].

Figura 61 - Quantificação das células positivas para DeltaFosB nas sub-regiões centro e concha do núcleo acumbens de animais susceptíveis e resilientes ao estresse de derrota social no experimento 8. Os animais foram perfundidos e os encéfalos retirados após 16 dias de tratamento com a N-acetilcisteína na dose de 60 mg/kg, duas vezes ao dia. A, quantificação do número de células DeltaFosB positivas no centro do núcleo acumbens; B, quantificação do número de células DeltaFosB positivas na concha do núcleo acumbens. As barras representam a média + EPM ($n = 8$ animais/grupo). AcbC, centro; AcbCh, concha; N-AC, N-acetilcisteína. *, $p < 0,05$ em relação ao grupo controle no mesmo hemisfério.



Fonte: próprio autor, 2021.

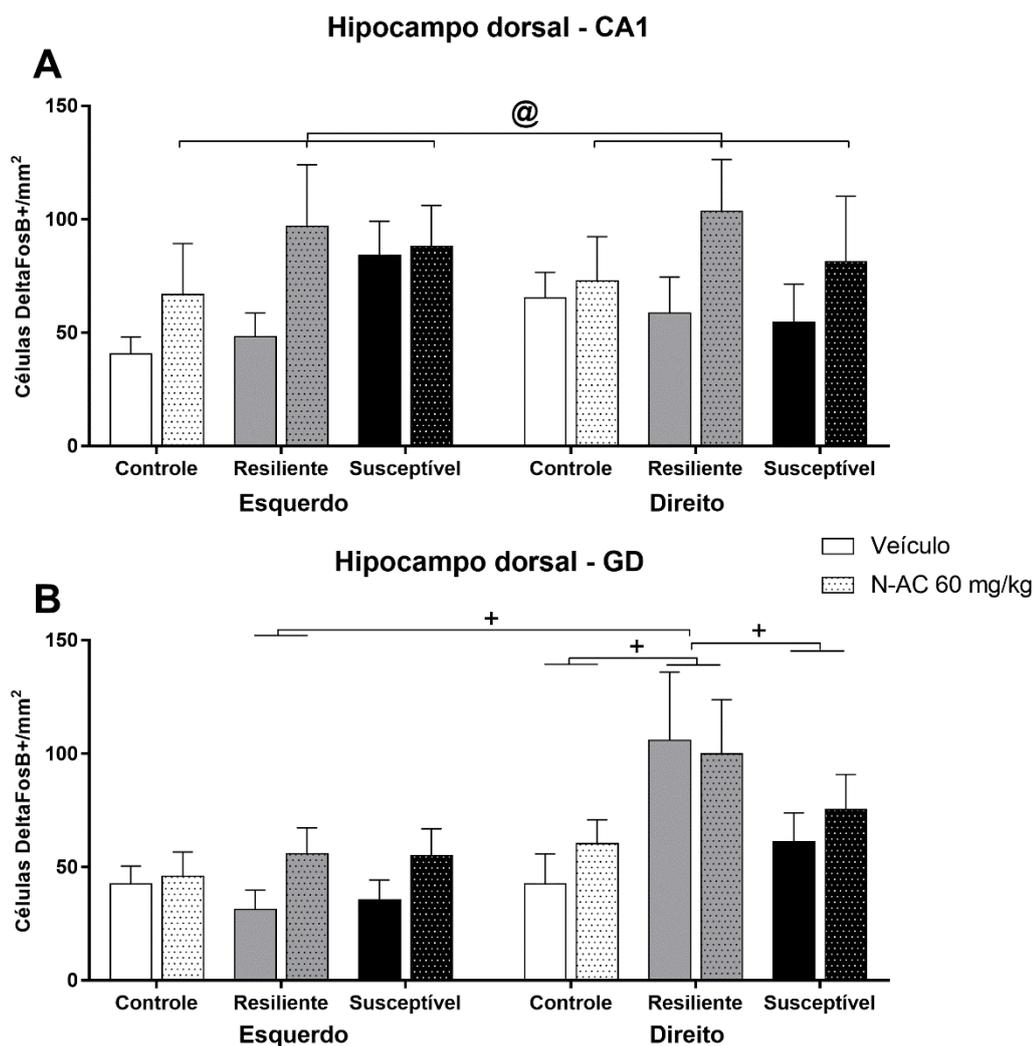
4.8.6. Efeito da N-acetilcisteína no número de células positivas para DeltaFosB no hipocampo dorsal

A ANOVA de três vias revelou um efeito significativo do fator tratamento ($F_{1,82} = 5,73$; $p < 0,01$) na sub-região CA1 (Figura 62A). O teste *post hoc* mostrou um maior número de células DeltaFosB positivas nos grupos tratados com a N-AC, independente do fenótipo e do hemisfério.

Em relação ao GD (Figura 62B), a ANOVA de três vias revelou um efeito do hemisfério ($F_{1,80} = 11,59$; $p < 0,001$) e da interação entre os fatores fenótipo e hemisfério ($F_{2,80} = 3,10$; $p < 0,05$). Houve um aumento significativo do número de células DeltaFosB positivas apenas no hemisfério direito do GD dos animais

resilientes ao EDS, independente do tratamento com a N-AC, quando comparados ao grupo controle (Resiliente, veículo, hemisfério direito = $106 \pm 30,1$; N-AC 60 mg/kg, hemisfério direito = $100 \pm 23,8$; x Controle, veículo, hemisfério direito = $43 \pm 13,3$; N-AC 60 mg/kg, hemisfério direito = $60 \pm 10,6$; $p < 0,01$), susceptível (Resiliente, veículo, hemisfério direito = $106 \pm 30,1$; N-AC 60 mg/kg, hemisfério direito = $100 \pm 23,8$; x Susceptível, veículo, hemisfério direito = $61 \pm 12,6$; N-AC 60 mg/kg, hemisfério direito = $75 \pm 15,5$; $p < 0,05$) e em relação ao próprio grupo no hemisfério esquerdo (Resiliente, veículo, hemisfério direito = $106 \pm 30,1$; N-AC 60 mg/kg, hemisfério direito = $100 \pm 23,8$; x Resiliente, veículo, hemisfério esquerdo = $31 \pm 8,5$; N-AC 60 mg/kg, hemisfério esquerdo = $56 \pm 11,5$; $p < 0,01$).

Figura 62 - Quantificação das células positivas para DeltaFosB hipocampo dorsal e suas sub-regiões de animais susceptíveis e resilientes ao estresse de derrota social no experimento 8. Os animais foram perfundidos e os encéfalos retirados após 16 dias de tratamento com a N-acetilcisteína na dose de 60 mg/kg, duas vezes ao dia. A, quantificação do número de células DeltaFosB positivas no *Cornus ammonis 1* do hipocampo dorsal; B, quantificação do número de células DeltaFosB positivas no giro denteado do hipocampo dorsal. As barras representam a média + EPM (n = 7-8 animais/grupo). CA1, *Cornus ammonis 1*; GD, giro denteado; N-AC, N-acetilcisteína. @, $p < 0,05$ em relação a todos os grupos tratados com veículo; +, $p < 0,05$ em relação ao grupo apontado.



Fonte: próprio autor, 2021.

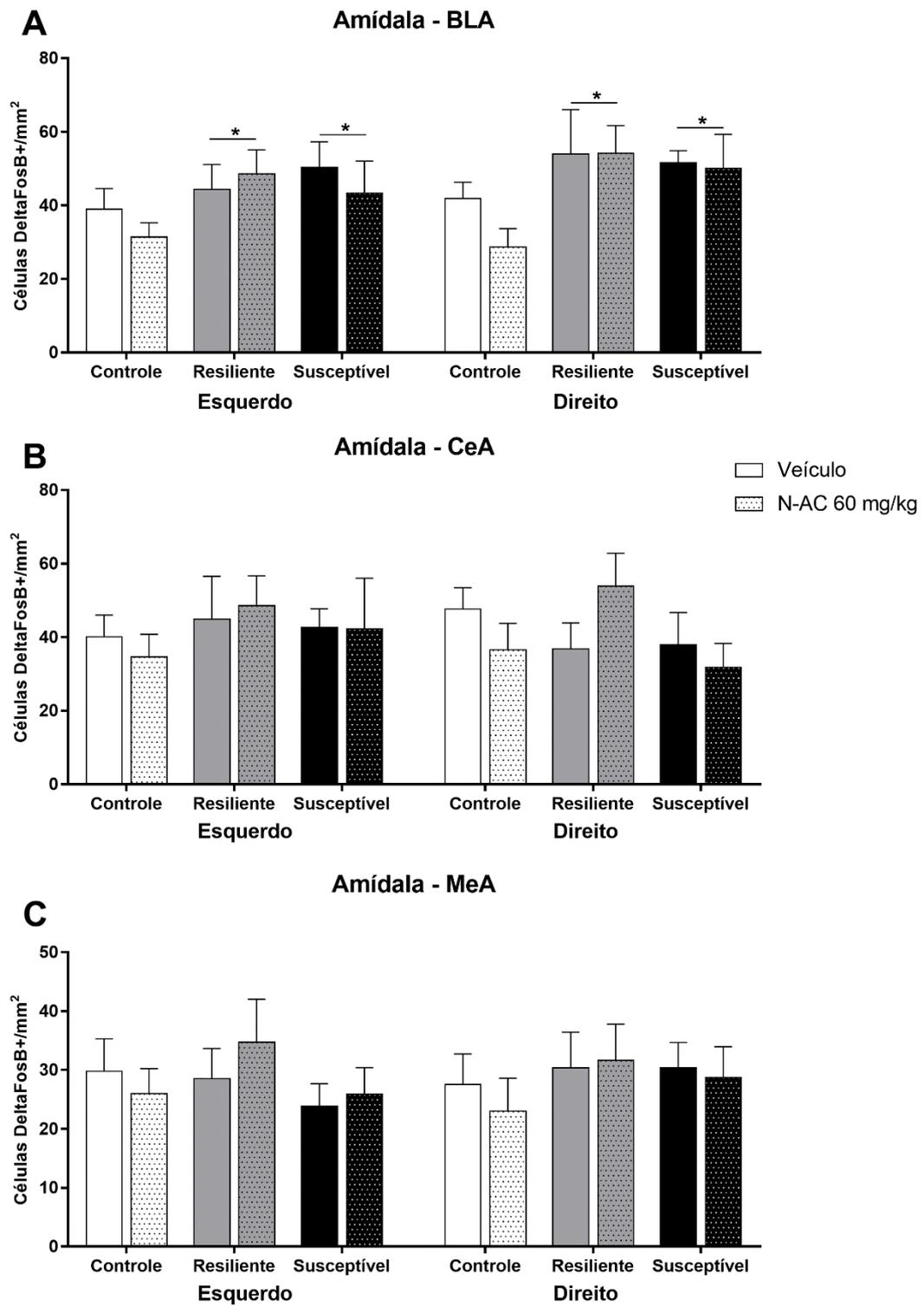
4.8.7. Efeito da N-acetilcisteína no número de células positivas para DeltaFosB na amígdala

Na BLA (Figura 63A), a ANOVA de três vias mostrou um efeito significativo do fator fenótipo ($F_{2,82} = 5,29$; $p < 0,01$). Houve um aumento significativo no número de células DeltaFosB positivas no grupo resiliente quando comparado ao grupo controle (Resiliente, veículo, hemisfério esquerdo = $44 \pm 6,8$; veículo, hemisfério direito = $54 \pm 12,0$; N-AC 60 mg/kg, hemisfério esquerdo = $49 \pm 6,6$; N-AC 60 mg/kg, hemisfério direito = $54 \pm 7,4$ x Controle, veículo, hemisfério esquerdo = $39 \pm 5,5$; veículo, hemisfério direito = $42 \pm 4,4$; N-AC 60 mg/kg, hemisfério esquerdo = $31 \pm 3,8$; N-AC 60 mg/kg, hemisfério direito = $29 \pm 4,9$; $p < 0,01$) e no grupo susceptível quando

comparado ao grupo controle (Susceptível, veículo, hemisfério esquerdo = $50 \pm 6,9$; veículo, hemisfério direito = $52 \pm 3,2$; N-AC 60 mg/kg, hemisfério esquerdo = $43 \pm 8,6$; N-AC 60 mg/kg, hemisfério direito = $50 \pm 9,3$ x Controle, veículo, hemisfério esquerdo = $39 \pm 5,5$; veículo, hemisfério direito = $42 \pm 4,4$; N-AC 60 mg/kg, hemisfério esquerdo = $31 \pm 3,8$; N-AC 60 mg/kg, hemisfério direito = $29 \pm 4,9$; $p < 0,01$), independente do hemisfério e do tratamento.

Não foram encontradas diferenças significativas na contagem de neurônios da CeA (Figura 63B) e da MeA (Figura 63C).

Figura 63 - Quantificação das células positivas para DeltaFosB na amígdala e suas sub-regiões de animais susceptíveis e resilientes ao estresse de derrota social no experimento 8. Os animais foram perfundidos e os encéfalos retirados após 16 dias de tratamento com a N-acetilcisteína na dose de 60 mg/kg, duas vezes ao dia. A, quantificação do número de células DeltaFosB positivas na amígdala basolateral; B, quantificação do número de células DeltaFosB positivas na amígdala central; C, quantificação de células DeltaFosB positivas na amígdala medial. As barras representam a média + EPM ($n = 7-8$ animais/grupo). BLA, basolateral; CeA, central; MeA, medial; N-AC, N-acetilcisteína. *, $p < 0,05$ em relação ao grupo controle no mesmo hemisfério.



Fonte: próprio autor, 2021.

5. DISCUSSÃO

5.1. ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS RELACIONADAS AOS FENÓTIPOS DE ENFRETEAMENTO AO ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL

Este trabalho traz uma ampla caracterização dos fenótipos susceptível e resiliente ao EDS em ratos, evidenciando alterações relacionadas ao desenvolvimento de doenças no fenótipo susceptível e uma recuperação positiva nos ratos resilientes ao EDS. Nesse contexto, os animais susceptíveis apresentaram um repertório de comportamentos relacionados à depressão, ansiedade e prejuízo de memória, enquanto apenas a memória episódica foi afetada nos animais resilientes. Essas alterações parecem não relacionadas com a intensidade da agressão sofrida. A tabela 4 sumariza os resultados encontrados.

Tabela 4 - Sumário das alterações comportamentais nos fenótipos resiliente e susceptível ao estresse de derrota social. Os símbolos ↑, ↓ e = indicam aumento, diminuição ou não-alteração na medida, respectivamente, em relação ao grupo Controle. Entre parênteses, alterações que foram encontradas apenas quando o teste foi realizado após o período de tratamento com veículo por 16 dias. LCE, labirinto em cruz elevado; TNF, teste do nado forçado.

	Resiliente	Susceptível
Evitação social	=	↑
Estado da pelagem	=	↓
Ganho de peso corporal	↓	↓
Comportamentos relacionados à ansiedade no LCE	↓	(↑)
Comportamentos relacionados à depressão no TNF	=	↑
Atividade locomotora	↑	=
Memória episódica	Curto prazo	=
	Longo Prazo	↓
Intensidade da agressão sofrida	=	=
Submissão ao agressor	=	=
Preferência pela sacarose	=	↓

Fonte: próprio autor, 2021.

A evitação social tem sido amplamente empregada em camundongos para identificação e estudo dos fenótipos resiliente e susceptível ao EDS (GOLDEN *et al.*, 2011; KRISHNAN, 2014; PAGLIUSI JR.; SARTORI, 2019; PLANCHEZ; SURGET; BELZUNG, 2019). No geral, os camundongos susceptíveis ao EDS apresentam evitação social e anedonia no TCS (KRISHNAN *et al.*, 2007), assim como encontrado em nosso trabalho em ratos. Além disso, mostramos outros comportamentos relacionados à depressão que são aumentados exclusivamente nos animais susceptíveis ao EDS, ou seja, o aumento do tempo de imobilidade no TNF e maior deterioração da pelagem durante o período de estresse. Esses resultados sugerem que o uso desse modelo de identificação dos fenótipos de enfrentamento ao EDS também é efetivo para utilização em ratos.

O protocolo no qual nos baseamos para utilização do TIS considera, como critério para classificação dos fenótipos, o escore da RI igual a 1 (GOLDEN *et al.*, 2011) em camundongos da linhagem isogênica C57BL/6J. Esse protocolo foi posteriormente validado também em uma linhagem de camundongos heterogênicos (PAGLIUSI JR.; SARTORI, 2019). Entretanto, em nosso trabalho verificamos que a utilização desse valor é inviável, uma vez que subestima muito o número de animais susceptíveis. Quando comparados ratos e camundongos, os primeiros parecem ser mais sociáveis, sendo a interação social mais reforçadora nessa espécie. A dose de cocaína que em camundongos aumenta a preferência pela droga em detrimento da interação social não tem o mesmo efeito em ratos (KUMMER *et al.*, 2014). Além disso, ratos saciados tem preferência pela interação social em relação a comida, e uma preferência semelhante entre a interação social e a comida quando privados de alimento. Por outro lado, camundongos saciados tem preferência semelhante pela interação social e comida, e maior preferência pela comida quando privados de alimento (REPPUCCI *et al.*, 2020). Encontramos na estatística a resolução para esse problema. Utilizando a análise de agrupamentos dos valores de RI obtidos no TIS, foi possível a identificação de dois grupos distintos, sendo que um apresenta evitação social quando comparado a animais não estressados e comportamentos relacionados à depressão em outros testes. Além disso, os valores de RI são negativamente correlacionados ao tempo de imobilidade no TNF, indicando que animais com valores menores de RI apresentam aumento nos comportamentos relacionados à depressão

(MORAIS-SILVA *et al.*, 2019). A separação dos fenótipos foi realizada utilizando os valores de RI obtidos no TIS realizado apenas um dia após o EDS. Entretanto, estudos anteriores tem mostrado que essas alterações são duradouras e podem ser utilizadas na separação dos fenótipos por até 6 meses (RIGA *et al.*, 2017).

Expandindo o repertório de alterações comportamentais relacionadas à depressão exclusivas do fenótipo susceptível, nós encontramos um aumento na deterioração da pelagem. A diminuição dos cuidados com a pelagem faz um paralelo com a menor motivação para os cuidados pessoais e higiene relatada na prática clínica em pacientes deprimidos (ALONSO *et al.*, 2004; AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013). Diversos estudos mostram resultados semelhantes em modelos animais de exposição ao estresse crônico, cujas alterações são revertidas apenas mediante tratamento crônico com antidepressivos (IBARGUEN-VARGAS *et al.*, 2008; LAW *et al.*, 2016). Estudos comparando diferentes linhagens mostram ainda que a deterioração da pelagem aparece apenas nas linhagens mais susceptíveis ao estresse (POTHION *et al.*, 2004; YALCIN; BELZUNG; SURGET, 2008). Camundongos susceptíveis ao ECV apresentam deterioração da pelagem mais intensa em relação aos animais resilientes e não expostos ao ECV (NASCA *et al.*, 2014). Juntos, esses dados reforçam a utilização desse tipo de avaliação no estudo do estresse e suas consequências (SMOLINSKY *et al.*, 2009).

Ao contrário do descrito para camundongos, os ratos classificados como resilientes apresentaram diminuição dos comportamentos relacionados à ansiedade no LCE e aumento da atividade locomotora no CA, enquanto os susceptíveis apresentaram aumento da ansiedade quando testados 18 dias após o último episódio de EDS. Tanto os camundongos susceptíveis e resilientes ao EDS apresentam aumento da ansiedade no LCE (KRISHNAN *et al.*, 2007). Camundongos susceptíveis ao estresse social crônico selecionados por meio do aumento da corticosterona basal após o período de estresse também apresentam aumento dos comportamentos relacionados à ansiedade, além de aumento da atividade locomotora no CA (SCHMIDT *et al.*, 2010). Em outros estudos envolvendo modelos animais de depressão, resultados mostrando aumento da ansiedade e alterações na locomoção são inconsistentes, variando de acordo com o tempo de exposição ao estresse, linhagem animal utilizada, aparato comportamental e características do ambiente no qual os animais são testados (BLANCHARD; MCKITTRICK; BLANCHARD, 2001; HAMMELS *et al.*, 2015). Por exemplo, uma única exposição ao EDS aumenta os

comportamentos relacionados à ansiedade no LCE quando este é realizado 5 minutos após o encontro agressivo, mas não 24 horas (COSTA *et al.*, 2016). Essa grande variedade de resultados dificulta a interpretação dos dados obtidos em nosso trabalho. Uma hipótese plausível é que essa diminuição dos comportamentos relacionados à ansiedade mostrada nos animais resilientes pode estar relacionada à maneira como esses animais lidam com as situações aversivas, como a exposição aos braços abertos do LCE ou ao ambiente novo e aberto do CA, sendo essa maneira um fator de proteção contra as consequências negativas do estresse. Outra hipótese é que essas diferenças são naturais entre os fenótipos, existindo nos indivíduos antes da exposição ao estresse.

Reclamações relacionados a problemas de memória e concentração são comuns em pacientes acometidos do transtorno de depressão maior. Indivíduos deprimidos apresentam dificuldade em recordar eventos, diminuição da memória associada a eventos positivos e facilidade em memorizar eventos e materiais aversivos (DILLON; PIZZAGALLI, 2018). Em modelos animais, a exposição crônica ao estresse está relacionada a um prejuízo na memória espacial de longo prazo no labirinto em Y (CONRAD *et al.*, 1996,2003; ORSETTI *et al.*, 2007) e no RNO (ORSETTI *et al.*, 2007; ZOLADZ *et al.*, 2008), mas não na memória de curto prazo (KLEEN *et al.*, 2006; WRIGHT; CONRAD, 2008). Em nosso estudo, ambos os fenótipos expostos ao EDS apresentaram prejuízo na memória episódica de longo prazo. Apesar de não ter sido estatisticamente significativa, os animais susceptíveis apresentaram uma tendência de maior prejuízo também em relação aos animais resilientes. Esses resultados reforçam a associação entre a evitação social e os comportamentos relacionados à depressão, e não a um prejuízo na memória dos animais susceptíveis. De acordo com nosso conhecimento, apenas um trabalho avaliou as diferenças na memória espacial em relação aos fenótipos de enfrentamento ao EDS (RIGA *et al.*, 2017). Nesse trabalho, os animais susceptíveis apresentaram prejuízo na memória de curto prazo nove semanas após o término da exposição ao EDS por uma semana, enquanto os animais resilientes não apresentaram essas alterações. Em conjunto, esses resultados sugerem que, inicialmente, os prejuízos relacionados à memória após a exposição ao estresse não estão relacionados ao fenótipo de enfrentamento ao estresse. Entretanto, semanas após o término dessa exposição, apenas os indivíduos resilientes parecem se recuperar, uma vez que o prejuízo de memória aparece apenas nos animais susceptíveis.

A anedonia é um sintoma chave da depressão (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013). Em modelos animais, a exposição ao estresse de forma crônica diminui a preferência e o consumo de soluções adocicadas (PLANCHEZ; SURGET; BELZUNG, 2019), sendo exclusiva do fenótipo susceptível e mais intensa em linhagens mais susceptíveis ao estresse (KRISHNAN *et al.*, 2007; PALMFELDT *et al.*, 2016; POTHION *et al.*, 2004; TORRES-BERRÍO *et al.*, 2017). Essa redução na preferência pela sacarose pode inclusive ser utilizada na separação dos fenótipos de enfrentamento ao estresse (NASCA *et al.*, 2014). Em nosso estudo, a redução na preferência pela sacarose foi restrita as primeiras horas em que a solução foi oferecida aos animais. Essa redução corrobora com os outros resultados envolvendo comportamentos relacionados à depressão encontrados em nosso estudo nos ratos susceptíveis, em que apenas esse fenótipo apresentou um aumento da imobilidade no TNF e maior deterioração da pelagem durante o período de EDS.

A análise dos encontros agressivos no EDS não mostrou nenhuma diferença quanto a agressividade dos residentes em relação aos fenótipos, assim como os fenótipos não diferiram quanto a latência para apresentarem a postura de submissão e no tempo gasto explorando o agressor. Esses resultados são importantes para demonstrar que a diferença nos fenótipos apresentados pelos animais não se deve a uma menor quantidade de ataques agressivos sofridos, e sim está relacionada a fatores individuais. Outros estudos têm utilizado a latência para postura de submissão na identificação dos fenótipos de enfrentamento ao estresse em ratos da linhagem Sprague Dawley (WOOD *et al.*, 2010,2013,2015), onde animais cuja latência para postura de submissão é mais curta também apresentam aumento dos comportamentos relacionados à depressão no TNF (WOOD *et al.*, 2010). Essa separação não foi replicada em nosso estudo, indicando que talvez esse parâmetro tenha uma utilização mais restrita de acordo com a linhagem utilizada.

5.2.ALTERAÇÕES NEURAIS RELACIONADAS AO TROCADOR CISTINA GLUTAMATO E AO FATOR DE TRANSCRIÇÃO DELTAFOSB NOS FENÓTIPOS DE ENFRENTAMENTO AO ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL

Os fenótipos de enfrentamento ao EDS parecem estar relacionados com um acúmulo diferente de DeltaFosB em diversas regiões encefálicas sensíveis aos efeitos do estresse, em especial regiões corticais e do sistema límbico. A tabela 5 sumariza

os resultados encontrados. Por outro lado, apenas o HpcV apresentou alterações na quantidade do xCT diferentes entre os fenótipos.

Tabela 5 - Sumário das alterações no número de células positivas para DeltaFosB encéfalo nos fenótipos resiliente e susceptível ao estresse de derrota social. Os símbolos ↑, ↓ e = indicam aumento, diminuição ou não-alteração na medida, respectivamente, em relação ao grupo Controle. A direita, avaliação da diferença hemisférica na expressão da DeltaFosB. O símbolo ↑ indica maior número de células positivas para DeltaFosB no hemisfério indicado, independente do fenótipo ou tratamento. Entre parênteses, alterações que foram encontradas apenas quando o teste foi realizado após o período de tratamento com veículo por 16 dias. CPFm, córtex pré-frontal medial - Cg, cíngulado; PrL, pré-límbico; IL, infralímbico; COF, córtex orbitofrontal - VO, ventral; LO, lateral; Acb, núcleo acumbens – AcbC, centro; AcbCh, concha; CPu, caudado-putamen; Ins, córtex insular – Ains, agranular; DIns, desgranular; GIns, granular; HpcD, hipocampo dorsal – CA1, *Cornus ammonis 1*; GD, giro dentado; Ami, amígdala – BLA, basolateral; CeA, central; MeA, medial; HL, hipotálamo lateral; HVM, hipotálamo ventromedial – HVMD, dorsal; HVMVL, ventrolateral; MCP, matéria cinzenta periaquedutal – MCPDM, dorsomedial; MCPDL, dorsolateral; MCPL, lateral; MCPVL, ventrolateral.

		Resiliente		Susceptível		Diferença hemisférica
		Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito	
CPFm	Cg	=	=	=	=	↑ Hemisfério direito
	PrL	=	=	↑	↑	(↑ Hemisfério direito)
	IL	↑	↑	=	=	(↑ Hemisfério direito)
COF	VO	↑	=	=	=	Não
	LO	=	=	=	=	Não
Acb	AcbC	↑	↑	↑	↑	↑ Hemisfério direito
	AcbCh	↑	↑	↑	↑	Não
CPu		=	=	=	=	↑ Hemisfério esquerdo
Ins	AIns	=	=	=	=	↑ Hemisfério direito
	DIns	=	=	=	=	↑ Hemisfério esquerdo
	GIns	=	=	=	=	↑ Hemisfério direito
HpcD	CA1	=	=	=	=	↑ Hemisfério direito
	GD	=	↑	=	=	Não
Ami	BLA	↑	↑	=	=	Não

	CeA	=	=			Não
	MeA	=	=	↑	↑	Não
	HL	=	=	=	=	Não
HVM	HVMD	=	=	=	=	Não
	HVMVL	=	=	=	=	Não
MCP	MCPDM	=			↑	Sub-região unilateral
	MCPDL	=	=	=	=	↑ Hemisfério Esquerdo
	MCPL	↑	↑	=	=	↑ Hemisfério direito
	MCPVL	=			=	Sub-região unilateral

Fonte: próprio autor, 2021.

Alterações da força sináptica no hipocampo tem sido descritas em animais expostos cronicamente ao estresse. Protocolos de estresse psicossocial diminuem os mecanismos de potenciação sináptica de longo prazo e aumentam os mecanismos de depressão sináptica de longo prazo, resultando em uma diminuição da força sináptica e prejudicando a memória em modelos animais (KIM; PELLMAN; KIM, 2015), os quais são revertidos mediante tratamento crônico com antidepressivos (FRIJTAG; VON *et al.*, 2001). Nesse sentido, a neurotransmissão excitatória do HpcV para o Acb é aumentada em animais susceptíveis ao EDS, e sua inativação possui efeitos pró-resiliência (BAGOT *et al.*, 2015). Nesse estudo os autores sugerem que esse aumento da atividade glutamatérgica pode estar relacionado com o aumento da depressão sináptica de longo prazo visto após o estresse. Com base nisso, podemos sugerir que a diminuição do xCT no HPCV dos animais resilientes pode ser um fator protetor dessas alterações induzidas pelo estresse. Nesse sentido, o bloqueio dos receptores metabotrópicos de glutamato do tipo II (mGluR2), que podem ser ativados pela liberação extrassináptica de glutamato pelo xCT, aumenta a resiliência ao estresse (HIGHLAND *et al.*, 2019). Entretanto, a diminuição da expressão dessa proteína no HpcV tem sido relacionada a uma perda da resiliência ao estresse em modelos genéticos de exposição ao estresse e em camundongos expostos cronicamente ao estresse de restrição (NASCA *et al.*, 2017). Mais experimentos são necessários para esclarecer esse resultado em nosso estudo.

As diversas alterações na expressão da DeltaFosB entre animais susceptíveis e resilientes podem ajudar a entender a variedade de diferenças entre os fenótipos, desde o comportamento até a respostas cardiovasculares. Essas alterações podem, até certo ponto, explicar os efeitos da manipulação funcional nessas regiões e sua relação com a vulnerabilidade ao estresse. Essas alterações também reforçam a ideia da resiliência como um processo ativo, dependente de alterações no organismo dos indivíduos.

O CPFm parece ser uma importante região relacionada à expressão dos fenótipos de enfretamento ao estresse. A ativação optogenética da parte mais ventral do CPFm de camundongos susceptíveis ao EDS tem efeito antidepressivo e induz a expressão de diversos genes de expressão imediata nessa região (COVINGTON *et al.*, 2010). De maneira semelhante, o tratamento com antidepressivos reverte as alterações comportamentais e as alterações na fosforilação do fator de transcrição CREB e na atividade da enzima ERK (PESARICO *et al.*, 2017). Por outro lado, a ativação de todo o CPFm de camundongos resilientes reverte o fenótipo resiliente (WANG *et al.*, 2014).

Em nosso estudo, os ratos resilientes ao EDS mostraram um maior número de células positivas para DeltaFosB na sub-região IL do CPFm, enquanto os ratos susceptíveis mostraram um aumento na DeltaFosB na sub-região PrL. Camundongos susceptíveis apresentam alterações elétricas nos neurônios do PrL (WANG *et al.*, 2014), assim como um maior acúmulo de DeltaFosB nessa sub-região (VIALOU *et al.*, 2014). Além disso, a superexpressão desse fator de transcrição no PrL aumenta a susceptibilidade ao EDS (VIALOU *et al.*, 2014). Por outro lado, a superexpressão de DeltaFosB no IL não altera o fenótipo de resiliência ou susceptibilidade (VIALOU *et al.*, 2014). Esses resultados indicam que a expressão da DeltaFosB, por si só, não é suficiente para alterar os efeitos do estresse mesmo em regiões onde essa molécula se acumula nos diferentes fenótipos de enfretamento ao estresse. Uma hipótese é que essas alterações podem ser necessárias para proteção dos neurônios de determinada região contra os efeitos do estresse, mas não tem efeito em alterações já estabelecidas.

Em contrapartida, o acúmulo de DeltaFosB no IL parece estar relacionado com o acúmulo de DeltaFosB em outra região encefálica nos animais resilientes: a BLA. O IL envia extensas projeções para a BLA (VERTES, 2004), cuja ativação quimiogênica aumenta a resiliência ao EDS em hamsters (DULKHA *et al.*, 2020). Além

disso, essas duas regiões sofrem alterações sinápticas de longo prazo após a exposição crônica ao EDS (COLYN *et al.*, 2019). A Ami tem um papel fundamental no processamento emocional, altamente conservado filogeneticamente, em especial no medo e na memória relacionada a esses estímulos, mas também no aprendizado relacionado à estímulos reforçadores (tanto positivos quanto negativos) e claro, ansiedade (JANAK; TYE, 2015). O acúmulo da DeltaFosB na BLA dos ratos resilientes pode estar relacionado com uma proteção dos neurônios dessa região contra os efeitos do estresse.

Como citado anteriormente, estudos tem demonstrado um importante papel da lateralização funcional dos hemisférios encefálicos, em especial do CPFm, nas respostas comportamentais ao estresse (CERQUEIRA; ALMEIDA; SOUSA, 2008). Por exemplo, a inibição do hemisfério esquerdo do CPFm aumenta a resposta ansiogênica ao EDS em camundongos (COSTA *et al.*, 2016). Camundongos identificados como susceptíveis ao EDS apresentam menor atividade do lado esquerdo do CPFm, cuja ativação restaura os níveis de interação social nesses mesmos animais (LEE *et al.*, 2015). Em regiões corticais de ratos identificados como susceptíveis por meio da avaliação do consumo de sacarose após a exposição ao estresse crônico variável, existe uma lateralização dos níveis de BDNF (do inglês, *brain-derived neurotrophic factor*) e do receptor NTRK-3 (do inglês, *neurotrophic tyrosine kinase receptor type 3*) em relação aos animais resilientes (FARHANG *et al.*, 2014). Em humanos, estudos *post-mortem* com pacientes deprimidos tem indicado uma diminuição do volume de sub-regiões do COF (BALLMAIER *et al.*, 2004; BREMNER *et al.*, 2002; LACERDA *et al.*, 2004; LAVRETSKY *et al.*, 2007; MONKUL *et al.*, 2007; TAYLOR *et al.*, 2007), sendo essa diminuição mais evidente no hemisfério esquerdo (ARNONE *et al.*, 2012; LACERDA *et al.*, 2004).

Em nosso estudo encontramos lateralização da expressão de DeltaFosB em duas regiões encefálicas: na parte ventral do COF (VO) e no GD do HpcD. Na primeira, houve um aumento de DeltaFosB no hemisfério esquerdo dos animais resilientes, enquanto na segunda esse aumento ocorreu no hemisfério direito dos animais resilientes.

A nível do córtex pré-frontal (CPFm e COF), as respostas emocionais ao estresse parecem ser precisamente controladas por um balanço entre a atividade do hemisfério esquerdo e direito, onde uma maior atividade do lado direito em geral reflete uma resposta exacerbada ao estímulo aversivo (CERQUEIRA; ALMEIDA;

SOUSA, 2008; OCKLENBURG *et al.*, 2016; SULLIVAN; GRATTON, 1999). Nesse sentido, parece haver um controle inibitório das estruturas no hemisfério esquerdo em relação ao direito (CERQUEIRA; ALMEIDA; SOUSA, 2008; SULLIVAN, 2004; SULLIVAN; GRATTON, 2002). Em adolescentes com transtorno de estresse pós-traumático (TEPT), um maior volume do CPF parece estar relacionado com um efeito protetor contra o TEPT (MUTLUER *et al.*, 2018). O aumento de DeltaFosB no hemisfério esquerdo do VO, então, pode ser um fator que impede o aparecimento de estados emocionais negativos exacerbados nos ratos resilientes, uma vez que pode aumentar o controle do hemisfério esquerdo sobre o direito. A superexpressão de DeltaFosB bilateralmente no COF não aumenta a resiliência ao EDS, embora tendências sejam observadas (VIALOU *et al.*, 2014). O VO se projeta para inúmeras estruturas encefálicas envolvidas na resposta ao estresse e comportamento, como CPFm, Ami, estriado, hipotálamo, rafe e área tegmental ventral (HOOVER; VERTES, 2011), por meio das quais pode alterar as respostas comportamentais ao EDS.

Em relação ao hipocampo, os estudos envolvendo lateralização funcional são escassos. Apesar disso, a neurogênese, importante característica dessa região, é diferente entre os dois hemisférios (SILVA *et al.*, 2006). A exposição crônica ao estresse diminui os níveis de noradrenalina especificamente no hemisfério direito do hipocampo (SPASOJEVIC; JOVANOVIC; DRONJAK, 2013; SPASOJEVIC *et al.*, 2012), mesma região onde encontramos alteração nos animais resilientes em nosso estudo. Assim, o aumento de DeltaFosB pode ter um papel em manter a funcionalidade e lateralidade dessa estrutura, impedindo as alterações comportamentais nos animais resilientes.

Estudos mostram uma importância da manutenção da lateralização funcional do cérebro nas respostas ao estresse, e um prejuízo dessa lateralização após o estresse crônico (CZÉH *et al.*, 2008; OCKLENBURG *et al.*, 2016; SALGIRLI DEMIRBAS *et al.*, 2019). A ausência de alterações no VO esquerdo e GD direito nos animais susceptíveis pode indicar um prejuízo na lateralização funcional dessas regiões, contribuindo para o desenvolvimento de alterações comportamentais relacionadas à depressão.

No Acb, o acúmulo da DeltaFosB tem sido relacionado com a resiliência ao EDS (LOBO *et al.*, 2013; OHNISHI *et al.*, 2011), sendo que a superexpressão dessa molécula no Acb aumenta a resiliência ao EDS (DONAHUE *et al.*, 2014; MUL *et al.*, 2018; VIALOU *et al.*, 2010). Esse efeito parece ser mediado especificamente pelos

neurônios do tipo D1 nessa região, uma vez que a ativação desses neurônios induz resiliência ao EDS (FRANCIS *et al.*, 2015), assim como a superexpressão de DeltaFosB (HAMILTON *et al.*, 2017). Em animais susceptíveis, por sua vez, o acúmulo de DeltaFosB ocorre especificamente nos neurônios do tipo D2 (LOBO *et al.*, 2013), cuja ativação está relacionada com a susceptibilidade (FRANCIS *et al.*, 2015). Nossos resultados mostraram um aumento da DeltaFosB no Acb de ambos os fenótipos. Nesse caso, esse resultado deve refletir a contagem das células DeltaFosB positivas como um todo, sem a separação entre os neurônios do tipo D1 e D2, culminando em um aumento em ambos os grupos.

Na MCPVL, a superexpressão de DeltaFosB aumenta a resiliência ao estresse induzido pelo choque inescapável nas patas (BERTON *et al.*, 2007). No nosso estudo, entretanto, não encontramos alterações na expressão de DeltaFosB na MCPVL, apenas na MCPL dos animais resilientes e na MCPDM dos animais susceptíveis. Neste caso, podemos sugerir duas hipóteses: a primeira de que a DeltaFosB na MCPVL induz resiliência especificamente ao choque inescapável, não tendo um papel marcante no EDS. Outra hipótese é de que um aumento induzido de DeltaFosB nessa região aumenta a resiliência ao estresse, porém não está relacionado com a expressão natural da resiliência ao estresse.

Nossos achados em diversas regiões encefálicas ampliam resultados prévios na literatura acerca da expressão da DeltaFosB nos diferentes fenótipos de enfrentamento ao EDS em camundongos (VIALOU *et al.*, 2014). Em alguns casos, em que estudos anteriores não encontraram diferenças significativas, ou que as diferenças não foram conclusivas, identificamos em nosso estudo um papel importante do hemisfério cerebral ou de uma sub-região específica da área estudada. Como exemplo, podemos citar a MCP, que em camundongos apresenta um aumento tanto em animais resilientes quanto em animais susceptíveis, e que em nosso estudo encontramos alterações diferentes na MCPDM e MCPL, e o HPCD e COF, em que encontramos um importante efeito da lateralização dos hemisférios encefálicos.

5.3. ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES E NO PESO DE ÓRGÃOS RELACIONADAS AOS FENÓTIPOS DE ENFRENTAMENTO AO ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL

No sistema cardiovascular, alterações relacionadas a um maior risco para o desenvolvimento de patologias foram encontradas, como aumento da FC em repouso, diminuição da VFC, diminuição da efetividade do barorreflexo, aumento da resposta pressora ao estresse e hipertrofia do coração, provavelmente relacionadas a um desequilíbrio da modulação do sistema nervoso autônomo para o coração, por um aumento da contribuição do sistema nervoso autônomo simpático. Essas alterações foram inexistentes no fenótipo resiliente, que apresentou características relacionadas com um sistema cardiovascular saudável, como aumento da VFC e do tônus vagal para o coração. Apesar disso, a resiliência ao estresse não protege totalmente contra o aparecimento de alterações relacionadas ao estresse, como alteração no ganho de peso corporal e de órgãos cuja morfologia é afetada pelo estresse crônico. Parte desses resultados encontram-se publicados no periódico *Neurobiology of Stress* (exemplar disponível no ANEXO C). A tabela 6 sumariza os resultados encontrados.

Tabela 6 - Sumário das alterações cardiovasculares e no peso de órgãos nos fenótipos resiliente e susceptível ao estresse de derrota social. Os símbolos ↑, ↓ e = indicam aumento, diminuição ou não-alteração na medida, respectivamente, em relação ao grupo Controle. ER, estresse de restrição.

	Resiliente	Susceptível
Corticosterona plasmática no repouso	↑	=
Frequência cardíaca no repouso	=	↑
Pressão arterial no repouso	=	=
Variabilidade cardíaca no repouso	↑	↓
Tônus vagal no repouso	↑	=
Contribuição simpática para o balanço autônomo	=	↑
Tônus simpático para os vasos	=	=
Sensibilidade do barorreflexo	Esponâneo	↑
	Farmacológico	=
Efetividade do barorreflexo	=	↓
Resposta pressora ao ER	=	↑
Resposta taquicárdica ao ER	=	=
Temperatura cutânea durante o ER	=	=

Corticosterona plasmática em resposta ao ER		=	=
	Adrenais	↑	↑
	Timo	↓	↓
Massa dos órgãos	Baço	=	=
	Coração	=	↑
	Rins	=	=

Fonte: próprio autor, 2021.

As alterações cardiovasculares encontradas nos animais susceptíveis são, em geral, relacionadas a um mal prognóstico em relação ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Apesar desses animais não apresentarem hipertensão arterial, as alterações encontradas no fenótipo susceptível aumentam muito o risco do aparecimento de eventos cardiovasculares adversos, como arritmias, infarto agudo do miocárdio e hipertensão arterial (SGOIFO *et al.*, 2015). Esses mesmos animais também apresentaram aumento dos comportamentos relacionados à depressão, avaliados pela evitação social e deterioração da pelagem, reforçando a correlação entre as alterações cardiovasculares e a depressão. Alterações semelhantes são encontradas em roedores expostos ao estresse durante a adolescência, idade em que os indivíduos são mais susceptíveis aos efeitos prejudiciais do estresse (CRESTANI, 2017).

A taquicardia em repouso é uma alteração cardíaca que têm sido descrita de maneira consistente após a exposição crônica de roedores ao estresse, principalmente a protocolos envolvendo isolamento social (GRIPPO *et al.*, 2007,2010,2011; MCNEAL *et al.*, 2014) e o estresse crônico variável (DUARTE *et al.*, 2015; GRIPPO; BELTZ; JOHNSON, 2003; GRIPPO; MOFFITT; JOHNSON, 2002). Entretanto, poucos trabalhos descrevem esse efeito em protocolos envolvendo o EDS (CRESTANI, 2016; SÉVOZ-COUCHE *et al.*, 2013). Esses resultados conflitantes podem ser explicados pela presença de animais susceptíveis e resilientes analisados de maneira conjunta, o que poderia mascarar a visualização da taquicardia em repouso, principalmente levando em consideração que o percentual de animais susceptíveis em uma amostra depende de inúmeros fatores prévios ao experimento. Nossos dados reforçam essa hipótese, uma vez que animais resilientes não apresentam alteração na FC durante o repouso.

Diversos estudos têm mostrado a FC alta como um fator de risco para o aparecimento, desenvolvimento e de doenças cardiovasculares, além de interferir na recuperação dos pacientes acometidos de tais doenças (TADIC; CUSPIDI; GRASSI, 2018). Indivíduos com maior FC apresentam maior propensão ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares e morte prematura (KIM *et al.*, 1999; WOODWARD *et al.*, 2014). Recentemente, uma metanálise mostrou que, em humanos, um aumento de 10 bpm na FC de repouso aumenta em 15% o risco de aparecimento de doenças cardiovasculares e em 17% a mortalidade por outras causas (AUNE *et al.*, 2017). Em veteranos de guerra, os quais são uma população de risco para o desenvolvimento de diversas doenças relacionadas ao estresse, uma maior FC é associada a um maior risco para doenças cardiovasculares e mortalidade (PITTARAS *et al.*, 2013). Dentre as doenças cardiovasculares, níveis mais altos de FC aumentam o risco do desenvolvimento de hipertensão (KIM *et al.*, 1999; PALATINI *et al.*, 2006), insuficiência cardíaca (AUNE *et al.*, 2017; KHAN *et al.*, 2015; WOODWARD *et al.*, 2014), infarto agudo do miocárdio (AUNE *et al.*, 2017; FOX *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2017; ZHANG; WANG; LI, 2016) e o risco de mortalidade em pacientes acometidos por um acidente vascular encefálico (NOLTE *et al.*, 2016; QIU *et al.*, 2016). Essa correlação também é encontrada em estudos pré-clínicos. Camundongos expostos ao estresse psicológico cronicamente apresentam aumento da FC de repouso e diminuição da função endotelial, o que acarreta em um aumento da área de dano isquêmico em um modelo de acidente vascular encefálico (CUSTODIS *et al.*, 2011). Em macacos tratados com dieta aterogênica (BEERE; GLAGOV; ZARINS, 1984; KAPLAN *et al.*, 1987) e coelhos cuja aterosclerose foi induzida cirurgicamente (HOOF; VAN *et al.*, 2017), a diminuição da FC retardou a formação de placas de ateroma.

A VFC é outro parâmetro cardíaco facilmente obtido com uma implicação clínica relacionada ao prognóstico e desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Esse parâmetro reflete as recíprocas e complexas interações do eixo cérebro-coração (MCCRATY; SHAFFER, 2015). Sua análise é um importante recurso que auxilia na identificação de pacientes em risco de morte por eventos cardiovasculares, sendo útil também na avaliação do controle autônomo sobre o coração, uma vez que seu controle é realizado batimento a batimento pelo sistema nervoso autônomo (CYGANKIEWICZ; ZAREBA, 2013; KLEIGER; STEIN; BIGGER, 2005). Recentemente, uma diminuição na VFC tem sido relacionada a diversas doenças psiquiátricas, incluindo a depressão (SGOIFO *et al.*, 2015).

A exposição crônica ao estresse diminui a VFC, consequência que parece não depender do tipo de protocolo de estresse utilizado. Essa diminuição se dá por meio de uma alteração no balanço entre o controle simpático e parassimpático para o coração (LOMBARDI, 1996), seja por um aumento do tônus simpático (GRIPPO; BELTZ; JOHNSON, 2003; GRIPPO; MOFFITT; JOHNSON, 2008; VIEIRA *et al.*, 2017), diminuição do tônus parassimpático (WOOD *et al.*, 2012) ou aumento do tônus simpático concomitante com diminuição do tônus parassimpático (SÉVOZ-COUCHE *et al.*, 2013), dependendo da duração e protocolo de estresse utilizado.

Em nosso trabalho, apenas os animais susceptíveis ao EDS apresentaram uma diminuição da VFC, possivelmente por um aumento da contribuição simpática para o coração. Animais que demonstram um fenótipo submisso durante a fase de derrota do EDS (curta latência para assumir postura de submissão) também apresentam diminuição da VFC e um desvio no balanço simpátovagal, relacionado a um aumento do tônus simpático (WOOD *et al.*, 2012). Esse mesmo fenótipo de submissão apresenta aumento dos comportamentos relacionados à depressão quando expostos ao EDS, diferente de animais não-submissos (longa latência para assumir postura de submissão) (WOOD *et al.*, 2010).

Esse aumento da contribuição simpática para o coração provavelmente foi o responsável pelo aumento da FC no repouso assim como pela diminuição da VFC. Nos animais resilientes, o maior tônus vagal pode ter protegido esses animais contra as alterações decorrentes do aumento do tônus simpático durante o estresse. Nesse sentido, indivíduos autocompassivos possuem maior tônus vagal e VFC avaliados pela análise espectral da FC (SVENDSEN *et al.*, 2016). Estes respondem ao estresse de maneira menos negativa, apresentando menor diminuição da VFC e menor estado emocional negativo após exposição ao estresse induzido em laboratório. O sentimento de autocompaixão parece estar relacionado com a maneira como o indivíduo lida com o estresse, sendo que pessoas mais autocompassivas lidam melhor com o estresse (LUO; QIAO; CHE, 2018). De maneira semelhante, indivíduos com maiores valores de VFC relatam sofrer menos os efeitos do estresse psicossocial (LISCHKE *et al.*, 2018). Assim, a autocompaixão e a VFC parecem estar relacionadas com a resiliência ao estresse. Apesar de não ser possível avaliar autocompaixão em ratos, a maior VFC encontrada nos animais resilientes corrobora com os dados obtidos em humanos.

Baseado nos estudos citados acima e em nossos resultados, a VFC parece ser uma característica natural que determina a maneira como um indivíduo lida com o

estresse. Os maiores valores de tônus vagal e VFC no fenótipo resiliente possivelmente são prévios à exposição ao EDS, podendo ser parte do mecanismo envolvido na resiliência ou uma consequência do estado das vias neurais nesses sujeitos. Mais estudos são necessários para elucidar se esses parâmetros são naturalmente mais elevados nos indivíduos resilientes ao estresse e se maiores valores de VFC podem prever a resiliência ao EDS.

É possível que a alteração na efetividade do barorreflexo seja responsável pelo aumento da contribuição simpática para o coração encontrada nos animais susceptíveis. Outros trabalhos mostraram alterações na atividade do barorreflexo espontâneo em animais expostos ao estresse crônico variável (ALMEIDA *et al.*, 2015) e ao EDS (SÉVOZ-COUCHE *et al.*, 2013). A menor efetividade do barorreflexo diminui o controle inibitório desse reflexo sobre os neurônios bulbares responsáveis pela ativação do sistema nervoso simpático, os quais são tonicamente ativados, levando a um aumento do tônus simpático (BARMAN; YATES, 2017; GRASSI *et al.*, 2006). Em nosso estudo, o aumento da contribuição simpática ocorreu especificamente para o coração, não afetando o controle autônomo dos vasos. Um dado interessante obtido foi o aumento da sensibilidade do barorreflexo nos animais susceptíveis, apesar da diminuição de sua efetividade. O EDS parece induzir alterações funcionais em ambos os arcos eferente e aferente do barorreflexo. Apesar de, aparentemente, as informações periféricas chegarem ao sistema nervoso central de maneira melhorada nesse fenótipo, as respostas autônomas estão prejudicadas, afetando a efetividade do barorreflexo.

Um aumento da resposta pressora e taquicárdica ao estresse já foi descrita em alguns estudos envolvendo a exposição de roedores a um novo estressor em modelos animais de depressão (CUDNOCH-JEDRZEJEWSKA *et al.*, 2014; GRIPPO *et al.*, 2006,2010; GRIPPO; MOFFITT; JOHNSON, 2002; MCNEAL *et al.*, 2014; NALIVAICO, 2011). A exposição repetida ao estresse sonoro também aumenta a resposta cardiovascular em resposta a inalação de ozônio (HAZARI *et al.*, 2021). Nosso estudo mostrou uma maior resposta pressora a um novo estressor, que é exclusiva do fenótipo susceptível, indicando um prejuízo desses animais na resposta cardiovascular ao estresse, o que pode ser prejudicial frente a uma nova situação aversiva.

A maior resposta pressora ao ER também parece estar relacionada ao aumento da contribuição simpática para o coração nos animais susceptíveis. Durante a

exposição a situações aversivas, tanto o sistema nervoso simpático quanto o parassimpático são ativados, levando a um aumento controlado das respostas cardiovasculares necessário para preparar o organismo para situações potencialmente danosas (REIS; DOS *et al.*, 2014). De fato, esse aumento concomitante da modulação parassimpática durante o estresse agudo é importante para manutenção do correto funcionamento do coração nessa situação (PATON *et al.*, 2005). Apesar de nossos dados sugerirem que apenas o tônus simpático para o coração é aumentado, não podemos afirmar que durante a exposição a um novo estresse não ocorra também uma desregulação da modulação parassimpática.

A literatura a respeito das alterações na massa do coração possui algumas discrepâncias. Apesar de diversos estudos mostrarem hipertrofia cardíaca em animais expostos ao estresse crônico (CARNEVALI *et al.*, 2015; COSTA-FERREIRA *et al.*, 2016; VIEIRA *et al.*, 2017), outros estudos não encontraram essa correlação (ALMEIDA *et al.*, 2015; CRUZ *et al.*, 2016) ou ainda diminuição da massa do coração, associada a aumento da deposição de colágeno nesse órgão (COSTOLI *et al.*, 2004). Diferentemente do nosso estudo, apenas os camundongos classificados como resilientes ao EDS apresentam aumento da massa do coração (KRISHNAN *et al.*, 2007). A hipertrofia cardíaca também não ocorre em ratas expostas ao estresse crônico variável, apesar do sexo biológico feminino ser considerado um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e depressão (ISSLER; NESTLER, 2018; VIEIRA *et al.*, 2017).

Se considerarmos o aumento da massa cardíaca como um sinal da hipertrofia cardíaca, o aumento da contribuição simpática para o coração provavelmente também está relacionado à hipertrofia cardíaca nos ratos susceptíveis em nosso estudo. A patogênese da hipertrofia cardíaca envolve diversos fatores, entre eles o aumento da atividade simpática cardíaca (SAMAK *et al.*, 2016; YAMAZAKI; YAZAKI, 2000). As alterações moleculares envolvidas na hipertrofia são consideradas os primeiros passos para o desenvolvimento da insuficiência cardíaca (RITTER; NEYSES, 2003). Por outro lado, a hipertrofia cardíaca também é uma resposta adaptativa importante durante a gravidez e em atletas, por exemplo, ocorrendo de maneira leve e reversível. O aumento da massa do coração em nosso estudo deve ser interpretado com cautela. Apesar de sugerir uma disfunção quando analisado em conjunto com as outras alterações encontradas nos animais susceptíveis, somente uma análise histológica poderia confirmar essa hipótese, especialmente considerando as discrepâncias

frequentemente encontradas na literatura a respeito dos efeitos do estresse na massa do coração em modelos animais. Os achados aqui reportados podem ser resultado do menor ganho de peso nesses animais, ainda que os animais resilientes também tenham apresentado menor ganho de peso.

Ao contrário do que se pode imaginar popularmente ao pensar em um indivíduo resiliente, o EDS não é inócua aos animais resilientes, uma vez que algumas alterações relacionadas ao estresse aparecem em ambos os fenótipos. A diminuição do ganho de peso corporal, a hipertrofia das glândulas adrenais e a involução tímica após a exposição crônica ao estresse, apesar de não serem unanimemente encontradas, são frequentemente descritas na literatura (HAMMELS *et al.*, 2015). Essas alterações estão relacionadas com a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenais durante o estresse e os níveis circulantes de glicocorticoides (HARVEY; SUTCLIFFE, 2010; REUL *et al.*, 2015; TARCIC *et al.*, 1998; ULRICH-LAI *et al.*, 2006). Outros trabalhos têm mostrado alterações semelhantes entre fenótipos com diferentes respostas ao estresse (WOOD *et al.*, 2010). Esses resultados, em conjunto com a avaliação dos níveis de agressão durante os episódios de EDS, indicam que a resposta ao estresse não é inexistente no fenótipo resiliente ao EDS, e que a expressão dos fenótipos não é devido a uma diferença na intensidade da agressão.

Os animais resilientes apresentaram um aumento da corticosterona basal mensurada 3 dias após o último episódio agressivo. Esse resultado é contrário aos estudos envolvendo humanos, onde o aumento do cortisol matinal é geralmente encontrado em pacientes deprimidos (BHAGWAGAR; HAFIZI; COWEN, 2005; HOLSBOER, 2000; VREEBURG *et al.*, 2009). De maneira semelhante, ratos vulneráveis ao EDS selecionados de acordo com a latência para submissão apresentam aumento da corticosterona basal (WOOD *et al.*, 2010). Por outro lado, pacientes recuperados da depressão apresentam aumento dos níveis matinais de cortisol na saliva (BHAGWAGAR; HAFIZI; COWEN, 2003), assim como pacientes em tratamento com inibidores seletivos da recaptação da serotonina apresentam elevação do cortisol noturno (MANTHEY *et al.*, 2011). Camundongos resilientes ao EDS apresentam aumento da corticosterona basal 39 dias após o estresse (KRISHNAN *et al.*, 2007), enquanto animais selecionados por possuírem uma maior concentração de corticosterona plasmática pela manhã depois da exposição ao EDS são menos vulneráveis ao estresse (BOWENS *et al.*, 2012). Não está clara a significância biológica de tais discrepâncias e dos nossos achados, que podem estar

relacionadas a variedade de protocolos empregados na coleta e quantificação da corticosterona e cortisol.

O CPFm é considerado uma região chave no controle das respostas comportamentais e também autônomas relacionadas ao estresse (MCKLVEEN; MYERS; HERMAN, 2015). No repouso, uma maior atividade do CPFm em humanos se correlaciona positivamente com uma maior VFC e modulação vagal para o coração (ZIEGLER *et al.*, 2009). Frente a elevações de FC e PA, ocorre uma menor ativação nessa região, devido a uma diminuição da modulação vagal durante o teste de força de prensão manual (WONG *et al.*, 2007). Essa modulação cardiovascular exercida pelo CPFm, no entanto, é proveniente de um balanço entre as suas principais sub-regiões, o PrL e IL, que parecem ter um papel oposto no controle cardiovascular (MCKLVEEN; MYERS; HERMAN, 2015; MYERS, 2017), assim como na depressão (VIALOU *et al.*, 2014). Assim, o aumento oposto de DeltaFosB nas sub-regiões do CPFm em animais resilientes e susceptíveis pode estar relacionado às diferentes respostas cardiovasculares encontradas.

Em animais anestesiados, a estimulação elétrica do PrL diminui a PA (BURNS; MICHAEL WYSS, 1985) por meio de uma inibição do sistema nervoso simpático (VERBERNE, 1996). No modelo de medo condicionado, lesões restritas ao PrL aumentam a resposta taquicárdica, enquanto lesões do IL bloqueiam essa resposta (FRYSZTAK; NEAFSEY, 1994). Essas sub-regiões controlam de maneira semelhante a resposta cardiovascular ao ER (TAVARES; CORRÊA; RESSTEL, 2009). O IL possui extensas projeções para os neurônios do sistema nervoso simpático, enquanto o PrL se projeta principalmente para regiões relacionadas a um controle inibitório desse sistema (MCKLVEEN; MYERS; HERMAN, 2015; VERTES, 2004; WESTERHAUS; LOEWY, 2001). Em nosso estudo, a DeltaFosB no PrL exerceria um papel inibitório, diminuindo a inibição dos neurônios dessa região sobre o sistema nervoso simpático. No IL, o acúmulo desse fator de transcrição pode ter impedido, também por mecanismos inibitórios, o aumento do tônus simpático para o coração, protegendo o sistema cardiovascular dos animais resilientes.

Outra região envolvida no controle emocional e nas respostas cardiovasculares ao estresse é a Ami, que parece exercer um controle bidirecional do sistema cardiovascular, exercendo um papel integrativo entre regiões corticais, como o CPFm e o Hpc, e o tronco encefálico (MYERS, 2017). Nesse sentido, evidências têm mostrado um papel especial da MeA na atividade do barorreflexo (COSTA-

FERREIRA; GOMES-DE-SOUZA; CRESTANI, 2019; FORTALEZA *et al.*, 2015). Novamente, as alterações no número de células positivas para DeltaFosB encontradas em na Ami em nosso estudo podem estar relacionadas com as alterações cardiovasculares nos animais susceptíveis ao EDS, e na ausência de alterações dos animais resilientes.

5.4.EFEITOS DO TRATAMENTO COM A N-ACETILCISTEÍNA NAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E RELACIONADAS À DELTAFOSB NOS FENÓTIPOS DE ENFRETAMENTO AO ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL

O tratamento com a N-AC foi eficaz em reverter as alterações comportamentais relacionadas à ansiedade e depressão nos animais susceptíveis ao EDS. Entretanto, esse tratamento não alterou o acúmulo de DeltaFosB relacionado aos fenótipos, apesar de ter induzido um aumento do número de células positivas para DeltaFosB no CA1 do HpcD.

Outros autores demonstraram efeitos antidepressivos ou ansiolíticos da N-AC em diversos modelos animais, como citado anteriormente. Em humanos, apesar de ainda pouco robustos e conclusivos, alguns estudos já mostraram efeitos ansiolíticos ou antidepressivos da N-AC em associação com outras drogas (BERK *et al.*, 2014; STRAWN; SALDAÑA, 2012).

Na literatura, existem divergências quanto a quais características da N-AC são responsáveis pelos seus efeitos comportamentais, em especial devido a sua capacidade de atuar em dois sistemas orgânicos conhecidamente alterados pelo estresse, a neurotransmissão glutamatérgica e o estresse oxidativo. Além de atuar junto ao xCT regulando a liberação de glutamato nas sinapses, a N-AC é um potente antioxidante e precursor da glutathione (SAMUNI *et al.*, 2013). Alguns estudos mostram que doses efetivas da N-AC nos comportamentos relacionados à depressão também diminuem o estresse oxidativo ou vias intracelulares relacionadas em modelos animais (AL-SAMHARI *et al.*, 2015; LEHMANN *et al.*, 2019; MOCELIN *et al.*, 2018; SMAGA *et al.*, 2012). Por outro lado, no GD do HpcV, o estresse crônico diminui a expressão de xCT e induz aumento dos comportamentos relacionados à depressão, ambos revertidos pelo tratamento com a N-AC (NASCA *et al.*, 2017). Em um modelo animal da doença de Huntington, a N-AC exerce efeitos antidepressivos por meio do

aumento da liberação de glutamato no HpcV (WRIGHT *et al.*, 2016). Ainda não está claro como esses resultados se relacionam com o encontrado por nós no presente estudo, onde ratos resilientes ao EDS apresentaram uma diminuição dos níveis de xCT no HPCV. Apesar de os mecanismos não estarem completamente elucidados, o tratamento com a N-AC parece ter efeito benéfico em reverter as alterações comportamentais em modelos animais de estresse, seja por meio do seu efeito antioxidante ou alterando a liberação de glutamato.

De maneira contrária à nossa hipótese, nenhuma das alterações relacionadas à DeltaFosB encontradas nos ratos susceptíveis foram revertidas pelo tratamento, nem alterações exclusivas do fenótipo resiliente foram induzidas nos animais susceptíveis tratados com a N-AC. Assim, podemos concluir que o efeito da N-AC independe da DeltaFosB nessas regiões. Pelo menos no CA1 do HpcD, parece existir uma correlação entre a N-AC e a DeltaFosB, uma vez que o tratamento induziu um aumento no número de células positivas para esse fator de transcrição nessa região. Outros experimentos são necessários a fim de elucidar os mecanismos pelos quais a N-AC reverteu as alterações induzidas pelo estresse no fenótipo susceptível em nosso estudo.

6. CONCLUSÃO

Em conclusão, vemos que ratos resilientes e susceptíveis ao EDS apresentam diversas diferenças comportamentais, cardiovasculares e moleculares em resposta ao estresse, sendo as alterações no fenótipo susceptível relacionadas com um mal prognóstico para o desenvolvimento de doenças relacionadas ao estresse. No encéfalo, a expressão de DeltaFosB e xCT possui um padrão específico em cada fenótipo, sendo a lateralização dessa expressão importante especialmente no COF e HpcD. O tratamento com a N-AC foi capaz de reverter as alterações comportamentais induzidas pelo EDS nos ratos susceptíveis, mas não foi capaz de alterar as neuroadaptações na expressão da DeltaFosB relacionadas ao estresse.

CAPÍTULO 2 – A MANIPULAÇÃO QUIMIOGENÉTICA DOS NEURÔNIOS
NPAS1 POSITIVOS NO PÁLIDO VENTRAL ESTÁ RELACIONADA À
SUSCEPTIBILIDADE AO ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL

1. INTRODUÇÃO

Dada a importância do aspecto motivacional na sintomatologia dos transtornos depressivos, as pesquisas mais recentes têm focado nos componentes da neurocircuitaria da recompensa e em estruturas relacionadas no estudo da etiologia e tratamento da depressão, expandindo a visão de que essa circuitaria estaria envolvida apenas na dependência de drogas (RUSSO; NESTLER, 2013). Resultados têm mostrado que perturbações no funcionamento de neurônios e estruturas com um papel no reconhecimento e resposta a estímulos reforçadores estão implicadas no desenvolvimento, progressão e ineficácia do tratamento da depressão (FOX; LOBO, 2019; FRANCIS; LOBO, 2017).

O núcleo ventral é uma importante estrutura da neurocircuitaria da recompensa que possui um papel de destaque no processamento dos estímulos reforçadores e na execução dos comportamentos motivados (ROOT *et al.*, 2015; WULFF *et al.*, 2019). Esta estrutura possui uma característica única, uma vez que abriga tanto “*hotspots*” quanto “*coldspots*” hedônicos, que são grupos neuronais nos quais a neurotransmissão opioidérgica aumenta (*hotspots*) ou diminui (*coldspots*) o valor hedônico de um estímulo reforçador e conseqüentemente a motivação para busca daquele estímulo (SMITH *et al.*, 2009). Por se tratar de uma estrutura intrinsecamente conectada tanto a regiões encefálicas relacionadas à recompensa, como o Acb e a área tegmental ventral (ATV), e regiões relacionadas à aversão, como a hipófise lateral (HbL), é uma estrutura chave na codificação do valor hedônico de informações relevantes (FAGET *et al.*, 2018; KHAN *et al.*, 2020). O núcleo ventral possui um padrão transcricional e de conexões bem diversificado, sendo formado por vários fenótipos neuronais que recebem projeções de diversas áreas encefálicas (ROOT *et al.*, 2015). Dentre essas áreas, o Acb é a região com o padrão mais denso de projeções para o núcleo ventral, formando sinapses que utilizam GABA e peptídeos neuroativos na sua comunicação (KUPCHIK *et al.*, 2015; ROOT *et al.*, 2015). Os neurônios dopaminérgicos da ATV também se projetam para o núcleo ventral, os quais muitas vezes co-expressam glutamato, excitando os neurônios com os quais se comunicam (KLITENICK *et al.*, 1992; STOUT *et al.*, 2016; TAYLOR *et al.*, 2014). Por sua vez, o núcleo ventral se projeta de volta para o Acb, principalmente por meio de sinapses gabaérgicas (CHURCHILL; KALIVAS, 1994; KUO; CHANG, 1992), para a ATV por

meio de sinapses glutamatérgicas e gabaérgicas, e para a HbL por meio de neurônios glutamatérgicos (KNOWLAND *et al.*, 2017; TOOLEY *et al.*, 2018). Também foram descritas projeções colinérgicas do pálido ventral para o CPFm (GROENEWEGEN; BERENDSE; HABER, 1993).

Estudos têm mostrado que alterações no padrão de atividade do pálido ventral estão relacionadas com alguns sintomas da depressão, como anedonia e aversão social (KNOWLAND; LIM, 2018). Em indivíduos diagnosticados com depressão, a ligação da serotonina aos seus receptores é diminuída no pálido ventral (MURROUGH *et al.*, 2011), assim como lesões ou a atrofia do globo pálido (GP) ventral, em humanos, têm sido correlacionadas com sintomas da depressão (MILLER *et al.*, 2006; MOUSSAWI; KALIVAS; LEE, 2016; ONYEWUENYI *et al.*, 2014; STUKE *et al.*, 2016). Em camundongos, a inibição dos neurônios do pálido ventral que expressam a parvalbumina e se projetam para a HbL ou para a ATV aumenta a resiliência ao EDS (KNOWLAND *et al.*, 2017).

A proteína Npas1 (do inglês *Neuronal PAS domain protein 1*) é um repressor da transcrição com um importante papel na diferenciação de neurônios corticais (STANCO *et al.*, 2014). Mutações nesse gene durante o desenvolvimento embrionário alteram o desenvolvimento cerebral, embora não altere significativamente o comportamento de camundongos adultos (ERBEL-SIELER *et al.*, 2004). É altamente expresso no cérebro de embriões e atinge níveis estáveis depois da maturação do sistema nervoso (TEH *et al.*, 2006; ZHOU *et al.*, 1997). No GP, os neurônios Npas1 positivos (Npas1+) formam classes de neurônios distintas dos mais abundantes e conhecidos neurônios que expressam parvalbumina (ABECASSIS *et al.*, 2020; ABRAHAO; LOVINGER, 2018; HERNANDEZ *et al.*, 2015). Esses neurônios se projetam de maneira intensa para o estriado (GLAJCH *et al.*, 2016) e recebem projeções de diversas regiões encefálicas envolvidas na resposta ao estresse (HUNT *et al.*, 2018). Apesar de os neurônios Npas1+ do pálido ventral não estarem caracterizados assim como os neurônios do GP, as semelhanças embriológicas dessas duas regiões podem ser úteis no entendimento do papel dessas células no pálido ventral. Nesse sentido, os neurônios arquipalidais do pálido ventral, cuja morfologia se assemelha aos neurônios Npas1+ do GP, se projetam intensamente para o Acb por meio de sinapses inibitórias por meio das quais controlam o comportamento (VACHEZ *et al.*, 2021).

Assim, considerando o papel chave do pálido ventral na coordenação dos comportamentos motivados, sua posição anatômica em relação a áreas importantes na resposta ao estresse, e a grande densidade de neurônios Npas1+ nessa região, pode ser que a atividade dos neurônios Npas1+ esteja relacionada com o desenvolvimento das alterações relacionadas à exposição ao estresse.

2. OBJETIVOS

O objetivo desse estudo foi avaliar o papel dos neurônios Npas1+ na susceptibilidade ao EDS em camundongos. Visando esse objetivo, os seguintes objetivos específicos foram traçados:

- Avaliar o efeito da manipulação quimiogenética da atividade dos neurônios Npas1+ do pálido ventral durante o EDS subefetivo nas alterações comportamentais relacionadas à depressão;
- Avaliar o efeito da ativação quimiogenética da atividade dos neurônios Npas1+ do pálido ventral durante o EDS subefetivo na expressão da proteína DeltaFosB no Acb;
- Avaliar o efeito da inibição quimiogenética da atividade dos neurônios Npas1+ do pálido ventral durante o EDS crônico;
- Avaliar o efeito da ativação quimiogenética da atividade dos neurônios Npas1+ do pálido ventral em testes comportamentais relacionados à ansiedade e depressão;
- Avaliar o efeito da ativação optogenética dos neurônios Npas1+ do pálido ventral que se projetam para o Acb no teste de preferência por lugar em tempo real;
- Identificar as principais regiões-alvo das projeções dos neurônios Npas1+ do pálido ventral.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos descritos nesse capítulo da tese foram realizados durante o estágio de pesquisa no exterior, financiado pela FAPESP (processo FAPESP número 2018/05496-8), realizado na *University of Maryland School of Medicine* - Baltimore-MD, EUA, sob supervisão da professora Mary Lay Lobo, *PhD*.

3.1. SUJEITOS EXPERIMENTAIS

Cento e cinco camundongos machos e treze fêmeas *Npas1-Cre-2A-tdTomato* heterozigotos (*Npas1-Cre*, 8 semanas de idade no momento da administração dos vetores virais) foram obtidos pelo cruzamento de camundongos *Npas1-Cre* (gentilmente cedidos pelo professor C. Savio Chan, *PhD*, do *Northwestern Transgenic and Targeted Mutagenesis Laboratory*) com camundongos da linhagem C57BL/6. A linhagem *Npas1-Cre* foi gerada de acordo com o descrito anteriormente (HERNANDEZ *et al.*, 2015). Adicionalmente, 30 machos C57BL/6 foram utilizados em um dos experimentos. Como agressores nos protocolos de EDS, 20 machos CD1 (reprodutores aposentados, > 4 meses de idade) foram utilizados.

Os animais foram mantidos em um ciclo de luz de 12h (luzes acessas as 7:00 horas) com água e ração à vontade. Os experimentos foram realizados durante a fase claro do ciclo de luz. Todos os procedimentos envolvendo animais foram previamente aprovados e conduzidos de acordo com os princípios determinados pelo comitê de ética em experimentação animal da *University of Maryland School of Medicine* (protocolo #0517004) (ANEXO D).

3.2. CLOZAPINA-N-ÓXIDO

A clozapina-N-óxido (CNO), um análogo inativo da clozapina (ROTH, 2016), foi utilizada para ativação dos receptores projetados ativados exclusivamente por drogas projetadas (no inglês, *designer receptors exclusively activated by designer drugs* - DREADDs). A CNO (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI-EUA) foi diluída em salina (0,1 mg/mL) e injetada na dose de 1 mg/kg (0,1 mL/10 g i.p.).

3.3. VETORES VIRAIS E FIBRA ÓPTICA

O vetor viral adenoassociado contendo o DREADD excitatório fusionado com a proteína fluorescente mCherry [hM3D(Gq)-mCherry] invertido (no inglês, *double inverted open reading frame* – DIO) sob controle do promotor da sinapsina humana (AAV5-hSyn-DIO-hM3Dq-mCherry) ou o DREADD inibitório fusionado com a proteína fluorescente mCherry [hM4D(Gi)-mCherry] invertido sob controle do promotor da sinapsina humana (AAV5-DIO-hM4Di-mCherry), gentilmente cedidos por Bryan Roth, PhD, para o repositório da Addgene (#44361 e #44362, Watertown, MA-EUA) foram usados para a manipulação quimiogénica dos neurónios Npas1+.

O vetor viral adenoassociado contendo o canal iónico ativado por luz rodopsina 2 (no inglês, *channelrhodopsin-2* – ChR2) fusionado com a proteína fluorescente eYFP invertido sob controle do promotor do fator de alongamento da tradução eucariótica 1 alfa (AAV5-EF1a-DIO-hChR2(H134R)-eYFP), gentilmente cedidos por Karl Deisseroth para o *UNC Vector Core* (UNC Vector Core, Chapel Hill, NC-EUA) foi utilizado para a ativação optogénica dos neurónios Npas1+. Como controle da expressão génica, o vetor viral adenoassociado contendo a proteína fluorescente eYFP invertido sob controle do promotor do fator de alongamento da tradução eucariótica 1 alfa (AAV5-EF1a-DIO- eYFP) obtido do repositório Addgene foi utilizado.

Para estimulação óptica, fibras ópticas implantáveis de 4 mm foram construídas e implantadas cirurgicamente no Acb (0,22 abertura numérica, cladeado de 105 µm).

3.4. CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Os animais foram anestesiados com isoflurano (3% para indução e 1,5% para manutenção) e fixados no aparelho estereotáxico para injeção dos vetores virais no pálido ventral de acordo com as seguintes coordenadas: anteroposterior, +0,9 mm do Bregma; mediolateral, ± 2,2 mm do Bregma; dorsoventral, -5,3 mm da superfície do crânio. O vetor viral (300 nL) foi injetado com o auxílio de seringas próprias para microinjeção (Neuro Syringes, Hamilton Co., Reno, NV-EUA) à velocidade de 0,1 µL/minuto, após a qual a agulha foi mantida no local da injeção por 12 minutos. Após a injeção, a pele dos animais foi fechada com cola cirúrgica e os animais monitorados quanto a sua recuperação por 2 semanas antes de os experimentos serem iniciados.

Nos experimentos envolvendo a optogenética, logo após a injeção do vetor viral e ainda sob anestesia, fibras ópticas de 4 mm foram implantadas bilateralmente no Acb de acordo com as seguintes coordenadas: anteroposterior, +1,6 do Bregma; mediolateral, \pm 1,5 do Bregma. As fibras ópticas foram fixadas com resina acrílico dentário autopolimerizável e os animais monitorados quanto a sua recuperação por 3 semanas antes de os experimentos serem iniciados.

3.5. ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL

O modelo intruso-residente foi utilizado como protocolo de EDS de acordo com o publicado anteriormente (GOLDEN *et al.*, 2011). Em resumo, os animais experimentais (intrusos) foram expostos a um camundongo da linhagem CD1 agressivo (residente) a fim de ser derrotado. Após a derrota, os intrusos foram colocados na mesma caixa-moradia do agressor, separados por uma parede de acrílico perfurada, mantendo o contato sensorial. Os residentes foram escolhidos previamente com base em sua agressividade.

No protocolo de EDS subfetivo (EDSs) (FOX *et al.*, 2020), os intrusos foram expostos a 3 encontros agressivos com 3 diferentes residentes por 3 minutos em um único dia, cada sessão separada por 15 minutos de contato sensorial. Esse protocolo foi utilizado para avaliar o efeito da manipulação neuronal na susceptibilidade ao EDS, uma vez que, por si só, esse protocolo não induz alterações comportamentais relacionadas à depressão.

No protocolo de EDS crônico (EDSc) (NAM *et al.*, 2019), os intrusos foram expostos a um encontro agressivo com o residente por 10 minutos por dia, após o qual foram mantidos na caixa-moradia do residente separadas pela parede acrílica perfurada por 24 horas, até o próximo encontro agressivo. Esse procedimento foi repetido por 10 dias com um novo residente sendo utilizado a cada dia. Esse protocolo foi utilizado para avaliar o efeito da manipulação neuronal na resiliência ao EDS, uma vez que animais expostos a esse protocolo apresentam alterações comportamentais relacionadas à depressão.

3.6. TESTES COMPORTAMENTAIS

3.6.1. Teste de interação social

O TIS foi realizado 24 horas após o último episódio de EDS ou último teste comportamental realizado (dependendo do experimento) de acordo com o descrito anteriormente (GOLDEN *et al.*, 2011). Sob as condições experimentais desejadas, os animais experimentais foram colocados em um campo aberto (42 x 42 cm, paredes e chão de acrílico brancos) contendo uma caixa perfurada de acrílico (denominada caixa de interação) centralizada na parede de uma das extremidades. O tempo gasto na zona de interação (área virtual de 9 cm no entorno da caixa de interação) e zonas de interação (cantos de 9 cm na parede oposta da zona de interação) foram mensurados em 2 sessões de 150 segundos com o auxílio do software de análise comportamental TopScan (CleverSys, Reston, VA-EUA), durante as quais a caixa de interação estava vazia ou contendo um camundongo da linhagem CD1 desconhecido pelo animal experimental (alvo social). A razão de interação foi calculada pela razão entre o tempo gasto na zona de interação com e sem o alvo social.

3.6.2. Teste do nado forçado

O TNF foi realizado de acordo com o descrito anteriormente (PORSOLT; BERTIN; JALFRE, 1977) com modificações. Sob as condições desejadas, os animais experimentais foram colocados em um cilindro de vidro (20 cm de diâmetro) cheio de água (15 cm de altura) à $25 \pm 1^\circ\text{C}$. O tempo gasto imóvel e a latência para o primeiro episódio de imobilidade foram gravados durante 6 minutos e quantificados com o auxílio do software X-PloRat.

3.6.3. Teste do esguicho

O teste do esguicho (no inglês, *splash test*) foi utilizado para avaliação da motivação para o cuidado individual, como um indicativo de comportamentos relacionados à depressão (FOX *et al.*, 2020). Sob as condições desejadas, os animais experimentais foram colocados em um cilindro de vidro (20 cm de diâmetro) e receberam um esguicho de uma solução viscosa de sacarose (10% v/v) no dorso. O tempo gasto em autolimpeza e o número de sacudidas foi gravado e analisado por 5 minutos com o auxílio do software X-PloRat.

3.6.4. Labirinto em cruz elevado

O LCE consiste de 4 braços de dimensões iguais (30 x 5 cm) conectados por uma plataforma central (5 cm) elevados a 40 cm do solo, dois dos quais são fechados por paredes de 15 cm. Sob as condições experimentais desejadas, os animais foram colocados individualmente no centro do labirinto voltados para um dos braços abertos e tiveram seu comportamento filmado por 5 minutos para análise por meio do programa de análise comportamental X-PlorRat. Foram mensurados parâmetros espaço-temporais e etológicos para avaliação da ansiedade no LCE. Os parâmetros espaço-temporais convencionais avaliados foram o número de entradas nos braços fechados e a porcentagem de entradas e tempo gasto nos braços abertos. Os parâmetros etológicos foram a frequência de mergulhos (movimento exploratório com a cabeça e ombros para fora das laterais do labirinto) e a frequência de esticadas (postura exploratória esticando o corpo para frente e retornando à posição original sem nenhuma locomoção para frente).

3.6.5. Campo aberto

Para a avaliação da atividade locomotora, os animais foram colocados na mesma área utilizada no TIS (sem a caixa de interação), virtualmente dividida em uma zona central (quadrado de 15 cm de lado no centro do aparato) e zona periférica, por 5 minutos, para avaliação da distância percorrida e tempo gasto na periferia e centro do aparato. As análises foram realizadas utilizando o software TopScan.

3.6.6. Teste de consumo de sacarose

O protocolo do TCS teve duração de 3 dias, de acordo com o descrito a seguir: no primeiro dia, os animais foram expostos a dois bebedouros contendo água filtrada por 24 horas. No dia seguinte, as garrafas foram substituídas por uma contendo solução de sacarose a 1% e outra contendo água filtrada por 48 horas. A posição dos bebedouros foi trocada após 24 horas para evitar a preferência pela posição do bebedouro. O consumo de sacarose e a preferência foram determinados pesando os bebedouros logo antes de oferecê-los aos animais e ao final do experimento, e os

resultados expressos como a média de consumo dos dois dias. A solução perdida por vazamento ou evaporação foi determinada por bebedouros colocados em gaiolas vazias ao mesmo tempo em que o experimento foi realizado, e essa quantidade subtraída do total consumido pelos animais.

3.6.7. Preferência por lugar em tempo real

O teste de preferência por lugar em tempo real foi realizado de acordo com o seguinte protocolo: no primeiro dia, os animais foram habituados durante 15 minutos a arena (caixa retangular de acrílico com paredes e chão branco (60 x 30 cm – igualmente divididos por uma porta em guilhotina pequena) para avaliação da preferência inicial por um dos lados do aparato. No dia seguinte, os animais foram conectados ao gerador de laser através das fibras ópticas e colocados na arena por 20 minutos para avaliação dos efeitos da ativação das projeções dos neurônios Npas1+ do pálido ventral para o Acb. Os animais foram aleatoriamente distribuídos para receber a estimulação pela luz azul (10 mW, 40 hz, duração de pulso de 10 ms) em uma das câmaras do aparato. Vinte e quatro horas depois da estimulação, os animais foram testados novamente na arena sem a estimulação óptica para avaliação de um possível condicionamento por lugar.

3.7. PERFUSÃO, DISSECAÇÃO DAS ÁREAS ENCEFÁLICAS E IMUNOFLUORESCÊNCIA

Sob as condições experimentais desejadas, os animais foram profundamente anestesiados com isoflurano e perfundidos transcárdiacamente com PBS (0,1 M) e PFA 4%. Os encéfalos foram removidos da caixa craniana, mantidos por mais 24 horas em PFA e os cortes (40 µm de espessura) dissecados em vibrátomo (Leica VT1000 S, Leica Biosystems Inc., Buffalo Grove, IL-EUA). Os cortes foram então lavados em PBS (3 x 10 minutos) e bloqueados em solução bloqueadora (3% de soro de cabra + 0,3% Triton X-100 em PBS) por 30 minutos. Após o bloqueio, os cortes foram incubados em solução bloqueadora contendo os anticorpos primários anti-FosB/DeltaFosB (produzido em coelho, 1:200 cat. No. 102: sc-48, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA-EUA), anti-mCherry (produzido em galinhas, 1:1500, NBP2-25158, Novus Biologicals, LLC, Centennial, CO-EUA), anti-mCherry

(produzido em coelhos, cat. No. 632496, Takara Bio USA, Inc., Mountain View, CA-EUA) ou anti-GFP (1:1500, #GFP-1020, Aves Labs Inc., Tigard, OR-EUA), dependendo do experimento, a 4°C durante a noite.

Após a incubação com os anticorpos primários, os cortes foram novamente lavados, e então incubados em PBS contendo os anticorpos secundários anti-IgG de coelho Alexa 488 (produzido em cabras, 1:1000, cat. No. 711-545-152, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA-EUA), anti-IgG de galinha Cy3 (produzido em cabras, 1:1000, cat. No. 703-165-155, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.), anti-IgG de galinha Alexa 488 (produzido em cabras, 1:1000, cat. No. 703-545-155, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) ou anti-IgG de coelho Cy3 (produzido em cabras, 1:1000, cat. No. 711-165-152, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) em temperatura ambiente por 2 horas. Os cortes foram então lavados em PBS e montados em lâmina silanizada utilizando o meio de montagem Vectashield com DAPI (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA-EUA). As imagens das regiões de interesse foram capturadas no aumento de 20x em um microscópio confocal (Leica SP8, Leica Microsystems).

3.7.1. Quantificação das células positivas para DeltaFosB

Imagens bilaterais do AcbC e AcbCh marcadas para DeltaFosB foram quantificadas por meio do software ImageJ 1.48 (NIH). O background foi subtraído pelo método de Yen e as partículas com 15-70 μM de área e circularidade entre 0,5-1 foram contadas.

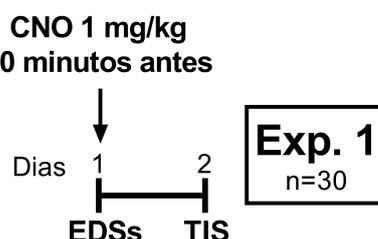
3.8. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.8.1. Experimento 1: avaliação da dose de clozapina-N-óxido no estresse de derrota social subefetivo

Considerando os conhecidos problemas da utilização de doses altas de CNO, devido ao seu metabolismo à clozapina (GOMEZ *et al.*, 2017), este experimento preliminar foi realizado a fim de avaliar a ineficácia da dose escolhida de CNO nesse modelo sem a expressão dos DREADDs.

Camundongos machos da linhagem C57Bl/6 receberam 1 mg/kg de CNO i.p. e 30 minutos depois foram submetidos ao protocolo de EDSs. Os grupos controle receberam veículo (salina, 0,9%, 0,1 mL/kg). Vinte e quatro horas após o EDSs, os animais foram submetidos ao TIS. O procedimento experimental está detalhado na Figura 64.

Figura 64 - Protocolo experimental e número de animais utilizados no experimento 1. EDSs, estresse de derrota social subefetivo; TIS, teste de interação social; CNO, clozapina-N-óxido; Exp., experimento.

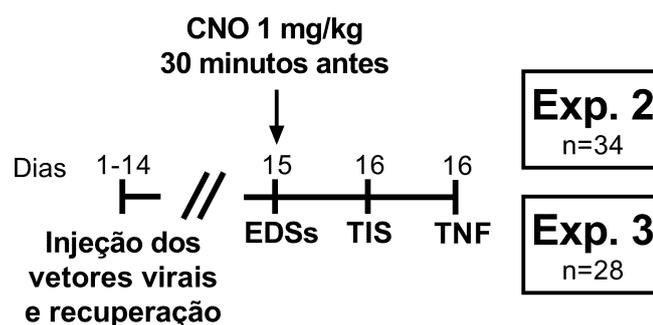


Fonte: próprio autor, 2021.

3.8.2. Experimento 2: ativação quimiogénica dos neurónios Npas1+ do pálido ventral durante o estresse de derrota social subefetivo

Camundongos machos Npas1-Cre receberam os DREADDs excitatórios no pálido ventral duas semanas antes de serem submetidos ao EDSs. Os grupos controle receberam a proteína fluorescente eYFP. Trinta minutos antes do EDSs, todos os animais receberam CNO na dose de 1 mg/kg. Ao término do EDSs, os animais foram mantidos isolados pelo restante do experimento. No dia seguinte, os animais foram testados no TIS e 24 horas depois, no TNF. Vinte e quatro horas após o TNF, os animais foram perfundidos, e os encéfalos retirados para confirmação da expressão viral no pálido ventral e quantificação da proteína DeltaFosB no Acb. O procedimento experimental está detalhado na Figura 65.

Figura 65 - Protocolo experimental e número de animais utilizados nos experimentos 2 e 3. EDSs, estresse de derrota social subefetivo; TIS, teste de interação social; TNF, teste do nado forçado; CNO, clozapina-N-óxido; Exp., experimento.



Fonte: próprio autor, 2021.

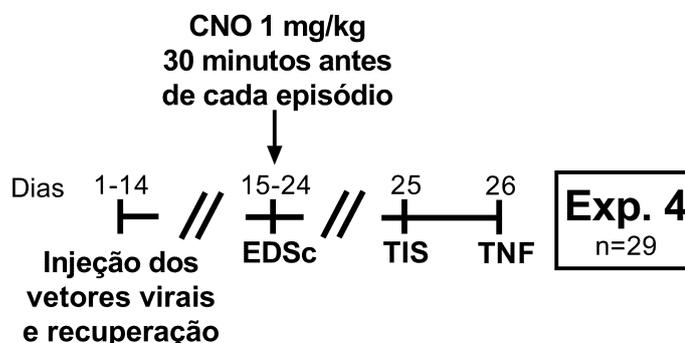
3.8.3. Experimento 3: inibição quimiogenética dos neurônios Npas1+ do pálido ventral durante o estresse de derrota social subefetivo

Camundongos machos Npas1-Cre receberam os DREADDs inibitórios no pálido ventral duas semanas antes de serem submetidos ao EDSs. Os grupos controles receberam a proteína fluorescente eYFP. Trinta minutos antes do EDSs, todos os animais receberam CNO na dose de 1 mg/kg. Ao término do EDSs, os animais foram mantidos isolados pelo restante do experimento. No dia seguinte, os animais foram testados no TIS e 24 horas depois, no TNF. Vinte e quatro horas após o TNF, os animais foram perfundidos, e os encéfalos retirados para confirmação da expressão viral no pálido ventral. O procedimento experimental está detalhado na Figura 65.

3.8.4. Experimento 4: inibição quimiogenética dos neurônios Npas1+ do pálido ventral durante o estresse de derrota social crônico

Camundongos machos Npas1-Cre receberam os DREADDs inibitórios no pálido ventral duas semanas antes de serem submetidos ao EDSc. Os grupos controles receberam a proteína fluorescente eYFP. Trinta minutos antes de cada episódio de derrota no EDSc, todos os animais receberam CNO na dose de 1 mg/kg. Ao término do EDSc, os animais foram mantidos isolados pelo restante do experimento. No dia seguinte, os animais foram testados no TIS e 24 horas depois, no TNF. Vinte e quatro horas após o TNF, os animais foram perfundidos, e os encéfalos retirados para confirmação da expressão viral no pálido ventral. O procedimento experimental está detalhado na Figura 66.

Figura 66 - Protocolo experimental e número de animais utilizados referente ao experimento 4. EDSc, estresse de derrota social crônico; TIS, teste de interação social; TNF, teste do nado forçado; CNO, clozapina-N-óxido; Exp., experimento.

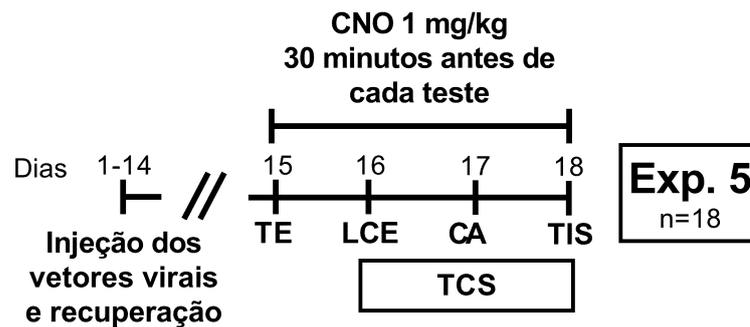


Fonte: próprio autor, 2021.

3.8.5. Experimento 5: ativação quimiogenética dos neurônios Npas1+ do pálido ventral durante testes comportamentais relacionados à ansiedade e depressão

Camundongos machos Npas1-Cre receberam os DREADDs inibitórios no pálido ventral duas semanas antes do início dos testes comportamentais. Os grupos controles receberam a proteína fluorescente eYFP. Trinta minutos antes de cada teste (exceto o TCS), todos os animais receberam CNO na dose de 1 mg/kg. Os animais foram submetidos a uma bateria de testes comportamentais por 5 dias, de acordo com a seguinte ordem: teste de esguicho, LCE, CA e TIS. O TCS foi realizado durante os intervalos nos dias após o LCE. Vinte e quatro horas após o fim do TCS, os animais foram perfundidos e os cérebros processados para confirmação da expressão viral no pálido ventral. O procedimento experimental está detalhado na Figura 67.

Figura 67 - Protocolo experimental e número de animais utilizados no experimento 5. TE, teste do esguicho; LCE, labirinto em cruz elevado; CA, campo aberto; TIS, teste de interação social; TCS, teste de consumo de sacarose; CNO, clozapina-N-óxido; Exp., experimento.



Fonte: próprio autor, 2021.

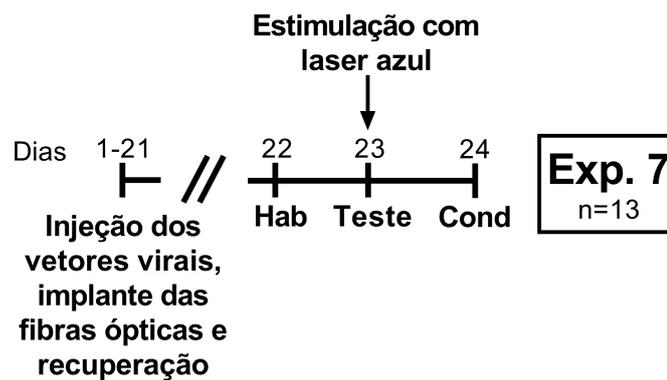
3.8.6. Experimento 6: mapeamento das projeções dos neurônios Npas1+ do pálido ventral

Três encéfalos de camundongos que receberam o vetor viral contendo o plasmídeo para a proteína fluorescente controle eYFP foram aleatoriamente selecionados e processados para imunofluorescência. Um corte a cada 160 μ M foi selecionado e marcados para visualização das proteínas mCherry (marcador dos neurônios Npas1+) e eYFP (marcador das projeções).

3.8.7. Experimento 7: ativação optogenética das projeções dos neurônios Npas1+ do pálido ventral para o núcleo acumbens durante o teste da preferência por lugar em tempo real

Camundongos fêmeas Npas1-Cre receberam a opsina excitatória ChR2 no pálido ventral e tiveram as fibras ópticas implantadas no Acb. Os animais controle receberam o plasmídeo contendo a proteína fluorescente eYFP. Três semanas após a cirurgia, os animais foram testados no teste de preferência por lugar em tempo real para avaliação do efeito reforçador da ativação das projeções Npas1+ do pálido ventral para o Acb. O procedimento experimental está detalhado na Figura 68.

Figura 68 - Protocolo experimental e número de animais utilizados no experimento 7. Hab, etapa de habituação; Cond, teste do condicionamento. Exp., experimento.



Fonte: próprio autor, 2021.

3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi feita utilizando-se o software Statistica 7.1 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK-EUA) e os gráficos no software GraphPad Prism 7 (GraphPad software Inc., La Jolla, CA-EUA). Todos os valores foram expressos como média \pm EPM.

Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, ANOVA de medidas repetidas ou teste *t-student* dependendo do experimento. Nos casos em que a ANOVA mostrou diferenças significativas ($p \leq 0,05$), o teste *post hoc* de Newman-Keuls foi realizado.

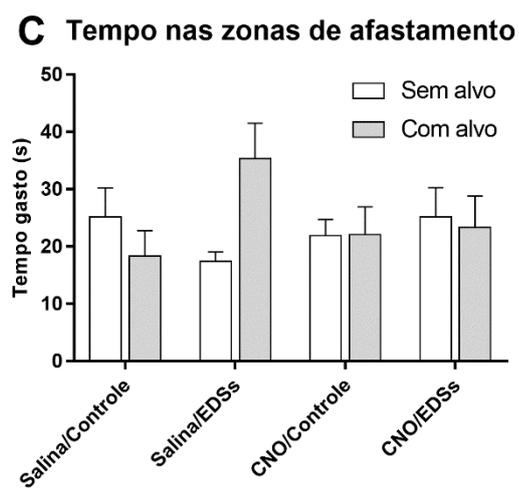
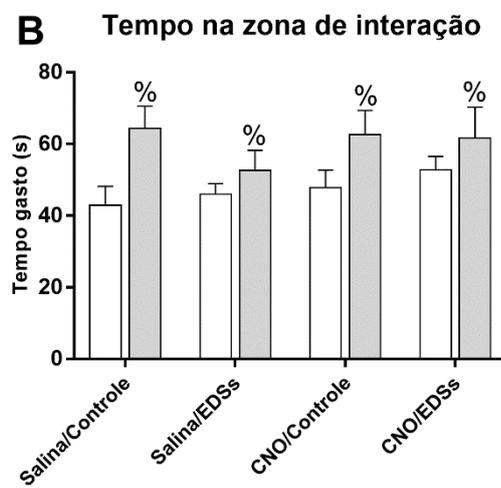
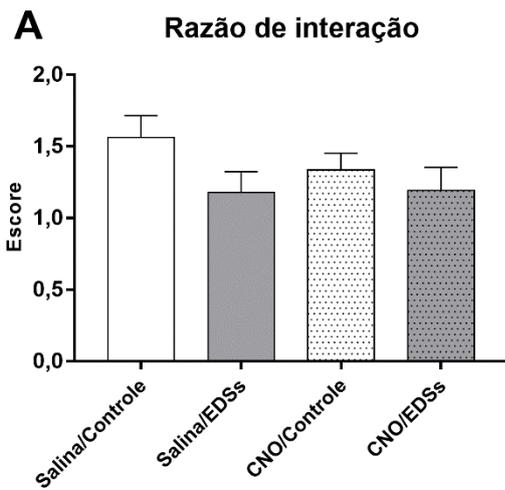
4. RESULTADOS

4.1. EXPERIMENTO 1: AVALIAÇÃO DA DOSE DE CLOZAPINA-N-ÓXIDO NO ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL SUBEFETIVO EM ANIMAIS SEM ADMINISTRAÇÃO DE VETORES VIRAIS

A dose de CNO utilizada no estudo não alterou os comportamentos no TIS em animais da linhagem C57BL/6 expostos ao EDSs, que não receberam injeções de vetores virais (Figura 69).

A ANOVA de duas vias não mostrou nenhum efeito significativo em relação a RI no experimento 1 (Figura 69A). De maneira semelhante, a ANOVA de medidas repetidas mostrou efeito significativo apenas do fator sessão ($F_{1,26} = 14,00$; $p < 0,001$) em relação ao tempo gasto na zona de interação (Figura 69B), indicando um aumento do tempo gasto nessa zona com o alvo presente em relação à sessão sem alvo. Não foram encontradas diferenças significativas em relação ao tempo gasto nas zonas de afastamento (Figura 69C).

Figura 69 - Efeito do tratamento com clozapina-N-óxido na dose de 1 mg/kg nas respostas comportamentais ao estresse de derrota social subefetivo. Trinta minutos antes do protocolo de estresse de derrota social subefetivo, os animais receberam uma administração de clozapina-N-óxido na dose de 1 mg/kg. O teste de interação social foi realizado 24 horas após o último episódio de derrota social. A, razão de interação; B, tempo de permanência (em segundos) na zona de interação; C, tempo de permanência (em segundos) nas zonas de afastamento. As barras representam a média + EPM ($n = 7-8$ animais/grupo). EDSs, estresse de derrota social subefetivo; CNO, clozapina-N-óxido. %, $p < 0,05$ em relação ao tempo gasto durante a sessão sem alvo do respectivo grupo.



Fonte: próprio autor, 2021.

4.2. EXPERIMENTO 2: EFEITOS DA ATIVAÇÃO DOS NEURÔNIOS NPAS1+ DO PÁLIDO VENTRAL DURANTE O ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL SUBEFETIVO

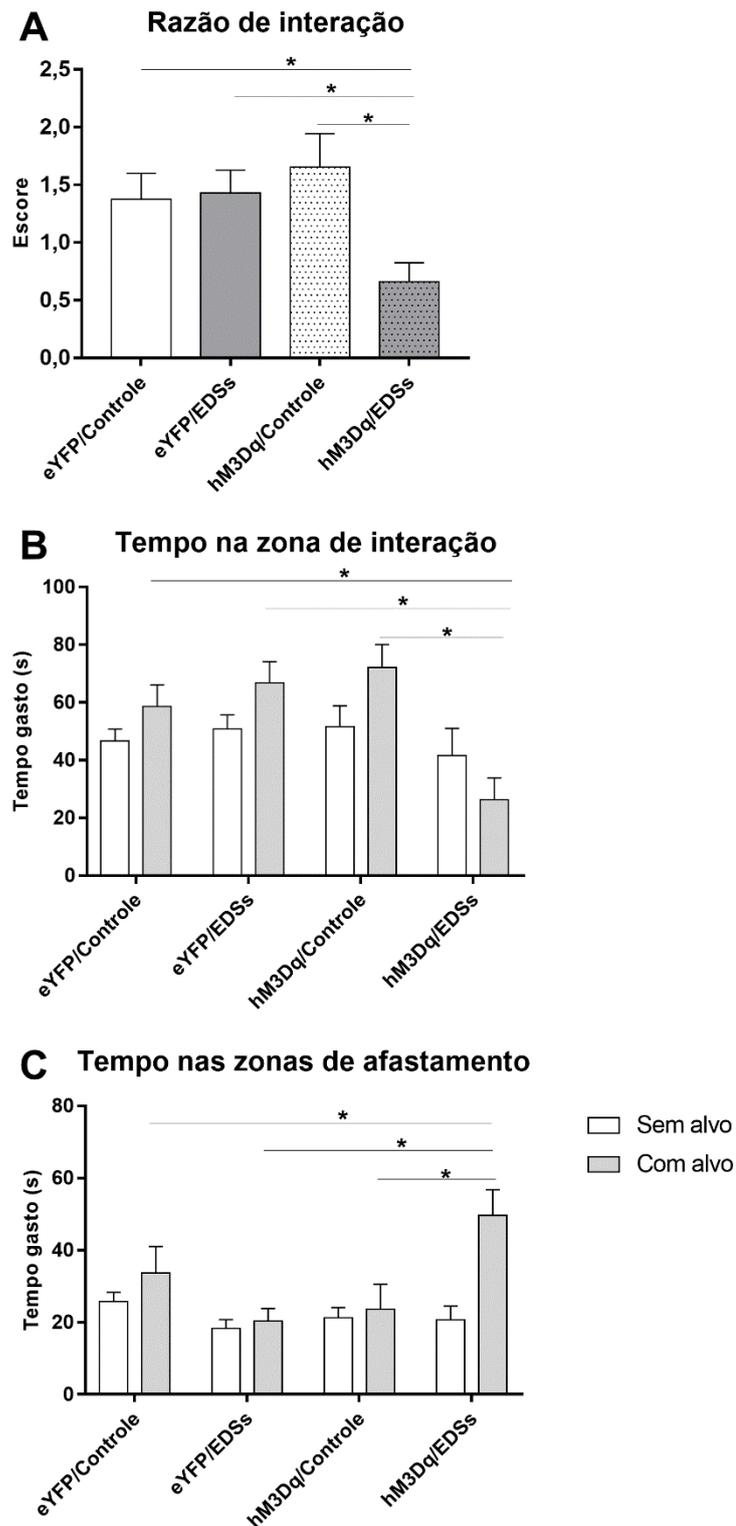
A ativação quimiogênica dos neurônios Npas1+ do pálido ventral aumentou a susceptibilidade dos animais ao EDS.

A ANOVA de duas vias da RI (Figura 70A) revelou um efeito significativo do fator estresse ($F_{1,30} = 4,31$; $p < 0,05$) e da interação entre os fatores vetor viral e estresse ($F_{1,30} = 4,31$; $p < 0,05$). O teste *post hoc* de Newman Keuls mostrou uma diminuição da RI no grupo hM3Dq/EDSs comparado ao grupo eYFP/Controle (eYFP/Controle = $1,4 \pm 0,2$ x hM3Dq/EDSs = $0,7 \pm 0,2$; $p < 0,05$), eYFP/EDSs (eYFP/EDSs = $1,4 \pm 0,2$ x hM3Dq/EDSs = $0,7 \pm 0,2$; $p = 0,05$) e ao grupo hM3Dq-Controle (hM3Dq/Controle = $1,7 \pm 0,3$ x hM3Dq/EDSs = $0,7 \pm 0,2$; $p < 0,05$).

A ANOVA de medidas repetidas do tempo gasto na zona de interação (Figura 70B) mostrou um efeito significativo do fator estresse ($F_{1,30} = 4,42$; $p < 0,05$), da interação entre estresse e vetor viral ($F_{1,30} = 10,68$; $p < 0,01$) e estresse, vetor viral e sessão ($F_{1,30} = 4,25$; $p < 0,05$). A análise *post hoc* mostrou uma diminuição do tempo gasto na zona de interação na sessão com alvo no grupo hM3Dq/EDSs em relação ao grupo eYFP/Controle (eYFP/Controle = $58,7 \pm 7,4$ x hM3Dq/EDSs = $26,3 \pm 7,5$; $p < 0,05$), eYFP/EDSs (eYFP/EDSs = $66,7 \pm 7,3$ x hM3Dq/EDSs = $26,3 \pm 7,5$; $p < 0,01$) e hM3Dq/Controle (hM3Dq/Controle = $72,0 \pm 8,0$ x hM3Dq/EDSs = $26,3 \pm 7,5$; $p < 0,01$).

Houve um efeito significativo da interação entre os fatores estresse e vetor viral ($F_{1,30} = 9,66$; $p < 0,01$), do fator sessão ($F_{1,30} = 10,20$; $p < 0,01$) e da interação entre estresse, vetor viral e sessão ($F_{1,30} = 6,33$; $p < 0,05$) em relação ao tempo gasto nas zonas de afastamento (Figura 70C). Os animais do grupo hM3Dq/EDSs apresentaram um aumento do tempo gasto nas zonas de afastamento quando comparados ao grupo eYFP/Controle (eYFP/Controle = $33,7 \pm 7,4$ x hM3Dq/EDSs = $49,7 \pm 7,1$; $p < 0,05$), eYFP/EDSs (eYFP/EDSs = $20,3 \pm 3,5$ x hM3Dq/EDSs = $49,7 \pm 7,1$; $p < 0,01$) e hM3Dq/Controle (hM3Dq/Controle = $23,7 \pm 6,9$ x hM3Dq/EDSs = $49,7 \pm 7,1$; $p < 0,01$), além de quando comparados a si próprios quando o alvo estava ausente (hM3Dq/EDSs sem alvo = $20,8 \pm 3,7$ x hM3Dq/EDSs com alvo = $49,7 \pm 7,1$; $p < 0,01$).

Figura 70 - Efeito da ativação dos neurônios Npas1+ do pálido ventral durante estresse de derrota social subefetivo no teste de interação social. Trinta minutos antes do protocolo de estresse de derrota social subefetivo, os animais receberam uma administração de clozapina-N-óxido na dose de 1 mg/kg. O teste de interação social foi realizado 24 horas após o último episódio de derrota social. A, razão de interação; B, tempo de permanência (em segundos) na zona de interação; C, tempo de permanência (em segundos) nas zonas de afastamento. As barras representam a média + EPM (n = 8-9 animais/grupo). eYFP, vetor viral contendo plasmídeo controle; hM3Dq, vetor viral contendo DREAAD excitatório; EDSs, estresse de derrota social subefetivo. *, $p < 0,05$ em relação ao grupo indicado.

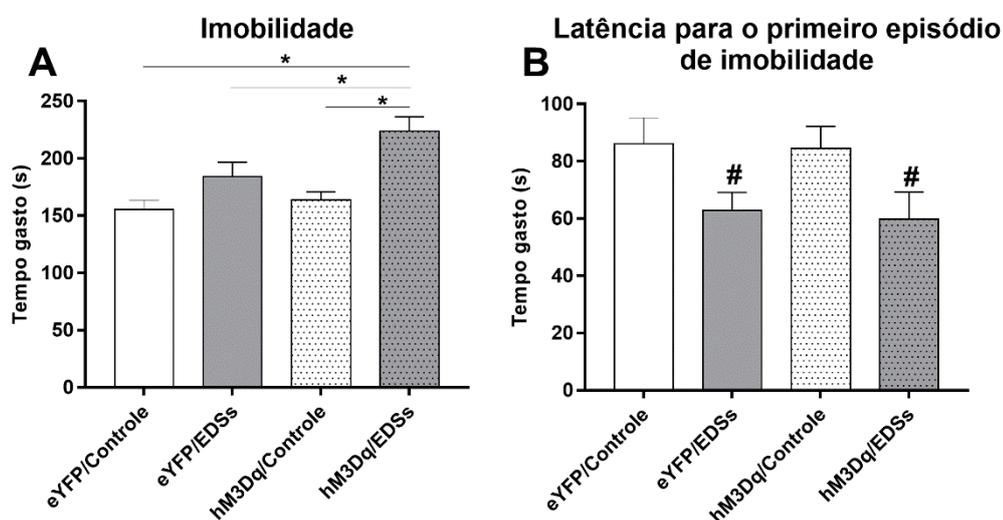


Fonte: próprio autor, 2021.

Houve um efeito significativo do fator vetor viral ($F_{1,30} = 5,08$; $p < 0,05$) e estresse ($F_{1,30} = 17,41$; $p < 0,001$) em relação ao tempo de imobilidade no TNF (Figura

71A). O teste *post hoc* mostrou uma diminuição do tempo de imobilidade no grupo hM3Dq/EDSs comparado ao grupo eYFP/Controle (eYFP/Controle = $155,5 \pm 8,0$ x hM3Dq/EDSs = $223,6 \pm 6,9$; $p < 0,001$), eYFP/EDSs (eYFP/EDSs = $184,0 \pm 12,8$ x hM3Dq/EDSs = $223,6 \pm 6,9$; $p < 0,05$) e hM3Dq (hM3Dq/Controle = $163,7 \pm 7,2$ x hM3Dq/EDSs = $223,6 \pm 6,9$; $p < 0,01$). Houve um efeito significativo do fator estresse ($F_{1,30} = 8,69$; $p < 0,01$) na latência para primeiro episódio de imobilidade (Figura 71B), indicando uma diminuição da latência para primeira imobilidade em todos os animais expostos ao estresse, independente do vetor viral.

Figura 71 - Efeito da ativação dos neurônios Npas1+ do pálido ventral durante estresse de derrota social subefetivo no teste do nado forçado. Trinta minutos antes do protocolo de estresse de derrota social subefetivo, os animais receberam uma administração de clozapina-N-óxido na dose de 1 mg/kg. O teste do nado forçado foi realizado 48 horas após o último episódio de derrota social. A, tempo gasto (em segundos) em imobilidade; B, latência (em segundos) para primeiro episódio de imobilidade. As barras representam a média + EPM (n = 8-9 animais/grupo). eYFP, vetor viral contendo plasmídeo controle; hM3Dq, vetor viral contendo DREAAD excitatório; EDSs, estresse de derrota social subefetivo. *, $p < 0,05$ em relação ao grupo indicado; #, $p < 0,05$ em relação aos grupos não-estressados.

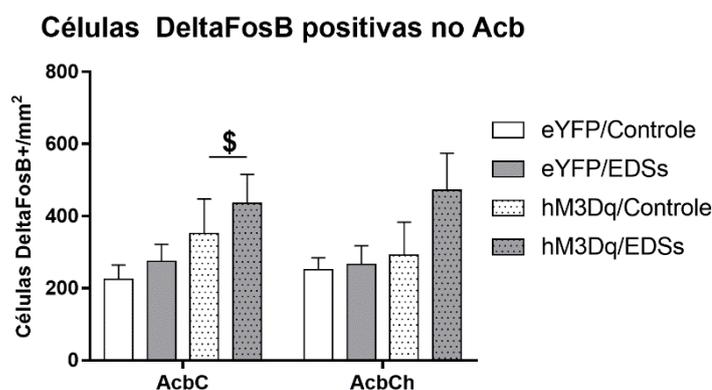


Fonte: próprio autor, 2021.

A ativação dos neurônios Npas1+ do pálido ventral aumentou o número de células positivas para DeltaFosB no AcbC, mas não no AcbCh (Figura 72). A ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo do fator vetor viral no AcbC ($F_{1,29} = 4,31$; $p < 0,05$) indicando um aumento no número de células positivas para DeltaFosB nos animais que receberam o vetor viral contendo hM3Dq em relação aos animais que

receberam o vetor viral contendo eYFP, independente do estresse (eYFP/Controle = $224,1 \pm 40,2$; eYFP/EDSs = $274,5 \pm 46,9$ x hM3Dq/Controle = $350,7 \pm 97,2$; hM3Dq/EDSs = $435,0 \pm 80,5$; $p < 0,05$). Não foram encontradas diferenças significativas no AcbCh ($p > 0,1$).

Figura 72 - Efeito da ativação dos neurônios Npas1+ do pálido ventral durante estresse de derrota social subefetivo no número de células DeltaFosB positivas no núcleo acumbens. Trinta minutos antes do protocolo de estresse de derrota social subefetivo, os animais receberam uma administração de clozapina-N-óxido na dose de 1 mg/kg. Os encéfalos foram retirados 72 horas após o último episódio de derrota social. As barras representam a média + EPM (n = 8-9 animais/grupo). eYFP, vetor viral contendo plasmídeo controle; hM3Dq, vetor viral contendo DREAAD excitatório; EDSs, estresse de derrota social subefetivo; AcbC, centro do núcleo acumbens; AcbCh, concha do núcleo acumbens. \$, $p < 0,05$ em relação aos grupos eYFP.



Fonte: próprio autor, 2021.

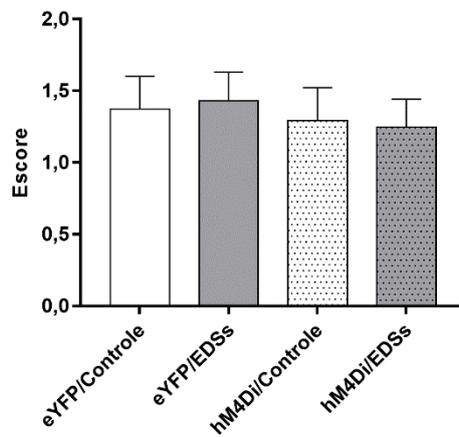
4.3. EXPERIMENTO 3: EFEITOS DA INIBIÇÃO DOS NEURÔNIOS NPAS1+ DO PÁLIDO VENTRAL DURANTE O ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL SUBEFETIVO

A inibição dos neurônios Npas1+ do pálido ventral não altera a resposta comportamentais de camundongos ao EDSs. A ANOVA de uma via não mostrou efeito significativo para nenhum dos fatores em relação a RI (Figura 73A) ($p > 0,1$).

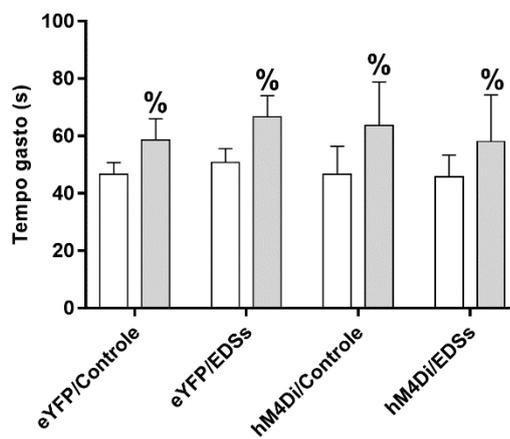
A ANOVA de medidas repetidas mostrou um efeito significativo do fator sessão em relação ao tempo gasto na zona de interação (Figura 73B), indicando um aumento do tempo gasto na zona de interação na sessão com alvo em relação a sessão sem alvo em todos os grupos experimentais. Não foram encontradas diferenças significativas em relação ao tempo gasto nas zonas de afastamento (Figura 73C) ($p > 0,1$).

Figura 73 - Efeito da inibição dos neurônios Npas1+ do pálido ventral durante estresse de derrota social subefetivo no teste de interação social. Trinta minutos antes do protocolo de estresse de derrota social subefetivo, os animais receberam uma administração de clozapina-N-óxido na dose de 1 mg/kg. O teste de interação social foi realizado 24 horas após o último episódio de derrota social. A, razão de interação; B, tempo de permanência (em segundos) na zona de interação; C, tempo de permanência (em segundos) nas zonas de afastamento. As barras representam a média + EPM (n = 5-9 animais/grupo). eYFP, vetor viral contendo plasmídeo controle; hM4Di, vetor viral contendo DREAAD inibitório; EDSs, estresse de derrota social subefetivo. %, $p < 0,05$ em relação à sessão sem alvo do próprio grupo.

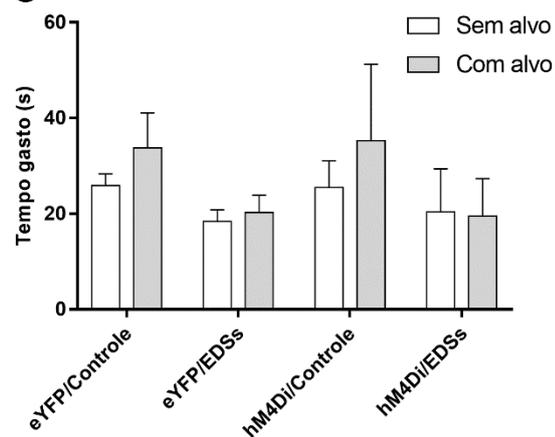
A Razão de interação



B Tempo na zona de interação



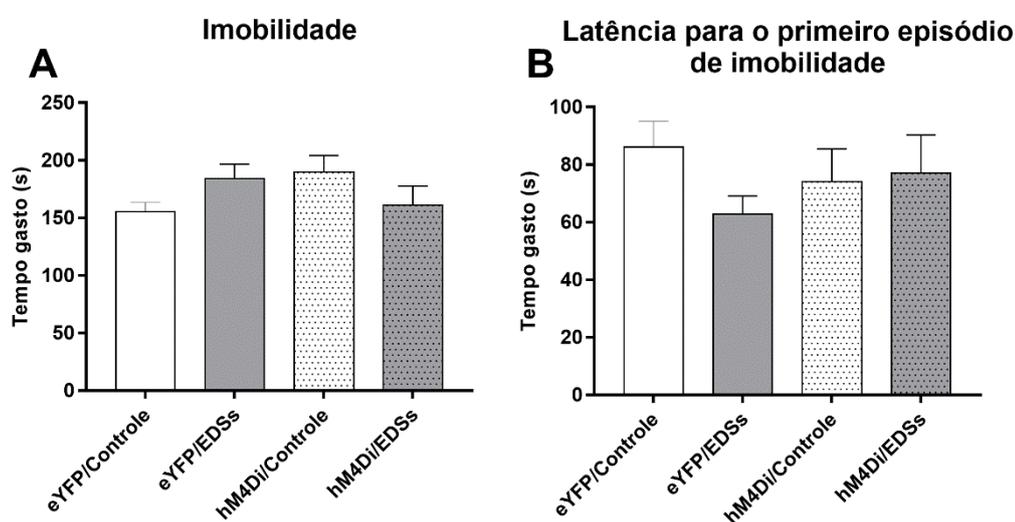
C Tempo nas zonas de afastamento



Fonte: próprio autor, 2021.

Não foram encontradas diferenças significativas em relação ao tempo de imobilidade (Figura 74A) e latência para primeiro episódio de imobilidade (Figura 74B).

Figura 74 - Efeito da inibição dos neurônios Npas1+ do pálido ventral durante estresse de derrota social subefetivo no teste do nado forçado. Trinta minutos antes do protocolo de estresse de derrota social subefetivo, os animais receberam uma administração de clozapina-N-óxido na dose de 1 mg/kg. O teste do nado forçado foi realizado 48 horas após o último episódio de derrota social. A, tempo gasto (em segundos) em imobilidade; B, latência (em segundos) para primeiro episódio de imobilidade. As barras representam a média + EPM (n = 5-9 animais/grupo). eYFP, vetor viral contendo plasmídeo controle; hM4Di, vetor viral contendo DREAAD inibitório; EDSs, estresse de derrota social subefetivo.



Fonte: próprio autor, 2021.

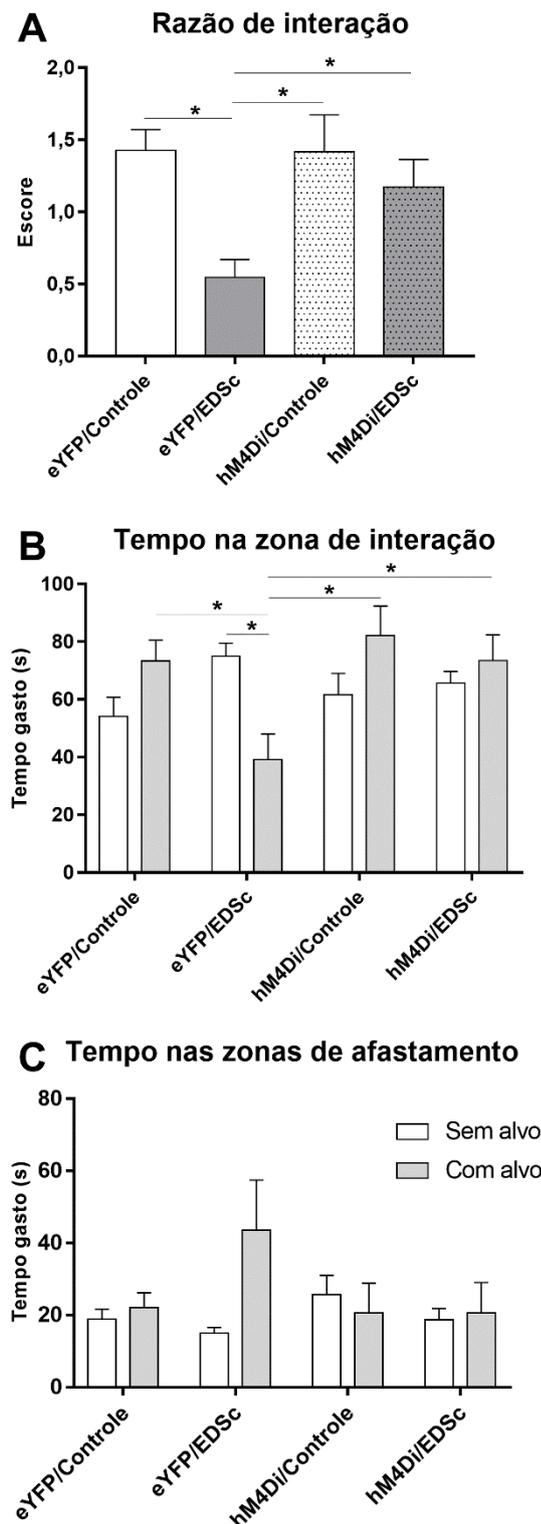
4.4. EXPERIMENTO 4: EFEITOS DA INIBIÇÃO DOS NEURÔNIOS NPAS1+ DO PÁLIDO VENTRAL DURANTE O ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL CRÔNICO

A inibição quimiogênica dos neurônios Npas1+ do pálido ventral durante o EDSc aumentou a resiliência ao estresse em camundongos. A ANOVA de duas vias da razão de interação (Figura 75A) mostrou um efeito significativo do fator estresse ($F_{1,23} = 9,59$; $p < 0,01$) e uma tendência de significância para a interação entre os fatores estresse e vetor viral ($F_{1,23} = 3,10$; $p = 0,09$). O teste *post hoc* mostrou uma diminuição da RI no grupo eYFP/EDSc em relação ao grupo eYFP/Controle

(eYFP/Controle = $1,4 \pm 0,1$ x eYFP/EDSc = $0,5 \pm 0,1$; $p < 0,05$), hM4Di/Controle (hM4Di/Controle = $1,4 \pm 0,3$ x eYFP/EDSc = $0,5 \pm 0,1$; $p < 0,05$) e hM4Di/EDSc (hM4Di/EDSc = $1,2 \pm 0,2$ x eYFP/EDSc = $0,5 \pm 0,1$; $p < 0,05$).

A ANOVA de medidas repetidas do tempo gasto na zona de interação (Figura 75B) mostrou um efeito significativo da interação entre o fator estresse e sessão ($F_{1,23} = 10,89$, $p < 0,01$), vetor viral e sessão ($F_{1,23} = 4,84$, $p < 0,05$) e estresse, vetor viral e sessão ($F_{1,23} = 4,22$, $p = 0,05$). O grupo eYFP/EDSc mostrou uma diminuição do tempo gasto na zona de interação com o alvo presente em relação ao grupo eYFP/Controle (eYFP/Controle = $73,4 \pm 7,2$ x eYFP/EDSc = $39,2 \pm 8,9$; $p < 0,05$), hM4Di/Controle (hM4Di/Controle = $82,2 \pm 10,1$ x eYFP/EDSc = $39,2 \pm 8,9$; $p < 0,05$), hM4Di/EDSc (hM4Di/EDSc = $73,5 \pm 8,9$ x eYFP/EDSc = $39,2 \pm 8,9$; $p < 0,05$) e a si próprio quando na sessão sem alvo (eYFP/EDSc sem alvo = $75,0 \pm 4,6$ x com alvo = $39,2 \pm 8,9$; $p < 0,05$). Não foram encontradas diferenças significativas em relação ao tempo gasto nas zonas de afastamento (Figura 75C).

Figura 75 - Efeito da inibição dos neurônios Npas1+ do pálido ventral durante estresse de derrota social crônico no teste de interação social. Trinta minutos antes de cada derrota no protocolo de estresse de derrota social crônico, os animais receberam uma administração de clozapina-N-óxido na dose de 1 mg/kg. O teste de interação social foi realizado 24 horas após o último episódio de derrota social. A, razão de interação; B, tempo de permanência (em segundos) na zona de interação; C, tempo de permanência (em segundos) nas zonas de afastamento. As barras representam a média + EPM (n = 6-9 animais/grupo). eYFP, vetor viral contendo plasmídeo controle; hM4Di, vetor viral contendo DREAAD inibitório; EDSc, estresse de derrota social crônico. *, $p < 0,05$ em relação ao grupo indicado.

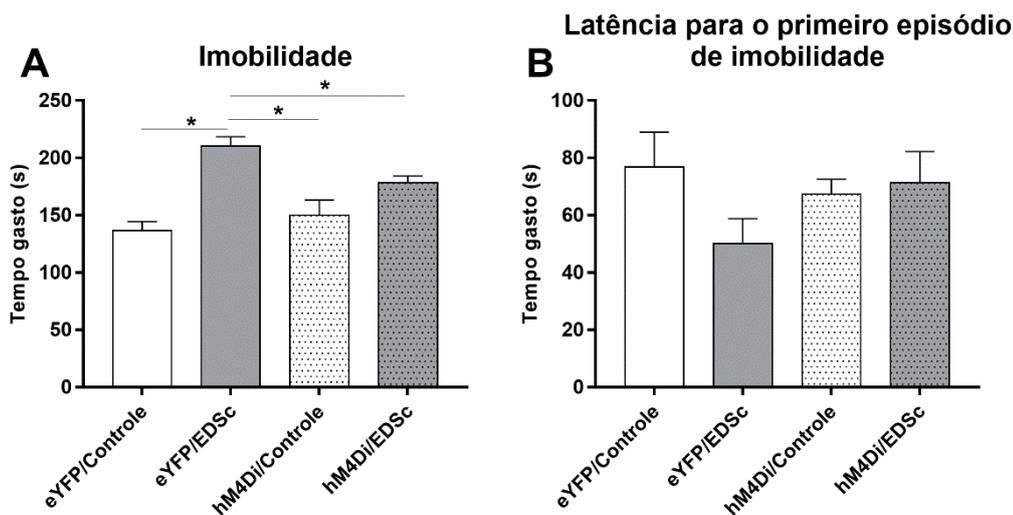


Fonte: próprio autor, 2021.

A ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo do fator estresse ($F_{1,23} = 33,26$; $p < 0,001$) e da interação entre estresse e vetor viral ($F_{1,23} = 6,65$; $p < 0,01$) em relação ao tempo gasto em imobilidade (Figura 76A). O teste *post hoc* mostrou um

aumento no tempo de imobilidade do grupo eYFP/EDSc em relação ao grupo eYFP/Controle (eYFP/Controle = $136,8 \pm 7,7$ x eYFP/EDSc = $210,5 \pm 7,9$; $p < 0,001$), hM4Di/Controle (hM4Di/Controle = $150,1 \pm 13,1$ x eYFP/EDSc = $210,5 \pm 7,9$; $p < 0,001$) e hM4Di/EDSc (hM4Di/EDSc = $178,3 \pm 5,9$ x eYFP/EDSc = $210,5 \pm 7,9$; $p < 0,01$). Não foram encontradas diferenças significativas em relação a latência para primeiro episódio de imobilidade (Figura 76B).

Figura 76 - Efeito da inibição dos neurônios Npas1+ do pálido ventral durante estresse de derrota social crônico no teste do nado forçado. Trinta minutos antes de cada derrota no protocolo de estresse de derrota social crônico, os animais receberam uma administração de clozapina-N-óxido na dose de 1 mg/kg. O teste do nado forçado foi realizado 48 horas após o último episódio de derrota social. A, tempo gasto (em segundos) em imobilidade; B, latência (em segundos) para primeiro episódio de imobilidade. As barras representam a média + EPM (n = 6-9 animais/grupo). eYFP, vetor viral contendo plasmídeo controle; hM4Di, vetor viral contendo DREAAD inibitório; EDSc, estresse de derrota social crônico. *, $p < 0,05$ em relação ao grupo indicado.



Fonte: próprio autor, 2021.

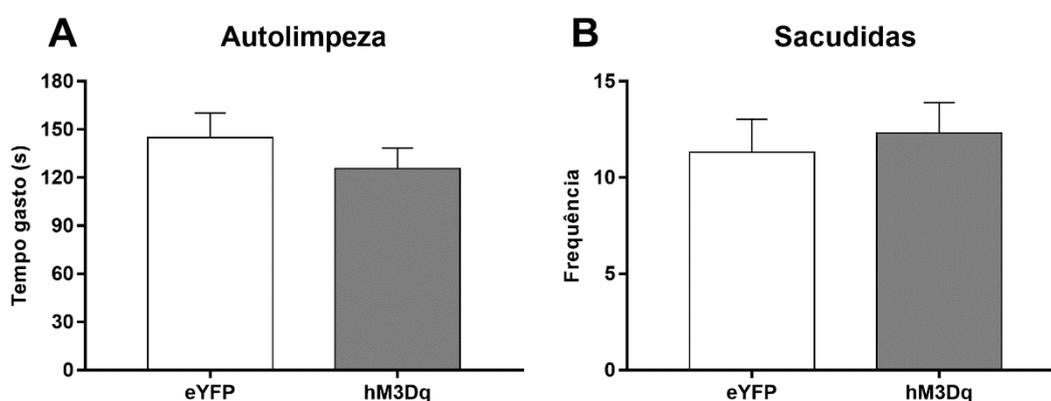
4.5. EXPERIMENTO 5: EFEITO DA ATIVAÇÃO DOS NEURÔNIOS NPAS1+ DO PÁLIDO VENTRAL DURANTE TESTES COMPORTAMENTAIS RELACIONADOS À ANSIEDADE E DEPRESSÃO

A ativação quimiogénica dos neurônios Npas1+ do pálido ventral aumentou os comportamentos relacionados à ansiedade avaliados no LCE e CA, sem alterar os

comportamentos relacionados à depressão no teste do esguicho, TIS e TCS em camundongos.

O tempo gasto em autolimpeza (Figura 77A) e o número de sacudidas (Figura 77B) não foram alterados pelo tratamento. O teste *t-student* não mostrou nenhuma diferença significativa nesses comportamentos ($p > 0,1$).

Figura 77 - Efeito da ativação dos neurônios Npas1+ do pálido ventral durante o teste do esguicho. Trinta minutos antes do início do teste, os animais receberam uma administração de clozapina-N-óxido na dose de 1 mg/kg. A, tempo gasto (em segundos) em autolimpeza; B, frequência de sacudidas. As barras representam a média + EPM ($n = 9$ animais/grupo). eYFP, vetor viral contendo plasmídeo controle; hM3Dq, vetor viral contendo DREAAD excitatório.



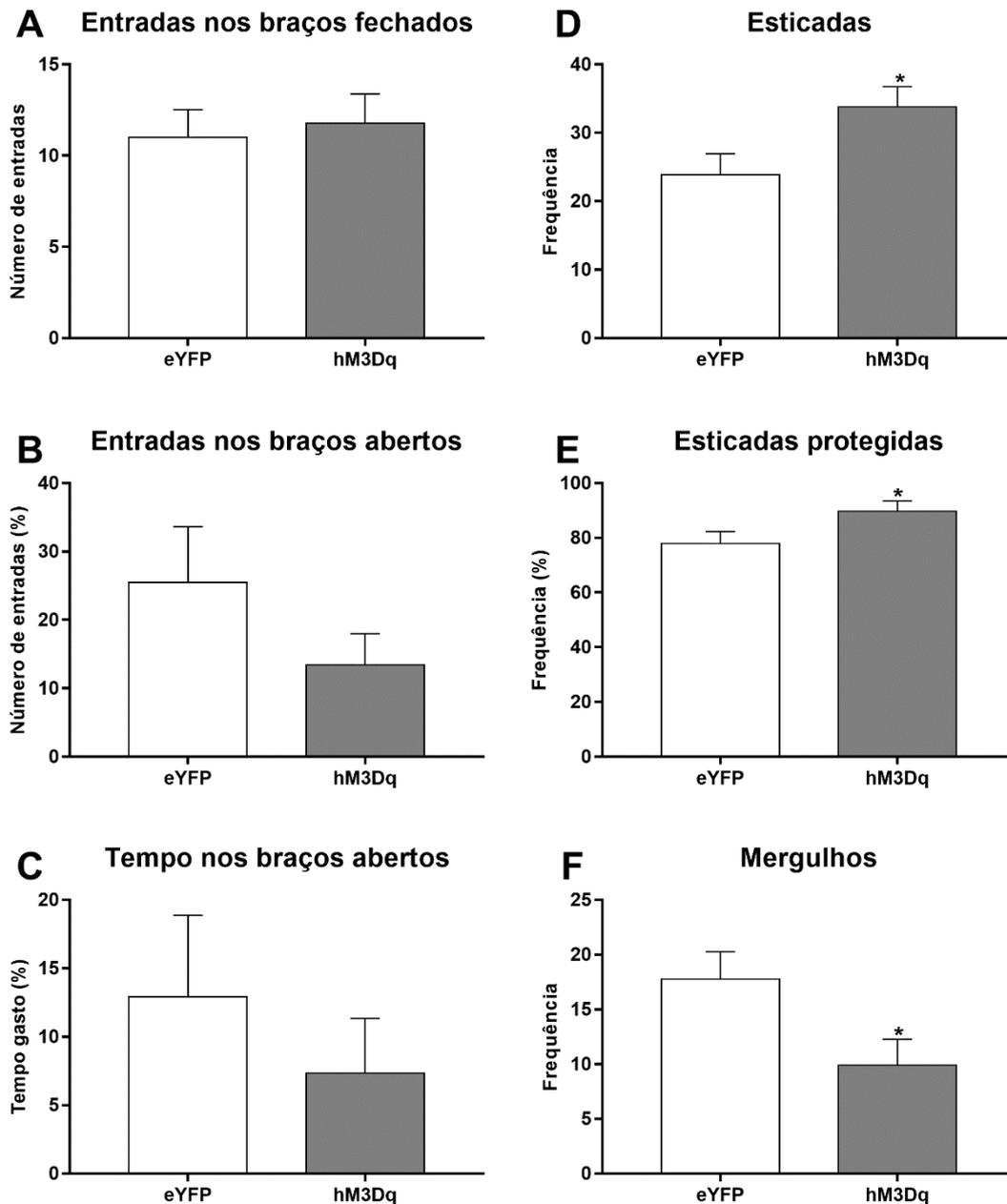
Fonte: próprio autor, 2021.

Houve um aumento dos comportamentos de avaliação de risco no LCE. O teste *t-student* não mostrou nenhuma diferença significativa em relação ao número de entradas nos braços fechados (Figura 78A) ($p > 0,1$), na porcentagem de entradas nos braços abertos (Figura 78B) ($p > 0,1$) ou na porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos (Figura 78C) ($p > 0,1$). Por outro lado, houve um aumento na frequência de esticadas (Figura 78D) no grupo hM3Dq (eYFP = $23,9 \pm 3,1$ x hM3Dq = $33,8 \pm 3,0$; $p < 0,05$) e na porcentagem de esticadas protegidas (Figura 78E) (eYFP = $77,9 \pm 4,4$ x hM3Dq = $89,8 \pm 3,7$; $p = 0,05$). Houve também uma diminuição no número de mergulhos (Figura 78F) no grupo hM3Dq (eYFP = $17,8 \pm 2,5$ x hM3Dq = $9,9 \pm 2,4$; $p < 0,05$).

Figura 78 - Efeito da ativação dos neurônios Npas1+ do pálido ventral durante o labirinto em cruz elevado. Trinta minutos antes do início do teste, os animais receberam uma administração de clozapina-N-óxido na dose de 1 mg/kg. A, número

de entradas nos braços fechados. B, percentual do número entradas nos braços abertos. C, percentual do tempo gasto nos braços abertos; D, número de esticadas; E, percentual de esticadas realizadas na zona protegida; F, número de mergulhos.

As barras representam a média + EPM (n = 9 animais/grupo). eYFP, vetor viral contendo plasmídeo controle; hM3Dq, vetor viral contendo DREAAD excitatório. *, p < 0,05 em relação ao grupo eYFP.

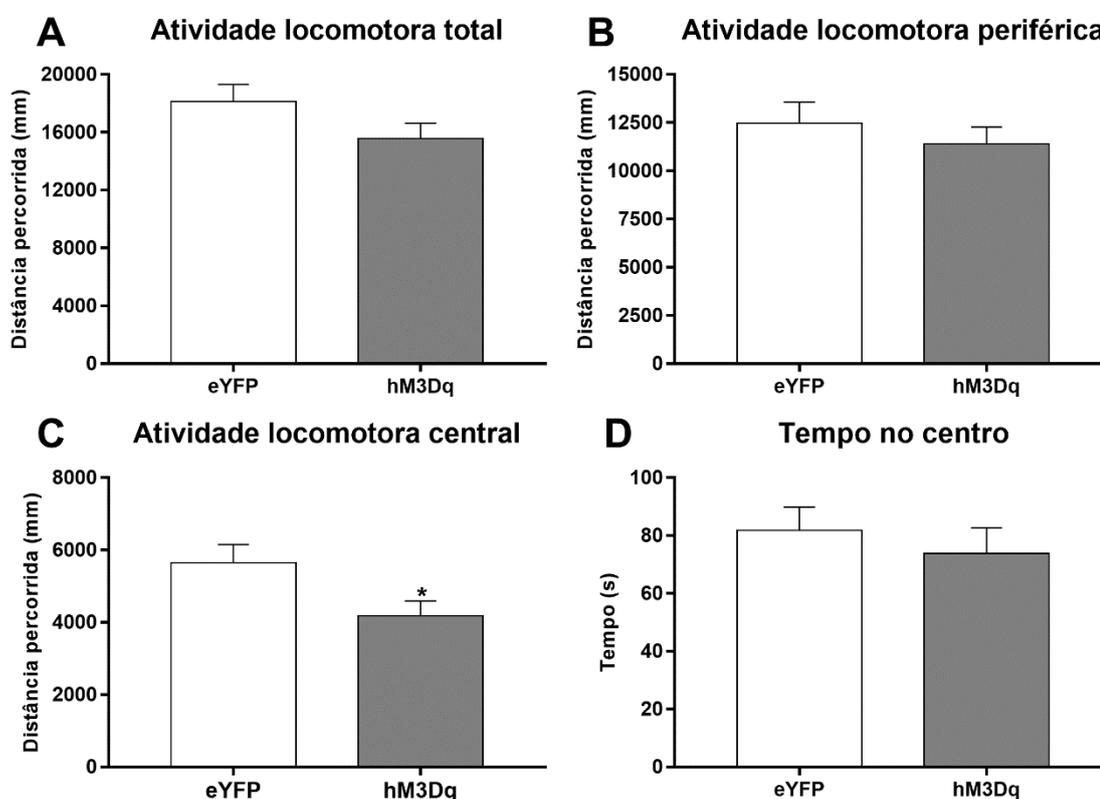


Fonte: próprio autor, 2021.

Houve uma diminuição da atividade locomotora no centro do CA nos animais que receberam o vetor viral contendo hM3Dq. Não foram encontradas diferenças significativas em relação a atividade locomotora total (Figura 79A) ($p > 0,1$) ou

periférica (Figura 79B) ($p > 0,1$). Por outro lado, os animais do grupo hM3Dq mostraram uma diminuição da distância percorrida na zona central do CA (Figura 79C) (eYFP = $1322 \pm 177,1$ x hM3Dq = $8474 \pm 121,6$; $p < 0,05$). O tempo gasto no centro não foi alterado pelo tratamento (Figura 79D) ($p > 0,1$).

Figura 79 - Efeito da ativação dos neurônios Npas1+ do pálido ventral durante o teste do campo aberto. Trinta minutos antes do início do teste, os animais receberam uma administração de clozapina-N-óxido na dose de 1 mg/kg. A, distância total (em mm) percorrida. B, distância percorrida (em mm) na periferia do aparato. C, distância percorrida (em mm) no centro do aparato; D, tempo de permanência no centro do aparato. As barras representam a média + EPM (n = 9 animais/grupo). eYFP, vetor viral contendo plasmídeo controle; hM3Dq, vetor viral contendo DREAAD excitatório. *, $p < 0,05$ em relação ao grupo eYFP.

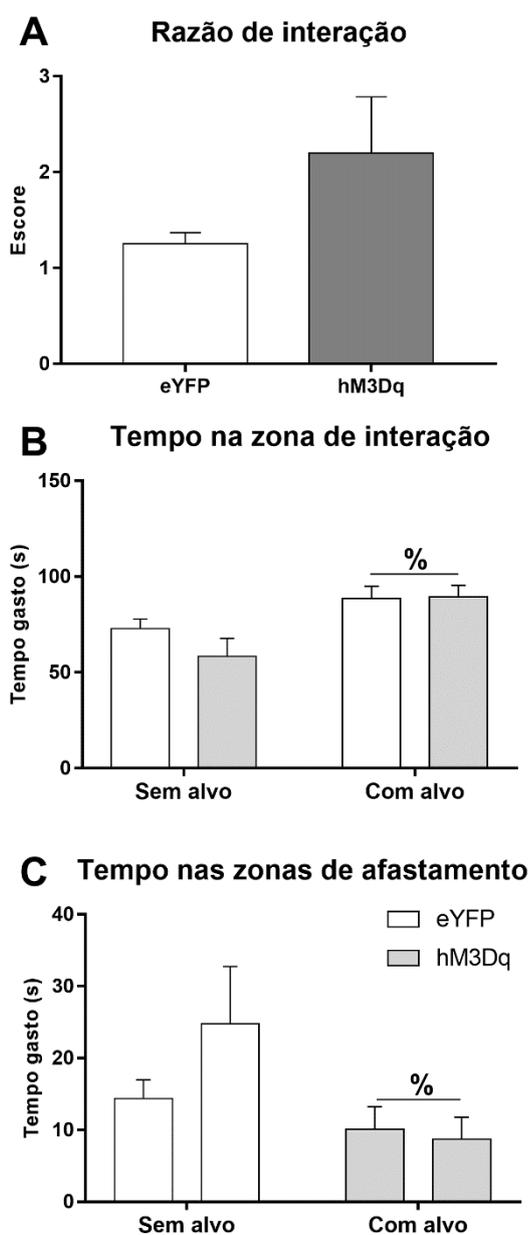


Fonte: próprio autor, 2021.

O tratamento não alterou os comportamentos sociais no TIS. Não foram encontradas diferenças significativas na RI (Figura 80A) ($p > 0,1$). Em relação ao tempo gasto na zona de interação (Figura 80B), a ANOVA de medidas repetidas mostrou efeito significativo do fator sessão ($F_{1,16} = 15,79$; $p < 0,01$), indicando um aumento do tempo gasto nessa zona quando o alvo social estava presente. De

maneira semelhante, a ANOVA de medidas repetidas revelou um efeito significativo do fator sessão ($F_{1,16} = 7,00$; $p < 0,05$) no tempo gasto nas zonas de afastamento (Figura 80C), indicando uma diminuição do tempo de permanência nessa zona quando o alvo social estava presente.

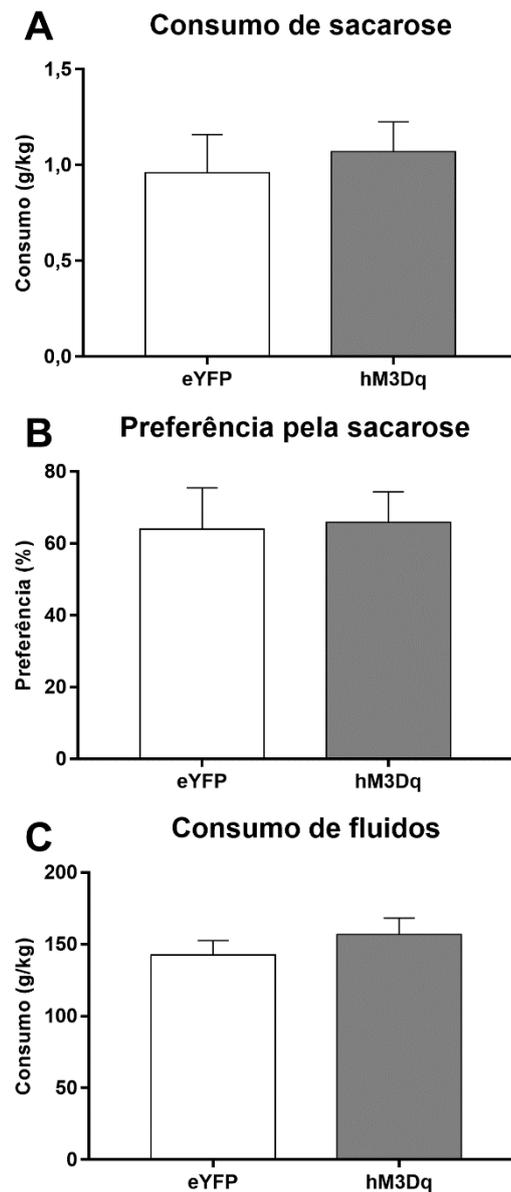
Figura 80 - Efeito da ativação dos neurônios Npas1+ do pálido ventral durante o teste de interação social. Trinta minutos antes do início do teste, os animais receberam uma administração de clozapina-N-óxido na dose de 1 mg/kg. A, razão de interação; B, tempo de permanência (em segundos) na zona de interação; C, tempo de permanência (em segundos) nas zonas de afastamento. As barras representam a média + EPM (n = 9 animais/grupo). eYFP, vetor viral contendo plasmídeo controle; hM3Dq, vetor viral contendo DREAAD excitatório. %, $p < 0,05$ em relação ao próprio grupo em relação a sessão sem alvo.



Fonte: próprio autor, 2021.

Não foram encontradas diferenças significativas em relação ao consumo de sacarose (Figura 81A), preferência pela sacarose (Figura 81B) ou consumo de fluidos (Figura 81C) ($p > 0,1$) pela ativação dos neurônios Npas1+ no pálido ventral.

Figura 81 - Efeito da ativação dos neurônios Npas1+ do pálido ventral no teste de consumo de sacarose. O teste foi realizado durante os intervalos entre os testes comportamentais, após o labirinto em cruz elevado. A, consumo de sacarose; B, preferência pela solução de sacarose; C, consumo de fluidos. As barras representam a média + EPM ($n = 9$ animais/grupo). eYFP, vetor viral contendo plasmídeo controle; hM3Dq, vetor viral contendo DREADD excitatório.



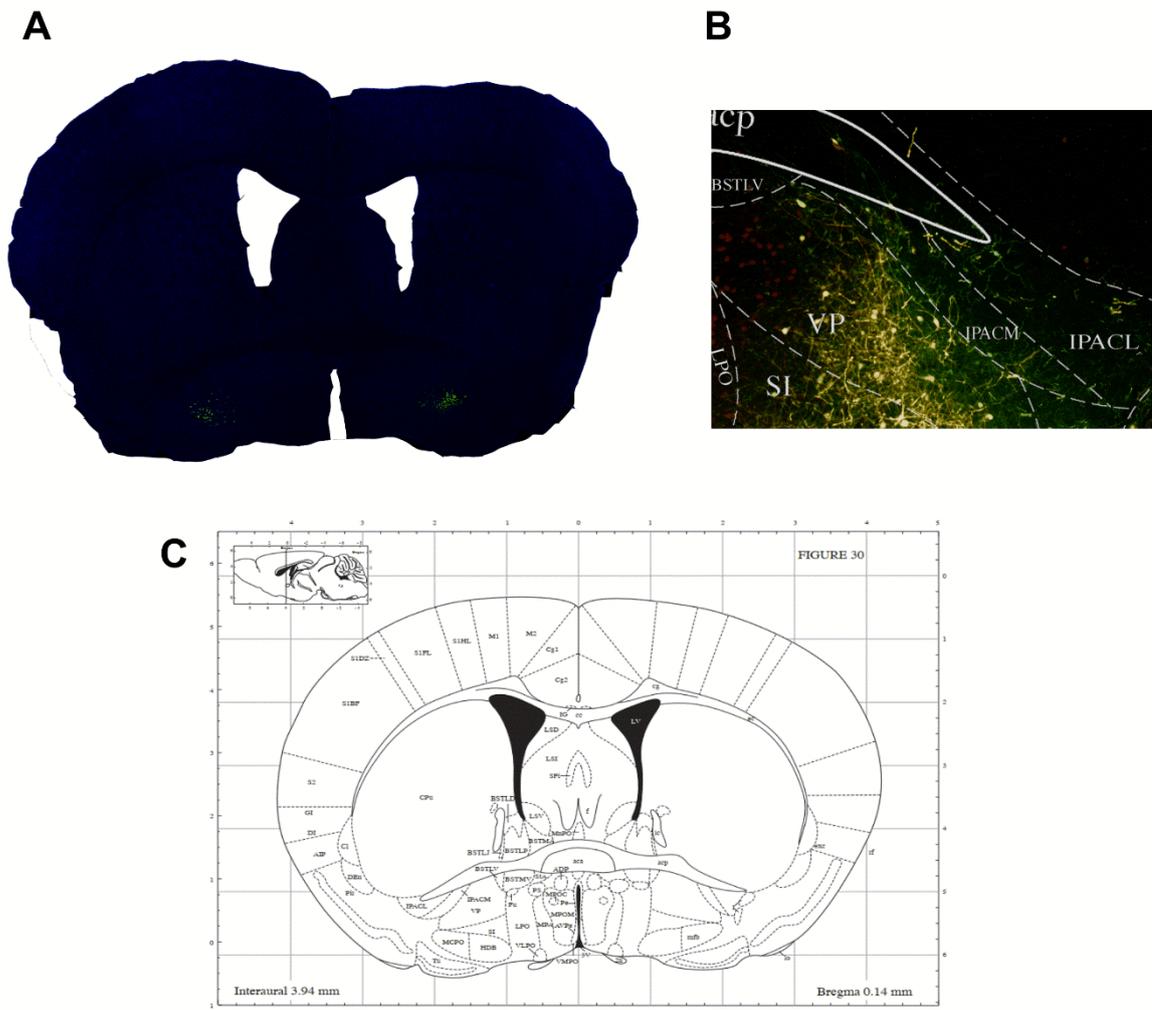
Fonte: próprio autor, 2021.

4.6. EXPERIMENTO 6: MAPEAMENTO DAS PROJEÇÕES DOS NEURÔNIOS NPAS1+ DO PÁLIDO VENTRAL

Três animais que receberam o vetor viral contendo o plasmídeo para a proteína controle eYFP foram usados para a investigação das áreas encefálicas que recebem projeções dos neurônios Npas1+ do pálido ventral. A Figura 82 mostra uma fotomicrografia representativa do sítio de injeção dos vetores virais no pálido ventral (Figura 82A), a co-marcação entre a eYFP e mCherry especificamente no pálido ventral (Figura 82B), e que representam a expressão da proteína fluorescente

especificamente nos neurônios Npas1+ nos animais Npas1-cre e a prancha (Figura 82C) do atlas de coordenadas estereotáticas (PAXINOS; FRANKLIN, 2001), representando a região-alvo para a injeção dos vetores virais.

Figura 82 - Imagens representativas do local de injeção dos vetores virais no pálido ventral. A, fotomicrografia de baixa ampliação representando uma injeção do vetor viral correta no pálido ventral; B, comarcação entre a eYFP e mCherry no pálido ventral de camundongos Npas1-cre; C, prancha do atlas de coordenadas estereotáticas representando a região-alvo para administração dos vetores virais.

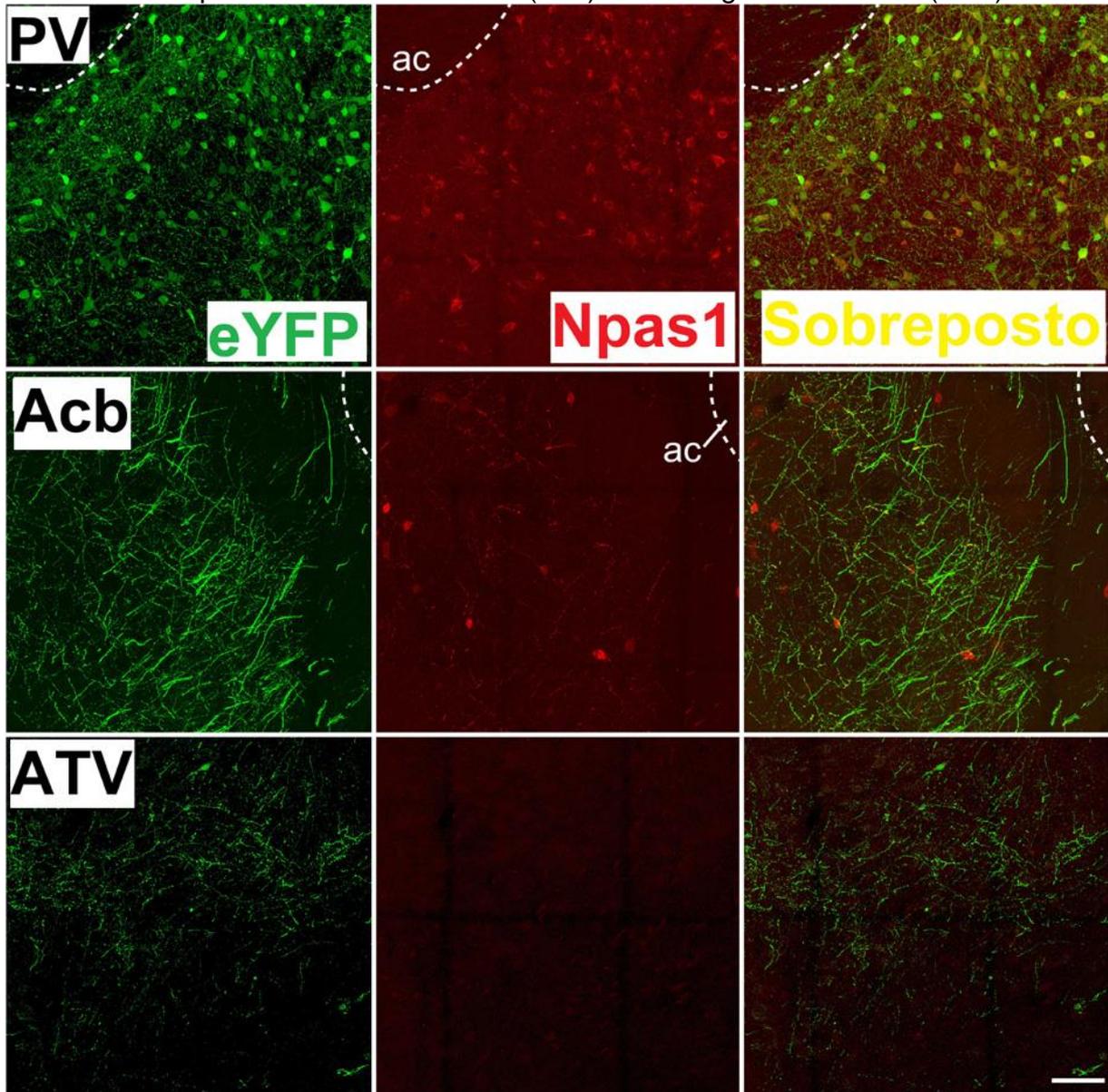


Fonte: próprio autor, 2021. A prancha (C) foi retirada do atlas de coordenadas estereotáticas de Paxinos e Franklin (2001).

Foram encontradas projeções dos neurônios Npas1+ do pálido ventral para o Acb (Figura 83), ATV (Figura 83), HbL e HbM (Figura 84), HL (Figura 84), tálamo (Figura 84), núcleo olfatório anterior (Figura 85), septo lateral e medial (Figura 85) e

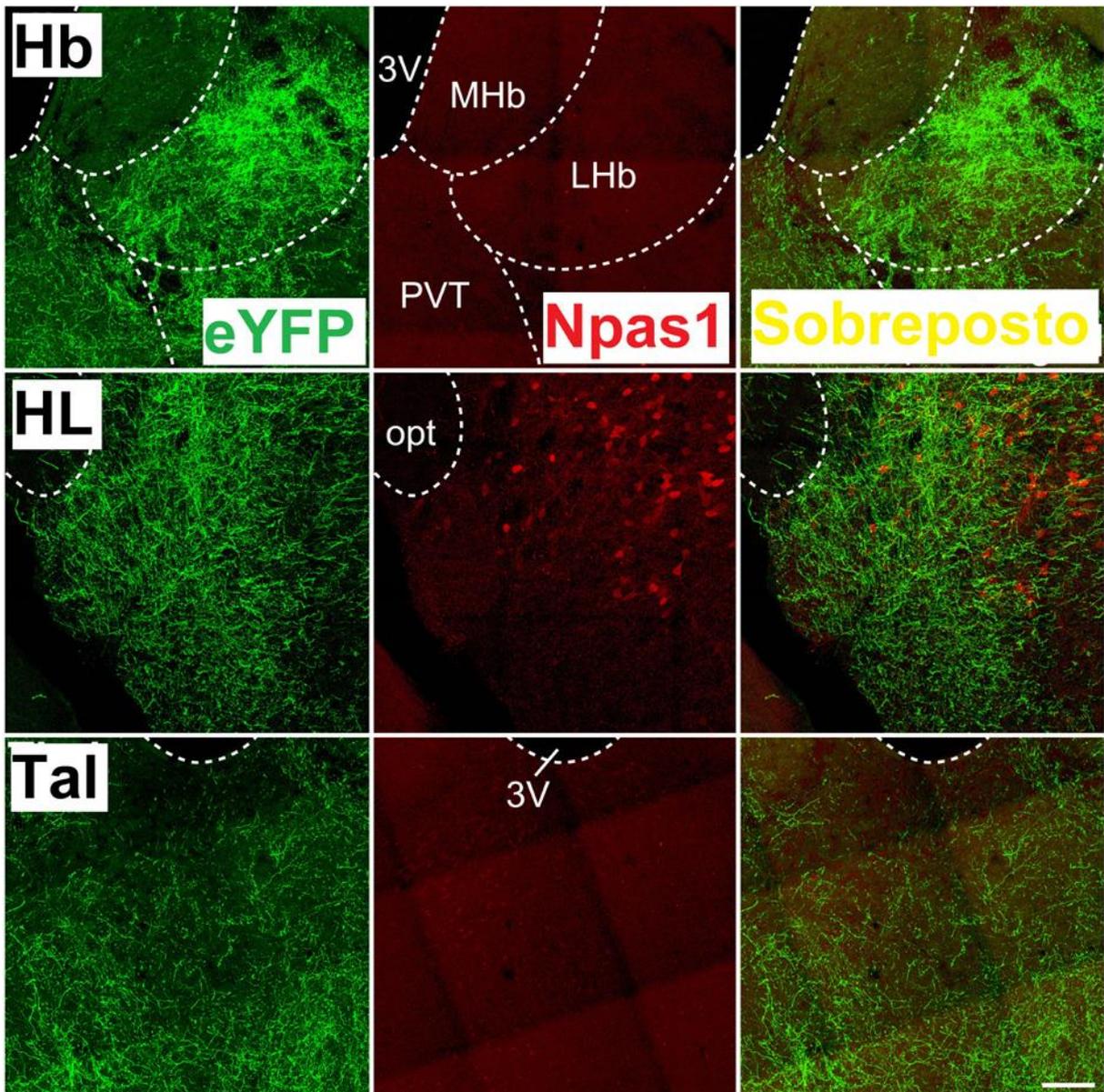
MCP (Figura 85). Dentre essas regiões, foram encontrados neurônios Npas1+ no Acb, HL, núcleo olfatório anterior e septo lateral.

Figura 83 - Imagens representativas das projeções dos neurônios Npas1+ do pálido ventral para o núcleo acumbens (Acb) e área tegmental ventral (ATV).



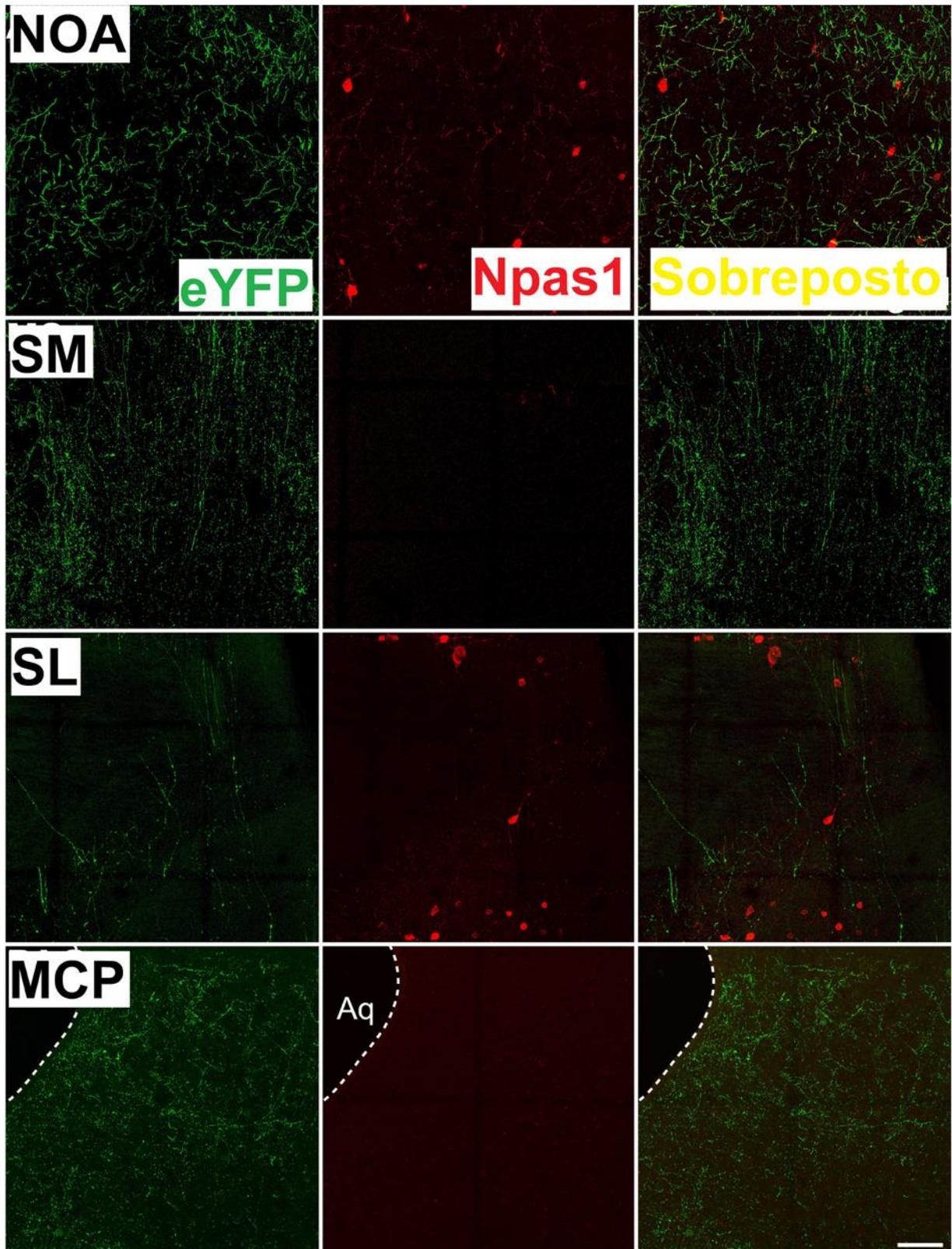
Fonte: próprio autor, 2021.

Figura 84 - Imagens representativas das projeções dos neurônios Npas1+ do pálido ventral para a habênula (Hb), hipotálamo lateral (HL) e tálamo (Tal).



Fonte: próprio autor, 2021.

Figura 85 - Imagens representativas das projeções dos neurônios Npas1+ do pálido ventral para núcleo olfatório anterior (NOA), septo medial (SM), septo lateral (SL) e matéria cinzenta periaquedutal (MCP).

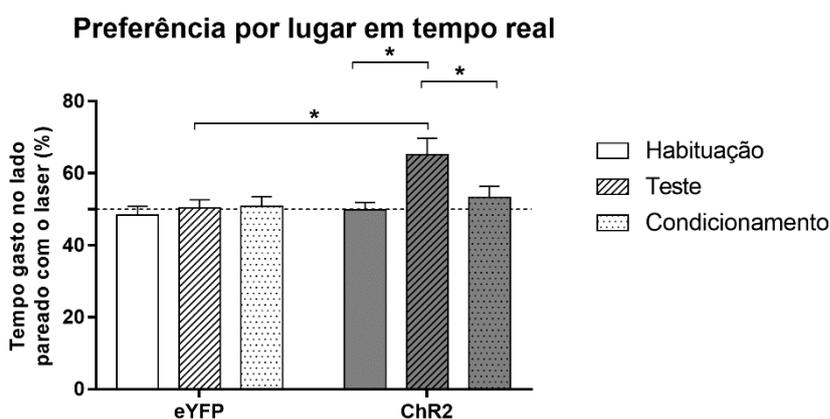


Fonte: próprio autor, 2021.

4.7. EXPERIMENTO 7: EFEITO DA ATIVAÇÃO OPTOGENÉTICA DOS NEURÔNIOS NPAS1+ DO PÁLIDO VENTRAL QUE SE PROJETAM PARA O NÚCLEO ACUMBENS DURANTE O TESTE DE PREFERÊNCIA POR LUGAR EM TEMPO REAL

A ativação optogenética dos neurônios Npas1+ do pálido ventral que se projetam para o Acb induziu uma preferência por lugar (Figura 86). A ANOVA de medidas repetidas mostrou um efeito significativo do vetor viral ($F_{1,11} = 7,51$; $p < 0,05$), sessão ($F_{2,22} = 3,81$; $p < 0,05$) e uma tendência de significância para a interação entre esses fatores ($F_{2,22} = 2,70$; $p = 0,09$). O teste *post hoc* mostrou que os animais que receberam o vetor viral contendo o plasmídeo para ChR2 permaneceram mais tempo no lado pareado com o laser durante a sessão teste quando comparado com os animais que receberam eYFP (eYFP = $50,3 \pm 2,3$ x ChR2 = $65,2 \pm 4,6$; $p < 0,05$), e consigo mesmo em relação à sessão de habituação (ChR2 habituação = $49,8 \pm 2,1$ x ChR2 teste = $65,2 \pm 4,6$; $p < 0,05$) e de avaliação do condicionamento (ChR2 teste = $65,2 \pm 4,6$ x ChR2 condicionamento = $53,3 \pm 3,0$; $p < 0,05$).

Figura 86 - Efeito da ativação dos neurônios Npas1+ do pálido ventral que se projetam para o núcleo acumbens no teste da preferência por lugar em tempo real. eYFP, vetor viral contendo plasmídeo controle; ChR2, vetor viral contendo o canal iônico ativado por luz rodopsina 2. *, $p < 0,05$ em relação ao grupo apontado.



Fonte: próprio autor, 2021.

5. DISCUSSÃO

A ativação quimiogénica dos neurónios Npas1+ do pálido ventral aumentou a susceptibilidade ao EDS e os comportamentos relacionados à ansiedade, enquanto a inibição quimiogénica desses neurónios durante o estresse aumentou a resiliência ao EDS. Por outro lado, a ativação específica dos neurónios Npas1+ do pálido ventral que se projetam para o Acb teve um efeito reforçador.

Em roedores, as consequências comportamentais relacionadas ao estresse da manipulação do pálido ventral são diversas, ainda que poucos estudos tenham sido feitos. Alguns resultados mostram que a inibição de todo o pálido ventral por meio do aumento da neurotransmissão GABAérgica aumenta os comportamentos relacionados à depressão no TNF (SKIRZEWSKI *et al.*, 2011), enquanto a inibição quimiogénica dos neurónios do pálido ventral que expressam parvalbumina diminui os comportamentos relacionados à depressão (KNOWLAND *et al.*, 2017). Junto com os resultados encontrados em nosso estudo, esses resultados parecem sugerir que, assim como em outras regiões, como o Acb (FRANCIS; LOBO, 2017), os diferentes tipos celulares no pálido ventral controlam as respostas comportamentais ao estresse de maneira distinta.

O aumento dos comportamentos relacionados à ansiedade devido a ativação dos neurónios Npas1+ do pálido ventral pode ser um reflexo do aumento da susceptibilidade desses animais frente a situações aversivas, ou pode contribuir para sua maior susceptibilidade. Em humanos, um temperamento ansioso ou maior ansiedade durante a infância e adolescência são correlacionados com um maior risco no desenvolvimento de depressão na vida adulta (KALIN, 2017), e um estilo negativo de enfrentamento a situações estressantes aumenta a prevalência de ansiedade e depressão em adultos (LEW *et al.*, 2019; XIONG *et al.*, 2019).

Não encontramos estudos que descrevam as propriedades eletrofisiológicas e as projeções dos diferentes tipos neuronais do pálido ventral. Entretanto, podemos utilizar das semelhanças entre o GP e o pálido ventral para entender as propriedades celulares dos neurónios do pálido ventral. Ambas as regiões se originam de células progenitoras semelhantes e são populadas por tipos neuronais semelhantes (MA; GEYER, 2018; NOBREGA-PEREIRA *et al.*, 2010; ROOT *et al.*, 2015). Tanto o GP quanto o pálido ventral possuem neurónios glutamatérgicos, GABAérgicos e

colinérgicos, sendo os neurônios GABAérgicos a maioria (MA; GEYER, 2018). No GB, os neurônios GABAérgicos podem ser classificados em três subgrupos: os neurônios arquipalidais, os neurônios protótipos de baixa frequência e os neurônios protótipos de alta frequência. Essas populações são altamente segregadas em relação a suas propriedades elétricas e expressão de marcadores genéticos (ABRAHAO; LOVINGER, 2018). Dentre esses marcadores, a expressão de Npas1 e parvalbumina diferencia o padrão de projeção neuronal. Os neurônios Npas1+ constituem a principal projeção para o estriado dorsal, enquanto os neurônios positivos para parvalbumina se projetam principalmente para o núcleo subtalâmico (ABECASSIS *et al.*, 2020; GLAJCH *et al.*, 2016; HERNANDEZ *et al.*, 2015). Os neurônios Npas1+ também possuem projeções para regiões somatossensoriais, somatomotoras e orbitais do córtex (ABECASSIS *et al.*, 2020). Nossos resultados mostraram projeções dos neurônios Npas1+ do pálido ventral para áreas do bulbo olfatório, para o Acb, para o septo medial e lateral, habênula (tanto lateral quanto medial), tálamo e hipotálamo lateral, ATV e MCP. Comparado ao GP, os neurônios Npas1+ do pálido ventral possuem um padrão de projeção mais ventral, sem projeções para áreas corticais. Isso sugere que esses neurônios no pálido ventral estão mais envolvidos no controle de processos emocionais ao invés de um papel mais importante no processamento motor. Outros estudos mostraram um padrão semelhante de projeções do pálido ventral quando esse foi analisado como um todo (FAGET *et al.*, 2018; KNOWLAND *et al.*, 2017; ROOT *et al.*, 2015; WULFF *et al.*, 2019).

Dentre os alvos das projeções dos neurônios Npas1+ do pálido ventral encontrados em nosso estudo, o Acb, a ATV e a HbL têm sido implicados no desenvolvimento da depressão (FOX; LOBO, 2019; KNOWLAND *et al.*, 2017). Considerando essas três regiões e seu papel na resposta ao estresse, podemos sugerir algumas hipóteses de como os neurônios Npas1+ do pálido ventral modulam as respostas ao estresse, a nível de circuitaria.

A primeira hipótese é de que os neurônios Npas1+ aumentam a susceptibilidade ao EDS por meio da liberação de GABA no Acb, aumentando, diretamente ou indiretamente, a inibição dos neurônios espinhosos médios do tipo D1 em relação aos neurônios do tipo D2. A inibição quimiogênica dos neurônios do tipo D1 aumenta a susceptibilidade ao EDS, enquanto a inibição dos neurônios do tipo D2 aumenta a resiliência (FRANCIS *et al.*, 2015). Além disso, o aumento do efeito inibitório da dopamina sobre os neurônios do tipo D2 por meio da superexpressão

desses receptores aumenta a motivação (GALLO *et al.*, 2018; THIBEAULT *et al.*, 2019), assim como a inibição optogenética desses neurônios induz aversão (COLE; ROBINSON; BERRIDGE, 2018). Por sua vez, a ativação dos neurônios do tipo D1 é reforçadora (COLE; ROBINSON; BERRIDGE, 2018; SOARES-CUNHA *et al.*, 2016,2018). Nossos resultados da ativação optogenética dos neurônios Npas1+ do pálido ventral para o Acb durante o teste de preferência por lugar em tempo real mostraram um efeito reforçador dessa projeção. Nesse sentido, resultados recentes mostraram que os neurônios arquipalidais do pálido ventral, cuja morfologia é semelhante aos neurônios arquipalidais do GP, inibem o AcbCh e aumentam o consumo de substâncias reforçadoras (VACHEZ *et al.*, 2021). Podemos sugerir então que, de alguma maneira as projeções Npas1+ para o Acb se projetam preferencialmente para os neurônios do tipo D2, ou que esses neurônios são mais sensíveis ao GABA proveniente dessas projeções. Contrariando essa hipótese, resultados mostram que o PÁLIDO VENTRAL se projeta de maneira semelhante para os neurônios D1 ou D2 do Acb (GANGAROSSA *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2018), e algumas evidências mostram que a ativação dos neurônios do tipo D2 estaria relacionada com a motivação, ao invés de sua inibição (SOARES-CUNHA *et al.*, 2016,2018). Por outro lado, os neurônios do tipo D2 parecem ser mais sensíveis ao GABA (ADE *et al.*, 2008; GLAJCH *et al.*, 2016).

O aumento do número de células positivas para DeltaFosB no Acb indica que a ativação dos neurônios Npas1+ do PÁLIDO VENTRAL altera a atividade desta região. Entretanto, nossos resultados não permitem dizer se essa modulação está direta ou indiretamente aumentando a susceptibilidade ao estresse. A DeltaFosB é uma das moléculas por meio das quais o estresse e drogas de abuso induzem alterações de longo prazo no Acb (HAN; NESTLER, 2017; NESTLER; KELZ; CHEN, 1999; NESTLER, 2015), e o aumento na sua expressão no Acb está relacionada com a resiliência e a susceptibilidade ao EDS, dependendo do tipo celular (HAMILTON *et al.*, 2017; VIALOU *et al.*, 2014). É possível que a ativação dos neurônios Npas1+ do pálido ventral não induza a expressão de DeltaFosB de maneira direta, e sim por meio de projeções para outras regiões encefálicas que modulem a atividade do Acb.

A HbL recebe tanto projeções GABAérgicas quanto glutamatérgicas do pálido ventral (WULFF *et al.*, 2019). A ativação optogenética das projeções glutamatérgicas induz aversão por lugar (TOOLEY *et al.*, 2018) e aumenta a susceptibilidade ao EDS (KNOWLAND *et al.*, 2017). Se considerarmos a possibilidade dos neurônios Npas1+

do pálido ventral para a HbL serem glutamatérgicos, outra hipótese é que a ativação quimiogénica desses neurônios em nosso trabalho aumenta a susceptibilidade ao EDS por meio do aumento direto da atividade da HbL. No caso desses neurônios serem GABAérgicos, esse aumento da atividade da HbL poderia ser indireto, por meio da inibição de interneurônios inibitórios, por exemplo. Como citado anteriormente, a maioria dos estudos indica que os neurônios Npas1+ são inibitórios (ABRAHAO; LOVINGER, 2018; GLAJCH *et al.*, 2016; HERNANDEZ *et al.*, 2015; VACHEZ *et al.*, 2021).

A atividade da ATV têm sido relacionada a susceptibilidade ao EDS. Após a exposição crônica ao estresse, indivíduos susceptíveis apresentam aumento da atividade dos neurônios dopaminérgicos dessa região especificamente para o Acb (FOX; LOBO, 2019). Por sua vez, o aumento da atividade dos neurônios do pálido ventral que se projetam para a ATV aumentam a atividade dopaminérgica dessa região, e a susceptibilidade ao EDS (KNOWLAND *et al.*, 2017). Assim, outra hipótese que poderia explicar nossos resultados é de que os neurônios Npas1+ do pálido ventral se projetam para a ATV, onde aumentam a atividade dessa região por meio da inibição dos interneurônios GABAérgicos.

6. CONCLUSÃO

Em conclusão, nossos resultados mostraram que a atividade dos neurônios Npas1+ do pálido ventral modula a susceptibilidade ao EDS, de modo que a ativação desses neurônios induz um aumento da susceptibilidade enquanto a sua inibição aumenta a resiliência ao EDS. A ativação dos neurônios Npas1+ do pálido ventral também aumenta os comportamentos relacionados à ansiedade no LCE e CA. Por outro lado, a ativação dos neurônios Npas1+ do pálido ventral que se projetam para o Acb induz preferência por lugar. Essa modulação pode estar relacionada a projeções para importantes regiões encefálicas que modulam a aversão e a motivação/recompensa, como a HbL, o Acb e a ATV.

REFERÊNCIAS

ABECASSIS, Z. A. et al. Npas1 + -Nkx2.1 + Neurons Are an Integral Part of the Cortico-pallido-cortical Loop. **The Journal of Neuroscience**, v. 40, n. 4, p. 743–768, 2020.

ABRAHAO, K. P.; LOVINGER, D. M. Classification of GABAergic neuron subtypes from the globus pallidus using wild-type and transgenic mice. **Journal of Physiology**, v. 596, n. 17, p. 4219–4235, 2018.

ADE, K. K. et al. Differential Tonic GABA Conductances in Striatal Medium Spiny Neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 5, p. 1185–1197, 2008.

AL-SAMHARI, M. M. et al. Possible involvement of the JAK/STAT signaling pathway in N-acetylcysteine-mediated antidepressant-like effects. **Experimental Biology and Medicine**, v. 0, p. 1–10, 2015.

ALMEIDA, J. et al. Effects of nitric oxide synthesis inhibitor or fluoxetine treatment on depression-like state and cardiovascular changes induced by chronic variable stress in rats. **Stress**, v. 18, n. 4, p. 462–474, 2015.

ALONSO, R. et al. Blockade of CRF1 or V1b receptors reverses stress-induced suppression of neurogenesis in a mouse model of depression. **Molecular Psychiatry**, v. 9, n. 3, p. 278–286, 2004.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**. 5. ed. Arlington: American Psychiatric Association, 2013.

AMSTADTER, A. B.; MYERS, J. M.; KENDLER, K. S. Psychiatric resilience: Longitudinal twin study. **British Journal of Psychiatry**, v. 205, n. 4, p. 275–280, 2014.

ARENT, C. O. et al. Synergist effects of n-acetylcysteine and deferoxamine treatment on behavioral and oxidative parameters induced by chronic mild stress in rats. **Neurochemistry International**, v. 61, n. 7, p. 1072–1080, 2012.

ARNONE, D. et al. Magnetic resonance imaging studies in unipolar depression: Systematic review and meta-regression analyses. **European Neuropsychopharmacology**, v. 22, n. 1, p. 1–16, 2012.

AUNE, D. et al. Resting heart rate and the risk of cardiovascular disease, total cancer, and all-cause mortality – A systematic review and dose–response meta-analysis of prospective studies. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular**

Diseases, v. 27, n. 6, p. 504–517, 2017.

BAGOT, R. C. et al. Ventral hippocampal afferents to the nucleus accumbens regulate susceptibility to depression. **Nature Communications**, v. 6, n. May, 2015.

BALLMAIER, M. et al. Anterior Cingulate, Gyrus Rectus, and Orbitofrontal Abnormalities in Elderly Depressed Patients: An MRI-Based Parcellation of the Prefrontal Cortex. **American Journal of Psychiatry**, v. 161, n. 1, p. 99–108, 2004.

BARMAN, S. M.; YATES, B. J. Deciphering the Neural Control of Sympathetic Nerve Activity: Status Report and Directions for Future Research. **Front Neurosci.**, v. 11, n. 1662– 453X (Linking), p. 730, 2017.

BEERE, P.; GLAGOV, S.; ZARINS, C. Retarding effect of lowered heart rate on coronary atherosclerosis. **Science**, v. 226, n. 4671, p. 180–182, 1984.

BERK, M. et al. The efficacy of adjunctive N-acetylcysteine in major depressive disorder: A double-blind, randomized, placebo-controlled trial. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 75, n. 6, p. 628–636, 2014.

BERTON, O. et al. Induction of deltaFosB in the Periaqueductal Gray by Stress Promotes Active Coping Responses. **Neuron**, v. 55, n. 2, p. 289–300, 2007.

BHAGWAGAR, Z.; HAFIZI, S.; COWEN, P. J. Increase in Concentration of Waking Salivary Cortisol in Recovered Patients With Depression. **American Journal of Psychiatry**, v. 160, n. 10, p. 1890–1891, 2003.

BHAGWAGAR, Z.; HAFIZI, S.; COWEN, P. J. Increased salivary cortisol after waking in depression. **Psychopharmacology**, v. 182, n. 1, p. 54–57, 2005.

BJÖRKQVIST, K. Social defeat as a stressor in humans. **Physiology & behavior**, v. 73, n. 3, p. 435–42, 2001.

BLANCHARD, R. J.; MCKITTRICK, C. R.; BLANCHARD, D. C. C. Animal models of social stress: effects on behavior and brain neurochemical systems. **Physiology & behavior**, v. 73, n. 3, p. 261–71, 2001.

BOWENS, N. et al. Lack of elevations in glucocorticoids correlates with dysphoria-like behavior after repeated social defeat. **Physiology & behavior**, v. 105, n. 4, p. 958–65, 2012.

BOYSON, C. O. et al. Prevention of social stress-escalated cocaine self-administration by CRF-R1 antagonist in the rat VTA. **Psychopharmacology**, v. 218, n. 1, p. 257–269, 2011.

BREMNER, J. D. et al. Reduced volume of orbitofrontal cortex in major depression. **Biological Psychiatry**, v. 51, n. 4, p. 273–279, 2002.

BRIDGES, R. et al. Thinking outside the cleft to understand synaptic activity: contribution of the cystine-glutamate antiporter (System xc-) to normal and pathological glutamatergic signaling. **Pharmacological reviews**, v. 64, n. 3, p. 780–802, 2012.

BROWN, R. M.; KUPCHIK, Y. M.; KALIVAS, P. W. The Story of Glutamate in Drug Addiction and of N -Acetylcysteine as a Potential Pharmacotherapy. **JAMA Psychiatry**, v. 70, n. 9, p. 895, 2013.

BURNS, S. M.; MICHAEL WYSS, J. The involvement of the anterior cingulate cortex in blood pressure control. **Brain Research**, v. 340, n. 1, p. 71–77, 1985.

CAREY, A. N. et al. Endogenous Opioid Activation Mediates Stress-Induced Deficits in Learning and Memory. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 13, p. 4293–4300, 2009.

CARNEVALI, L. et al. Antidepressant-like activity and cardioprotective effects of fatty acid amide hydrolase inhibitor URB694 in socially stressed Wistar Kyoto rats. **European Neuropsychopharmacology**, 2015.

CARVALHO, A. F. et al. N-Acetylcysteine Augmentation to Tranylcypromine in Treatment-Resistant Major Depression. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 33, n. 5, p. 719–720, 2013.

CATHOMAS, F. et al. Neurobiology of Resilience: Interface Between Mind and Body. **Biological Psychiatry**, v. 86, n. 6, p. 410–420, 2019.

CERQUEIRA, J. J. et al. The prefrontal cortex as a key target of the maladaptive response to stress. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 11, p. 2781–2787, 2007.

CERQUEIRA, J. J.; ALMEIDA, O. F. X.; SOUSA, N. The stressed prefrontal cortex. Left? Right! **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 22, n. 5, p. 630–638, 2008.

CHAKRABORTI, A.; GULATI, K.; RAY, A. Age related differences in stress-induced neurobehavioral responses in rats: Modulation by antioxidants and nitrenergic agents. **Behavioural Brain Research**, v. 194, n. 1, p. 86–91, 2008.

CHARLSON, F. et al. New WHO prevalence estimates of mental disorders in conflict settings: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet**, v. 394, n. 10194, p. 240–248, 2019.

CHURCHILL, L.; KALIVAS, P. W. A topographically organized gamma-aminobutyric acid projection from the ventral pallidum to the nucleus accumbens in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 345, n. 4, p. 579–595, 1994.

CICCHETTI, D.; ROGOSCH, F. A. Gene x environment interaction and resilience: Effects of child maltreatment and serotonin, corticotropin releasing

hormone, dopamine, and oxytocin genes. **Development and Psychopathology**, v. 24, n. 2, p. 411–427, 2012.

COHEN, S.; JANICKI-DEVERTS, D.; MILLER, G. E. Psychological Stress and Disease. **JAMA**, v. 298, n. 14, p. 1685, 2007.

COLE, S. L.; ROBINSON, M. J. F.; BERRIDGE, K. C. Optogenetic self-stimulation in the nucleus accumbens: D1 reward versus D2 ambivalence. **PLoS ONE**, v. 13, n. 11, p. 1–29, 2018.

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

CONRAD, C. D. et al. Chronic stress impairs rat spatial memory on the Y maze, and this effect is blocked by tianeptine treatment. **Behavioral Neuroscience**, v. 110, n. 6, p. 1321–1334, 1996.

CONRAD, C. D. et al. Sex differences in spatial and non-spatial Y-maze performance after chronic stress. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 79, n. 1, p. 32–40, 2003.

COSTA-CAMPOS, L. et al. Interactive effects of N-acetylcysteine and antidepressants. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 44, p. 125–130, 2013.

COSTA-FERREIRA, W. et al. Involvement of type 1 angiotensin II receptor (AT1) in cardiovascular changes induced by chronic emotional stress: Comparison between homotypic and heterotypic stressors. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, n. AUG, p. 1–13, 2016.

COSTA-FERREIRA, W.; GOMES-DE-SOUZA, L.; CRESTANI, C. C. AT2 and MAS (but not AT1) angiotensinergic receptors in the medial amygdaloid nucleus modulate the baroreflex activity in rats. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 471, n. 9, p. 1173–1182, 2019.

COSTA, N. S. et al. Functional lateralization of the medial prefrontal cortex in the modulation of anxiety in mice: Left or right? **Neuropharmacology**, v. 108, p. 82–90, 2016.

COSTOLI, T. et al. Effects of chronic psychosocial stress on cardiac autonomic responsiveness and myocardial structure in mice. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 286, n. 6, p. H2133-40, 2004.

COVINGTON, H. E. et al. Antidepressant Effect of Optogenetic Stimulation of

the Medial Prefrontal Cortex. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 48, p. 16082–16090, 2010.

CRESTANI, C. C. Emotional Stress and Cardiovascular Complications in Animal Models: A Review of the Influence of Stress Type. **Frontiers in Physiology**, v. 7, n. June, 2016.

CRESTANI, C. C. Adolescent vulnerability to cardiovascular consequences of chronic emotional stress: Review and perspectives for future research. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 74, p. 466–475, 2017.

CRUZ, F. C. et al. Adolescent vulnerability to cardiovascular consequences of chronic social stress: Immediate and long-term effects of social isolation during adolescence. **Developmental Neurobiology**, v. 76, n. 1, p. 34–46, 2016.

CUDNOCH-JEDRZEJEWSKA, A. et al. Angiotensin Converting Enzyme Inhibition Reduces Cardiovascular Responses to Acute Stress in Myocardially Infarcted and Chronically Stressed Rats. **BioMed Research International**, v. 2014, n. 1cv, p. 1–9, 2014.

CUSTODIS, F. et al. Heart rate contributes to the vascular effects of chronic mental stress: Effects on endothelial function and ischemic brain injury in mice. **Stroke**, v. 42, n. 6, p. 1742–1749, 2011.

CYGANKIEWICZ, I.; ZAREBA, W. Heart rate variability. *In*: **Handbook of Clinical Neurology**. 1. ed. [s.l.] Elsevier B.V., 2013. v. 117 379–393 p.

CZÉH, B. et al. Chronic social stress inhibits cell proliferation in the adult medial prefrontal cortex: hemispheric asymmetry and reversal by fluoxetine treatment. **Neuropsychopharmacology**, v. 32, n. 7, p. 1490–503, 2007.

CZÉH, B. et al. Chronic stress-induced cellular changes in the medial prefrontal cortex and their potential clinical implications: Does hemisphere location matter? **Behavioural Brain Research**, v. 190, n. 1, p. 1–13, 2008.

DEAN, O.; GIORLANDO, F.; BERK, M. N-acetylcysteine in psychiatry: current therapeutic evidence and potential mechanisms of action. **Journal of Psychiatry & Neuroscience**, v. 36, n. 2, p. 78–86, 2011.

DHABHAR, F. S. Effects of stress on immune function: the good, the bad, and the beautiful. **Immunologic Research**, v. 58, n. 2–3, p. 193–210, 2014.

DILLON, D. G.; PIZZAGALLI, D. A. Mechanisms of Memory Disruption in Depression. **Trends in Neurosciences**, v. xx, p. 1–13, 2018.

DONAHUE, R. J. et al. Effects of Striatal Δ FosB Overexpression and Ketamine

on Social Defeat Stress-Induced Anhedonia in Mice. **Biological psychiatry**, v. 76, n. 7, p. 1–9, 2014.

DUARTE, J. O. et al. Stress Vulnerability During Adolescence. **Psychosomatic Medicine**, v. 77, n. 2, p. 186–199, 2015.

DUARTE, J. O.; PLANETA, C. S.; CRESTANI, C. C. Immediate and long-term effects of psychological stress during adolescence in cardiovascular function: Comparison of homotypic vs heterotypic stress regimens. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 40, p. 52–59, 2015.

DULKA, B. N. et al. Chemogenetic activation of an infralimbic cortex to basolateral amygdala projection promotes resistance to acute social defeat stress. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 6884, 2020.

EAGLE, A. L. et al. Circuit-specific hippocampal Δ FosB underlies resilience to stress-induced social avoidance. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, 2020.

ENOCH, M.-A. The role of early life stress as a predictor for alcohol and drug dependence. **Psychopharmacology**, v. 214, n. 1, p. 17–31, 2011.

ERBEL-SIELER, C. et al. Behavioral and regulatory abnormalities in mice deficient in the NPAS1 and NPAS3 transcription factors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 37, p. 13648–13653, 2004.

ESKILDSEN, A. et al. Work-related stress is associated with impaired neuropsychological test performance: a clinical cross-sectional study. **Stress**, v. 18, n. 2, p. 198–207, 2015.

FAGET, L. et al. Opponent control of behavioral reinforcement by inhibitory and excitatory projections from the ventral pallidum. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 849, 2018.

FANG, Y. et al. Genomic prediction of depression risk and resilience under stress. **Nature Human Behaviour**, v. 4, n. 1, p. 111–118, 2020.

FARHANG, S. et al. Asymmetrical expression of BDNF and NTRK3 genes in frontoparietal cortex of stress-resilient rats in an animal model of depression. **Synapse**, v. 68, n. 9, p. 387–393, 2014.

FARIA, M. P.; LAVERDE, C. F.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Anxiogenesis induced by social defeat in male mice: Role of nitric oxide, NMDA, and CRF1 receptors in the medial prefrontal cortex and BNST. **Neuropharmacology**, v. 166, n. March 2019, p. 107973, 2020.

FEDER, A. et al. The Biology of Human Resilience: Opportunities for Enhancing

Resilience across the Lifespan. **Biological Psychiatry**, 2019.

FELDMAN, R. What is resilience: an affiliative neuroscience approach. **World Psychiatry**, v. 19, n. 2, p. 132–150, 2020.

FERNANDES, J.; GUPTA, G. L. N-acetylcysteine attenuates neuroinflammation associated depressive behavior induced by chronic unpredictable mild stress in rat. **Behavioural Brain Research**, v. 364, n. January, p. 356–365, 2019.

FERREIRA, F. F. et al. Antidepressant-like effects of N-acetyl-L-cysteine in rats. **Behavioural Pharmacology**, v. 19, n. 7, p. 747–750, 2008.

FORTALEZA, E. A. T. et al. The medial amygdaloid nucleus modulates the baroreflex activity in conscious rats. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 193, p. 44–50, 2015.

FOX, K. et al. Heart rate is a prognostic risk factor for myocardial infarction: A post hoc analysis in the PERFORM (Prevention of cerebrovascular and cardiovascular Events of ischemic origin with teluroban in patients with a history of ischemic stroke or transient ischemic attack). **International Journal of Cardiology**, v. 168, n. 4, p. 3500–3505, 2013.

FOX, M. E. et al. Dendritic remodeling of D1 neurons by RhoA/Rho-kinase mediates depression-like behavior. **Molecular Psychiatry**, v. 25, n. 5, p. 1022–1034, 2020.

FOX, M. E.; LOBO, M. K. The molecular and cellular mechanisms of depression: a focus on reward circuitry. **Molecular Psychiatry**, 2019.

FRANCIS, T. C. et al. Nucleus accumbens medium spiny neuron subtypes mediate depression-related outcomes to social defeat stress. **Biological Psychiatry**, v. 77, n. 3, p. 212–222, 2015.

FRANCIS, T. C.; LOBO, M. K. Emerging Role for Nucleus Accumbens Medium Spiny Neuron Subtypes in Depression. **Biological Psychiatry**, v. 81, n. 8, p. 645–653, 2017.

FRIJTAG, J. C. VON et al. Chronic imipramine treatment partially reverses the long-term changes of hippocampal synaptic plasticity in socially stressed rats. **Neuroscience Letters**, v. 309, n. 3, p. 153–156, 2001.

FRYSZTAK, R. J.; NEAFSEY, E. J. The effect of medial frontal cortex lesions on cardiovascular conditioned emotional responses in the rat. **Brain Research**, v. 643, n. 1–2, p. 181–193, 1994.

FULLERTON, C. S. et al. Posttraumatic Stress Disorder, Depression, and

Alcohol and Tobacco Use in Public Health Workers After the 2004 Florida Hurricanes. **Disaster Medicine and Public Health Preparedness**, v. 7, n. 1, p. 89–95, 2013.

GAINOTTI, G. Emotional Behavior and Hemispheric Side of the Lesion. **Cortex**, v. 8, n. 1, p. 41–55, 1972.

GALLO, E. F. et al. Accumbens dopamine D2 receptors increase motivation by decreasing inhibitory transmission to the ventral pallidum. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 2018.

GANGAROSSA, G. et al. Distribution and compartmental organization of GABAergic medium-sized spiny neurons in the mouse nucleus accumbens. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 7, n. February, p. 1–20, 2013.

GLAJCH, K. E. et al. Npas1+ Pallidal Neurons Target Striatal Projection Neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 20, p. 5472–5488, 2016.

GOLDEN, S. A. et al. A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice. **Nature Protocols**, v. 6, n. 8, p. 1183–1191, 2011.

GOMES-DE-SOUZA, L. et al. Involvement of endocannabinoid neurotransmission in the bed nucleus of stria terminalis in cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. **British Journal of Pharmacology**, p. 2833–2844, 2016.

GOMEZ, J. L. et al. Chemogenetics revealed: DREADD occupancy and activation via converted clozapine. **Science**, v. 357, n. 6350, p. 503–507, 2017.

GONZALEZ, P.; MARTINEZ, K. G. The Role of Stress and Fear in the Development of Mental Disorders. **Psychiatric Clinics of North America**, v. 37, n. 4, p. 535–546, 2014.

GRASSI, G. et al. Baroreflex Function in Hypertension: Consequences for Antihypertensive Therapy. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 48, n. 6, p. 407–415, 2006.

GRESSIER, F.; CALATI, R.; SERRETTI, A. 5-HTTLPR and gender differences in affective disorders: A systematic review. **Journal of Affective Disorders**, v. 190, p. 193–207, 2016.

GRIPPO, A. J. et al. The Effects of Chronic Fluoxetine Treatment on Chronic Mild Stress-Induced Cardiovascular Changes and Anhedonia. **Biological Psychiatry**, v. 59, n. 4, p. 309–316, 2006.

GRIPPO, A. J. et al. Social Isolation Disrupts Autonomic Regulation of the Heart and Influences Negative Affective Behaviors. **Biological Psychiatry**, v. 62, n. 10, p. 1162–1170, 2007.

GRIPPO, A. J. et al. Cardiac dysfunction and hypothalamic activation during a social crowding stressor in prairie voles. **Autonomic Neuroscience**, v. 156, n. 1–2, p. 44–50, 2010.

GRIPPO, A. J. et al. 24-Hour Autonomic Dysfunction and Depressive Behaviors in an Animal Model of Social Isolation: Implications for the Study of Depression and Cardiovascular Disease. **Psychosomatic Medicine**, v. 73, n. 1, p. 59–66, 2011.

GRIPPO, A. J.; BELTZ, T. G.; JOHNSON, A. K. Behavioral and cardiovascular changes in the chronic mild stress model of depression. **Physiology & Behavior**, v. 78, n. 4–5, p. 703–710, 2003.

GRIPPO, A. J.; MOFFITT, J. A.; JOHNSON, A. K. Cardiovascular alterations and autonomic imbalance in an experimental model of depression. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 282, n. 5, p. R1333–R1341, 2002.

GRIPPO, A. J.; MOFFITT, J. A.; JOHNSON, A. K. Evaluation of baroreceptor reflex function in the chronic mild stress rodent model of depression. **Psychosomatic medicine**, v. 70, n. 4, p. 435–43, 2008.

GROENEWEGEN, H. J.; BERENDSE, H. W.; HABER, S. N. Organization of the Output of the Ventral Striatopallidal System in the Rat - Ventral Pallidal Efferents. **Neuroscience**, v. 57, n. 1, p. 113–142, 1993.

HAMILTON, P. J. et al. Cell-Type-Specific Epigenetic Editing at the Fosb Gene Controls Susceptibility to Social Defeat Stress. **Neuropsychopharmacology**, v. 43, n. 2, p. 272–284, 2017.

HAMMELS, C. et al. Defeat stress in rodents: From behavior to molecules. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 59, p. 111–140, 2015.

HAN, M. H.; NESTLER, E. J. Neural Substrates of Depression and Resilience. **Neurotherapeutics**, v. 14, n. 3, p. 677–686, 2017.

HANKIN, B. L. et al. Differential susceptibility in youth: Evidence that 5-HTTLPR x positive parenting is associated with positive affect for better and worse. **Translational Psychiatry**, v. 1, n. August, p. 1–7, 2011.

HARIRI, A. R.; HOLMES, A. Finding translation in stress research. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 10, p. 1347–1352, 2015.

HARVEY, P. W.; SUTCLIFFE, C. Adrenocortical hypertrophy: Establishing cause and toxicological significance. **Journal of Applied Toxicology**, v. 30, n. 7, p. 617–626, 2010.

HAZARI, M. S. et al. Exposure to Intermittent Noise Exacerbates the Cardiovascular Response of Wistar–Kyoto Rats to Ozone Inhalation and Arrhythmogenic Challenge. **Cardiovascular Toxicology**, v. 21, n. 4, p. 336–348, 2021.

HERNANDEZ, V. M. et al. Parvalbumin+ Neurons and Npas1+ Neurons Are Distinct Neuron Classes in the Mouse External Globus Pallidus. **Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 34, p. 11830–11847, 2015.

HIGHLAND, J. N. et al. Group II metabotropic glutamate receptor blockade promotes stress resilience in mice. **Neuropsychopharmacology**, n. October 2018, p. 1–9, 2019.

HOLSBOER, F. The Corticosteroid Receptor Hypothesis of Depression. **Neuropsychopharmacology**, v. 23, n. 5, p. 477–501, 2000.

HOOFF, R. H. M. VAN et al. Heart rate lowering treatment leads to a reduction in vulnerable plaque features in atherosclerotic rabbits. **PLOS ONE**, v. 12, n. 6, p. e0179024, 2017.

HOOVER, W. B.; VERTES, R. P. Projections of the medial orbital and ventral orbital cortex in the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 519, n. 18, p. 3766–3801, 2011.

HUGHES, K. et al. The effect of multiple adverse childhood experiences on health: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Public Health**, v. 2, n. 8, p. e356–e366, 2017.

HUHMANN, K. L. Social conflict models: Can they inform us about human psychopathology? **Hormones and Behavior**, v. 50, n. 4, p. 640–646, 2006.

HUNT, A. J. et al. Paraventricular hypothalamic and amygdalar CRF neurons synapse in the external globus pallidus. **Brain Structure and Function**, v. 223, n. 6, p. 2685–2698, 2018.

IBARGUEN-VARGAS, Y. et al. Multifaceted strain-specific effects in a mouse model of depression and of antidepressant reversal. **Psychoneuroendocrinology**, v. 33, n. 10, p. 1357–1368, 2008.

ISSLER, O.; NESTLER, E. J. The molecular basis for sex differences in depression susceptibility. **Current Opinion in Behavioral Sciences**, v. 23, p. 1–6, 2018.

JAGGI, A. S. et al. A review on animal models for screening potential anti-stress agents. **Neurological sciences**, v. 32, n. 6, p. 993–1005, 2011.

JAIN, A. K. Data clustering: 50 years beyond K-means. **Pattern Recognition Letters**, v. 31, n. 8, p. 651–666, 2010.

JAMES, S. L. et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 Diseases and Injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **The Lancet**, v. 392, n. 10159, p. 1789–1858, 2018.

JANAK, P. H.; TYE, K. M. From circuits to behaviour in the amygdala. **Nature**, v. 517, n. 7534, p. 284–292, 2015.

KALIN, N. H. Mechanisms underlying the early risk to develop anxiety and depression: A translational approach. **European Neuropsychopharmacology**, v. 27, n. 6, p. 543–553, 2017.

KAPLAN, J. R. et al. Inhibition of coronary atherosclerosis by propranolol in behaviorally predisposed monkeys fed an atherogenic diet. **Circulation**, v. 76, n. 6, p. 1364–1372, 1987.

KHAN, H. et al. Resting heart rate and risk of incident heart failure: three prospective cohort studies and a systematic meta-analysis. **Journal of the American Heart Association**, v. 4, n. 1, p. e001364, 2015.

KHAN, H. A. et al. Mapping excessive “disgust” in the brain: Ventral pallidum inactivation recruits distributed circuitry to make sweetness “disgusting”. **Cognitive, Affective, & Behavioral Neuroscience**, v. 20, n. 1, p. 141–159, 2020.

KIM, E. J.; PELLMAN, B.; KIM, J. J. Stress effects on the hippocampus: A critical review. **Learning and Memory**, v. 22, n. 9, p. 411–416, 2015.

KIM, J.-R. et al. Heart Rate and Subsequent Blood Pressure in Young Adults : The CARDIA Study. **Hypertension**, v. 33, n. 2, p. 640–646, 1999.

KISHI, T. et al. N-acetylcysteine as an adjunctive treatment for bipolar depression and major depressive disorder: a systematic review and meta-analysis of double-blind, randomized placebo-controlled trials. **Psychopharmacology**, v. 237, n. 11, p. 3481–3487, 2020.

KIVIMÄKI, M.; STEPTOE, A. Effects of stress on the development and progression of cardiovascular disease. **Nature Reviews Cardiology**, v. 15, n. 4, p. 215–229, 2018.

KLEEN, J. K. et al. Chronic stress impairs spatial memory and motivation for reward without disrupting motor ability and motivation to explore. **Behavioral Neuroscience**, v. 120, n. 4, p. 842–851, 2006.

KLEIGER, R. E.; STEIN, P. K.; BIGGER, J. T. Heart Rate Variability: Measurement and Clinical Utility. **Annals of Noninvasive Electrocardiology**, v. 10, n. 1, p. 88–101, 2005.

KLITENICK, M. A. et al. Topography and functional role of dopaminergic projections from the ventral mesencephalic tegmentum to the ventral pallidum. **Neuroscience**, v. 50, n. 2, p. 371–386, 1992.

KLOET, E. R. DE; JOËLS, M.; HOLSBOER, F. Stress and the brain: from adaptation to disease. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 6, n. 6, p. 463–75, 2005.

KNOWLAND, D. et al. Distinct Ventral Pallidal Neural Populations Mediate Separate Symptoms of Depression. **Cell**, v. 170, n. 2, p. 284- 297.e18, 2017.

KNOWLAND, D.; LIM, B. K. Circuit-based frameworks of depressive behaviors: The role of reward circuitry and beyond. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 174, p. 42–52, 2018.

KOVÁCS, K. J. c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. **Neurochemistry International**, v. 33, n. 4, p. 287–297, 1998.

KRISHNAN, V. et al. Molecular Adaptations Underlying Susceptibility and Resistance to Social Defeat in Brain Reward Regions. **Cell**, v. 131, n. 2, p. 391–404, 2007.

KRISHNAN, V. Defeating the fear: New insights into the neurobiology of stress susceptibility. **Experimental Neurology**, v. 261, p. 412–416, 2014.

KRUK, J. et al. Psychological Stress and Cellular Aging in Cancer: A Meta-Analysis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, 2019.

KUMMER, K. K. et al. Differences in social interaction- vs. cocaine reward in mouse vs. rat. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 8, n. October, p. 363, 2014.

KUO, H.; CHANG, H. T. Ventral pallido-striatal pathway in the rat brain: A light and electron microscopic study. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 321, n. 4, p. 626–636, 1992.

KUPCHIK, Y. M. et al. Coding the direct/indirect pathways by D1 and D2 receptors is not valid for accumbens projections. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 9, p. 1230–1232, 2015.

LACERDA, A. L. T. et al. Anatomic evaluation of the orbitofrontal cortex in major depressive disorder. **Biological Psychiatry**, v. 55, n. 4, p. 353–358, 2004.

LAINE, M. A. et al. Brain activation induced by chronic psychosocial stress in mice. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 15061, 2017.

LAVRETSKY, H. et al. Neuroanatomical Characteristics of Geriatric Apathy and Depression: A Magnetic Resonance Imaging Study. **The American Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 15, n. 5, p. 386–394, 2007.

LAW, J. et al. Decline of hippocampal stress reactivity and neuronal ensemble coherence in a mouse model of depression. **Psychoneuroendocrinology**, v. 67, p. 113–123, 2016.

LEE, E. et al. Left brain cortical activity modulates stress effects on social behavior. **Scientific reports**, v. 5, p. 13342, 2015.

LEE, N. S.; BEERY, A. K. Neural Circuits Underlying Rodent Sociality: A Comparative Approach. *In*: **Brain Imaging in Behavioral Neuroscience**. [s.l.: s.n.]. 211–238 p.

LEHMANN, M. L. et al. The behavioral sequelae of social defeat require microglia and are driven by oxidative stress in mice. **Journal of Neuroscience**, v. 39, n. 28, p. 5594–5605, 2019.

LEW, B. et al. Associations between depression, anxiety, stress, hopelessness, subjective well-being, coping styles and suicide in Chinese university students. **PloS one**, v. 14, n. 7, p. e0217372, 2019.

LI, Z. et al. Cell-Type-Specific Afferent Innervation of the Nucleus Accumbens Core and Shell. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 12, n. October, p. 1–16, 2018.

LISCHKE, A. et al. Heart rate variability is associated with psychosocial stress in distinct social domains. **Journal of Psychosomatic Research**, 2018.

LOBO, M. K. et al. FosB Induction in Striatal Medium Spiny Neuron Subtypes in Response to Chronic Pharmacological, Emotional, and Optogenetic Stimuli. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 47, p. 18381–18395, 2013.

LOMBARDI, F. Heart rate variability and its sympatho-vagal modulation. **Cardiovascular Research**, v. 32, n. 2, p. 208–216, 1996.

LUO, X.; QIAO, L.; CHE, X. Self-compassion Modulates Heart Rate Variability and Negative Affect to Experimentally Induced Stress. **Mindfulness**, 2018.

MA, T. P.; GEYER, H. L. The Basal Nuclei. *In*: **Fundamental Neuroscience for Basic and Clinical Applications**. [s.l.] Elsevier, 2018. 377-393.e1 p.

MANTHEY, L. et al. Antidepressant use and salivary cortisol in depressive and anxiety disorders. **European Neuropsychopharmacology**, v. 21, n. 9, p. 691–699, 2011.

MASCARENHAS, D. C.; GOMES, K. S.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Anxiogenic-

like effect induced by TRPV1 receptor activation within the dorsal periaqueductal gray matter in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 250, p. 308–315, 2013.

MASSIE, A. et al. Main path and byways: Non-vesicular glutamate release by system xc⁻ as an important modifier of glutamatergic neurotransmission. **Journal of Neurochemistry**, v. 135, n. 6, p. 1062–1079, 2015.

MCCRATY, R.; SHAFFER, F. Heart Rate Variability: New Perspectives on Physiological Mechanisms, Assessment of Self-regulatory Capacity, and Health Risk. **Global Advances in Health and Medicine**, v. 4, n. 1, p. 46–61, 2015.

MCEWEN, B. S. Brain on stress: How the social environment gets under the skin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. Supplement_2, p. 17180–17185, 2012.

MCEWEN, B. S.; AKIL, H. Revisiting the Stress Concept: Implications for Affective Disorders. **The Journal of Neuroscience**, v. 40, n. 1, p. 12–21, 2020.

MCEWEN, B. S.; GRAY, J. D.; NASCA, C. Recognizing resilience: Learning from the effects of stress on the brain. **Neurobiology of Stress**, v. 1, p. 1–11, 2015.

MCEWEN, B. S.; KARATSOREOS, I. N. Resilience and vulnerability: a neurobiological perspective. **F1000Prime Reports**, v. 5, n. May, 2013.

MCKLVEEN, J. M.; MYERS, B.; HERMAN, J. P. The Medial Prefrontal Cortex: Coordinator of Autonomic, Neuroendocrine and Behavioural Responses to Stress. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 27, n. 6, p. 446–456, 2015.

MCNEAL, N. et al. Disruption of social bonds induces behavioral and physiological dysregulation in male and female prairie voles. **Autonomic Neuroscience**, v. 180, n. 1, p. 9–16, 2014.

MERZ, C. N. B. et al. Psychosocial Stress and Cardiovascular Disease: Pathophysiological Links. **Behavioral Medicine**, v. 27, n. 4, p. 141–147, 2002.

MILLER, J. M. et al. Anhedonia After a Selective Bilateral Lesion of the Globus Pallidus. **American Journal of Psychiatry**, v. 163, n. 5, p. 786–788, 2006.

MOCELIN, R. et al. N-acetylcysteine prevents stress-induced anxiety behavior in zebrafish. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 139, p. 121–126, 2015.

MOCELIN, R. et al. N-Acetylcysteine Reverses Anxiety and Oxidative Damage Induced by Unpredictable Chronic Stress in Zebrafish. **Molecular Neurobiology**, p. 1–8, 2018.

MONKUL, E. S. et al. Fronto-limbic brain structures in suicidal and non-suicidal female patients with major depressive disorder. **Molecular Psychiatry**, v. 12, n. 4, p.

360–366, 2007.

MORAIS-SILVA, G. et al. Cardiovascular outcomes related to social defeat stress: New insights from resilient and susceptible rats. **Neurobiology of Stress**, v. 11, n. June, p. 100181, 2019.

MORAIS-SILVA, G.; ALVES, G. C.; MARIN, M. T. N-acetylcysteine treatment blocks the development of ethanol-induced behavioural sensitization and related Δ FosB alterations. **Neuropharmacology**, v. 110, p. 135–142, 2016.

MOUSSAWI, K.; KALIVAS, P. W.; LEE, J. W. Abstinence From Drug Dependence After Bilateral Globus Pallidus Hypoxic-Ischemic Injury. **Biological Psychiatry**, v. 80, n. 9, p. e79–e80, 2016.

MUL, J. D. et al. Voluntary wheel running promotes resilience to chronic social defeat stress in mice: a role for nucleus accumbens Δ FosB. **Neuropsychopharmacology**, v. 43, n. 9, p. 1934–1942, 2018.

MURROUGH, J. W. et al. Reduced ventral striatal/ventral pallidal serotonin1B receptor binding potential in major depressive disorder. **Psychopharmacology**, v. 213, n. 2–3, p. 547–553, 2011.

MURROUGH, J. W.; ABDALLAH, C. G.; MATHEW, S. J. Targeting glutamate signalling in depression: Progress and prospects. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 16, n. 7, p. 472–486, 2017.

MUSAZZI, L.; TRECCANI, G.; POPOLI, M. Functional and Structural Remodeling of Glutamate Synapses in Prefrontal and Frontal Cortex Induced by Behavioral Stress. **Frontiers in Psychiatry**, v. 6, n. April, 2015.

MUTLUER, T. et al. Lateralization of Neurobiological Response in Adolescents with Post-Traumatic Stress Disorder Related to Severe Childhood Sexual Abuse: the Tri-Modal Reaction (T-MR) Model of Protection. **Journal of Trauma & Dissociation**, v. 19, n. 1, p. 108–125, 2018.

MYERS, B. Corticolimbic regulation of cardiovascular responses to stress. **Physiology and Behavior**, v. 172, p. 49–59, 2017.

NALIVAICO, E. Animal models of psychogenic cardiovascular disorders: what we can learn from them and what we cannot. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 38, n. 2, p. 115–125, 2011.

NAM, H. et al. Reduced nucleus accumbens enkephalins underlie vulnerability to social defeat stress. **Neuropsychopharmacology**, v. 44, n. 11, p. 1876–1885, 2019.

NASCA, C. et al. Mind the gap: glucocorticoids modulate hippocampal glutamate tone underlying individual differences in stress susceptibility. **Molecular Psychiatry**, v. 20, n. 6, p. 755–763, 2014.

NASCA, C. et al. Role of the Astroglial Glutamate Exchanger xCT in Ventral Hippocampus in Resilience to Stress. **Neuron**, v. 96, n. 2, p. 402- 413.e5, 2017.

NESTLER, E. J. Δ FosB: A transcriptional regulator of stress and antidepressant responses. **European Journal of Pharmacology**, v. 753, p. 66–72, 2015.

NESTLER, E. J.; KELZ, M. B.; CHEN, J. DeltaFosB: a molecular mediator of long-term neural and behavioral plasticity. **Brain research**, v. 835, n. 1, p. 10–7, 1999.

NOBREGA-PEREIRA, S. et al. Origin and Molecular Specification of Globus Pallidus Neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 8, p. 2824–2834, 2010.

NOLTE, C. H. et al. Impact of heart rate on admission on mortality and morbidity in acute ischaemic stroke patients - results from VISTA. **European Journal of Neurology**, v. 23, n. 12, p. 1750–1756, 2016.

OCKLENBURG, S. et al. Stress and laterality – The comparative perspective. **Physiology & Behavior**, v. 164, p. 321–329, 2016.

OHNISHI, Y. N. et al. FosB is essential for the enhancement of stress tolerance and antagonizes locomotor sensitization by Δ fosB. **Biological Psychiatry**, v. 70, n. 5, p. 487–495, 2011.

ONYEWUENYI, I. C. et al. Basal ganglia morphology links the metabolic syndrome and depressive symptoms. **Physiology & Behavior**, v. 123, p. 214–222, 2014.

ORSETTI, M. et al. Modification of spatial recognition memory and object discrimination after chronic administration of haloperidol, amitriptyline, sodium valproate or olanzapine in normal and anhedonic rats. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 10, n. 03, p. 345, 2007.

PAGLIUSI JR., M. O.; SARTORI, C. Social Defeat Stress (SDS) in Mice: Using Swiss Mice as Resident. **BIO-PROTOCOL**, v. 9, n. 6, 2019.

PALATINI, P. et al. Heart rate as a predictor of development of sustained hypertension in subjects screened for stage 1 hypertension: The HARVEST Study. **Journal of Hypertension**, v. 24, n. 9, p. 1873–1880, 2006.

PALMFELDT, J. et al. Protein biomarkers of susceptibility and resilience to stress in a rat model of depression. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 74, p. 87–95, 2016.

PARATI, G.; RIENZO, M. DI; MANCIA, G. How to measure baroreflex sensitivity. **Journal of Hypertension**, v. 18, n. 1, p. 7–19, 2000.

PATKI, G. et al. Depression, anxiety-like behavior and memory impairment are associated with increased oxidative stress and inflammation in a rat model of social stress. **Brain Research**, v. 1539, p. 73–86, 2013.

PATON, J. F. R. et al. The yin and yang of cardiac autonomic control: Vago-sympathetic interactions revisited. **Brain Research Reviews**, v. 49, n. 3, p. 555–565, 2005.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. B. J. **The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates**. 2. ed. California: Academic Press, 2001.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates - The new coronal set**. 5. ed. San Diego: Academic Press, 2005.

PERROTTI, L. I. et al. Induction of deltaFosB in reward-related brain structures after chronic stress. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 24, n. 47, p. 10594–602, 2004.

PESARICO, A. P. et al. Brain-derived neurotrophic factor signaling plays a role in resilience to stress promoted by isoquinoline in defeated mice. **Journal of Psychiatric Research**, v. 94, p. 78–87, 2017.

PITTARAS, A. M. et al. Heart rate at rest, exercise capacity, and mortality risk in veterans. **American Journal of Cardiology**, v. 112, n. 10, p. 1605–1609, 2013.

PLANCHEZ, B.; SURGET, A.; BELZUNG, C. Animal models of major depression: drawbacks and challenges. **Journal of Neural Transmission**, v. 126, n. 11, p. 1383–1408, 2019.

POPOLI, M. et al. The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 13, n. 1, p. 22–37, 2011.

PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie**, v. 229, n. 2, p. 327–36, 1977.

POTHION, S. et al. Strain differences in sucrose preference and in the consequences of unpredictable chronic mild stress. **Behavioural Brain Research**, v. 155, n. 1, p. 135–146, 2004.

PRYCE, C. R.; FUCHS, E. Chronic psychosocial stressors in adulthood: Studies in mice, rats and tree shrews. **Neurobiology of Stress**, v. 6, p. 94–103, 2017.

QIU, M. et al. Admission Heart Rate Predicts Poor Outcomes in Acute Intracerebral Hemorrhage: The Intensive Blood Pressure Reduction in Acute Cerebral Hemorrhage Trial Studies. **Stroke**, v. 47, n. 6, p. 1479–1485, 2016.

REIS, D. G. DOS et al. Role of the autonomic nervous system and baroreflex in stress-evoked cardiovascular responses in rats. **Stress**, v. 17, n. 4, p. 362–372, 2014.

REPPUCCI, C. J. et al. Wistar rats and C57BL/6 mice differ in their motivation to seek social interaction versus food in the Social versus Food Preference Test. **Physiology and Behavior**, v. 227, n. June, p. 113162, 2020.

REUL, J. M. H. M. et al. Glucocorticoids, epigenetic control and stress resilience. **Neurobiology of Stress**, v. 1, p. 44–59, 2015.

RICHMAN, L. S. et al. Discrimination, dispositions, and cardiovascular responses to stress. **Health Psychology**, v. 26, n. 6, p. 675–683, 2007.

RIGA, D. et al. Temporal profiling of depression vulnerability in a preclinical model of sustained depression. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 8570, 2017.

RITTER, O.; NEYSES, L. The molecular basis of myocardial hypertrophy and heart failure. **Trends in Molecular Medicine**, v. 9, n. 7, p. 313–321, 2003.

ROBINSON, R. G. et al. Mood disorders in stroke patients: importance of location of lesion. **Brain**, v. 107, n. 1, p. 81–93, 1984.

ROBINSON, R. G.; SZETELA, B. Mood change following left hemispheric brain injury. **Annals of Neurology**, v. 9, n. 5, p. 447–453, 1981.

ROBISON, A. J. et al. Fluoxetine Epigenetically Alters the CaMKII α Promoter in Nucleus Accumbens to Regulate Δ FosB Binding and Antidepressant Effects. **Neuropsychopharmacology**, v. 39, n. 5, p. 1178–1186, 2014.

ROOT, D. H. et al. The ventral pallidum: Subregion-specific functional anatomy and roles in motivated behaviors. **Progress in Neurobiology**, v. 130, p. 29–70, 2015.

ROSENGREN, A. et al. Association of psychosocial risk factors with risk of acute myocardial infarction in 11 119 cases and 13 648 controls from 52 countries (the INTERHEART study): Case-control study. **Lancet**, v. 364, n. 9438, p. 953–962, 2004.

ROTH, B. L. DREADDs for Neuroscientists. **Neuron**, v. 89, n. 4, p. 683–694, 2016.

RUFFLE, J. K. Molecular neurobiology of addiction: what's all the (Δ)FosB about? **The American Journal of Drug and Alcohol Abuse**, v. 40, n. 6, p. 428–437, 2014.

RUSSO, S. J.; NESTLER, E. J. The brain reward circuitry in mood disorders.

Nature Reviews Neuroscience, v. 14, n. 9, p. 609–625, 2013.

SALGIRLI DEMIRBAS, Y. et al. Functional cerebral asymmetry in dogs living under different environmental conditions. **Behavioural Processes**, v. 165, n. May, p. 4–8, 2019.

SAMAK, M. et al. Cardiac Hypertrophy: An Introduction to Molecular and Cellular Basis. **Medical Science Monitor Basic Research**, v. 22, p. 75–79, 2016.

SAMUNI, Y. et al. The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1830, n. 8, p. 4117–4129, 2013.

SANACORA, G.; TRECCANI, G.; POPOLI, M. Towards a glutamate hypothesis of depression. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 63–77, 2012.

SANTOS, P. et al. Anxiolytic properties of N -acetylcysteine in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 317, p. 461–469, 2017.

SCHARF, S. H.; SCHMIDT, M. V. Animal models of stress vulnerability and resilience in translational research. **Current Psychiatry Reports**, v. 14, n. 2, p. 159–165, 2012.

SCHMIDT, M. V. et al. High susceptibility to chronic social stress is associated with a depression-like phenotype. **Psychoneuroendocrinology**, v. 35, n. 5, p. 635–643, 2010.

SCOFIELD, M. D. et al. The Nucleus Accumbens: Mechanisms of Addiction across Drug Classes Reflect the Importance of Glutamate Homeostasis. **Pharmacological Reviews**, v. 68, n. 3, p. 816–871, 2016.

SELYE, H. A Syndrome produced by Diverse Nocuous Agents. **Nature**, v. 138, n. 3479, p. 32–32, 1936.

SELYE, H. **The stress of life**. New York: Mcgraw-Hill, 1956.

SÉVOZ-COUCHE, C. et al. Involvement of the dorsomedial hypothalamus and the nucleus tractus solitarii in chronic cardiovascular changes associated with anxiety in rats. **The Journal of Physiology**, v. 591, n. 7, p. 1871–1887, 2013.

SGOIFO, A. et al. Autonomic dysfunction and heart rate variability in depression. **Stress**, v. 18, n. 3, p. 343–352, 2015.

SGOIFO, A.; CARNEVALI, L.; GRIPPO, A. J. The socially stressed heart. Insights from studies in rodents. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 39, p. 51–60, 2014.

SILVA, R. et al. Mapping cellular gains and losses in the postnatal dentate

gyrus: Implications for psychiatric disorders. **Experimental Neurology**, v. 200, n. 2, p. 321–331, 2006.

SKIRZEWSKI, M. et al. Enhanced GABAergic tone in the ventral pallidum: Memory of unpleasant experiences? **Neuroscience**, v. 196, p. 131–146, 2011.

SMAGA, I. et al. N-acetylcysteine possesses antidepressant-like activity through reduction of oxidative stress: Behavioral and biochemical analyses in rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 39, n. 2, p. 280–287, 2012.

SMITH, K. S. et al. Ventral pallidum roles in reward and motivation. **Behavioural Brain Research**, v. 196, n. 2, p. 155–167, 2009.

SMOLINSKY, A. N. et al. Analysis of Grooming Behavior and Its Utility in Studying Animal Stress, Anxiety, and Depression. *In*: GOULD, T. D. (ED). **Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice**. 1. ed. New York: Humana Press, 2009. 21–36 p.

SOARES-CUNHA, C. et al. Reappraising striatal D1- and D2-neurons in reward and aversion. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 68, p. 370–386, 2016.

SOARES-CUNHA, C. et al. Nucleus Accumbens Microcircuit Underlying D2-MSN-Driven Increase in Motivation. **Eneuro**, v. 5, n. 2, p. ENEURO.0386-18.2018, 2018.

SPASOJEVIC, N. et al. Hippocampal asymmetry in expression of catecholamine synthesizing enzyme and transporters in socially isolated rats. **Neuroendocrinology Letters**, v. 33, n. 6, p. 631–635, 2012.

SPASOJEVIC, N.; JOVANOVIC, P.; DRONJAK, S. Molecular basis of chronic stress-induced hippocampal lateral asymmetry in rats and impact on learning and memory. **Acta Physiologica Hungarica**, v. 100, n. 4, p. 388–394, 2013.

STANCO, A. et al. NPAS1 Represses the Generation of Specific Subtypes of Cortical Interneurons. **Neuron**, v. 84, n. 5, p. 940–953, 2014.

STEIN, M. B. et al. Genome-wide analyses of psychological resilience in U.S. Army soldiers. **American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics**, v. 180, n. 5, p. 310–319, 2019.

STEWART, J. L.; ALLEN, J. J. B. Resting frontal brain asymmetry is linked to future depressive symptoms in women. **Biological Psychology**, v. 136, n. September 2017, p. 161–167, 2018.

STOUT, K. A. et al. Selective Enhancement of Dopamine Release in the Ventral

Pallidum of Methamphetamine-Sensitized Mice. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 7, n. 10, p. 1364–1373, 2016.

STRAWN, J. R.; SALDAÑA, S. N. Treatment with adjunctive N-acetylcysteine in an adolescent with selective serotonin reuptake inhibitor-resistant anxiety. **Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology**, v. 22, n. 6, p. 472–473, 2012.

STUKE, H. et al. Cross-Sectional and Longitudinal Relationships between Depressive Symptoms and Brain Atrophy in MS Patients. **Frontiers in Human Neuroscience**, v. 10, n. December, p. 1–8, 2016.

SULLIVAN, R. M. Hemispheric asymmetry in stress processing in rat prefrontal cortex and the role of mesocortical dopamine. **Stress**, v. 7, n. 2, p. 131–143, 2004.

SULLIVAN, R. M.; GRATTON, A. Lateralized effects of medial prefrontal cortex lesions on neuroendocrine and autonomic stress responses in rats. **Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 7, p. 2834–2840, 1999.

SULLIVAN, R. M.; GRATTON, A. Behavioral effects of excitotoxic lesions of ventral medial prefrontal cortex in the rat are hemisphere-dependent. **Brain Research**, v. 927, n. 1, p. 69–79, 2002.

SVENDSEN, J. L. et al. Trait Self-Compassion Reflects Emotional Flexibility Through an Association with High Vagally Mediated Heart Rate Variability. **Mindfulness**, v. 7, n. 5, p. 1103–1113, 2016.

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

TADIC, M.; CUSPIDI, C.; GRASSI, G. Heart rate as a predictor of cardiovascular risk. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 53, n. 10, p. e12892, 2018.

TAKAHASHI, A. et al. Aggression, social stress and the immune system in humans and animal models. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 12, n. March, p. 56, 2018.

TARCIC, N. et al. Restraint stress-induced thymic involution and cell apoptosis are dependent on endogenous glucocorticoids. **Journal of Neuroimmunology**, v. 82, n. 1, p. 40–46, 1998.

TAVARES, R. F.; CORRÊA, F. M. A.; RESSTEL, L. B. M. Opposite role of infralimbic and prelimbic cortex in the tachycardiac response evoked by acute restraint stress in rats. **Journal of Neuroscience Research**, v. 87, n. 11, p. 2601–2607, 2009.

TAYLOR, S. R. et al. GABAergic and glutamatergic efferents of the mouse

ventral tegmental area. **Journal of Comparative Neurology**, v. 522, n. 14, p. 3308–3334, 2014.

TAYLOR, W. D. et al. Orbitofrontal cortex volume in late life depression: influence of hyperintense lesions and genetic polymorphisms. **Psychological Medicine**, v. 37, n. 12, p. 1763–1773, 2007.

TEH, C. H. L. et al. Neuronal PAS Domain Protein 1 Is a Transcriptional Repressor and Requires Arylhydrocarbon Nuclear Translocator for Its Nuclear Localization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 45, p. 34617–34629, 2006.

TEJADA, J.; CHAIM, K. T.; MORATO, S. X-PlorRat: A software for scoring animal behavior in enclosed spaces. **Psicologia: Teoria e Pesquisa**, v. 33, p. 1–4, 2017.

THIBEAULT, K. C. et al. Cell-type and projection-specific dopaminergic encoding of aversive stimuli in addiction. **Brain Research**, v. 1713, p. 1–15, 2019.

TOOLEY, J. et al. Glutamatergic Ventral Pallidal Neurons Modulate Activity of the Habenula–Tegmental Circuitry and Constrain Reward Seeking. **Biological Psychiatry**, v. 83, n. 12, p. 1012–1023, 2018.

TORRES-BERRÍO, A. et al. DCC Confers Susceptibility to Depression-like Behaviors in Humans and Mice and Is Regulated by miR-218. **Biological Psychiatry**, v. 81, n. 4, p. 306–315, 2017.

TOTH, I.; NEUMANN, I. D. Animal models of social avoidance and social fear. **Cell and Tissue Research**, v. 354, n. 1, p. 107–118, 2013.

ULRICH-LAI, Y. M. et al. Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 291, n. 5, p. E965–E973, 2006.

ULRICH-LAI, Y. M.; HERMAN, J. P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 6, p. 397–409, 2009.

VACHEZ, Y. M. et al. Ventral arkypallidal neurons inhibit accumbal firing to promote reward consumption. **Nature Neuroscience**, 2021.

VENZALA, E. et al. Chronic social defeat stress model: Behavioral features, antidepressant action, and interaction with biological risk factors. **Psychopharmacology**, v. 224, n. 2, p. 313–325, 2012.

VERBERNE, A. J. Medullary sympathoexcitatory neurons are inhibited by activation of the medial prefrontal cortex in the rat. **American Journal of Physiology-**

Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, v. 270, n. 4, p. R713–R719, 1996.

VERTES, R. P. Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. **Synapse**, v. 51, n. 1, p. 32–58, 2004.

VIALOU, V. et al. DeltaFosB in brain reward circuits mediates resilience to stress and antidepressant responses. **Nature neuroscience**, v. 13, n. 6, p. 745–752, 2010.

VIALOU, V. et al. Prefrontal Cortical Circuit for Depression- and Anxiety-Related Behaviors Mediated by Cholecystokinin: Role of FosB. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 11, p. 3878–3887, 2014.

VICTORIANO, G. et al. Inhibition of the left medial prefrontal cortex (mPFC) prolongs the social defeat-induced anxiogenesis in mice: Attenuation by NMDA receptor blockade in the right mPFC. **Behavioural Brain Research**, v. 378, n. June 2019, p. 112312, 2020.

VIEIRA, J. O. et al. Sex differences in cardiovascular, neuroendocrine and behavioral changes evoked by chronic stressors in rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 81, n. May 2017, p. 426–437, 2017.

VREEBURG, S. A. et al. Major Depressive Disorder and Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Activity. **Archives of General Psychiatry**, v. 66, n. 6, p. 617, 2009.

WANG, E. Y. et al. Causes and Predictors of Death in Patients With Coronary Heart Disease (from the Heart and Soul Study). **American Journal of Cardiology**, v. 119, n. 1, p. 27–34, 2017.

WANG, M. et al. Synaptic Modifications in the Medial Prefrontal Cortex in Susceptibility and Resilience to Stress. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 22, p. 7485–7492, 2014.

WESTERHAUS, M. J.; LOEWY, A. D. Central representation of the sympathetic nervous system in the cerebral cortex. **Brain Research**, v. 903, n. 1–2, p. 117–127, 2001.

WOLF, E. J. et al. A classical twin study of PTSD symptoms and resilience: Evidence for a single spectrum of vulnerability to traumatic stress. **Depression and Anxiety**, v. 35, n. 2, p. 132–139, 2018.

WONG, S. W. et al. Ventral medial prefrontal cortex and cardiovagal control in conscious humans. **NeuroImage**, v. 35, n. 2, p. 698–708, 2007.

WOOD, S. K. et al. Individual differences in reactivity to social stress predict susceptibility and resilience to a depressive phenotype: Role of corticotropin-releasing factor. **Endocrinology**, v. 151, n. 4, p. 1795–1805, 2010.

WOOD, S. K. et al. Depressive and cardiovascular disease comorbidity in a rat model of social stress: a putative role for corticotropin-releasing factor. **Psychopharmacology**, v. 222, n. 2, p. 325–336, 2012.

WOOD, S. K. et al. Cellular Adaptations of Dorsal Raphe Serotonin Neurons Associated with the Development of Active Coping in Response to Social Stress. **Biological Psychiatry**, v. 73, n. 11, p. 1087–1094, 2013.

WOOD, S. K. et al. Inflammatory factors mediate vulnerability to a social stress-induced depressive-like phenotype in passive Coping Rats. **Biological Psychiatry**, v. 78, n. 1, p. 38–48, 2015.

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

WOODWARD, M. et al. The association between resting heart rate, cardiovascular disease and mortality: Evidence from 112,680 men and women in 12 cohorts. **European Journal of Preventive Cardiology**, v. 21, n. 6, p. 719–726, 2014.

WRIGHT, D. J. et al. N-acetylcysteine modulates glutamatergic dysfunction and depressive behavior in Huntington's disease. **Human Molecular Genetics**, v. 0, n. 0, p. ddw144, 2016.

WRIGHT, R. L.; CONRAD, C. D. Enriched environment prevents chronic stress-induced spatial learning and memory deficits. **Behavioural Brain Research**, v. 187, n. 1, p. 41–47, 2008.

WULFF, A. B. et al. Ventral pallidal modulation of aversion processing. **Brain Research**, v. 1713, n. July 2018, p. 62–69, 2019.

XIONG, W. et al. Relationships of coping styles and sleep quality with anxiety symptoms among Chinese adolescents: A cross-sectional study. **Journal of Affective Disorders**, v. 257, n. June, p. 108–115, 2019.

YALCIN, I.; BELZUNG, C.; SURGET, A. Mouse strain differences in the unpredictable chronic mild stress: a four-antidepressant survey. **Behavioural Brain Research**, v. 193, n. 1, p. 140–143, 2008.

YAMAZAKI, T.; YAZAKI, Y. Molecular basis of cardiac hypertrophy. **Zeitschrift für Kardiologie**, v. 89, n. 1, p. 1–6, 2000.

YANKELEVITCH-YAHAV, R. et al. The Forced Swim Test as a Model of Depressive-like Behavior. **Journal of Visualized Experiments**, n. 97, p. 1–7, 2015.

ZHANG, D.; WANG, W.; LI, F. Association between resting heart rate and coronary artery disease, stroke, sudden death and noncardiovascular diseases: a meta-analysis. **Canadian Medical Association Journal**, v. 188, n. 15, p. E384–E392, 2016.

ZHOU, Y.-D. et al. Molecular characterization of two mammalian bHLH-PAS domain proteins selectively expressed in the central nervous system. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 2, p. 713–718, 1997.

ZIEGLER, G. et al. The relation of ventromedial prefrontal cortex activity and heart rate fluctuations at rest. **European Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 11, p. 2205–2210, 2009.

ZOLADZ, P. R. et al. Acute episodes of predator exposure in conjunction with chronic social instability as an animal model of post-traumatic stress disorder. **Stress**, v. 11, n. 4, p. 259–281, 2008.

ANEXO A – PARECER CEUA 01/2017

C E R T I F I C A D O

Certificamos que a proposta intitulada "Lidando com o inimigo: efeitos do tratamento com N-acetilcisteína na susceptibilidade e resiliência ao estresse de derrota social em ratos", registrada com o Protocolo CEUA/FCF/CAR: 01/2017, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marcelo Tadel Marin - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado ad-referendum pelo Coordenador da COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP em 08 de maio de 2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	janeiro de 2020
Espécie/linhagem/raça	Rato Wistar/Long Evans
Nº de animais	372
Peso/Idade	220/400g – 8/12 semanas
Sexo	15 Fêmeas/357 Machos
Origem	Biotério Central da UNESP/Botucatu

Araraquara, 08 de maio de 2017.



Profa. Dra. Carla Raquel Fontana Mendonça
Coordenadora da CEUA

ANEXO B – PARECER CEUA 01/2017 (PRORROGAÇÃO)



CERTIFICADO

* Torna sem efeito o certificado expedido em 08 de maio de 2017.

Certificamos que a proposta intitulada "Lidando com o inimigo: efeitos do tratamento com N-acetilcisteína na susceptibilidade e resiliência ao estresse de derrota social em ratos", registrada com o Protocolo CEUA/FCF/CAR: 01/2017, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marcelo Tadeu Marin - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado ad-referendum pela Coordenadora da COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP em 04 de dezembro de 2019.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	janeiro de 2021
Espécie/linhagem/raça	Rato Wistar/Long Evans
Nº de animais	372
Peso/Idade	220/400g – 8/12 semanas
Sexo	15 Fêmeas/357 Machos
Origem	Biotério Central da UNESP/Botucatu
Registro CIAEP	02.00082.2019

Araraquara, 10 de dezembro de 2019.



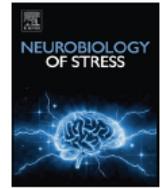
Prof. Dr. Marcelo Tadeu Marin
Coordenador da CEUA

**ANEXO C – ARTIGO “CARDIOVASCULAR OUTCOMES RELATED TO SOCIAL
DEFEAT STRESS: NEW INSIGHTS FROM RESILIENT AND SUSCEPTIBLE
RATS”**



Contents lists available at ScienceDirect

Neurobiology of Stress

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ynstr

Cardiovascular outcomes related to social defeat stress: New insights from resilient and susceptible rats



Gessynger Morais-Silva^{a,b}, Willian Costa-Ferreira^{a,b}, Lucas Gomes-de-Souza^{a,b},
Jacqueline C. Pavan^a, Carlos C. Crestani^{a,b}, Marcelo T. Marin^{a,b,*}

^a São Paulo State University (UNESP), School of Pharmaceutical Sciences, Laboratory of Pharmacology, Araraquara, SP, Brazil

^b Joint Graduate Program in Physiological Sciences (PIPGCF), UFSCar/UNESP, São Carlos/Araraquara, SP, Brazil

ABSTRACT

Stress exposure is an important risk factor for psychiatric and cardiovascular disorders. Two phenotypes related to coping with stress can be observed in rodents that experience chronic social defeat stress (SDS): susceptible, showing social avoidance and behavioral changes related to depression, and resilient, showing none of these alterations. Moreover, a strong correlation exists between depression and the development of or mortality due to cardiovascular diseases. Nevertheless, little is known about cardiovascular alterations related to SDS exposure in those phenotypes or their correlation with depressive-like behaviors. Using a chronic SDS protocol followed by the social interaction test, we identified Wistar rats as resilient or susceptible to SDS. Susceptible animals showed increased depressive-like behaviors with resting tachycardia and decreased heart rate variability (HRV) due to increased sympathetic tone in the heart and a less effective baroreflex. In contrast, resilient rats were protected from these alterations by increased vagal tone, resulting in greater HRV values. To our knowledge, our study is the first to indicate that harmful cardiovascular outcomes are related to depressive-like behaviors in susceptible rats and to suggest a mechanism by which resilient rats are protected from these changes. Also, our results suggest that enhanced HRV and vagal tone may be an important trait in resilient individuals.

1. Introduction

The impact of stress-related disorders on public health systems is such that the fifth edition of the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5) includes, as a separate topic, diseases related to trauma and stressor exposure, depression being one of the most impactful (American Psychiatric Association, 2013). Globally, depression is the fifth leading cause of years lived with disability (YLDs) (Vos et al., 2017). Depression is also strongly correlated with the development of and mortality due to cardiovascular diseases (Penninx, 2016). Meta-analyses evaluating the impact of depression on the later development of cardiovascular diseases show that depressed patients have an increased risk for developing coronary heart diseases (Nicholson et al., 2006; Wu and Kling, 2016).

Animal models of stress exposure also support this correlation. Chronic exposure to diverse stress protocols induces a variety of depressive-like symptoms, such as anhedonia and behavioral despair, in addition to neuroendocrine, sleep, and weight disturbances (Deussing, 2006; Jaggi et al., 2011). Among the animal models of stress, the exposure of rodents to social defeat stress (SDS) stands out due to its ethological relevance and similarity to psychosocial stress experienced by humans. It consists of exposing the animal to an intense,

unpredictable, and inescapable confrontation with an aggressive conspecific (Hammels et al., 2015). After chronic exposure to SDS, animals show behavioral and physiological alterations related to anxiety and depression, such as decreased body weight gain, anxiogenic responses in the elevated plus maze (EPM), novelty suppression of feeding, anhedonia, increased immobility time in the forced swim test (FST) (Venzala et al., 2012), social avoidance (Berton et al., 2006; Jaisinghani and Rosenkranz, 2015), autonomic imbalance, resting tachycardia, and electrophysiological alterations in the heart (Sévoz-Couche et al., 2013; Sgoifo et al., 2014).

Heart rate variability (HRV) is a natural and physiological phenomenon that reflects the complex and reciprocal interactions along the brain-heart axis. It is easy to obtain and has important implications regarding the development and prognosis of cardiovascular diseases (McCraty and Shaffer, 2015). HRV analysis aids in the identification of patients at risk of death by cardiovascular diseases and the evaluation of autonomic control of the heart (Cygankiewicz and Zareba, 2013; Kleiger et al., 2005). Evidence obtained in humans and animal subjects has indicated that decreased HRV is associated with many psychiatric disorders, including depression (Carnevali et al., 2018; Minassian et al., 2015; Sgoifo et al., 2015).

Despite the importance of stress exposure to the development of

* Corresponding author. Depto. Princípios Ativos Naturais e Toxicologia (PANT), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rod. Araraquara - Jaú - km 01, CEP, 14800-903, Araraquara, SP, Brazil.

E-mail address: marcelo.marin@unesp.br (M.T. Marin).

<https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2019.100181>

Received 1 February 2019; Received in revised form 28 May 2019; Accepted 4 June 2019

Available online 06 June 2019

2352-2895/© 2019 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

psychiatric and cardiovascular disorders, not every exposed individual develops diseases (Cohen et al., 2007). In this sense, individual differences in the response of the organism to adverse events may be related to an individual's ability to adapt to adversity, i.e., resilience or susceptibility to stress. Resilience can be interpreted as an individual's ability to maintain health in the face of adversity, whereas susceptibility consists of the opposite, individuals that show maladaptive responses facing problems and challenges (Wood and Bhatnagar, 2015).

The use of the social interaction test (SIT) to classify socially defeated mice into susceptible and resilient phenotypes has helped to clarify the behavioral and neurobiological bases of stress resilience (Krishnan et al., 2007). Accordingly, after chronic exposure to SDS, susceptible mice show social avoidance and behavioral alterations related to depression, whereas resilient mice do not (Golden et al., 2011; Pfau and Russo, 2015). Until now, no study has used SIT to identify rats that are susceptible and resilient to SDS and correlate the stress-susceptibility phenotype with depressive-like behavior development. Also, an investigation of distinct stress-induced cardiovascular outcomes in susceptible and resilient rats is lacking in the literature and can offer new insights about the impact of stress on cardiovascular disorders.

Here, we use the SIT to identify rats that are resilient and susceptible to SDS and evaluate behavioral alterations related to depression and cardiovascular parameters in both phenotypes.

2. Material and methods

2.1. Experimental subjects

Fifty-seven male Wistar rats (230–260 g) were used as experimental subjects. Animals were obtained from the animal breeding facility of Sao Paulo State University (UNESP) (Botucatu-SP, Brazil) and were transferred to our animal facility at least 7 days before the beginning of experiments. They were kept in a room with controlled temperature ($23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$), on a 12 h reverse light-dark cycle (lights on 10 pm), in groups of four per cage ($32 \times 40 \times 16\text{ cm}$). Water and food were offered *ad libitum* during the entire experiment. All stress exposures and behavioral tests were performed during the dark phase of the cycle, and animals were tested randomly throughout this period (1 p.m. to 6 pm). Cardiovascular recordings were performed during the light phase of the cycle, and animals were tested randomly throughout this period (11 p.m. to 4 am).

Six male Long Evans rats (weighing more than 400 g during aggressive encounters) were used as aggressors in the chronic SDS protocol. They were kept in a different animal facility, each one in a cage ($32 \times 40 \times 16\text{ cm}$), forming a stable colony with a fertile female Long Evans rat. The room was maintained under the same conditions described above. One week before their use as aggressors in the study, the residents were screened to ensure similar levels of aggressiveness using non-experimental Wistar rats as intruders. Residents that were not able to provoke at least one event of submissive posture (at least 4 s of supine posture) from two different animals in a 5-min test on 2 consecutive days were not used in the experiments. One hour before each aggressive encounter, females and pups were removed from the resident's home cage and kept undisturbed in the animal facility with water and food offered *ad libitum*. Aggressors were transferred to the defeat room at least 1 h prior to aggressive encounters.

All procedures involving animal use were approved by the university ethics committee for animal care and use (CEUA/FCF/CAr 01/2017), and all experiments were conducted according to the principles of the Brazilian National Council for Animal Experiments Control (CONCEA), based on the NIH Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals.

2.2. Experimental procedure

After SDS and identification of coping phenotypes, animals were

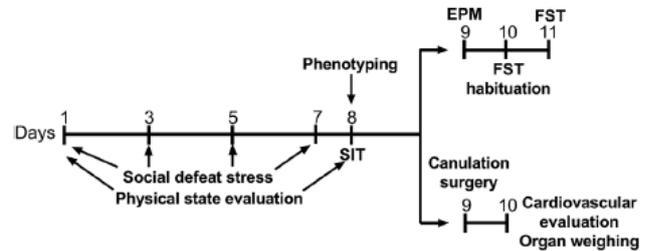


Fig. 1. Graphical representation of the experimental procedure. Social defeat stress was performed every other day (days 1, 3, 5 and 7) for 7 days, totaling 4 aggressive encounters. Stress coping phenotypes were identified by the SIT 24 h later. After the phenotyping, animals were used to evaluate the behavioral alterations related to anxiety and depression or were cannulated to the recording of cardiovascular parameters. SIT, social interaction test; EPM, elevated plus maze; FST, forced swim test.

divided into two groups: the first ($n = 26$) was submitted to evaluation of behavioral alterations related to anxiety and depression and the second ($n = 31$) to the evaluation of cardiovascular alterations. The experimental timeline is depicted in Fig. 1.

2.2.1. Social defeat stress

Our intruder-resident protocol of chronic SDS was based on a previously described method (Boyson et al., 2011), with some modifications. Briefly, it consists of exposing the animals to be stressed (intruders) to the home-cage of an aggressive conspecific (residents).

For 7 days, the intruders were exposed to an aggressive encounter in the resident's home-cage to be defeated. Each aggressive encounter occurred in a specific room and lasted for 25 min, divided into three phases: in the first, called the incitation phase, the intruders were protected by a protective metal grid cage for 5 min to stimulate aggressiveness in the resident. Subsequently, in the defeat phase, the intruders were removed from the protective cage and placed in confrontation with the aggressive Long Evans for 10 min. The intruders were then placed again in the resident's home cage, secured by the protective cage for 10 min (post-defeat phase). At the end of the aggressive encounter, the intruders were replaced in their home cages until the next defeat (48 h later). Therefore, each intruder rat was exposed to four stress sessions. Each intruder was exposed to a different aggressor in each aggressive encounter, which was randomly performed during the dark phase of the light-dark cycle.

The experimental subjects (stressed and control animals) were weighed before each aggressive encounter. Control animals were handled (cage changes, weighing, and coat state evaluation) during the occurrence of the social defeat sessions.

2.2.2. Physical state evaluation

Coat state deterioration was used as an index of the animal's motivational state for self-centered activities and depressive-like behavior (Nollet et al., 2013).

Before the first aggressive encounter (initial coat state score) and SIT (final coat state score), control and stressed animals were evaluated regarding the state of their coats, using a scale from 3 to 0, wherein 3 represents healthy and well-cared-for fur, while 0 represents unhealthy and dirty fur, with hair loss and piloerection. Intermediate states were scored as variations of 0.5 points. The coat state deterioration score was expressed as the difference between the initial and final coat state scores.

2.2.3. Social interaction test

Twenty-four hours after SDS, intruder rats were identified as resilient or susceptible by their interaction ratio (IR) in the SIT based on a procedure described previously for mice (Golden et al., 2011), with modifications.

The social interaction arena (Supplementary Fig. S1) is a black-floored acrylic box (80 cm length x 80 cm width x 25 cm height) with a transparent acrylic enclosure (20 cm length x 15 cm width x 24 cm height) centered on one of the walls (custom-made, Master One, Ribeirão Preto-SP, Brazil). The arena is divided virtually into an interaction zone (15 cm width around the enclosure) and an avoidance zone (15 cm length x 15 cm area projecting from both corner joints opposing the target enclosure).

Experimental subjects were exposed to the arena for 5 min divided into two phases: in the first one, the no-target phase, animals explored the arena freely for 2.5 min with the target enclosure empty. At the end of this phase, the experimental subjects were removed from the arena for 30 s, and the empty target enclosure was changed to one containing a new and non-aggressive male Long Evans rat. Subsequently, the animals were replaced in the arena for 2.5 min. The time spent in the interaction and avoidance zones during the no-target and target phases was evaluated using a camera connected to a microcomputer with behavioral analysis software ANY-maze (Stoelting Co., Wood Dale-IL, USA).

Intruders were identified as resilient or susceptible based on *k-means* cluster analysis of the IR, using a two-subgroup classification. Animals classified in the cluster with the lower mean were identified as susceptible, while those in the higher mean cluster were identified as resilient. The IR was calculated as the time spent in the interaction zone during the target phase/time spent in the interaction zone during the no-target phase.

2.2.4. Elevated plus maze

Anxiety-like behavior was evaluated in the EPM 24 h after the SIT. The protocol is based on rodents' natural aversion to open and high places, mimicked by the open arms of the EPM (Pellow and File, 1986).

The EPM is a plus-shaped wooden apparatus, elevated 50 cm above floor level with two open arms (50 cm length x 10 cm width x 0.25 cm height) and two opaque closed arms (50 cm length x 10 cm width x 40 cm height) connected by a common central platform (10 cm length x 10 cm width).

Rats were placed on the central platform of the EPM facing an open arm, and their behavior was video-recorded by a camera fixed to the roof for 5 min for analysis of the number of entries (arm entry = four paws in the arm) into the closed arms, percentage of entries into the open arms (number of entries in the open arms/total x 100), and percentage of time spent in the open arms [(time spent in open arms/total) x 100]. Behavioral analyses were performed using the software X-Plo-Rat 2005 (developed by the research team of Dr. Morato, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP, Brazil).

2.2.5. Forced swim test

Depressive-like behavior was evaluated by the FST 48 h after the SIT. The method is based on behavioral despair, that is, the immobility that rodents eventually show when exposed to an inescapable, threatening situation. In the FST, an increase in immobility time is correlated with an increased negative mood (depressive-like behavior) (Porsolt et al., 1978).

Rats were placed in an acrylic tank (30 cm diameter) filled with water (40 cm height) at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ in two phases: habituation and test. During the habituation phase, experimental subjects were placed in the water tank for 15 min. Twenty-four hours later, animals were placed again in the tank and video recorded for 5 min for the evaluation of time spent immobile (lack of movements except those necessary to float), swimming (active horizontal movements aimed at escape from the tank), climbing (active vertical movements against the tank walls aimed at escape from the tank), and latency to the first immobility event. After each exposure to the water tank, animals were towel-dried and kept in a dry cage for 15 min, after which they were replaced in their home cage. Behavioral analyses were performed using the software X-Plo-Rat 2005.

2.2.6. Femoral artery and vein cannulation

Twenty-four hours after SIT, animals were anesthetized with tribromoethanol (250 mg/kg, 1 mL/kg, i.p.) and catheters (a 4-cm segment of PE-10 heat-bound to a 13 cm segment of PE-50; Clay Adams, Parsippany-NJ, USA) were implanted into the femoral artery for pulsatile arterial pressure (PAP) recording and blood sampling and into the femoral vein for drug infusion. Both catheters were tunneled under the skin and exteriorized near the neck at the animal's dorsum. The animals were kept in individual cages and in the recording room for the rest of the experiment. As prophylaxis, animals received the non-steroidal anti-inflammatory flunixin meglumine (2.5 mg/kg, 0.1 mL/100 g, s.c., Chemitec Agro-Veterinária Ltd., São Paulo-SP, Brazil) for postoperative analgesia and a poly-antibiotic formulation containing streptomycin and penicillin (560 mg/kg, 0.2 mL, i.m., Zoetis Ltd., Campinas-SP, Brazil) to prevent infection.

2.2.7. Measurement of cardiovascular parameters at rest

Twenty-four hours after surgery, animals were connected to a pressure transducer (DPT100, Utah Medical Products Inc., Midvale-UT, USA) by the femoral artery cannula. PAP was recorded for 60 min using an amplifier (Bridge Amp ML221, ADInstruments, Dunedin-OTA, NZ) connected to a digital acquisition board (PowerLab 4/30 ML866, ADInstruments) and LabChart PRO software (ADInstruments, Dunedin). The mean (MAP), systolic (SAP), and diastolic (DAP) arterial pressures, as well as the heart rate (HR) were derived from the PAP.

2.2.8. Power spectral analysis of pulse interval and systolic arterial pressure

Heart rate (HRV) and blood pressure (BPV) variabilities were evaluated by power spectral analysis of the pulse interval (PI) and SAP using CardioSeries v2.6.2 software (developed by Daniel P.M. Dias, Departamento de Fisiologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto-SP, Brazil) (Duarte et al., 2015). Stationary temporal series of PI were extracted from the registry of 60 min of PAP. HRV and BPV were calculated from the total variance of these series in the time domain. Frequency domain analysis was also calculated from the power of oscillatory components in the frequency bands of low frequency (LF, 0.20–0.75 Hz) and high frequency (HF, 0.75–3.0 Hz) using the Fast Fourier Transform (FFT).

2.2.9. Assessment of baroreflex sensitivity and effectiveness

Baroreflex sensitivity and effectiveness were evaluated by spontaneous baroreflex analysis through the sequence analysis method and by the classical pharmacological approach (Costa-Ferreira et al., 2016; Parati et al., 2000).

The sequence method evaluated baroreflex functioning over physiological fluctuations of the SAP without pharmacological manipulation. For this, stationary temporal series of PI were extracted from the registry of 60 min of PI and SAP and analyzed beat-to-beat to identify the sequences in which an SAP increase was accompanied by PI prolongation (up sequences) or an SAP decrease was accompanied by PI shortening (down sequences). A sequence was considered as a baroreflex sequence only when the Pearson correlation coefficient between SAP and PI was greater than 0.8. Spontaneous baroreflex sensitivity was assessed based on the slope (ms/mmHg) of the linear regression between SAP and PI. Spontaneous baroreflex effectiveness was evaluated by the baroreflex effectiveness index (BEI), calculated as the ratio between baroreflex sequences and the total number of consecutive SAP increases.

The classical pharmacological approach evaluates baroreflex functioning during acute blood pressure changes evoked by vasoactive agents. In this sense, baroreflex activity was assessed via the pharmacological approach by intravenous infusion of the α_1 -adrenoceptor agonist phenylephrine (70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ at 0.4 mL/min.kg) and the nitric oxide donor sodium nitroprusside (SNP) (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ at 0.80 mL/min.kg), using an infusion pump (KD Scientific, Holliston-MA, USA), at the end of 60 min of recording of resting cardiovascular parameters.

Vasoactive drugs were infused on a randomized schedule, and the second infusion was not performed until the cardiovascular parameters returned to control values (an approximately 5-min interval). The infusions lasted for 20–30 s, resulting in the administration of a total dose of 9–14 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of phenylephrine and 26–40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of SNP. Sigmoid curves were constructed using MAP variations versus the reflex HR responses. Five parameters were evaluated using the sigmoid curves: (1) lower HR plateau (P1, Δbpm) (i.e., the maximum reflex bradycardia); (2) upper HR plateau (P2, Δbpm) (i.e., the maximum reflex tachycardia); (3) HR range (bpm) (i.e., the difference between the upper and lower plateau levels); (4) median blood pressure (BP50, ΔmmHg) (i.e., MAP at 50% of the HR range) and (5) average gain (G, bpm/mmHg) (i.e., the average slope of the curves between +1 and -1 standard derivations from the BP50). Reflex HR responses during blood pressure increases and decreases were analyzed separately using linear regression analysis. Their slopes were compared to evaluate changes in baroreflex gain.

2.2.10. Plasma corticosterone measurement

During the first hour of the light phase of the cycle, 30 min before the measurement of resting cardiovascular parameters, a blood sample (200 μL) was collected from the femoral artery for the determination of basal plasma corticosterone. Samples were collected in heparinized plastic tubes [5 μL of heparin (5000 UI/ml)] (Hepamax-S[®], Blausiegel, Cotia, SP, Brazil), centrifuged at 2000 g for 10 min at 4 °C, and plasma was stored at -80 °C until quantification. Plasma corticosterone levels were estimated using a commercial corticosterone enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to the manufacturer's instructions (Item No. 501320, Cayman Chemical, Ann Harbor-MI, USA). Plasma samples were diluted (1:250) in ELISA buffer provided by the kit prior to quantification.

2.2.11. Organ weight measurements

At the end of baroreflex evaluation, the animals were euthanized by urethane overdose (2.5 g/kg, 1 mL/100 g, i.p.) and decapitated. The adrenals, kidneys, spleen, heart, and thymus were removed, trimmed of fat and conjunctive tissues, and weighed. Organ weight was expressed as absolute weight (g) and as relative weight (g/kg body weight).

2.3. Statistics

Statistical analyses were performed using Statistica 7.1 software (StatSoft, Inc., Tulsa, OK-USA), and graphs were made using GraphPad Prism 7 software (GraphPad Software Inc., La Jolla-CA, USA). Values were expressed as mean + SEM.

Stress-coping phenotypes were identified by *k-means* cluster analyses of the IR of intruder animals. Data were classified into two clusters, maximizing between-cluster distance and minimizing within-cluster distance.

Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) considering the factor phenotype (control x resilient x susceptible) or by repeated-measures ANOVA, considering the factor phenotype (control x resilient x susceptible) as the independent factor and session (no target x target) or time (initial x final) as the repeated measurement. In cases where ANOVA showed significant differences ($p \leq 0.05$), The Newman-Keuls *post hoc* test was performed.

The correlation between immobility time and IR was assessed using Pearson's correlation analysis. Separate correlation analyses were performed for control and stressed groups.

3. Results

Our results confirmed the large difference in social interaction among animals exposed to SDS. The *k-means* cluster analyses separated stress-exposed animals in two groups, demonstrating the social avoidance expected by susceptible rats to SDS. One-way ANOVA of the IR

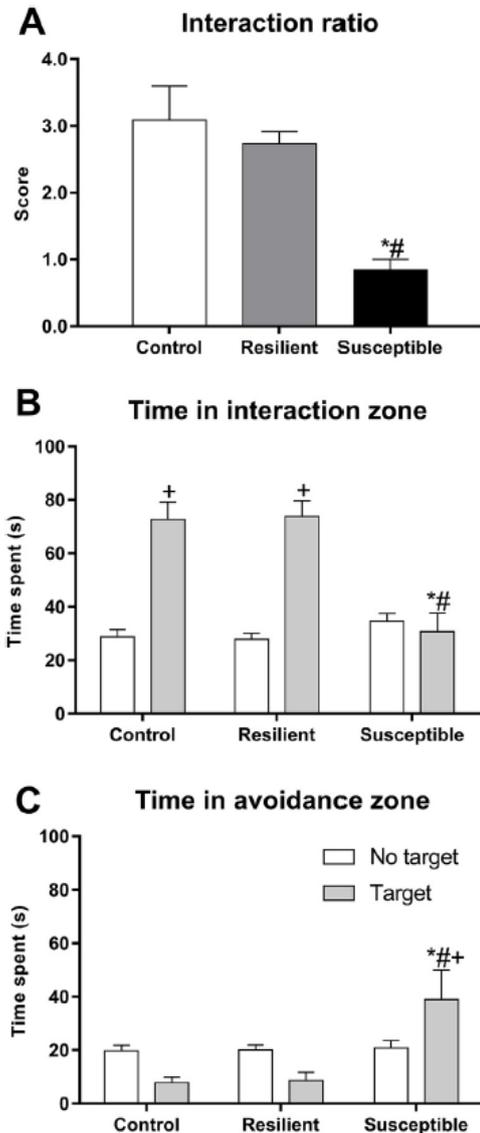


Fig. 2. Interaction ratio and time spent in interaction and avoidance zones of the social interaction apparatus in resilient and susceptible phenotypes to social defeat stress. Social interaction test was performed 24 h after the last social defeat episode. Bars represent means + SEM ($n = 18\text{--}20$ animals per group). A, interaction ratio. B, time spent in the interaction zone. C, time spent in the avoidance zone. *, $p < 0.05$ relative to control group; #, $p < 0.05$ relative to resilient group; +, $p < 0.05$ relative to time spent in the no-target phase of the same group.

(Fig. 2A) showed a significant effect of phenotype ($F_{2,54} = 13.43$, $p < 0.001$). The Newman-Keuls *post hoc* test indicates a lower IR in the susceptible group compared with the control and resilient ($p < 0.001$) groups but no differences between the resilient and control groups ($p = 0.43$). A graphical representation of the distribution of IR values is available as supplementary material (Supplementary Fig. 2).

Regarding the time spent in the interaction zone (Fig. 2B), repeated-measures ANOVA showed a significant effect of phenotype ($F_{2,54} = 13.43$, $p < 0.01$), session ($F_{1,54} = 71.91$, $p < 0.001$), and the phenotype and session interaction ($F_{2,54} = 22.38$, $p < 0.001$). The *post hoc* analysis revealed that control ($p < 0.001$) and resilient ($p < 0.001$) animals spent more time in the interaction zone when the target was present compared with the no-target session, while susceptible animals spent the same amount of time when the target was

Table 1
Body weight and body weight gain of resilient and susceptible phenotypes to social defeat stress in experiment 1.

		Control	Resilient	Susceptible
Body weight (g)	Initial	251 ± 7	249 ± 7	258 ± 8
	Final	284 ± 6	271 ± 7	276 ± 7
Body weight gain (g)		33 ± 3	22 ± 4*	18 ± 4*

Numbers represent means ± SEM (n = 18–20 animals per group). *, p < 0.05 relative to control group.

present (p > 0.05). Susceptible animals spent less time in the interaction zone when the target was present compared with the control (p < 0.001) and resilient groups (p < 0.001).

There was a main effect of phenotype ($F_{2,54} = 5.93$, p < 0.01) and of the interaction between phenotype and session ($F_{2,54} = 7.55$, p < 0.01) for the time spent in the avoidance zone (Fig. 2C). The Newman-Keuls *post hoc* test revealed an increase in time spent in the avoidance zone when the target was present in susceptible animals compared with the no-target session (p < 0.01) and compared with the control (p < 0.01) and resilient (p < 0.01) groups.

Body weight gain (Table 1) was affected in socially defeated animals, as resilient and susceptible groups gained less weight during SDS exposure. One-way ANOVA showed a significant effect of the phenotype factor ($F_{2,54} = 4.33$, p < 0.05). Body weight gain was lower in resilient (p < 0.05) and susceptible (p < 0.05) animals than in control animals. There were no significant differences among the groups in the initial or final body weights of the animals (p > 0.05).

After SDS exposure and phenotype identification in the SIT, our results indicate a decrease in anxiety levels in resilient animals tested in the EPM. One-way ANOVA failed to show significant differences regarding the number of entries into the closed arms (p > 0.05) (Fig. 3A) or the percentage of entries into the open arms (p > 0.05) (Fig. 3B). On the other hand, there was a significant effect of phenotype ($F_{2,23} = 3.77$, p < 0.05) on the percentage of time spent in the open arms of the apparatus (Fig. 3B). The resilient group spent more time in the open arms of the EPM than the control (p < 0.05) and susceptible (p = 0.05) groups.

Susceptible animals showed increased depressive-like behaviors in the FST. One-way ANOVA of the immobility time (Fig. 4A) showed a significant effect of phenotype ($F_{2,23} = 4.68$, p < 0.05). The Newman-Keuls *post hoc* test revealed an increased immobility duration in susceptible animals when compared with control (p < 0.05) and resilient animals (p < 0.05). The latency to being immobile for the first time (Fig. 4B) was also affected by the phenotype. One-way ANOVA showed a significant effect of phenotype ($F_{2,23} = 5.34$, p < 0.01), and the Newman-Keuls test revealed a decrease in immobility latency in susceptible animals relative to control (p < 0.01) and resilient (p = 0.05) ones. There were no significant alterations in the time spent swimming (Fig. 4C), despite a trend toward a significant effect of phenotype ($F_{2,23} = 2.77$, p = 0.08). One-way ANOVA showed a significant effect of phenotype ($F_{2,23} = 4.69$, p < 0.05) on climbing behavior (Fig. 4D). Newman-Keuls *post hoc* test revealed a decrease in time spent climbing in susceptible animals compared with the control (p = 0.05) and resilient (p < 0.05) groups.

Pearson's correlation analysis revealed a negative correlation between time spent immobile and IR in stressed animals (Supplementary Fig. 3A) (r = -0.4722, p < 0.05). On the other hand, there was no correlation between these variables in non-stressed (control) animals (Supplementary Fig. 3B) (r = 0.0736, p > 0.05).

Coat state deterioration (Fig. 5) was altered only in susceptible animals after SDS, which showed increased deterioration. One-way ANOVA showed significant differences for the phenotype factor ($F_{2,28} = 5.07$, p < 0.05). Susceptible animals had higher coat state deterioration scores than control (p < 0.05) and resilient animals

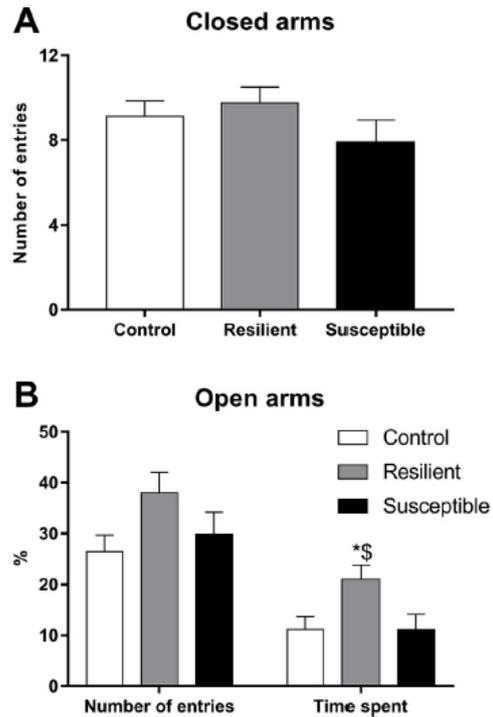


Fig. 3. Anxiety-like behaviors of resilient and susceptible phenotypes to social defeat stress in elevated plus maze. The test was performed 48 h after the last social defeat episode. Bars represent means + SEM (n = 8–10 animals per group). A, number of entries in the closed arms of the apparatus. B, percentage of number of entries and time spent in the open arms of the apparatus. *, p < 0.05 relative to control group; \$, p < 0.05 relative to susceptible group.

(p < 0.05).

Regarding basal HR values (Fig. 6A), one-way ANOVA showed a significant effect of the phenotype factor ($F_{2,19} = 8.20$, p < 0.01). Susceptible animals showed resting tachycardia compared with control (p < 0.01) and resilient rats (p < 0.01). There were no significant phenotype-related alterations in MAP, SAP, or DAP (Fig. 6) (p > 0.05).

A significant effect of the phenotype factor ($F_{2,19} = 19.04$, p < 0.001) was found for the total variance of PI (indicative of HRV) (Fig. 7A). The Newman-Keuls *post hoc* test revealed a decrease in HRV in susceptible animals compared with control (p < 0.05) and resilient animals (p < 0.001). There was also an increase in HRV in resilient animals relative to controls (p < 0.01). On the other hand, there were no significant alterations in the total variance of SP (indicative of blood pressure variance) (p > 0.05) (Supplementary Fig. 4A).

Power spectral analysis revealed an increase in the power of oscillatory components in low-frequency bands in susceptible animals and an increase in RMSSD and the power of oscillatory components in high-frequency bands in resilient animals. One-way ANOVA of the RMSSD (Fig. 7B) showed a significant effect of phenotype ($F_{2,19} = 4.88$, p < 0.05). The resilient group showed increased RMSSD when compared with the control (p = 0.05) and susceptible groups (p < 0.01). Similarly, one-way ANOVA showed a significant effect of the phenotype ($F_{2,19} = 4.67$, p < 0.05) on the HF power spectrum (Fig. 7D), whereas the Newman-Keuls test revealed an increase in resilient animals relative to control (p < 0.05) and susceptible animals (p < 0.05). There was a significant effect of the phenotype ($F_{2,19} = 3.65$, p < 0.05) on the LF power spectrum (Fig. 7C). The Newman-Keuls test revealed a significant increase in susceptible animals relative to controls (p < 0.05) and a small trend in resilient animals relative to controls (p = 0.09). There were no significant alterations in sympathovagal balance (p > 0.05) (Fig. 7E) nor in the LF power spectrum to the vessels (Supplementary Fig. 4B).

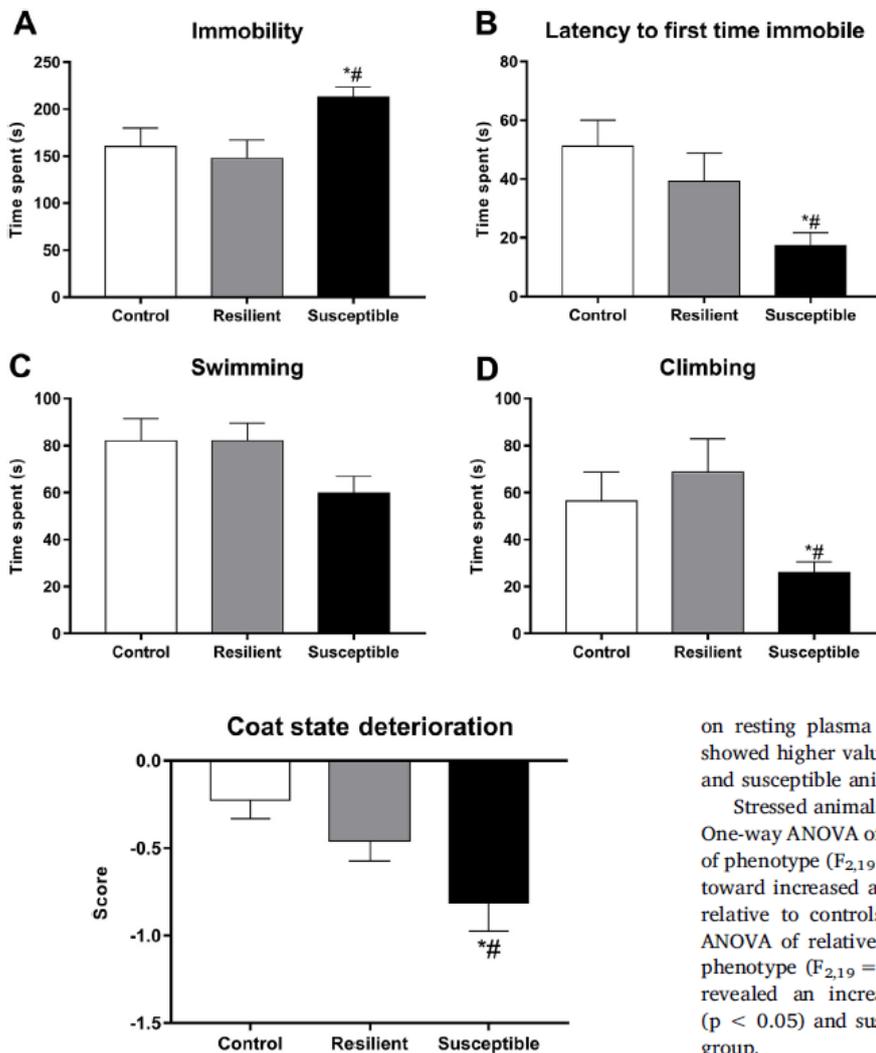


Fig. 5. Coat state deterioration in resilient and susceptible phenotypes to social defeat stress. Fur quality was evaluated right before each aggressive encounter and social interaction test. Bars represent means + SEM (n = 8–12 animals per group). *, $p < 0.05$ relative to control group; #, $p < 0.05$ relative to resilient group.

Spontaneous baroreflex gain and effectiveness differed between phenotypes. Regarding spontaneous baroreflex gain (Fig. 8A), one-way ANOVA showed a significant effect of the phenotype factor on the slope of all baroreflex sequences ($F_{2,19} = 3.95$, $p < 0.05$), the slope of up baroreflex sequences ($F_{2,19} = 5.55$, $p < 0.05$), and that of down baroreflex sequences ($F_{2,19} = 6.93$, $p < 0.05$). The slope of all sequences was increased in susceptible animals relative to controls ($p < 0.05$), whereas the slope of up and down sequences was greater in the susceptible group relative to the control ($p < 0.05$) and resilient groups ($p < 0.05$). Baroreflex effectiveness was decreased in susceptible animals (Fig. 8B). One-way ANOVA showed a significant effect of phenotype ($F_{2,19} = 4.09$, $p < 0.05$). The Newman-Keuls *post hoc* test revealed a lower BEI in susceptible animals than in control ($p < 0.05$) and resilient animals ($p < 0.05$).

There were no significant alterations in the baroreflex according to non-linear (Fig. 9A) or linear regression (Fig. 9B) in the classical pharmacological approach. One-way ANOVA showed no significant differences in P1, P2, HR range, BP50, or gain ($p > 0.05$) (Supplementary Table 1).

There was a significant effect of phenotype ($F_{2,19} = 4.52$, $p < 0.05$)

Fig. 4. Depressive-like behaviors of resilient and susceptible phenotypes to social defeat stress in the forced swim test. The test was performed 96 h after the last social defeat episode. Bars represent means + SEM (n = 8–10 animals per group). A, time spent immobile. B, latency to exhibit first immobility episode. C, time spent in active horizontal movements. D, time spent in active vertical movements towards the walls of the apparatus. *, $p < 0.05$ relative to control group; #, $p < 0.05$ relative to resilient group.

on resting plasma corticosterone levels (Table 2). Resilient animals showed higher values of resting corticosterone than control ($p = 0.05$) and susceptible animals ($p < 0.05$).

Stressed animals showed increased adrenal gland weight (Table 2). One-way ANOVA of absolute adrenal weight showed a significant effect of phenotype ($F_{2,19} = 3.47$, $p = 0.05$). *Post hoc* analysis showed a trend toward increased absolute weight in resilient and susceptible animals relative to controls ($p = 0.06$ and $p = 0.08$, respectively). One-way ANOVA of relative adrenal weight showed a significant effect of the phenotype ($F_{2,19} = 5.30$, $p < 0.05$). The Newman-Keuls *post hoc* test revealed an increase in the relative adrenal weights of resilient ($p < 0.05$) and susceptible rats ($p < 0.05$) in comparison to control group.

Relative heart weight was affected in susceptible animals (Table 2). One-way ANOVA showed no alteration in absolute heart weight ($p > 0.05$). On the other hand, relative weight was affected by the phenotype ($F_{2,19} = 4.04$, $p < 0.05$). Susceptible rats had increased relative heart weights when compared with control ($p < 0.05$) and resilient rats ($p < 0.05$).

Thymus weight was decreased in stressed animals (Table 2). One-way ANOVA of absolute thymus weight showed a significant effect of phenotype ($F_{2,19} = 9.18$, $p < 0.01$). Resilient and susceptible rats had decreased absolute thymus weight relative to controls ($p < 0.01$). There was a trend toward a significant effect of the phenotype ($F_{2,19} = 3.07$, $p = 0.06$) on relative thymus weight. The Newman-Keuls test revealed a trend toward decreased relative thymus weight in resilient animals compared with controls ($p = 0.07$).

There were no significant alterations in absolute or relative spleen or kidney weight ($p > 0.05$) (Table 2).

4. Discussion

Rats susceptible to SDS showed increased immobility in the FST and coat state deterioration, indicating a depressive-like state in these animals. This phenotype was also associated with increased basal HR, reduced HRV, and lower baroreflex effectiveness, probably due to an autonomic imbalance toward an increase in the sympathetic contribution. Resilient rats were protected from these alterations, which was possibly related to the increased vagal tone to the heart and greater

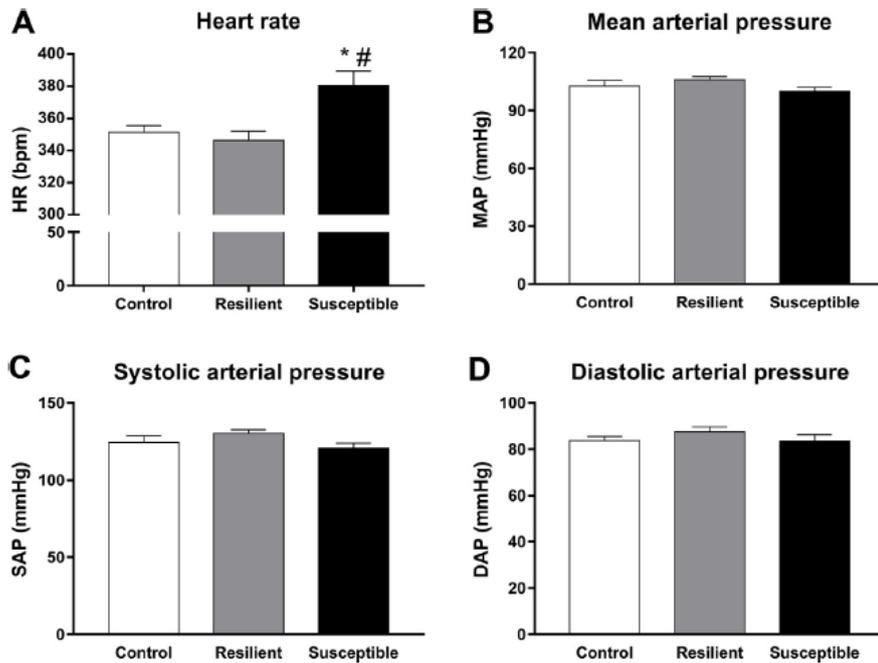


Fig. 6. Heart rate and blood pressure during rest in resilient and susceptible phenotypes to social defeat stress. Animals were cannulated 48 h after the last social defeat episode and cardiovascular parameters were recorded 24 h later. Bars represent means + SEM (n = 6–8 animals per group). A, heart rate (HR). B, mean arterial pressure (MAP). C, systolic arterial pressure (SAP). D, diastolic arterial pressure (DAP). *, p < 0.05 relative to control group; #, p < 0.05 relative to resilient group.

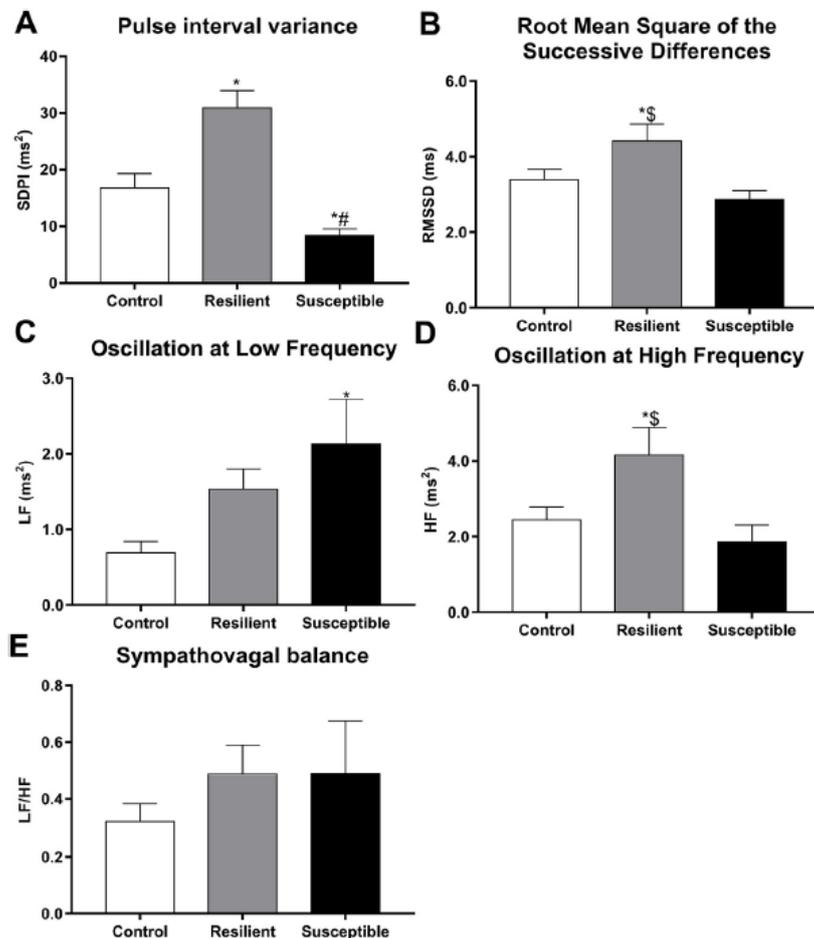


Fig. 7. Power spectral analyzes of pulse interval in time and frequency domains in resilient and susceptible phenotypes to social defeat stress. Stationary periods of pulse interval were extracted from the registry of resting pulsatile arterial pressure held 72 h after the last social defeat episode. Bars represent means + SEM (n = 6–8 animals per group). A, total variance of pulse interval in the time domain. B, Root Mean Square of the Successive Differences (RMSSD). C, power of oscillatory components in the frequency bands of low frequency (LF, 0.20–0.75 Hz). D, power of oscillatory components in the frequency bands of high frequency (HF, 0.75–3.0 Hz). E, sympathovagal balance calculated using LF/HF ratio. SDPI, standard deviation of pulse interval; LF, low frequency; HF, high frequency. *, p < 0.05 relative to control group; #, p < 0.05 relative to resilient group; \$, p < 0.05 relative to susceptible group.

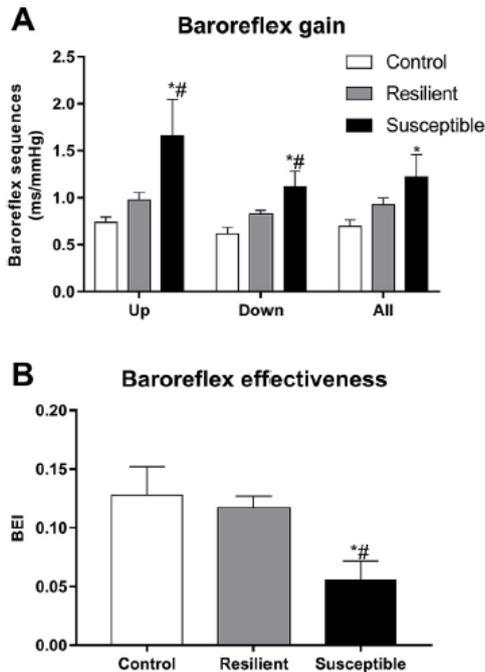


Fig. 8. Spontaneous baroreflex gain and effectiveness in resilient and susceptible phenotypes to social defeat stress. Stationary periods of pulse interval and systolic arterial pressure were extracted from the registry of resting pulsatile arterial pressure held 72 h after the last social defeat episode. Bars represent means + SEM (n = 6–8 animals per group). A, baroreflex gain of up, down and all baroreflex sequences. B, baroreflex effectiveness index (BEI). *, p < 0.05 relative to control group; #, p < 0.05 relative to resilient group.

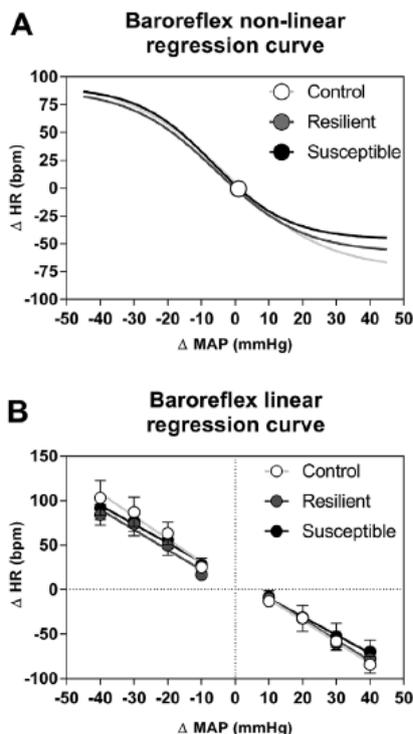


Fig. 9. Baroreflex activity during an acute pressure stimulus in resilient and susceptible phenotypes to social defeat stress. Drugs were infused right after the 60 min of resting of recording resting cardiovascular parameters. Points and lines represent means ± SEM (n = 6–8 animals per group). ΔHR, heart rate variation; ΔMAP, mean arterial pressure variation.

HRV found in our study. These results are summarized below (Table 3).

Correlational analysis between IR and immobility during FST in stressed animals revealed a negative correlation, where SDS-exposed animals that presented the lowest values of IR showed the largest values of immobility in FST performed later. These data also reinforce the use of social avoidance, at least in rodents, as a hallmark of a depressive-like state. As stated above, it is already used for mice (Golden et al., 2011), while reports using rats are limited (Pfaus and Russo, 2015). Based on our results, this procedure seems reliable for identifying rats that are resilient and susceptible to SDS, increasing the potential use of rats as animal models to study resilience to stress, in addition to mice. We separated the groups based on social interaction performed 1 day after SDS, but it is possible that this group difference is long lasting. One recent report (Riga et al., 2017) showed that rats exposed to SDS can be separated into two populations according to social interaction, and this difference persists for up to 6 months.

Expanding the repertory of behavioral alterations related to depression that appear only in susceptible individuals, we found an increase in coat state deterioration. This index is similar to the diminished individual care and personal hygiene found in depressed patients at clinics (Alonso et al., 2004; American Psychiatric Association, 2013). Increased coat state deterioration was identified after rodent exposure to chronic stress protocols and was reversible only through chronic antidepressant treatment (Ibarguen-Vargas et al., 2008; Law et al., 2016; Smolinsky et al., 2009). Rodent strains that are more susceptible to stress-induced depressive-like behaviors also show greater coat state deterioration than resilient lineages (Voorn et al., 2004; Yalcin et al., 2008), as do mice susceptible to chronic variable stress (Nasca et al., 2014). This result, together with immobility during FST, supports our classification of rats as susceptible or resilient to SDS, demonstrating that only susceptible animals develop a depressive-like state.

In contrast to previous findings in mice (Golden et al., 2011; Krishnan et al., 2007), resilient rats showed decreased anxiety-like behaviors when evaluated in the EPM. Inconsistent data are available in the literature regarding the effects of chronic social defeat on anxiety-like behaviors in rodents. This effect is variable and depends on the exposure time to stressors, animal strain, behavioral apparatus used to evaluate anxiety, and ambient characteristics during the test (Blanchard et al., 2001; Hammels et al., 2015). Nevertheless, mice selected as susceptible to chronic social instability based on the corticosterone response show increased anxiety-like behaviors in the EPM (Schmidt et al., 2010). Up to now, the reason for such discrepancies has been unclear. Our first hypothesis is that the anxiolytic response to stress is part of a coping mechanism in resilient rats. It could develop during SDS sessions and act as a protective factor against the negative consequences of stress during future stress episodes. Another hypothesis is that resilient rats are less anxious than susceptible rats prior to SDS exposure, and this lesser anxiety makes the rat less prone to adverse consequences of stress. At least in mice, this hypothesis does not appear to be supported. Unpublished data from our laboratory showed that mice classified as susceptible or resilient according to their IR do not present differences in anxiety-like behaviors in the EPM before repeated SDS. However, additional experiments are needed to elucidate the importance of such characteristics in rats.

Reinforcing the strong relationship between cardiovascular diseases and depressive-like behaviors, in susceptible rats we found cardiovascular alterations that are, in general, related to a poor prognosis for the development of cardiovascular diseases. Autonomic imbalance toward an increased sympathetic contribution, resting tachycardia, lower HRV, and baroreflex impairment has been associated with the development of arrhythmias, myocardial infarction, and arterial hypertension (Sgoifo et al., 2015, 2014). Those alterations are similar to that found in rats exposed to a wide range of stressors during adolescence, an age at which individuals are more susceptible to the effects of stress (Crestani, 2017). Surprisingly, but not unexpectedly, resilient rats are protected from those harmful alterations.

Table 2

Corticosterone during rest, absolute and relative wet weight of adrenals, kidneys, spleen, heart, and thymus of resilient and susceptible phenotypes to social defeat stress.

		Control	Resilient	Susceptible
Corticosterone (ug/dL)		2.25 ± 0.73	8.51 ± 2.54*[§]	2.26 ± 0.95
Adrenals	Absolute (g)	0.061 ± 0.007	0.083 ± 0.007	0.078 ± 0.004
	Relative (g/kg)	0.21 ± 0.02	0.33 ± 0.03*	0.31 ± 0.02*
Kidneys	Absolute (g)	2.17 ± 0.05	2.10 ± 0.07	2.08 ± 0.11
	Relative (g/kg)	7.77 ± 0.21	8.20 ± 0.29	8.32 ± 0.46
Spleen	Absolute (g)	1.12 ± 0.10	1.12 ± 0.10	1.23 ± 0.12
	Relative (g/kg)	4.01 ± 0.34	4.35 ± 0.39	4.96 ± 0.52
Heart	Absolute (g)	0.92 ± 0.03	0.87 ± 0.04	0.90 ± 0.05
	Relative (g/kg)	3.28 ± 0.07	3.33 ± 0.05	3.60 ± 0.12*[§]
Thymus	Absolute (g)	0.35 ± 0.02	0.23 ± 0.01*	0.26 ± 0.03*
	Relative (g/kg)	1.20 ± 0.10	0.91 ± 0.07	1.02 ± 0.10

Numbers represent means ± SEM (n = 6–8 animals per group). *, p < 0.05 relative to control group. #, p < 0.05 relative to resilient group. §, p < 0.05 relative to susceptible group.

Table 3

Summary of behavioral and cardiovascular alterations in resilient and susceptible phenotypes to social defeat stress.

		Resilient	Susceptible
Social avoidance		=	↑
Coat state		=	↓
Open arms time on EPM		↑	=
Immobility on FST		=	↑
Body weight gain		↓	↓
Corticosterone during rest		↑	=
Resting heart rate		=	↑
Resting blood pressure		=	=
Resting heart rate variability		↑	↓
Vagal tonus		↑	=
Sympathetic contribution to autonomic balance		=	↑
Vascular sympathetic tonus		=	=
Baroreflex sensitivity	Spontaneous	=	↑
	Pharmacologic	=	=
Baroreflex effectiveness		=	↓
Organ weight	Adrenals	↑	↑
	Kidneys	=	=
	Spleen	=	=
	Heart	=	↑
	Thymus	↓	↓

↓, ↑, = indicates a decrease, an increase or no alteration relative to the control group, respectively.

Resting tachycardia is consistently described in rodents after stress exposure, especially were social isolation (Grippe et al., 2011, 2010, 2007) and chronic variable stress are involved (Duarte et al., 2015; Grippe et al., 2003, 2002). However, few works have shown this alteration in socially defeated rodents (Crestani, 2016; Sévoz-Couche et al., 2013). A possible explanation is that previous studies carried out a joint analysis of resilient and susceptible animals, which could mask the elevation in HR after stress exposure.

Increase in basal HR values have been reported as a risk factor for the development of cardiovascular diseases (Tadic et al., 2018). Individuals with higher HR present an increased risk to the development of arterial hypertension (Kim et al., 1999; Palatini et al., 2006), heart failure (Aune et al., 2017; Khan et al., 2015; Woodward et al., 2014), myocardial infarction (Aune et al., 2017; Fox et al., 2013; Wang et al., 2017; Zhang et al., 2016), and death after ischemic stroke (Nolte et al., 2016; Qiu et al., 2016). A recent meta-analysis showed that an increase of 10 BPM in resting HR enhances by 15% the risk of cardiovascular diseases and by 17% the mortality rate from other causes (Aune et al., 2017). In war veterans, who are at high risk for the development of stress-related disorders, greater HR values are associated with an increased risk of cardiovascular diseases and mortality (Pittaras et al., 2013). Lower levels of basal HR and higher HRV values are related to a lower incidence of depression in humans (Jandackova et al., 2016). Pre-

clinical studies also show this relationship. Mice exposed to chronic variable psychological stress showed resting tachycardia and reduced endothelial function, which increased ischemic damage in a model of stroke (cerebral artery occlusion) (Custodis et al., 2011). In non-human primates treated with an atherogenic diet (Beere et al., 1984; Kaplan et al., 1987) and in rabbits with surgically induced atherosclerosis (van Hoof et al., 2017), HR reduction retarded the formation of atherosclerotic plaques.

Together with resting tachycardia, susceptible animals showed a decrease in HRV, while resilient rats had increased HRV. The literature shows that chronic stress exposure decreases HRV though alterations in the balance of sympathetic and parasympathetic tonus to the heart (Lombardi, 1996). This could be induced by enhanced sympathetic tone (Grippe et al., 2008, 2003; Vieira et al., 2017), decreased vagal tone (Wood et al., 2012), or a concomitant increase in sympathetic tone and decrease in vagal tone (Sévoz-Couche et al., 2013), depending on the stress length and protocol.

Autonomic imbalance toward an increase in the sympathetic contribution may explain the resting tachycardia and lower HRV. Other studies have shown that submissive rats in SDS exhibit decreased HRV and a shift in sympathovagal balance towards an increase in sympathetic tone (Wood et al., 2012). These animals also show increased depressive-like behaviors after SDS exposure, showing a susceptible phenotype (Wood et al., 2010). Therefore, susceptibility to SDS is related to a propensity for pathologic increases in sympathetic nervous system control of the heart.

Increased vagal tone to the heart might be interpreted as an adaptive response that protects resilient animals from cardiovascular and behavioral changes. To our knowledge, our study is the first to provide a potential mechanism wherewith resilient animals are protected from harmful cardiovascular and behavioral alterations related to stress exposure. Studies in humans showed that more self-compassionate individuals have both greater vagal tone to the heart and HRV (Svendensen et al., 2016). The self-compassion trait seems to be related to how individuals cope with stress, wherein more self-compassionate individuals cope better with adversity (Luo et al., 2018). Similarly, individuals with greater basal values of HRV are less likely to show symptoms of depression (Jandackova et al., 2016) and report suffering less from psychosocial stress (Lischke et al., 2018). On the other hand, lower baseline levels of HRV are associated with the inability to accept and regulate negative emotions (Visted et al., 2017; Williams et al., 2015) and to post-traumatic stress syndrome development after deployment in active marine members (Minassian et al., 2015, 2014). Thereby, self-compassion and HRV in humans seems to be related to stress resilience. Although it is not possible to access self-compassion in rats, the greater values of HRV found in resilient animals in our study corroborates data obtained from studies with human beings. Moreover, decreased anxiety-like behaviors in resilient rats could be a trait of

stress resilience.

Based on the works cited above, as well as our results, HRV seems to be a natural trait to determine how an individual copes with stress. Greater values of HRV and vagal tone to the heart probably precede SDS exposure and are likely inherent in resilient individuals, which could be part of the mechanism involved in resilience or a consequence of the status of neural pathways in those subjects. More studies are necessary to address whether these parameters are naturally higher in resilient individuals and if HRV could be a predictor of stress resilience. At least for humans, there is a growing body of evidence pointing to high HRV as a marker of stress resilience (Carnevali et al., 2018).

It can be argued that sympathovagal balance should be altered in resilient or susceptible animals since they showed altered vagal tone and an autonomic imbalance toward an increase in the sympathetic contribution. In resilient animals, there is a small trend toward an increased HF power spectrum. This could counterbalance the greater LF power spectrum, maintaining normal values of sympathovagal balance. More studies are necessary, using other techniques such as pharmacological blockade of autonomic branches to the heart, to confirm if this trend is biologically relevant. In susceptible animals, it is possible that the increase in the LF power spectrum was not sufficient to alter autonomic balance, since vagal tone to the heart is naturally higher (Task Force, 1996) and could mask the increase in sympathetic tone.

The decrease in BEI should be responsible for the autonomic imbalance in susceptible rats. Others have found altered baroreflex activity in rodents exposed to chronic variable stress (Almeida et al., 2015) and SDS (Sévoz-Couche et al., 2013). A less effective baroreflex decreases the inhibitory control of this reflex in the medullary neurons responsible for sympathetic system activation, which are tonically activated, increasing the sympathetic tone to the heart and vessels (Barman and Yates, 2017; Grassi et al., 2006). In our study the increase in sympathetic tone occurred exclusively to the heart, not affecting autonomic control of the vessels. An interesting result obtained here was the increased spontaneous baroreflex sensitivity, besides the decrease in effectiveness. It seems that SDS elicited functional alterations in both afferent and efferent arcs of the baroreflex. Although peripheral information seems to reach the central nervous system in an improved way in susceptible mice, autonomic responses are blunted, resulting in decreased baroreflex effectiveness.

Scientific literature concerning changes in heart weight is controversial. Although some studies have shown increased heart weight in stress-exposed animals as an indicator of heart hypertrophy (Carnevali et al., 2015; Costa-Ferreira et al., 2016; Vieira et al., 2017), others have found decreased heart weight associated with collagen deposition (Costoli et al., 2004) or no alteration (Almeida et al., 2015; Cruz et al., 2016). We found increased relative heart weight specifically in rats susceptible to SDS. In contrast to our study, Krishnan et al. (2007) found that only resilient mice show increased heart weight after SDS exposure. Cardiac hypertrophy also does not occur in female rats exposed to chronic variable stress, despite the female sex being more prone to the development of cardiovascular diseases and depression (Issler and Nestler, 2018; Vieira et al., 2017).

If we consider the increased heart weight in susceptible animals as a sign of cardiac hypertrophy, it should be related to increased sympathetic tone to the heart. The pathogenesis of cardiac hypertrophy involves diverse factors, including increased sympathetic activity (Samak et al., 2016; Yamazaki and Yazaki, 2000), and molecular alterations in cardiac hypertrophy are considered as the first step in the development of heart failure (Ritter and Neyses, 2003). On the other hand, it is also an important and reversible adaptive response during pregnancy and to exercise in athletes. Thus, the increased heart weight observed in our study should be interpreted with caution. Despite suggesting a dysfunction when analyzed together with other alterations found in the susceptible phenotype, only a histological analysis could confirm our hypothesis, especially considering the discrepancies found in the literature. The findings reported here could be a result of decreased body

weight gain in these animals, for example.

Contrary to popular belief, SDS exposure is not inoffensive to resilient individuals, since some physiological alterations were found in both phenotypes. This study and others (Hammels et al., 2015) found decreased body weight gain, adrenal gland hypertrophy, and increased thymic involution in both susceptible and resilient rodents. These alterations seem to be related to hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis activation and circulating glucocorticoids (Harvey and Sutcliffe, 2010; Reul et al., 2015; Tarcic et al., 1998; Ulrich-Lai et al., 2006). These results also confirm that the differences found between resilient and susceptible rats are not related to the robustness of the stress faced by each phenotype, since both groups showed physiological alterations related to a general response to an adverse event.

Our study found increased basal corticosterone blood levels specifically in resilient animals 3 days after the end of SDS. This result seems to contradict the outcomes of human studies, since increased morning corticosterone is a common finding in patients suffering from depression (Bhagwagar et al., 2005; Holsboer, 2000; Vreeburg et al., 2009). Similarly to humans, increased basal plasma corticosterone was reported in rats presenting vulnerability to SDS (Wood et al., 2010). On the other hand, patients who had recovered from depression showed increased morning salivary cortisol levels (Bhagwagar et al., 2003), while depressive patients under selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) treatment showed elevated evening cortisol (Manthey et al., 2011). Resilient mice present increased basal corticosterone 39 days after the last defeat (Krishnan et al., 2007), whereas animals that were less prone to stress-induced depressive-like behaviors had higher levels of morning corticosterone after SDS exposure (Bowens et al., 2012). Thus, it is unclear to us the biological significance of such discrepancies, which could be related to differences in used species, time after the onset of disease or stress exposure, and medication history.

5. Conclusions

In summary, resilient animals are protected from behavioral and cardiovascular outcomes related to SDS exposure and present changes that can be interpreted as adaptive responses, such as increased HRV and vagal tone to the heart. On the other hand, susceptible animals show increased depressive-like behaviors and harmful cardiovascular outcomes, along with an autonomic imbalance toward an increase in the sympathetic contribution and baroreflex impairment.

To our knowledge, our study is the first to indicate maladaptive cardiovascular alterations and a correlation with increased depressive-like behaviors in rats susceptible to SDS, along with a possible mechanism by which resilient rats are protected from these changes. Our results suggest the importance of studying strategies that improve HRV and vagal tone, since they could be useful in the prevention or treatment of cardiovascular diseases related to stress and depression.

Financial disclosure

The authors report no conflicts of interest.

Acknowledgments

This work was supported by grant no. 2015/25308-3 from São Paulo Research Foundation (FAPESP) to GMS and financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001. FAPESP and CAPES had no further role in the study design; in the collection, analysis, or interpretation of data; in the writing of the report; or in the decision to submit the paper for publication.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://>

doi.org/10.1016/j.ynstr.2019.100181.

References

- Almeida, J., Duarte, J.O., Oliveira, L.A., Crestani, C.C., 2015. Effects of nitric oxide synthesis inhibitor or fluoxetine treatment on depression-like state and cardiovascular changes induced by chronic variable stress in rats. *Stress* 18, 462–474. <https://doi.org/10.3109/10253890.2015.1038993>.
- Alonso, R., Griebel, G., Pavone, G., Stemmelin, J., Le Fur, G., Soubrié, P., 2004. Blockade of CRF1 or V1b receptors reverses stress-induced suppression of neurogenesis in a mouse model of depression. *Mol. Psychiatry* 9, 278–286. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001464>.
- American Psychiatric Association, 2013. In: *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, fifth ed.* American Psychiatric Association. American Psychiatric Association, Arlington. <https://doi.org/10.1176/appi.books.9780890425596>.
- Aune, D., Sen, A., O'Hartaigh, B., Janszky, I., Romundstad, P.R., Tonstad, S., Vatten, L.J., 2017. Resting heart rate and the risk of cardiovascular disease, total cancer, and all-cause mortality – a systematic review and dose–response meta-analysis of prospective studies. *Nutr. Metabol. Cardiovasc. Dis.* 27, 504–517. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2017.04.004>.
- Baman, S.M., Yates, B.J., 2017. Deciphering the neural control of sympathetic nerve activity: status report and directions for future research. *Front. Neurosci.* 11, 730. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00730>.
- Beere, P., Glagov, S., Zarins, C., 1984. Retarding effect of lowered heart rate on coronary atherosclerosis. *Science (Washington, D.C.)* 226, 180–182. <https://doi.org/10.1126/science.6484569>.
- Berton, O., McClung, C. a, Dileone, R.J., Krishnan, V., Renthal, W., Russo, S.J., Graham, D., Tsankova, N.M., Bolanos, C. a., Rios, M., Monteggia, L.M., Self, D.W., Nestler, E.J., 2006. Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science* 311, 864–868. <https://doi.org/10.1126/science.1120972>.
- Bhagwagar, Z., Hafzi, S., Cowen, P.J., 2005. Increased salivary cortisol after waking in depression. *Psychopharmacology (Berlin)* 182, 54–57. <https://doi.org/10.1007/s00213-005-0062-z>.
- Bhagwagar, Z., Hafzi, S., Cowen, P.J., 2003. Increase in concentration of waking salivary cortisol in recovered patients with depression. *Am. J. Psychiatry* 160, 1890–1891. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.160.10.1890>.
- Blanchard, R.J., McKittrick, C.R., Blanchard, D.C.C., 2001. Animal models of social stress: effects on behavior and brain neurochemical systems. *Physiol. Behav.* 73, 261–271. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(01\)00449-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(01)00449-8).
- Bovens, N., Heydendael, W., Bhatnagar, S., Jacobson, L., 2012. Lack of elevations in glucocorticoids correlates with dysphoria-like behavior after repeated social defeat. *Physiol. Behav.* 105, 958–965. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.10.032>.
- Boyson, C.O., Miguel, T.T., Quadros, I.M., DeBold, J.F., Miczek, K. a., 2011. Prevention of social stress-escalated cocaine self-administration by CRF-R1 antagonist in the rat VTA. *Psychopharmacology (Berlin)* 218, 257–269. <https://doi.org/10.1007/s00213-011-2266-8>.
- Carnevali, L., Koenig, J., Sgoifo, A., Ottaviani, C., 2018. Autonomic and brain morphological predictors of stress resilience. *Front. Neurosci.* 12, 228. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00228>.
- Carnevali, L., Vacondio, F., Rossi, S., Callegari, S., Macchi, E., Spadoni, G., Bedini, A., Rivara, S., Mor, M., Sgoifo, A., 2015. Antidepressant-like activity and cardioprotective effects of fatty acid amide hydrolase inhibitor URB694 in socially stressed Wistar Kyoto rats. *Eur. Neuropsychopharmacol.* <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2015.07.015>.
- Cohen, S., Janicki-Deverts, D., Miller, G.E., 2007. Psychological stress and disease. *J. Am. Med. Assoc.* 298, 1685. <https://doi.org/10.1001/jama.298.14.1685>.
- Costa-Ferreira, W., Vieira, J.O., Almeida, J., Gomes-de-Souza, L., Crestani, C.C., 2016. Involvement of type 1 angiotensin II receptor (AT1) in cardiovascular changes induced by chronic emotional stress: comparison between homotypic and heterotypic stressors. *Front. Pharmacol.* 7, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00262>.
- Costoli, T., Bartolomucci, A., Graiani, G., Stili, D., Laviola, G., Sgoifo, A., 2004. Effects of chronic psychosocial stress on cardiac autonomic responsiveness and myocardial structure in mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 286, H2133–H2140. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00869.2003>.
- Crestani, C.C., 2017. Adolescent vulnerability to cardiovascular consequences of chronic emotional stress: review and perspectives for future research. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 74, 466–475. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.03.027>.
- Crestani, C.C., 2016. Emotional stress and cardiovascular complications in animal models: a review of the influence of stress type. *Front. Physiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00251>.
- Cruz, F.C., Duarte, J.O., Leão, R.M., Hummel, L.F.V., Planeta, C.S., Crestani, C.C., 2016. Adolescent vulnerability to cardiovascular consequences of chronic social stress: immediate and long-term effects of social isolation during adolescence. *Dev. Neurobiol.* 76, 34–46. <https://doi.org/10.1002/dneu.22297>.
- Custodis, F., Gertz, K., Balkaya, M., Prinz, V., Mathar, I., Stamm, C., Kronenberg, G., Kazakov, A., Freichel, M., Böhm, M., Endres, M., Laufs, U., 2011. Heart rate contributes to the vascular effects of chronic mental stress: effects on endothelial function and ischemic brain injury in mice. *Stroke* 42, 1742–1749. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.598607>.
- Cyganekiewicz, I., Zareba, W., 2013. Heart rate variability. In: *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier B.V., pp. 379–393. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53491-0.00031-6>.
- Deussing, J.M., 2006. Animal models of depression. *Drug Discov. Today Dis. Model.* 3, 375–383. <https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2006.11.003>.
- Duarte, J.O., Planeta, C.S., Crestani, C.C., 2015. Immediate and long-term effects of psychological stress during adolescence in cardiovascular function: comparison of homotypic vs heterotypic stress regimens. *Int. J. Dev. Neurosci.* 40, 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2014.11.004>.
- Fox, K., Bousser, M.G., Amarenco, P., Chamorro, A., Fisher, M., Ford, I., Hennerici, M.G., Mattle, H.P., Rothwell, P.M., 2013. Heart rate is a prognostic risk factor for myocardial infarction: a post hoc analysis in the PERFORM (Prevention of cerebrovascular and cardiovascular Events of ischemic origin with teRetroban in patients with a history of ischemic stroke or transient isch. Int. J. Cardiol. 168, 3500–3505. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2013.04.206>.
- Golden, S.A., Covington, H.E., Berton, O., Russo, S.J., 2011. A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice. *Nat. Protoc.* 6, 1183–1191. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.361>.
- Grassi, G., Trevano, F.Q., Seravalle, G., Scopelliti, F., Mancia, G., 2006. Baroreflex function in hypertension: consequences for antihypertensive therapy. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 48, 407–415. <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2006.03.002>.
- Grippe, A.J., Beltz, T.G., Johnson, A.K., 2003. Behavioral and cardiovascular changes in the chronic mild stress model of depression. *Physiol. Behav.* 78, 703–710. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(03\)00050-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(03)00050-7).
- Grippe, A.J., Carter, C.S., McNeal, N., Chandler, D.L., LaRocca, M.A., Bates, S.L., Porges, S.W., 2011. 24-Hour autonomic dysfunction and depressive behaviors in an animal model of social isolation: implications for the study of depression and cardiovascular disease. *Psychosom. Med.* 73, 59–66. <https://doi.org/10.1097/PSY.0b013e31820019e4>.
- Grippe, A.J., Lamb, D.G., Carter, C.S., Porges, S.W., 2007. Social isolation disrupts autonomic regulation of the heart and influences negative affective behaviors. *Biol. Psychiatry* 62, 1162–1170. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2007.04.011>.
- Grippe, A.J., Moffitt, J. a, Johnson, A.K., 2008. Evaluation of baroreceptor reflex function in the chronic mild stress rodent model of depression. *Psychosom. Med.* 70, 435–443. <https://doi.org/10.1097/PSY.0b013e3181616fdd>.
- Grippe, A.J., Moffitt, J.A., Johnson, A.K., 2002. Cardiovascular alterations and autonomic imbalance in an experimental model of depression. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 282, R1333–R1341. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00614.2001>.
- Grippe, A.J., Sgoifo, A., Matorci, F., McNeal, N., Trahanas, D.M., 2010. Cardiac dysfunction and hypothalamic activation during a social crowding stressor in prairie voles. *Auton. Neurosci.* 156, 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2010.03.003>.
- Hammels, C., Pishva, E., De Vry, J., van den Hove, D.L.A., Prickaerts, J., van Winkel, R., Seltens, J.P., Lesch, K.P., Daskalakis, N.P., Steinbusch, H.W.M., van Os, J., Kenis, G., Rutten, B.P.F., 2015. Defeat stress in rodents: from behavior to molecules. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 59, 111–140. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.10.006>.
- Harvey, P.W., Sutcliffe, C., 2010. Adrenocortical hypertrophy: establishing cause and toxicological significance. *J. Appl. Toxicol.* 30, 617–626. <https://doi.org/10.1002/jat.1569>.
- Holsboer, F., 2000. The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology* 23, 477–501. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(00\)00159-7](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(00)00159-7).
- Ibarguen-Vargas, Y., Surget, A., Touma, C., Palme, R., Belzung, C., 2008. Multifaceted strain-specific effects in a mouse model of depression and of antidepressant reversal. *Psychoneuroendocrinology* 33, 1357–1368. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2008.07.010>.
- Issler, O., Nestler, E.J., 2018. The molecular basis for sex differences in depression susceptibility. *Curr. Opin. Behav. Sci.* 23, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2017.12.019>.
- Jaggi, A.S., Bhatia, N., Kumar, N., Singh, N., Anand, P., Dhawan, R., 2011. A review on animal models for screening potential anti-stress agents. *Neurol. Sci.* 32, 993–1005. <https://doi.org/10.1007/s10072-011-0770-6>.
- Jaisinghani, S., Rosenkranz, J.A., 2015. Repeated social defeat stress enhances the anxiogenic effect of bright light on operant reward-seeking behavior in rats. *Behav. Brain Res.* 290, 172–179. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.04.048>.
- Jandackova, V.K., Britton, A., Malik, M., Steptoe, A., 2016. Heart rate variability and depressive symptoms: a cross-lagged analysis over a 10-year period in the Whitehall II study. *Psychol. Med.* 46, 2121–2131. <https://doi.org/10.1017/S003329171600060X>.
- Kaplan, J.R., Manuck, S.B., Adams, M.R., Weingand, K.W., Clarkson, T.B., 1987. Inhibition of coronary atherosclerosis by propranolol in behaviorally predisposed monkeys fed an atherogenic diet. *Circulation* 76, 1364–1372. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.76.6.1364>.
- Khan, H., Kunutsor, S., Kalogeropoulos, A.P., Georgiopoulou, V.V., Newman, A.B., Harris, T.B., Bibbins-Domingo, K., Kauhanen, J., Gheorghiane, M., Fonarow, G.C., Kritchevsky, S.B., Laukkanen, J.A., Butler, J., 2015. Resting heart rate and risk of incident heart failure: three prospective cohort studies and a systematic meta-analysis. *J. Am. Heart Assoc.* 4, e001364. <https://doi.org/10.1161/JAHA.114.001364>.
- Kim, J.-R., Kiefe, C.I., Liu, K., Williams, O.D., Jacobs, D.R., Oberman, A., 1999. Heart rate and subsequent blood pressure in young Adults: the CARDIA study. *Hypertension* 33, 640–646. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.33.2.640>.
- Kleiger, R.E., Stein, P.K., Bigger, J.T., 2005. Heart rate variability: measurement and clinical utility. *Ann. Noninvasive Electrocardiol.* 10, 88–101. <https://doi.org/10.1111/j.1542-474X.2005.10101.x>.
- Krishnan, V., Han, M.-H., Graham, D.L., Berton, O., Renthal, W., Russo, S.J., LaPlant, Q., Graham, A., Lutter, M., Lagace, D.C., Ghose, S., Reister, R., Tannous, P., Green, T. a., Neve, R.L., Chakravarty, S., Kumar, A., Eisch, A.J., Self, D.W., Lee, F.S., Tamminga, C. a., Cooper, D.C., Gershenfeld, H.K., Nestler, E.J., 2007. Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. *Cell* 131, 391–404. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.09.018>.
- Law, J., Ibarque-Vargas, Y., Belzung, C., Surget, A., 2016. Decline of hippocampal stress reactivity and neuronal ensemble coherence in a mouse model of depression. *Psychoneuroendocrinology* 67, 113–123. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2016.01.028>.
- Lischke, A., Jacksteit, R., Mau-Moeller, A., Pahnke, R., Hamm, A.O., Weippert, M., 2018. Heart rate variability is associated with psychosocial stress in distinct social domains. *J. Psychosom. Res.* <https://doi.org/10.1016/j.jpsychores.2018.01.005>.
- Lombardi, F., 1996. Heart rate variability and its sympatho-vagal modulation. *Cardiovasc. Res.* 32, 208–216. [https://doi.org/10.1016/0008-6363\(96\)00116-2](https://doi.org/10.1016/0008-6363(96)00116-2).
- Luo, X., Qiao, L., Che, X., 2018. Self-compassion Modulates Heart Rate Variability and Negative Affect to Experimentally Induced Stress. *Mindfulness (N. Y.)*. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-1001-8>.

- org/10.1007/s12671-018-0900-9.
- Manthey, L., Leeds, C., Gilray, E.J., van Veen, T., Vreeburg, S.A., Penninx, B.W.J.H., Zitman, F.G., 2011. Antidepressant use and salivary cortisol in depressive and anxiety disorders. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 21, 691–699. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2011.03.002>.
- McCraty, R., Shaffer, F., 2015. Heart rate variability: new perspectives on physiological mechanisms, assessment of self-regulatory capacity, and health risk. *Glob. Adv. Heal. Med.* 4, 46–61. <https://doi.org/10.7453/gahmj.2014.073>.
- Minassian, A., Geyer, M.A., Baker, D.G., Nievergelt, C.M., O'Connor, D.T., Risbrough, V.B., 2014. Heart rate variability characteristics in a large group of active-duty marines and relationship to posttraumatic stress. *Psychosom. Med.* 76, 292–301. <https://doi.org/10.1097/PSY.0000000000000056>.
- Minassian, A., Maihofer, A.X., Baker, D.G., Nievergelt, C.M., Geyer, M.A., Risbrough, V.B., 2015. Association of predeployment heart rate variability with risk of postdeployment posttraumatic stress disorder in active-duty marines. *JAMA Psychiatry* 72, 979. <https://doi.org/10.1001/jama.psychiatry.2015.0922>.
- Nasca, C., Bigio, B., Zelli, D., Nicoletti, F., McEwen, B.S., 2014. Mind the gap: glucocorticoids modulate hippocampal glutamate tone underlying individual differences in stress susceptibility. *Mol. Psychiatry* 20, 755–763. <https://doi.org/10.1038/mp.2014.96>.
- Nicholson, A., Kuper, H., Hemingway, H., 2006. Depression as an aetiological and prognostic factor in coronary heart disease: a meta-analysis of 6362 events among 146 538 participants in 54 observational studies. *Eur. Heart J.* 27, 2763–2774. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehl338>.
- Nollet, M., Guisquet, A.-M. Le, Belzung, C., 2013. Models of depression: unpredictable chronic mild stress in mice. In: *Current Protocols in Pharmacology*. John Wiley & Sons, Hoboken, pp. 17. <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph056561>.
- Nolte, C.H., Erdur, H., Grittner, U., Schneider, A., Piper, S.K., Scheitz, J.F., Wellwood, L., Bath, P.M.W., Diener, H.-C., Lees, K.R., Endres, M., 2016. Impact of heart rate on admission to mortality and morbidity in acute ischaemic stroke patients - results from VISTA. *Eur. J. Neurol.* 23, 1750–1756. <https://doi.org/10.1111/ene.13115>.
- Palatini, P., Dorigatti, F., Zaetta, V., Mommino, P., Mazzer, A., Bortolazzi, A., D'Este, D., Pegoraro, F., Milani, L., Mos, L., 2006. Heart rate as a predictor of development of sustained hypertension in subjects screened for stage 1 hypertension: the HARVEST Study. *J. Hypertens.* 24, 1873–1880. <https://doi.org/10.1097/01.hjh.0000242413.96277.5b>.
- Parati, G., Di Rienzo, M., Mancia, G., 2000. How to measure baroreflex sensitivity. *J. Hypertens.* 18, 7–19. <https://doi.org/10.1097/00004872-200018010-00003>.
- Pellow, S., File, S.E., 1986. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 24, 525–529. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(86\)90552-6](https://doi.org/10.1016/0091-3057(86)90552-6).
- Penninx, B.W.J.H., 2016. Depression and cardiovascular disease: epidemiological evidence on their linking mechanisms. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 74, 277–286. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.07.003>.
- Pfau, M.L., Russo, S.J., 2015. Peripheral and central mechanisms of stress resilience. *Neurobiol. Stress* 1, 66–79. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2014.09.004>.
- Pittaras, A.M., Faselis, C., Doumas, M., Myers, J., Kheirbek, R., Kokkinos, J.P., Tsimploulis, A., Aiken, M., Kokkinos, P., 2013. Heart rate at rest, exercise capacity, and mortality risk in veterans. *Am. J. Cardiol.* 112, 1605–1609. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2013.07.042>.
- Porsolt, R.D., Anton, G., Blavet, N., Jalife, M., 1978. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur. J. Pharmacol.* 47, 379–391. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(78\)90118-8](https://doi.org/10.1016/0014-2999(78)90118-8).
- Qiu, M., Sato, S., Zheng, D., Wang, X., Carcel, C., Hirakawa, Y., Sandset, E.C., Delcourt, C., Arima, H., Wang, J., Chalmeers, J., Anderson, C.S., 2016. Admission heart rate predicts poor outcomes in acute intracerebral hemorrhage: the intensive blood pressure reduction in acute cerebral hemorrhage trial studies. *Stroke* 47, 1479–1485. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.115.012382>.
- Reul, J.M.H.M., Collins, A., Saliba, R.S., Mifsud, K.R., Carter, S.D., Gutierrez-Mecinas, M., Qian, X., Linthorst, A.C.E., 2015. Glucocorticoids, epigenetic control and stress resilience. *Neurobiol. Stress* 1, 44–59. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2014.10.001>.
- Riga, D., Schmitz, L.J.M., Hoogendijk, W.J.G., Smit, A.B., Spijker, S., 2017. Temporal profiling of depression vulnerability in a preclinical model of sustained depression. *Sci. Rep.* 7, 8570. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06984-5>.
- Ritter, O., Neynes, L., 2003. The molecular basis of myocardial hypertrophy and heart failure. *Trends Mol. Med.* 9, 313–321. [https://doi.org/10.1016/S1471-4914\(03\)00114-X](https://doi.org/10.1016/S1471-4914(03)00114-X).
- Samak, M., Fatullayev, J., Sabashnikov, A., Zerihou, M., Schmack, B., Farag, M., Popov, A.F., Dohmen, P.M., Choi, Y.-H., Wahlers, T., Weymann, A., 2016. Cardiac hypertrophy: an introduction to molecular and cellular basis. *Med. Sci. Monit. Basic Res.* 22, 75–79. <https://doi.org/10.12659/MSMBR.900437>.
- Schmidt, M.V., Scharf, S.H., Sterlemann, V., Ganea, K., Liebl, C., Holsboer, F., Müller, M.B., 2010. High susceptibility to chronic social stress is associated with a depression-like phenotype. *Psychoneuroendocrinology* 35, 635–643. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2009.10.002>.
- Sévoz-Couche, C., Brouillard, C., Camus, F., Laude, D., De Boer, S.F., Becker, C., Benoliel, J.-J., 2013. Involvement of the dorsomedial hypothalamus and the nucleus tractus solitarius in chronic cardiovascular changes associated with anxiety in rats. *J. Physiol.* 591, 1871–1887. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.247791>.
- Sgoifo, A., Carnevali, L., Grippo, A.J., 2014. The socially stressed heart. Insights from studies in rodents. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 39, 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.12.005>.
- Sgoifo, A., Carnevali, L., Pico Alfonso, M.D.L.A., Amore, M., 2015. Autonomic dysfunction and heart rate variability in depression. *Stress* 18, 343–352. <https://doi.org/10.1080/10253890.2015.1045868>.
- Smolinsky, A.N., Bergner, C.L., LaPorte, J.L., Kalueff, A.V., 2009. Analysis of grooming behavior and its utility in studying animal stress, anxiety, and depression. In: Gould, T.D. (Ed.), *Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice*. Humana Press, New York, pp. 21–36. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-303-9_2.
- Svendsen, J.L., Osnes, B., Binder, P.-E., Dundas, I., Visted, E., Nordby, H., Schanche, E., Sørensen, L., 2016. Trait self-compassion reflects emotional flexibility through an association with high vagally mediated heart rate variability. *Mindfulness* (N. Y.) 7, 1103–1113. <https://doi.org/10.1007/s12671-016-0549-1>.
- Tadic, M., Cuspidi, C., Grassi, G., 2018. Heart rate as a predictor of cardiovascular risk. *Eur. J. Clin. Investig.* 53, e12892. <https://doi.org/10.1111/eci.12892>.
- Tarcic, N., Ovadia, H., Weiss, D.W., Weidenfeld, J., 1998. Restraint stress-induced thymic involution and cell apoptosis are dependent on endogenous glucocorticoids. *J. Neuroimmunol.* 82, 40–46. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(97\)00186-0](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(97)00186-0).
- Task Force, of the E.S. of C. and theNorth A.S. of P. and E., 1996. Heart rate Variability: standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. *Circulation* 93, 1043–1065. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.93.5.1043>.
- Ulrich-Lai, Y.M., Figueiredo, H.F., Ostrander, M.M., Choi, D.C., Engeland, W.C., Herman, J.P., 2006. Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a sub-region-specific manner. *Am. J. Physiol. Metab.* 291, E965–E973. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00070.2006>.
- van Hoof, R.H.M., Hermeling, E., Sluimer, J.C., Salzmann, J., Hoeks, A.P.G., Rousset, J., Daemen, M.J.A.P., Struijker-Boudier, H., Wildberger, J.E., Heeneman, S., Kooi, M.E., 2017. Heart rate lowering treatment leads to a reduction in vulnerable plaque features in atherosclerotic rabbits. *PLoS One* 12, e0179024. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179024>.
- Venzala, E., García-García, A.L., Elizalde, N., Delagrangue, P., Tordema, R.M., 2012. Chronic social defeat stress model: behavioral features, antidepressant action, and interaction with biological risk factors. *Psychopharmacology* (Berlin) 224, 313–325. <https://doi.org/10.1007/s00213-012-2754-5>.
- Vieira, J.O., Duarte, J.O., Costa-Ferreira, W., Morais-Silva, G., Marin, M.T., Crestani, C.C., 2017. Sex differences in cardiovascular, neuroendocrine and behavioral changes evoked by chronic stressors in rats. *Prog. Neuro Psychopharmacol. Biol. Psychiatr.* 81, 426–437. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.08.014>.
- Visted, E., Sørensen, L., Osnes, B., Svendsen, J.L., Binder, P.-E., Schanche, E., 2017. The association between self-reported difficulties in emotion regulation and heart rate variability: the salient role of not accepting negative emotions. *Front. Psychol.* 8, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2017.00328>.
- Voorn, P., Vanderschuren, L.J.M.J., Groenewegen, H.J., Robbins, T.W., Pennartz, C.M. a., 2004. Putting a spin on the dorsal-ventral divide of the striatum. *Trends Neurosci.* 27, 468–474. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.06.006>.
- Vos, T., Abajobir, A.A., Abate, K.H., Abbafati, C., Abbas, K.M., Abd-Allah, F., et al., 2017. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet* 390, 1211–1259. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32154-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32154-2).
- Vreeburg, S.A., Hoogendijk, W.J.G., van Pelt, J., DeRijk, R.H., Verhagen, J.C.M., van Dyck, R., Smit, J.H., Zitman, F.G., Penninx, B.W.J.H., 2009. Major depressive disorder and hypothalamic-pituitary-adrenal Axis Activity. *Arch. Gen. Psychiatr.* 66, 617. <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2009.50>.
- Wang, E.Y., Dixon, J., Schiller, N.B., Whooley, M.A., 2017. Causes and predictors of death in patients with coronary heart disease (from the heart and soul study). *Am. J. Cardiol.* 119, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2016.09.006>.
- Williams, D.W.P., Cash, C., Rankin, C., Bernardi, A., Koenig, J., Thayer, J.F., 2015. Resting heart rate variability predicts self-reported difficulties in emotion regulation: a focus on different facets of emotion regulation. *Front. Psychol.* 6, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2015.00261>.
- Wood, S.K., Bhatnagar, S., 2015. Resilience to the effects of social stress: evidence from clinical and preclinical studies on the role of coping strategies. *Neurobiol. Stress* 1, 164–173. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2014.11.002>.
- Wood, S.K., McFadden, K.V., Grigoriadis, D., Bhatnagar, S., Valentino, R.J., 2012. Depressive and cardiovascular disease comorbidity in a rat model of social stress: a putative role for corticotropin-releasing factor. *Psychopharmacology* (Berlin) 222, 325–336. <https://doi.org/10.1007/s00213-012-2648-6>.
- Wood, S.K., Walker, H.E., Valentino, R.J., Bhatnagar, S., 2010. Individual differences in reactivity to social stress predict susceptibility and resilience to a depressive phenotype: role of corticotropin-releasing factor. *Endocrinology* 151, 1795–1805. <https://doi.org/10.1210/en.2009-1026>.
- Woodward, M., Webster, R., Murakami, Y., Barzi, F., Lam, T.H., Fang, X., Suh, I., Batty, G.D., Huxley, R., Rodgers, A., 2014. The association between resting heart rate, cardiovascular disease and mortality: evidence from 112,680 men and women in 12 cohorts. *Eur. J. Prev. Cardiol.* 21, 719–726. <https://doi.org/10.1177/2047487312452501>.
- Wu, Q., Kling, J.M., 2016. Depression and the risk of myocardial infarction and coronary death. *Medicine* (Baltim.) 95, e2815. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000002815>.
- Yalcin, I., Belzung, C., Surget, A., 2008. Mouse strain differences in the unpredictable chronic mild stress: a four-antidepressant survey. *Behav. Brain Res.* 193, 140–143. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.04.021>.
- Yamazaki, T., Yazaki, Y., 2000. Molecular basis of cardiac hypertrophy. *Z. Kardiol.* 89, 1–6. <https://doi.org/10.1007/s003920050001>.
- Zhang, D., Wang, W., Li, F., 2016. Association between resting heart rate and coronary artery disease, stroke, sudden death and noncardiovascular diseases: a meta-analysis. *Can. Med. Assoc. J.* 188, E384–E392. <https://doi.org/10.1503/cmaj.160050>.

ANEXO D – PARECER IACUC #0517004

**UNIVERSITY OF MARYLAND
SCHOOL OF MEDICINE
Office of Animal Welfare Assurance**

655 W. Baltimore Street
BRB, Mezzanine Ste. M023
Baltimore, MD 21201-1559

email: iacuc@som.umaryland.edu
voice: (410) 706-7859/8470
Assurance Number: A3200-01

DATE: August 22, 2018

TO: Mary Kay Lobo, Ph.D.
Department of Anatomy & Neurobiology
HSF2, Rm 251

FROM: Institutional Animal Care and Use Committee

RE: IACUC PROTOCOL #0517004
"Molecular and Functional Studies of Stress and Depression on the
Brain"

The Institutional Animal Care and Use Committee reviewed and APPROVED your amendment dated August 22, 2018.

Please note that the expiration date for this protocol is May 17, 2020.

If you have any questions, please do not hesitate to contact the Office of Animal Welfare Assurance by email (iacuc@som.umaryland.edu) or by phone (706-7859 / 8470).



John B. Sacci, Jr., Ph.D.
IACUC Chair

PERSONNEL AMENDMENT

*Add Gessynger Morais Silva

*Remove Brianna Evans, Emily Larkin, Rachel Herman, Christopher Schiefer, Miriam Menken, Houman Qadir, Torrance Wang, Michael Hong, Shavin Thomas, Israel Garcia Carachure, Paul Henderson