

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA**

“O impacto do estresse na adolescência e na idade adulta no perfil comportamental de camundongos.”

LARA RAMOS DE CAMPOS

Monografia apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biomédicas, ênfase em Ciências Básicas da Saúde.

**RIBEIRÃO PRETO - SP
2022**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA**

“O impacto do estresse na adolescência e na idade adulta no perfil comportamental de camundongos.”

LARA RAMOS DE CAMPOS

Monografia apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biomédicas, ênfase em Ciências Básicas da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Villela Gomes
Co-orientadora: Thamyris Santos Silva

**Ribeirão Preto - SP
2022**

Autorizo a reprodução e divulgação total deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

A inclusão deste trabalho na Biblioteca Digital foi aprovada pela Comissão Coordenadora do Curso em sua 68^a Sessão Ordinária, realizada em 31/10/2022.

Dedico este trabalho a todas as pretas
professoras.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe que, não à toa, tem nome de santa-guerreira. Obrigada por sempre demonstrar as suas fraquezas com tanta sinceridade. Obrigada pelo apoio incondicional. É sempre por nós e para nós.

Agradeço à minha irmã, Gabriela, que adotou os melhores cachorros do mundo: Kate Lúcia, Paçoca, Pitty e Ski, e alguns outros. Também a agradeço por ser minha primeira amiga.

À minha avó, Maria Helena, obrigada por insistir na educação formal da nossa família, é o nosso maior legado. Obrigada também por ser essa figura única e teimosa que representa toda a nossa ancestralidade.

Às minhas tias, Tia Jô e Josiani, obrigada pelas férias, pelas viagens, pelos conselhos e pelos ombros que nos acolhem quando as lágrimas insistem em cair.

Ao meu avô Júlio, é uma honra ser comparada com você.

Ao meu tio Marcos, obrigada por sempre ter sido o meu melhor pai.

Ao meu irmão Olavo, obrigada por me proporcionar a experiência de ser irmã mais velha, foi divertido. Desculpa a ausência, te amo muito.

Agradeço demais ao meu melhor amigo Higor, por favor continue na minha vida por mais inúmeros anos.

Aos meus companheiros da CB T5 e T6, vocês tornaram esses anos de graduação possível. Em especial, obrigada à Cometa, Luna, Engov, Lídia, Nathalia, Arerê e Monange.

Obrigada à Maria Luiza por todo amor, paciência, lealdade e companheirismo.

Agradeço imensamente à Thamyris e à Débora Akemi pela amizade e por toda a sabedoria compartilhada comigo. Sem vocês este trabalho não seria possível.

Ao professor Felipe, obrigada pela oportunidade de fazer parte do GomesLab. Obrigada pelas orientações e as inúmeras correções que se fizeram necessárias.

À Universidade de São Paulo, bem como a todos os seus funcionários que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Ao Departamento de Farmacologia.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

RESUMO

Diversas evidências apontam para o papel do estresse como um fator de risco para o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos, como a esquizofrenia e a depressão. Ademais, estudos em ratos indicam que a idade na qual o animal é submetido ao estresse pode ser determinante para as alterações comportamentais que são observadas. Por exemplo, dados do nosso laboratório indicam que a exposição de ratos a um protocolo de estresse na adolescência causa na idade adulta um fenótipo tipo-esquizofrenia, enquanto que o mesmo protocolo de estresse aplicado a animais adultos resulta em um fenótipo tipo-depressão. Considerando o amplo desenvolvimento da tecnologia de manipulação de genes em camundongos, é de extrema valia associar fatores socioambientais, como o estresse, com os fatores genéticos, através do uso de animais geneticamente modificados. Dessa forma, buscou-se caracterizar o impacto de um protocolo de estresse em camundongos (machos e fêmeas) durante a adolescência ou na idade adulta, de modo a analisar a possibilidade de aparecimento de alterações em testes comportamentais comumente utilizados no estudo da neurobiologia de transtornos psiquiátricos e de novas drogas para o tratamento dessas patologias. Para isto, camundongos machos e fêmeas da linhagem C57 foram submetidos a um protocolo de estresse que envolve a exposição a choque nas patas por 10 dias consecutivos e, cerca de 5 semanas após o fim do estresse, foram submetidos aos seguintes testes comportamentais: labirinto em cruz elevado (LCE), interação e reconhecimento social, reconhecimento de objetos e resposta locomotora à anfetamina. Os resultados indicaram que, ao contrário do estresse na idade adulta, o estresse na adolescência, tanto em machos quanto em fêmeas, causou alterações comportamentais de longo prazo na idade adulta. Além disso, apenas em animais machos expostos ao estresse na adolescência foi possível observar alterações na resposta locomotora à anfetamina. Sendo assim, pudemos verificar, por meio destes testes comportamentais, a existência da janela de vulnerabilidade na adolescência, uma vez que foram os animais mais acometidos pelo protocolo de estresse realizado.

Palavras-chave: estresse, adolescência, janela de vulnerabilidade, testes comportamentais.

ABSTRACT

Several pieces of evidence point to the role of stress as a risk factor for the development of psychiatric disorders, such as schizophrenia and depression. Furthermore, studies in rats indicate that the age in which the animal is subjected to stress can be a determinant factor for the behavioral changes that are observed. For example, data from our laboratory indicate that the exposure of rats to stress in adolescence causes a schizophrenia-like phenotype in adulthood, whereas the same stress protocol applied to adult animals results in a depression-like phenotype. Considering the widespread development of gene manipulation technology in mice, it is of extreme value to associate socio-environmental factors, such as stress, with genetic factors, through the use of genetically modified animals. Thus, we sought to characterize the impact of a stress protocol in mice (male and female) during adolescence or adulthood, in order to analyze stress-induced behavioral deficits in tests commonly used in the study of the neurobiology of psychiatric disorders and new drugs for the treatment of these pathologies. For this, mice of the C57 lineage were submitted to a stress protocol based on the exposure to footshocks during 10 days and, about 5 weeks after the end of the stress, they were tested in the following behavioral tests: elevated plus maze (EPM), social interaction and social recognition, novel object recognition and locomotor response to amphetamine. The results indicated that, unlike stress in adulthood, stress in adolescence, in both males and females, caused long-term behavioral changes in adulthood. Furthermore, only in male animals exposed to stress during adolescence was it possible to observe alterations in the locomotor response to amphetamine. Therefore, we were able to verify, through these behavioral tests, the existence of a window of vulnerability in adolescence, since these were the animals most affected by the stress protocol we executed.

Keywords: stress, adolescence, window of vulnerability, comportamental tests.

ABREVIATURAS

DA	Dopaminérgicos
FS	<i>Footshock</i>
HPA	Hipotálamo-hipófise-adrenal
IID	Índice de discriminação social
IIS	Índice de interação social
IR	Índice de reconhecimento
LC	<i>Locus coeruleus</i>
LCE	Labirinto em cruz elevado
Nac	Núcleo accumbens
NE	Norepinefrina
NOR	<i>Novel object recognition</i>
OC	Objeto conhecido
ON	Objeto novo
PFC	<i>Prefrontal cortex</i>
PND	<i>Postnatal day</i>
PV	Interneurônios parvalbumina-positivos
vHipp	Hipocampo ventral
VTA	Área tegmental ventral

SÍMBOLOS

% símbolo de porcentagem

cm centímetros

df *degrees of freedom*

i.p. intraperitoneal

kg quilograma

mA miliampères

mg miligrama

min minutos

n número de animais

p *p value*

s segundos

± símbolo de mais ou menos

α letra grega alpha

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aparato para teste de Interação e reconhecimento Social.....	22
Figura 2. Representação esquemática do teste de Reconhecimento de objetos.....	23
Figura 3. Impacto do estresse na adolescência em machos sobre a porcentagem de entrada nos braços abertos (A), porcentagem de tempo gasto nos braços abertos (B) e número de entrada nos braços fechados (C) no labirinto em cruz elevado.....	25
Figura 4. Impacto do estresse na idade adulta em machos s sobre a porcentagem de entrada nos braços abertos (A), porcentagem de tempo gasto nos braços abertos (B) e número de entrada nos braços fechados (C) no labirinto em cruz elevado.....	26
Figura 5. Impacto do estresse na adolescência em fêmeas sobre a porcentagem de entrada nos braços abertos (A), porcentagem de tempo gasto nos braços abertos (B) e número de entrada nos braços fechados (C) no labirinto em cruz elevado.....	26
Figura 6. Impacto do estresse na idade adulta em fêmeas sobre a porcentagem de entrada nos braços abertos (A), porcentagem de tempo gasto nos braços abertos (B) e número de entrada nos braços fechados (C) no labirinto em cruz elevado.....	27
Figura 7. Impacto do estresse em machos na adolescência (A) e na idade adulta (B) sobre o Índice de interação social (IIS).....	28
Figura 8. Impacto do estresse em fêmeas na adolescência (A) e na idade adulta (B) sobre o Índice de interação social (IIS).....	28
Figura 9. Impacto do estresse em machos na adolescência (A) e na idade adulta (B) sobre o Índice de discriminação social (IID).....	29
Figura 10. Impacto do estresse em fêmeas na adolescência (A) e na idade adulta (B) sobre o Índice de discriminação social (IID).....	29
Figura 11. Impacto do estresse em machos na adolescência (A) e na idade adulta (B) sobre a Atividade locomotora.....	30
Figura 12. Impacto do estresse em machos na adolescência (A) e na idade adulta (B) sobre a Atividade locomotora.....	30
Figura 13. Impacto do estresse em machos na adolescência (A) e na idade adulta (B) sobre o Índice de reconhecimento de objetos.....	31
Figura 14. Impacto do estresse em fêmeas na adolescência (A) e na idade adulta (B) sobre o Índice de reconhecimento de objetos.....	32

Figura 15. Impacto do estresse em machos na adolescência (A) e na idade adulta (B) sobre a Resposta locomotora induzida por anfetamina.....	32
Figura 16. Impacto do estresse em fêmeas na adolescência (A) e na idade adulta (B) sobre a Resposta locomotora induzida por anfetamina.....	33

SUMÁRIO

1. Introdução	14
1.1. Estresse	14
1.2. Janela de vulnerabilidade	14
1.3. Testes comportamentais	15
1.3.1. Testes para o estudo de comportamentos relacionados a ansiedade	15
1.3.2. Teste para estudos de comportamento que indicam alterações cognitivas	16
1.4. Avaliação do estado hiperdopaminérgico na Resposta locomotora à anfetamina	16
2. Objetivos	18
2.1. Objetivos específicos	18
3. Materiais e métodos	20
3.1. Animais	20
3.2. Protocolos de estresse	20
3.3. Testes comportamentais	21
3.3.1. Labirinto em cruz elevado (LCE)	21
3.3.2. Interação e discriminação social	21
3.3.3. Atividade locomotora	22
3.3.4. Reconhecimento de objetos	22
3.3.5. Resposta locomotora induzida por anfetamina	23
3.3.6. Análise estatística	23
4. Resultados e discussão	25
5. Conclusões	35
6. Referências bibliográficas	37

Introdução

1. Introdução

1.1. Estresse

Embora a etiologia da maioria dos transtornos psiquiátricos ainda permaneça desconhecida, há muito é sabido que o estresse desempenha papel crucial na patogênese dessas doenças (GOMES; ZHU; GRACE, 2020). Definido como qualquer estímulo que possa criar um desafio à homeostase de um organismo, o estresse provoca respostas fisiológicas para reagir a um possível perigo. Entretanto, uma resposta inadequada ao estresse pode ser prejudicial, precipitando uma série de condições patológicas, como transtornos depressivos maiores ou psicóticos (BELUJON; GRACE, 2015).

O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), o sistema nervoso autônomo e o sistema noradrenérgico cerebral são as principais vias associadas à resposta ao estresse. Enquanto a ativação do eixo HPA desencadeia a resposta de "luta ou fuga", liberando glicocorticoides pela glândula adrenal, a ativação do sistema nervoso autônomo, resulta em uma rápida liberação de noradrenalina no cérebro, pela ativação dos neurônios noradrenérgicos do *locus coeruleus* (LC) que se projetam para diferentes estruturas cerebrais envolvidas em respostas emocionais. Entretanto, é cada vez mais evidente que o sistema dopaminérgico também desempenha um papel importante na resposta ao estresse (BELUJON; GRACE, 2015).

Uma característica interessante é que o efeito de um estressor no sistema dopaminérgico varia dependendo se ele é fisiológico, psicológico ou um estímulo nocivo. Por exemplo, um estudo demonstrou que um choque nas patas aplicado em animais anestesiados induz uma diminuição transitória na taxa de disparo de neurônios dopaminérgicos da área tegmental ventral. Enquanto um estresse físico praticado em um animal acordado, como por exemplo um estresse agudo ou de restrição, provoca aumento na atividade dos neurônios dopaminérgicos da área tegmental ventral (VALENTI; LODGE; GRACE, 2011).

Os modelos de estresse baseiam-se na exposição forçada a estímulos ou situações que normalmente são evitadas por um indivíduo. Sendo assim, o estudo do estresse em animais compreende no estado interno induzido pela exposição a estímulos ameaçadores e aversivos. Sendo esta provavelmente uma definição não muito abrangente de estresse, mas que a comunidade entende ser o melhor reflexo do que geralmente é estudado na pesquisa experimental (PIAZZA; LE MOAL, 1998).

1.2. Janela de vulnerabilidade

É estabelecido que a adolescência é um período crítico no desenvolvimento do indivíduo, onde ocorrem mudanças comportamentais, hormonais e neuroquímicas. Estudos apontam que o impacto das variáveis que atingem esse período pode aumentar o risco de aparecimento de transtornos psiquiátricos, como a esquizofrenia, o abuso de substâncias e transtornos afetivos (PAUS; KESHAVAN; GIEDD, 2008). Transtornos de adição e transtornos psicóticos podem estar relacionados a mudanças de equilíbrio entre os sistemas dopaminérgicos mesocortical e mesolímbico em adolescentes, por exemplo (ROMEO; MCEWEN, 2006). Outras características comportamentais comumente associadas à adolescentes, como a sensibilidade exagerada ao estresse, são associadas a mudanças no

desenvolvimento no cérebro, como as que acontecem no córtex pré-frontal (PFC) (KESHAVAN et al., 2014).

As alterações nos circuitos cerebrais durante a adolescência, apesar de ser um momento importante de transição, onde o indivíduo troca um comportamento impulsivo e imprudente por decisões de enfrentamento mais eficazes, também apresenta-se como um momento de maior plasticidade que pode deixar os circuitos cerebrais mais vulneráveis. A esquizofrenia, por exemplo, é um transtorno geralmente diagnosticado em jovens adultos, e acredita-se que sua etiologia deriva de uma combinação de predisposição genética com a exposição a fatores socioambientais adversos que acontecem na infância e adolescência (GOMES; RINCÓN-CORTÉS; GRACE, 2016).

1.3. Testes comportamentais

1.3.1. Testes para o estudo de comportamentos relacionados a ansiedade

Dados do nosso laboratório indicam que a exposição de ratos a um protocolo de estresse na adolescência causa na idade adulta um fenótipo tipo-esquizofrenia, enquanto que o mesmo protocolo de estresse aplicado a animais adultos resulta em um fenótipo tipo-depressão (GOMES; ZHU; GRACE, 2020). Considerando o amplo desenvolvimento da tecnologia de manipulação de genes em camundongos, é de extrema valia associar fatores socioambientais, como o estresse, com os fatores genéticos, através do uso de animais geneticamente modificados (HOMBERG; WÖHR; ALENINA, 2017). Dessa forma, buscou-se caracterizar o impacto de um protocolo de estresse em camundongos (machos e fêmeas) durante a adolescência ou na idade adulta, de modo a analisar a possibilidade de aparecimento de alterações em testes comportamentais comumente utilizados no estudo da neurobiologia de transtornos psiquiátricos e de novas drogas para o tratamento dessas patologias.

Com o objetivo de caracterizar o estresse em camundongos, realizamos testes comportamentais para avaliar o comportamento do tipo ansioso e um possível prejuízo na função cognitiva. Sabendo que doenças como depressão e esquizofrenia são heterogêneas por natureza, nenhum modelo animal de comportamento pode capturar todos os sintomas. Por isso, uma série de testes comportamentais foram realizados.

A ansiedade é um estado emocional negativo relacionado à percepção de ameaça, e é caracterizada por sentimentos de apreensão. Em modelos animais, os testes comportamentais são fundamentais para a avaliação de um comportamento do tipo ansioso (KRAEUTER; GUEST; SARNYAI, 2019). Um dos testes realizados neste projeto foi o de Labirinto em cruz elevado (LCE), que consiste em quatro braços elevados unidos a uma plataforma central. Neste aparato, dois braços opostos são murados (braços fechados) e dois braços opostos são abertos. O teste inicia-se quando o camundongo é colocado na área central, e deixado para explorar o labirinto por um curto espaço de tempo. Baseado na tendência natural dos roedores evitarem locais abertos ou elevados, em tese, um comportamento tipo-ansiedade é caracterizado por uma menor exploração dos braços abertos do LCE comparado ao grupo controle (KRAEUTER; GUEST; SARNYAI, 2019).

Para completar essa avaliação, também foi realizado os testes de Interação e Discriminação Social em um aparato de três câmaras e em três fases: habiuação, interesse social e discriminação social. O aparato é uma caixa cilíndrica com abertura entre os recinto e

duas gaiolas, uma em cada câmara exterior para receber os animais sociais (Figura 1). Na fase de interesse social, um camundongo desconhecido foi colocado em um dos cilindros, enquanto o outro cilindro permaneceu vazio. Sabendo que os camundongos preferem explorar “objetos” co-específicos em relação à objetos inanimados, a preferência social é quantificada com um Índice de interação social (IIS), que indica a porcentagem de tempo gasto perto do rato desconhecido (KENTROP et al., 2018).

Já na fase de discriminação social, o animal desconhecido da fase anterior passa a ser considerado familiar e um novo animal desconhecido é colocado no outro cilindro. Dada a escolha entre um animal familiar e um não familiar, espera-se que os animais testados explorem mais o animal não familiar, e a porcentagem de tempo gasto neste animal é quantificada como Índice de discriminação social (IID) (KENTROP et al., 2018). Resultados conflitantes têm sido observados após a exposição a estressores. Enquanto alguns estudos indicam uma diminuição na preferência social. Outros indicam para um aumento que tem sido associado com uma possível tentativa do animal em atenuar socialmente um estado tipo-ansiedade causado pela exposição ao estresse (CONTESTABILE et al., 2021).

1.3.2. Teste para estudos de comportamento que indicam alterações cognitivas

Um aspecto crítico do quadro sintomático de alguns transtornos psiquiátricos, como a esquizofrenia e o transtorno bipolar, são as disfunções cognitivas (TUFVESSON-ALM et al., 2020). Com o intuito de observar possíveis alterações na cognição de animais estressados, utilizamos o teste de Reconhecimento de objetos (ou *Novel object recognition*; NOR), que é baseado no comportamento exploratório espontâneo de roedores que mede a memória de reconhecimento (GRAYSON et al., 2015).

Realizado em duas fases, na primeira delas, a aquisição, os animais são expostos a dois objetos idênticos em um campo aberto e, durante a segunda, a retenção, os camundongos são expostos a dois objetos diferentes, um objeto familiar da primeira fase e um novo objeto. O reconhecimento de objetos pode ser medido como a diferença no tempo gasto explorando o objeto familiar e o objeto novo. Os roedores (e outras espécies) tendem a explorar por mais tempo o objeto novo em comparação com o objeto familiar (GRAYSON et al., 2015). Sendo assim, devido à sua relativa facilidade de realização, tempo de ensaio bastante curto e ausência de condições estressantes para os animais testados, o teste de Reconhecimento de objetos vem sendo amplamente utilizado para o estudo de alterações na função cognitiva (LUEPTOW, 2017).

1.4. Avaliação do estado hiperdopaminérgico na Resposta locomotora à anfetamina

A resposta locomotora potencializada à anfetamina tem sido associada a um aumento da sensibilidade do sistema dopaminérgico e utilizada como modelo dos sintomas positivos (alucinações e delírios, por exemplo) da esquizofrenia em roedores. O hipocampo, através do subículo, modula a transmissão de dopamina e as lesões hipocampais ou suboculares potencializam a resposta locomotora à anfetamina (LECOURTIER et al., 2010). Evidências indiretas de que a disfunção hipocampal resulta em profunda perturbação do sistema

dopaminérgico vêm de estudos que mostram que lesões hipocampais potencializam a resposta locomotora à anfetamina (COUTUREAU et al., 2000). Como a resposta locomotora à anfetamina é mediada principalmente por um aumento da liberação de dopamina no núcleo accumbens (Nac), acredita-se que uma resposta locomotora potencializada à anfetamina resulte de uma hipersensibilidade generalizada do sistema de dopaminérgico do meso-accumbens (LECOURTIER et al., 2010).

Em nosso grupo, foi observado um estado hiperdopaminérgico em animais expostos ao estresse precoce da adolescência, indicado por um aumento da atividade da população de neurônios dopaminérgicos (DA) da área tegmental ventral (VTA), aumento da resposta locomotora à anfetamina e hiperatividade no vHipp (hipocampo ventral), que também é o local de perda de interneurônios parvalbumina-positivos (PV). Acredita-se que a perda de PV leve à hiperatividade vHipp que, por sua vez, resulta em um estado hiperdopaminérgico. E esta condição é altamente consistente com as observações clínicas na esquizofrenia (GOMES; ZHU; GRACE, 2020). Portanto, nosso objetivo em analisar a resposta locomotora à anfetamina em camundongos, é observar possíveis alterações hiperdopaminérgicas entre animais estressados na adolescência e na idade adulta.

Objetivos

2. Objetivos

Avaliar o impacto da exposição a um protocolo de estresse na adolescência e idade adulta em camundongos machos e fêmeas em diferentes testes comportamentais.

2.1. Objetivos específicos

- Avaliar o impacto do estresse na adolescência ou idade adulta no comportamento dos animais no LCE.
- Avaliar o impacto do estresse na adolescência e na idade adulta no comportamento dos animais no teste de Interação e discriminação social.
- Avaliar o impacto do estresse na adolescência e na idade adulta no comportamento dos animais no teste de Reconhecimento de objetos
- Avaliar o impacto do estresse na adolescência e na idade adulta no comportamento dos animais na Resposta locomotora à anfetamina
- Avaliar possíveis diferenças sexuais nas alterações comportamentais induzidas pelo estresse na adolescência e idade adulta.

Materiais e métodos

3. Materiais e métodos

3.1. Animais

Camundongos C57BL6 machos e fêmeas com 3 semanas ou 6 semanas foram obtidos do biotério central da Universidade de São Paulo/Campus Ribeirão Preto e aclimatados por 1 semana antes do início do experimento. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas em uma sala com temperatura ambiente controlada ($24 \pm 2^\circ\text{C}$), ciclo claro/escuro de 12/12 horas e livre acesso à água e comida. Todos os protocolos realizados foram previamente submetidos à análise pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP.

3.2. Protocolos de estresse

Camundongos adolescentes (PND 30) e adultos (PND 65) de ambos os sexos foram submetidos a um evento estressor, o protocolo de choque nas patas (FS), diariamente entre PND 31 e 40 (estresse na adolescência) ou PND 65 e 74 (estresse na idade adulta). Os animais controle (naïve) permaneceram em suas *homecages*.

O protocolo de FS consistiu em sessão diária de choques nas patas durante 10 dias. Em cada sessão os animais receberam 15 choques (0,75 mA, 2s) apresentados de forma randômica a cada 60 ± 20 s.

3.3. Testes comportamentais

3.3.1. Labirinto em cruz elevado (LCE)

Os animais foram colocados no centro do LCE, que consiste em dois braços abertos (30x5 cm) que formam uma cruz com dois braços fechados (30x5x15 cm) posicionados a 50 cm do solo. A porcentagem de entradas e o tempo despendido nos braços abertos (parâmetros relacionados à ansiedade) foram avaliados por 5 min, bem como o número de entrada nos braços fechados (parâmetros relacionados à atividade locomotora). As análises comportamentais foram realizadas com auxílio do software Any-maze.

3.3.2. Interação e discriminação social

Para avaliar a interação e o reconhecimento social, os animais foram submetidos ao Teste de Interação e Discriminação Social. No dia do teste, os animais foram habituados por 5 minutos (min) em uma caixa de acrílico contendo 3 compartimentos e duas gaiolas vazias (Figura 1). Durante a fase de Interação Social, um camundongo não familiar foi colocado em uma gaiola (social), enquanto a outra gaiola permanecerá vazia (não social). O animal teste explorou o ambiente por 10 min. Durante a fase de Discriminação social, o animal previamente considerado como não familiar foi considerado familiar, e um novo camundongo foi colocado na outra gaiola (não familiar). Nessa fase, o animal teste explora o ambiente por 5 min

(Adaptado de Kentrop *et al.*, 2018). Os resultados foram reportados como tempo total de interação (s) e como índice de Interação (IIS) ou Discriminação social (IID):

$$IIS = [(Social - Não Social) / (Social + Não Social)]$$

$$IID = [(Familiar - Não familiar) / (Familiar + Não familiar)]$$

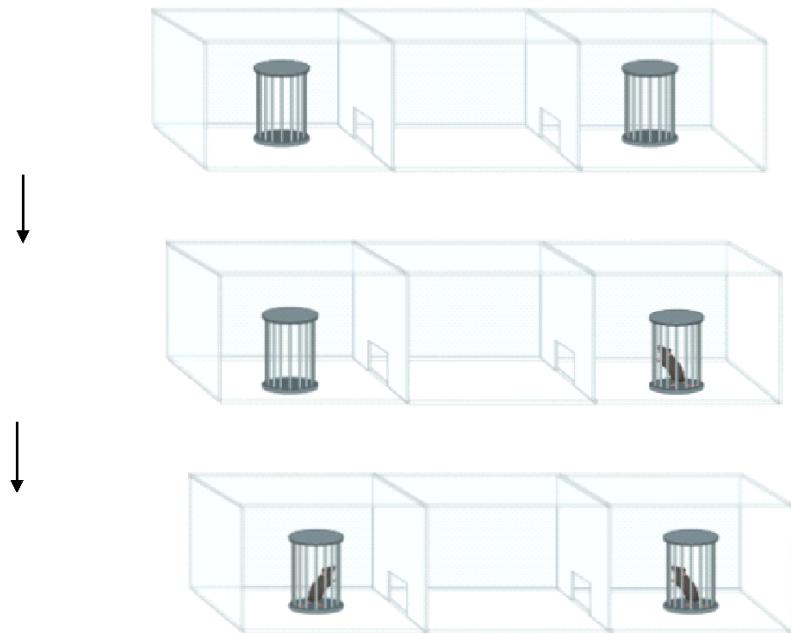


Figura 1. Representação do aparato utilizado para os testes de Interação e Reconhecimento social (KENTROP et al., 2018).

3.3.3. Atividade locomotora

Os animais foram testados em campo aberto (30 x 30 cm) e atividade locomotora foi registrada e analisada pelo software Any-maze. A atividade locomotora basal foi registrada por 30 min.

3.3.4. Reconhecimento de objetos

Camundongos estressados e naïve foram submetidos a uma sessão de habituação à arena de acrílico por 15 min. No dia seguinte, os animais foram submetidos a duas sessões teste. Na primeira sessão (Figura 2-A), os animais foram colocados individualmente na arena contendo dos objetos idênticos por 5 min (sessão de aquisição). Após 1 hora (Figura 2-B), os objetos da primeira sessão foram trocados por objeto idêntico (objeto conhecido, OC) e um objeto novo (ON). Os animais puderam explorar novamente a arena por 5 min durante a segunda sessão (sessão de

retenção). O tempo de exploração de cada objeto foi mensurada para a determinação do índice de reconhecimento (IR) através da seguinte fórmula:

$$IR = ((ON - OC) / (ON + OC))$$

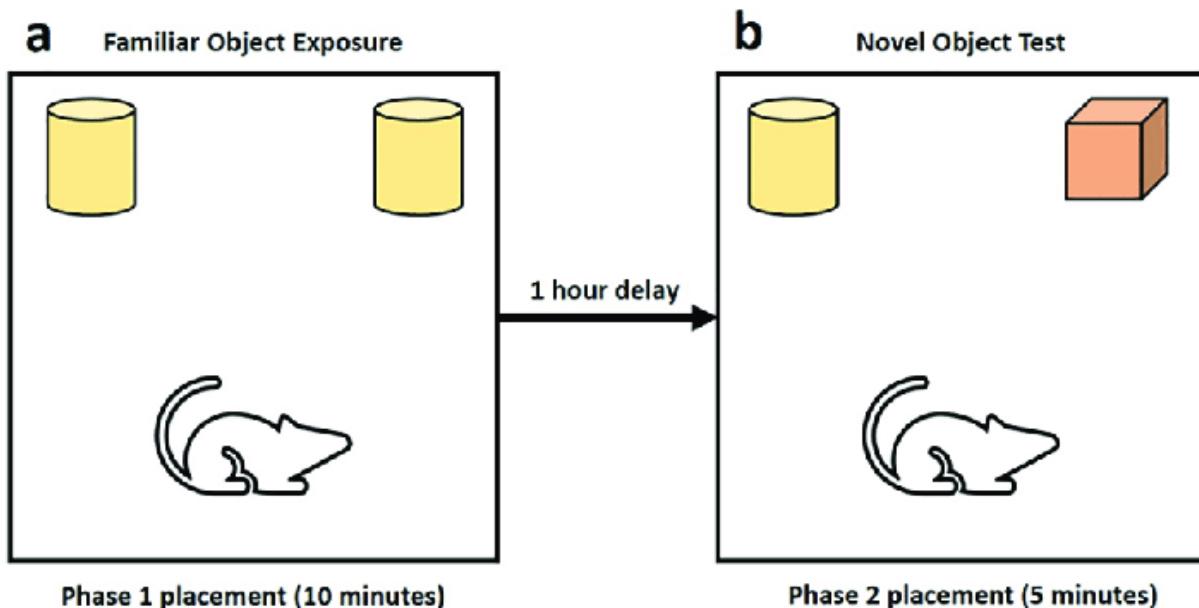


Figura 2. Representação esquemática do teste de Reconhecimento de objetos. (A) Fase 1: Exposição a objetos idênticos. (B) Fase 2: Teste de reconhecimento, contendo um objeto conhecido e um objeto novo (BARKER et al., 2017).

3.3.5. Resposta locomotora induzida por anfetamina

Os animais foram testados em campo aberto (30 x 30 cm) e atividade locomotora foi registrada e analisada pelo software Any-maze. A atividade locomotora basal foi registrada por 30 min. Após esse período, os animais receberam anfetamina (1,5 mg/kg, i.p.) ou salina e atividade locomotora foi registrada por mais 40 min.

3.3.6. Análise estatística

Os dados foram apresentados como a média \pm erro padrão da média. Para análise do efeito do estresse, a comparação do grupo controle (naïve) com o grupo estressado foi realizada pelo ANOVA de uma via.. As análises de variância foram seguidas do post-hoc de Bonferroni. A estatística foi considerada significativa se $p < 0,05$.

Resultados e discussão

4. Resultados e discussão

Após a realização do protocolo de estresse de choque nas patas (FS) em fêmeas e machos adolescentes - choques diáários entre os PND 31 e PND 40, em fêmeas e machos adultos - entre os PND 65 e PND 74, os camundongos foram submetidos aos mesmos testes comportamentais demonstrados e analisados a seguir.

Avaliamos a porcentagem de entrada e de tempo gasto nos braços abertos e o número de entrada nos braços fechados. Os camundongos estressados na adolescência (FS) apresentaram um comportamento tipo-ansiedade indicado por uma menor porcentagem de entradas (Figura 3-A; Naïve: $28,92 \pm 3,21$; FS: $15,92 \pm 2,67$; $t= 3,09$; $df= 23$; $p= 0,005$) e de tempo nos braços abertos do LCE (Figura 3-B; Naïve: $25,38 \pm 4,99$; FS: $7,67 \pm 1,92$; $t= 3,21$; $df= 23$; $p= 0,004$). Uma diminuição no número de entradas nos braços fechados também foi observada em animais estressados (Figura 3-C; Naïve: $11,38 \pm 5,0$; FS: $8,58 \pm 1,02$; $t= 2,53$; $df= 23$; $p= 0,02$). Uma diminuição na exploração total do LCE também foi observada após a exposição a estressores por outros grupos de pesquisa (PADOVAN; GUIMARÃES, 2000).

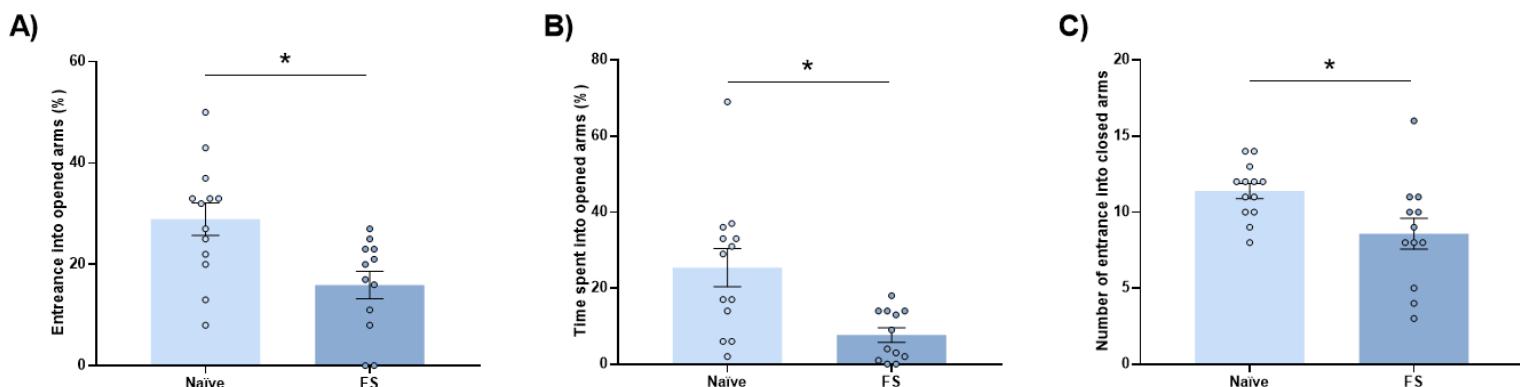


Figura 3. Impacto do estresse na adolescência em machos sobre a porcentagem de entrada nos braços abertos (A), porcentagem de tempo gasto nos braços abertos (B) e número de entrada nos braços fechados (C) no LCE(nave: n=13; FS: n=12; *p< 0,05). FS = *footshock*.

Para o estresse na idade adulta em machos, não foi observada diferenças estatísticas nem na porcentagem de entradas (Figura 4-A; Porcentagem de entrada nos braços abertos: Naïve: $31,1 \pm 3,99$; FS: $30,7 \pm 9,65$; $t= 0,038$; $df= 18$; $p= 0,96$), nem na porcentagem de tempo gasto nos braços abertos (Figura 4-B; Naïve: $30,3 \pm 5,98$; FS: $33 \pm 12,06$; $t= 0,20$; $df= 18$; $p= 0,84$). Entretanto, o número de entrada nos braços fechados foi estatisticamente menor em animais estressados em relação aos naïve (Figura 4-C; Naïve: $11,9 \pm 0,72$; FS: $7 \pm 1,41$; $t= 3,1$; $df= 18$; $p= 0,006$).

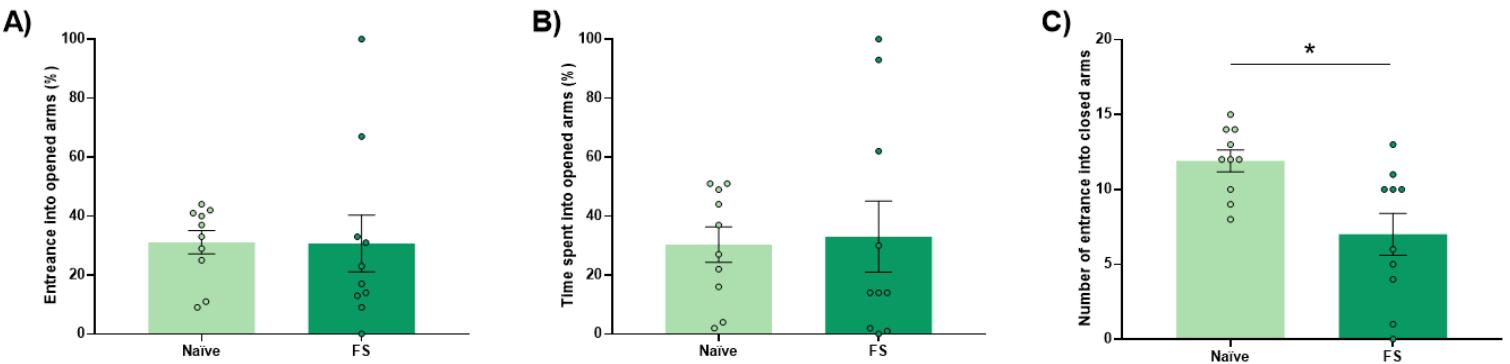


Figura 4. Impacto do estresse em machos na idade adulta sobre a porcentagem de entrada nos braços abertos (A), porcentagem de tempo gasto nos braços abertos (B) e número de entrada nos braços fechados (C) no LCE (naïve: n=10; FS: n=10; *p< 0,05). FS = footshock.

Nas fêmeas estressadas na adolescência, percebe-se menor porcentagem de entrada nos braços abertos no grupo estressado em relação ao grupo naïve (Figura 5-A; Naïve: $30,4 \pm 2,81$; FS: $20,4 \pm 4,90$; $t= 1,77$; $df= 18$; $p= 0,09$); apesar de não haver diferença estatística na porcentagem de tempo gasto nos braços abertos (Figura 5-B; Naïve: $19,8 \pm 3,83$; FS: $19,9 \pm 7,76$; $t= 0,011$; $df= 18$; $p= 0,99$). As fêmeas do grupo estressado também apresentaram menor número de entrada nos braços fechados em relação às naïve (Figura 5-C; Naïve: $13,1 \pm 1,59$; FS: $8,5 \pm 1,36$; $t= 2,2$; $df= 18$; $p= 0,04$).

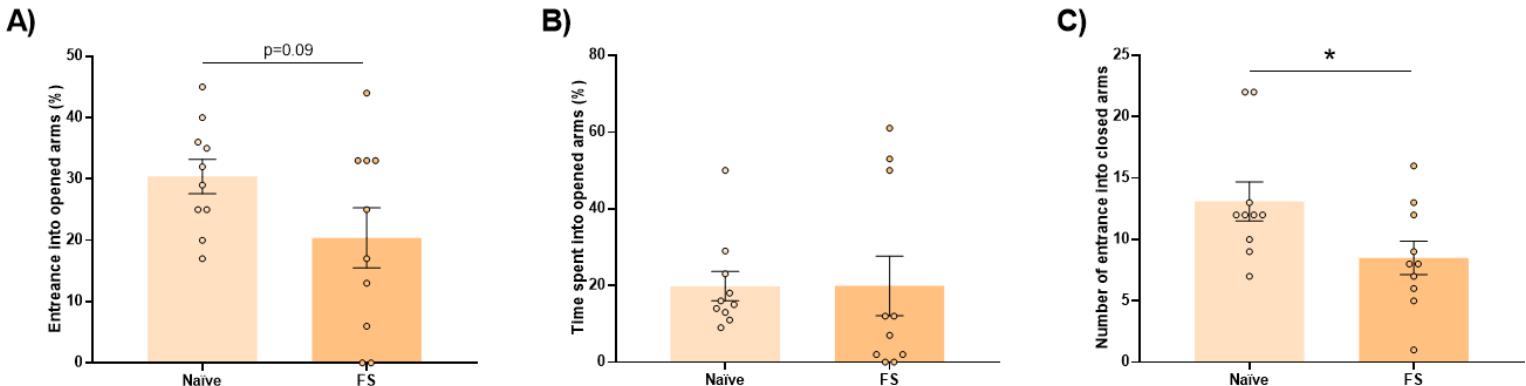


Figura 5. Impacto do estresse em fêmeas adolescentes sobre a porcentagem de entrada nos braços abertos (A), porcentagem de tempo gasto nos braços abertos (B) e número de entrada nos braços fechados (C) no LCE (naïve: n=10; FS: n=10; *p< 0,05). FS = footshock.

Assim como os dados obtidos nos machos estressados na idade adulta, as fêmeas não apresentaram diferença estatística na porcentagem de entrada (Figura 6-A; Naïve: $35,7 \pm 3,89$; FS: $25,6 \pm 4,97$; $t= 1,61$; $df= 18$; $p= 0,12$) e porcentagem de tempo gasto (Figura 6-B; Naïve: $27,8 \pm 5,18$; FS: $28,3 \pm 6,59$; $t= 0,05$; $df= 18$; $p= 0,95$) nos braços abertos. Porém, o número de entradas nos braços fechados também foi estatisticamente menor no grupo estressado em relação ao grupo naïve (Figura 6-C; Naïve: $14,1 \pm 1,21$; FS: $8,9 \pm 1,40$; $t= 2,81$; $df= 18$; $p= 0,01$).

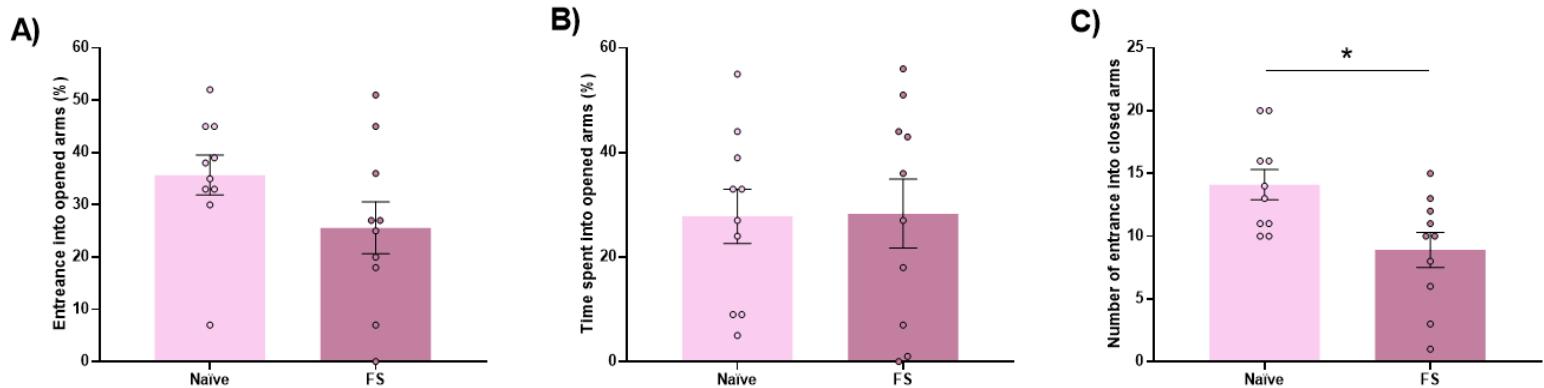


Figura 6. Impacto do estresse em fêmeas na idade adulta sobre a porcentagem de entrada nos braços abertos (A), porcentagem de tempo gasto nos braços abertos (B) e número de entrada nos braços fechados (C) no LCE (naïve: n=10; FS: n=10; *p< 0,05). FS = footshock.

A adolescência é caracterizada por uma janela de vulnerabilidade a fatores ambientais, como o estresse crônico, que pode interromper o desenvolvimento do cérebro e causar disfunções comportamentais, observado em distúrbios como depressão e esquizofrenia, por exemplo (PAGE; COUTELLIER, 2018). Em se tratando de esquizofrenia, especificamente, a maioria dos sintomas que caracterizam o distúrbio são os psicóticos, mas por volta de 65% dos pacientes também apresentam sintomas de ansiedade (TEMMINGH; STEIN, 2015). Os testes de LCE e Interação e discriminação social foram utilizados aqui para avaliar o comportamento do tipo ansioso nos animais estudados. Tanto fêmeas quanto machos estressados durante a adolescência apresentaram menor exploração dos braços abertos - com exceção da porcentagem de tempo gasto nos braços abertos de fêmeas estressadas na adolescência; que é um parâmetro associado à ansiedade neste teste. Enquanto, ambos os sexos não apresentaram diferença significativa no tempo de exploração nos grupos estressados na idade adulta.

O número de entrada nos braços fechados pode ser utilizado para avaliar a atividade locomotora dos animais. Todos os grupos estressados - machos e fêmeas, estressados na adolescência e na idade adulta, apresentaram menor número de entrada nos braços fechados em relação aos animais não estressados. Este dado pode indicar uma diminuição na atividade locomotora devido como consequência do aumento do nível de ansiedade. A redução da exploração do LCE na avaliação do impacto de estressores no comportamento de ratos já foi observada em trabalhos anteriores (PADOVAN; GUIMARÃES, 2000).

No teste de Interação Social, apenas os camundongos estressados na adolescência apresentaram diferença significativa, onde os animais FS apresentaram menor ISS que os naïve (Figura 7-A; Naïve: $0,61 \pm 0,03$; FS: $0,28 \pm 0,04$; $t= 5,916$; $df= 23$; $p > 0,0001$). Os animais estressados na idade adulta (Figura 7-B; Naïve: $0,45 \pm 0,05$; FS: $0,50 \pm 0,05$; $t= 0,65$; $df= 18$; $p= 0,52$) não apresentaram diferença significativa.

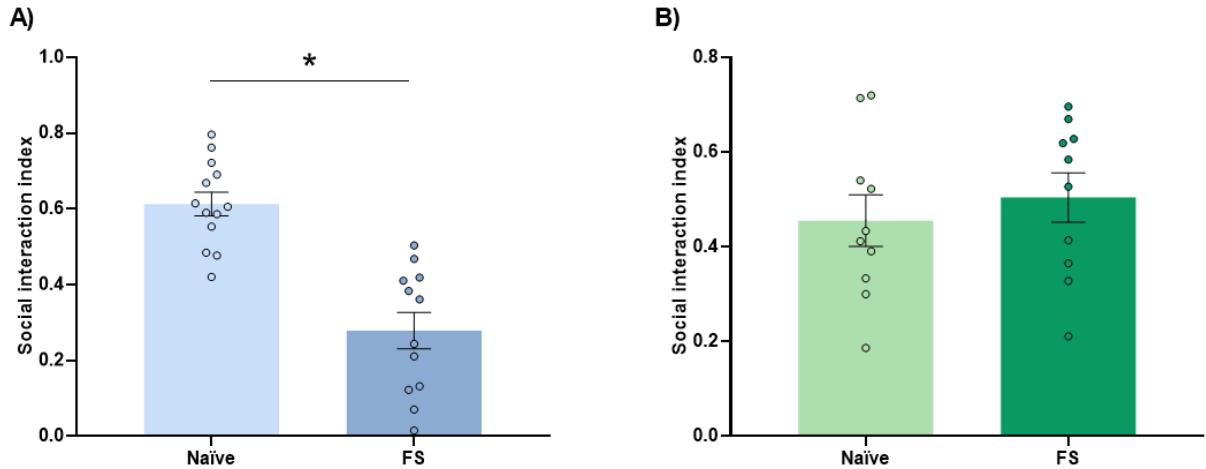


Figura 7. Impacto do estresse em machos na adolescência (A) e na idade adulta (B) sobre o Índice de interação social (naïve: n=13; FS: n=12; *p<0,05). FS = footshock.

Em fêmeas, o mesmo padrão foi observado. No grupo de estressadas na adolescência, o grupo FS apresentou menor IIS em relação às fêmeas naïve (Figura 8-A; Naïve: $0,54 \pm 0,02$; FS: $0,36 \pm 0,07$; $t= 2,33$; $df= 18$; $p= 0,03$), enquanto não houve diferença estatística nas fêmeas estressadas na idade adulta (Figura 8-B; Naïve: $0,36 \pm 0,06$; FS: $0,43 \pm 0,04$; $t= 0,87$; $df= 18$; $p= 0,39$).

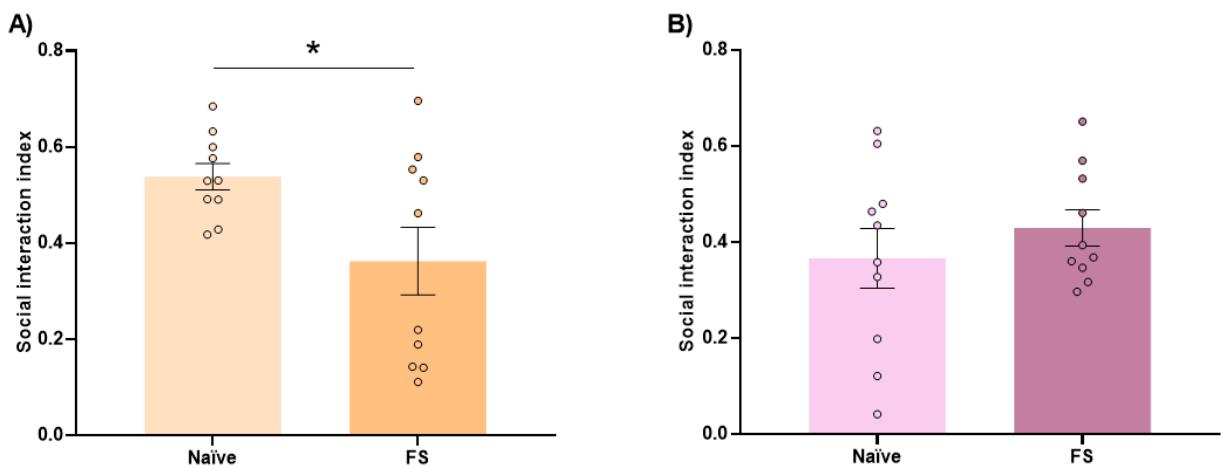


Figura 8. Impacto do estresse em fêmeas na adolescência (A) e na idade adulta (B) sobre o Índice de interação social (naïve: n=10; FS: n=10; *p< 0,05). FS = footshock.

Em se tratando de discriminação social, os camundongos estressados na adolescência (FS) apresentaram significativamente menor IID em relação aos naïve (Figura 9-A; Naïve: $0,52 \pm 0,09$; FS: $0,22 \pm 0,05$ $t= 2,90$; $df= 23$; $p= 0,008$). Enquanto os animais estressados na idade adulta não apresentaram diferença significativa (Figura 9-B; Naïve: $0,38 \pm 0,07$; FS: $0,27 \pm 0,10$; $t= 0,93$; $df= 18$; $p= 0,30$).

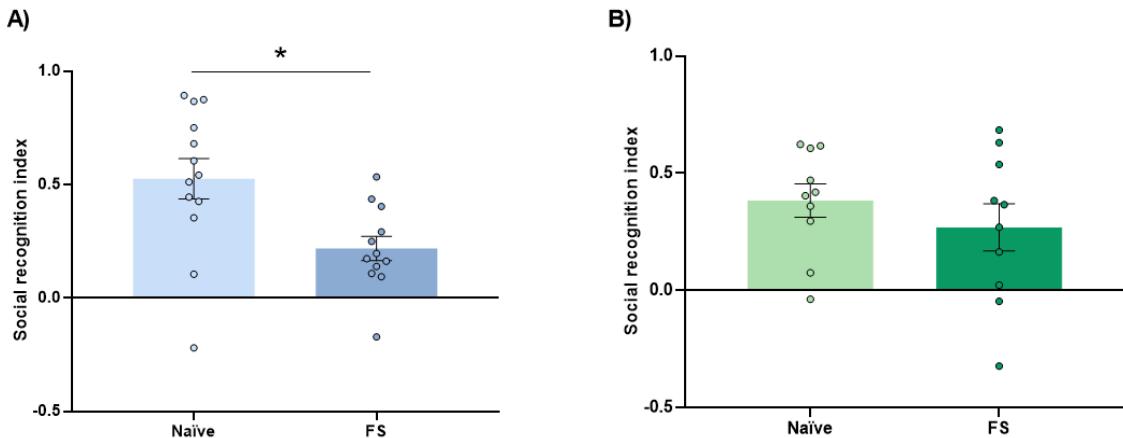


Figura 9. Impacto do estresse em machos na adolescência (A) e na idade adulta (B) sobre o Índice de discriminação social (naïve: n=13; FS: n=12; *p< 0,05). FS = footshock.

Nas fêmeas, o grupo FS apresentou maior IID em relação ao grupo naïve em animais estressados na adolescência (Figura 10-A; Naïve: $0,23 \pm 0,05$; FS: $0,27 \pm 0,06$; $t= 0,58$; $df= 18$; $p= 0,56$), semelhante com o que foi observado em estressadas na idade adulta (Figura 10-B; Naïve: $0,23 \pm 0,09$; FS: $0,32 \pm 0,09$; $t= 0,68$; $df= 18$; $p= 0,5$). Entretanto, em nenhuma das idades a diferença foi estatisticamente relevante.

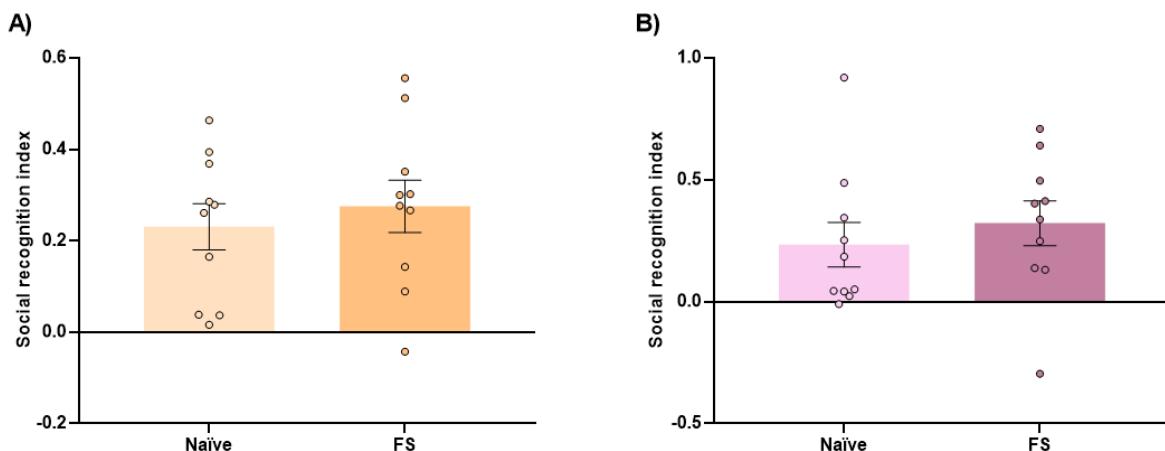


Figura 10. Impacto do estresse em fêmeas na adolescência (A) e na idade adulta (B) sobre o Índice de discriminação social (naïve: n=10; FS: n=10). FS = footshock.

Mais uma vez pode-se observar que os animais estressados na adolescência apresentaram maior comportamento do tipo ansioso, em relação aos animais na idade adulta. Machos estressados na adolescência apresentaram menor IIS e IID, enquanto as fêmeas, também estressadas na adolescência, demonstraram menor IIS em relação aos animais não estressados. A literatura apresenta dois tipos de interpretações para este teste após a exposição a estressores: enquanto alguns estudos indicam uma diminuição na preferência social, outros indicam um aumento expressivo, que pode ser associado a uma tentativa do animal em atenuar socialmente um estado do tipo ansiedade causado pela exposição ao estresse (CONTESTABILE et al., 2021). Nossos animais apresentaram um comportamento parecido com a primeira hipótese.

Na sessão de habituação do NOR, foi avaliado o impacto do estresse na adolescência e idade adulta sobre a atividade locomotora dos animais no campo aberto. Não houve diferença significativa entre os animais machos naïve e estressados, tanto nos camundongos estressados na adolescência (Figura 11-A; Naïve: $32,42 \pm 2,12$; FS: $34,79 \pm 3,15$; $t=0,63$; $df=23$; $p=0,53$), quanto nos animais estressados na idade adulta (Figura 11-B; Naïve: $37,62 \pm 2,79$; FS: $30,99 \pm 2,73$; $t=1,7$; $df=18$; $p=0,11$).

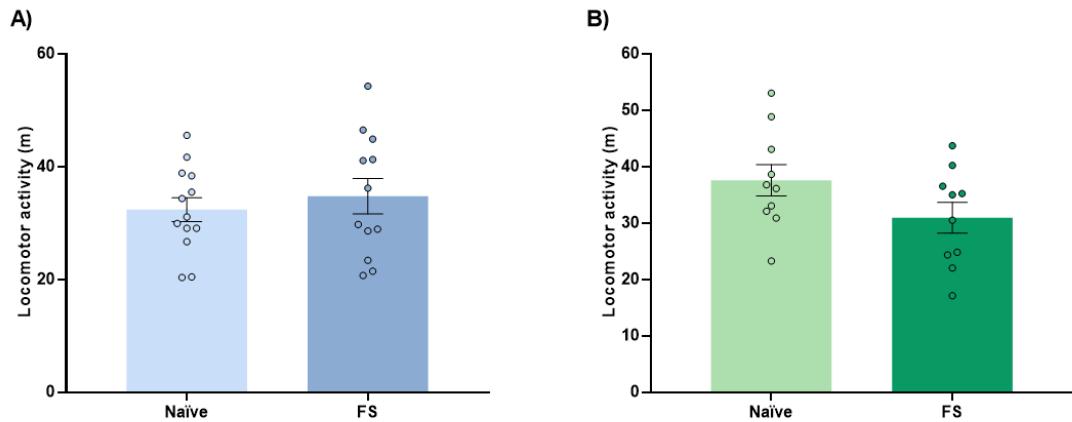


Figura 11. Impacto do estresse em machos na adolescência (A) e na idade adulta (B) sobre a Atividade locomotora (naïve: n=13; FS: n=12). FS = *footshock*.

Um resultado semelhante foi observado nas fêmeas, uma vez que não houve diferença significativa nos resultados da atividade locomotora entre o grupo estressadas e naïve, tanto em fêmeas estressados na adolescência (Figura 12-A; Naïve: $32,65 \pm 2,44$; FS: $34,77 \pm 2,16$; $t=0,65$; $df=18$; $p=0,52$), quanto em fêmeas estressadas na idade adulta (Figura 12-B; Naïve: $27,55 \pm 3,15$; FS: $25,15 \pm 3,17$; $t=0,53$; $df=18$; $p=0,59$).

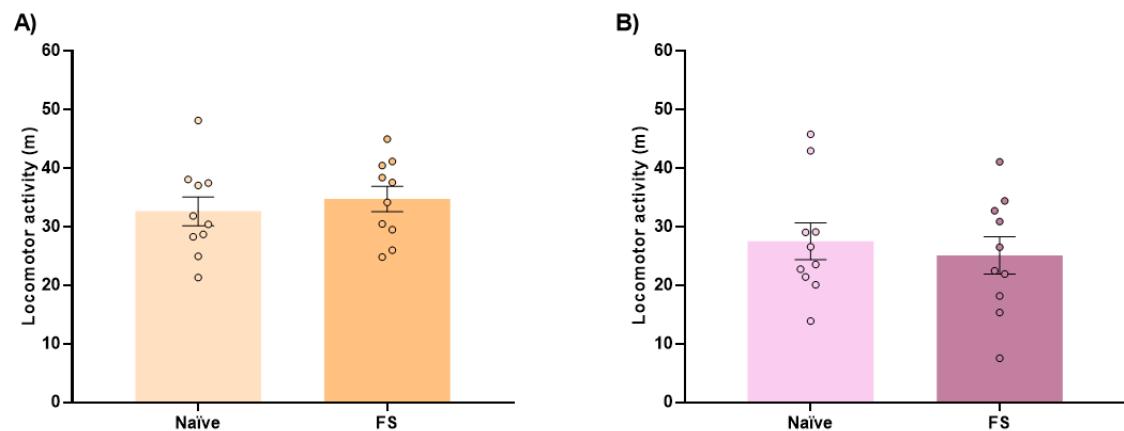


Figura 12. Impacto do estresse em fêmeas na adolescência (A) e na idade adulta (B) sobre a Atividade locomotora (naïve: n=10; FS: n=10; $p<0,05$). FS = *footshock*.

O teste de reconhecimento de objetos é um teste cognitivo comum para os roedores. Tanto em machos estressados na adolescência (Figura 13-A; Naïve: $0,50 \pm 0,08$; FS: $0,18 \pm 0,07$; $t= 2,96$; $df= 23$; $p= 0,007$), quanto machos estressados na idade adulta (Figura 13-B; Naïve: $0,45 \pm 0,08$; FS: $0,40 \pm 0,06$; $t= 0,56$; $df= 18$; $p= 0,58$), o índice de NOR foi menor em animais estressados em relação aos naïve. Entretanto, somente nos estressados na adolescência houve diferença estatística significativa.

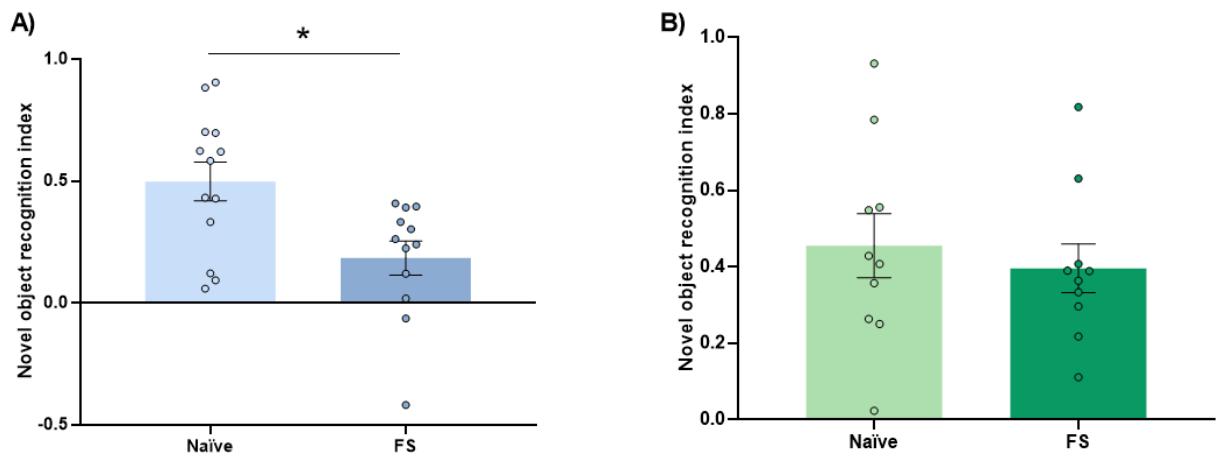


Figura 13. Impacto do estresse em machos na adolescência (A) e na idade adulta (B) sobre o Índice de reconhecimento de objetos (naïve: n=13; FS: n=12; *p< 0,05). FS = footshock.

Apenas nas fêmeas estressadas na adolescência houve relevância estatística, mostrando que o grupo FS teve menor índice de reconhecimento de objetos do que o grupo naïve (Figura 14-A; Naïve: $0,42 \pm 0,04$; FS: $0,30 \pm 0,036$; $t= 2,19$; $df= 18$; $p= 0,04$). O grupo estressado na idade adulta apresentou resultados semelhantes entre animais estressados e controle (Figura 14-B; Naïve: $0,27 \pm 0,05$; FS: $0,27 \pm 0,04$; $t= 0,1643$; $df= 18$; $p= 0,87$), contanto, sem diferença estatística.

Além de sintomas do tipo-ansiedade, os possíveis déficits cognitivos em resposta ao estresse foram avaliados. Como já demonstrado por Gomes e Grace (2017), o estresse na adolescência induziu prejuízo cognitivo em ratos, avaliado pelo teste de reconhecimento de objetos (NOR). Nossos resultados demonstram esse prejuízo em camundongos, uma vez que ambos os sexos apresentaram menor índice de reconhecimento de objetos em animais estressados na adolescência. O estresse na idade adulta não induziu prejuízo cognitivo avaliado pelo NOR.

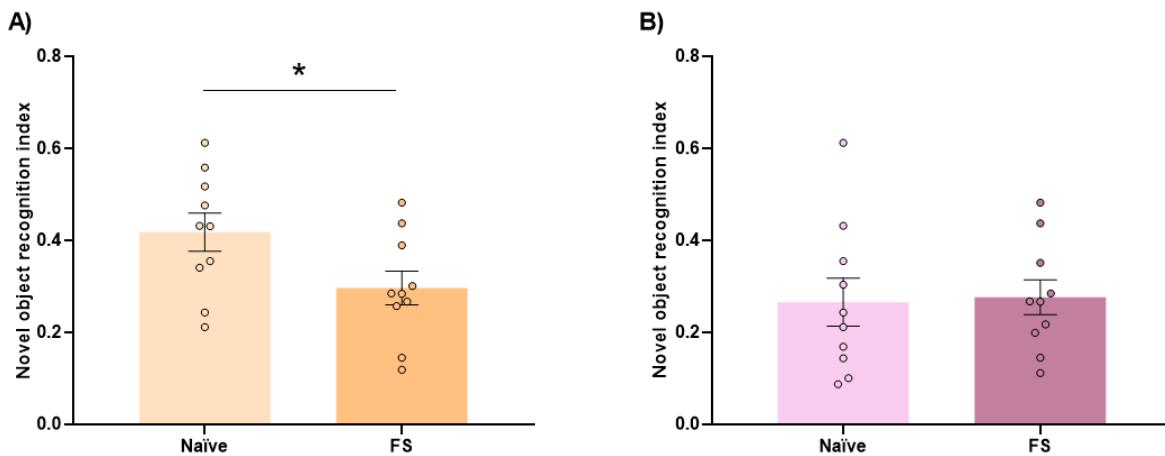


Figura 14. Impacto do estresse em fêmeas na adolescência (A) e na idade adulta (B) sobre o Índice de reconhecimento de objetos (naïve: n=10; FS: n=10; *p<0,05). FS = footshock.

Na avaliação da resposta locomotora à anfetamina, foi observado, em machos que o estresse na adolescência aumentou a resposta locomotora após a administração aguda de anfetamina (Figura 15-A; Naïve: $255 \pm 13,45$; FS: $338,5 \pm 17,89$; t= 0,373; df= 18; p= 0,001) uma alteração que não foi observada após o estresse na idade adulta (Figura 15-B; Naïve: $212,6 \pm 25,39$; FS: $235,6 \pm 23,58$; t= 0,66; df= 18; p= 0,51).

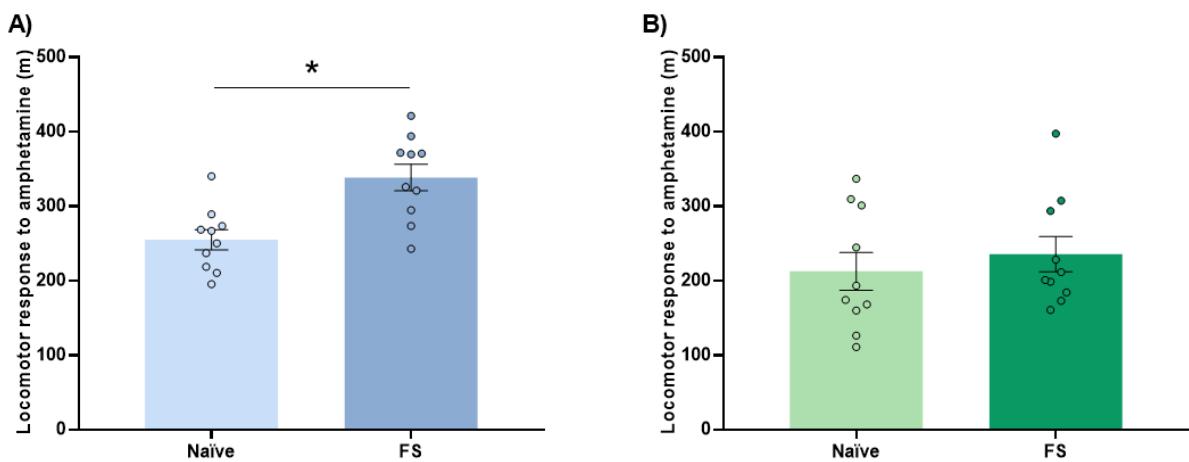


Figura 15. Impacto do estresse em machos na adolescência (A) e na idade adulta (B) sobre a Resposta locomotora à anfetamina (naïve: n=10; FS: n=10; *p< 0,05). FS = footshock.

Nas fêmeas, tanto as estressadas durante a adolescência (Figura 16-A; Naïve: $361 \pm 22,16$; FS: $387,8 \pm 27,08$; t= 0,76; df= 18; p= 0,45) quanto as estressadas na idade adulta (16-B; Naïve: $272 \pm 20,66$; FS: $348,2 \pm 37,77$; t= 1,71; df= 17; p= 0,10), o grupo estressado apresentou maior atividade locomotora em resposta à anfetamina. Entretanto, nem o grupo estressado na adolescência, nem o estressado na idade adulta, apresentou diferença estatisticamente relevante.

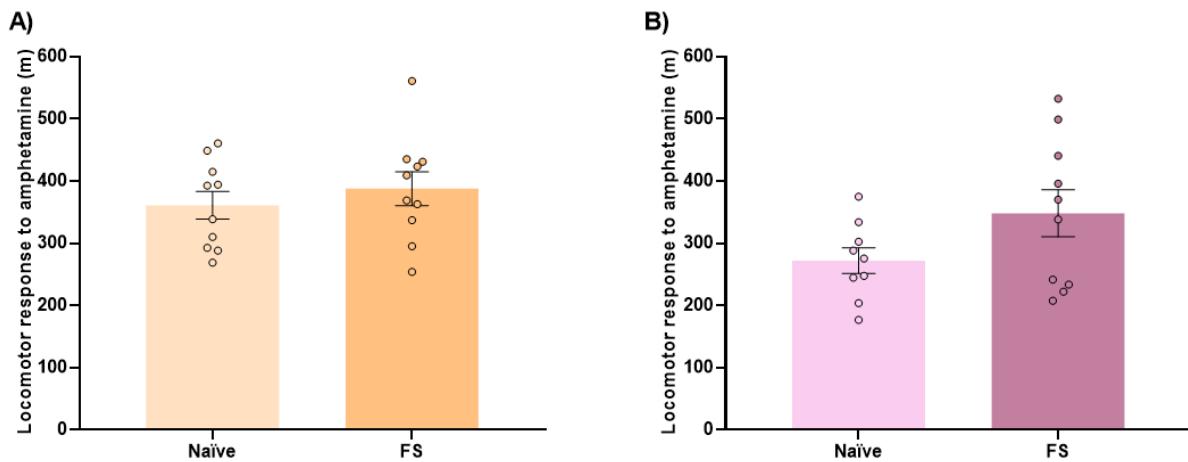


Figura 16. Impacto do estresse em fêmeas na adolescência (A) e na idade adulta (B) sobre a Resposta locomotora induzida por anfetamina (naïve: n=9; FS: n=10; *p< 0,05). FS = footshock.

Diversas evidências sugerem que disfunções no sistema dopaminérgico podem ser a base da fisiopatologia de vários transtornos psiquiátricos, incluindo esquizofrenia e depressão (GRACE, 2016). A esquizofrenia, por exemplo, é caracterizada por um estado hiperdopaminérgico. Em humanos, o estado de atividade aumentada do sistema dopaminérgico é refletido pela maior captação de fluorodopa estriatal, que pode ser medida por exames de imagem, como a tomografia por emissão de pósitrons (KÄTZEL et al., 2020). Já em animais, pode ser indicado por uma resposta exacerbada a uma baixa dose de anfetamina (PIERCE; KALIVAS, 1997). Nossos resultados apontam aumento dessa resposta locomotora à anfetamina em camundongos estressados na adolescência. Enquanto os camundongos estressados na idade adulta não apresentaram esse aumento. Dados similares foram observados pelo nosso grupo em ratos adultos que foram submetidos ao estresse na adolescência (Gomes e Grace 2017).

Entretanto, as fêmeas estressadas durante a adolescência não apresentaram aumento significativo de resposta locomotora à anfetamina quando testadas. Essa diferença pode estar relacionada às respostas do eixo HPA aos estressores em função dos hormônios gonadais. Como o eixo HPA é um sistema sexualmente diferenciado, que atua em um substrato sexualmente diferenciado, e que passa por uma maior diferenciação sexual na adolescência, as consequências da exposição a estressores provavelmente diferem para machos e fêmeas (MCCORMICK; MATHEWS, 2007). O ciclo estral de camundongos fêmeas não foi monitorado para esses experimentos.

Conclusões

5. Conclusões

Considerando que a ansiedade em roedores está relacionada à aversão a espaços abertos, pudemos observar que, tanto os machos estressados na adolescência, quanto as fêmeas estressadas na adolescência, apresentaram menor porcentagem de entrada nos braços abertos do LCE em relação aos animais não estressados. Enquanto ambos os sexos estressados na idade adulta não apresentaram diferença estatística nem na porcentagem de entrada, nem na porcentagem de tempo gasto nos braços abertos. Por outro lado, um dado foi consistente em todos os grupos estressados (machos e fêmeas, estressados na adolescência e na idade adulta): apresentaram menor número de entrada nos braços fechados em relação aos animais não estressados. Este dado pode indicar que os animais estressados, em qualquer idade, apresentam redução da exploração do LCE.

Ainda sobre o comportamento do tipo ansioso, foi possível verificar que, estatisticamente, os machos e as fêmeas estressadas na adolescência apresentaram menor índice de interação social e, somente os machos estressados na adolescência apresentaram menor índice de discriminação social com diferença estatística.

Em se tratando de avaliação da cognição dos animais, tanto os machos quanto as fêmeas estressadas na adolescência demonstraram menor índice de reconhecimento de objetos, apontando para um prejuízo cognitivo. Sobre o estado hiperdopaminérgico, característico no distúrbio de esquizofrenia, e medido pela resposta locomotora à anfetamina, somente o grupo de machos estressados na adolescência apresentou os maiores valores de resposta locomotora induzida por anfetamina. Em fêmeas não foi possível observar resposta semelhante, podendo estar relacionado às diferentes respostas à estressores relacionadas aos hormônios gonadais.

Em posse destes resultados, é possível observar as interferências negativas que o estresse impõe sobre os animais em se tratando de comportamento do tipo ansioso e prejuízo cognitivo, principalmente em animais estressados na adolescência. Além de possíveis respostas sexo-específicas à estressores. Espera-se que trabalhos como este ajudem a comunidade a entender melhor a neurobiologia de transtornos psiquiátricos e desenvolver novas drogas para o tratamento dessas patologias.

Referências bibliográficas

6. Referências bibliográficas

1. ABI-DARGHAM, A. et al. Increased baseline occupancy of D2 receptors by dopamine in schizophrenia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 14, p. 8104–8109, 2000.
2. BARKER, T. H. et al. Assessment of housing density, space allocation and social hierarchy of laboratory rats on behavioural measures of welfare. **PloS one**, v. 12, n. 9, p. e0185135, 2017.
3. BELUJON, P.; GRACE, A. A. Regulation of dopamine system responsiveness and its adaptive and pathological response to stress. **Proceedings. Biological sciences**, v. 282, n. 1805, p. 20142516, 2015.
4. CONTESTABILE, A. et al. Deconstructing the contribution of sensory cues in social approach. **The European journal of neuroscience**, v. 53, n. 9, p. 3199–3211, 2021.
5. COUTUREAU, E. et al. Selective lesions of the entorhinal cortex, the hippocampus, or the fimbria-fornix in rats: a comparison of effects on spontaneous and amphetamine-induced locomotion. **Experimental brain research**, v. 131, n. 3, p. 381–392, 2000.
6. FANSELOW, M. S. Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. **Behavioural brain research**, v. 110, n. 1–2, p. 73–81, 2000.
7. GOMES, F. V.; RINCÓN-CORTÉS, M.; GRACE, A. A. Adolescence as a period of vulnerability and intervention in schizophrenia: Insights from the MAM model. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 70, p. 260–270, 2016.
8. GOMES, F. V.; ZHU, X.; GRACE, A. A. The pathophysiological impact of stress on the dopamine system is dependent on the state of the critical period of vulnerability. **Molecular psychiatry**, v. 25, n. 12, p. 3278–3291, 2020.
9. GRACE, A. A. Dysregulation of the dopamine system in the pathophysiology of schizophrenia and depression. **Nat Rev Neurosci**, v. 17, n. 8, p. 524–532, 2016.
10. GRAYSON, B. et al. Assessment of disease-related cognitive impairments using the novel object recognition (NOR) task in rodents. **Behavioural brain research**, v. 285, p. 176–193, 2015.
11. HOMBERG, J. R.; WÖHR, M.; ALENINA, N. Comeback of the rat in biomedical research. **ACS chemical neuroscience**, v. 8, n. 5, p. 900–903, 2017.

12. KÄTZEL, D. et al. Hippocampal hyperactivity as a druggable circuit-level origin of aberrant salience in schizophrenia. **Frontiers in pharmacology**, v. 11, p. 486811, 2020.
13. KENTROP, J. et al. Effects of maternal deprivation and complex housing on rat social behavior in adolescence and adulthood. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 12, p. 193, 2018.
14. KESHAVAN, M. S. et al. Changes in the adolescent brain and the pathophysiology of psychotic disorders. **The lancet. Psychiatry**, v. 1, n. 7, p. 549–558, 2014.
15. KRAEUTER, A.-K.; GUEST, P. C.; SARNYAI, Z. The elevated plus maze test for measuring anxiety-like behavior in rodents. **Methods in molecular biology** (Clifton, N.J.), v. 1916, p. 69–74, 2019.
16. LECOURTIER, L. et al. Combined lesions of GABAergic and cholinergic septal neurons increase locomotor activity and potentiate the locomotor response to amphetamine. **Behavioural brain research**, v. 213, n. 2, p. 175–182, 2010.
17. LEUNG, C.; KIM, J. C.; JIA, Z. Three-chamber social approach task with optogenetic stimulation (mice). **Bio-protocol**, v. 8, n. 24, p. e3120, 2018.
18. LUEPTOW, L. M. Novel object recognition test for the investigation of learning and memory in mice. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 126, 2017.
19. MCCORMICK, C. M.; MATHEWS, I. Z. HPA function in adolescence: role of sex hormones in its regulation and the enduring consequences of exposure to stressors. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 86, n. 2, p. 220–233, 2007.
20. PACÁK, K.; PALKOVITS, M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. **Endocrine reviews**, v. 22, n. 4, p. 502–548, 2001.
21. PADOVAN, C. M.; GUIMARÃES, F. S. Restraint-induced hypoactivity in an elevated plus-maze. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 1, p. 79–83, 2000.
22. PAGE, C. E.; COUTELLIER, L. Adolescent stress disrupts the maturation of anxiety-related behaviors and alters the developmental trajectory of the prefrontal cortex in a sex- and age-specific manner. **Neuroscience**, v. 390, p. 265–277, 2018.
23. PAUS, T.; KESHAVAN, M.; GIEDD, J. N. Why do many psychiatric disorders emerge during adolescence? **Nature reviews. Neuroscience**, v. 9, n. 12, p. 947–957, 2008

24. PIAZZA, P. V.; LE MOAL, M. The role of stress in drug self-administration. **Trends in pharmacological sciences**, v. 19, n. 2, p. 67–74, 1998.
25. PIERCE, R. C.; KALIVAS, P. W. A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. **Brain research. Brain research reviews**, v. 25, n. 2, p. 192–216, 1997.
26. ROMEO, R. D.; MCEWEN, B. S. Stress and the adolescent brain. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1094, n. 1, p. 202–214, 2006.
27. TEMMINGH, H.; STEIN, D. J. Anxiety in patients with schizophrenia: Epidemiology and management. **CNS drugs**, v. 29, n. 10, p. 819–832, 2015.
28. TRAISSARD, N. et al. Combined damage to entorhinal cortex and cholinergic basal forebrain neurons, two early neurodegenerative features accompanying Alzheimer's disease: effects on locomotor activity and memory functions in rats. **Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 32, n. 4, p. 851–871, 2007.
29. TUFVESSON-ALM, M. et al. Repeated administration of LPS exaggerates amphetamine-induced locomotor response and causes learning deficits in mice. **Journal of neuroimmunology**, v. 349, n. 577401, p. 577401, 2020.
30. VALENTI, O.; LODGE, D. J.; GRACE, A. A. Aversive stimuli alter ventral tegmental area dopamine neuron activity via a common action in the ventral hippocampus. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 31, n. 11, p. 4280–4289, 2011.