

**Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP**

**Campus São Paulo**

**Escola Paulista de Medicina – EPM**

**Curso Biomedicina**

**NATHALIA NOVAES DUARTE DA SILVA**

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM NEUROPEPTÍDEO Y EM UM  
MODELO DE VULNERABILIDADE AO TRANSTORNO DE ESTRESSE  
PÓS-TRAUMÁTICO INDUZIDO PELA PRIVAÇÃO MATERNA**

**São Paulo, SP**

**2023**

**NATHALIA NOVAES DUARTE DA SILVA**

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM NEUROPEPTÍDEO Y EM UM  
MODELO DE VULNERABILIDADE AO TRANSTORNO DE ESTRESSE  
PÓS-TRAUMÁTICO INDUZIDO PELA PRIVAÇÃO MATERNA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao  
Curso de Graduação na Universidade Federal de São  
Paulo, para obtenção do grau de Biomédica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Deborah Suchecki

**São Paulo, SP**

**2023**

Silva, Nathalia Novaes Duarte da

**Efeitos do tratamento com neuropeptídeo Y em um modelo de vulnerabilidade ao Transtorno de Estresse Pós-Traumático induzido pela privação materna** / Nathalia Novaes Duarte da Silva. – São Paulo, 2023.

57 f

Orientador: Deborah Suchecki

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) -  
Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina.

1. Estresse. 2. Privação materna. 3. TEPT. 4. Neuropeptídeo Y. 5.  
Modelo animal.

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho e todo o esforço a minha mãe, Miriam, e meu pai, Odair. Se realizo meu sonho de estudar e me formar em uma Universidade Pública, é por vocês. Obrigada por valorizar tanto a educação e o estudo em minha vida, e sempre me incentivarem a buscar o conhecimento. Vocês sempre me fizeram acreditar que eu podia mais, até alcançar as estrelas, e eu não seria nada sem vocês.

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente ao Lucas, meu porto seguro desde 2016 e que aguentou todas as mudanças, loucuras e incertezas na minha vida, sempre cuidando muito bem de mim.

A família do Lucas, um grupo tão divertido e reconfortante, que sempre me acolheu, faça chuva ou faça sol. Todos os almoços de Domingo, todos os aniversários, todas as comemorações quando André voltava de Minas Gerais, todos eles me ajudavam escapar da realidade por um tempo.

À Prof<sup>a</sup>. Deborah, de quem sou profunda admiradora; ela não só trouxe o projeto à vida quanto ouviu todas as minhas ideias, solucionou todos os problemas e soube deixar a Ciência e a curiosidade florescerem em mim.

À Prof<sup>a</sup> Ivone, que também sempre admirei, com quem tenho tantas coisas em comum, e que, com suas aulas, mudou o curso da minha trajetória.

Ao Departamento de Psicobiologia e à AFIP, obrigada por ser minha casa desde 2018, e fornecer a estrutura e recursos para a realização deste trabalho.

Aos Bioteristas e Técnicos do Departamento (Ricardo, Vinícius, Ivan, Zé, Gilberto), vocês são a força invisível que faz tudo funcionar! Muito obrigada, pela paciência e dedicação enormes!

À CAPES/CNPq, que fizeram ser possível que eu participasse ativamente de todos os procedimentos deste trabalho;

Aos meus amigos, de tantas épocas e locais diferentes. Vocês sabem quem são, e sou eternamente grata.

À turma 52 de Biomedicina: A graduação não seria a mesma sem vocês!

Por fim, à UNIFESP. A universidade que me proporcionou tantos sonhos realizados e um mundo de conhecimento vasto e lindo. Nunca me cansarei de tecer elogios a essa instituição, que me formou Biomédica, Cientista, e mais do que isso, participou da minha construção como pessoa. Tenho orgulho de ser filha da Universidade Pública, onde o Conhecimento é Público!

## Resumo

O Transtorno de Estresse Pós-Traumático (TEPT) é caracterizado por alterações comportamentais e neurobiológicas ocasionadas por um evento traumático. Sintomas de ansiedade e depressão e uma resposta fisiológica desregulada de cortisol são observados nos pacientes com este transtorno. As adversidades na infância, como perda de cuidados parentais, podem aumentar a vulnerabilidade para o desencadeamento de TEPT. Ademais, as concentrações de neuropeptídeo Y (NPY), considerado um importante fator de resiliência ao estresse, estão reduzidas em pacientes com TEPT. Entretanto, é difícil estabelecer relações de causa e consequência em estudos transversais com seres humanos e modelos animais podem auxiliar a estabelecer se a redução do NPY é um biomarcador de vulnerabilidade ao transtorno ou consequência do evento traumático. Em um estudo anterior, mostramos que a privação materna por 24 h no dia pós-natal (DPN) 3 (PM3), um modelo de negligência extrema, induz comportamentos do tipo ansioso e depressivo e redução da imunorreatividade do NPY na amígdala e hipocampo dorsal. Portanto, o objetivo deste trabalho foi testar a efetividade do tratamento preventivo com NPY, administrado logo após um evento traumático, em ratos machos e fêmeas adultos submetidos à PM3. Este tratamento foi comparado ao tratamento com veículo e Diazepam (DZP), um ansiolítico clássico que não é eficiente para tratar TEPT. O projeto foi realizado em dois experimentos: Experimento 1: Escolha de melhor dose para o tratamento com NPY. Ratos *Wistar* machos foram submetidos ao trauma por imersão em água (*Underwater trauma* – UWT) no DPN 63 e tratados com veículo (água destilada) ou NPY nas doses de 60 µg/kg ou 75 µg/kg, por 3 dias consecutivos, via intraperitoneal (i.p). Trinta dias depois, os animais foram avaliados em um teste de auto-cuidado e um teste de ansiedade (labirinto em cruz elevado – LCE). Experimento 2: Efeitos do tratamento farmacológico com NPY ou DZP em comportamentos do tipo-TEPT. Ninhadas de ratos *Wistar* machos e fêmeas foram distribuídos nos grupos controle (CTL) e PM3. No dia 74, as ninhadas foram designadas NPY ou DZP; 1 macho e 1 fêmea (par) foram treinados a nadar por 1 min por 6 dias (UWT-) e três pares nadaram por 5 dias e no 6º dia foram submergidos por 45 s. Nas ninhadas DZP, após o trauma, um par recebeu veículo e dois pares, DZP (2 mg/kg de peso) por 3 dias consecutivos. Nas ninhadas NPY utilizamos o mesmo delineamento, mas o tratamento foi com NPY 75 µg/kg. Trinta dias depois do trauma, todos os animais, exceto os não-testados (NT)

foram avaliados como no Experimento 1. Os resultados do Experimento 1 mostraram que NPY 60 µg/kg teve efeito ansiogênico, embora não tenha se detectado diferença estatística entre os grupos. Os resultados preliminares do Experimento 2 mostraram que, independente do grupo, as fêmeas expressam mais comportamentos de autocuidado. No LCE, as fêmeas ambularam mais e permaneceram mais tempo nos braços abertos do que machos. O tratamento com Diazepam ou NPY teve efeito ansiolítico em alguns parâmetros do LCE. Esses resultados mostram que ambos os tratamentos parecem ter efeito benéfico em comportamentos de ansiedade pós-trauma.

**Palavras-chave:** privação materna, estresse, modelo animal, TEPT, neuropeptídeo Y

## Abstract

Posttraumatic Stress Disorder (PTSD) is characterized by behavioural and neurobiological changes caused by a traumatic event. Anxiety and depression symptoms and altered physiological cortisol response are observed in patients with this disorder. Childhood adversities, such as loss of parental care, may increase vulnerability to developing PTSD. Furthermore, neuropeptide Y (NPY) concentration, considered an important resilience factor to stress, is reduced in PTSD patients. Nevertheless, it's difficult to establish cause-consequence relationships in cross-sectional studies in humans, and animal models might help determine if NPY reduction is a biomarker for vulnerability to the disorder or a consequence of the trauma. In a previous study, we showed that 24-hour maternal deprivation on postnatal day (PND) 3 (DEP3), a model of extreme negligence, induces anxiety and depressive-like behaviours and a decrease of immunoreactivity of NPY in the amygdala and dorsal hippocampus. Therefore, the aim of this project was to test effectiveness of a preventive treatment with NPY, administered after a traumatic event, in male and female adult rats exposed to DEP3. This treatment was compared to treatment with a vehicle and Diazepam (DZP), a classic anxiolytic that is not effective in managing PTSD. Two experiments were executed: Experiment 1: Choosing the best dose for NPY treatment. Male *Wistar* rats were exposed to Underwater trauma (UWT) on PND 63 and treated with vehicle (distilled water) or NPY (in a 60 µg/kg or 75 µg/kg dosage), on three consecutive days, by intraperitoneal injection (i.p.). Thirty days later, animals were evaluated in a self-care test and an anxiety test (elevated plus maze – EPM). Experiment 2: Effects of NPY or DZP treatment in PTSD-like behaviours. Litters of male and female *Wistar* rats were distributed in control (CTL) and PM3 groups. On PND 74, litters were designated to NPY or DZP conditions; one male and one female (pair) were trained to swim for 1 min for 6 days (UWT-) and three pairs swam for 5 days and on the 6<sup>th</sup> day were submerged for 45 s. On DZP litters, after the trauma, a pair was treated with vehicle and two pairs, DZP (2 mg/kg) for 3 consecutive days. On NPY litters, the same experimental design was used, but animals were treated with a dose of NPY 75 µg/kg. Thirty days after the trauma, all animals, except the ones in the non-tested (NT) group were evaluated as in Experiment 1. Experiment 1 results showed NPY 60 µg/kg had an anxiogenic effect, although no statistical significance has been

detected. Preliminary results from Experiment 2 showed that, independently from the group, female rats expressed more self-care behaviours. On the EPM, female rats ambulated more and spent more time in the open arms than male counterparts. These results show that both treatments seem to have a beneficial effect in anxiety behaviours post-trauma.

**Keywords:** Maternal deprivation, stress, animal model, PTSD, neuropeptide Y

## Lista de Figuras

Figura 1 - Aparato e grade metálicos utilizados no protocolo de UWT.....	22
Figura 2 – Padrão sequencial do <i>grooming</i> .....	23
Figura 3 - Labirinto em Cruz Elevado (LCE).....	23
Figura 4 - Delineamento do Experimento 1.....	26
Figura 5 - Protocolo de privação materna no DPN 3 (PM3) .....	29
Figura 6 – Delineamento do Experimento 2 .....	33
Figura 7 - Evolução ponderal do peso dos animais .....	34
Figura 8 - Resultados do TSS 1 .....	35
Figura 9 - Resultados do Labirinto em Cruz Elevado.....	36
Figura 10 - Resultados dos parâmetros fisiológicos.....	37
Figura 11 - Peso corporal ao desmame .....	38
Figura 12 – Peso relativo das adrenais.....	39
Figura 13 - Tentativas de escape no <i>back test</i> .....	40
Figura 14 - Latência para iniciar auto-limpeza e frequência de <i>grooming</i> .....	41
Figura 15 – Parâmetros clássicos no LCE.....	43
Figura 16 - Parâmetros complementares no LCE.....	44
Figura 17 – Frequência e tempo de <i>grooming</i> no LCE .....	45

## Lista de Tabelas

Tabela 1 – Distribuição dos animais nos diferentes grupos testados no Experimento 1 .....	26
Tabela 2 – Distribuição dos animais nos diferentes grupos testados no Experimento 2 .....	32
Tabela 3 – Resultado estatístico dos parâmetros analisados no LCE .....	36
Tabela 4 – Porcentagem (número absoluto) de animais que foram classificados como ativos ou passivos rígidos e variáveis no <i>back test</i> , em cada sexo.....	40

## Lista de Abreviaturas

BT: *Back test*;

BA: Braços abertos;

BF: braços fechados;

CORT: Corticosterona;

CTL: grupo controle;

DPN: Dia pós-natal;

DZP: Diazepam;

Eixo HPA: Eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal;

i.p.: Intraperitoneal;

LCE: Labirinto em Cruz Elevado;

NPY: Neuropeptídeo Y;

PHRE: Período de hiporresponsividade ao estresse;

PM: Privação materna;

PM3: Grupo submetido à PM no 3º dia de vida;

SNC: Sistema Nervoso Central;

TSS: Teste de *Splash* de Sacarose;

TEPT: Transtorno de Estresse Pós-Traumático;

UWT: acrônimo de *Underwater Trauma* (trauma por imersão em água).

## **Lista de Símbolos**

### **Experimento 1:**

\* - Diferença em relação ao grupo não-testado (NT);

### **Experimento 2:**

\* - Diferença em relação ao grupo controle (CTL);

\$ - Diferença entre sexos.

## Sumário

Dedicatória	3
Agradecimentos	4
Resumo	5
Abstract	7
Lista de Figuras	9
Lista de Tabelas	10
Lista de Abreviaturas	11
Lista de Símbolos	12
Sumário	13
1 Introdução	15
2 Desenvolvimento	18
2.1 Justificativa	18
2.2 Objetivo Geral	19
2.3 Modificações no Projeto Original	19
2.4 Materiais e Métodos	20
2.4.1 Sujeitos Experimentais	20
2.4.2 Replicações do Experimento	20
2.4.3 Experimento 1: Teste de dose eficaz de NPY para efeito ansiolítico	21
2.4.3.1. Avaliação do Peso Corporal: Evolução Ponderal	21
2.4.3.2. Protocolo de Trauma Por Imersão Em Água (UWT: <i>Underwater Trauma</i> )	21
2.4.3.3. Avaliações Comportamentais	22
2.4.3.4. Tratamento Farmacológico	24
2.4.3.5. Delineamento Experimental	24
2.4.3.6. Análise Estatística	27
2.4.4 Experimento 2: Tratamento farmacológico com NPY e DZP em animais submetidos à PM3 e trauma por imersão em água	27
2.4.4.1. Cruzamentos e Obtenção de Ninhadas	27
2.4.4.2. Protocolo de Privação Materna	28
2.4.4.3. Avaliação do Peso Corporal: Evolução Ponderal	29
2.4.4.4. Avaliações Comportamentais	29
2.4.4.5. Tratamento Farmacológico	30
2.4.4.6. Delineamento Experimental	31

2.4.4.7. Análise Estatística	33
3. Resultados	33
3.1 Experimento 1	33
3.2 Experimento 2	37
3 Discussão	45
4 Conclusão	49
Referências	49

## 1 Introdução

O Transtorno de Estresse Pós-Traumático (TEPT) é um transtorno psiquiátrico incapacitante que ocorre após um evento traumático vivenciado ou testemunhado pelo indivíduo<sup>1</sup>. Seus sintomas consistem em lembranças intrusivas e involuntárias do acontecimento, incluindo reexperiência do evento traumático (*flashbacks*), evitação de locais ou pessoas relacionadas ao evento, manifestação de medo e ansiedade, alterações cognitivas e no humor, e hiperexcitabilidade ou hipervigilância<sup>1</sup>. É importante notar que esses sintomas, para caracterizarem o TEPT, devem durar mais de um mês, e apresentam variabilidade individual<sup>1</sup>. Estima-se que apenas 10 a 20% dos indivíduos expostos a um evento traumático apresentem o transtorno, (embora muitos pacientes não sejam efetivamente diagnosticados)<sup>2</sup>, havendo variações de acordo com o tipo de trauma, sexo, idade e situação socioeconômica<sup>3-5</sup>. O TEPT tem, geralmente, maior duração e prevalência em mulheres<sup>1,6</sup>, podendo ser 2x mais comum do que em homens<sup>2</sup>. Entre os eventos traumáticos que podem desencadear o TEPT, podem-se citar guerras<sup>7-9</sup>, terremotos<sup>10,11</sup>, e diversos tipos de violência<sup>12-15</sup>. Ademais, o transtorno apresenta alta comorbidade com outros transtornos psiquiátricos, como a depressão, ansiedade e abuso de substâncias<sup>1,2,6</sup>, assim como outros tipos de doenças sistêmicas, como diabetes, hipercolesterolemia e doenças cardiovasculares<sup>16</sup>.

O TEPT também causa diversas alterações neurobiológicas, como a desregulação da liberação de cortisol, tanto basal quanto em resposta a um estressor, embora existam resultados que contradizem esta afirmação. Em comparação com indivíduos saudáveis, pacientes com TEPT apresentam maiores concentrações de cortisol à tarde e menor pico ao acordar<sup>17,18</sup>. Ademais, estudos relatam maior atividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) nos pacientes diante de situações que podem relembrar o trauma<sup>19-21</sup> e na execução de tarefas cognitivas estressantes<sup>22</sup>. Todavia, outros estudos relatam que estes pacientes apresentam menor resposta de cortisol quando submetidos a um protocolo de estresse psicossocial<sup>23,24</sup>. Essas disparidades podem ser justificadas pela variabilidade de resposta frente ao teste, em que é possível classificar os pacientes em hipercortisolêmicos e não respondedores.

O protocolo de “trauma por imersão em água” (*Underwater trauma – UWT*)<sup>25-28</sup> é um modelo animal que pode ser utilizado para reproduzir características do

TEPT, representando um evento aversivo breve, imprevisível e/ou incontrolável e que mimetiza uma ameaça à vida, além de ser considerado um modelo mais natural para induzir o trauma quando comparado a outros tipos de estímulos<sup>29</sup>. No âmbito cognitivo/emocional, o UWT resulta em prejuízo da memória espacial<sup>27,30,31</sup> e aumento de expressão do comportamento do tipo ansioso<sup>25,26,32</sup>. Além disso, foram relatados aumento da expressão de marcadores da atividade neuronal, como da proteína Fos, nos núcleos central e basolateral da amígdala<sup>28</sup>, e da fosforilação da quinase regulada por sinal (*signal-regulated kinase*, ERK) no núcleo basolateral da amígdala e hipocampo ventral<sup>33</sup>, além de redução da potencialização de longa duração (LTP) no hipocampo, processo importante para a memória e o aprendizado<sup>31</sup>. Dessa maneira, pode-se observar que o modelo é uma boa ferramenta para estudar o trauma e suas consequências comportamentais e neurobiológicas.

A infância é um momento crítico do desenvolvimento do Sistema Nervoso Central (SNC) e diversas transformações morfofuncionais que ocorrem durante este período configuram uma janela de vulnerabilidade quando eventos estressores ou adversos podem afetar permanentemente o funcionamento do sistema<sup>34</sup>. Esses eventos, denominados coletivamente na literatura como estresse precoce (*early life stress*) ou adversidades na infância (*early life adversities*) têm efeitos tardios no comportamento, desenvolvimento e fisiologia do indivíduo<sup>35</sup>, produzindo uma cascata de eventos neurobiológicos que podem ter impacto no funcionamento de estruturas, como o hipocampo e a amígdala, e no eixo HPA<sup>36</sup>.

Para investigar as consequências tardias das adversidades na infância, um dos protocolos mais frequentemente utilizados é a privação materna (PM), que consiste na interrupção do contato mãe-filhote por 24 h, durante ou próximo ao período de hiporresponsividade ao estresse (PHRE), que ocorre, em ratos, entre 4 e 14 dias de vida<sup>37</sup>. No PHRE, o eixo HPA exhibe resposta refratária ao estresse e ao seu hormônio trófico, o ACTH<sup>38,39</sup>, e comportamentos maternos inibem a resposta de corticosterona (CORT) e de ACTH dos filhotes a vários estressores<sup>40,41</sup>.

As alterações a longo prazo observadas após a PM não são universais, dependendo de fatores como sexo e idade da prole no momento da privação. Por exemplo, é possível observar alterações no comportamento do tipo ansioso em animais adolescentes e adultos privados no dia pós-natal (DPN) 3 (grupo PM3)<sup>42</sup> e

em animais adultos privados no DPN 11 (grupo PM11)<sup>34,43</sup>. Em estudo de nosso grupo<sup>42</sup>, foram demonstradas diferenças nos comportamentos de animais do grupo PM3 e PM11, sendo que os animais PM3 apresentavam aumento de comportamentos relacionados a anedonia no teste de supressão alimentar induzida pela novidade, e aumento de comportamentos do tipo ansioso no teste no Labirinto em Cruz Elevado (LCE) em relação a animais do grupo controle e PM11, que parecem mais resilientes a alterações neste tipo de comportamento<sup>42-44</sup>. Em relação ao comportamento de enfrentamento de estresse, no mesmo estudo, foi observado aumento da imobilidade no teste de nado forçado em animais PM3 e PM11 de ambos os sexos, embora os machos PM11 tenham apresentado essa alteração em menor intensidade. No âmbito neuroquímico, fêmeas PM11, em fase de diestro, apresentam redução de concentrações hipocâmpais de GABA e noradrenalina, enquanto machos do mesmo grupo apresentam aumento das concentrações de aspartato e glutamato, indicando aumento de excitabilidade neuronal<sup>34</sup>. Outro estudo de nosso grupo também relatou aumento das concentrações de serotonina no hipotálamo (que pode ser responsável pela ativação do eixo HPA<sup>45</sup>) e diminuição no córtex pré-frontal de machos adultos submetidos a PM11, bem como diminuição de dopamina na amígdala e aumento de noradrenalina no córtex pré-frontal de fêmeas do mesmo grupo<sup>45</sup>.

O neuropeptídeo Y (NPY) está amplamente distribuído no cérebro e é o mais abundante no cérebro de mamíferos<sup>46-48</sup>. É produzido principalmente no hipotálamo e possui projeções para regiões relacionadas ao comportamento emocional<sup>49,50</sup>, como o hipocampo, amígdala, substância cinzenta periaquedutal e septo lateral<sup>51</sup>. Entre suas funções, podemos citar propriedades neuroprotetoras e antiepiléticas<sup>47</sup>, estimuladoras de apetite (orexigênicas)<sup>52</sup>, além de regular a liberação de diversos hormônios hipotalâmicos (como o CRH<sup>48</sup>). Também é considerado um importante fator de resiliência ao estresse<sup>48,53,54</sup> e parece ter relação com a fisiopatologia da ansiedade, depressão e TEPT<sup>46-48</sup>. Pacientes deprimidos ou com diagnóstico de TEPT apresentam redução das concentrações de NPY no líquido<sup>55-57</sup>. Alguns estudos mostram a associação da redução líquórica e plasmática de NPY com a gravidade dos sintomas do transtorno<sup>47,58,59</sup>. Em diversos modelos experimentais, já foi evidenciada sua ação ansiolítica<sup>46,48,53</sup>, atenuando<sup>60,61</sup> ou prevenindo<sup>61,62</sup> alterações decorrentes de eventos traumáticos. Esses efeitos parecem ser mediados

principalmente pelo receptor Y1<sup>63,64</sup>. A privação materna tem impacto na produção de NPY em diferentes áreas cerebrais: a PM no DPN 9 (PM9) reduz as concentrações do peptídeo no córtex occipital e hipocampo<sup>65</sup>, enquanto que a PM3 e PM11 reduzem o número de neurônios imunorreativos na amígdala, hipocampo dorsal<sup>42</sup> e núcleo arqueado do hipotálamo<sup>66</sup> em ratos adolescentes de ambos os sexos. Independente da adversidade infantil, as fêmeas apresentam menores concentrações do peptídeo do que os machos<sup>42,66</sup>, salientando a importância de utilizar ambos os sexos.

Os tratamentos utilizados para o TEPT incluem terapias comportamentais cognitivas e medicamentos que buscam aliviar os sintomas<sup>60,67</sup>. Entre os medicamentos, podemos citar antidepressivos, benzodiazepínicos e antipsicóticos<sup>68,69</sup>, embora entre 40 e 50% dos pacientes com TEPT não respondam aos tratamentos<sup>60</sup>. Mesmo sendo frequentemente prescritos, não existem evidências fortes da eficácia de benzodiazepínicos e antipsicóticos atípicos<sup>68</sup>, sendo que benzodiazepínicos podem ser prejudiciais para o TEPT, aumentando a gravidade de seus sintomas<sup>67,70</sup>. Dessa maneira, a busca por novas estratégias terapêuticas para esses pacientes é essencial.

## **2 Desenvolvimento**

### **2.1 Justificativa**

A PM é um modelo de adversidade na infância, que pode aumentar a vulnerabilidade ao desenvolvimento de transtornos psiquiátricos, entre eles, o TEPT. Esse protocolo produz alterações comportamentais e neurobiológicas no sistema de NPY, um importante fator de resiliência ao estresse cuja redução foi relatada em estudos clínicos em pacientes com TEPT. Entretanto, nesses estudos é muito difícil avaliar se a redução observada é decorrente do trauma ou prévia a ele, constituindo um fator de vulnerabilidade ao desenvolvimento do TEPT. Além disso, o uso de modelos animais com forte poder translacional possibilita que seja investigado não só os prejuízos causados pelo transtorno, bem como a eficácia do tratamento com NPY na prevenção de comportamentos do tipo ansioso em ambiente controlado.

Portanto, neste projeto buscamos determinar se o tratamento com NPY logo após o trauma por imersão em água é eficiente para prevenir as alterações comportamentais observadas em machos e fêmeas submetidos à PM3. Além disso

comparamos os efeitos do NPY com aqueles observados com o tratamento com Diazepam (DZP), um ansiolítico clássico, cujo uso na clínica tem se mostrado prejudicial para os casos relacionados ao trauma<sup>67,70</sup>.

## 2.2 Objetivo Geral

O objetivo do projeto foi avaliar se o tratamento com NPY por três dias consecutivos após o trauma induzido pelo protocolo de UWT pode evitar ou reduzir alterações do comportamento tipo-TEPT, em animais com histórico de adversidade na infância, e como esse regime de tratamento se compara com o uso de DZP, um ansiolítico clássico cujo uso em vítimas de trauma tem pouca ou nenhuma eficácia.

### Objetivos específicos:

- 1) Determinar a melhor dose para tratamento com NPY (Experimento 1);
- 2) Avaliar o potencial efeito preventivo do tratamento com NPY, administrado logo após o trauma por imersão em água, sobre as alterações decorrentes do evento, associado ou não à PM (Experimento 2);
- 3) Como o tratamento com NPY se compara ao uso de DZP (Experimento 2);
- 4) Avaliar se existem diferenças sexuais na resposta ao tratamento (Experimento 2);
- 5) Determinar as concentrações de CORT em resposta ao LCE em ratos de ambos os sexos expostos ou não à PM3 e ao UWT e tratados com NPY, DZP ou com veículo (Experimento 2).

## 2.3 Modificações no Projeto Original

Devido ao alto custo de NPY, algumas modificações no projeto original foram necessárias.

Inicialmente, o Experimento 1 previa a utilização de sessenta ratos machos e o tratamento de 30 deles com três doses de NPY: 45 µg/kg, 60 µg/kg e 90 µg/kg (N = 10/grupo). Entretanto, considerando os trabalhos de Gelfo e colaboradores<sup>71,72</sup>, que usaram a dose de 60 µg/kg, optamos por usar essa dose e uma maior, 75 µg/kg. Ademais, o N foi reduzido para 35 animais (7 animais/grupo).

O segundo experimento, originalmente, previa a utilização de animais provenientes de 30 ninhadas que seriam divididas entre grupo controle (CTL) e grupos submetidos à PM3 e PM11. Entretanto, resultados de outro trabalho do grupo

semelhante a este apontaram que o efeito do trauma no comportamento do tipo ansioso e de auto-cuidado foi mais proeminente em animais submetidos ao PM3. Dessa maneira, optamos por incluir apenas este grupo e compará-lo ao grupo CTL. Além disso, a limitação do tempo para execução do projeto foi outro fator importante para reduzirmos o número de ninhadas para 20 (10 ninhadas/grupo).

Adicionalmente, como os resultados do Experimento 1 não foram muito claros quanto ao efeito do tratamento com NPY, optamos por incluir o tratamento de metade das ninhadas com um benzodiazepínico (DZP) e comparar seus efeitos com os do NPY.

Também incluímos o *back test* (BT), um teste para avaliar o estilo de enfrentamento de estresse em animais juvenis como uma forma de analisar se essa variável pode ser usada como preditor para as consequências da PM3, do trauma e do tratamento. Este teste está detalhado na seção 2.4.4.4.

Por fim, devido ao atraso na chegada de NPY, alguns dos testes ocorreram em dias distintos do previsto: no Experimento 1, o trauma ocorreu no DPN 62 ou 63; no Experimento 2, o trauma ocorreu no DPN 74 e a eutanásia a partir do DPN 105, para manter o intervalo de 30 dias entre o trauma e o LCE.

## **2.4 Materiais e Métodos**

### **2.4.1 Sujeitos Experimentais**

Ratos da linhagem *Wistar* foram obtidos do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia (CEDEME) e utilizados para o Experimento 1 e como matrizes para a obtenção de ninhadas no Experimento 2. Os animais foram mantidos em biotério com condições controladas de temperatura (20 – 22°C) e luminosidade (ciclo de claro-escuro de 12 h e luzes acesas a partir de 07:00 h), em gaiolas em estantes ventiladas, no Departamento de Psicobiologia, da Universidade Federal de São Paulo. Todos os procedimentos experimentais realizados ocorreram no mesmo local e foram aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais (CEUA) da Unifesp (CEUA N° 6735221021).

### **2.4.2 Replicações do Experimento**

Por questão de logística (prazo de chegada do medicamento e número de animais que seriam submetidos simultaneamente aos testes) e como forma de atestar a reprodutibilidade da execução e dos resultados, ambos os experimentos

foram realizados em duas replicações, com os animais distribuídos de forma balanceada nos grupos experimentais.

A primeira replicação do Experimento 1 consistiu em 15 animais e a segunda, em 20 animais; no caso do Experimento 2, a primeira replicação consistiu em 10 ninhadas e a segunda, em 8 ninhadas.

### **2.4.3 Experimento 1: Teste de dose eficaz de NPY para efeito ansiolítico**

#### **2.4.3.1. Avaliação do Peso Corporal: Evolução Ponderal**

Os animais foram pesados na chegada ao biotério, no dia do trauma, em cada dia de tratamento para ajuste do volume de solução a ser utilizada (DPNs 63-65) e no dia da eutanásia (DPNs 88-91). Esses dados foram utilizados para calcular a variação do peso entre a chegada no biotério e o dia do trauma (V1) e entre este dia e a eutanásia (V2), por meio da fórmula **% variação = [(peso final – peso inicial)/peso inicial]\*100**.

#### **2.4.3.2. Protocolo de Trauma Por Imersão Em Água (UWT: *Underwater Trauma*)**

O protocolo de trauma foi realizado no período da manhã, com início entre 07:30 h e 09:00 h. O procedimento ocorreu em um aparato metálico, com 50 cm de altura e 30 cm de largura, e com água a uma profundidade de 30 cm em temperatura ambiente ou ligeiramente aquecida, quando a temperatura ambiente estava muito baixa e a água, muito fria.

Cinco dias antes do trauma, todos os animais, com exceção daqueles pertencentes ao grupo não-testado (NT), foram treinados a nadar por 1 min/dia. No dia do trauma, os animais do grupo não-trauma (UWT-) foram submetidos a outra sessão de natação, enquanto os animais do grupo trauma (UWT+) nadaram por 15 s e, imediatamente depois, foram submergidos por 45 s, dentro de uma grade metálica, conforme protocolo descrito por Ardi e colaboradores<sup>25</sup>. A grade metálica e o aparato utilizados no protocolo podem ser vistos na Figura 1.

Imediatamente antes do trauma, cada animal foi colocado em uma gaiola individual com maravalha, onde foi borrifada uma solução com odor de baunilha a 10%, permanecendo ali por 30 s<sup>25</sup>. O estímulo olfatório foi utilizado como uma pista associativa do contexto do trauma, buscando mimetizar a capacidade desses estímulos em induzir pensamentos intrusivos e a reexperiência do evento traumático, sintomas cardinais do TEPT<sup>1</sup>. Trabalhos do grupo do Prof. Richter-Levin demonstram que essas pistas colaboram para o estabelecimento de

comportamentos associados ao transtorno com maior intensidade que somente o trauma<sup>25,33</sup>, havendo maior ativação do hipocampo ventral e amígdala basolateral, áreas importantes para o processamento de medo e memórias traumáticas<sup>33</sup>.



**Figura 1.** Aparato e grade metálicos utilizados no protocolo de UWT. Foto cedida pela estudante Natália Zanta.

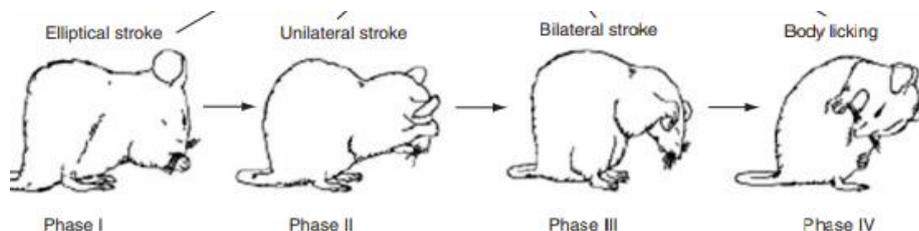
### 2.4.3.3. Avaliações Comportamentais

#### Teste de *splash* de sacarose (TSS)

Um dia antes do trauma e um dia antes da eutanásia, foi realizado o TSS (adaptado de<sup>73-75</sup>), em que foram observados os perfis de auto-cuidado e hedônico, refletidos pelo comportamento de autolimpeza (*grooming*). Para a realização do TSS, ocorrido entre 8:00 h e 11:30 h, os animais foram individualizados 30 min antes do teste e uma solução de sacarose a 10% foi borrifada no dorso do animal. A solução é viscosa, de modo a compelir o animal a fazer a autolimpeza. O aumento da latência para o início do *grooming* e/ou a redução na frequência deste comportamento estão relacionados a alguns sintomas presentes em pacientes deprimidos, como a apatia<sup>73-75</sup>, de modo que o aumento da latência reflete a diminuição do auto-cuidado e a diminuição da frequência, a perda de motivação<sup>73</sup>. Estas alterações podem, também, ser revertidas com o uso de antidepressivos<sup>73-75</sup>.

Além dessas características, o *grooming* é um comportamento inato com uma sequência evolutivamente conservada e movimentos estereotipados de progressão céfalo-caudal, ou seja, que começam na pata/focinho, progridem para a face, cabeça e finalizam no corpo, até que esta estrutura é repetida, embora possa ser

flexível<sup>76</sup>. Essa sequência pode ser visualizada na figura abaixo (Figura 2). Considerando que esta sequência também pode ser afetada por estressores e outros fatores<sup>76,77</sup>, sua avaliação pode ser uma ferramenta valiosa.



**Figura 2** – Padrão sequencial do *grooming*, que pode ser dividido em 4 fases: movimentos elípticos na pata e focinho (*grooming* de pata e focinho), movimentos unilaterais nas vibrissas e abaixo dos olhos (*grooming* facial), movimentos bilaterais que alcançam atrás das orelhas (*grooming* de cabeça) e limpeza corporal (*grooming* de corpo). Figura adaptada de Kalueff et al., 2007<sup>77</sup>.

O teste foi gravado por 10 min e avaliado posteriormente quanto a latência para iniciar o comportamento e frequências de *grooming* facial, de cabeça e corporal<sup>78</sup>. Além disso, foi anotada a ordem em que os comportamentos foram realizados; entretanto, esta análise será feita posteriormente.

### Labirinto em cruz elevado (LCE)

O LCE é um dos testes mais usados para investigar comportamentos do tipo ansioso em ratos<sup>79</sup>, consistindo em um aparato em forma de cruz mantido a 50 cm de altura do chão, com dois braços abertos perpendiculares a dois braços fechados (com paredes de 40 cm de altura), sendo que menor tempo despendido nos braços abertos está relacionado com o aumento do comportamento do tipo ansioso<sup>80</sup>. Cada braço é dividido em 3 segmentos de 16 x 12 cm, e os 4 braços são conectados por um compartimento central, conforme pode ser visualizado na figura abaixo (Figura 3):



**Figura 3.** Labirinto em Cruz Elevado (LCE).

O teste foi realizado entre os DPNs 88 e 91, entre 7:30 h e 12:00 h, sob baixa luminosidade (15 a 18 lux). Antes do teste, cada animal foi colocado em uma gaiola limpa com maravalha, localizada em uma sala distinta da sala do LCE. Na gaiola, foi borrifada a mesma solução de baunilha utilizada no protocolo de UWT, de modo a atuar como lembrança do evento traumático. Os animais permaneceram ali por 30 s, quando então foram expostos ao LCE, onde foram colocados no segmento central do aparato com a face voltada para um dos braços abertos, de forma alternada entre os animais. Entre as sessões, o labirinto foi limpo com álcool 20% para a eliminação de pistas olfativas.

Cada teste durou 5 minutos e foi gravado para análise posterior dos seguintes parâmetros: entrada nos braços abertos e fechados para cálculo da porcentagem de entrada nos braços abertos (**%EBA** = razão entre o número de entradas nos braços abertos e o número total de entradas nos braços abertos e fechados), tempo de permanência nos braços abertos e fechados para o cálculo da porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos (**%TBA** = razão entre o tempo de permanência nos braços abertos e tempo total do teste), número de quadrantes percorridos nos braços abertos e fechados (**% de quadrantes abertos** = razão entre o número de quadrantes percorridos nos braços abertos e o número total de quadrantes percorridos), frequência de visitas às extremidades dos braços abertos (**ExtBA**) e índice de ansiedade (**IA**), calculado segundo a fórmula **Índice de ansiedade = 100 – [(%EBA + %TBA) / 2]**<sup>81,82</sup>.

#### 2.4.3.4. Tratamento Farmacológico

O NPY foi adquirido da Sigma-Aldrich e diluído em água destilada (veículo) para obtenção de solução estoque de concentração 75 µg/ml. Para os animais do grupo UWT+/NPY<sub>60</sub>, foi adicionada água destilada em volume de 20% da solução estoque para obtenção da concentração de 60 µg/ml.

As soluções foram administradas no volume de 0,1 ml/100 g de peso, uma vez ao dia, por 3 dias consecutivos (7 a 10 min após o trauma e nos dois dias seguintes), entre 8:30 h e 10:30 h, por via intraperitoneal (i.p.), baseado nos trabalhos de Gelfo e colaboradores<sup>71,72</sup>.

#### 2.4.3.5. Delineamento Experimental

Trinta e cinco ratos machos da linhagem *Wistar* de 6 a 8 semanas de idade foram adquiridos do CEDEME e habituados no biotério do departamento de

Psicobiologia por 7 dias antes do início dos experimentos. Os animais foram distribuídos em 5 grupos experimentais no dia de chegada ao biotério setorial:

**Grupo 1:** Não-testado (NT): animais que não foram submetidos a nenhuma das manipulações. Para eliminar o efeito do manuseio sobre as alterações observadas, eles foram apenas manuseados nos dias em que o restante dos animais era submetido às manipulações.

**Grupo 2:** UWT-: animais que foram submetidos ao treino de natação e a todos os testes comportamentais, mas não ao trauma;

**Grupo 3:** UWT+/VEI: animais que foram submetidos a todos os testes comportamentais, aos treinos de natação e ao trauma e tratados com veículo (água destilada), para eliminar o efeito das injeções sobre as possíveis alterações comportamentais;

**Grupo 4:** UWT+/NPY<sub>60</sub>: animais submetidos a todas as manipulações citadas e tratados com NPY na dose de 60 µg/kg.

**Grupo 5:** UWT+/NPY<sub>75</sub>: animais submetidos a todas as manipulações citadas e tratados com NPY na dose de 75 µg/kg.

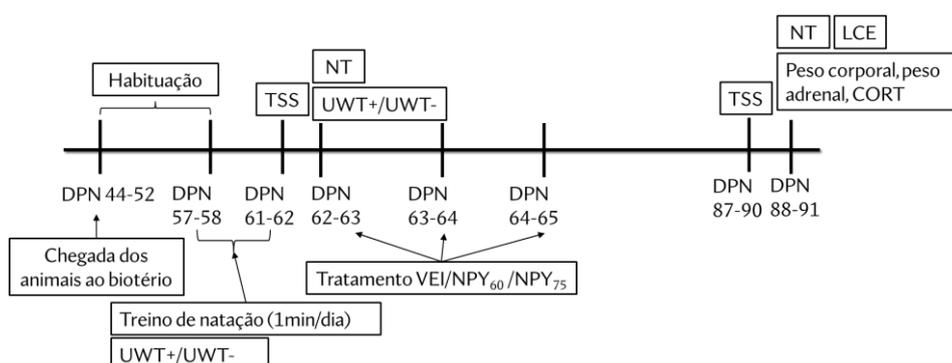
Animais representativos de todos os grupos foram avaliados nos testes de forma balanceada. A distribuição dos animais nos grupos encontra-se na Tabela 1.

Todos os animais (exceto os do grupo NT) foram treinados a nadar por 1 min/dia, a partir do DPN 57 ou 58, por 5 dias. No DPN 61 ou 62, esses animais foram submetidos ao primeiro TSS. No dia seguinte, os animais NT foram novamente manuseados, os do grupo UWT- tiveram mais uma sessão de natação e os do grupo UWT+ foram submetidos ao trauma e, aproximadamente 7-10 min depois, tratados com veículo (VEI), NPY 60 µg/kg ou 75 µg/kg, i.p., por 3 dias consecutivos. No DPN 87-90, os animais foram submetidos ao segundo TSS e, no dia seguinte, foram testados no LCE, às 08:00 h.

O delineamento experimental pode ser visto na Figura 4.

**Tabela 1 – Distribuição dos animais nos diferentes grupos testados no Experimento 1.**

Grupos experimentais (N = 7/grupo)				
NT	UWT-	UWT+/VEI	UWT+/NPY <sub>60</sub>	UWT+/NPY <sub>75</sub>
<b>Coleta de sangue para determinação das concentrações de CORT (DPN 88-91)</b>				
Valores basais	Efeito do LCE	Efeito do trauma + LCE	Efeito do NPY sobre o trauma + LCE	Efeito do NPY sobre o trauma + LCE



**Figura 4.** Delineamento do Experimento 1. TSS = Teste de Splash de Sacarose; UWT = Underwater trauma; VEI = tratamento com veículo; NPY<sub>60</sub> = tratamento com neuropeptídeo Y, 60 µg/kg; NPY<sub>75</sub> = tratamento com neuropeptídeo Y, 75 µg/kg; CORT = corticosterona; LCE = labirinto em cruz elevado.

### Eutanásia

Trinta minutos após o LCE, momento em que ocorre o pico de CORT em resposta ao teste, os animais foram pesados e decapitados sem anestesia para evitar a interferência dos anestésicos sobre as concentrações de CORT<sup>83,84</sup>. Os animais do grupo NT foram eutanasiados antes do começo do teste dos outros grupos no LCE. A eutanásia aconteceu no período da manhã.

O sangue foi coletado em tubos contendo EDTA (concentração de 7,5%) e centrifugados a 3.000 rpm, a 4°C, por 15 min para obtenção do plasma que foi estocado em freezer -20°C e, posteriormente utilizado para determinação de CORT plasmática por meio de kits de ELISA (DBL, Alemanha). Além disso, as glândulas

adrenais foram retiradas, limpas e pesadas para determinação do peso relativo pela fórmula: **[peso das adrenais (mg)/peso corporal (g)] x 1000**.

#### **2.4.3.6. Análise Estatística**

O *Generalized Linear Model* foi utilizado para a análise de todos os parâmetros. Os índices eta-square e ( $\eta^2$ ) ou eta-square parcial ( $\eta_p^2$ ) indicam o tamanho do efeito de um fator ou da interação entre fatores. Os valores são interpretados como:

- 0,01 a 0,059: efeito pequeno
- 0,06 a 0,139: efeito moderado
- 0,14 e acima: efeito grande<sup>85,86</sup>

Utilizou-se ANOVA de duas vias com medidas repetidas (fatores Grupo e Idade) para analisar a variação de peso, enquanto os parâmetros fisiológicos e os comportamentos foram analisados por ANOVA de 1 via (fator Grupo). Quando ocorreu diferença significativa ou interação entre os fatores, foi realizado o teste *a posteriori* de Newman-Keuls. O nível de significância estatística considerado foi de  $p < 0,05$ .

A análise estatística foi feita com auxílio dos programas Statistica v.14 e Jamovi. Os gráficos foram elaborados com o programa GraphPad Prism 9.

### **2.4.4 Experimento 2: Tratamento farmacológico com NPY e DZP em animais submetidos à PM3 e trauma por imersão em água**

#### **2.4.4.1. Cruzamentos e Obtenção de Ninhadas**

Ratos *Wistar*, 10 machos e 20 fêmeas adultos, foram alojados em conjunto (1 macho: 2 fêmeas) por 7 dias, para a realização dos cruzamentos e obtenção de 20 ninhadas para o Experimento 2. Após o período de cruzamentos, os machos foram retirados das gaiolas, enquanto as fêmeas permaneceram juntas por mais 10 dias e depois foram individualizadas, seguindo o procedimento padrão de nosso laboratório<sup>34,42,43,45</sup>. Foi fornecido material para construção de ninhos (2 folhas de papel absorvente e maior quantidade de serragem) às fêmeas depois de 18 dias do início dos cruzamentos. As gaiolas foram inspecionadas às 09:00 h e 17:00 h, diariamente, para verificação dos nascimentos das ninhadas, após 20 dias do início do período de cruzamentos.

O dia do nascimento foi designado como DPN 0. No DPN 1, foi feita a sexagem dos filhotes e a padronização das ninhadas para 10 filhotes (5 machos e fêmeas), quando possível. Nos casos em que as ninhadas não possuíam número suficiente de filhotes, foram feitas adoções de filhotes excedentes de outras ninhadas que haviam nascido no mesmo dia e período, seguindo a rotina do nosso laboratório, considerando que as mães não fazem distinção entre seus próprios filhotes e os adotados<sup>42</sup>. Após a sexagem e padronização, a mãe foi devolvida à gaiola-moradia.

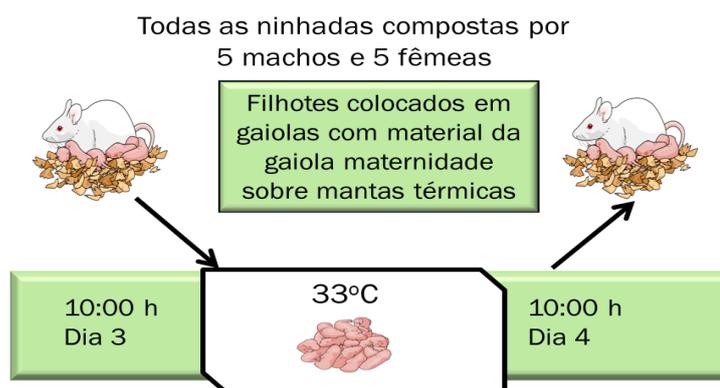
Durante todo o período pós-natal, a limpeza das gaiolas foi feita a cada 3 dias, retirando metade da serragem suja e substituindo-a por limpa. Quando necessário, também foram acrescentadas mais folhas (máximo de 2) para a construção do ninho.

Todos os animais foram mantidos sob as mesmas condições ambientais citadas no item 2.4.1. Ao final, foram obtidas 18 ninhadas, pois duas fêmeas não emprenharam.

#### **2.4.4.2. Protocolo de Privação Materna**

As 18 ninhadas obtidas foram distribuídas em grupo controle (CTL) e privação materna no DPN 3 (PM3). Considerando que um macho era colocado na gaiola-moradia com duas fêmeas para o cruzamento e, dessa maneira, as ninhadas da dupla de fêmeas teriam proximidade genética, foi decidido que, quando possível, uma destas ninhadas seria alocada ao grupo CTL e a outra, ao grupo PM3.

O grupo CTL não foi manipulado (exceto pela limpeza de gaiolas) e permaneceu com suas mães durante todo o desenvolvimento. No grupo PM3, as mães foram removidas das gaiolas-moradia no DPN 3 e mantidas na maternidade, enquanto os filhotes foram transferidos, na gaiola-moradia, para uma sala distante, onde ficaram por um período de 24 h. Neste período, a sala permaneceu escura e as gaiolas foram colocadas sobre mantas térmicas (30-33°C) para manutenção da temperatura corporal dos filhotes. O protocolo teve início às 10:00 h do DPN 3 e, ao final de 24 h, as mães e as ninhadas foram reunidas na gaiola-moradia, como visto na Figura 5.



**Figura 5.** Protocolo de privação materna no DPN 3 (PM3).

Os filhotes de ambos os grupos permaneceram com suas mães até o desmame, no DPN 21. Neste dia, os animais foram identificados e os irmãos de mesmo sexo permaneceram juntos na gaiola. A distribuição dos filhotes de uma mesma ninhada em diferentes subgrupos dilui o efeito da ninhada. Água e ração foram oferecidas *ad libitum*.

#### **2.4.4.3. Avaliação do Peso Corporal: Evolução Ponderal**

Para avaliação da evolução ponderal, os animais foram pesados no DPN 21 (peso no desmame - PD), DPNs 74-76 (para determinação do volume de medicamento a ser injetado), e nos DPNs 105-112 (dia da eutanásia).

#### **2.4.4.4. Avaliações Comportamentais**

##### Back test (BT)

O BT é um teste comportamental originalmente realizado em porcos jovens<sup>87,88</sup> e que busca avaliar as estratégias de enfrentamento de estresse (*coping*) de um animal. Tais estratégias podem ser variadas e com diferentes graus de eficiência em gerar respostas adaptativas frente a um estressor<sup>89</sup>; ou seja, pode ser um preditor de resiliência ao estresse<sup>89,90</sup>.

No presente trabalho, o BT foi realizado com base em Hawley et al.<sup>89</sup>, nos DPNs 25 e 32. Para isso, os animais foram colocados em posição de supino por 1 minuto, sendo segurados pelo dorso e base do rabo, de modo a restringir seus movimentos. Os animais, então, tentam escapar, ação definida como movimento dos membros e da cabeça. Considerando que o estudo piloto do mesmo autor indicava que os animais tentavam escapar não continuamente, mas em “períodos” curtos intercalados por repouso, a quantidade de “períodos de escape” foi contabilizada.

Outros parâmetros avaliados consistiram na latência para o início das tentativas de escape, vocalização do animal no teste e número de bolos fecais liberados.

Os resultados dos dois dias de teste foram comparados para criar três categorias de animais: aqueles que tinham estratégias **ativas** de enfrentamento de estresse (10 ou mais tentativas de escape); **passivas** (menos de 10 tentativas de escape) e aqueles cuja resposta foi **variável** entre os dois testes. O ponto de corte para a determinação de cada categoria, assim como no artigo original<sup>89</sup>, foi calculado com base no animal que, no primeiro teste, teve a maior quantidade de escapes (19). Dessa forma, uma estratégia de enfrentamento ativa foi definida como a quantidade de escapes maior do que a metade do número máximo escapes no teste. De acordo com a estratégia adotada em cada teste, os animais podem ser classificados em **ativos rígidos** (estratégia ativa em ambos os testes), **passivos rígidos** (passivos em ambos os testes) ou **variáveis** (estratégias diferentes em cada teste).

#### TSS e LCE

O TSS e o LCE foram realizados da mesma maneira como no Experimento 1, porém, com algumas modificações: o primeiro TSS foi realizado antes do início das natações, para refletir o comportamento basal do animal (sem a influência dos treinos de natação). O LCE foi realizado entre os DPNs 105 e 112, sob baixa luminosidade (entre 15 e 18 lux) e, além dos parâmetros citados anteriormente, foi analisada a frequência e o tempo de *grooming* no teste, com auxílio do Software X-Plo-Rat, 2005.

#### **2.4.4.5. Tratamento Farmacológico**

O NPY foi preparado como descrito no Experimento 1. O DZP foi adquirido de uma farmácia de manipulação. Considerando sua difícil solubilização em água, foi necessária a adição de algumas gotas de *tween 80* até que fosse formada uma pasta, seguida de adição de água destilada até que fosse obtida uma solução de concentração 2 mg/ml, com base em estudos não publicados de nosso grupo.

Da mesma forma que no Experimento 1, as soluções foram administradas no volume de 0,1 ml/100 g de peso, uma vez ao dia, por 3 dias consecutivos (7 a 10 min após o trauma e nos dois dias seguintes), entre 8:30 h e 10:30 h, por i.p.. Os veículos foram as mesmas soluções utilizadas para preparar as drogas, ou seja,

água destilada para as ninhadas NPY e água destilada + *tween 80* para as ninhadas DZP.

#### **2.4.4.6. Delineamento Experimental**

No início do protocolo de UWT, considerando que a solução de DZP é preparada utilizando-se *tween* além de água destilada, foi necessário dividir as ninhadas CTL (N = 42-44/sexo) e PM3 (N = 41-47/sexo) entre os tratamentos com NPY ou com DZP.

Dessa forma, os animais foram distribuídos em cinco grupos: **Grupo 1** (NT), **Grupo 2** (UWT-), **Grupo 3** (UWT+/VEI), como no Experimento 1, **Grupo 4** (UWT+/DZP) e **Grupo 5** (UWT+/NPY<sub>75</sub>), animais submetidos a todos os protocolos e tratados com DZP (2 mg/ml) ou NPY (75 µg/kg), como apresentado na Tabela 2.

O delineamento experimental está apresentado na Figura 6. Nos DPNs 25 e 32, os animais de todos os grupos, com exceção do grupo NT, foram submetidos ao BT e, quando necessário, tiveram sua identificação reforçada. Os demais procedimentos ocorreram como descrito no Experimento 1, salvo as modificações citadas no Item 2.4.4.4 – Avaliações Comportamentais.

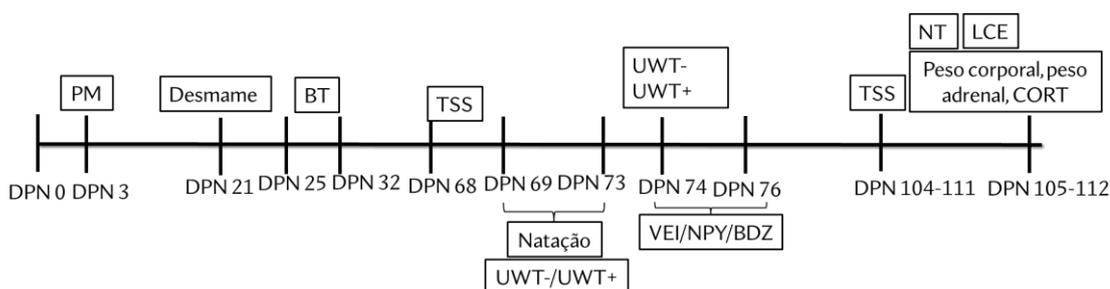
#### Eutanásia e coleta de materiais biológicos

Assim como no Experimento 1, trinta minutos após o LCE os animais foram pesados e imediatamente eutanasiados por decapitação. Os animais NT sempre foram eutanasiados antes do que os/as irmãos/irmãs. O sangue dos animais foi coletado exatamente da mesma forma como descrito anteriormente.–As glândulas adrenais foram retiradas, limpas e pesadas para obtenção do seu peso relativo. Os cérebros também foram retirados, congelados e mantidos à -80°C para futuras análises.

Amostras *post mortem* do epitélio vaginal foram coletadas para estabelecimento da fase do ciclo estral no dia do LCE. A coleta foi feita com lavagem utilizando-se uma pipeta com água destilada, e o material foi colocado em lâminas de microscopia para avaliação futura em microscópio óptico<sup>91</sup>.

**Tabela 2** – Distribuição dos animais nos diferentes grupos testados no Experimento 2.

<b>Grupo CTL (N = 9 ninhadas)</b>											
<b>Ninhadas tratadas com NPY (N = 5 ninhadas)</b>						<b>Ninhadas tratadas com DZP (N = 4 ninhadas)</b>					
<b>Machos</b>			<b>Fêmeas</b>			<b>Machos</b>			<b>Fêmeas</b>		
UWT-	UWT+/VEI	UWT+/NPY <sub>75</sub>	UWT-	UWT+/VEI	UWT+/NPY <sub>75</sub>	UWT-	UWT+/VEI	UWT+/DZP	UWT-	UWT+/VEI	UWT+/DZP
<b>Grupo PM3 (N = 9 ninhadas)</b>											
<b>Ninhadas tratadas com NPY (N = 5 ninhadas)</b>						<b>Ninhadas tratadas com DZP (N = 4 ninhadas)</b>					
<b>Machos</b>			<b>Fêmeas</b>			<b>Machos</b>			<b>Fêmeas</b>		
UWT-	UWT+/VEI	UWT+/NPY <sub>75</sub>	UWT-	UWT+/VEI	UWT+/NPY <sub>75</sub>	UWT-	UWT+/VEI	UWT+/DZP	UWT-	UWT+/VEI	UWT+/DZP



**Figura 6.** Delineamento do Experimento 2. BT = Back test; TSS = Teste de Splash de Sacarose; UWT = Underwater trauma; VEI = tratamento com veículo; NPY = tratamento com neuropeptídio Y, 75 µg/kg; DZP = tratamento com DZP, 2 mg/kg; CORT = corticosterona; LCE = labirinto em cruz elevado.

#### 2.4.4.7. Análise Estatística

Assim como no Experimento 1, foi empregado o *Generalized Linear Model* para determinação de  $\eta^2$  e  $\eta_p^2$  e foi considerado nível de significância estatística de  $p < 0,05$ . Para a evolução ponderal a análise foi feita separadamente por sexo, por ANOVA de 3 vias para medidas repetidas considerando Grupo (CTL, PM3), Condição (Não-testado [NT], UWT-, UWT+/VEI, UWT+/DZP, UWT+/NPY) e Tempo (Desmame, Dia do trauma/natação, LCE) como fatores principais. As análises do peso relativo das adrenais e dos parâmetros obtidos nos testes comportamentais foram realizadas por ANOVA de 3 vias com fatores principais Sexo (macho, fêmea), Grupo e Condição. Para a análise do *back test* e TSS 1, foi empregada a ANOVA de 2 vias, com fatores Sexo e Grupo. No caso de serem encontradas diferenças significativas, foi feito o teste *a posteriori* de Newman-Keuls.

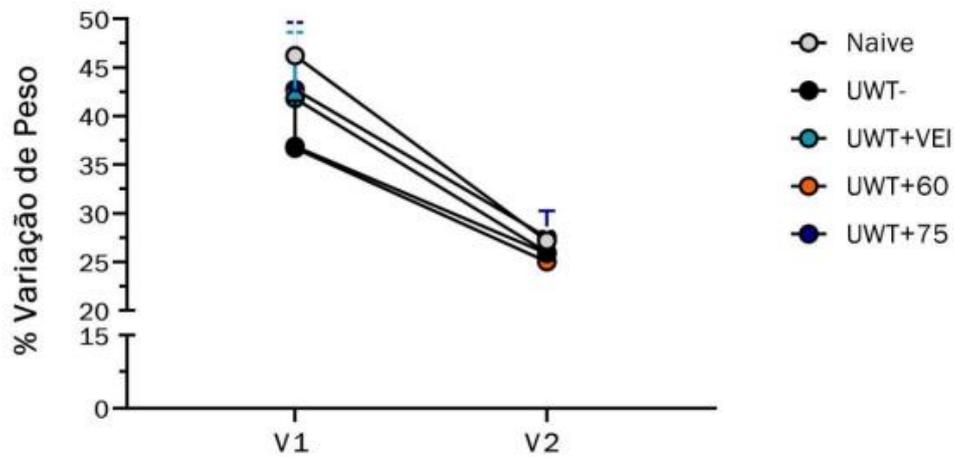
A análise estatística foi feita com auxílio dos programas Statistica v.14 e Jamovi. Os gráficos foram elaborados com o programa GraphPad Prism 9.

### 3. Resultados

#### 3.1 Experimento 1

##### Variação do peso corporal

A ANOVA de duas vias apontou efeito principal da idade dos animais o  $[F_{(1,30)} = 23,61; p < 0,0001, \eta^2 = 0,44]$ . Além disso, o ganho de peso, em todos os grupos, foi maior entre a chegada dos animais no biotério e o trauma (V1) do que entre o trauma e a eutanásia (V2), como pode ser visualizado no gráfico abaixo.

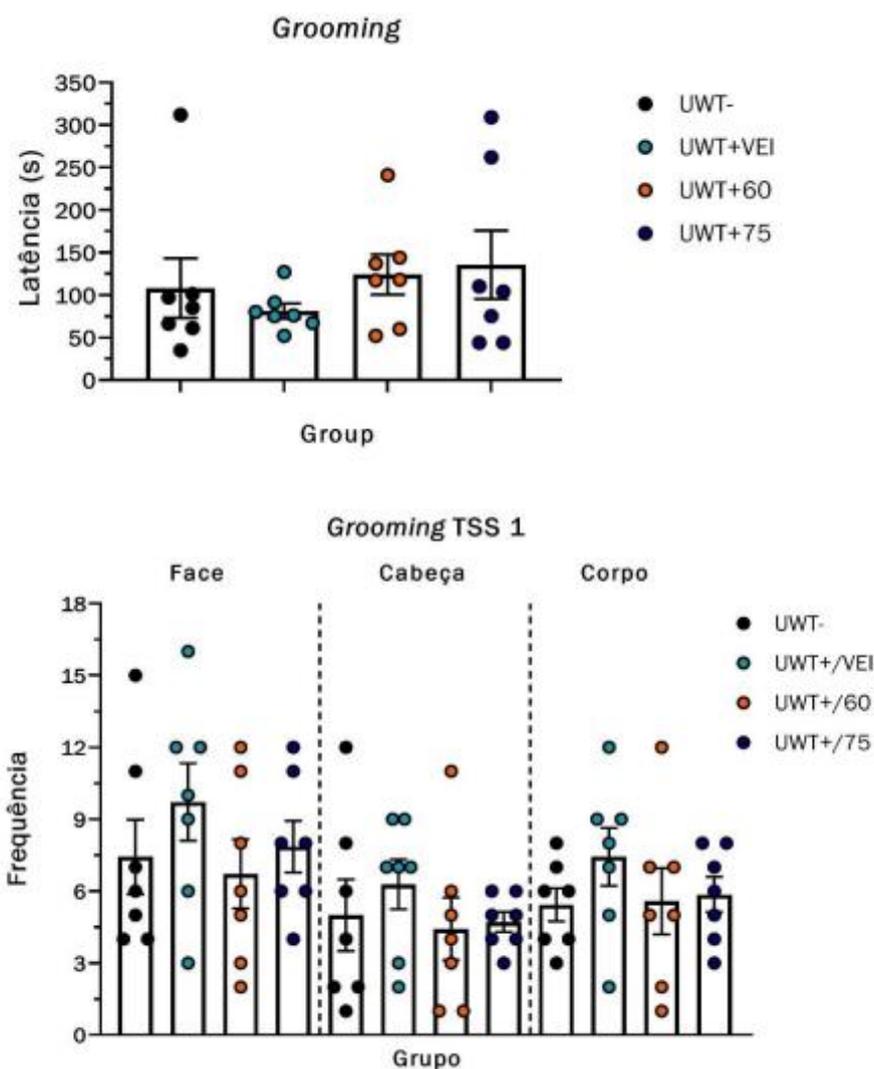


**Figura 7.** Evolução ponderal do peso dos animais. V1 = variação do peso dos animais entre o momento de chegada no biotério setorial e o trauma; V2 = variação do peso entre o trauma e o dia da eutanásia.

### TSS 1 e TSS 2

Os resultados relativos ao TSS 1 podem ser visualizados na Figura 8. Não foram encontradas diferenças estatísticas quanto a latência [ $F_{(4,30)} = 0,63$ ;  $p = 0,60$ ,  $\eta^2 = 0,07$ ], *Grooming* facial [ $F_{(4,30)} = 0,793$ ;  $p = 0,51$ ,  $\eta^2 = 0,09$ ], *Grooming* de cabeça [ $F_{(4,30)} = 0,516$ ;  $p = 0,67$ ,  $\eta^2 = 0,06$ ] e *Grooming* corporal [ $F_{(4,30)} = 0,78$ ;  $p = 0,52$ ,  $\eta^2 = 0,09$ ]. Como se pode observar pelos valores de  $\eta^2$ , em todos os parâmetros foram identificados efeitos moderados da intervenção ( $\eta^2$  de 0.06 a 0.139).

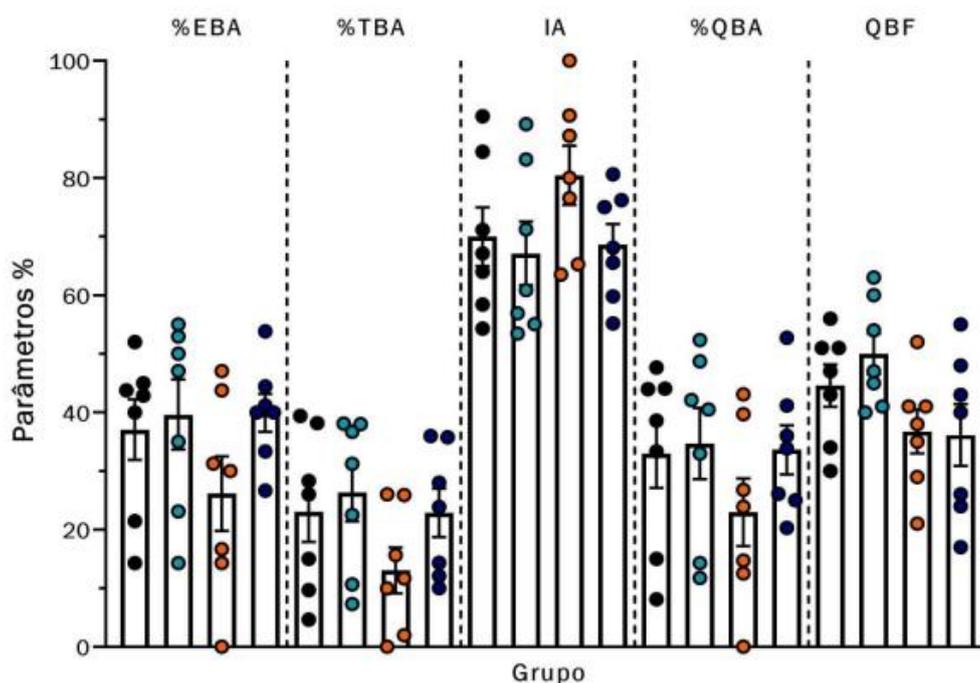
Em relação aos resultados do TSS 2, na segunda replicação do experimento (N = 4 animais/grupo), um problema na câmera causou a perda dos vídeos, impossibilitando a análise completa do teste.



**Figura 8.** Resultados do TSS 1. A latência para o início do comportamento pode ser visualizada no painel superior, enquanto no segundo painel se observa a frequência de grooming facial, de cabeça e corporal em animais não submetidos ao trauma (UWT-) ou submetidos ao trauma e tratados com veículo (UWT+/VEI), NPY nas doses de 60 µg/kg (UWT+/60) ou 75 µg/kg (UWT+/75). Os valores individuais foram incluídos e as colunas representam a média ± d.p. de 7 animais/grupo.

### LCE

O gráfico retratado na Figura 9 mostra os resultados das avaliações comportamentais no LCE.



**Figura 9.** Resultados do Labirinto em Cruz Elevado. Os parâmetros mostrados foram avaliados em ratos não submetidos ao trauma (UWT-) ou submetidos ao trauma e tratados com veículo (UWT+/VEI), NPY nas doses de 60 µg/kg (UWT+/60) ou 75 µg/kg (UWT+/75). Os valores individuais foram incluídos e as colunas representam a média ± d.p. de 7 animais/grupo.

Não foram encontradas diferenças estatísticas em nenhum dos parâmetros avaliados, embora os valores de  $\eta^2$  indiquem efeito moderado ( $\eta^2$  de 0.06 a 0.139) ou grande (acima de 0.14) da intervenção nos parâmetros, como pode mostrado na tabela abaixo.

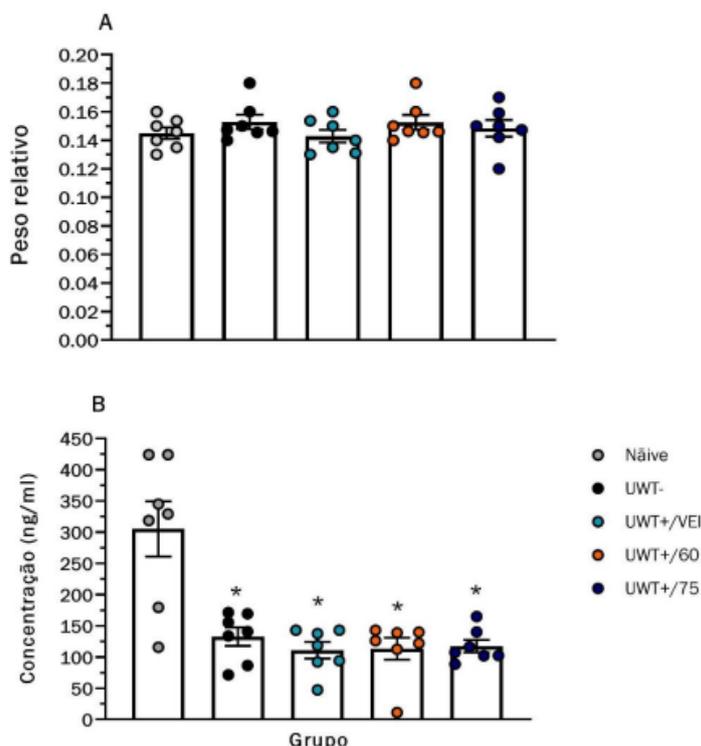
**Tabela 3 –** Resultado estatístico dos parâmetros analisados no LCE.

Parâmetro	Resultado (ANOVA)
<b>% EBA</b>	$F_{(4,30)} = 1,48$ ; $p = 0,24$ , $\eta^2 = \mathbf{0,16}$
<b>% TBA</b>	$F_{(4,30)} = 1,59$ ; $p = 0,22$ , $\eta^2 = \mathbf{0,17}$
<b>IA</b>	$F_{(4,30)} = 1,59$ ; $p = 0,22$ , $\eta^2 = \mathbf{0,17}$
<b>% QBA</b>	$F_{(4,30)} = 0,97$ ; $p = 0,42$ , $\eta^2 = 0,11$
<b>QBF</b>	$F_{(4,30)} = 2,65$ ; $p = 0,08$ , $\eta^2 = \mathbf{0,25}$
<b>Ext. BA</b>	$F_{(4,30)} = 1,10$ ; $p = 0,37$ , $\eta^2 = 0,12$

% EBA = porcentagem de entradas nos braços abertos (BA); % TBA = porcentagem de tempo nos BA; IA = Índice de ansiedade; % QBA = porcentagem de quadrantes atravessados nos BAs; QBF = número de quadrantes atravessados nos braços fechados; Ext. BA = frequência de visitas à extremidade dos BAs. Os valores de  $\eta^2$  são interpretados como: 0,01 a 0,059 – efeito pequeno; 0,06 a 0,139 – efeito moderado; 0,14 e acima – efeito grande. Os parâmetros que apresentaram efeito moderado estão indicados em *itálico*, e os que apresentaram efeito grande, em **negrito**.

### Parâmetros fisiológicos

Não houve diferença estatística no peso relativo das adrenais [ $F_{(4,30)} = 0,75$ ;  $p = 0,57$ ,  $\eta^2 = 0,09$ ] entre os grupos (Figura 10A), embora o  $\eta^2$  indique tamanho de efeito moderado e as adrenais do grupo NT tiveram menor peso do que os outros grupos. Em relação às concentrações de CORT, todos os grupos apresentaram valores menores que os animais não testados [ $F_{(4,30)} = 12,67$ ;  $p < 0,0001$ ,  $\eta^2 = 0,63$ ] (Figura 10B).



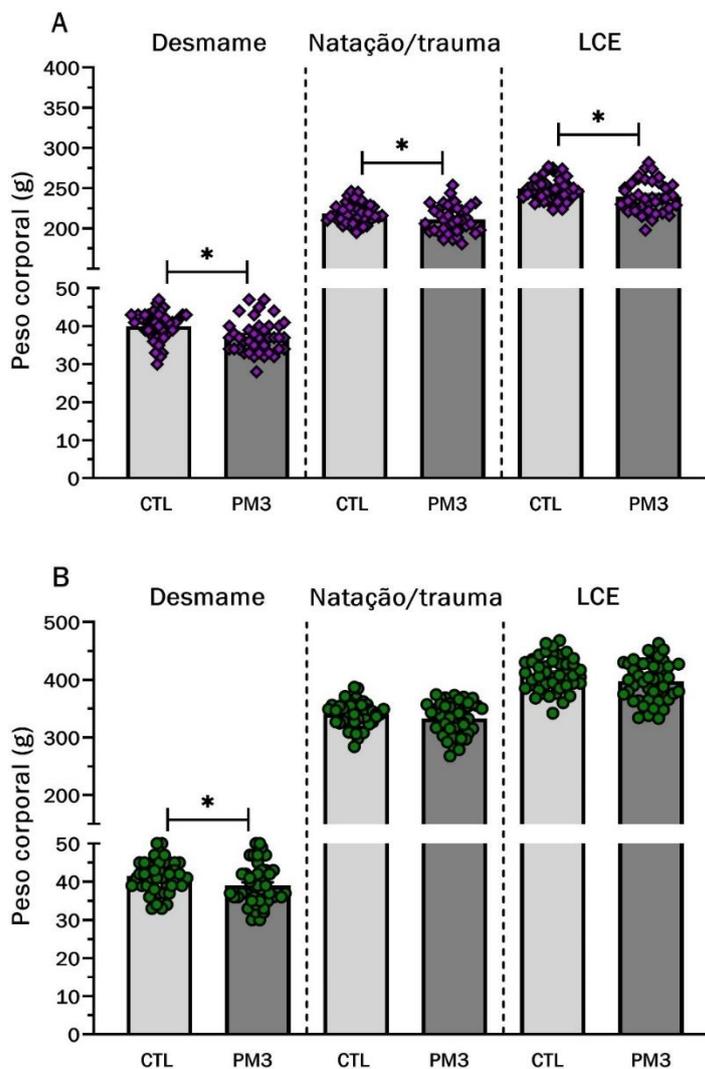
**Figura 10.** Resultados dos parâmetros fisiológicos. Em A, é possível visualizar o peso relativo das adrenais e, em B, as concentrações de CORT em ratos não submetidos aos testes e apenas manipulados (NT), não submetidos ao trauma (UWT-), ou submetidos ao trauma e tratados com veículo (UWT+/VEI), NPY nas doses de 60 µg/kg (UWT+/60) ou 75 µg/kg (UWT+/75). Os valores individuais foram incluídos e as colunas representam a média  $\pm$  d.p. de 7 animais/grupo. \* - diferença em relação ao grupo NT.

## 3.2 Experimento 2

### Evolução ponderal (Figura 11)

Em fêmeas, a análise detectou efeitos do grupo [ $F_{(1,142)} = 8,03$ ;  $p < 0,006$ ,  $\eta^2 = 0,1$ ] e do tempo [ $F_{(2,142)} = 10107,47$ ;  $p < 0,00001$ ,  $\eta^2 = 0,99$ ]. Em todos os tempos avaliados, o peso do grupo PM3 foi menor do que do grupo CTL ( $p < 0,007$ ) e o peso corporal no dia do LCE foi maior do que no dia do trauma/natação ( $p < 0,0001$ ) que, por sua vez, foi maior do que o peso no desmame ( $p < 0,0001$ ).

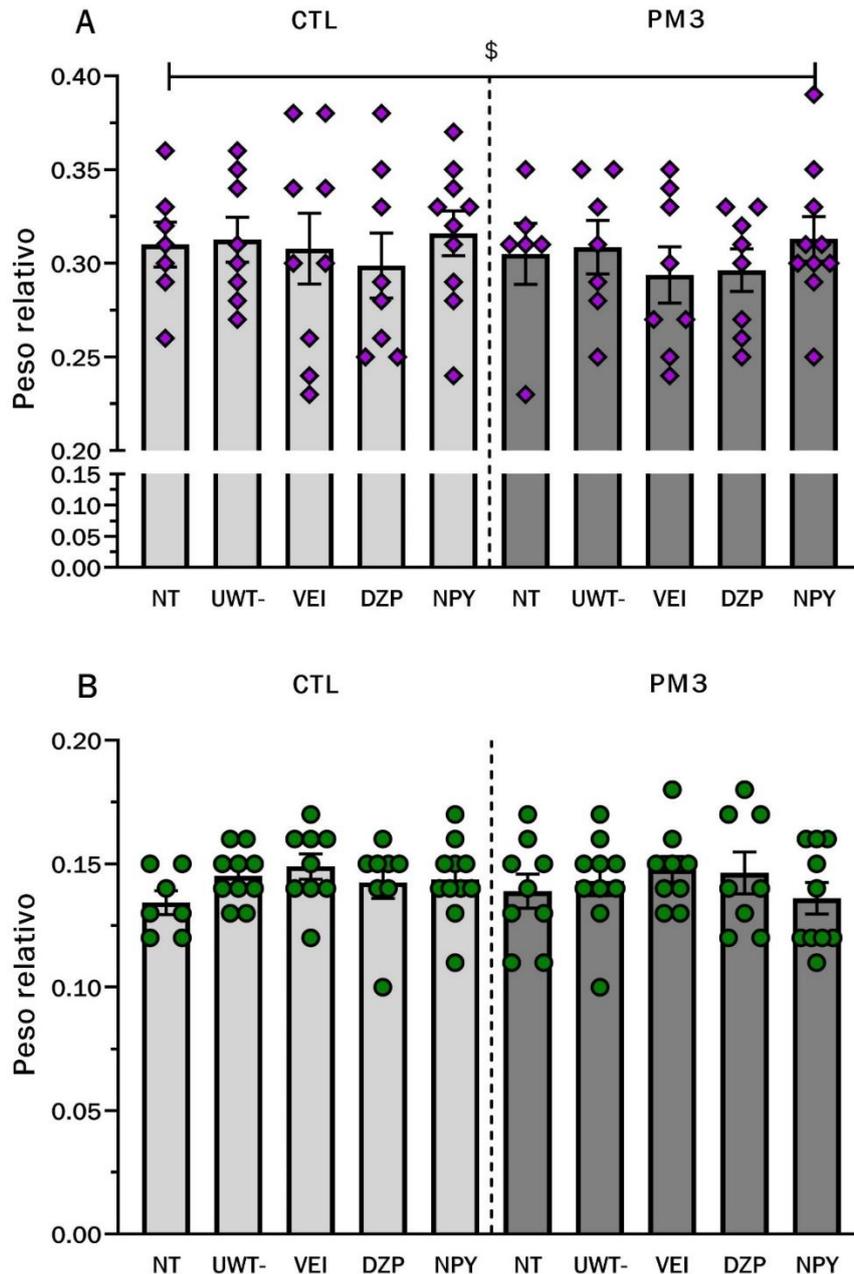
Em machos, houve uma tendência a que os ratos do grupo PM3 apresentassem menor peso corporal do que os do grupo CTL [ $F_{(1,160)} = 3,56$ ;  $p < 0,07$ ,  $\eta^2 = 0,04$ ] e efeito do tempo [ $F_{(1,160)} = 10766,30$ ;  $p < 0,00001$ ,  $\eta^2 = 0,99$ ]. O peso corporal no dia do LCE foi maior do que no dia do trauma/natação ( $p < 0,0001$ ) que, por sua vez, foi maior do que o peso no desmame ( $p < 0,0001$ ).



**Figura 11.** Peso corporal ao desmame (dia pós-natal 21), no dia do trauma/natação e no dia do labirinto em cruz elevado em fêmeas (A) e machos (B) dos grupos controle (CTL – colunas cinza-claro) e privado da mãe no 3º dia de vida (PM3 – colunas cinza-escuro). Os valores dos animais não-testados também foram incluídos em todos os tempos. Os valores individuais são apresentados e as colunas representam a média  $\pm$  e.p.m de 39-42 fêmeas e 44 – 46 machos/grupo. \* - diferente do respectivo grupo CTL ( $p < 0,05$ ).

### Peso relativo das adrenais (Figura 12)

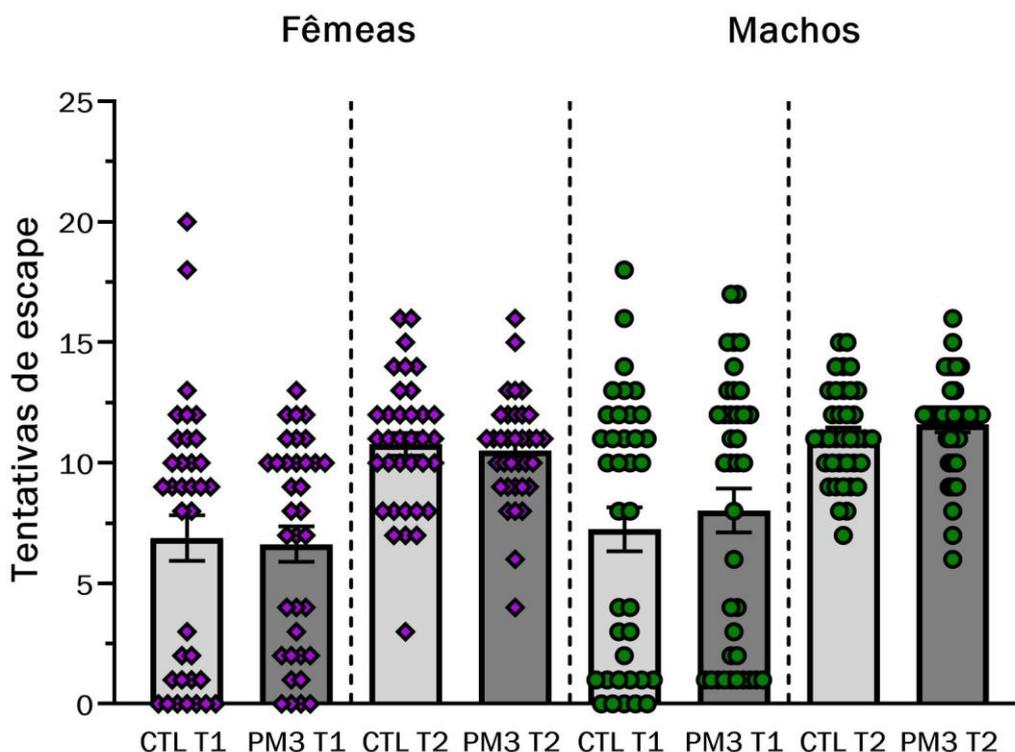
A análise revelou efeito do sexo [ $F_{(1,151)} = 1182,704$ ;  $p < 0,00001$ ,  $\eta^2 = 0,89$ ], sendo que as fêmeas apresentaram maior peso das adrenais do que os machos.



**Figura 12.** Peso relativo das adrenais de fêmeas (A) e machos (B) dos grupos controle (CTL - barras cinza-claro ou privados no 3º dia de vida (PM3 - barras cinza-escuro). Estes animais foram distribuídos nos subgrupos Não-testado (NT), submetidos ao treino de natação (UWT-) ou submetidos ao trauma por imersão em água e tratados com veículo (VEI), Diazepam (DZP) ou neuropeptídeo Y (NPY). Os valores individuais são apresentados e as colunas representam a média  $\pm$  e.p.m. de 6-10 fêmeas e 7-11 machos grupo/condição. \$ - diferença entre os sexos ( $p < 0,0001$ ),

### BT (Figura 13)

Não foram observadas diferenças significativas em relação ao sexo ou ao grupo para as tentativas de escape no primeiro ou segundo testes.



**Figura 13.** Tentativas de escape no *back test* realizado nos dias 25 (T1) e 32 (T2) de vida em fêmeas (losangos) e machos (círculos) dos grupos controle (CTL – colunas cinza-claro) e privado da mãe no 3º dia de vida (PM3 – colunas cinza-escuro). Os valores individuais são apresentados e as colunas representam a média ± e.p.m. de 35 fêmeas e 37-38 machos por grupo.

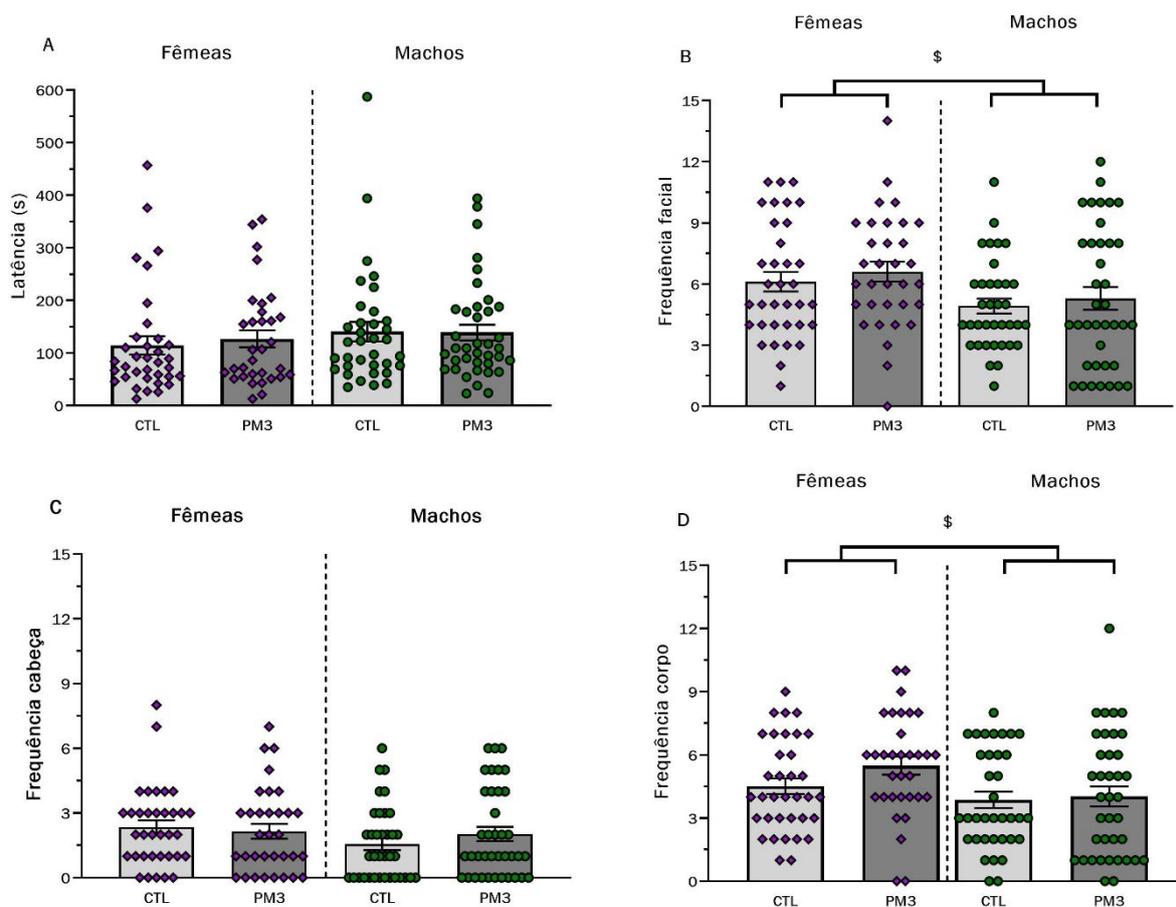
Com base nos valores de corte para as tentativas de escape, foi possível diferenciar o perfil comportamental dos animais em ativo rígido, passivo rígido e variável. A frequência de perfis encontrados nos sexos e grupos pode ser observada na tabela abaixo:

**Tabela 4** – Porcentagem (número absoluto) de animais que foram classificados como ativos ou passivos rígidos e variáveis no *back test*, em cada sexo.

Perfil	Grupo CTL		Grupo PM3		Total
	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	
Ativo	4,1% (6)	2,8% (4)	3,4% (5)	4,1% (6)	14,5% (21)
Passivo	0,0% (0)	0,7% (1)	0,0% (0)	1,4% (2)	2,07% (3)
Variável	21,4% (31)	20,7% (30)	22,8% (33)	18,6% (27)	83,5% (121)
Total	25,5% (37)	24,1% (35)	26,2% (38)	24,1% (35)	100,0% (145)

### TSS 1 (Figura 14)

Não foram observadas diferenças na latência para o início do comportamento de *grooming*. Foram encontradas diferenças em relação ao sexo na frequência de *grooming* facial [ $F_{(1,139)} = 7,34$ ;  $p = 0,008$ ,  $\eta^2 = 0,05$ ], na frequência de *grooming* corporal [ $F_{(1,139)} = 6,70$ ;  $p = 0,011$ ,  $\eta^2 = 0,045$ ] e na frequência de *grooming* total [ $F_{(1,139)} = 6,75$ ;  $p = 0,01$ ,  $\eta^2 = 0,046$ ]. Em todos os casos, a frequência dos comportamentos foi maior em fêmeas do que em machos.



**Figura 14.** Latência para iniciar auto-limpeza (A); limpeza facial (B); limpeza de cabeça (C) e limpeza do corpo (D) de fêmeas (losangos) e machos (círculos) dos grupos controle (CTL – colunas cinza-claro) e privado da mãe no 3º dia de vida (PM3 – colunas cinza-escuro). Os valores individuais são apresentados e as colunas representam a média  $\pm$  e.p.m. de 32-35 fêmeas e 35-37 machos por grupo. \$ - diferença entre sexos ( $p < 0,05$ ).

Além da análise de frequência dos comportamentos que compõem o *grooming*, sua ordem e a ocorrência de interrupções na sequência do comportamento foram anotadas para análise futura.

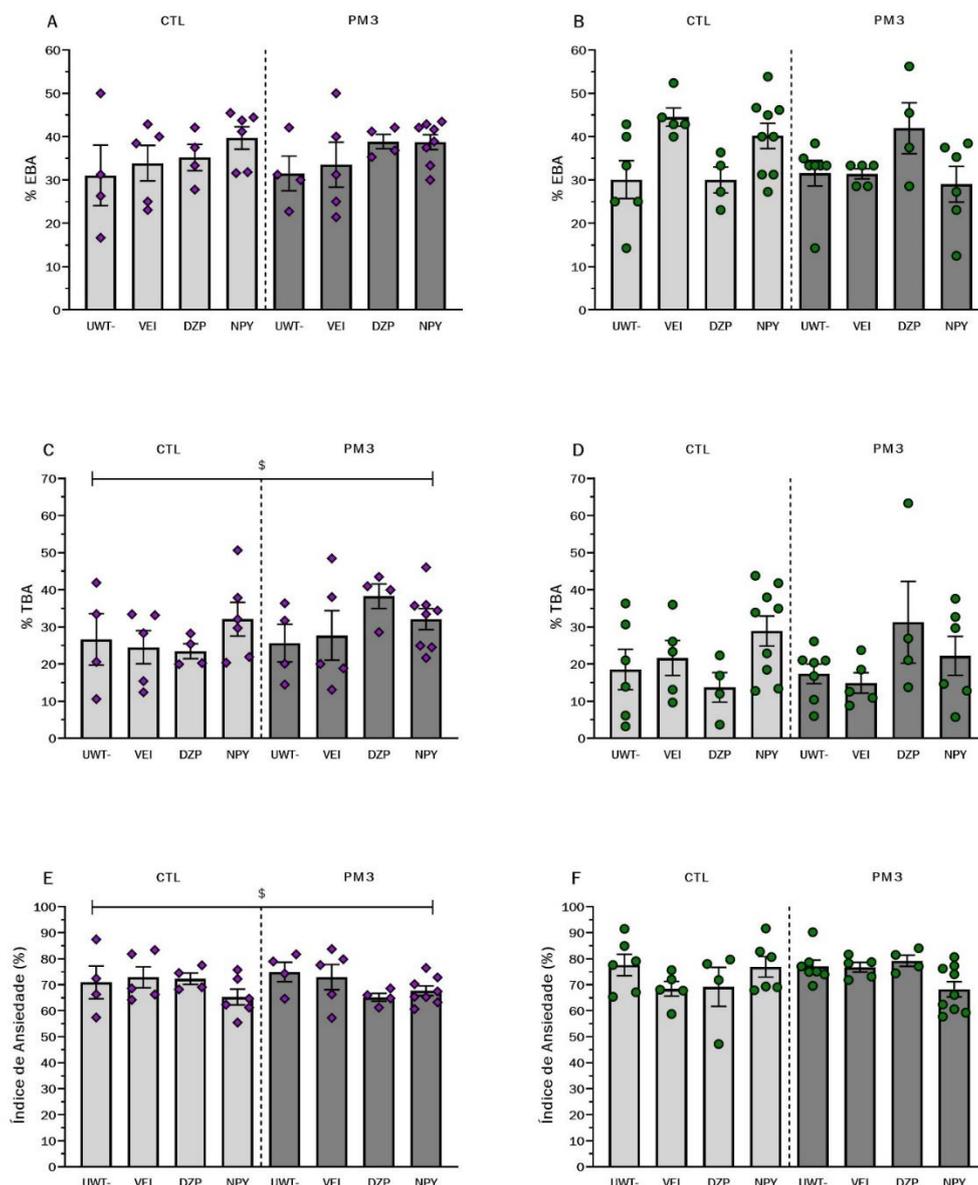
## TSS 2

Até o momento de redação deste relatório, a análise do segundo TSS não foi concluída.

## LCE (Figuras 15, 16 e 17)

Os resultados disponíveis do LCE são referentes a primeira replicação do estudo. Mesmo com a avaliação parcial dos parâmetros, realizamos a análise estatística para detectar as tendências dos efeitos dos fatores sobre diferentes comportamentos expressos neste teste.

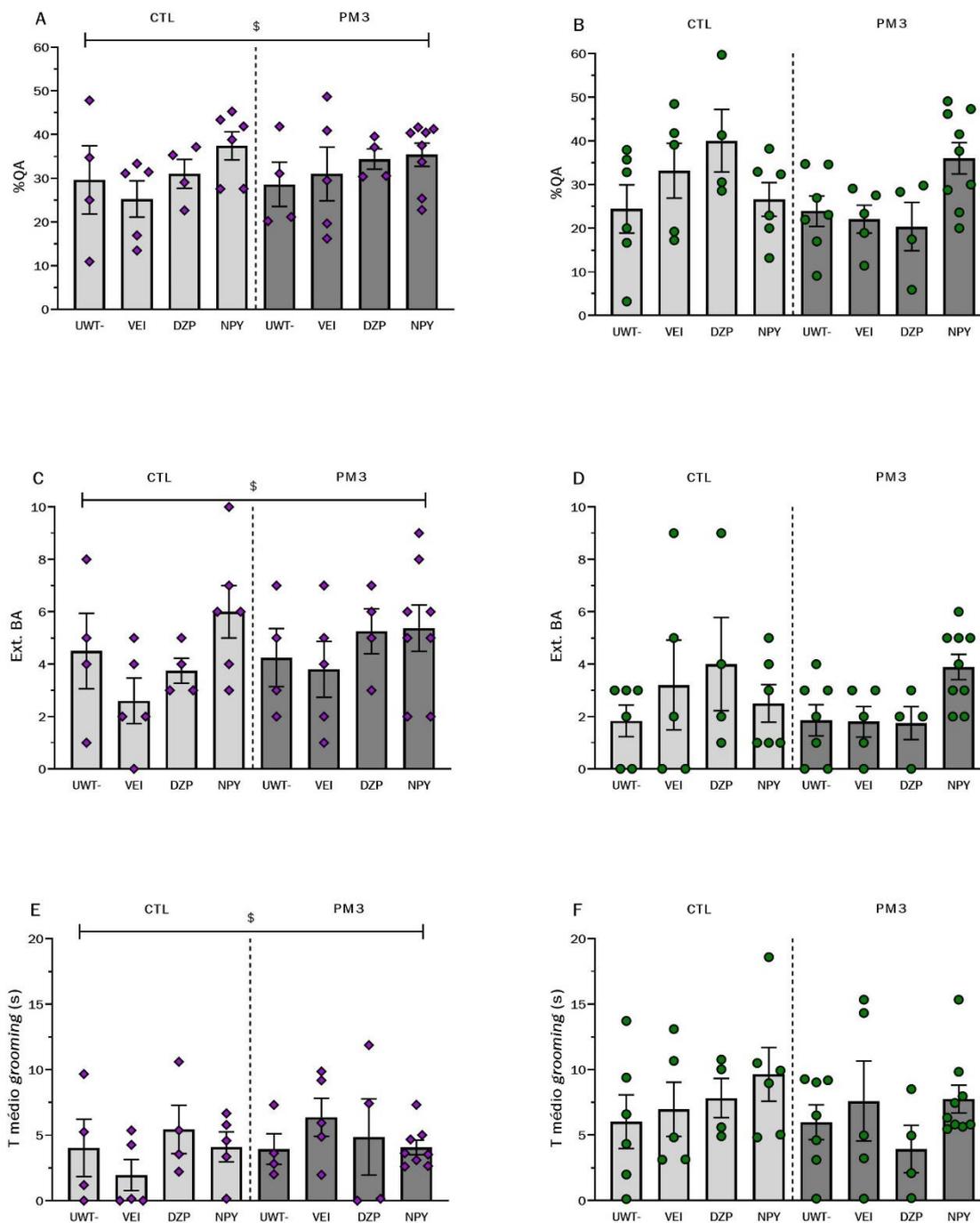
A análise da **%EBA** revelou interação entre grupo e condição [ $F_{(3,70)} = 2,804$ ;  $p = 0,046$ ,  $\eta^2 = 0,107$ ]. A análise *a posteriori* não detectou diferenças entre os subgrupos, porém a comparação entre médias indica que entre os animais UWT+/VEI, o grupo PM3 visita menos os BA do que os do grupo CTL, enquanto para os animais UWT+/DZP e UWT+/NPY, se observa o oposto, ou seja, o grupo PM3 visita mais os BA do que o grupo CTL. As fêmeas permaneceram mais **tempo nos BA** do que os machos [ $F_{(1,70)} = 9,558$ ;  $p < 0,003$ ,  $\eta^2 = 0,12$ ]. A análise integrada destes parâmetros fornece o índice de ansiedade, que foi diferente entre os sexos [ $F_{(1,70)} = 4,499$ ;  $p < 0,04$ ,  $\eta^2 = 0,06$ ], sendo que este foi menor nas fêmeas comparados com machos ( $p < 0,03$ ). Estes resultados podem ser vistos na Figura 15.



**Figura 15.** Parâmetros clássicos no LCE, % de entradas nos braços abertos (%EBA – A, B), % tempo nos braços abertos (%TBA – C, D) e índice de ansiedade (E, F) de fêmeas (A, C, E) e machos (B, D, F) dos grupos controle (CTL – colunas cinza-claro) e privado da mãe no 3º dia de vida (PM3 – colunas cinza-escuro). Os valores individuais são apresentados e as colunas representam a média  $\pm$  e.p.m. de 4-8 fêmeas e 4-9 machos por grupo. \$ - diferença entre sexos ( $p < 0,05$ ).

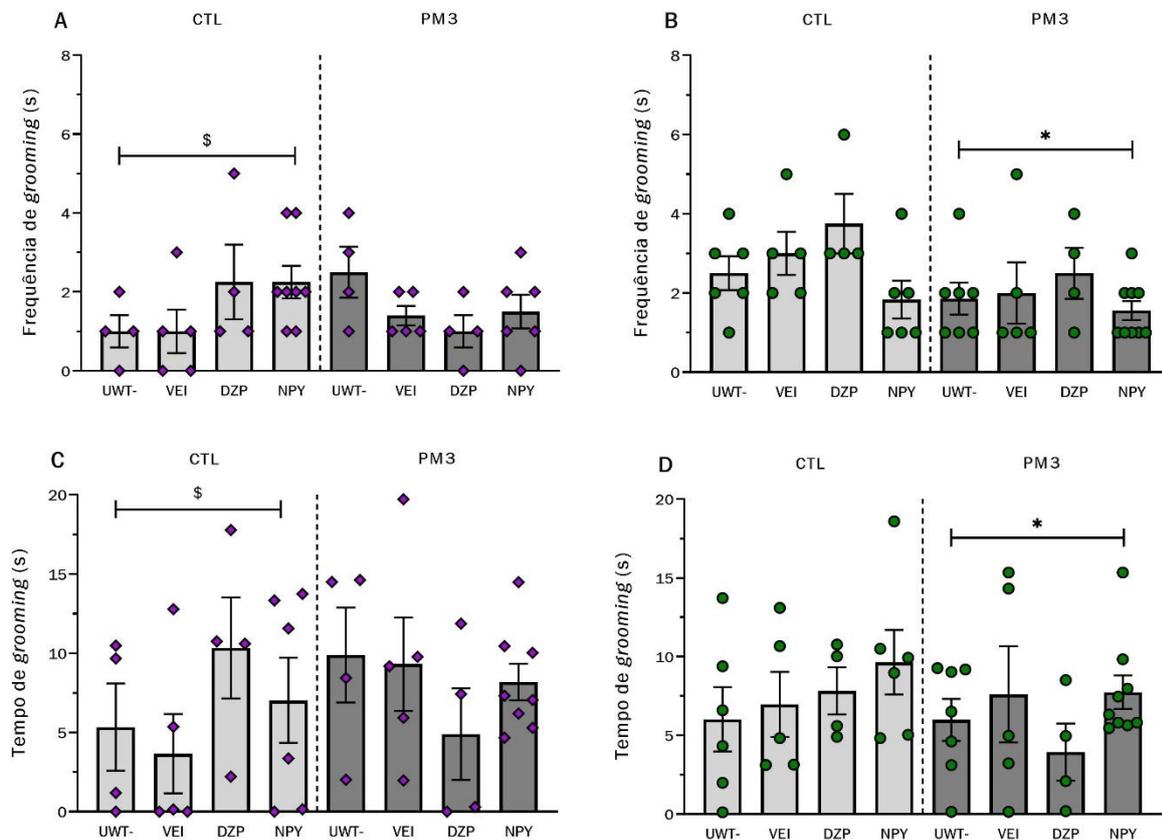
Houve tendência de efeito da condição na **porcentagem de ambulação nos BA** [ $F_{(3,70)} = 2,271$ ;  $p < 0,09$ ,  $\eta^2 = 0,089$ ], sendo que os animais tratados com NPY tenderam a ambular mais do que os animais UWT-. As fêmeas visitaram mais as **extremidades dos BA** [ $F_{(1,70)} = 14,43$ ;  $p < 0,0003$ ,  $\eta^2 = 0,17$ ] e houve tendência de efeito da condição [ $F_{(1,70)} = 2,548$ ;  $p < 0,07$ ,  $\eta^2 = 0,098$ ], em que os animais tratados com NPY chegaram mais vezes ao final dos braços abertos ( $p = 0,054$ ). Quanto ao tempo médio de *grooming* no LCE, observou-se efeito do sexo [ $F_{(1,65)} = 5,092$ ;  $p <$

0,03,  $\eta^2 = 0,07$ ], em que os machos realizaram esse comportamento de forma mais prolongada. Esses resultados podem ser vistos na Figura 16.



**Figura 16** - Parâmetros complementares no LCE, % de quadrantes atravessados nos braços abertos (%QBA – A, B), visitas às extremidades dos braços abertos (Ext. BA – C, D) e tempo médio de *grooming* (E, F) de fêmeas (A, C, E) e machos (B, D, F) dos grupos controle (CTL – colunas cinza-claro) e privado da mãe no 3º dia de vida (PM3 – colunas cinza-escuro). Os valores individuais são apresentados e as colunas representam a média  $\pm$  e.p.m. de 4-8 fêmeas e 4-9 machos por grupo. \$ - diferença entre sexos ( $p < 0,05$ ).

A frequência de *grooming* no LCE foi influenciada pela interação entre sexo e grupo [ $F_{(1,70)} = 4,836$ ;  $p < 0,04$ ,  $\eta^2 = 0,064$ ], sendo que os machos PM3 e as fêmeas CTL fizeram menos *grooming* do que os machos CTL ( $p$ 's  $< 0,04$ ). O tempo de *grooming* no LCE também foi influenciado pela interação de sexo e grupo [ $F_{(1,70)} = 7,425$ ;  $p < 0,009$ ,  $\eta^2 = 0,096$ ] e as mesmas diferenças descritas acima foram vistas com este parâmetro ( $p$ 's  $< 0,004$ ). Estes resultados encontram-se na Figura 17.



**Figura 17.** Frequência (A, B) e tempo de *grooming* (C, D) de fêmeas (A, C, E) e machos (B, D, F) dos grupos controle (CTL – colunas cinza-claro) e privado da mãe no 3º dia de vida (PM3 – colunas cinza-escuro). Os valores individuais são apresentados e as colunas representam a média  $\pm$  e.p.m. de 4-8 fêmeas e 4-9 machos por grupo. \* - diferença do grupo CTL; \$ - diferença entre sexos no mesmo grupo ( $p < 0,05$ ).

### 3 Discussão

A análise da evolução de peso corporal pode fornecer informações importantes sobre o desenvolvimento físico dos animais, especialmente no contexto da privação materna. Como já demonstrado em estudos de nosso grupo<sup>42,66,92</sup>, animais submetidos a privação materna apresentam menor peso corporal em relação a animais controle, o que pode persistir até a adolescência ou idade adulta. Neste estudo, foi observada diferença de peso no momento do desmame, independente do sexo. Porém, é interessante notar que apenas entre as fêmeas a diferença de peso se manteve ao longo de todo o desenvolvimento e vida adulta,

enquanto machos PM3 apresentaram somente tendência de menor peso que seus respectivos controles. Em outros trabalhos do grupo, a diferença de peso entre grupos privados (PM3 e PM11, em um dos trabalhos<sup>66</sup>, e machos PM9 em outro<sup>92</sup>) se perpetuou até a adolescência. Todavia, no trabalho atual, não houve manutenção dessa diferença até a vida adulta, indicando que, em algum momento, o peso dos animais privados pode se igualar ao dos CTL.

Outro ponto importante a ser lembrado no momento de avaliação do peso dos animais é o papel do NPY, que é orexigênico<sup>52</sup>. Por ser um estimulador de apetite, postulamos que animais do grupo tratado com NPY poderiam ter maior variação de peso corporal. Todavia, em ambos os experimentos, isso não ocorreu e os animais tratados com NPY (independentemente do sexo ou grupo) apresentaram evolução de peso corporal semelhantes aos outros animais. Isso pode ser explicado pois, embora outros estudos (inclusive em diferentes espécies<sup>93</sup>) demonstrem aumento do comportamento alimentar e peso corporal em animais tratados com NPY<sup>94,95</sup>, este tratamento é feito localmente (como no núcleo paraventricular do hipotálamo, PVN)<sup>95</sup> e com maior duração do que o feito neste estudo<sup>95,96</sup>.

Em relação ao peso relativo das adrenais, não houve diferença estatística entre os grupos em nenhum dos experimentos, e, embora no Experimento 1 tenhamos detectado tamanho de efeito moderado, não houve nenhuma tendência à diferença. No Experimento 2, a única diferença significativa neste parâmetro foi encontrada entre machos e fêmeas, sendo que as fêmeas apresentaram adrenais mais pesadas, resultado que está de acordo com outros artigos<sup>42,97</sup>. Todavia, em estudo de nosso grupo<sup>42</sup>, também foram encontradas diferenças significativas do peso relativo entre os grupos PM3 e CTL em animais adolescentes. No que se refere às concentrações de CORT obtidas no Experimento 1, todos os grupos experimentais apresentaram valores menores que animais não testados, o que é inesperado, considerando que este é o único grupo que não foi submetido a qualquer uma das manipulações ou ao LCE, um teste que elicia resposta de estresse no animal<sup>34,45</sup>. É possível, dessa maneira, que os animais tenham maior sensibilidade a decapitação.

O *back test* é um teste inédito no nosso grupo, realizado para avaliar as estratégias de enfrentamento de estresse (*coping*) do animal no período juvenil e, por isso, pode ser um preditor de resiliência ao estresse<sup>89,90</sup>. Como nem todos os resultados desde trabalho estão disponíveis, pouco se pode discutir quanto ao teste.

Entretanto, observou-se grande quantidade de animais com perfil variável, o que pode sugerir (assim como o maior número absoluto de tentativas de escape entre um teste e outro) que os animais retiveram memória do teste e adaptaram sua resposta. Além disso, destacamos a grande diferença entre a variação no número de escapes dos animais testados em relação ao artigo original<sup>89</sup>: enquanto encontramos uma variação de 2 a 20 tentativas de escape, o trabalho original encontrou, no máximo, 12 tentativas. Isso pode ter ocorrido devido a diferença das linhagens (*Long Evans* x *Wistar*) e protocolo experimental.

O TSS é um teste simples que se utiliza de um comportamento inato do animal e fornece diversas informações sobre seu comportamento de autocuidado e hedônico, que podem refletir sintomas de pacientes deprimidos<sup>73-75</sup>. Uma das diferenças importantes entre os Experimentos 1 e 2 quanto às avaliações comportamentais foi a mudança do momento de realização do TSS 1. No Experimento 1, o teste foi realizado antes do 5º treino de natação, enquanto no Experimento 2, foi feito um dia antes do início dos treinos. Essa alteração foi realizada pois consideramos que refletiria melhor o comportamento basal dos animais. Todavia, em ambos os experimentos, nenhum efeito foi observado na latência para o início do comportamento ou na frequência de *grooming*, o que indica que a natação em si não parece afetar o comportamento.

Especificamente em relação ao Experimento 2, o dimorfismo sexual encontrado na frequência de *grooming* facial, corporal e total, em que as fêmeas realizaram esse comportamento mais frequentemente, é concordante com o resultado de outro estudo que ocorre paralelamente a este. Entretanto, a ausência de diferenças entre os grupos é incoerente com o trabalho citado, em que animais PM3 expressaram menor frequência de *grooming* facial e corporal. Considerando que o *grooming* reflete o autocuidado e está relacionado com hedonia, os resultados também vão contra outro estudo do grupo<sup>42</sup>, em que ratos PM3 apresentaram menor sensibilidade para a mudança de palatabilidade no teste de contraste de sacarose, refletindo comportamento anedônico. Além disso, a avaliação da sequência de *grooming* (assim como a análise do TSS2) ainda não foi feita e pode fornecer informações importantes sobre as manipulações, considerando que a estrutura do comportamento pode ser afetada pelas manipulações do presente protocolo<sup>76,77</sup>.

O LCE é um teste amplamente utilizado para analisar o comportamento do tipo ansioso em ratos, que é inversamente proporcional ao tempo despendido nos

braços abertos<sup>79,80</sup>. No Experimento 1, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os parâmetros avaliados, embora o tamanho do efeito tenha sido moderado ou grande. Entretanto, animais tratados com NPY a dose de 60 µg/kg visualmente ambularam menos e permaneceram menos tempo nos braços abertos, resultando em aumento do índice de ansiedade. Isso foi essencial para que escolhêssemos a dose de 75 µg/kg para usar no Experimento 2, pois, embora estatisticamente igual aos outros grupos, o grupo tratado com essa dose apresentava comportamentos semelhantes ao grupo UWT-. No Experimento 2, seguindo a tendência do experimento anterior, o grupo UWT+/NPY tendeu a ambular mais nos braços abertos que o grupo UWT- e a visitar mais a extremidade desses braços. Além disso, nossos resultados preliminares indicaram que animais PM3 do grupo UWT+/VEI visitaram menos os braços abertos que os animais CTL/VEI, enquanto o oposto foi observado em animais PM3 tratados com DZP e NPY, que visitaram mais os braços abertos do que os respectivos grupos CTL. Considerando que tanto o DZP quanto o NPY são ansiolíticos<sup>46,48,53,70,98</sup>, é coerente que o tratamento com esses medicamentos aumente a ambulação nos braços abertos e diminua o índice de ansiedade, apesar das evidências clínicas que indicam que o DZP aumenta a gravidade de sintomas do TEPT<sup>67,70</sup>. A diferença entre os grupos CTL e PM3 pode indicar, por sua vez, que o tratamento pode auxiliar a melhorar comportamentos relevantes para a ansiedade e o faz com maior intensidade quando há um fator de vulnerabilidade (no caso, a privação) presente. Entretanto, considerando que metade dos animais submetidos ao LCE tenham sido avaliados, qualquer conclusão é precipitada.

Em concordância com outros estudos do grupo<sup>45</sup>, observou-se dimorfismo sexual nos comportamentos analisados, no tempo de permanência nos braços abertos e na quantidade de visitas às extremidades dos braços abertos, que foram maiores em fêmeas. No entanto, em outros trabalhos do nosso grupo não foram observadas diferenças entre machos e fêmeas na maioria dos parâmetros<sup>34,42</sup>.

A avaliação do *grooming* no LCE, embora não prevista no projeto original e nem no Experimento 1, foi feita para os animais no Experimento 2. De maneira geral, os machos do grupo CTL (independente da condição) realizaram o comportamento de forma mais prolongada do que as fêmeas e do que machos do grupo PM3. Esses resultados corroboram outro trabalho do grupo<sup>34</sup>, em que a importância de avaliar comportamentos além da ambulação e tempo de

permanência nos braços é evidenciada, já que os grupos podem apresentar diferenças em parâmetros que não somente os relacionados à avaliação espaço-temporal.

## 4 Conclusão

É importante destacar que, embora grande quantidade de dados esteja disponível, a análise deste projeto não está concluída, de modo que os resultados apresentados podem mudar ou ser fortalecidos com a completude das avaliações comportamentais. Entretanto, o dimorfismo sexual foi evidente em diversos parâmetros comportamentais, assim como a tendência dos tratamentos com NPY e DZP em diminuir o comportamento do tipo ansioso dependente de eventos neonatais, enfatizando a importância do estudo e sua riqueza de informações.

## Referências

1. APA, A. P. A. *The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition*. vol. 5ª Edição (Ed. Arlington, VA, 2013).
2. Brunello, N. *et al.* Posttraumatic stress disorder: diagnosis and epidemiology, comorbidity and social consequences, biology and treatment. *Neuropsychobiology* 43, 150–162 (2001).
3. Chiu, K. B., deRoos-Cassini, T. A. & Brasel, K. J. Factors identifying risk for psychological distress in the civilian trauma population. *Acad Emerg Med* 18, 1156–1160 (2011).
4. Nöthling, J., Simmons, C., Suliman, S. & Seedat, S. Trauma type as a conditional risk factor for posttraumatic stress disorder in a referred clinic sample of adolescents. *Compr Psychiatry* 76, 138–146 (2017).
5. World Health Organization. *World mental health report: transforming mental health for all*. Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. (2022).
6. Kessler, R. C., Sonnega, A., Bromet, E., Hughes, M. & Nelson, C. B. Posttraumatic stress disorder in the National Comorbidity Survey. *Arch Gen Psychiatry* 52, 1048–1060 (1995).
7. Smith, T. C. *et al.* New onset and persistent symptoms of post-traumatic stress disorder self reported after deployment and combat exposures: prospective population based US military cohort study. *BMJ* 336, 366–371 (2008).

8. Rona, R. J. *et al.* Predicting persistent posttraumatic stress disorder (PTSD) in UK military personnel who served in Iraq: a longitudinal study. *J Psychiatr Res* 46, 1191–1198 (2012).
9. Magruder, K. *et al.* Prevalence of Posttraumatic Stress Disorder in Vietnam-Era Women Veterans: The Health of Vietnam-Era Women's Study (HealthVIEWS). *JAMA Psychiatry* 72, 1127–1134 (2015).
10. Farooqui, M. *et al.* Posttraumatic stress disorder: a serious post-earthquake complication. *Trends Psychiatry Psychother* 39, 135–143 (2017).
11. Tang, W., Lu, Y. & Xu, J. Post-traumatic stress disorder, anxiety and depression symptoms among adolescent earthquake victims: comorbidity and associated sleep-disturbing factors. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol* 53, 1241–1251 (2018).
12. Maniglio, R. The impact of child sexual abuse on health: a systematic review of reviews. *Clin Psychol Rev* 29, 647–657 (2009).
13. Chen, L. P. *et al.* Sexual abuse and lifetime diagnosis of psychiatric disorders: systematic review and meta-analysis. *Mayo Clin Proc* 85, 618–629 (2010).
14. Dworkin, E. R., Menon, S. V., Bystrynski, J. & Allen, N. E. Sexual assault victimization and psychopathology: A review and meta-analysis. *Clin Psychol Rev* 56, 65–81 (2017).
15. Scott, K. M. *et al.* Post-traumatic stress disorder associated with sexual assault among women in the WHO World Mental Health Surveys. *Psychol Med* 48, 155–167 (2018).
16. Pietrzak, R. H., Goldstein, R. B., Southwick, S. M. & Grant, B. F. Medical comorbidity of full and partial posttraumatic stress disorder in US adults: results from Wave 2 of the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. *Psychosom Med* 73, 697–707 (2011).
17. Morris, M. C., Compas, B. E. & Garber, J. Relations among posttraumatic stress disorder, comorbid major depression, and HPA function: a systematic review and meta-analysis. *Clin Psychol Rev* 32, 301–315 (2012).
18. McFarlane, A. C., Barton, C. A., Yehuda, R. & Wittert, G. Cortisol response to acute trauma and risk of posttraumatic stress disorder. *Psychoneuroendocrinology* 36, 720–727 (2011).
19. Dekel, S., Ein-Dor, T., Rosen, J. B. & Bonanno, G. A. Differences in Cortisol Response to Trauma Activation in Individuals with and without Comorbid PTSD and Depression. *Front Psychol* 8, 797 (2017).

20. Elzinga, B. M., Schmahl, C. G., Vermetten, E., van Dyck, R. & Bremner, J. D. Higher cortisol levels following exposure to traumatic reminders in abuse-related PTSD. *Neuropsychopharmacology* 28, 1656–1665 (2003).
21. Stoppelbein, L., Greening, L. & Fite, P. The role of cortisol in PTSD among women exposed to a trauma-related stressor. *J Anxiety Disord* 26, 352–358 (2012).
22. Bremner, J. D. *et al.* Cortisol response to a cognitive stress challenge in posttraumatic stress disorder (PTSD) related to childhood abuse. *Psychoneuroendocrinology* 28, 733–750 (2003).
23. Wichmann, S., Kirschbaum, C., Böhme, C. & Petrowski, K. Cortisol stress response in post-traumatic stress disorder, panic disorder, and major depressive disorder patients. *Psychoneuroendocrinology* 83, 135–141 (2017).
24. Zaba, M. *et al.* Identification and characterization of HPA-axis reactivity endophenotypes in a cohort of female PTSD patients. *Psychoneuroendocrinology* 55, 102–115 (2015).
25. Ardi, Z., Ritov, G., Lucas, M. & Richter-Levin, G. The effects of a reminder of underwater trauma on behaviour and memory-related mechanisms in the rat dentate gyrus. *Int J Neuropsychopharmacol* 17, 571–580 (2014).
26. Ardi, Z., Albrecht, A., Richter-Levin, A., Saha, R. & Richter-Levin, G. Behavioral profiling as a translational approach in an animal model of posttraumatic stress disorder. *Neurobiol Dis* 88, 139–147 (2016).
27. Richter-Levin, G. Acute and long-term behavioral correlates of underwater trauma--potential relevance to stress and post-stress syndromes. *Psychiatry Res* 79, 73–83 (1998).
28. Ritov, G., Boltyansky, B. & Richter-Levin, G. A novel approach to PTSD modeling in rats reveals alternating patterns of limbic activity in different types of stress reaction. *Mol Psychiatry* 21, 630–641 (2016).
29. Schöner, J., Heinz, A., Endres, M., Gertz, K. & Kronenberg, G. Post-traumatic stress disorder and beyond: an overview of rodent stress models. *J Cell Mol Med* 21, 2248–2256 (2017).
30. Ritov, G. & Richter-Levin, G. Water associated zero maze: a novel rat test for long term traumatic re-experiencing. *Front Behav Neurosci* 8, 1 (2014).
31. Wang, J., Akirav, I. & Richter-Levin, G. Short-term behavioral and electrophysiological consequences of underwater trauma. *Physiol Behav* 70, 327–332 (2000).

32. Cohen, H. *et al.* Setting apart the affected: the use of behavioral criteria in animal models of post traumatic stress disorder. *Neuropsychopharmacology* 29, 1962–1970 (2004).
33. Ritov, G., Ardi, Z. & Richter-Levin, G. Differential activation of amygdala, dorsal and ventral hippocampus following an exposure to a reminder of underwater trauma. *Front Behav Neurosci* 8, 18 (2014).
34. Barbosa Neto, J. B. *et al.* Stress during development alters anxiety-like behavior and hippocampal neurotransmission in male and female rats. *Neuropharmacology* 62, 518–526 (2012).
35. Boersma, G. J. *et al.* Long-term impact of early life events on physiology and behaviour. *J Neuroendocrinol* 26, 587–602 (2014).
36. Teicher, M. H. *et al.* The neurobiological consequences of early stress and childhood maltreatment. *Neurosci Biobehav Rev* 27, 33–44 (2003).
37. Witek-Janusek, L. Pituitary-adrenal response to bacterial endotoxin in developing rats. *Am J Physiol* 255, E525-530 (1988).
38. Schoenfeld, N. M., Leatham, J. H. & Rabii, J. Maturation of adrenal stress responsiveness in the rat. *Neuroendocrinology* 31, 101–105 (1980).
39. Suchecki, D., Mozaffarian, D., Gross, G., Rosenfeld, P. & Levine, S. Effects of maternal deprivation on the ACTH stress response in the infant rat. *Neuroendocrinology* 57, 204–212 (1993).
40. Levine, S., Huchton, D. M., Wiener, S. G. & Rosenfeld, P. Time course of the effect of maternal deprivation on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the infant rat. *Dev Psychobiol* 24, 547–558 (1991).
41. Suchecki, D., Rosenfeld, P. & Levine, S. Maternal regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the infant rat: the roles of feeding and stroking. *Brain Res Dev Brain Res* 75, 185–192 (1993).
42. Miragaia, A. S. *et al.* Maternal Deprivation Increases Anxiety- and Depressive-Like Behaviors in an Age-Dependent Fashion and Reduces Neuropeptide Y Expression in the Amygdala and Hippocampus of Male and Female Young Adult Rats. *Front Behav Neurosci* 12, 159 (2018).
43. Faturi, C. B. *et al.* Disruptions of the mother-infant relationship and stress-related behaviours: altered corticosterone secretion does not explain everything. *Neurosci Biobehav Rev* 34, 821–834 (2010).

44. Suchecki, D., Duarte Palma, B. & Tufik, S. Pituitary-adrenal axis and behavioural responses of maternally deprived juvenile rats to the open field. *Behav Brain Res* 111, 99–106 (2000).
45. Cabbia, R., Consoli, A. & Suchecki, D. Association of 24 h maternal deprivation with a saline injection in the neonatal period alters adult stress response and brain monoamines in a sex-dependent fashion. *Stress* 21, 333–346 (2018).
46. Heilig, M. *et al.* Anxiolytic-like action of neuropeptide Y: mediation by Y1 receptors in amygdala, and dissociation from food intake effects. *Neuropsychopharmacology* 8, 357–363 (1993).
47. Alviña, K., Jodeiri Farshbaf, M. & Mondal, A. K. Long term effects of stress on hippocampal function: Emphasis on early life stress paradigms and potential involvement of neuropeptide Y. *J Neurosci Res* 99, 57–66 (2021).
48. Heilig, M., Koob, G. F., Ekman, R. & Britton, K. T. Corticotropin-releasing factor and neuropeptide Y: role in emotional integration. *Trends Neurosci* 17, 80–85 (1994).
49. Sullivan, G. M., Coplan, J. D., Kent, J. M. & Gorman, J. M. The noradrenergic system in pathological anxiety: a focus on panic with relevance to generalized anxiety and phobias. *Biol Psychiatry* 46, 1205–1218 (1999).
50. LeDoux, J. E. Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* 23, 155–184 (2000).
51. Holmes, A., Heilig, M., Rupniak, N. M. J., Steckler, T. & Griebel, G. Neuropeptide systems as novel therapeutic targets for depression and anxiety disorders. *Trends Pharmacol Sci* 24, 580–588 (2003).
52. de Lima, R. M. S. *et al.* Early life stress and the programming of eating behavior and anxiety: Sex-specific relationships with serotonergic activity and hypothalamic neuropeptides. *Behav Brain Res* 379, 112399 (2020).
53. Thorsell, A. *et al.* Behavioral insensitivity to restraint stress, absent fear suppression of behavior and impaired spatial learning in transgenic rats with hippocampal neuropeptide Y overexpression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12852–12857 (2000).
54. Yehuda, R., Brand, S. & Yang, R.-K. Plasma neuropeptide Y concentrations in combat exposed veterans: relationship to trauma exposure, recovery from PTSD, and coping. *Biol Psychiatry* 59, 660–663 (2006).
55. Nilsson, C., Karlsson, G., Blennow, K., Heilig, M. & Ekman, R. Differences in the neuropeptide Y-like immunoreactivity of the plasma and platelets of human volunteers and depressed patients. *Peptides* 17, 359–362 (1996).

56. Heilig, M. & Widerlöv, E. Neuropeptide Y: an overview of central distribution, functional aspects, and possible involvement in neuropsychiatric illnesses. *Acta Psychiatr Scand* 82, 95–114 (1990).
57. Hou, C., Jia, F., Liu, Y. & Li, L. CSF serotonin, 5-hydroxyindolacetic acid and neuropeptide Y levels in severe major depressive disorder. *Brain Res* 1095, 154–158 (2006).
58. Sah, R. *et al.* Low cerebrospinal fluid neuropeptide Y concentrations in posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* 66, 705–707 (2009).
59. Sah, R., Ekhtor, N. N., Jefferson-Wilson, L., Horn, P. S. & Geraciotti, T. D. Cerebrospinal fluid neuropeptide Y in combat veterans with and without posttraumatic stress disorder. *Psychoneuroendocrinology* 40, 277–283 (2014).
60. Serova, L. I., Laukova, M., Alaluf, L. G., Pucillo, L. & Sabban, E. L. Intranasal neuropeptide Y reverses anxiety and depressive-like behavior impaired by single prolonged stress PTSD model. *Eur Neuropsychopharmacol* 24, 142–147 (2014).
61. Serova, L. I. *et al.* Single intranasal neuropeptide Y infusion attenuates development of PTSD-like symptoms to traumatic stress in rats. *Neuroscience* 236, 298–312 (2013).
62. Sabban, E. L., Alaluf, L. G. & Serova, L. I. Potential of neuropeptide Y for preventing or treating post-traumatic stress disorder. *Neuropeptides* 56, 19–24 (2016).
63. Primeaux, S. D., Wilson, S. P., Cusick, M. C., York, D. A. & Wilson, M. A. Effects of altered amygdalar neuropeptide Y expression on anxiety-related behaviors. *Neuropsychopharmacology* 30, 1589–1597 (2005).
64. Sajdyk, T. J., Vandergriff, M. G. & Gehlert, D. R. Amygdalar neuropeptide Y Y1 receptors mediate the anxiolytic-like actions of neuropeptide Y in the social interaction test. *Eur J Pharmacol* 368, 143–147 (1999).
65. Husum, H., Termeer, E., Mathé, A. A., Bolwig, T. G. & Ellenbroek, B. A. Early maternal deprivation alters hippocampal levels of neuropeptide Y and calcitonin-gene related peptide in adult rats. *Neuropharmacology* 42, 798–806 (2002).
66. Wertheimer, G. S. de O., Girardi, C. E. N., de Oliveira, A. de S. M., Monteiro Longo, B. & Suchecki, D. Maternal deprivation alters growth, food intake, and neuropeptide Y in the hypothalamus of adolescent male and female rats. *Dev Psychobiol* 58, 1066–1075 (2016).

67. Schrader, C. & Ross, A. A Review of PTSD and Current Treatment Strategies. *Mo Med* 118, 546–551 (2021).
68. Jeffreys, M., Capehart, B. & Friedman, M. J. Pharmacotherapy for posttraumatic stress disorder: review with clinical applications. *J Rehabil Res Dev* 49, 703–715 (2012).
69. Jonas, D. E. *et al.* *Psychological and Pharmacological Treatments for Adults With Posttraumatic Stress Disorder (PTSD)*. (Agency for Healthcare Research and Quality (US), 2013).
70. Guina, J., Rossetter, S. R., DeRHODES, B. J., Nahhas, R. W. & Welton, R. S. Benzodiazepines for PTSD: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Psychiatr Pract* 21, 281–303 (2015).
71. Gelfo, F. *et al.* Intraperitoneal injection of neuropeptide Y (NPY) alters neurotrophin rat hypothalamic levels: Implications for NPY potential role in stress-related disorders. *Peptides* 32, 1320–1323 (2011).
72. Gelfo, F. *et al.* NPY intraperitoneal injections produce antidepressant-like effects and downregulate BDNF in the rat hypothalamus. *CNS Neurosci Ther* 18, 487–492 (2012).
73. Taksande, B. G. *et al.* Agmatine attenuates chronic unpredictable mild stress induced behavioral alteration in mice. *Eur J Pharmacol* 720, 115–120 (2013).
74. Rosa, P. B. *et al.* Folic acid prevents depressive-like behavior induced by chronic corticosterone treatment in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 127, 1–6 (2014).
75. Haj-Mirzaian, A. *et al.* Blockade of NMDA receptors reverses the depressant, but not anxiogenic effect of adolescence social isolation in mice. *Eur J Pharmacol* 750, 160–166 (2015).
76. Kalueff, A. V. *et al.* Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. *Nat Rev Neurosci* 17, 45–59 (2016).
77. Kalueff, A. V., Aldridge, J. W., LaPorte, J. L., Murphy, D. L. & Tuohimaa, P. Analyzing grooming microstructure in neurobehavioral experiments. *Nat Protoc* 2, 2538–2544 (2007).
78. Hu, C. *et al.* Re-evaluation of the interrelationships among the behavioral tests in rats exposed to chronic unpredictable mild stress. *PLoS One* 12, e0185129 (2017).
79. Knight, P. *et al.* Sex differences in the elevated plus-maze test and large open field test in adult Wistar rats. *Pharmacol Biochem Behav* 204, 173168 (2021).

80. Korte, S. M. & De Boer, S. F. A robust animal model of state anxiety: fear-potentiated behaviour in the elevated plus-maze. *Eur J Pharmacol* 463, 163–175 (2003).
81. Mazor, A. *et al.* Gender-related qualitative differences in baseline and post-stress anxiety responses are not reflected in the incidence of criterion-based PTSD-like behaviour patterns. *World J Biol Psychiatry* 10, 856–869 (2009).
82. Cohen, H. *et al.* The neuropeptide Y (NPY)-ergic system is associated with behavioral resilience to stress exposure in an animal model of post-traumatic stress disorder. *Neuropsychopharmacology* 37, 350–363 (2012).
83. Pereira, G. C., Neto, M. M., Antunes, H. K. M., Lee, K. S. & da Luz, M. H. M. Anesthesia can alter the levels of corticosterone and the phosphorylation of signaling molecules. *BMC Res Notes* 14, 363 (2021).
84. Arnold, M. & Langhans, W. Effects of anesthesia and blood sampling techniques on plasma metabolites and corticosterone in the rat. *Physiol Behav* 99, 592–598 (2010).
85. Stephanie. Eta Squared / Partial Eta Squared. *Statistics How To* <https://www.statisticshowto.com/eta-squared/> (2016).
86. What is Partial Eta Squared? (Definition & Example) - Statology. <https://www.statology.org/partial-eta-squared/>.
87. Koolhaas, J. M. *et al.* Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. *Neurosci Biobehav Rev* 23, 925–935 (1999).
88. van Erp-van der Kooij, E., Kuijpers, A. H., Schrama, J. W., Ekkel, E. D. & Tielen, M. J. [Individual behavioral characteristics of pigs and their impact on production]. *Tijdschr Diergeneeskde* 125, 649–652 (2000).
89. Hawley, D. F. *et al.* Neurobiological constituents of active, passive, and variable coping strategies in rats: integration of regional brain neuropeptide Y levels and cardiovascular responses. *Stress* 13, 172–183 (2010).
90. Yehuda, R., Flory, J. D., Southwick, S. & Charney, D. S. Developing an agenda for translational studies of resilience and vulnerability following trauma exposure. *Ann N Y Acad Sci* 1071, 379–396 (2006).
91. Goldman, J. M., Murr, A. S. & Cooper, R. L. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 80, 84–97 (2007).

92. Henn, L., Zanta, N. C., Girardi, C. E. N. & Suchecki, D. Chronic Escitalopram Treatment Does Not Alter the Effects of Neonatal Stress on Hippocampal BDNF Levels, 5-HT1A Expression and Emotional Behaviour of Male and Female Adolescent Rats. *Mol Neurobiol* 58, 926–943 (2021).
93. McConn, B. R., Cline, M. A. & Gilbert, E. R. Dietary macronutrient composition and central neuropeptide Y injection affect dietary preference and hypothalamic gene expression in chicks. *Nutr Neurosci* 21, 403–413 (2018).
94. Dryden, S., Pickavance, L., Frankish, H. M. & Williams, G. Increased neuropeptide Y secretion in the hypothalamic paraventricular nucleus of obese (fa/fa) Zucker rats. *Brain Res* 690, 185–188 (1995).
95. Stanley, B. G., Kyrkouli, S. E., Lampert, S. & Leibowitz, S. F. Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. *Peptides* 7, 1189–1192 (1986).
96. Zarjevski, N., Cusin, I., Vettor, R., Rohner-Jeanrenaud, F. & Jeanrenaud, B. Chronic intracerebroventricular neuropeptide-Y administration to normal rats mimics hormonal and metabolic changes of obesity. *Endocrinology* 133, 1753–1758 (1993).
97. Sencar-Cupović, I. & Milković, S. The development of sex differences in the adrenal morphology and responsiveness in stress of rats from birth to the end of life. *Mech Ageing Dev* 5, 1–9 (1976).
98. Diazepam. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 66, 37–96 (1996).