

Rodrigo de Almeida Ramos

Avaliação de resposta ansiolítica em ratos infectados por *Toxoplasma gondii* tratados com *Lactobacillus rhamnosus* comparados com placebo.

Tese apresentada ao curso de
Pós-Graduação da Faculdade
de Ciências Médicas da
Santa Casa de São Paulo para
obtenção do título de Doutor
em Ciências a Saúde.

São Paulo, 2025

Rodrigo de Almeida Ramos

Avaliação de resposta ansiolítica em ratos infectados por *Toxoplasma gondii* tratados com *Lactobacillus rhamnosus* comparados com placebo.

Tese apresentada ao curso de
Pós-Graduação da Faculdade
de Ciências Médicas da
Santa Casa de São Paulo para
obtenção do título de Doutor
em Ciências da Saúde.

Área de Concentração:
Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dr. Marcelo
Jenné Mimica – livre docente
Co orientador – Prof. Dr
Sergio Vieira dos Santos

São Paulo, 2025

Para Rafinha e Bubuzinha, as verdadeiras razões de tudo

Para o amigo Caio Zamboni – Foi você, né?

Para Patricia, Priscila e Polyana, que compartilham comigo a genética do estudo

Para mamãe e papai, os verdadeiros responsáveis por tudo

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central da
Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo

Ramos, Rodrigo de Almeida

Avaliação de resposta ansiolítica em ratos infectados por *Toxoplasma gondii* tratados com *Lactobacillus rhamnosus* comparados com placebo./ Rodrigo de Almeida Ramos. São Paulo, 2025.

Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo – Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Ciências da Saúde

Orientador: Marcelo Jenne Mimica

Coorientador: Sergio Vieira dos Santos

1. *Toxoplasma gondii* 2. *Lactobacillus rhamnosus* 3. Probióticos 4. Ansiedade 5. Eixo intestino-cérebro 6. Vasopressinas 7. Ratos 8. Comportamento animal

BC-FCMSCSP/45-25

“Em algum lugar, algo incrível está esperando para ser conhecido.”

Sharon Begley — frequentemente atribuída a Carl Sagan

Agradecimentos

À Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo – guardiã centenária do saber médico, que acolheu, ao longo da história, as principais escolas de medicina do Estado. Incentivadora perene da ciência e da formação humanística, fez de seus muros um santuário onde o conhecimento floresce a serviço da vida.

À Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo – templo da ciência e da ética, cuja vocação para o ensino, a pesquisa e a formação humana confere à medicina um sentido que ultrapassa o ofício técnico: faz dela um compromisso com a dignidade humana e um ato contínuo de reverência à complexidade do humano.

Ao Departamento de Patologia da FCMSCSP, que generosamente acolheu este projeto e tantos outros conduzidos por psiquiatras que, desafiando os limites da especialidade, buscam na base morfofuncional das doenças os caminhos para compreender os intrincados mecanismos do comportamento humano. Que esse espaço continue sendo terreno fértil para o encontro entre a biologia e a mente.

À Disciplina de Parasitologia, que se reinventou com generosidade e visão para acolher profissionais cujas trajetórias até então se distanciavam de seu escopo tradicional. Com sabedoria e entusiasmo, não apenas os integrou ao universo

da parasitologia, mas os fez trabalhar com afinco, gostar e, sobretudo, se encantar pelas fascinantes relações entre parasitas e comportamento.

À Disciplina de Microbiologia, cuja iniciativa visionária deu origem a esta pesquisa, envolvendo psiquiatras em um escopo até então pouco explorado por eles. Com entusiasmo e competência, mostrou a todos nós que os microrganismos não são apenas agentes biológicos, mas peças-chave na compreensão da mente, do comportamento e da complexa tapeçaria que une corpo e psiquismo.

À Probac do Brasil Produtos Bacteriológicos LTDA, expresso meu sincero agradecimento pela gentil cessão da cepa de *Lactobacillus rhamnosus*, elemento essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, registro minha mais profunda gratidão pela generosa cessão da cepa de *Toxoplasma gondii*, sem a qual este trabalho não teria sido possível.

Ao Prof. Dr. Marcelo Jenné Mimica, livre-docente, cuja trajetória se entrelaça à minha desde os tempos de graduação e que, com nobreza e generosidade intelectual, dignou-se a aceitar o desafio de orientar esta tese – um gesto que honra não apenas a mim, mas ao próprio ofício da ciência.

Ao Prof. Dr. Sergio Vieira dos Santos, intelecto eminente da academia e mestre de excelência, que assumiu com primorosa dedicação a coorientação desta tese

— honra que me coube e cuja marca se inscreve com nitidez na arquitetura deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Pedro Paulo Chieffi, mestre inaugural da minha jornada acadêmica desde os tempos da graduação, cuja inquietação intelectual me instigou a desvendar os enigmas do comportamento do Toxoplasma, e cuja orientação ao longo dos anos revelou que o caminho da ciência, embora árduo, é fonte de inextinguível satisfação.

À Dra. Gisele Akenime Wolf, companheira de jornada desde os tempos de faculdade, cuja presença foi decisiva para o início deste trabalho. Sua dedicação, precisão e senso organizacional foram alicerces sólidos ao longo de todo o percurso — garantindo que cada resultado fosse mais que um dado: fosse direção.

Ao Prof. Dr. Mauro Tadeu Ajaj Sayeg, com quem compartilhei não apenas os bancos da faculdade, mas também o uniforme do Exército em Manaus. Foi ele quem, com generosidade incansável e sabedoria fraterna, lançou pontes para os artigos que sustentaram esta tese, reafirmando que na ciência, como na vida, os bons aliados são tesouros raros.

À minha irmã, Prof. Polyana de Almeida Ramos Pierce — acadêmica de excelência e guardiã do rigor linguístico — que, com olhar atento e espírito generoso, revisou, padronizou e refinou cada linha desta tese. A ela, que me

presenteou com dois sobrinhos, um deles afilhado, vai também minha gratidão por entrelaçar, com ciência e afeto, os fios desta jornada.

À minha irmã, Priscila de Almeida Ramos, escritora brilhante e autora de três livros publicados, agradeço com especial carinho por emprestar sua sensibilidade artística e criatividade ímpar na elaboração dos principais desenhos desta tese e do artigo derivado. Sua dedicação transformou ideias complexas em imagens claras e inspiradoras, enriquecendo não apenas o rigor científico do trabalho, mas também sua beleza estética.

A Érico Silva Thiago, cuja competência multifacetada se fez presente em todas as etapas deste projeto — da concepção às discussões mais densas. Participativo, preciso e incansável, Érico é daqueles que parecem saber tudo de tudo. Não por acaso, alcança com folga a nota máxima em qualquer escala de humor.

À Prof.^a Cynthia Silva Bartolomeu, cuja atuação foi decisiva na condução da parte experimental deste trabalho. Sua competência técnica e dedicação foram fundamentais, em especial nos estudos relacionados à metilação do DNA — área em que sua precisão e discernimento científico imprimiram rigor e profundidade aos resultados obtidos.

A Daniel Mauricio Santos, cuja habilidade técnica no manejo experimental com animais foi essencial para o êxito deste trabalho. Com entusiasmo contagiante,

incentivou-me a entrelaçar a ciência com o exercício físico, e presenteou-me com momentos inesquecíveis — sempre marcados por sua personalidade incrível, fantástica e sensacional, que faz da convivência um privilégio raro.

À aluna de Iniciação Científica Vitória Assis Romano Monteiro, cuja doçura no trato se soma a um empenho admirável. Incansável na execução das etapas experimentais, foi presença constante e dedicada neste projeto, deixando em cada tarefa a marca de sua seriedade, sensibilidade e vontade genuína de aprender.

À aluna de Iniciação Científica Tainá Ribeiro Azevedo, cuja intensidade, garra e espírito de liderança são tão marcantes quanto sua dedicação à pesquisa. Incansável na parte experimental, trouxe ao projeto não apenas esforço e competência, mas também a chama vibrante da juventude que luta pelo que acredita — um sopro de vitalidade e propósito em cada etapa do trabalho.

A Edith Zamai, presença luminosa e insubstituível da Santa Casa, cuja trajetória de sete décadas de dedicação atravessa gerações com firmeza, doçura e exemplo. Com palavras de incentivo e o ritual sagrado de um café sempre no tempo certo, manteve nossa equipe unida — como só aqueles que entendem a alma dos lugares e das pessoas sabem fazer. Sua existência é uma lição silenciosa de cuidado, constância e amor pelo que se faz.

À Roselina Gordinho, cuja paciência e precisão deram forma às lâminas de imunohistoquímica que sustentam esta pesquisa. Com simpatia singular e

excelência didática, ensinou passo a passo — e com notável generosidade — os segredos de uma lâmina bem-feita, tornando cada gesto técnico também um gesto de transmissão e cuidado.

À Luciana Regina Meireles, manifesto minha profunda gratidão pela generosidade em ceder a cepa de *Toxoplasma gondii* a partir do Instituto de Medicina Tropical e pelo apoio constante, ainda que à distância, em todas as etapas deste trabalho.

A Elen Conceição Silva, gerente dedicada da minha clínica, que, com competência e zelo, colaborou na organização das tabelas deste trabalho. Sua ajuda discreta, mas essencial, revela que a ciência também se faz com gestos de apoio que ultrapassam os muros da universidade.

À Dra. Bruna Martella, cuja presença nos primeiros passos desta pesquisa contribuiu para lançar suas bases com entusiasmo e competência. Depois, seguiu para um dos mais belos projetos da vida: a maternidade — escolha que merece reverência e afeto, pois também é forma sublime de construção do futuro.

Abreviaturas e símbolos

5- HT – 5-hidroxi triptamina (serotonina)

AADC – Descarboxilase de aminoácidos aromáticos

ACTH – Adrenocorticotropina

AGCC – Ácidos graxos de cadeia curta

AhR – Hidrocarbonetos aromáticos

AVP – Arginina vasopressina

BDNF – Fator neurotrófico derivado do cérebro

BFD1 - *Bradyzoite-Formation Deficient 1*

BHE – Barreira hematoencefálica

BNST - Leito da estria terminal

CA – Campo Aberto

CA 1 – Campo aberto no primeiro tempo

CA 2 – Campo aberto no segundo tempo

CCK – Colecistoquinina

CeA – Amígdala central

CpG - Citosina – ponte fosfodiéster – Guanina

CRF – Fator liberador de corticotrofina

CRH – Hormônio liberador de corticotropina

DII – Doença inflamatória intestinal

DNA – Ácido desoxiribonucleico

EA – Esquiva aversiva

EBA – Entradas no Braço Aberto

EBF - Entradas no Braço Fechado

ERK - *Extracellular signal-Regulated Kinase*

FBA – Tempo de Fundo do Braço Aberto

FBF – Tempo de Fundo do Braço Fechado

GABA – Ácido Gama amino butírico

GAD – Glutamato descarboxilase

GAD 15 - Dense Granule Protein 15

GLP1- Peptídeo glucagon like 1

GPC 1- Glicoproteína da parede do cisto 1

HAUSP - *Herpesvirus-associated ubiquitin-specific protease*

HDACs - Histonas desacetilases

HIF-1 α - *Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha*

HMP – Human microbiome Project

HPA - Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

IFN- γ – Interferon gama

IHQ – Imuno-histoquímica

IL 22 – Interleucina 22

IL-10 – Interleucina 10

IL-12 – Interleucina 12

IL-1 β – Interleucina 1 Beta

IL-6 – Interleucina 6

ILA - Ácido indol-3-láctico

iNOS – Óxido nítrico sintetase induzível

IRGs – GTPases imunoreguladoras

IRR - Razão de taxa de incidência

JNK - *c-Jun N-terminal Kinase*

LB – Labirinto de Barnes

LB 1 - Labirinto de Barnes no primeiro tempo

LB 2 – Labirinto de Barnes no segundo tempo

LCE – Labirinto em cruz elevado

LCE 1 – Labirinto em cruz elevado no primeiro tempo

LCE 2 – Labirinto em cruz elevado no segundo tempo

LCMV – Vírus da coreomeningite linfocítica

LH – Hormônio luteinizante

LRT - *Likelihood ratio test*

MCIs – Massas de células intercaladas

MeA – Amígdala medial

MePD – Região pósterodorsal da amígdala medial

MePV - Região pósteroventral da amígdala medial

miR-17-92 - *microRNA cluster 17-92*

MSRE - Enzimas de restrição sensíveis à metilação

MUC 2 - gene responsável pela codificação da mucina 2

NAc – Núcleo *Accumbens*

NF-κB – Fator nuclear kappa B

NK – Células natural killer

NLET – Núcleo do leito da estria terminal

NO – Óxido nítrico

NTS – Núcleo do trato solitário

PP2A - *Protein Phosphatase 2^a*

PVN – Núcleo paraventricular

PYY – Peptídeo tirosina tirosina

REML - Máxima verossimilhança restrita

RNA – Ácido nucleico

SII – Síndrome do intestino irritável

SMZ-TMP – Sulfametoxazol – Trimetoprima

SNC – Sistema nervosa central

SNE – Sistema nervoso entérico

SON – Núcleo supraóptico

STATs - *Signal Transducer and Activator of Transcription*

TBA - Tempo no Braço Aberto

TBF – Tempo no Braço Fechado

TC - Tempo no Centro

TH – Tirosina hidroxilase

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

TP – Tempo de periferia

ZO-1- Zonula occludens 1

Sumário

1. Introdução	20
2. Revisão da literatura	4
2.1 O papel adaptativo das emoções na evolução de Homo sapiens: ênfase nas emoções negativas e na ansiedade.....	4
2.2 A amígdala e o medo.....	9
2.3 Microbioma	10
2.4 O Eixo Intestino-Cérebro	16
2.5 O papel do sistema nervoso entérico na comunicação intestino-cérebro.....	21
2.6 Uso de prebióticos, probióticos e pósbióticos para ansiedade e depressão	22
2.7 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> : propriedades taxonômicas, clínicas e aplicações experimentais	24
2.8 A amígdala e sua liberação de Arginina-Vasopressina.....	37
2.9 Interação entre <i>Toxoplasma gondii</i> e <i>Lactobacillus</i> : implicações imunológicas e terapêuticas	44
2.10 Pesquisas com análise de metilação do promotor de AVP	47
2.11 Abordagens experimentais para avaliação comportamental em modelos animais	48
2.12 Imunohistoquímica e os marcadores c-FOS e AVP: fundamentos e aplicações em neurociência comportamental	56
3. Objetivos.....	59
3.1 Objetivo geral.....	59
3.2 Objetivos específicos.....	59
4. Materiais e Métodos	60

8. Segundo Tempo de <i>Grooming</i>	105
1. Análise com a enzima HpaII (sítio CCGG).....	180
2. Análise com a enzima BstUI (sítio CGCG)	182
4. Análise gráfica de amplificação e curvas de dissociação	185
5. Discussão	188
6. Conclusão.....	192
7. Resumo.....	204
Anexo I.....	208
Anexo II.....	317
Anexo III.....	319
Anexo IV	Erro! Indicador não definido.

1. Introdução

Nas últimas décadas, três eixos de pesquisa ganharam tração mensurável e relevância translacional: (i) neurociência das emoções; (ii) eixo microbiota–intestino–cérebro; e (iii) neuroparasitologia.

No que tange às emoções, observa-se um aumento gradual de publicações entre 1992 e 2005, seguido por um crescimento vertiginoso e pela entrada de pesquisadores de diversas áreas nesse campo. Nos últimos 30 anos, portanto, houve um crescimento consistente no número de artigos e publicações. A expansão do interesse científico em compreender a neurobiologia das emoções continua a se expressar de maneira contínua e significativa ⁽¹⁾.

No eixo intestino–cérebro, sínteses-âncora evidenciam um crescimento progressivo de dados pré-clínicos e clínicos sobre vias neurais, endócrinas e imunes que conectam a microbiota ao cérebro, tornando o campo prioritário para intervenções em estresse, ansiedade e humor ⁽²⁾. Há, ainda, evidências bibliométricas de que esse crescimento seguirá constante ⁽³⁾.

Já a neuroparasitologia, embora emergente, é hoje reconhecida e bem aceita como subdisciplina que investiga como parasitas modulam circuitos neurais e comportamento. Ainda que as evidências diretas de manipulação neural em humanos sejam escassas, cresce o interesse em associações entre *Toxoplasma gondii* e transtornos psiquiátricos, como esquizofrenia e transtorno

bipolar. Estudos recentes sugerem, inclusive, que algumas doenças psiquiátricas podem ter etiologia infecciosa além da predisposição genética (4,

5). Esse novo campo de estudo mostra-se, portanto, capaz de explicar alterações comportamentais em hospedeiros mamíferos e artrópodes, além de abrir novas perspectivas para a integração entre neurociência, parasitologia e psiquiatria (4). É nesse contexto que se inicia a justificativa deste trabalho.

O *T. gondii*, protozoário intracelular obrigatório do filo Apicomplexa, constitui um modelo robusto para investigar modulação comportamental e circuitos do medo/ansiedade. Em roedores, a infecção crônica reduz a aversão a odores de predadores felinos, aumentando a vulnerabilidade do hospedeiro. Além disso, a infecção diminui a ansiedade geral, em correlação com carga cística e neuroinflamação, envolvendo a amígdala, vias dopaminérgicas e plasticidade epigenética local (6). Resultados clássicos em labirinto em cruz elevado e em testes de interação social já demonstraram redução da ansiedade após a infecção por *T. gondii* (7). Complementarmente, evidências indicam hipometilação do promotor da vasopressina (AVP) na amígdala medial posterior (MePD) como mecanismo proximal para o fenótipo comportamental, reforçando a ponte entre neuroepigenética e comportamento (8). Esse conjunto sustenta a pertinência de investigar relações “ansiolíticas” associadas ao *T. gondii* e seus moduladores.

Por outro lado, a literatura mostra que a microbiota intestinal modula a reatividade ao estresse e à ansiedade por vias vagais, GABAérgicas, imunes e metabólicas, consolidando bases biológicas para intervenções psicobióticas (2). Em modelo murino, a ingestão de *Lactobacillus rhamnosus* (JB-1) reduziu comportamentos ansiosos e reconfigurou a expressão de receptores GABA no cérebro; tais efeitos foram abolidos pela vagotomia — evidência causal de um circuito intestino–vago–cérebro (9). Em humanos, ensaio

clínico randomizado mostrou menor prevalência de sintomas de ansiedade e depressão no pós-parto com *L. rhamnosus* HN001, apoiando a plausibilidade translacional, ainda que dependente da cepa utilizada (10). O conceito de psicobióticos — microrganismos vivos que beneficiam a saúde mental — vem se consolidando de forma crescente na literatura científica (11).

Evidências atuais indicam que a infecção por *T. gondii* desestabiliza a eubiose intestinal e repercute no sistema nervoso central, conectando imunidade de mucosa, inflamação sistêmica e lesão neural. Em modelos animais, *Lactobacillus* spp. (e seus metabólitos, como o indol-3-lático) atenuam danos à barreira intestinal e reduzem marcadores neuroinflamatórios, sugerindo uma via de modulação intestino–cérebro relevante ao fenótipo ansioso (12). Revisões recentes propõem explicitamente que a disbiose induzida por *T. gondii* pode estar na base das alterações comportamentais, reforçando a justificativa para manipular a microbiota como estratégia experimental (13).

Diante do crescimento e da convergência desses campos, investigar as relações ansiolíticas entre *Toxoplasma gondii* e *Lactobacillus rhamnosus* é cientificamente oportuno e clinicamente pertinente. Tal abordagem explora:

- um modelo consolidado de modulação do medo/ansiedade por um parasita neurotrópico;
- um modulador microbiano com mecanismos definidos no eixo intestino–cérebro; e
- o nexo fisiopatológico entre disbiose, neuroinflamação e circuitos afetivos — alinhado ao estado da arte da neurociência afetiva, da biologia do estresse e da parasitologia moderna.

2. Revisão da literatura

2.1 O papel adaptativo das emoções na evolução de *Homo sapiens*:

ênfase nas emoções negativas e na ansiedade

As emoções constituem sistemas neurobiológicos fundamentais, moldados ao longo da evolução para regular o comportamento diante de desafios recorrentes do ambiente. Essas respostas afetivas rápidas e, muitas vezes, automáticas, promovem a sobrevivência e o sucesso reprodutivo dos organismos, inclusive dos *Homo sapiens*. Em termos funcionais, as emoções podem ser compreendidas como estados mentais moduladores de ação, que operam de modo mais flexível que reflexos, mas menos deliberativos que os comportamentos volitivos. Elas permitem uma avaliação eficiente de ameaças e oportunidades, facilitando a tomada de decisões em contextos incertos e dinâmicos ⁽¹⁴⁾.

Do ponto de vista funcional, os estados emocionais são caracterizados por múltiplas propriedades, como escalabilidade, persistência, prioridade no controle comportamental e integração de múltiplos sistemas fisiológicos e cognitivos — elementos que os distinguem de outros estados mentais como reflexos ou conceitos ⁽¹⁴⁾. Essas propriedades podem ser sintetizadas no esquema a seguir:

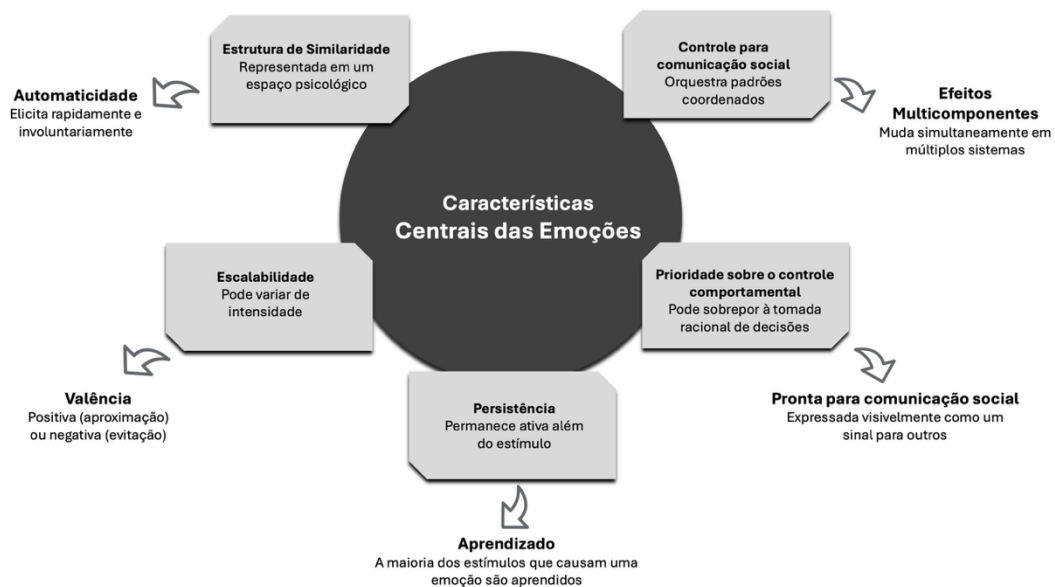


Figura 1. Características funcionais dos estados emocionais. O fluxograma apresenta propriedades centrais que definem os estados emocionais. Tais características incluem escalabilidade, persistência, prioridade sobre o controle comportamental, estrutura de similaridade, valência, aprendizado, predisposição à comunicação social, efeitos multicomponentes, automaticidade. Essas propriedades distinguem os estados emocionais de reflexos simples ou comportamentos volitivos, oferecendo um modelo funcional útil para investigações em neurociência afetiva⁽¹⁴⁾.

As emoções podem ser classificadas de acordo com sua valência (Figura 1), refletindo tendências motivacionais de aproximação (positiva) ou esquiva (negativa) ⁽²⁾.

As emoções de valência positiva, como alegria, contentamento e orgulho, desempenham funções adaptativas essenciais ao promoverem comportamentos de aproximação e aquisição de recursos, fortalecendo vínculos sociais e estratégias cooperativas. Essas emoções estão enraizadas no sistema motivacional apetitivo, responsável por orientar o organismo em direção a estímulos prazerosos e recompensadores. Em termos neurobiológicos, esse sistema envolve a ativação de circuitos dopaminérgicos mesolímbicos — notadamente o núcleo accumbens e o córtex pré-frontal ventromedial —, os quais favorecem o reforço de ações que aumentam o bem-estar e o sucesso reprodutivo ⁽¹⁵⁾. Evidências psicofisiológicas indicam que, diante de estímulos agradáveis e emocionalmente excitantes, há inibição do reflexo de sobressalto, maior atividade nos músculos faciais relacionados ao sorriso (Eletromiografia do músculo zigomático), além de aceleração cardíaca e aumento do tempo de visualização voluntária ⁽¹⁶⁾. Em contextos ancestrais, essas respostas facilitavam a manutenção de interações sociais benéficas, cooperação entre membros do grupo e o fortalecimento de laços afetivos — elementos cruciais à sobrevivência e à reprodução em espécies de organização social complexa, como os humanos ^(17, 18).

Em contrapartida, emoções de valência negativa — como medo, raiva, tristeza e ansiedade — foram igualmente mantidas por seu valor protetivo. Evocadas por estímulos associados à ameaça, à frustração ou à perda, essas emoções ativam rapidamente circuitos subcorticais como a amígdala, o hipotálamo e a substância cinzenta periaquedutal, mobilizando respostas comportamentais e fisiológicas de defesa⁽¹⁹⁾. Ainda que subjetivamente

desconfortáveis, essas respostas aumentam a vigilância, a prontidão e a capacidade de evitar danos — funções essenciais em ambientes incertos ⁽²⁰⁾.

Entre elas, destaca-se a ansiedade, um estado emocional preventivo, que se diferencia do medo por antecipar perigos potenciais ou incertos, em lugar de ameaças imediatas. Filogeneticamente, a ansiedade favoreceu a detecção precoce de riscos e a preparação comportamental, especialmente em cenários em que a ameaça ainda não havia se manifestado plenamente⁽²¹⁾. Comportamentos defensivos eliciados por pistas ambientais ambíguas, como sons súbitos ou movimentos inesperados, refletem estratégias adaptativas selecionadas filogeneticamente para maximizar a sobrevivência em ambientes hostis e imprevisíveis, mesmo na ausência de uma ameaça iminente⁽²²⁾.

Para estudar os mecanismos subjacentes à ansiedade, tanto a autoprotetiva e normal quanto a disfuncional e patológica, a neurociência tem empregado modelos animais robustos, especialmente o teste do labirinto em cruz elevado (LCE). Esse paradigma explora o conflito entre a motivação exploratória e o medo inato de espaços abertos. O LCE consiste em duas hastes abertas e duas fechadas, elevadas do solo. Ratos ansiosos tendem a permanecer nas áreas fechadas, evitando as abertas ⁽²³⁾. O modelo é validado por sua sensibilidade a benzodiazepínicos e sua correlação com a ativação da amígdala e do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) ⁽²³⁻²⁵⁾.

Nas últimas décadas, a emergência da neuroparasitologia ampliou as possibilidades de investigação sobre o substrato emocional a partir da manipulação comportamental induzida por parasitas ^(4, 5). Um dos modelos

mais emblemáticos é o da infecção por *Toxoplasma gondii* em roedores. Diversos estudos demonstraram que esse protozoário, ao formar cistos em regiões límbicas como a amígdala medial posterior, altera a valência emocional de pistas associadas a predadores felinos ^(7, 26). Como consequência, os ratos infectados exibem redução da ansiedade relacionada à autodefesa e da aversão inata ao odor de urina de gato, comportamento interpretado como uma manipulação adaptativa do hospedeiro intermediário, que aumenta as chances de transmissão do parasita ao hospedeiro definitivo ⁽⁷⁾.

Esse modelo demonstra que circuitos emocionais, considerados altamente conservados do ponto de vista evolutivo, podem ser modulados por agentes infecciosos, oferecendo uma janela privilegiada para o estudo das bases neurobiológicas da emoção, da motivação e do comportamento defensivo.

Contudo, os mesmos circuitos que sustentaram a ansiedade adaptativa durante a evolução — como o eixo amígdala-hipocampo-córtex pré-frontal medial — podem tornar-se disfuncionais. Em sociedades altamente informatizadas, com estressores crônicos e ausência de ameaças físicas claras, esses sistemas podem ser hiperativados, levando à ansiedade patológica ⁽²⁷⁾.

Dessa forma, a ansiedade pode ser compreendida como um resquício funcionalmente vantajoso da história evolutiva, que hoje, em determinados contextos, pode se tornar disfuncional. Ao investigar suas bases biológicas, funcionais e filogenéticas, a neurociência contemporânea não apenas elucida a origem dos transtornos mentais, como também oferece um modelo integrativo para entender a emoção humana como um fenômeno adaptativo.

2.2 A amígdala e o medo

A amígdala, ou complexo amigdalóide, é uma estrutura do sistema límbico, situada no lobo temporal medial, e composta de mais de dez núcleos, de onde se destacam: Grupo basolateral, Grupo cortical, Grupo centromedial, massas de células intercaladas (MCIs), área amígdalo-hipocampal, a área amigdalóide anterior, além da amígdala estendida, proposta alternativa que incorpora o núcleo do leito da estria terminal (NLET – parte do sistema límbico que contém neurônios GABAérgicos e glutamatérgicos, além de expressar receptores de CRF (fator liberador de corticotropina), AVP (arginina vasopressina) e noradrenalina)) e a substância denominada como parte funcional da amígdala centromedial ⁽²⁸⁾.

Suas principais aferências incluem informações sensoriais olfatória, somatossensorial, gustativa, auditiva e visual provenientes do córtex, além de outras regiões límbicas como o hipocampo, núcleos talâmicos, tronco encefálico e hipotálamo, e projeta impulsos nervosos para o córtex pré-frontal, hipocampo, núcleo accumbens, córtex sensorial, tálamo, hipotálamo, núcleo do leito de estrias terminais, além de regiões monoaminérgicas. Dessa forma, ela modula comportamentos autonômicos, endócrinos e defensivos, incluindo o medo ^(7, 26-28).

O medo tem sido popular em pesquisas da expressão neurocientífica das emoções por ser tão importante para a sobrevivência e pela existência de vários protocolos consagrados para seu estudo experimental ⁽²⁹⁾.

O medo é amplamente reconhecido como um componente central dos transtornos de ansiedade, devido à sua estreita relação com esses quadros. Medo e ansiedade são manifestações inter-relacionadas de um mesmo fenômeno emocional, ambas associadas a comportamentos de autopreservação diante de ameaças presentes ou futuras. Enquanto o medo representa uma resposta emocional frente a uma ameaça real ou iminente, a ansiedade refere-se à antecipação de um perigo potencial. Apesar de sobrepostos em muitos aspectos, esses estados diferenciam-se funcionalmente: o medo está mais frequentemente ligado à ativação autonômica intensa, mobilizada para respostas de luta ou fuga, ao passo que a ansiedade se associa à tensão muscular e à vigilância prolongada, voltadas à preparação para ameaças futuras.

Diversas evidências apontam atualmente que a conexão da amígdala basolateral com a amígdala central, juntamente com as projeções eferentes da amígdala central, representam coletivamente um sistema central de medo envolvido tanto na expressão quanto na aquisição do medo condicionado (20).

2.3 Microbioma

Nas últimas décadas, a visão científica sobre os microrganismos que habitam o corpo humano sofreu profundas transformações. O que antes era denominado genericamente como “flora normal” — termo botânico considerado inadequado e reducionista — evoluiu para a noção de “microbioma”, conceito que abrange tanto os microrganismos (microbiota) quanto seus genes, produtos metabólicos e vias funcionais (30-33). Estima-se que o corpo humano seja habitado por uma comunidade composta por cerca de 100 trilhões de células

microbianas — em sua maioria bacterianas — e aproximadamente um quatrilhão de vírus, com concentração predominante no intestino grosso ⁽³⁴⁾. A distinção entre microbiota e microbioma é crucial: enquanto a primeira refere-se aos organismos vivos, a segunda contempla tanto os organismos vivos, quanto seu material genético e funções associadas ⁽³⁰⁻³²⁾. Entre suas múltiplas funções, destacam-se a fermentação de fibras alimentares não digeridas e a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), como acetato, propionato e butirato — metabólitos com papel fundamental na homeostase intestinal e cerebral ^(35, 36).

Esses AGCCs são produzidos a partir da fermentação de polissacarídeos complexos presentes em alimentos como aveia, banana verde, alho-poró, trigo e legumes ⁽³⁵⁾. Uma vez sintetizados por bactérias como *Bacteroides*, *Ruminococcus* e *Eubacterium*, esses ácidos exercem funções diversas: fornecimento energético, modulação do pH intestinal, indução de gliconeogênese hepática e manutenção da integridade da barreira epitelial ⁽³⁵⁾. Além disso, atravessam a barreira hematoencefálica (BHE) por meio de mecanismos mediados por receptores acoplados à proteína G e por modulação epigenética via inibição de histonas desacetilases (HDACs) ⁽³⁶⁾. O butirato, em especial, tem efeito epigenético relevante ao aumentar a acetilação de histonas e favorecer a expressão de genes envolvidos na plasticidade sináptica, neurogênese e síntese de BDNF — fator neurotrófico associado à memória e ao humor ⁽³⁵⁻³⁷⁾. Evidências em modelos animais associam esses efeitos a propriedades ansiolíticas, antidepressivas e de melhora cognitiva ⁽³⁵⁻³⁸⁾.

Há ainda muita controvérsia a respeito da origem do microbioma intestinal humano. Por anos, prevaleceu a hipótese do “útero estéril”, segundo a

qual o líquido amniótico seria livre de microrganismos e o recém-nascido adquiriria integralmente sua microbiota apenas após o nascimento ^(39, 40). Contudo, nos últimos anos, surgiram estudos que contrariam essa visão e apontam que podem existir bactérias no líquido amniótico, sugerindo que ele seja uma das principais fontes de microrganismos que colonizariam o intestino fetal e neonatal ⁽⁴¹⁻⁴⁵⁾.

Um estudo que analisou fezes maternas, placenta, líquido amniótico, colostro, mecônio e fezes neonatais verificou que a placenta e o líquido amniótico apresentam comunidades bacterianas de baixa diversidade, dominadas por *Proteobacteria*, enquanto o colostro mostrou-se mais diverso e rico em *Streptococcus* e *Lactobacillus*. O mecônio apresentou semelhanças com placenta e líquido amniótico, mas um perfil próprio, caracterizado por *Firmicutes*; já as fezes neonatais, após alguns dias, mostraram-se principalmente influenciadas pelo leite materno ⁽⁴²⁾. Assim, ele apoia a hipótese de colonização intrauterina: a de que placenta e líquido amniótico contêm comunidades microbianas próprias, estáveis entre indivíduos e distintas das fezes maternas. Dessa forma, o processo de colonização seguiria etapas sucessivas: início intrauterino (placenta e líquido amniótico), amplificação pós-natal imediata (colostro) e estabelecimento progressivo da microbiota intestinal durante a primeira semana de vida ⁽⁴²⁾.

Muller et al. (2024) apontam que a composição do mecônio neonatal se assemelha mais ao trato gastrointestinal materno do que ao microbioma vaginal, especialmente no final da gestação. Isso sugere que a transferência ocorra provavelmente por via hematogênica, isto é, pela translocação de bactérias ou de seus componentes do intestino materno para o

compartimento fetal. Embora contrarie a hipótese do útero estéril, esse estudo apoia a ideia de que o feto é exposto a assinaturas microbianas intraútero, ainda que não se trate de uma colonização ativa ⁽⁴²⁾.

Por outro lado, Lim et al. (2017), em contraste com estudos anteriores que relataram microbiota no líquido amniótico, demonstraram que, em gestações a termo, sem complicações e sem sinais de infecção, não há evidência de microbioma detectável. Segundo os autores, os achados positivos de outros trabalhos provavelmente se devem a contaminações decorrentes de baixo nível de DNA bacteriano nos reagentes ou manipulação das amostras. Esse estudo reforça a hipótese de que o feto saudável se desenvolve em ambiente intrauterino estéril e que a colonização microbiana ocorre apenas no momento do parto e no período neonatal (39).

Em uma das investigações mais recentes sobre o tema, Kim et al. (2024) confirmaram a possibilidade de transmissão vertical de microrganismos maternos para neonatos, possivelmente via deglutição do líquido amniótico e da microbiota cervical. Os autores mostraram ainda que fatores como tipo de parto, idade gestacional, peso ao nascer, corioamnionite e diabetes materna influenciam significativamente a diversidade e a composição do microbioma oral neonatal ⁽⁴⁵⁾.

Em contraposição, em outro artigo recente, Lyu et al. (2025) reforçaram a hipótese do útero estéril ao avaliar o líquido amniótico no segundo trimestre e no momento do parto, não encontrando nenhuma bactéria em gestações saudáveis ⁽⁴⁰⁾. Esses achados, quando comparados a estudos que

evidenciam sinais de DNA bacteriano no ambiente intrauterino, demonstram que o tema permanece altamente controverso e ainda carece de consenso científico.

Independentemente do momento inicial da colonização do microbioma intestinal neonatal, sua maturação se estende até os três primeiros anos de vida, sendo fortemente modulada por fatores como tipo de parto, aleitamento materno, dieta e uso de antibióticos (26–28). Com o tempo, a microbiota torna-se dominada por bactérias estritamente anaeróbias, com predomínio dos filos *Bacillota* (*Firmicutes*) e *Bacteroidota* (*Bacteroidetes*), cuja composição se torna tão singular quanto uma impressão digital (22, 24, 29–31). A maturação do microbioma intestinal humano começa ao nascimento — que ocorre em meio a um estado estéril — e se estende até os três primeiros anos de vida, sendo influenciada por tipo de parto, aleitamento materno, dieta e uso de antibióticos ⁽³⁶⁻³⁸⁾. Recém-nascidos por cesariana apresentam menor diversidade microbiana e maior abundância de patobiontes em comparação aos nascidos por parto vaginal. Essas diferenças iniciais podem ter efeitos duradouros sobre a saúde metabólica e imunológica. Evidências recentes sugerem que o intestino materno, e não apenas o canal de parto, é a principal fonte inicial da microbiota do neonato, como demonstrado por estudos com transplante fecal materno ⁽³⁶⁾. Com o tempo, a microbiota torna-se dominada por bactérias estritamente anaeróbias, com predomínio dos filos *Bacillota* (*Firmicutes*) e *Bacteroidota* (*Bacteroidetes*), cuja composição torna-se tão singular quanto uma impressão digital ^(32, 34, 46-48).

A estrutura bacteriana intestinal adulta é dominada por cinco filos principais — *Bacillota* (*Firmicutes*), *Bacteroidota* (*Bacteroidetes*),

Actinobacteria, *Pseudomonadota* (Proteobacteria) e *Verrucomicrobia* — que juntos compõem 93–95% da microbiota intestinal ⁽⁴⁹⁾. Esses filos exercem funções essenciais, como a fermentação de fibras, produção de AGCCs e modulação imunológica ^(34, 50-59). A variabilidade na composição microbiana é influenciada por fatores como dieta, medicamentos, estresse, localização geográfica e envelhecimento ⁽⁴⁷⁾. Esforços colaborativos, como o Human Microbiome Project (HMP), o MetaHIT, e os projetos intestinais americano e britânico, permitem mapear a diversidade genética e funcional da microbiota em diferentes populações ⁽⁵⁵⁻⁵⁷⁾. Por fim, com os avanços em filogenia genômica, importantes atualizações taxonômicas têm sido propostas, como a reclassificação de *Firmicutes* para *Bacillota*, adotando-se nomenclaturas híbridas nesta tese para manter clareza e rigor científico ⁽⁶⁰⁾.

A análise taxonômica da microbiota intestinal em níveis mais específicos — como gêneros e espécies — permite uma compreensão aprofundada das funções ecológicas, metabólicas e imunológicas dos microrganismos residentes. Espécies como *Faecalibacterium prausnitzii*, com potente ação anti-inflamatória (~5 % do total bacteriano), e *Clostridium*, produtor de ácidos graxos de cadeia curta, desempenham papéis centrais na homeostase intestinal. *Bacteroides* pode compor até 30 % da microbiota e atua na degradação de glicanos, enquanto *Prevotella*, comum em dietas ricas em fibras, pode atingir até 50 % da microbiota em populações não ocidentalizadas. *Bifidobacterium*, do filo *Actinobacteria*, é amplamente reconhecido por seu potencial probiótico e por contribuir para cadeias tróficas sintróficas com produtores de butirato. Já *Akkermansia muciniphila*, do filo *Verrucomicrobia*, auxilia na degradação de mucina e preservação da barreira intestinal ⁽³⁷⁾. A

predominância ou escassez relativa desses gêneros podem indicar estados de eubiose ou disbiose: enquanto *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* estão associados a benefícios imunológicos e digestivos, a superabundância de *Clostridium* ou *Escherichia* pode sinalizar desequilíbrios associados a condições como síndrome do intestino irritável (SII) e doença inflamatória intestinal (DII) ⁽³⁷⁾.

2.4 O Eixo Intestino-Cérebro

O intestino é o maior órgão digestivo, imune e endócrino do corpo humano, e possui uma inervação tão abundante e complexa que seu sistema nervoso, o Sistema Nervoso Entérico (SNE), é relativamente independente do cérebro. O sistema nervoso entérico tem uma certa similaridade com o cérebro em termos de componentes neuronais e de neurotransmissão. Dado que 90-95% das células do intestino correspondem a microrganismos, podemos chamá-lo de órgão microbiano. A relação simbiótica entre a microbiota e esse órgão hospedeiro envolve uma troca com profundas repercussões sobre todo o organismo. Enquanto o intestino traz espaço e alimentos para os microrganismos, estes influenciam o desenvolvimento e o funcionamento do intestino. O trabalho em conjunto dos dois melhora a performance da digestão, imune, endócrina e a função de neurotransmissão. A essa relação dá-se o nome de eixo intestino-cérebro ⁽⁶⁰⁻⁶²⁾.

A comunicação entre a microbiota intestinal e o Sistema Nervoso Central (SNC) ocorre por meio de um complexo conjunto de vias interligadas, que incluem rotas neurais, imunológicas, endócrinas e metabólicas.

2.4.1 Vias neurais

O principal componente neural envolvido nessa comunicação é o nervo vago, que é o décimo par craniano e representa a rota mais rápida e direta que conecta o intestino ao cérebro. Seu nome deriva do latim *vagus*, que significa "errante", em razão de sua extensa inervação, a qual permite a coleta de informações de diversos órgãos viscerais ⁽⁶¹⁻⁶⁴⁾. Esse nervo, composto por 80% de fibras aferentes e 20% de fibras eferentes, é o responsável por transmitir informações sensoriais do trato gastrointestinal ao encéfalo ⁽⁶⁴⁾. A maioria das fibras vagais aferentes transmitem informações da mucosa intestinal para centros cerebrais, como o núcleo do trato solitário (NTS) ⁽⁶⁴⁾.

As células enteroendócrinas, amplamente distribuídas na mucosa intestinal, participam ativamente dessa sinalização, interagindo diretamente com as fibras aferentes vagais por meio da liberação de serotonina (5-HT), que ativa receptores locais 5-HT₃, ou pela secreção de hormônios intestinais como colecistoquinina (CCK), Peptídeo glucagon *like* 1 (GLP-1) e Peptídeo tirosina tirosina (PYY). Esses hormônios ativam receptores orexígenos e anorexígenos localizados nas terminações vagais, influenciando vias neurais associadas ao controle do apetite e da homeostase energética ⁽⁶⁴⁾.

Evidências experimentais demonstram que a integridade anatômica e funcional desse nervo é essencial para a mediação de efeitos ansiolíticos de probióticos ⁽⁶³⁾. Estudos em modelos animais mostram que a vagotomia impede os efeitos comportamentais benéficos de certas cepas bacterianas, como *Lactobacillus rhamnosus*, sugerindo que o nervo vago atua como via aferente crítica nessa sinalização bidirecional. Por meio dessa

conexão, estímulos intestinais atingem estruturas cerebrais envolvidas na regulação emocional, como o hipotálamo e o tronco encefálico ⁽⁶⁵⁾.

O estresse, por exemplo, exerce efeitos significativos sobre a fisiologia intestinal por meio da modulação autonômica e pela promoção de um estado de inflamação crônica de baixo grau. Em situações de estresse crônico ou agudo, pode ocorrer alterações na microbiota intestinal (disbiose) e assim há uma inibição da atividade parassimpática vagal e uma ativação simultânea do sistema nervoso simpático. Além disso, há redução na expressão de MUC2 (gene responsável pela codificação da mucina 2, uma glicoproteína secretada que representa o principal componente do muco intestinal) e de proteínas como occludina e Zonula Occludens-1 (ZO-1), que são componentes fundamentais das junções de oclusão (*tight junctions*) das células epiteliais intestinais. Essas junções são estruturas que mantêm a integridade da barreira intestinal, controlando o que pode ou não atravessar o espaço entre as células (via paracelular) ^(9, 54). Essas alterações comprometem a integridade da barreira intestinal, resultando em aumento da permeabilidade epitelial (fenômeno conhecido como *leaky gut*), facilitando a translocação de endotoxinas e antígenos microbianos para a circulação sistêmica. Evidências apontam que essa desregulação neuroimune está fortemente associada a diversas condições clínicas, incluindo síndrome do intestino irritável (SII) e doença inflamatória intestinal (DII), além de doenças neurodegenerativas como doença de Alzheimer⁽⁶⁶⁾, doença de Parkinson ⁽⁶⁷⁾, Esclerose Lateral Amiotrófica ⁽⁶⁸⁾, Esclerose Múltipla ⁽⁶⁹⁾, doença de Huntington (70) e de transtornos psiquiátricos como depressão ⁽⁷¹⁾ e ansiedade ⁽⁷²⁾ nas quais se observam redução do tônus vagal e desequilíbrio na homeostase do eixo microbiota-intestino-cérebro ^(73, 74).

2.4.2 Vias imunológicas

A microbiota intestinal exerce profundo impacto sobre o sistema imunológico do hospedeiro, influenciando a liberação de citocinas e a maturação de células imunes. Em situações de disbiose, há aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, como Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 1 beta (IL-1 β) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), as quais podem atravessar a BHE ou afetá-la indiretamente, promovendo estados de neuroinflamação ⁽⁷⁵⁾. Tal condição está associada a alterações na neuroplasticidade e na neurotransmissão, contribuindo para quadros de ansiedade e depressão. Além disso, a microbiota modula o equilíbrio entre células T reguladoras e células T pró-inflamatórias, afetando a homeostase imunológica sistêmica ^(62-65, 73-75).

Evidências experimentais demonstram que a ausência de uma microbiota intestinal diversificada compromete significativamente a maturação e a função das micróglia — as principais células imunocompetentes do sistema nervoso central. Camundongos *germ-free* exibem micróglia com morfologia alterada, perfis gênicos imaturos e resposta inflamatória deficiente a estímulos bacterianos ou virais, como lipopolissacarídeo e Vírus da coreomeningite linfocítica (LCMV). Além disso, a suplementação com AGCC, produtos da fermentação bacteriana, foi capaz de restaurar parcialmente a maturidade e a morfologia microglial, indicando que metabólitos derivados da microbiota intestinal exercem papel fundamental na manutenção da imunovigilância cerebral em condições basais ⁽⁷⁶⁾.

2.4.3 Vias endócrinas

A via endócrina é predominantemente mediada pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), que regula a resposta ao estresse por meio da liberação de glicocorticoides, como o cortisol. A microbiota influencia a sensibilidade desse eixo, modulando a liberação hormonal diante de estímulos estressores. Modelos *germ-free*, desprovidos de microbiota, apresentam hiperatividade do eixo HPA, com níveis exacerbados de corticosterona ⁽⁷⁷⁾. A colonização desses animais com bactérias específicas, como *Bifidobacterium infantis*, normaliza a resposta ao estresse, evidenciando o papel regulador da microbiota na neuroendocrinologia ⁽⁷⁸⁾.

2.4.4 Vias metabólicas

A microbiota intestinal, como já mencionado, produz uma ampla gama de metabólitos bioativos com potencial neuroativo. Entre eles, destacam-se os AGCCs, como acetato, propionato e butirato, derivados da fermentação de fibras alimentares. Tais compostos modulam a função da barreira intestinal, a resposta inflamatória e a atividade epigenética no SNC, podendo atravessar a barreira hematoencefálica e regular diretamente a função da micróglia ⁽³⁸⁾. Além disso, microrganismos intestinais são capazes de sintetizar neurotransmissores, como GABA (por *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*), dopamina, serotonina e noradrenalina, os quais afetam circuitos neurais envolvidos na regulação do humor e da cognição. Outros metabólitos, como o ácido indol-3-acético, derivado do triptofano, participam da neurogênese, plasticidade sináptica e comunicação célula-célula no cérebro ^(9, 62-65, 73-75).

2.5 O papel do sistema nervoso entérico na comunicação intestino-cérebro

O SNE, frequentemente denominado “segundo cérebro”, é uma rede complexa de neurônios e gliócitos situada ao longo da parede do trato gastrointestinal ⁽⁷⁵⁾. Composto por aproximadamente 100 milhões de neurônios distribuídos principalmente nos plexos mioentérico (de Auerbach) e submucoso (de Meissner), o SNE é capaz de operar de forma autônoma, ainda que mantenha comunicação bidirecional com o SNC por meio de fibras aferentes e eferentes, sobretudo via nervo vago e fibras simpáticas ⁽⁷⁹⁾.

O SNE possui um papel central na regulação de funções digestivas essenciais, como motilidade intestinal, secreção de muco e enzimas, fluxo sanguíneo e absorção de nutrientes. Mais recentemente, no entanto, tornou-se evidente que o SNE também atua como um intermediário crítico na sinalização entre a microbiota intestinal e o cérebro ⁽⁷⁹⁾.

O SNE envia sinais ao SNC principalmente por meio de vias aferentes do nervo vago. Estímulos detectados localmente no trato gastrointestinal, como distensão, presença de patógenos ou alterações na microbiota, são transmitidos ao tronco encefálico e, a partir daí, processados em regiões superiores, como o hipotálamo e o sistema límbico. Isso influencia respostas comportamentais e neuroendócrinas. A via inversa, eferente, também existe: o SNC pode modular a atividade do SNE por meio de fibras simpáticas e parassimpáticas, especialmente em contextos de estresse ou inflamação ⁽⁷⁹⁾.

2.5.1 Desenvolvimento e plasticidade

O desenvolvimento adequado do SNE depende, em parte, da presença da microbiota intestinal. Em modelos *germ-free*, observa-se atraso na maturação neuronal entérica, redução da excitabilidade neuronal e alterações morfofuncionais dos plexos entéricos. A colonização com microbiota convencional restaura parcialmente essas funções, indicando uma interdependência dinâmica entre bactérias comensais e o sistema nervoso entérico ⁽⁸⁰⁾.

Além disso, o SNE apresenta notável plasticidade, sendo capaz de adaptar sua função em resposta a mudanças na microbiota, no estado inflamatório local e nos estímulos nutricionais. Essa plasticidade permite ajustes rápidos na homeostase gastrointestinal e na comunicação com o SNC, funcionando como um elo modulável no eixo intestino-cérebro ⁽⁸⁰⁾.

2.6 Uso de prebióticos, probióticos e pósbióticos para ansiedade e depressão

Prebióticos são definidos como substratos não digeríveis que conferem benefícios à saúde do hospedeiro, por meio da modulação específica da composição e atividade da microbiota intestinal. Probióticos, por sua vez, referem-se a microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, promovem efeitos benéficos à saúde por meio de sua atuação na microbiota ⁽⁸¹⁾. Recentemente, surgiu o termo posbiótico, que foi definido como uma preparação composta por microrganismos inativados e/ou seus

componentes estruturais, que, comprovadamente, conferem benefícios à saúde do hospedeiro ⁽⁸²⁾.

O interesse científico nesse campo cresceu substancialmente na última década, com aumento expressivo no número de publicações nos últimos anos, especialmente aquelas que investigam o impacto de psicobióticos — termo que abrange prebióticos, probióticos e posbióticos com efeitos sobre o eixo intestino-cérebro — em transtornos como ansiedade e depressão ⁽⁽⁸²⁾⁾.

Modelos animais têm sido amplamente utilizados para explorar os efeitos dos psicobióticos em condições de estresse precoce. Estudos com roedores submetidos à separação materna demonstraram disfunções no HPA, aumento da vulnerabilidade a distúrbios gastrointestinais e alterações comportamentais associadas à ansiedade. Notavelmente, a administração de probióticos como *Lactobacillus rhamnosus* e *L. helveticus* foi capaz de reverter tais alterações em animais adultos, sugerindo efeitos duradouros na regulação neuroendócrina e comportamental ⁽⁸²⁾.

Além disso, foi evidenciado que *L. rhamnosus* pode modular a expressão dos receptores GABA-A e GABA-B por meio de vias vagais, implicando diretamente no sistema GABAérgico, crucial para o controle da ansiedade. Alterações nesse sistema são frequentemente observadas em doenças psiquiátricas relacionadas ao estresse e, inclusive, constituem o alvo de fármacos ansiolíticos, como os benzodiazepínicos ⁽⁶⁵⁾.

2.7 *Lactobacillus rhamnosus*: propriedades taxonômicas, clínicas e aplicações experimentais

Lactobacillus rhamnosus é uma bactéria gram-positiva, anaeróbia facultativa, pertencente ao filo *Firmicutes*, classe *Bacilli*, ordem *Lactobacillales* e família *Lactobacillaceae*. Entre as espécies do gênero *Lactobacillus*, destaca-se como uma das mais amplamente estudadas, sobretudo pela cepa GG (ATCC 53103), isolada por Gorbach e Goldin em 1983, notável por suas propriedades probióticas bem estabelecidas ⁽⁸¹⁻⁸³⁾.

No contexto clínico e experimental, *L. rhamnosus* tem sido extensivamente investigado por sua capacidade de modular o sistema imunológico ⁽⁸⁴⁾, fortalecer a integridade da barreira epitelial do intestino, competir com microrganismos patogênicos na adesão à mucosa e influenciar a composição e funcionalidade da microbiota residente ⁽⁸⁵⁾. Essas características conferem à espécie um papel relevante na prevenção e no tratamento adjuvante de diversas condições, como diarreia associada ao uso de antibióticos, infecções respiratórias ⁽⁸⁶⁾, dermatite atópica ⁽⁸⁷⁾, síndrome do intestino irritável ⁽⁸⁸⁾ e até mesmo transtornos do humor, em razão de sua interface com o eixo intestino-cérebro ^(89, 90).

Do ponto de vista imunológico, diferentes cepas de *L. rhamnosus*, em especial a cepa GG, demonstram efeitos anti-inflamatórios robustos, modulando tanto a resposta imune inata quanto a adaptativa. Estudos indicam que essa modulação ocorre por meio da redução na produção de citocinas pró-inflamatórias — como TNF- α , IL-6 e IL-1 β — e pelo aumento da secreção de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 ⁽⁸⁴⁻⁹¹⁾.

Modelos experimentais de colite demonstram que a administração oral de *L. rhamnosus* promove uma significativa redução da inflamação intestinal, em associação à inibição da via de sinalização do fator nuclear kappa B (NF-κB), central na mediação da resposta inflamatória. Além disso, essa bactéria contribui para a preservação da integridade da barreira epitelial ao estimular a expressão de proteínas de junção intercelular, como occludina e claudina, reduzindo assim a translocação bacteriana e a ativação imunológica exacerbada ⁽⁹¹⁾.

2.8 A neuroparasitologia e o *Toxoplasma gondii*

A neuroparasitologia constitui um campo emergente e interdisciplinar da biologia que investiga as complexas interações entre organismos parasitários e o sistema nervoso de seus hospedeiros. Essa área dedica-se à compreensão dos mecanismos moleculares, celulares e comportamentais pelos quais determinados parasitas são capazes de modular, interferir ou até mesmo assumir o controle de circuitos neurais, alterando respostas emocionais, cognitivas e motoras de hospedeiros, a fim de manter sua própria sobrevivência e sucesso reprodutivo ⁽⁵⁾. Diversos protozoários, helmintos e artrópodes parasitas apresentam estratégias evolutivamente selecionadas para manipular o comportamento do hospedeiro, de modo a favorecer sua própria replicação, disseminação ou acesso ao hospedeiro definitivo. Nesse contexto, *Toxoplasma gondii* emerge como um dos modelos mais estudados, dada sua capacidade de induzir alterações neurocomportamentais duradouras em hospedeiros intermediários, especialmente roedores, por meio da formação

de cistos intracerebrais em regiões límbicas e da modulação de vias neuroimunes e epigenéticas ⁽⁹²⁾.

2.8.1 Um dos parasitas mais bem-sucedidos do mundo

O *Toxoplasma gondii* é descrito como um dos parasitas intracelulares de maior sucesso evolutivo, devido à sua distribuição ubíqua pelo mundo e à ampla quantidade de hospedeiros que é capaz de infectar. É encontrado profusamente em diversas espécies de mamíferos e aves ^(92, 93).

Em 1908, Nicole e Manceaux descobriram esses parasitas nos ratos africanos *Ctenodactylus gundi*. Desde então, recebeu a taxonomia do gênero *Toxoplasma*, subfamília *Toxoplasmatinae*, família *Sarcocystidae*, subclasse *Coccidia*, classe *Sporozoa* e filo *Apicomplexa* ⁽⁹⁴⁾.

Estudos epidemiológicos estimam que entre 30 e 70% da população mundial está infectada com *Toxoplasma* ⁽⁹⁵⁾.

Em humanos, a infecção por *Toxoplasma*, a toxoplasmose, costuma ser assintomática em indivíduos imunocompetentes ⁽⁹⁵⁾, mas, em imunodeprimidos, pode causar diferentes distúrbios neuropsiquiátricos, bem como alterações de comportamento, manifestações oculares, pneumonias, hepatites e encefalites⁽⁹⁵⁾, além de, em casos mais graves, abscessos cerebrais e morte ⁽⁹⁶⁾. Alguns estudos postulam que há uma significativa associação entre indivíduos soropositivos para *Toxoplasma gondii* e transtornos mentais como esquizofrenia ⁽⁹⁵⁾.

O quadro também se torna crítico em caso de transmissão materno-fetal, onde ele está relacionado a diversas anormalidades, como

microcefalia, hidrocefalia, surdez, aborto e morte ao nascer, além de retardo psicomotor, deficiência intelectual, perda auditiva, desenvolvimento pós-natal mais lento durante o primeiro ano de vida, coriorretinite, epilepsia criptogênica e transtornos do espectro autista em recém-nascidos ⁽⁹⁵⁾.

No contexto de sua morfobiologia infecciosa, *Toxoplasma gondii* apresenta três formas evolutivas distintas; cada uma desempenhando papéis específicos nos diferentes estágios do ciclo parasitário e nas diversas vias de transmissão. Os taquizoítos constituem a forma proliferativa associada à fase aguda da infecção, caracterizando-se por sua notável capacidade de replicação por meio do processo de endodiogenia, um mecanismo de divisão assexuada que permite a rápida disseminação do parasita pelos tecidos do hospedeiro. Em contraposição, os bradizoítos representam a forma de persistência tecidual, estando alojados em cistos intracelulares duradouros, nos quais se multiplicam lentamente, também por mecanismos assexuados, como a divisão binária ou endodiogenia ⁽⁹⁷⁾. Essa morfoforma é crucial para a cronicidade da infecção, garantindo a manutenção prolongada do parasita nos hospedeiros intermediários. Por fim, os esporozoítos correspondem à forma presente nos oocistos esporulados eliminados nas fezes dos felídeos. Dotados de elevada resistência às condições ambientais adversas, os esporozoítos são fundamentais para a transmissão indireta do parasita, sobretudo em hospedeiros não carnívoros, perpetuando sua ampla disseminação ecológica ^(98, 99).

No que se refere ao ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*, este se organiza em duas fases distintas e complementares:

- Fase sexuada – restrita aos hospedeiros definitivos (felídeos)

Essa etapa ocorre exclusivamente no epitélio intestinal de felídeos, principalmente gatos domésticos e selvagens. A infecção é iniciada com a ingestão de cistos teciduais contendo bradizoítos, que, ao atingirem o intestino delgado, invadem os enterócitos e sofrem diferenciação, culminando na reprodução sexuada do parasita. Esse processo resulta na liberação de oocistos não esporulados nas fezes, os quais esporulam no ambiente sob condições adequadas de temperatura e umidade, tornando-se infectantes em um período de 1 a 5 dias. Cada oocisto esporulado contém dois esporocistos, cada um abrigando quatro esporozoítos viáveis.

- Fase assexuada – desenvolvida em hospedeiros intermediários (mamíferos e aves)

A infecção nessa fase ocorre por meio da ingestão de oocistos esporulados presentes no ambiente (água, solo ou alimentos contaminados) ou de cistos teciduais presentes em carnes cruas ou malcozidas. Após a ingestão, esporozoítos (provenientes dos oocistos) ou bradizoítos (originários dos cistos teciduais) invadem as células do hospedeiro e se diferenciam em taquizoítos, formas altamente proliferativas que se disseminam sistemicamente, promovendo a fase aguda da infecção. Posteriormente, os taquizoítos se convertem novamente em bradizoítos, formando cistos teciduais, os quais permanecem viáveis por longos períodos, caracterizando a infecção crônica.

É importante destacar que, mesmo na ausência de hospedeiros definitivos, o ciclo pode ser mantido indefinidamente entre hospedeiros intermediários, devido à capacidade dos cistos teciduais de perpetuar a infecção via predação ou consumo alimentar ⁽⁹⁹⁾.

2.7.1 O *Toxoplasma* no cérebro de mamíferos

A transmissão de *Toxoplasma gondii* é favorecida por alterações neurocomportamentais induzidas nos hospedeiros intermediários, as quais parecem resultar de estratégias adaptativas do parasito que aumentam sua eficiência de transmissão ao hospedeiro definitivo. Evidências provenientes de estudos experimentais demonstram de forma consistente que a infecção latente por *T. gondii* está associada a um amplo espectro de alterações comportamentais, incluindo prejuízo nas habilidades motoras, déficits em tarefas de aprendizagem e memória espacial, redução dos níveis de ansiedade, hiperatividade em ambientes tanto novos quanto familiares, déficits na atenção sensorial e alterações na responsividade a estímulos ambientais. Além disso, observa-se incremento nos tempos de latência de reação e alterações no comportamento exploratório, particularmente no que diz respeito à busca por novidades ⁽¹⁰⁰⁾.

O efeito mais notável e recorrente, entretanto, consiste na diminuição da aversão inata de roedores ao odor de predadores felinos.

Roedores apresentam uma aversão inata ao odor da urina de felinos, ou seja, um comportamento adaptativo crucial à sua sobrevivência, pois sinaliza a proximidade de predadores naturais. Essa resposta de esquiva é desencadeada por compostos voláteis presentes na urina de gatos, como a

felinina — um pequeno peptídeo sulfurado derivado dos aminoácidos glutamina, glicina e cisteína —, que atua como sinal químico relevante na comunicação urinária dos felinos. A percepção desse estímulo ativa circuitos neurais associados à amígdala medial, estrutura cerebral envolvida na detecção de sinais olfativos de ameaça e na mediação de respostas defensivas, como o medo ⁽¹⁰¹⁾. A produção de felinina na urina felina é regulada pela cauxina, uma proteína urinária maior cuja atividade enzimática hidrolisa o precursor 3-metilbutanol-cisteinilglicina, liberando felinina e glicina. Estudos mostram que essa produção é dependente do sexo e da idade do animal, sendo mais elevada em machos adultos não castrados, o que sugere sua participação em estratégias de comunicação química intraespecífica, como a marcação territorial e o comportamento reprodutivo ⁽⁶⁾.

O fato da perda da sensibilidade do odor a felinos, como o de urina de gato, sem alteração da resposta a odores de outros predadores não felinos sugere uma modulação comportamental altamente específica, com provável base neurobiológica, que culmina na elevação da probabilidade de predação por felídeos — hospedeiros definitivos do ciclo do parasita —, aumentando, assim, as chances de transmissão e perpetuação do ciclo biológico de *T. gondii* ^(102, 103).

Uma vez no organismo, *Toxoplasma gondii* pode atravessar a BHE por três mecanismos principais: (1) ruptura das junções intercelulares, mediada por proteínas de roptria, que comprometem a coesão entre células endoteliais, facilitando sua passagem para o SNC ⁽¹⁰⁴⁾; (2) mecanismo do “cavalo de Troia”, no qual o parasita invade células do sistema imune inato,

especialmente células dendríticas, sem induzir lise, promovendo nelas um fenótipo hipermigratório que permite atravessar barreiras biológicas e atingir o SNC, protegendo-se da vigilância imunológica ⁽¹⁰⁴⁾; e (3) dano endotelial induzido, mediante replicação ativa nas células da BHE, levando à destruição dessas células e permitindo a entrada do parasita. Proteínas como toxofilina (do parasita) e Rab11 (do hospedeiro) participam desse processo, regulando a reorganização do citoesqueleto e a formação do vacúolo parasitóforo essencial para o estabelecimento intracelular e replicação do protozoário ^(104, 105).

2.7.2 Mecanismos Moleculares de Formação e Manutenção dos Cistos

A transição de taquizoítos para bradizoítos é induzida por estresses ambientais, como alterações no pH, privação de nutrientes e resposta imune do hospedeiro ⁽⁹⁷⁾. Esse processo envolve mudanças na expressão gênica e na morfologia do parasita, levando à formação de cistos com paredes espessas compostas por proteínas glicosiladas, como a glicoproteína da parede do cisto 1 (GPC1) (glicoproteína do tipo mucina, responsável pela estruturação e estabilidade da parede do cisto tecidual), que conferem resistência a condições adversas e à ação do sistema imune ⁽¹⁰⁶⁾. Essa transição também está associada à ativação de fatores reguladores como *Bradyzoite-Formation Deficient 1* (BFD1), considerado o principal regulador da diferenciação em bradizoítos ^(97, 107).

A manutenção dos cistos cerebrais depende da interação entre o parasita e o sistema imunológico do hospedeiro. A resposta imune mediada por células T CD8⁺ e a produção de interferon-gama (IFN- γ) são cruciais para controlar a replicação do parasita e prevenir a reativação da infecção ⁽¹⁰⁸⁾. Além

disso, o parasita pode modular a resposta imune do hospedeiro para favorecer sua persistência, utilizando proteínas efetoras que interferem na sinalização imunológica ⁽¹⁰⁹⁾.

2.7.3 Localização do parasita no cérebro

Duas semanas após a infecção, o *Toxoplasma gondii* forma cistos esféricos no cérebro dos hospedeiros, com diâmetro entre 50 e 70 μm ⁽¹⁰³⁾. Estudos histológicos revelam uma distribuição heterogênea desses cistos no encéfalo, com variabilidade interindividual quanto à quantidade e à localização ^(6, 100-110). Embora não haja um padrão fixo de tropismo regional, observa-se uma predominância em estruturas associadas à regulação do comportamento e da emoção, como córtex cerebral, hipotálamo, hipocampo, amígdala, bulbo olfatório e núcleo accumbens ^(6, 100-110). Destaca-se, ainda, maior densidade de cistos nas regiões medial e basolateral da amígdala em comparação ao hipocampo dorsal, córtex pré-frontal e bulbo olfatório, sugerindo um tropismo sutil por áreas envolvidas no medo inato a predadores ⁽⁹⁸⁾. Durante a fase aguda da infecção, micróglias e astrócitos são preferencialmente infectados pela forma taquizoíta do parasita, enquanto na fase crônica outras células neuronais passam a ser alvo da infecção ^(111, 112).

2.7.4 Alterações neurofisiológicas provocadas pelo *Toxoplasma* que afetam o comportamento

Conforme dito anteriormente, a presença do cisto no hospedeiro intermediário causa alterações de comportamento que culminarão com sua perda de habilidade inata de proteção ao hospedeiro. Essas e outras alterações comportamentais descritas acima ocorrem por um conjunto de fatores que coadunam para formar esse conjunto de sintomas:

1. Alterações dopaminérgicas: Estudos indicam que *Toxoplasma gondii* é capaz de aumentar os níveis de dopamina cerebral, alteração relacionada a comportamentos que favorecem a predação do hospedeiro ⁽¹⁰²⁻¹¹³⁾. Fármacos como haloperidol, ácido valproico e inibidores da recaptação dopaminérgica demonstram capacidade de atenuar parcialmente esses efeitos ⁽¹⁰³⁾. A dopamina é sintetizada a partir da L-tirosina, sendo a enzima tirosina hidroxilase (TH) responsável pela etapa limitante da via biossintética, com conversão de L-tirosina em L-DOPA, que, por sua vez, é transformada em dopamina pela descarboxilase de aminoácidos aromáticos (AADC). A atividade da TH é altamente regulada e determina a taxa de produção do neurotransmissor ⁽⁹⁹⁾.

Evidências recentes sugerem que infecções crônicas por *T. gondii* podem modular a expressão e atividade funcional da TH no encéfalo do hospedeiro, influenciando os níveis de dopamina e gerando potenciais consequências neuropsiquiátricas. Cistos do parasita contêm enzimas com atividade de tirosina hidroxilase codificadas pelos genes TgAaaH1 e TgAaaH2, sendo este último expresso durante a diferenciação para bradizoítos, que formam cistos no cérebro ^(104, 105). Embora a deleção do gene TgAaaH2 reduza

os níveis de dopamina cerebral, não elimina as alterações comportamentais associadas à infecção, sugerindo a atuação de outros mecanismos paralelos (106).

O núcleo accumbens (NAc) tem sido implicado como estrutura central na modulação da valência emocional durante a infecção, por seu papel na integração entre sistemas emocionais e motivacionais (107, 108). Parte do circuito mesolímbico, o NAc é dividido em duas subestruturas: o *core*, associado ao controle da impulsividade e tomada de decisão, e o *shell*, relacionado à motivação, prazer e reatividade emocional (108-110). Curiosamente, apesar do aumento geral da dopamina cerebral, observou-se redução de dopamina especificamente no *core* do NAc em animais infectados, acompanhada por diminuição da densidade de espinhas dendríticas nessa região. Tais alterações estruturais e neuroquímicas têm sido associadas ao chamado “efeito *carpe diem*”, caracterizado por perda do medo inato, impulsividade aumentada e maior atratividade sexual (107).

2. Diminuição da serotonina: A 5-HT, é um neurotransmissor cerebral com uma variedade de funções biológicas, que consistem em regulação do humor, cognição, aprendizado, memória, apetite e sono. 90% da serotonina é produzida no intestino, e sua síntese está ligada à conversão do aminoácido triptofano em 5- hidroxitriptofano, a partir da enzima triptofano hidroxilase, que é considerada a etapa limitante da velocidade na biossíntese da serotonina. Essa substância é catalisada, então, em 5-hidroxitriptofano pela enzima AADC (114, 115). A redução de serotonina está ligada a quadros depressivos. Na toxoplasmose aguda, a produção de IFN- γ e a ativação da 2, 3 indolamina desidrogenase

cerebral leva a converter o triptofano em quinurenina, e isso causa a diminuição dos precursores da serotonina ⁽⁹⁵⁾.

3. Diminuição do GABA: o GABA, neurotransmissor depressor do sistema nervoso, é produzido a partir do aminoácido glutamato, a partir da enzima Glutamato Descarboxilase, que possui nos mamíferos duas isoformas de *Dense Granule Protein 15* (GAD), as GAD 65 e GAD 67. Um estudo demonstrou que, em cérebros de camundongos infectados com a cepa tipo II ME49 de *T. gondii*, a distribuição de GAD67 tornou-se difusa no neurópilo, em contraste com a localização pontual típica nos terminais pré-sinápticos observada em cérebros não infectados. Essa redistribuição não resultou de uma diminuição na expressão de GAD67, mas, sim, de uma alteração em sua localização intracelular. Isso pode perturbar a sinalização GABAérgica no SNC, potencialmente contribuindo para manifestações neurológicas, como convulsões em pacientes com toxoplasmose cerebral ⁽¹¹⁶⁾.

4. Alterações na resposta imune: A infecção pelo protozoário no SNC desencadeia uma resposta imunológica coordenada, que envolve componentes da imunidade inata e adaptativa. Células residentes do SNC, como astrócitos e micróglia, são os primeiros elementos celulares a detectar a presença do parasita, ativando vias inflamatórias que visam a conter sua disseminação. A ativação dessas células resulta na produção de citocinas pró-inflamatórias essenciais para o controle da infecção, como o IFN- γ , a interleucina-12 (IL-12) e o TNF- α . No entanto, a persistência de sinais

inflamatórios pode culminar em dano neural significativo e disfunção neuronal duradoura. Os microgliócitos ativados pelo parasita exibem um perfil fenotípico inflamatório, com expressão aumentada de genes estimulados por IFN- γ , notadamente as GTPases imunorreguladoras (IRGs), que desempenham papel central na destruição intracelular do parasita por meio da ruptura do vacúolo parasitóforo ⁽¹¹⁷⁾. Paralelamente, os astrócitos respondem à infecção secretando um repertório de citocinas pró-inflamatórias – incluindo IL-6, IL-1 α , IL-1 β e TNF- α –, além de produzirem IFN- γ de forma autócrina/parácrina ⁽¹¹⁸⁾. A IL-12, predominantemente secretada por células apresentadoras de antígeno, como micróglia e células dendríticas infiltrantes, atua como potente indutora de IFN- γ em células T e em células *natural killer* (NK), estabelecendo uma cascata imunológica que culmina na contenção da replicação do parasita ⁽¹¹⁹⁾. O TNF- α , por sua vez, atua sinergicamente com o IFN- γ , promovendo a produção de óxido nítrico (NO), por meio da indução da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), cujos produtos têm ação antiparasitária direta ⁽¹²⁰⁾. Contudo, a ativação sustentada do eixo inflamatório no SNC pode comprometer a integridade tecidual e a funcionalidade neuronal. Citocinas como IFN- γ e TNF- α , quando persistentemente elevadas, promovem recrutamento celular excessivo, disfunção sináptica e morte neuronal ⁽¹²¹⁾. Em modelos murinos, observou-se que a ausência de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10, exacerba a resposta inflamatória e está associada ao agravamento das lesões cerebrais ⁽¹²²⁾. Assim, o equilíbrio entre mediadores pró e anti-inflamatórios é determinante para o desfecho neuropatológico da toxoplasmose.

2.8 A amígdala e sua liberação de Arginina-Vasopressina

As relações entre a liberação de AVP e a amígdala são fortemente alteradas pelo *T. gondii* e serão responsáveis por uma série de alterações de comportamento.

2.8.1 A Arginina-Vasopressina

A AVP é considerada um hormônio neuroendócrino, sendo produzida no hipotálamo, nos neurônios magnocelulares do núcleo supraóptico e nos núcleos paraventriculares. Ele promove a vasoconstrição e antidiurese ⁽¹²³⁾. Após sua síntese, o AVP é acoplado a proteínas transportadoras chamadas neurofisinas, que a conduzem até as terminações axonais localizadas na hipófise posterior (neuro-hipófise) ⁽¹²⁴⁾.

Além desses efeitos, a AVP é um neuro-hormônio potente envolvido em atividades simpáticas, sensibilidade barorreflexa (a capacidade de o sistema nervoso autônomo ajustar a frequência cardíaca em resposta a mudanças na pressão arterial), homeostase da glicose, liberação de corticoides e catecolaminas, resposta ao estresse, ansiedade, memória e comportamento ⁽¹²⁵⁾.

A AVP exerce papel fundamental na homeostase hídrica e na resposta ao estresse, sendo sua liberação regulada por diversos estímulos fisiológicos. Pequenas elevações na osmolalidade plasmática, detectadas por osmorreceptores hipotalâmicos, são o sinal mais sensível para sua secreção, promovendo reabsorção de água nos túbulos coletores renais e restauração do equilíbrio osmótico ⁽¹²⁶⁾. A redução do volume sanguíneo ou da pressão arterial também estimula a liberação de AVP por meio da ativação de barorreceptores

do seio carotídeo e do arco aórtico ⁽¹²⁶⁾. Além disso, situações de estresse físico ou emocional ativam o HPA, levando à liberação conjunta de AVP e do hormônio liberador de corticotropina (CRH) pelos neurônios parvocelulares do núcleo paraventricular. Ambos atuam sinergicamente na hipófise anterior para induzir a secreção de adrenocorticotropina (ACTH), estimulando a liberação de cortisol pelas glândulas suprarrenais. A AVP, por meio dos receptores V1b, potencializa a ação do CRH, especialmente em contextos de estresse crônico ou depressão maior, modulando a atividade do eixo HPA em diferentes níveis, inclusive na liberação de CRH e ACTH ^(127, 128).

2.8.2 Liberação extra hipotálamo-hipofisária de arginina-vasopressina na amígdala

A liberação de AVP não é exclusiva da neuro-hipófise, mas também é expressa e liberada em regiões extra-hipotalâmicas do sistema nervoso central, incluindo a amígdala. Evidências acumuladas nas últimas décadas demonstram que a AVP atua como neuromodulador central, especialmente em circuitos neurais associados à regulação emocional e ao processamento do estresse ^(127, 129).

Neurônios localizados na amígdala medial (MeA) e no leito da estria terminal (BNST) expressam AVP endogenamente, sugerindo um papel funcional autóctone no controle de comportamentos sociais e emocionais, sobretudo em machos de roedores. Além disso, há projeções vasopressinérgicas originadas dos núcleos paraventricular (PVN) e supraóptico (SON) do hipotálamo que se estendem até a amígdala central (CeA), estabelecendo conexões sinápticas com interneurônios GABAérgicos que

expressam receptores V1a. Tal arquitetura sináptica indica que a AVP modula de forma ativa a excitabilidade neuronal da amígdala, influenciando respostas autonômicas e comportamentais diante de estímulos ameaçadores ou socialmente relevantes ⁽¹²⁷⁾.

Adicionalmente, o estresse físico ou psicológico tem sido associado ao aumento da expressão e da densidade de fibras vasopressinérgicas na amígdala, evidenciando que o sistema AVP participa de mecanismos neuroadaptativos ao estresse. Experimentalmente, verificou-se que a liberação local de AVP na amígdala potencializa o recrutamento de neurônios hipotalâmicos após a exposição a estressores agudos, sugerindo um circuito funcional interligado entre a amígdala e o eixo HPA ⁽¹²⁸⁾.

Portanto, a AVP não está restrita à sua ação periférica como hormônio neuro-hipofisário, mas desempenha funções centrais relevantes, especialmente no interior da amígdala, onde contribui para a integração neuroendócrina e comportamental da resposta ao estresse ⁽¹²⁷⁾.

2.8.3 Atuação do Toxoplasma sobre o eixo AVP-Amígdala

Estudos têm demonstrado cada vez mais o papel central da amígdala na alteração comportamental do hospedeiro intermediário que favorece a sobrevivência e propagação do parasita ^(8, 129-131).

A MeA é subdividida funcionalmente em duas regiões: a região pósterio-ventral (MePV), que responde a sinais de predadores e a região pósterio-dorsal (MePD) que está associada a comportamentos sexuais e expressão de

AVP. Em ratos não infectados, a exposição ao odor de felinos, como a urina de gato, leva à ativação seletiva da MePV, região funcionalmente associada ao processamento de sinais olfativos de ameaça e à modulação de respostas defensivas inatas. Em contrapartida, a MePD, tradicionalmente implicada na codificação de estímulos sociossexuais, permanece funcionalmente inativa diante desse tipo de estímulo, uma vez que o odor de predador não possui valência reprodutiva, mas, sim, aversiva. Agora em ratos cronicamente infectados por *Toxoplasma gondii*, a exposição ao odor de felinos continua a promover ativação da MePV da amígdala medial, de maneira semelhante ao observado em animais-controle, indicando que a capacidade de detecção de estímulos ameaçadores permanece funcional. No entanto, observa-se adicionalmente uma ativação robusta da MePD, resposta considerada atípica diante de um estímulo não reprodutivo. A MePD, tradicionalmente envolvida no processamento de sinais sociossexuais, não é recrutada por odores de predadores em condições fisiológicas. A ativação simultânea da MePD frente a estímulos aversivos em animais infectados sugere uma reorganização funcional das redes neurais amigdalares, resultando em uma reatribuição de valência ao estímulo olfativo. Tal “invasão funcional” de circuitos reprodutivos por sinais originalmente defensivos promovem uma valência emocional que transforma um estímulo de aversivo em atrativo, o que pode representar um mecanismo adaptativo pelo qual o parasita converte um estímulo de ameaça em um sinal de aproximação, favorecendo sua transmissão ao hospedeiro definitivo ⁽¹²⁹⁾.

Além disso, a presença do parasita nesse núcleo da amígdala induz a alterações epigenéticas que vão atuar diretamente no comportamento.

O Toxoplasma induz a uma hipometilação do gene promotor de AVP, no MePD, causando nessa região uma superexposição desse neuropeptídeo ⁽¹²⁹⁾.

A epigenética é definida como modificações na expressão gênica que ocorrem sem alterações na sequência de DNA. A compreensão dos seus mecanismos exigiu uma distinção conceitual, proposta por Berger e colaboradores (2009), que separa os processos epigenéticos em três categorias funcionais de sinais que atuam na indução e sustentação de estados epigenéticos estáveis: *epigenator*, *initiator* e *maintainer* ⁽¹³²⁾. Dessa forma, o *epigenator* é o estímulo inicial — ambiental ou celular —, que ativa vias de sinalização responsáveis por iniciar modificações epigenéticas. Seu efeito é transitório, funcionando como um gatilho. O *initiator* traduz esse sinal em alterações específicas na cromatina, direcionando modificações a regiões definidas do genoma. Pode ser um RNA não codificante, uma proteína de ligação ao DNA ou um complexo regulador, como o RNA Xist, que inativa o cromossomo X. O *maintainer* sustenta o estado epigenético após sua indução, mesmo sem o estímulo inicial. Isso inclui mecanismos como metilação de DNA e modificações de histonas. Esses elementos mantêm a memória epigenética ao longo das divisões celulares ⁽¹³²⁾.

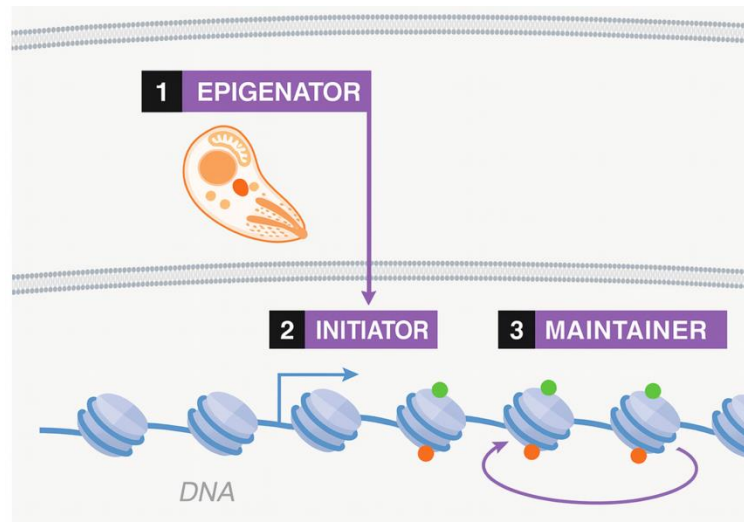


Figura 2. Representação esquemática do modelo epigenético tripartido aplicado à interação parasita-hospedeiro. (1) *Epigenator*: o parasita intracelular atua como um sinal ambiental que desencadeia alterações epigenéticas no hospedeiro, por meio da secreção de proteínas efetoras ou por contato com sua superfície. (2) *Initiator*: os sinais do *epigenator* são interpretados por proteínas do hospedeiro, que direcionam modificações em locais específicos da cromatina. (3) *Maintainer*: mecanismos epigenéticos, como retroalimentação via microRNAs, mantêm o estado cromatínico alterado ao longo do tempo, perpetuando os efeitos do parasita mesmo após sua eliminação. Essa figura foi adaptada de Cheeseman K, Weitzman JB ⁽¹³³⁾.

O *Toxoplasma gondii* parece ter a função de *epigenator*, ao secretar proteínas como a Rhoptry Protein 18 (ROP18), GRA15, GRA16 no citoplasma do hospedeiro. Elas vão modular a função celular ao interferir com a transcrição gênica e as vias de sinalização do hospedeiro como a via NF- κ B, que regula genes ligados à inflamação, sobrevivência celular e imunidade. Enquanto

a GRA15 ativa a via NF- κ B, a ROP18 pode inibi-la, dependendo da cepa do parasita. A GRA 16, por outro lado, entra no núcleo da célula hospedeira e interage com enzimas (*Herpesvirus-associated ubiquitin-specific protease* (HAUSP) e *Protein Phosphatase 2A* (PP2A)) que regulam a Proteína supressora tumoral, p53, inibindo sua função proapoptótica. O parasita ainda ativa quinases da própria célula hospedeira, como *Extracellular signal-Regulated Kinase* (ERK), *c-Jun N-terminal Kinase* (JNK) e *Signal Transducer and Activator of Transcription* (STATs), e ainda secreta suas próprias quinases, como ROP16 e ROP18, que interferem diretamente na resposta imune do hospedeiro. Ele ainda ativa a *Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha* (HIF-1 α) para favorecer a adaptação metabólica e sobrevivência em ambientes inflamatórios. Os fatores de transcrição, como NF- κ B, STATs e HIF-1 α , enzimas que modificam a cromatina e RNAs não codificantes, configuram-se como iniciadores epigenéticos, que então ocasionam a hipometilação do gene promotor de AVP na amígdala medial do hospedeiro intermediário. Por fim, a ativação pelo toxoplasma da *microRNA cluster 17-92* (miR-17-92), via STAT3, inibe a apoptose e mantém o resultado epigenético ⁽¹³³⁾.

A testosterona, hormônio com ação tanto sobre comportamentos sexuais quanto sobre a redução do medo, apresenta papel sinérgico nesse processo. Ratos machos infectados por *Toxoplasma gondii* apresentam um aumento significativo da produção de testosterona por meio de um aumento coordenado tanto na expressão do receptor de hormônio luteinizante (LH) como de enzimas esteroidogênicas. Esse aumento está funcionalmente ligado à perda de medo e ao aumento de atratividade sexual, sugerindo que a manipulação da produção hormonal compõe o conjunto de estratégias do parasita para, a partir

da alteração do comportamento do hospedeiro intermediário, conseguir sobreviver e se propagar ⁽¹³⁴⁾. Além disso, a testosterona pode ser uma mediadora da hipometilação do gene promotor de AVP, uma vez que é conhecida sua regulação epigenética da expressão de AVP em neurônios extra-hipotalâmicos ⁽¹²⁹⁾.

2.9 Interação entre *Toxoplasma gondii* e *Lactobacillus*: implicações imunológicas e terapêuticas

Além das alterações imunológicas descritas acima, a toxoplasmose crônica também se destaca por uma indução de disbiose intestinal, caracterizada por redução da diversidade bacteriana e diminuição de espécies probióticas benéficas, especialmente *Lactobacillus murinus* e *Lactobacillus gasseri*, conforme demonstrado em camundongos imunocompetentes infectados por *T. gondii* ⁽¹³⁵⁾. Essa disbiose exacerba o comprometimento das barreiras epiteliais intestinal e hematoencefálica, favorecendo a translocação microbiana e intensificando processos inflamatórios e neuroinflamatórios ⁽¹²⁾.

Estudos recentes têm demonstrado que a administração oral de probióticos do gênero *Lactobacillus*, vivos ou inativados, apresenta efeitos terapêuticos promissores em camundongos infectados experimentalmente por *T. gondii*. A suplementação oral com *Lactobacillus murinus* e *Lactobacillus gasseri* reduziu significativamente a carga parasitária no jejuno, fígado e cérebro de camundongos infectados por *Toxoplasma gondii*, além de preservar a

arquitetura intestinal, atenuar o dano à barreira hematoencefálica e aumentar significativamente a taxa de sobrevivência dos animais ⁽¹³⁵⁾. Adicionalmente, evidências demonstram que probióticos como *Lactobacillus rhamnosus* e *L. casei* podem exercer efeitos imunomoduladores relevantes ao ativar células imunes, promover a liberação de óxido nítrico (NO) por macrófagos e estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e TNF- α , contribuindo para a eliminação de patógenos intracelulares como *T. gondii* ^(12, 136).

Outro mecanismo de ação relevante envolve a produção de metabólitos derivados do triptofano, como o ácido indol-3-láctico (ILA), especialmente por cepas como *L. gasseri*. O ILA, um metabólito do triptofano produzido por bactérias da microbiota, atua como ligante do receptor de hidrocarbonetos aromáticos (AhR), promovendo efeitos imunomoduladores ao estimular a secreção de IL-22 pelas células epiteliais intestinais e reforçar respostas mediadas por IFN- γ , contribuindo para a regulação da inflamação e a defesa contra patógenos intracelulares ^(137, 138). A ativação do eixo AhR–IL-22 desempenha papel central na regeneração tecidual, na manutenção da homeostase de barreiras e na defesa contra parasitas intracelulares como *T. gondii* ⁽¹³⁷⁾.

Além disso, análises transcriptômicas demonstraram que o tratamento com lactobacilos influencia a expressão gênica cerebral em animais infectados, revertendo parcialmente a ativação de vias ligadas à apoptose e à apresentação antigênica exacerbada ⁽¹³⁵⁾. Essas evidências reforçam a existência de um eixo intestino–cérebro funcionalmente relevante na

toxoplasmose e apontam para a possibilidade de interferência terapêutica via modulação microbiana.

A administração de probióticos das espécies *Lactobacillus delbrueckii* e *Lactobacillus fermentum* demonstrou múltiplos efeitos benéficos frente à infecção experimental por *Toxoplasma gondii*, atuando por diferentes mecanismos complementares. Observou-se aumento significativo da produção de IFN- γ sérico, citocina central na defesa contra parasitas intracelulares; redução da carga parasitária hepática em 33% nos animais tratados apenas com probióticos; distorção morfológica dos taquizoítas detectada por microscopia eletrônica de varredura; além de efeito sinérgico quando combinados à terapia com Sulfametoxazol- Trimetoprima (SMZ-TMP), promovendo preservação hepática, aumento da taxa de sobrevivência (95%) e prolongamento da sobrevivência para até 16 dias. Os autores destacam ainda que os probióticos utilizados são formulações seguras, economicamente acessíveis e com ampla disponibilidade comercial, reforçando seu potencial como adjuvantes terapêuticos promissores na toxoplasmose aguda ⁽¹²⁾.

Resultados semelhantes foram observados com a administração de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 — anteriormente classificado como *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*, mas atualmente reconhecido como pertencente à espécie *L. rhamnosus*, muito próxima da cepa GG (ATCC 53103), amplamente estudada por suas propriedades probióticas. Nesse contexto, o uso de *L. rhamnosus* como adjuvante vacinal combinada a proteínas do citoesqueleto de *T. gondii* resultou em expressiva redução na formação de cistos cerebrais, efeito atribuído à sua elevada capacidade imunogênica. Apenas o uso

isolado de *L. rhamnosus* foi capaz de reduzir significativamente o número de cistos cerebrais, sugerindo um efeito imuno estimulador direto ⁽¹³⁹⁾.

Portanto, as evidências acumuladas sugerem que cepas específicas de *Lactobacillus* constituem uma ferramenta valiosa na modulação da resposta do hospedeiro frente à infecção por *T. gondii*, atuando de maneira sinérgica para conter a proliferação parasitária, atenuar a inflamação sistêmica, restaurar a homeostase da microbiota e proteger o sistema nervoso central.

2.10 Pesquisas com análise de metilação do promotor de AVP

Estudos sobre a regulação epigenética do promotor do gene da AVP têm se destacado por revelar mecanismos moleculares sensíveis a fatores ambientais e potencialmente envolvidos na modulação de comportamentos sociais e emocionais ^(140, 141).

Dentre os estudos que investigam esse eixo epigenético, destaca-se a utilização de enzimas de restrição sensíveis à metilação, como *Bacillus stearothermophilus* U, isozima I (BstUI) e *Haemophilus parainfluenzae*, isozima II (HpaII), as quais desempenham papel fundamental na discriminação de padrões de metilação do DNA em regiões de Citosina – ponte fosfodiéster – Guanina (CpG) do gene promotor de AVP.

A HpaII é uma enzima de restrição do tipo II, que cliva especificamente a sequência de DNA 5'-CCGG-3', desde que ela não esteja metilada. Essa enzima foi originalmente identificada e caracterizada em estudos com *Haemophilus parainfluenzae*. A precisão do reconhecimento desse sítio,

bem como sua sensibilidade à presença de grupos metil, tornam-na uma ferramenta-padrão em estudos de metilação do DNA ⁽¹⁴²⁾.

A enzima BstUI (também conhecida como BsH1236I) é uma endonuclease de restrição tipo II, isolada da bactéria *Bacillus stearothermophilus*. Ela reconhece especificamente a sequência 5'-CGCG-3' no DNA e realiza o corte apenas quando essa região não está metilada, sendo amplamente utilizada em estudos que avaliam padrões de metilação por meio da técnica de enzimas de restrição sensíveis à metilação-PCR quantitativo (MSRE-qPCR) ⁽¹⁴³⁾.

Essa abordagem permite uma análise semiquantitativa da metilação genômica e tem se mostrado particularmente útil em investigações com tecido neural, dada à natureza dinâmica da metilação no sistema nervoso central e sua susceptibilidade a eventos ambientais como infecções, estresse precoce ou intervenções farmacológicas.

2.11 Abordagens experimentais para avaliação comportamental em modelos animais

O uso de modelos animais na neurociência comportamental tem sido essencial para a formulação e testagem de hipóteses sobre cognição, ansiedade, memória, tomada de decisão, processamento emocional e plasticidade neural. Dentre as abordagens experimentais, destacam-se paradigmas comportamentais clássicos, como o LCE, o Campo Aberto (CA), a Esquiva Aversiva (EA) e o Labirinto de Barnes (LB), que permitem avaliar

diferentes domínios funcionais com base em respostas espontâneas ou aprendidas a estímulos ambientais.

2.11.1 Labirinto em Cruz Elevado

O teste do LCE é uma ferramenta comportamental amplamente utilizada na neurociência comportamental para a avaliação de respostas de ansiedade em roedores. Desenvolvido originalmente em 1985 por Pellow et al., baseados nos experimentos de Montgomery in 1958, o LCE explora o conflito inato entre a tendência exploratória e a evitação de espaços abertos, típico de animais de pequeno porte, como ratos e camundongos ⁽¹⁴⁴⁾.

A estrutura do LCE consiste em dois braços abertos e dois fechados, dispostos em cruz e elevados do solo. Nele observa-se a manifestação clássica de um conflito comportamental do tipo aproximação-esquiva, no qual o animal se vê dividido entre o impulso exploratório diante de um ambiente novo e a tendência inata de evitar áreas abertas e elevadas, percebidas como potencialmente aversivas ou ameaçadoras ⁽¹⁴⁵⁾. Animais ansiosos tendem a evitar os braços abertos, interpretados como ambientes potencialmente ameaçadores, enquanto exploram preferencialmente os braços fechados, considerados seguros. Assim, o tempo de permanência e o número de entradas em cada tipo de braço são utilizados como índices comportamentais de ansiedade ⁽¹⁴⁶⁾. O tempo gasto nos braços abertos, o número de entradas e a frequência de comportamentos como *head-dipping*, *rearing* e *grooming* são analisados como marcadores de ansiedade, exploração e estresse ^(144, 147).

O comportamento de *head-dipping*, definido como a LCE em cruz elevado, é tradicionalmente interpretado como um índice de exploração e um marcador inverso de ansiedade. Um maior número de episódios de *head-dipping* está associado a menor aversividade percebida e maior curiosidade investigativa. A variável *rearing* representa o número de comportamentos de exploração vertical realizados pelos animais, geralmente interpretado como um marcador de atividade exploratória geral e motivação investigativa. Esse tipo de comportamento pode ser modulado por estados emocionais, com reduções em contextos de alta ansiedade. Já o parâmetro *grooming*, definido como o comportamento de autocuidado ou limpeza dos animais, é frequentemente interpretado como um marcador indireto de estresse ou ansiedade, funcionando como um comportamento substitutivo diante de situações ambíguas ou desafiadoras. Alterações na frequência desse comportamento podem indicar diferentes estados emocionais dos animais frente ao ambiente do labirinto em cruz elevado ^(144, 145, 147, 148).

Um dos mais usados é o aparato descrito por Handley e Mithani ⁽¹⁴⁹⁾, com algumas modificações. O aparato é constituído de madeira branca, com elevação de 50 cm do solo. Possui dois braços abertos de 50x10 cm cruzados perpendicularmente por dois braços da mesma dimensão, fechados por parede de madeira de 40 cm de altura e com a parte superior aberta. O ponto em que os braços se cruzam é formado por uma arena central de 10x10 cm (Fig. 1).



Figura 3 - Labirinto em Cruz Elevado

Foto do arranjo tirada no biotério da FCMSCSP. Estrutura em forma de cruz composta por dois braços abertos (sem paredes laterais) e dois braços fechados (com paredes laterais opacas), dispostos ortogonalmente e elevados do solo. Na imagem, observa-se o contraste entre os braços abertos (com fundo escuro) e os braços fechados (com paredes laterais claras), característica que facilita a quantificação comportamental em protocolos de etologia experimental.

Os parâmetros analisados são os seguintes:

- Tempo no Braço Aberto (TBA): Refere-se à duração, em segundos, que o animal permanece nos braços abertos do labirinto. Como esses braços são expostos e elevados, seu acesso é normalmente evitado por animais ansiosos. Assim, um maior TBA é interpretado como indicativo de menor ansiedade ou maior comportamento exploratório.

- Tempo no Braço Fechado (TBF): Corresponde ao tempo que o animal permanece nos braços fechados, que oferecem maior proteção. Um aumento no TBF está geralmente associado a maior comportamento de esquiva e ansiedade.
- Tempo no Centro (TC): Indica o tempo que o animal permanece na interseção central entre os quatro braços. Esse local de transição pode refletir ambivalência entre exploração e evitação, sendo um indicador intermediário entre os comportamentos ansiosos e exploratórios.
- Entradas no Braço Aberto (EBA): Representa o número de vezes que o animal entra com as quatro patas nos braços abertos. Assim como o TBA, este parâmetro é inversamente proporcional aos níveis de ansiedade.
- Entradas no Braço Fechado (EBF): Contabiliza as entradas nos braços fechados e é frequentemente utilizado como indicador de atividade locomotora geral, dado que os animais preferem transitar nesses braços por se sentirem mais seguros.
- Tempo de Fundo do Braço Aberto (FBA): Mede o tempo que o animal permanece especificamente na extremidade distal do braço aberto, região mais exposta do labirinto. Um aumento nesse tempo reflete redução da aversão ao risco e menor ansiedade.
- Tempo de Fundo do Braço Fechado (FBF): Refere-se ao tempo gasto no final do braço fechado, que oferece a máxima proteção. É considerado um marcador de comportamento de esquiva.

- Além do *Rearing*, *Head-dipping* e Quantificação das fezes: A contagem de bolos fecais durante o teste é um marcador indireto de ativação autonômica e ansiedade emocional. Um número elevado costuma estar associado a maior estresse ou desconforto emocional.

2.11.2 Campo Aberto

O teste do CA é amplamente empregado na pesquisa neurobiológica do comportamento emocional, especialmente na avaliação da ansiedade e na triagem de fármacos com potencial ansiolítico. Embora tenha sido originalmente concebido para mensurar a atividade locomotora espontânea, esse paradigma comportamental também permite a análise de uma gama de respostas associadas ao estado emocional e à integridade funcional de roedores. Entre os comportamentos avaliados, destacam-se aqueles já avaliados no LCE: o *grooming*, o *rearing*, o *head-dipping* e a locomoção geral no ambiente ⁽¹⁵⁰⁾.

Além desses, o teste permite inferências sobre a atividade do sistema nervoso autônomo por meio da quantificação da defecação — parâmetro clássico introduzido por Hall (1934) ⁽¹⁵¹⁾ como um marcador indireto da reatividade emocional. A eliminação de fezes permanece até hoje como um dos indicadores mais amplamente utilizados de "emocionalidade", tendo sua validade e confiabilidade corroboradas por análises fatoriais em estudos subsequentes ⁽¹⁵²⁾.

Os parâmetros avaliados envolvem variáveis como mensuração do tempo de centro, que é amplamente utilizada como um índice de

comportamento ansioso em roedores, sendo inversamente proporcional ao grau de aversão ao espaço aberto. Há também a aferição do “tempo na periferia” (TP-CA), tempo (em segundos) em que os animais passaram na região periférica do campo aberto por um mecanismo chamado tigmotaxia ⁽¹⁵³⁾. Ele representa uma métrica comportamental inversa ao tempo exploratório no centro da arena, sendo geralmente interpretada como um indicador de comportamento evitativo, relacionado a estados ansiosos em roedores ^(150, 154, 155). Por outro lado, o número de quadrantes explorados no teste do campo aberto é amplamente utilizado como medida objetiva de atividade locomotora geral e comportamento exploratório espontâneo. Essa variável permite quantificar o grau de ambulação do animal ao longo da arena, sendo considerada um marcador confiável da capacidade motora e da disposição para explorar o ambiente. Além disso, seu monitoramento é fundamental para a correta interpretação de outros comportamentos, como a evitação do centro da arena, pois permite distinguir entre inatividade decorrente de estados emocionais (como ansiedade) e possíveis limitações motoras. Dessa forma, o número de quadrantes explorados funciona como um importante parâmetro de controle em testes comportamentais com roedores, especialmente na avaliação dos efeitos de drogas ou mutações genéticas sobre a exploração e a atividade espontânea dos animais ^(153, 154).

2.11.3 Labirinto de Barnes

O LB foi utilizado com o objetivo de avaliar a aprendizagem espacial, memória de referência e flexibilidade cognitiva dos ratos, com mínimo estresse comportamental ⁽¹⁵⁶⁻¹⁵⁸⁾. Dessa forma, ele avalia o funcionamento do

hipocampo dos animais ⁽¹⁵⁹⁾ de acordo com Babovic et al. ⁽¹⁵⁶⁾ e Görtz et al. ⁽¹⁵⁷⁾. O equipamento é constituído de material polipropileno no formato de arena, cor branca, com um metro de diâmetro, contendo 16 orifícios vazados (tocas falsas) com 9,5 cm de diâmetro, dispostos radialmente com um metro de elevação do chão (fig. 4). Todo perímetro da arena é constituído por parede escura, com figuras coloridas dispostas na parte interna para facilitar a orientação espacial dos roedores. Sobre o centro da arena, com aproximadamente 50 cm de altura, manteve-se uma lâmpada fluorescente de 21W. Sob um dos 18 orifícios foi acoplada uma caixa escura, contendo maravalhas, usada como escape (toca verdadeira) dos roedores. Na sala onde estava o equipamento é colocado um ventilador, que permanece ligado enquanto as luzes estão acesas a fim de proporcionar barulho enquanto o rato se deslocava pelo equipamento.

A quantificação do comportamento de *grooming* ao longo do experimento permite avaliar possíveis alterações emocionais e autonômicas associadas à tarefa do Labirinto de Barnes ⁽¹⁴⁸⁾.



Figura 4 – Labirinto de Barnes

Utilizado em testes comportamentais com roedores. O aparato consiste em uma plataforma circular elevada com múltiplos orifícios dispostos ao longo da periferia, sendo apenas um deles conectado a uma caixa de fuga. As imagens ilustram um rato explorando o ambiente e investigando os orifícios em busca da saída, comportamento comumente avaliado em estudos de memória espacial, ansiedade e aprendizagem.

2.11.4 Esquiva aversiva

Trata-se de experimento para avaliar aprendizado e memória. Durante o treinamento de evitação inibitória, os ratos normalmente recebem um único choque aversivo nas patas, após passarem o corpo inteiro de um compartimento iluminado a um compartimento escuro.

O protocolo experimental é estruturado em três fases sequenciais: a primeira consiste no treino inicial dos animais; a segunda, realizada 90 minutos após o treino, tem como objetivo avaliar a aquisição da aprendizagem; e a terceira, aplicada 24 horas após o treinamento, busca mensurar a retenção da memória. A metodologia utilizada é descrita nos trabalhos de Wang et al. ⁽¹⁶⁰⁾ e Wang et al. ⁽¹⁶¹⁾.

2.12 Imunohistoquímica e os marcadores c-FOS e AVP: fundamentos e aplicações em neurociência comportamental

A imunohistoquímica (IHQ) é uma técnica amplamente empregada nas neurociências para a localização, visualização e quantificação de proteínas específicas em tecidos biológicos, por meio da utilização de anticorpos dirigidos a antígenos de interesse. Ela combina a anatomia histológica com métodos

moleculares, possibilitando mapear com alta resolução espacial a expressão de moléculas associadas à atividade neuronal, regulação neuroendócrina e plasticidade sináptica. Entre os marcadores mais utilizados em estudos de comportamento emocional e social destacam-se o c-FOS e a arginina-vasopressina (AVP) ⁽¹⁶²⁾.

2.12.1 c-FOS: marcador molecular de ativação neuronal

O c-FOS é uma proteína nuclear codificada por um gene de resposta imediata, cuja expressão é rapidamente induzida por despolarização neuronal e por diversos estímulos fisiológicos ou ambientais, como estresse agudo, exposição a ambientes novos, aprendizagem ou dor ⁽¹⁶³⁾. Sua expressão atinge o pico entre 60 a 120 minutos após a estimulação, sendo amplamente utilizada como indicador funcional de ativação neuronal recente ⁽¹⁶⁴⁾.

Através da técnica de IHQ, é possível identificar núcleos de neurônios que expressaram c-FOS, permitindo inferir sua ativação em resposta a paradigmas comportamentais específicos. Esse método tem sido amplamente padronizado em modelos como o LCE, nos quais se observa aumento da imunorreatividade para c-FOS em regiões límbicas e diencefálicas, incluindo a amígdala medial, o córtex pré-frontal medial, o hipotálamo e o periaqueduto cinzento após exposição a estímulos ansiogênicos^(165, 166). Nesse contexto, foi demonstrado que esse tipo de estressor promove aumento significativo da expressão de c-FOS em estruturas-chave, como a amígdala central (CeA) e o núcleo do leito da estria terminal (BNST), reforçando o papel desses núcleos na mediação de respostas emocionais desencadeadas por estímulos aversivos ⁽¹⁶⁷⁾. A imunorreatividade para c-FOS nessas regiões fornece uma medida funcional

da ativação neuronal em redes associadas ao processamento do medo, da ansiedade e do estresse emocional ⁽¹⁶⁸⁾.

Silveira et al. (1993) demonstraram que a ativação de c-FOS em regiões como o septo lateral e o núcleo do leito da estria terminal (BNST) é sensível ao tipo de estímulo enfrentado e à estratégia de enfrentamento adotada pelo animal ⁽¹⁶⁵⁾. A IHQ para c-FOS, portanto, constitui uma ferramenta neurofuncional precisa para o mapeamento de circuitos emocionais.

2.12.2 AVP: neuropeptídeo regulador da emoção e sociabilidade

A IHQ para AVP possibilita a visualização da distribuição somatodendrítica e axonal dos neurônios que expressam esse peptídeo, permitindo também comparar sua densidade entre diferentes grupos experimentais ⁽¹⁶⁹⁾. Bielsky et al. (2004), utilizando IHQ e hibridização *in situ*, demonstraram que a expressão de AVP no PVN e SON permanece preservada em camundongos *knockout* para o receptor V1a, apesar de apresentarem alterações comportamentais significativas, indicando que os efeitos emocionais observados estão mais associados à sinalização do peptídeo do que à sua síntese ⁽¹⁷⁰⁾.

Adicionalmente, Bunck et al. (2009) identificaram, em camundongos geneticamente selecionados para baixa ansiedade (LAB), uma redução da expressão de AVP no PVN, confirmada por imunofluorescência. Essa diminuição foi atribuída a mutações na região promotora do gene AVP, correlacionando diretamente a quantidade de AVP com o fenótipo emocional observado ⁽¹⁷¹⁾.

O mapeamento da AVP por IHQ tem se mostrado essencial para investigar como variações genéticas, manipulações ambientais (como o isolamento social) ou farmacológicas influenciam o eixo hipotálamo–amígdala–BNST, regiões centrais na mediação do medo inato e de comportamentos de evitação ⁽¹⁷²⁻¹⁷⁴⁾.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito modulador do *Lactobacillus rhamnosus* sobre os sinais comportamentais de ansiedade em ratos infectados experimentalmente por *Toxoplasma gondii*, em comparação ao placebo.

Comparar sinais de ansiedade em ratos infectados experimentalmente por *Toxoplasma* recebendo *Lactobacillus rhamnosus* ou placebo.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar os efeitos comportamentais e neurobiológicos da infecção crônica por *Toxoplasma gondii* em ratos Wistar.
- Investigar as propriedades ansiolíticas associadas à infecção por *Toxoplasma gondii* e verificar a capacidade do *Lactobacillus rhamnosus* de modulá-las.

- Avaliar o impacto da infecção por *Toxoplasma gondii* sobre processos de aprendizagem e memória espacial, e examinar a influência do *Lactobacillus rhamnosus* na atenuação desses prejuízos.
- Determinar se a infecção por *Toxoplasma gondii* promove alterações epigenéticas, com ênfase na hipometilação do gene AVP na região pósterio-dorsal da amígdala medial, e se essas alterações são moduladas pelo *Lactobacillus rhamnosus*.

4. Materiais e Métodos

Foram utilizados parasitas *Toxoplasma gondii* da cepa ME49, adquiridos por doação pelo Instituto de Medicina Tropical da Universidade São Paulo e o probiótico *Lactobacillus rhamnosus*, cepa IAL 1883 (ATCC 7469) recebidos como uma contribuição da Probac do Brasil Produtos Bacteriológicos, bem como 50 espécimes machos de *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar, com idade entre seis e oito semanas.

Os animais eram visitados semanalmente pela equipe de pesquisa, ocasião em que era realizada a higienização das caixas com maravalha previamente autoclavada, bem como a reposição de ração e água também autoclavadas. As caixas eram substituídas integralmente a cada semana por outras devidamente esterilizadas. Duas vezes por semana eram

realizadas a coleta de fezes e a pesagem individual dos animais, de modo a monitorar sua saúde e bem-estar.

Os ratos foram mantidos em estante ventilada, sob iluminação controlada que respeitava o ritmo circadiano, permanecendo clara durante o período da manhã e escurecendo ao final da tarde. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos exclusivamente no período da manhã, a fim de evitar variações relacionadas ao ciclo claro/escuro.

Adotaram-se cuidados adicionais para reduzir possíveis fatores de interferência. Entre eles, destacou-se a recomendação de não utilizar perfumes nos dias de contato com os animais e a manutenção do mesmo número de pesquisadores do sexo masculino e feminino em todas as etapas da experimentação. Embora o biotério permanecesse em ambiente predominantemente silencioso, durante o período de ambientação foram realizadas visitas regulares aos animais, com o objetivo de favorecer a habituação à presença humana e às vozes dos manipuladores. Os indivíduos foram marcados com ácido pícrico.

Os animais foram distribuídos em cinco grupos experimentais distintos, conforme representado na Figura 5:

- Grupo 1 (G1) – Dez ratos receberam 14 dias de placebo e então foram inoculados com *T. gondii*.

- Grupo 2 (G2) – A mesma quantidade de ratos recebeu a inoculação do *T. gondii* como no grupo anterior, mas, dessa vez, sucedeu-se com a administração de 14 dias de probiótico.
- Grupo 3 (G3) – A mesma quantidade de animais recebeu inicialmente por 14 dias o probiótico e só então foi feita a inoculação do *T. gondii*.
- Grupo 4 (G4) - Dez ratos receberam 14 dias de probiótico sem inoculação com *T. gondii*.
- Grupo-Control (GC): composto por 10 ratos sem infecção e tratados 14 dias com placebo.

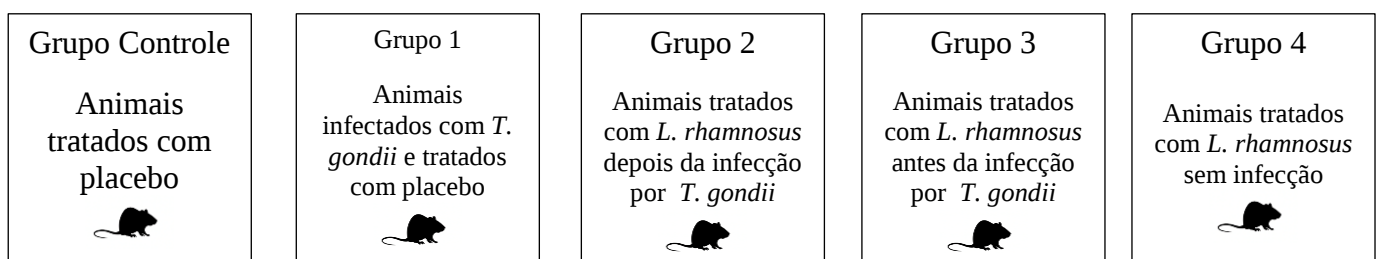


Figura 5 – Grupos experimentais utilizados no estudo

Distribuição dos grupos experimentais utilizados ao longo dos testes comportamentais e moleculares. Esses grupos permitiram avaliar os efeitos da infecção isolada, do probiótico isolado e das diferentes estratégias de intervenção probiótica sobre os desfechos comportamentais e neurobiológicos analisados.

A infecção e o tratamento com probiótico dos animais foram efetuadas via oral, por intermédio de sonda esofágica. Nos animais do grupo-controle, foram administrados, pela mesma via, quantidade equivalente de solução salina.

Nos dias 60 e 90 dias pós-infecção, os animais foram submetidos a:

1. Labirinto em Cruz Elevado

Uma hora antes do procedimento, os animais foram transferidos para a antessala do laboratório para ambientação. Após esse período, eles foram individualmente levados à sala onde estava posicionado o aparelho e colocados na intersecção dos braços do labirinto, com a cabeça voltada para o braço aberto, em sentido oposto ao avaliador. Cada animal permaneceu no aparelho por cinco minutos. Durante esse tempo, foram observadas as variáveis: tempo de permanência dos animais nos braços abertos, fechados e no centro, frequência de entrada nos braços abertos e fechados, fundo dos braços abertos e dos braços fechados e frequência de mergulhar a cabeça no braço aberto (*head-dipping*). Nos intervalos entre cada animal, o aparato foi higienizado com Etanol 5%.

2. Campo Aberto

Após período de ambientação, os animais foram individualmente introduzidos na parte central da caixa de madeira do aparato por 5 minutos para observação e registro das variáveis de comportamento: movimentos horizontais

e verticais, tempo de *grooming*, quantidade de *pellets* fecais eliminados e tempo de imobilidade. As variáveis foram manualmente medidas.

3. Labirinto de Barnes

No dia do experimento, uma hora após ambientação, os animais foram conduzidos à sala onde se localizava a arena. As luzes estavam acesas e o ventilador ligado para proporcionar um ambiente aversivo aos roedores. Cada rato foi colocado no centro do labirinto, dentro de uma câmara acrílica, por um minuto. Após esse período, o animal foi liberado para nele deambular. Foi registrado o tempo para que encontrassem a toca verdadeira (caixa escura). O período máximo para cada roedor explorar o labirinto e encontrar a caixa de escape foi de cinco minutos. Quando o animal encontrou a toca e entrou nela, o tempo foi interrompido e registrado. As luzes e o ventilador foram desligados, a fim de proporcionar a sensação de segurança pela ausência de iluminação e barulho. O animal permaneceu na caixa por um minuto. Quando o animal excedeu o tempo máximo sem encontrar a toca verdadeira, foi encaminhado pelo pesquisador até a caixa de escape; as luzes e o ventilador foram desligados, e o roedor permaneceu lá por um minuto. Após esse tempo, o animal foi recolocado ao centro do labirinto, dentro da caixa acrílica, por um minuto. Então, o animal foi novamente liberado no labirinto para explorar o ambiente em busca da caixa de escape. Quando o animal encontrou a toca e entrou nela antes do tempo, as luzes e o ventilador foram desligados, e o animal permaneceu nela por um minuto. Se o roedor não obteve êxito em encontrar a toca e adentrá-la, foi reconduzido à toca, e as luzes e o ventilador foram desligados pelo mesmo período. Esse procedimento foi efetuado durante cinco dias consecutivos no

período da manhã e da tarde. Após um intervalo de dois dias, os animais foram desafiados no período da manhã para avaliação da memória e aprendizado.

4. Esquiva aversiva

Para a realização desse procedimento, foi utilizado o equipamento da Ugo Basile 7551, *Passive Avoidance*, que consiste em uma caixa dividida em dois compartimentos, um iluminado e outro escuro, separados por uma porta com sistema guilhotina. A metodologia utilizada foi semelhante à descrita nos trabalhos de Wang et al. ⁽¹⁶⁰⁾ e Wang et al. ⁽¹⁶¹⁾, com algumas modificações. O experimento foi dividido em três partes: treinamento, verificação da capacidade de aprendizagem dos animais (90 min. após o treino) e avaliação da memória (24 horas após treinamento). No período de treinamento, os animais foram colocados no aparelho no compartimento iluminado, com a cabeça voltada para a porta de acesso ao compartimento escuro, sendo contados dois segundos para a abertura da porta que separa as duas regiões (clara e escura). O tempo máximo que cada animal teve para entrar no compartimento escuro (latência) foi de cinco minutos. Ao entrar na parte escura do aparato, o animal recebeu um choque de 5 mA por dois segundos de duração. Imediatamente após o choque, o roedor foi retirado do aparato e levado para a gaiola de descanso. Apenas a latência foi observada, e os animais que não entraram no compartimento escuro no decorrer dos cinco minutos foram devolvidos à caixa de descanso. Para avaliar a capacidade de aprendizagem de cada animal, 90 min após o treino, os animais foram submetidos ao procedimento descrito anteriormente.

Para todos os procedimentos de análise comportamental, os animais foram retirados do biotério e colocados na sala de descanso durante uma hora para evitar interferência de ambientação. Nos intervalos entre cada animal, o aparato foi higienizado com Etanol 5%.

5. Eutanásia

Quinze dias após o início da segunda bateria de testes comportamentais, os animais foram submetidos à eutanásia seguindo protocolo previamente estabelecido. Inicialmente, foi administrada anestesia por via intraperitoneal, utilizando Tiopental sódico na dosagem de 40 mg/kg associado à Lidocaína a 2% sem vasoconstrictor. Em seguida, procedeu-se à exsanguinação. Após a confirmação do óbito, realizou-se a remoção do encéfalo, com o objetivo de viabilizar as análises posteriores de metilação do promotor do gene da AVP e a aplicação da técnica de IHQ na amígdala cerebral.

O processo de experimentação seguiu o cronograma demonstrado na Figura

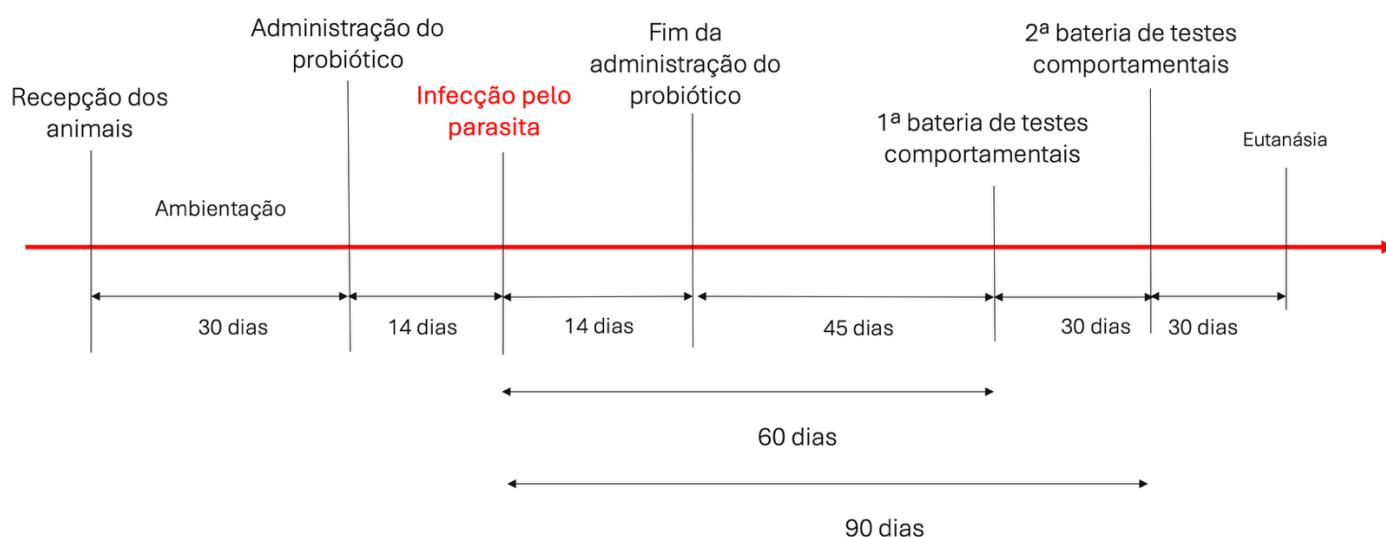


Figura 6 - Linha do tempo experimental representando a sequência cronológica dos procedimentos realizados durante o protocolo. Inicialmente, houve o recebimento e ambientação de 50 animais (Início). Após 30 dias, foi iniciada a administração do probiótico por 14 dias. Procedeu-se com a infecção pelo *T.gondii*. Transcorreu-se outros 14 dias de administração do probiótico ranqueados de acordo com o grupo. Realizou-se então a primeira bateria de testes comportamentais 60 dias após a infecção. Decorridos 90 dias da infecção, iniciou-se a segunda bateria de testes comportamentais. Trinta dias após esta última, procedeu-se à eutanásia final para coleta de material biológico.

6. Análise de metilação do promotor de AVP

Obteve-se o corte contendo a região da amígdala (coordenadas: Bregma –2,00 a –4,00; Interaural 6,24–5,76), conforme atlas estereotático The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates ⁽¹⁰⁷⁾, utilizando a matriz de 2 mm para corte

de cérebro de ratos. A seguir, procedeu-se à análise da metilação do promotor do gene da arginina-vasopressina (AVP).

A extração de DNA genômico a partir do tecido da amígdala foi realizada com o kit comercial DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN), de acordo com o protocolo adaptado ao Procedimento Operacional Padrão (POP) do laboratório (ANEXO 2).

Obteve-se o corte contendo a região da amígdala (coordenadas: Bregma -2,00 a -4,00; Interaural 6,24-5,76), conforme atlas estereotático The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates ⁽¹⁷⁵⁾, utilizando a matriz de 2 mm para corte de cérebro de ratos. A seguir, procedeu-se à análise da metilação do promotor do gene da AVP.

A quantificação da metilação no promotor do gene da AVP foi realizada por meio da técnica de digestão enzimática com endonucleases sensíveis à metilação (MSRE), seguida de amplificação por PCR quantitativo em tempo real (qPCR). Os primers utilizados, bem como os sítios-alvo, foram definidos com base em adaptações do protocolo descrito por Auger et al. ⁽¹⁷⁶⁾.

O DNA previamente extraído da amígdala foi submetido à digestão com duas enzimas específicas para reconhecimento de sequências não metiladas: a enzima HpaII (PROMEGA, REF-R6311), que atua sobre o sítio CCGG e a enzima Bsh1236I (BstUI; Thermo Scientific, ER0921), que atua sobre o sítio CGCG também apenas na ausência de metilação.

A eficiência de clivagem dessas enzimas foi previamente verificada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1%, utilizando como controle amostras de DNA amplificado do gene AVP sem metilação.

Após a digestão, foi realizada a reação de PCR em tempo real com o uso do sistema fluorescente SYBR Green (BIO-RAD, cat. #172-5271), conduzida no equipamento *Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System*. O corante SYBR Green é um marcador fluorescente que se intercala (liga-se internamente) ao DNA de fita dupla. Conforme a reação de PCR progride e novas cópias de DNA são sintetizadas, ocorre um aumento proporcional na fluorescência emitida. O equipamento de PCR em tempo real detecta essa luz a cada ciclo, permitindo quantificar a quantidade de DNA amplificado naquele momento. Os primers específicos utilizados para os sítios de interesse foram os seguintes:

- Para o sítio 2:
 - *Forward*: GTA GAC CGC CAC ACC TGA TT
 - *Reverse*: CCA GAC ATT GCT GTG TGA CC
- Para o sítio 4:
 - *Forward*: GGC CTT TGG CTC TAT GTT C
 - *Reverse*: TTG AGG GTC ACC TGG AAA TC

7. Técnica de Imunohistoquímica – AVP e FOS.

O protocolo completo de preparo das lâminas para IHQ, incluindo etapas de desparafinação, recuperação antigênica, bloqueio da

peroxidase endógena, incubação com anticorpos primários e secundários, desenvolvimento cromogênico e montagem final, encontra-se descrito detalhadamente no Anexo 4. Todas as etapas foram conduzidas sob condições padronizadas de temperatura, tempo e reagentes, conforme protocolos validados na literatura especializada.

8. Comitê de Ética no uso de Animais (CEUA)

O projeto experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) em 7 de fevereiro de 2022, sob o número de protocolo 001/22 (ANEXO 3).

9. Fomento

A pesquisa obteve financiamento da FAP (Fundo de Amparo à pesquisa) da Fundação Arnaldo Vieira de Carvalho/ Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo.

10. Metodologia Estatística

Inicialmente, foi realizada uma análise descritiva de todas as variáveis de interesse. Para as variáveis qualitativas, foram apresentadas as frequências absolutas e relativas; para as variáveis quantitativas, foram calculadas medidas de tendência central (média e mediana) e de dispersão (desvio-padrão, intervalo interquartil e amplitude). As trajetórias dos animais ao longo do tempo foram representadas por gráficos de perfis para as variáveis do LB. Para as variáveis mensuradas em um único momento, foram utilizados gráficos de violino, estratificados pelo grupo (controle, G1, G2, G3 e G4).

A comparação das variáveis quantitativas contínuas em relação ao grupo (controle, G1, G2, G3 e G4) foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA) de um fator, desde que as suposições do modelo fossem atendidas. A suposição de normalidade foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk, e a homogeneidade das variâncias foi verificada pelo teste de Levene. Quando as suposições da ANOVA foram violadas ou quando a variável de interesse consistia em dados de contagem, utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (K-W). Comparações par-a-par (*pairwise comparisons*) foram conduzidas quando a hipótese nula associada ao teste de K-W foi rejeitada. Nesses casos, aplicou-se o teste de Dunn com ajuste dos valores de p pelo método de Holm.

Para as variáveis de contagem mensuradas em um único momento, também foi ajustado um modelo de regressão linear generalizada (GLM) com distribuição binomial negativa, visando a acomodar a sobredispersão observada nos dados. O modelo estima as razões de taxa de incidência (*Incidence Rate Ratios, IRR*), permitindo comparar a taxa média entre os grupos experimentais e o grupo-controle. Comparações par-a-par entre os grupos foram realizadas com base nesse modelo, e os valores de p foram ajustados pelo método de Tukey para múltiplas comparações.

Para acomodar o delineamento de medidas repetidas e a natureza de dados de contagem das variáveis de interesse, foi ajustado um modelo linear misto generalizado utilizando a distribuição binomial negativa, com função de ligação logarítmica. Essa distribuição permite acomodar tanto a sobredispersão quanto a subdispersão em dados de contagem. O modelo incluiu efeitos fixos para grupo e tempo, além de um intercepto aleatório por animal, com o objetivo de considerar a correlação intra-animal entre as medidas ao longo

do tempo. A interação entre grupo e tempo foi avaliada por meio de um teste de razão de verossimilhança (*likelihood ratio test*, *LRT*), comparando modelos aninhados com e sem o termo de interação. Comparações par a par (*post hoc*) entre os níveis de grupo e tempo foram conduzidas com base nas médias marginais estimadas a partir do modelo, com ajuste para múltiplas comparações utilizando o método de Tukey. Os coeficientes do modelo foram apresentados na escala logarítmica e, quando apropriado, exponenciados para a obtenção das razões de taxas de incidência (IRRs). Para as variáveis quantitativas contínuas mensuradas ao longo do tempo, foi ajustado um modelo linear misto, incluindo efeitos fixos para grupo e tempo, bem como intercepto aleatório por animal. As mesmas estratégias de teste para interação e comparações múltiplas foram adotadas nesse contexto.

Todos os testes de hipótese foram bicaudais, adotando-se um nível de significância de 5%. As análises estatísticas foram realizadas no software R versão 4.5.

Os dados obtidos nas análises de metilação do gene AVP foram submetidos à análise estatística utilizando o software GraphPad Prism (versão 9.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Inicialmente, foram realizados testes de normalidade (Shapiro-Wilk) para avaliar a distribuição dos dados. Considerando que os dados não apresentaram distribuição normal, optou-se pela aplicação do teste não paramétrico de Mann-Whitney para comparações entre dois grupos independentes (tratado vs. não tratado com enzimas de restrição HpaII ou BstUI). Esse teste avalia a hipótese de igualdade entre as distribuições dos grupos, baseando-se na ordenação dos dados (*ranks*), sendo apropriado para amostras pequenas e dados assimétricos.

Os resultados foram expressos em termos de valores de p , medianas, diferença entre medianas observada e intervalos de confiança estimados pelo método de Hodges-Lehmann. A significância estatística foi considerada quando $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas com testes bilaterais (*two-tailed*), sem pressuposição da direção do efeito.

11. Resultados

I. Labirinto em Cruz Elevado

Realizou-se o primeiro teste comportamental do LCE 60 dias após a infecção. Obteve-se os seguintes resultados:

1. Tempo de Braço Aberto

Observou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos para a variável TBA (Kruskal-Wallis, $p = 0,004$ (Tabela 2 - ANEXO 1). O Grupo 1 apresentou a maior média (42,9 s) e mediana (21,5 s em comparação ao grupo-controle (GC), que exibiu média de 11 s e mediana de 3 s.

O Grupo 2 apresentou tempo reduzido (média = 5,5 s; mediana = 3 s), semelhante ao GC e significativamente inferior ao G1 ($p = 0,2232$). O Grupo 4 exibiu comportamento semelhante ao GC, sem diferenças estatísticas relevantes ($p > 0,25$) (Quadro 1 – ANEXO 1).

O Grupo 3 apresentou tempo nulo de permanência nos braços abertos (média e mediana = 0 s) (Tabela 2 – Anexo 1). Essa resposta diferenciou-se significativamente do Grupo 1 ($p = 0,0075$) e mostrou, quando

comparado ao grupo-controle, um valor de p próximo ao limiar de referência ($p = 0,0535$) (Quadro 1 – ANEXO 1).

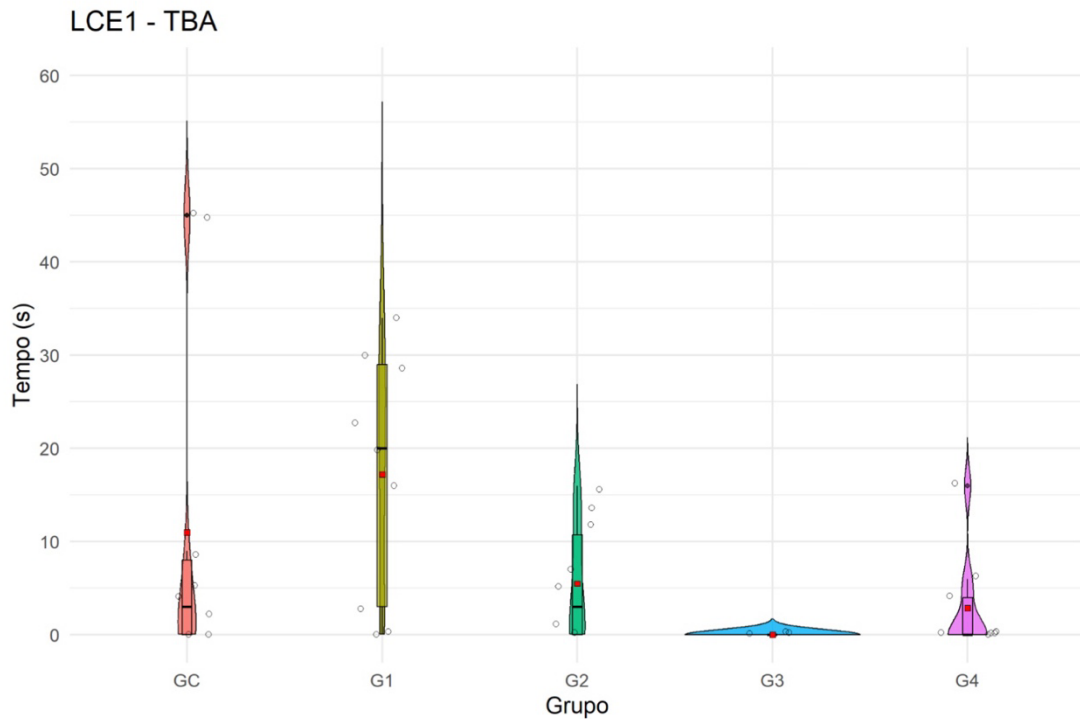


Figura 7 – Gráfico do tipo *violin plot* representando a distribuição do tempo de permanência nos braços abertos (em segundos) no Labirinto em Cruz Elevado (LCE) entre os diferentes grupos experimentais. A largura do gráfico representa a densidade dos dados; a linha horizontal no interior de cada forma indica a mediana e os pontos representam valores individuais.

2. Tempo de Braço Fechado

A análise descritiva dos dados (Tabela 5 - ANEXO) revela que as medianas de TBF variam entre os grupos, com valores mais baixos observados no G1 (246,5 s). Já o G4 apresentou a maior mediana de TBF (291,0 s).

O teste de Kruskal-Wallis não apontou diferença estatisticamente significativa entre os grupos para a variável TBF ($p = 0,233$), conforme mostrado na (Tabela 5 – ANEXO 1).

Visualmente, o gráfico de violino (Figura 8) a seguir ilustra a concentração dos dados em torno das medianas e evidencia a dispersão em alguns grupos, como G1 e G3, que possuem valores extremos, inclusive de tempo próximo ao zero.

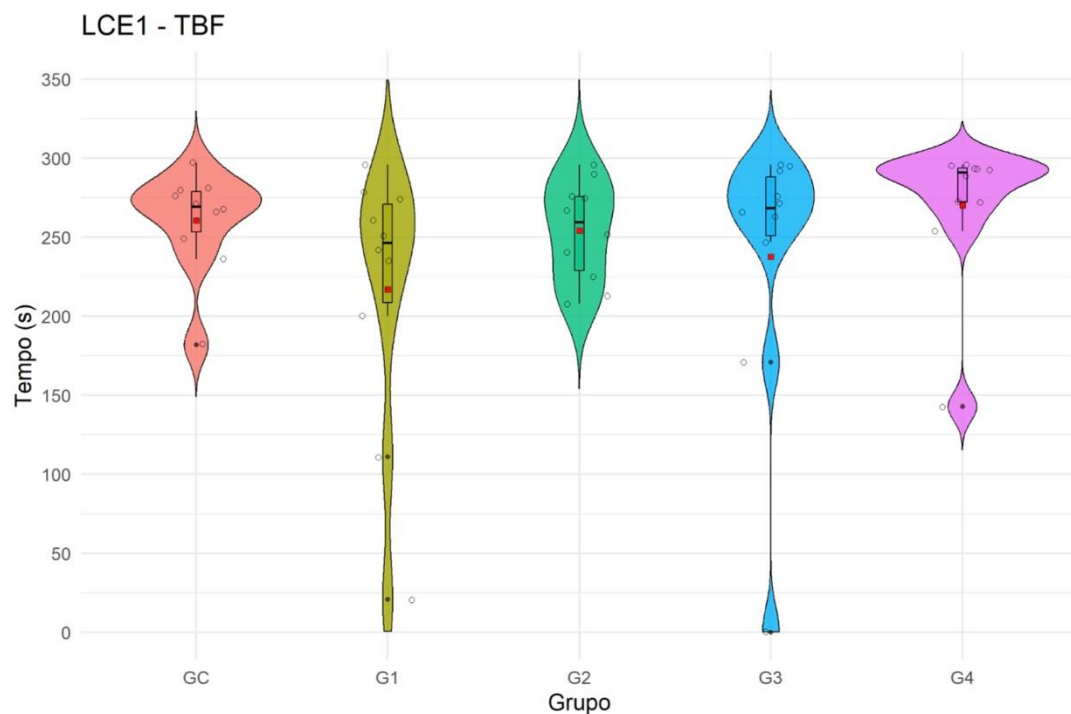


Figura 8 – Gráfico do tipo *Violin plot* representando a distribuição do TBF (em segundos) no LCE por grupo experimental. A largura representa a densidade dos dados; a linha horizontal indica a mediana, e os pontos individuais representam as observações.

3. Tempo de Centro

Observa-se que o grupo G3 apresentou a maior média de tempo no centro (62,30 s) e a maior dispersão (DP = 91,09). O grupo G4 apresentou a menor média (15,10 s) e mediana (9,0 s). O teste de Kruskal-Wallis não apontou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,248$) (Tabela 7 – ANEXO).

O gráfico de violino a seguir (Figura 9) evidencia a distribuição dos dados de TC em cada grupo. No grupo G3, há clara assimetria e presença de valores extremos (*outliers*). Já os grupos GC, G1 e G2 apresentaram distribuições mais simétricas e concentradas, enquanto o grupo G4 demonstrou comportamento mais restrito, com baixos valores de TC.

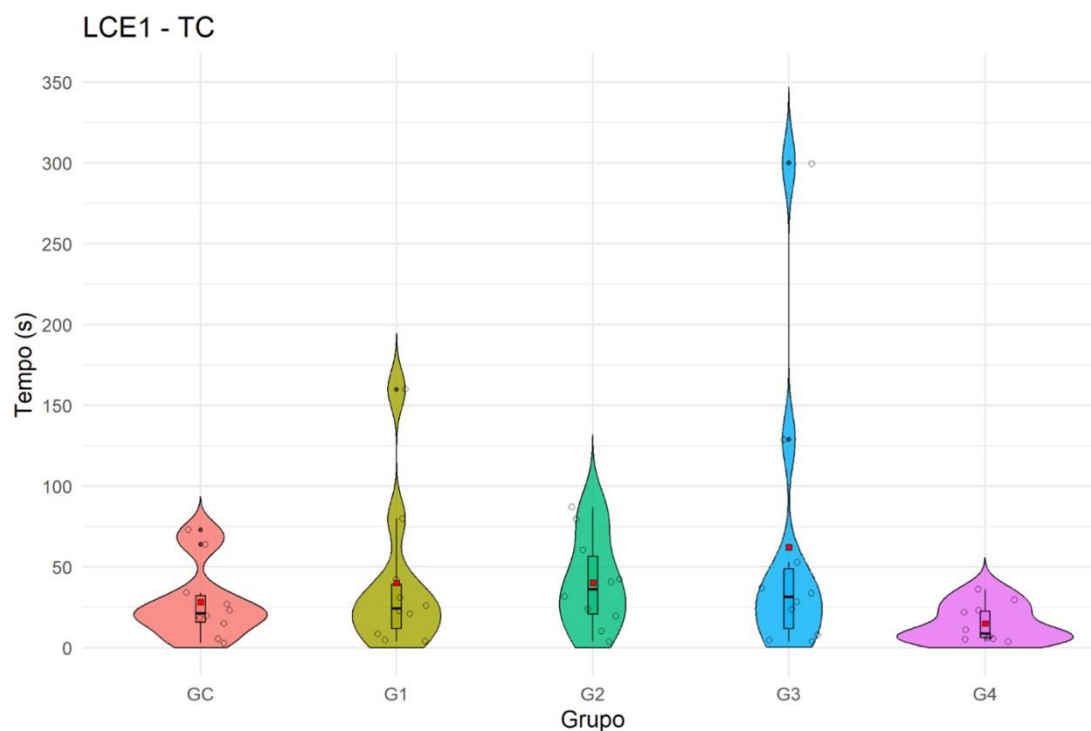


Figura 9 – Gráfico tipo *Violin plot* representando a distribuição do tempo de permanência (em segundos) no centro (TC) no Labirinto em Cruz Elevado (LCE) por grupo experimental. A largura representa a densidade dos dados; a linha horizontal indica a mediana, e os pontos individuais representam as observações.

4. Entradas no Braço Aberto

O teste de normalidade de Shapiro-Wilk (Tabela 8 - ANEXO) indicou distribuição normal para os grupos GC ($p = 0,0739$) e G1 ($p = 0,2604$). O grupo G2 apresentou dados não normais ($p = 0,0441$), enquanto nos grupos G3 e G4 o teste foi indefinido devido à ausência de variabilidade (todos os animais obtiveram zero ou valores constantes), o que impede o cálculo estatístico paramétrico.

O grupo G1 (Tabela 9 – ANEXO 1) exibiu a maior média de entradas nos braços abertos ($2,90 \pm 2,38$), seguido pelo G2, com média de 1,70. O GC apresentou média de 1,00 entrada. Os grupos G3 e G4 apresentaram médias próximas de zero.

O teste de Kruskal-Wallis revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,001$), justificando a realização de comparações pareadas por Wilcoxon com correção de Holm (Quadro 2 – ANEXO 1). Observa-se que o grupo G1 diferiu significativamente do grupo G3 ($p = 0,0022$) e do grupo G4 ($p = 0,0226$). O grupo G2 também apresentou diferença significativa em relação ao G3 ($p = 0,0466$).

O gráfico de violino a seguir (Figura 10) ilustra visualmente essas diferenças. Grupos G1 e G2 exibiram maior variabilidade e medianas mais altas de EBA, enquanto G3 e G4 apresentaram distribuição comprimida no valor zero, com baixa dispersão.

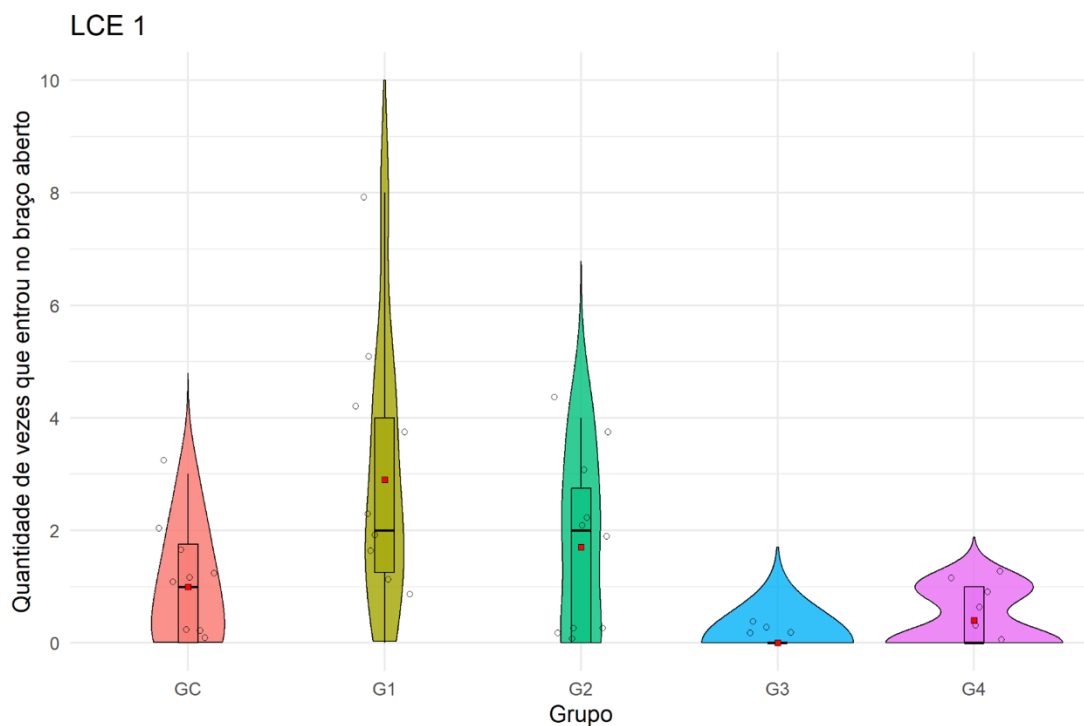


Figura 10 – Gráfico tipo *Violin plot* representando a distribuição da quantidade EBA entre os grupos. A largura representa a densidade dos dados; a linha horizontal indica a mediana, e os pontos representam os valores individuais. Os grupos G3 e G4 apresentaram valores nulos ou muito baixos, enquanto o G1 demonstrou maior comportamento exploratório, compatível com efeito ansiolítico da infecção por *T. gondii*.

O grupo G1 (Tabela 9 – ANEXO 1) exibiu a maior média de entradas nos braços abertos ($2,90 \pm 2,38$), seguido pelo G2, com média de 1,70. O GC apresentou média de 1,00 entrada. Os grupos G3 e G4 apresentaram médias próximas de zero.

O teste de Kruskal-Wallis revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,001$), justificando a realização de comparações pareadas por Wilcoxon com correção de Holm (Quadro 2 – ANEXO 1). Observa-se que o grupo G1 diferiu significativamente do grupo G3 ($p = 0,0022$) e do grupo G4 ($p = 0,0226$). O grupo G2 também apresentou diferença significativa em relação ao G3 ($p = 0,0466$).

O gráfico de violino a seguir (Figura 10) ilustra visualmente essas diferenças. Grupos G1 e G2 exibiram maior variabilidade e medianas mais altas de EBA, enquanto G3 e G4 apresentaram distribuição comprimida no valor zero, com baixa dispersão.

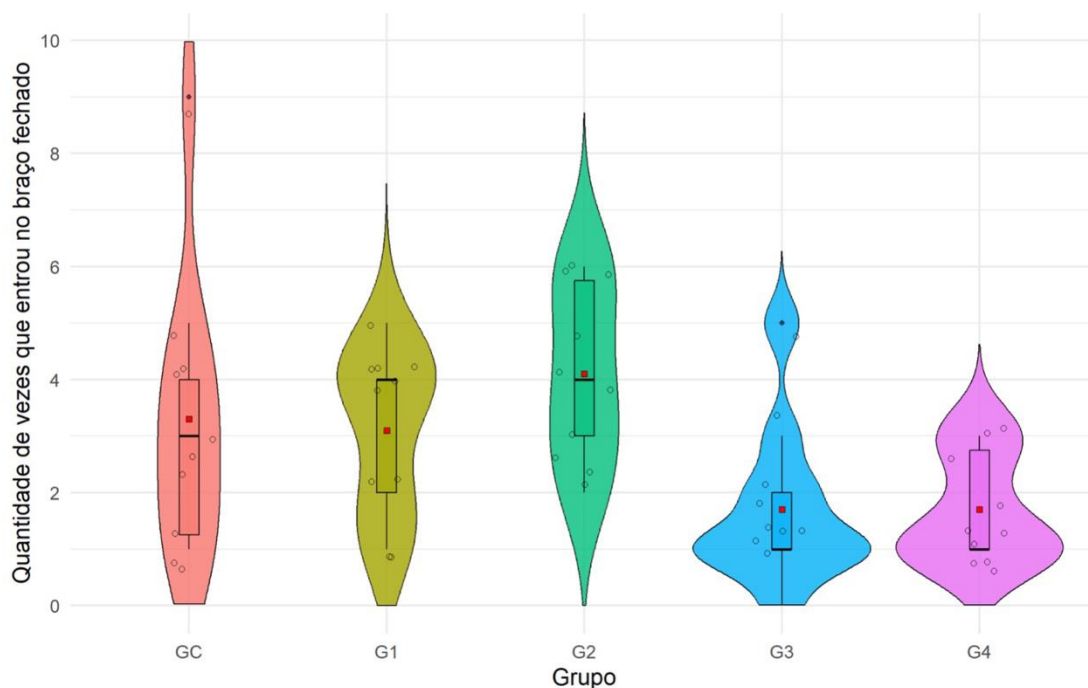


Figura 10 – Gráfico tipo *Violin plot* da distribuição da quantidade de entradas nos braços fechados por grupo experimental. Os grupos G3 e G4

apresentaram menores médias e menor dispersão, enquanto G2 exibiu maior atividade, compatível com menor inibição comportamental. A linha preta indica a mediana, os limites da caixa representam os quartis (Q1 e Q3), e o ponto vermelho representa a média. As áreas coloridas ilustram a densidade de probabilidade dos dados por grupo.

5. Tempo de Fundo de Braço Aberto

Em FBA não houve variabilidade entre os dados, uma vez que 46 de 50 ratos apresentaram tempo ZERO.

A tabela de estatísticas descritivas (Tabela 12 – ANEXO 1) mostra que os valores de FBA foram extremamente baixos em todos os grupos, com medianas iguais a 0 em todos os casos e valores máximos oscilando entre 1 s e 2 s. O grupo G4 apresentou a maior média de tempo ($0,20 \text{ s} \pm 0,63$), seguido de GC ($0,20 \text{ s} \pm 0,42$), enquanto o grupo G2 não apresentou nenhum animal que explorasse o fundo do braço aberto ($0,00 \pm 0,00$).

O teste de Kruskal-Wallis revelou ausência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,459$) (Tabela 12 – ANEXO 1).

O gráfico de violino a seguir (Figura 11) confirma essa limitação, demonstrando forte assimetria com a maioria dos dados concentrados em zero, especialmente nos grupos G2 e G3. Embora alguns animais no grupo G4 tenham

atingido valores de 2 s, a dispersão geral permanece baixa e a variabilidade intragrupo elevada.

Figura

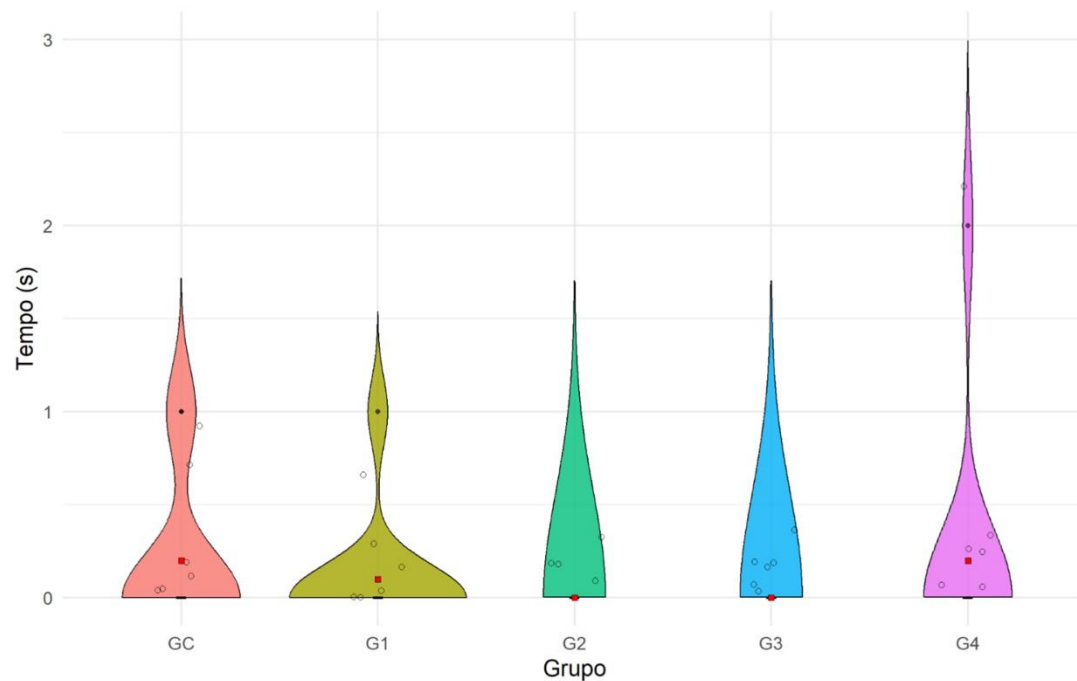


Figura 11 – Gráfico tipo *Violin plot* representando a distribuição do tempo de permanência (em segundos) no fundo do braço aberto (FBA) entre os grupos experimentais. A maior parte dos dados concentra-se no valor zero, especialmente nos grupos G2 e G3. O grupo G4 apresentou maior dispersão, com poucos animais permanecendo até dois segundos na extremidade distal do braço aberto. A linha preta indica a mediana, os limites da caixa representam os quartis (Q1 e Q3), e o ponto vermelho representa a média. As áreas coloridas ilustram a densidade de probabilidade dos dados por grupo.

6. Tempo de Fundo de Braço Fechado

O grupo-controle (GC) (Tabela 14 - ANEXO) obteve a maior média de tempo no fundo do braço fechado ($5,10 \text{ s} \pm 2,85$), seguido de G2 ($4,70 \text{ s} \pm 1,16$). Os grupos G1, G3 e G4 apresentaram médias menores, variando de 3,10 a 3,80 s. O teste de Kruskal-Wallis revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,044$).

As comparações pareadas (Quadro 4 – ANEXO 1), utilizando o teste de Wilcoxon com correção de Holm, no entanto, não revelaram diferenças significativas entre pares de grupos, sugerindo que, embora haja diferença global entre eles, não há contrastes pontuais suficientemente fortes para superar o critério de significância após correção múltipla.

O gráfico de violino a seguir (Figura 12) mostra maior dispersão dos dados no grupo GC, com valores variando de 1 s a 11 s. O grupo G2 apresentou distribuição mais concentrada e assimétrica. Os grupos G3 e G4 apresentaram distribuições mais compactas, com amplitudes reduzidas.

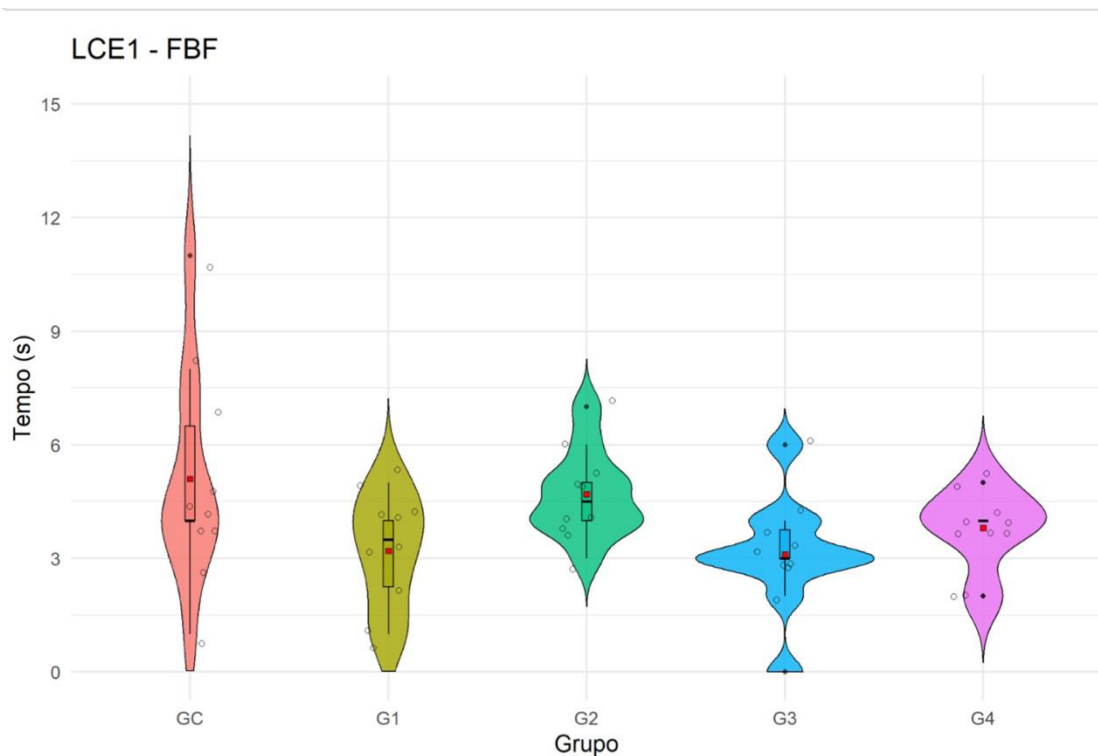


Figura 12 – Gráfico tipo *Violin plot* ilustrando a distribuição do tempo de permanência (em segundos) no fundo do braço fechado entre os grupos. Observa-se maior dispersão no grupo GC, com valores extremos, e padrão mais compacto nos grupos G3 e G4, sugerindo menor exploração ou maior evitação. A linha preta indica a mediana, os limites da caixa representam os quartis (Q1 e Q3) e o ponto vermelho representa a média. As áreas coloridas ilustram a densidade de probabilidade dos dados por grupo.

7. *Rearing*

Observou-se médias próximas entre os grupos GC (12,10), G1 (12,20) e G2 (12,20), com medianas entre 10 e 13 *rearing* (Tabela 16 – ANEXO 1). O grupo G3 apresentou menor média (8,80), e o grupo G4 (10,40) valores

intermediários. O teste de Kruskal-Wallis não identificou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p = 0,414$).

No gráfico de violino a seguir (Figura 13), observa-se alta dispersão em G1 e G3, com a presença de *outliers*. Os grupos G2 e G4 apresentaram distribuições mais compactas. O G3 mostrou tendência a menor exploração vertical, embora sem significância estatística.

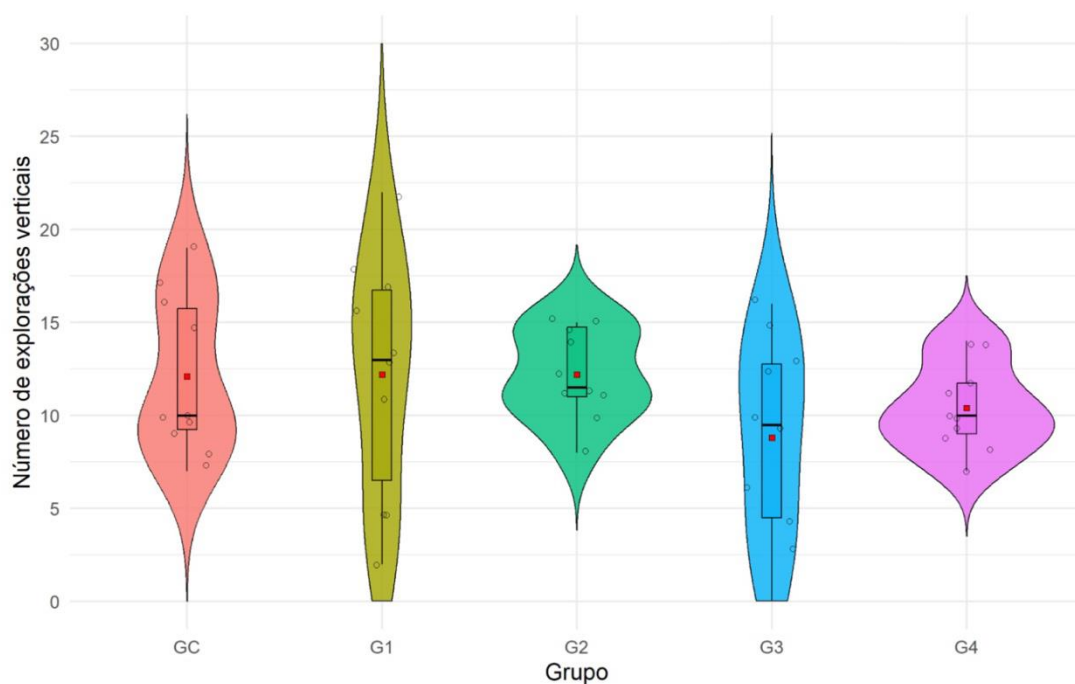


Figura 13 – Gráfico tipo *Violin plot* ilustrando a distribuição do número de *rearing* nos diferentes grupos. Os grupos G1 e G3 apresentaram maior dispersão, com *outliers*. Não se observam padrões claros de alteração comportamental entre os grupos, embora G3 tenha mostrado tendência à redução. A linha preta indica a mediana, os limites da caixa representam os

quartis (Q1 e Q3), e o ponto vermelho representa a média. As áreas coloridas ilustram a densidade de probabilidade dos dados por grupo.

8. *Head-dipping*

O grupo G1 apresentou o maior número médio de episódios de *head-dipping* ($6,90 \pm 5,40$), seguido de G2 ($5,50 \pm 3,54$) e GC ($5,80 \pm 5,14$). Os grupos G3 e G4 apresentaram os menores valores médios, respectivamente $2,50 \pm 1,18$ e $3,90 \pm 5,69$. O teste de Kruskal-Wallis não indicou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,077$), embora o resultado se aproxime do limiar convencional de significância, sugerindo possível tendência que merece investigação adicional (Tabela 18 – ANEXO 1).

Com o objetivo de aprofundar a análise, foi ajustado um modelo de regressão binomial negativa, apropriado para dados de contagem com sobredispersão. A análise por regressão utilizando razão de incidência (IRR – *Incidence Rate Ratio*) (Tabela 19 - ANEXO) mostrou que o grupo G3 apresentou uma redução estatisticamente significativa no número de episódios de *head-dipping* em comparação ao grupo-controle ($IRR = 0,431$; IC95%: 0,196–0,938; $p = 0,034$).

Nas comparações múltiplas com correção de Tukey (Quadro 6 – ANEXO 1), embora nenhuma das comparações tenha atingido significância estatística após ajuste, a comparação entre G1 e G3 aproximou-se do limiar de significância ($p = 0,0753$).

O gráfico de violino a seguir (Figura 14) ilustra claramente esse padrão. O grupo G1 exibe maior dispersão e número de eventos de *head-dipping*, enquanto o grupo G3 apresenta dados concentrados em torno de valores baixos, com mínima variabilidade intragrupo. O grupo G2, que recebeu o probiótico após a infecção, manteve desempenho intermediário.

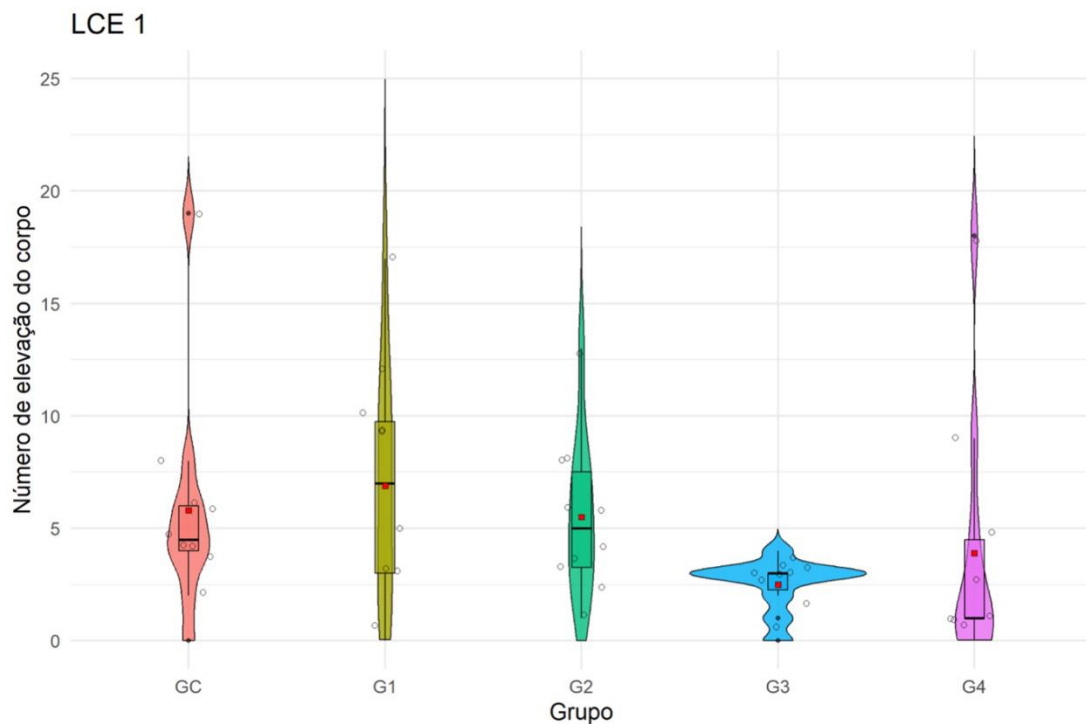


Figura 14 – Gráfico tipo *Violin plot* representando a distribuição do número de *head-dips* entre os grupos. G1 e G2 apresentaram maior dispersão e frequência, enquanto G3 e G4 demonstraram menor expressão do comportamento, possivelmente relacionado a maior inibição emocional. A linha preta indica a mediana, os limites da caixa representam os quartis (Q1 e Q3), e o ponto vermelho representa a média. As áreas coloridas ilustram a densidade de probabilidade dos dados por grupo.

9. *Grooming*

A análise descritiva dos dados (Tabela 21 – ANEXO 1) mostrou que os grupos G2 ($2,00 \pm 2,16$) e G4 ($1,70 \pm 0,95$) apresentaram as maiores médias de *grooming*, seguidos de GC ($1,00 \pm 1,76$) e G3 ($0,90 \pm 1,10$). O grupo G1 exibiu a menor média ($0,60 \pm 1,07$). As medianas também refletem essa tendência, com valores mais elevados nos grupos G2 (1,50) e G4 (2,00).

O teste de Kruskal-Wallis não indicou significância estatística entre os grupos ($p = 0,170$).

Complementarmente, foi utilizado um modelo de regressão binomial negativo com IRR (Tabela 22 – ANEXO 1), considerando o GC como referência. Os grupos G2 (IRR = 2,000; $p = 0,212$) e G4 (IRR = 1,700; $p = 0,346$) apresentaram maior frequência de *grooming*, embora sem significância estatística. O grupo G1 apresentou IRR = 0,600 ($p = 0,433$), sugerindo uma redução da ocorrência do comportamento em relação ao controle. Os intervalos de confiança, no entanto, foram amplos e incluíram a unidade, indicando incerteza quanto à magnitude e à direção dos efeitos.

As comparações múltiplas, ajustadas pelo método de Tukey (Quadro 7 – ANEXO 1), não mostraram contrastes estatisticamente significativos entre os grupos, sendo o contraste G1 vs. G2 ($p = 0,2830$) o mais próximo da significância. Esse resultado sugere que, embora haja tendência de aumento do *grooming* no grupo G2 em comparação ao G1, os dados não permitem uma conclusão definitiva com o nível de confiança adotado.

A visualização por meio do gráfico de violino a seguir (Figura 15) reforça esses achados, revelando uma maior dispersão e concentração de valores elevados nos grupos G2 e G4. Em contraste, os grupos G1 e G3 mostram distribuições mais estreitas e concentradas em valores baixos, indicando menor expressão do comportamento de *grooming*.

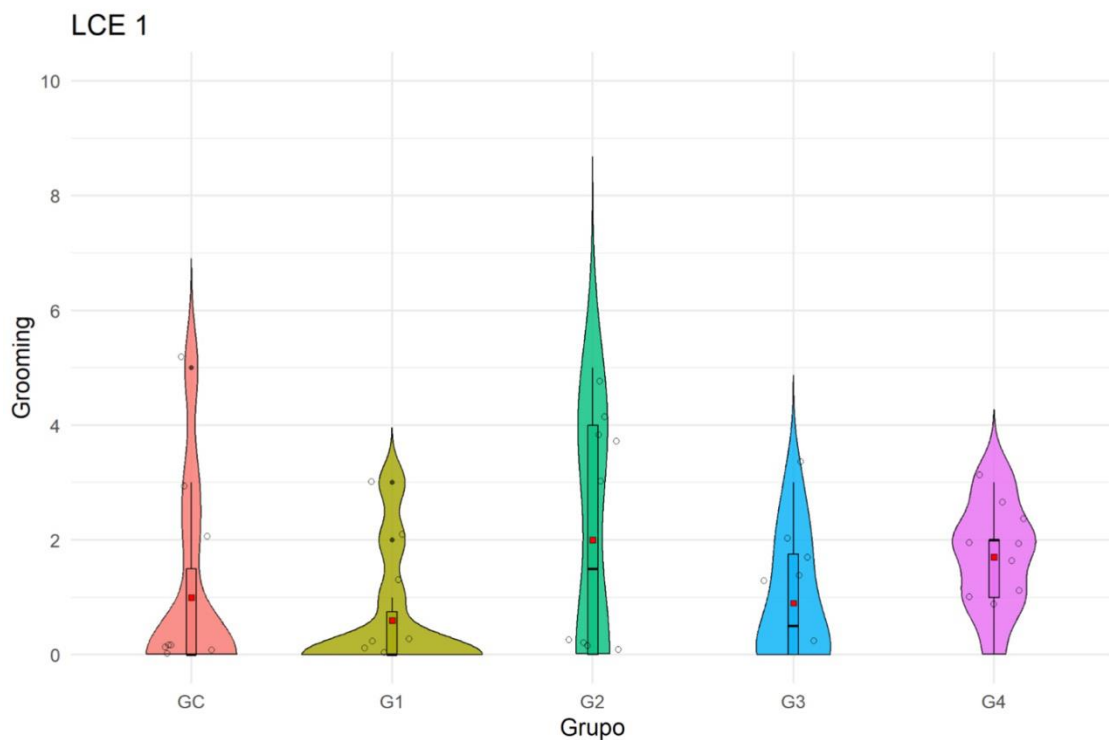


Figura 15 - Distribuição da variável *grooming* nos grupos GC, G1, G2, G3 e G4 representada por gráfico do tipo *Violin plot*. Observa-se maior dispersão e frequência de *grooming* nos grupos G2 e G4, e menor expressão nos grupos G1 e G3. A linha preta indica a mediana, os limites da caixa representam os quartis (Q1 e Q3), e o ponto vermelho representa a média. As áreas coloridas ilustram a densidade de probabilidade dos dados por grupo.

10. Fezes

A estatística descritiva (Tabela 24 – ANEXO 1) mostra médias relativamente próximas entre os grupos, com os valores mais altos observados em G4 ($2,40 \pm 1,90$) e GC ($2,30 \pm 1,95$), seguidos de G2 ($2,20 \pm 1,55$), G3 ($1,80 \pm 1,48$) e G1 ($1,70 \pm 1,64$). As medianas mantêm esse padrão, variando entre 1,50 e 2,00 em quase todos os grupos. A análise de variância não paramétrica de Kruskal-Wallis indicou ausência de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p = 0,875$).

O gráfico de violino a seguir (Figura 16) permite uma visualização mais refinada da distribuição dos dados. Observa-se alta sobreposição entre os grupos, com leve assimetria à direita em alguns deles, especialmente GC e G4. A dispersão dos dados é relativamente homogênea.

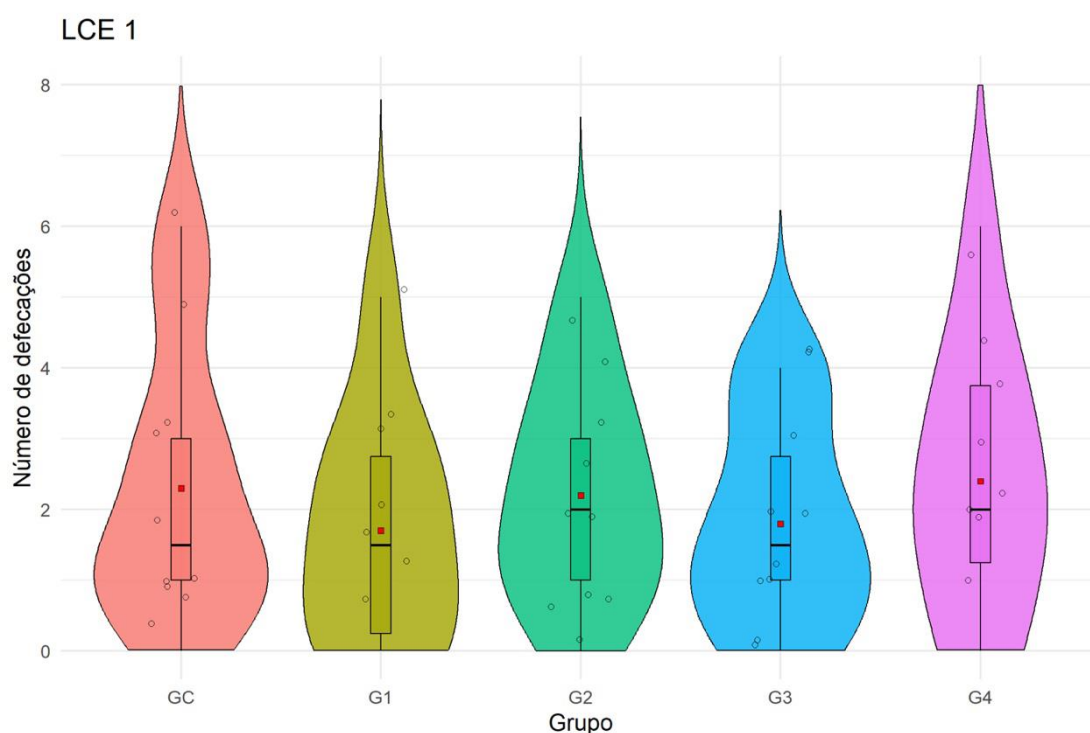


Figura 16 - Gráfico do tipo *Violin plot*, representando a distribuição do número de defecações por grupo. A sobreposição entre os grupos sugere padrão semelhante de resposta autonômica ao estresse em todos os grupos experimentais. A linha preta indica a mediana, os limites da caixa representam os quartis (Q1 e Q3), e o ponto vermelho representa a média. As áreas coloridas ilustram a densidade de probabilidade dos dados por grupo.

Labirinto em cruz elevado no segundo tempo

Trinta dias após o primeiro experimento com o Labirinto em Cruz Elevado (LCE), os animais foram novamente submetidos ao experimento, e verificaram-se os seguintes resultados:

1. Segundo Tempo de Braço Aberto (TBA 2)

A análise descritiva (Tabela 26 – ANEXO 1) indica que os Grupos-Controle (GC) e G1 apresentaram as maiores medianas de TBA2 (18,5 s e 53,5 s, respectivamente). Por outro lado, os grupos G2, G3 e especialmente G4 demonstraram tempos muito inferiores de permanência nos braços abertos. Destaca-se o grupo 4, cujos animais apresentaram valores uniformemente nulos (0,0 s), evidenciando um comportamento de completa evitação da área em questão.

O teste de Kruskal-Wallis apontou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,013$), justificando as análises *post-hoc*. As comparações par a par (Quadro 9 – ANEXO 1) indicaram diferenças significativas entre o grupo 4 e os grupos GC ($p = 0,050$) e G1 ($p = 0,014$). As demais comparações não atingiram significância estatística.

A distribuição dos dados apresentada no gráfico de violino a seguir (Figura 17) reforça esses achados. Os grupos GC, G1 e G3 demonstraram maior dispersão, com presença de valores elevados de TBA, enquanto o grupo 4 exibiu uma distribuição achatada em torno de zero.

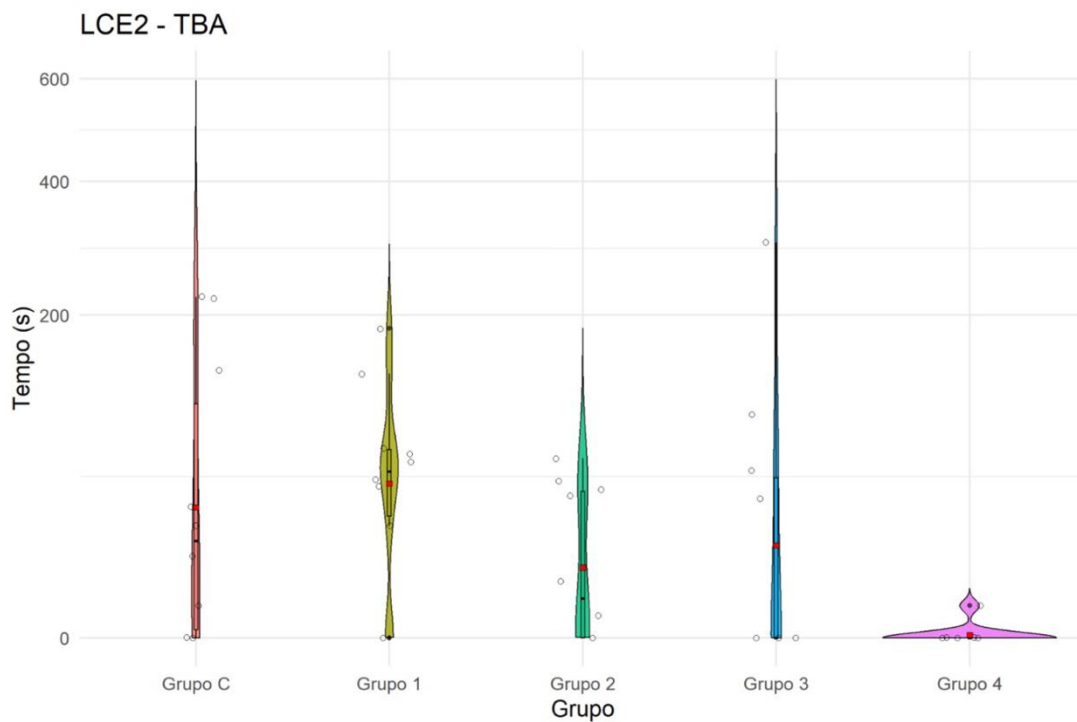


Figura 17 - Gráfico de tipo *Violin plot* representando a distribuição do tempo (em segundos) nos braços abertos (TBA2) para cada grupo experimental no LCE2. O grupo 4 apresenta ausência total de permanência nos braços abertos, enquanto os grupos GC e G1 apresentam maior dispersão e medianas elevadas. A linha preta indica a mediana, os limites da caixa representam os quartis (Q1 e Q3), e o ponto vermelho representa a média. As áreas coloridas ilustram a densidade de probabilidade dos dados por grupo.

2. Segundo Tempo de Braço Fechado (TBF2)

Os dados descritivos (Tabela 28 – ANEXO 1) indicaram que o grupo 4 apresentou o maior tempo médio (280,00 s) e mediana (291,00 s) de permanência nos braços fechados, com baixa variabilidade (DP = 22,29). Em contraste, os grupos GC e G1 exibiram tempos médios consideravelmente menores (190,20 s e 189,70 s, respectivamente), com maior variabilidade entre os indivíduos. O grupo 2 apresentou desempenho intermediário (média = 247,50 s), enquanto o grupo 3 apresentou média elevada (223,50 s), mas com ampla dispersão dos dados (DP = 89,50).

O teste de Kruskal-Wallis identificou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p = 0,005$). As comparações múltiplas com correção de Holm revelaram diferenças significativas entre o grupo 4 e os GC ($p = 0,041$) e G1 ($p = 0,022$) (Quadro 10 – ANEXO 1).

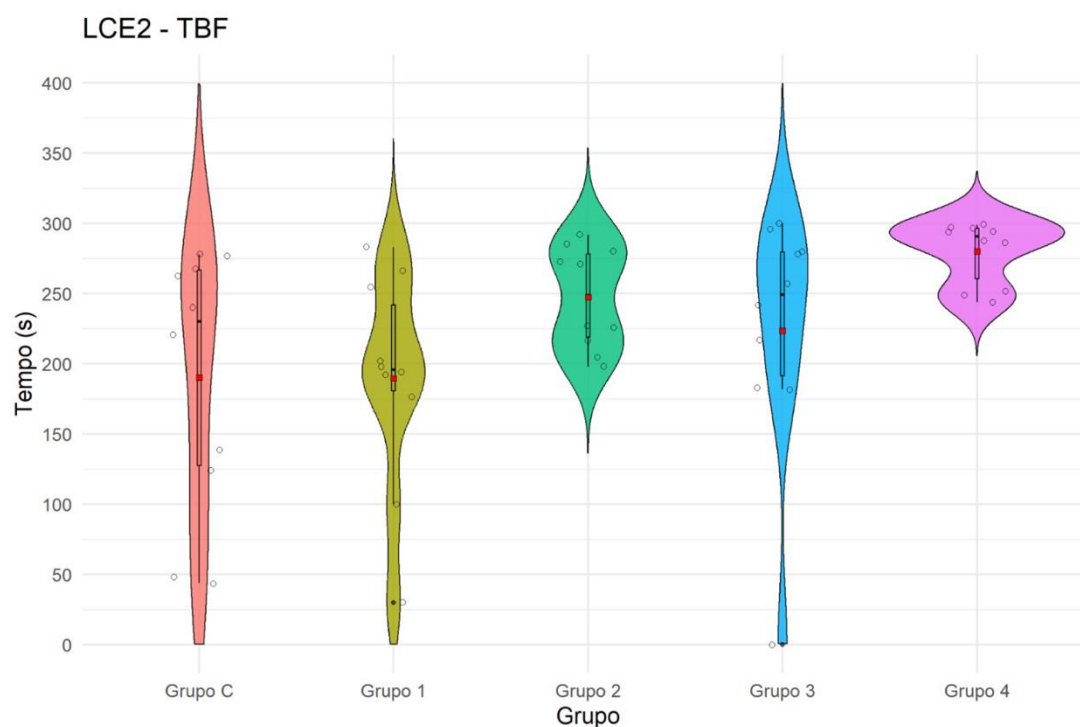


Figura 18 - Gráfico tipo *Violin plot* demonstrando a distribuição dos tempos de permanência (em segundos) em braços fechados (TBF2) por grupo experimental no LCE2. O grupo G4 apresenta maior concentração de tempos elevados. A linha preta indica a mediana, os limites da caixa representam os quartis (Q1 e Q3), e o ponto vermelho representa a média. As áreas coloridas ilustram a densidade de probabilidade dos dados por grupo.

3. Segundo Tempo de Centro

A tabela descritiva (TABELA 30 – ANEXO 1) mostra que os grupos GC ($44,10 \pm 44,87$ s) e G1 ($47,60 \pm 36,50$ s) apresentaram os maiores tempos médios no centro, seguidos por G2 ($38,20 \pm 29,10$ s) e G3 ($27,80 \pm 35,88$ s). O grupo G4 apresentou o menor tempo médio ($19,80 \pm 21,99$ s), com mediana

de apenas 9 s. A diferença entre os grupos não atingiu significância estatística no teste de Kruskal-Wallis ($p = 0,117$).

No gráfico de violino a seguir (Figura 19) visualiza-se que o G4 apresenta distribuição mais concentrada em valores baixos de tempo no centro, com baixa dispersão, enquanto os grupos GC e G1 exibem ampla variação, incluindo tempos mais elevados.

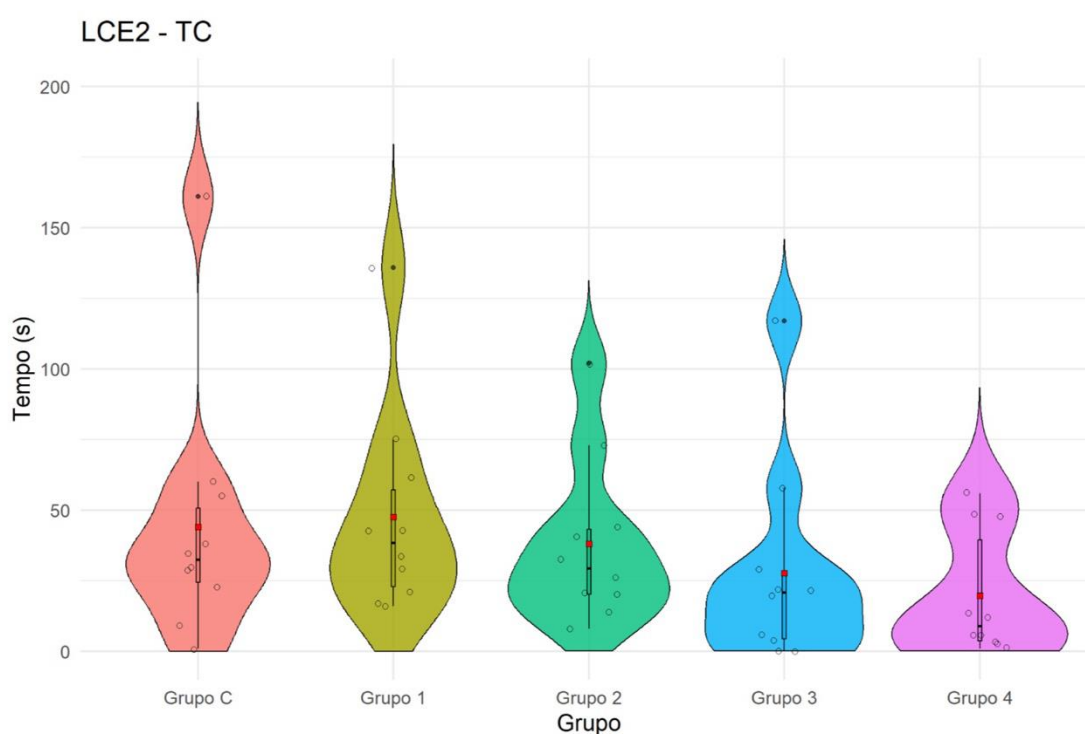


Figura 19 - Gráfico tipo *Violin plot*, ilustrando a distribuição do tempo de permanência (em segundos) no centro do labirinto (TC2) entre os grupos no LCE2. Note-se a menor dispersão e concentração em valores baixos no grupo G4. A linha preta indica a mediana, os limites da caixa representam os quartis (Q1 e Q3), e o ponto vermelho representa a média. As áreas coloridas ilustram a densidade de probabilidade dos dados por grupo.

4. Segundo Tempo de Entrada em Braço Aberto (EBA 2)

A tabela descritiva (Tabela 32 – ANEXO 1) evidencia que o grupo G1 apresentou a maior média ($3,80 \pm 2,74$) e mediana (4,50) de entradas nos braços abertos, seguido pelo grupo G4 ($2,50 \pm 2,07$), enquanto os grupos 2 e 3 apresentaram os menores valores médios e medianos ($\leq 1,0$). O GC exibiu valores intermediários, com média de 1,40 e mediana de 1,0.

As análises *post-hoc* com correção de Holm (Wilcoxon) (Quadro 11 – ANEXO 1) não revelaram diferenças estatisticamente significativas nas comparações par a par. Contudo, a análise de contrastes múltiplos com correção de Tukey apontou diferenças significativas entre o grupo G1 e os grupos G2 ($p = 0,0090$) e G3 ($p = 0,0032$), com destaque para o maior número de entradas no braço aberto no grupo G1 (Quadro 12 – ANEXO 1).

O gráfico de violino a seguir (Figura 20) reforça esses achados, evidenciando uma distribuição mais ampla e assimétrica para o grupo G1, com vários indivíduos apresentando altas frequências de entrada, em contraste com os grupos G2 e G3, cujas distribuições são estreitas e concentradas em valores baixos ou nulos.

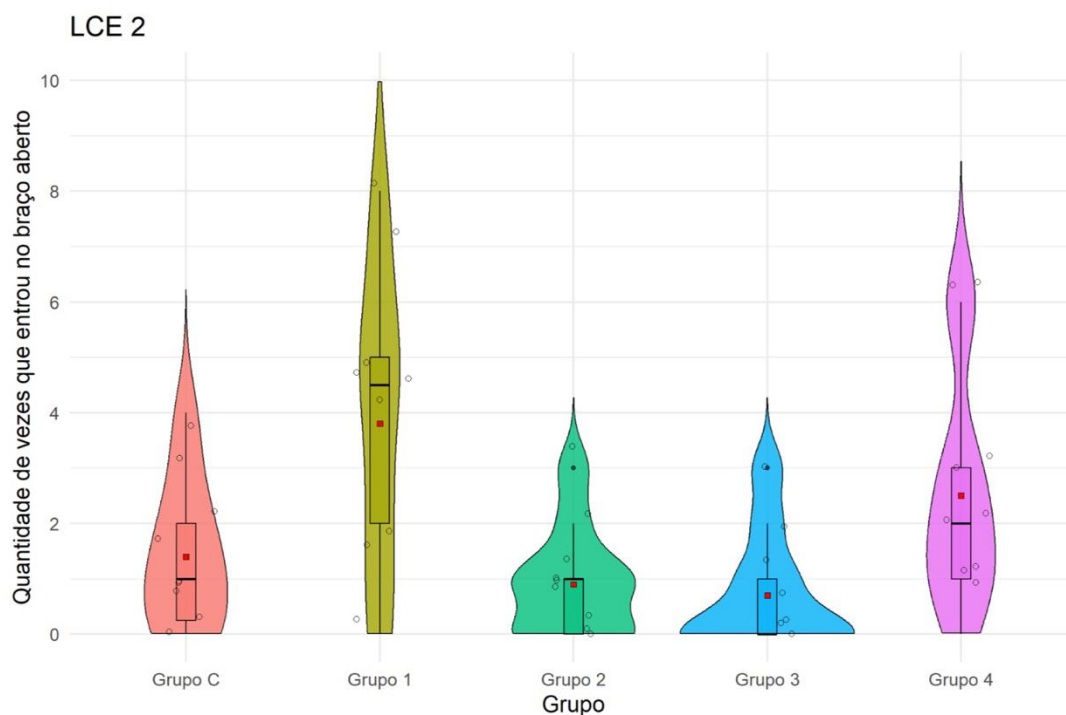


Figura 20 – Gráfico tipo *Violin Plot*, representando a quantidade de vezes que os animais de cada grupo experimental ingressaram nos braços abertos (EBA2) do labirinto, 30 dias após a primeira exposição (LCE1). A linha preta indica a mediana, os limites da caixa representam os quartis (Q1 e Q3), e o ponto vermelho representa a média. As áreas coloridas ilustram a densidade de probabilidade dos dados por grupo.

5. Segundo Tempo de Entrada no Braço Fechado (EBF2)

A análise descritiva (Tabela 34 – ANEXO 1) evidencia que os maiores valores médios e medianos de EBF2 foram observados nos grupos G1 (Média = 5,60; Mediana = 6,00) e G2 (Média = 4,20; Mediana = 4,00), seguidos do grupo GC (Média = 3,80; Mediana = 3,50). Já os G3 e G4 apresentaram os menores índices (Médias = 2,50 e 2,60, respectivamente).

O teste de Kruskal-Wallis apontou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,030$), o que justificou a realização de comparações múltiplas subsequentes (Tabela 34 – ANEXO 1). No entanto, os testes *post-hoc* de Wilcoxon com correção de Holm não identificaram diferenças significativas após correção para múltiplas comparações (Quadro 13 – ANEXO 1). Os contrastes log-lineares (modelo de razões de taxas de incidência – IRR) indicaram aumento de entradas nos braços fechados no grupo G1 em relação ao GC (IRR = 1,474; IC95% = 0,897–2,440; $p = 0,128$), e redução nos grupos G3 (IRR = 0,658) e G4 (IRR = 0,684), embora sem alcançar significância estatística (Tabela 35 – ANEXO 1).

O gráfico a seguir reforça os achados estatísticos. Conforme ilustrado na Figura 21, o grupo G1 apresentou a maior concentração de entradas nos braços fechados (EBF2), com mediana de 6,0 e ampla dispersão. Em contraste, os grupos G3 e G4 exibiram distribuições mais estreitas e medianas reduzidas (ambas igual a 2,0). Os grupos GC e o G2 situaram-se em posição intermediária, com medianas de 3,5 e 4,0, respectivamente. Visualmente, destaca-se a simetria do GC e a assimetria da distribuição no G2, que apresentou *outliers* superiores.

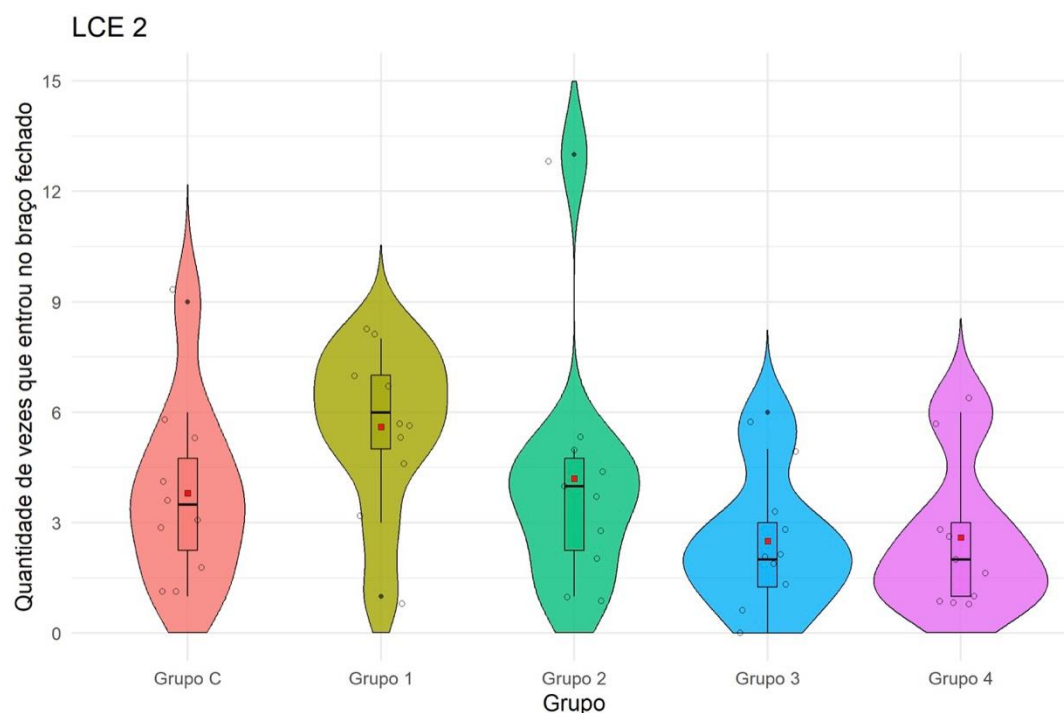


Figura 21 – Gráfico tipo *Violin plot*, representando o número de entradas nos braços fechados (EBF2) durante a segunda sessão do Labirinto em Cruz Elevado (LCE2), segundo os grupos experimentais. O gráfico ilustra a distribuição da variável EBF nos grupos GC, G1 a G4, 30 dias após a primeira exposição ao LCE. Os pontos individuais representam os valores observados por animal; os *boxplots* indicam os quartis e a mediana, e o ponto vermelho representa a média de cada grupo.

6. Segundo Tempo de Fundo de Braço Aberto

As medidas descritivas apontaram que o grupo G1 (infectado por *T. gondii* sem intervenção probiótica) apresentou o maior tempo médio de permanência no fundo do braço aberto ($2,60 \pm 2,80$ s), seguido pelo grupo G3 ($1,10 \pm 2,60$ s), enquanto o GC exibiu média inferior ($0,40 \pm 0,84$ s) (Tabela 37 – ANEXO 1). A análise *post-hoc* com o teste de Wilcoxon ajustado por Holm

(Quadro 14 – ANEXO 1) não identificou diferenças estatisticamente significativas entre pares de grupos (todos os valores de $p > 0,05$).

O gráfico de violino a seguir (Figura 22) corrobora esses achados, demonstrando maior dispersão e assimetria nos grupos G1 e G3, com presença de *outliers* que atingiram até 8 segundos de permanência no FBA2). Em contraste, os grupos GC, G2 e G4 exibiram baixa variabilidade e valores mediana e máximo de zero ou próximo de zero.

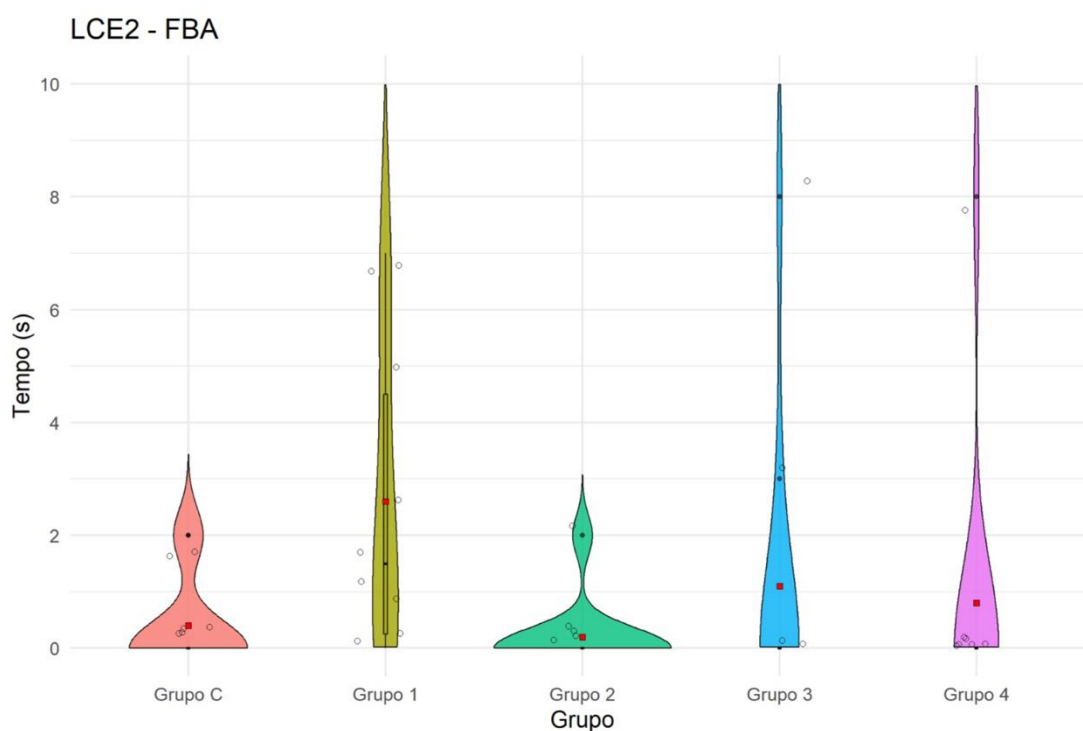


Figura 22 – Gráfico tipo *Violin plot* da variável FBA – LCE2. Representação gráfica da distribuição dos tempos de permanência no fundo dos braços abertos (FBA2) para cada grupo experimental. Os pontos individuais representam os valores observados por animal; os *boxplots* indicam os quartis e a mediana, e o ponto vermelho representa a média de cada grupo.

Segundo tempo do Fundo de Braço Fechado

O teste de Kruskal-Wallis (Tabela 39 – ANEXO 1), demonstrou ausência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,385$). As médias de tempo variaram entre 3,10 segundos (G3) e 4,80 segundos (G2), com desvios-padrão entre 1,95 s e 2,99 s. As medianas variaram de 2,50 s (G3) a 6,00 s (G1), evidenciando certa dispersão e sobreposição entre os grupos.

O gráfico em formato de violino a seguir (Figura 23) permite observar, de maneira integrada, a distribuição da variável em cada grupo. Destaca-se uma maior amplitude de valores no G1 e no G2, com alguns animais apresentando valores extremos. Já os G3 e G4 exibiram distribuições mais concentradas, com tempos inferiores à média geral. Visualmente, a densidade maior na porção inferior das distribuições nos grupos G3 e G4 indica menor tempo de permanência no fundo dos braços fechados (FBF2).

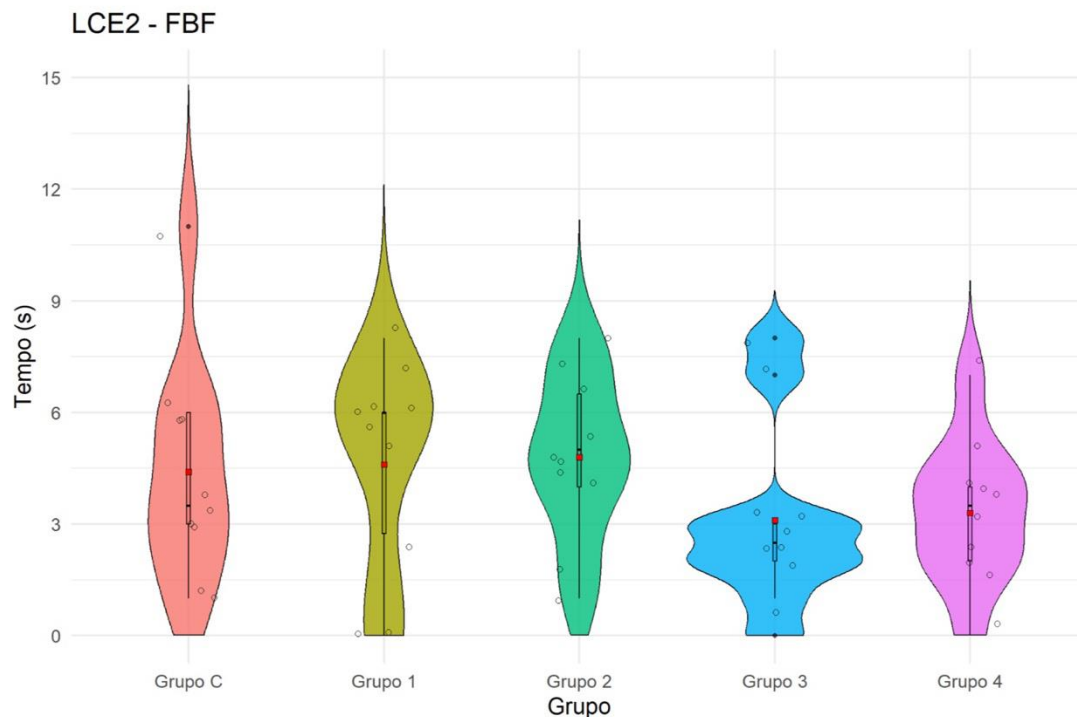


Figura 23 - Gráfico tipo *Violin plot* representando a distribuição do tempo de permanência no fundo do braço fechado (FBF2) na sessão LCE2. Cada gráfico de violino exibe a densidade da distribuição dos dados em segundos para cada grupo experimental. Os pontos individuais representam os valores observados por animal; os *boxplots* indicam os quartis e a mediana, e o ponto vermelho representa a média de cada grupo.

Rearing

No segundo teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE2), os dados descritivos para a variável *rearing* indicaram diferenças entre os grupos experimentais (Tabela 41 – ANEXO 1). A média geral foi de 9,88 episódios (DP = 5,40). O G1 apresentou a maior média ($14,20 \pm 6,03$), seguido pelos G4 ($9,90 \pm 4,75$), G3 ($9,70 \pm 6,11$), G2 ($8,80 \pm 4,29$) e GC ($6,80 \pm 3,39$). As medianas seguiram padrão semelhante: G1 (12,5), G3 (10,0), G4 (8,5), G2 (9,0) e GC (7,0).

O teste de Kruskal-Wallis revelou uma diferença entre os grupos ($p = 0,060$), embora se observe uma proximidade ao limiar de significância ($p > 0,05$) (Tabela 41 – ANEXO).

Para identificar diferenças significativas entre grupos, utilizou-se a análise de IRR com comparações entre pares. A avaliação da IRR, com o GC como referência, mostrou que o G1 teve IRR = 2,088 (IC95%: 1,335–3,280; $p = 0,001$), o G2 teve IRR = 1,294 (IC95%: 0,812–2,067; $p = 0,279$), o G3 teve IRR = 1,426 (IC95%: 0,899–2,270; $p = 0,132$) e o G4 teve IRR = 1,456 (IC95%: 0,918–2,314; $p = 0,111$) (Tabela 42 – ANEXO 1).

As comparações múltiplas com correção de Tukey indicaram diferença estatisticamente significativa entre o G1 e o GC (ratio = 0,479; $p = 0,0114$). Nenhuma outra comparação apresentou significância estatística ($p > 0,05$) (Quadro 16 – ANEXO 1).

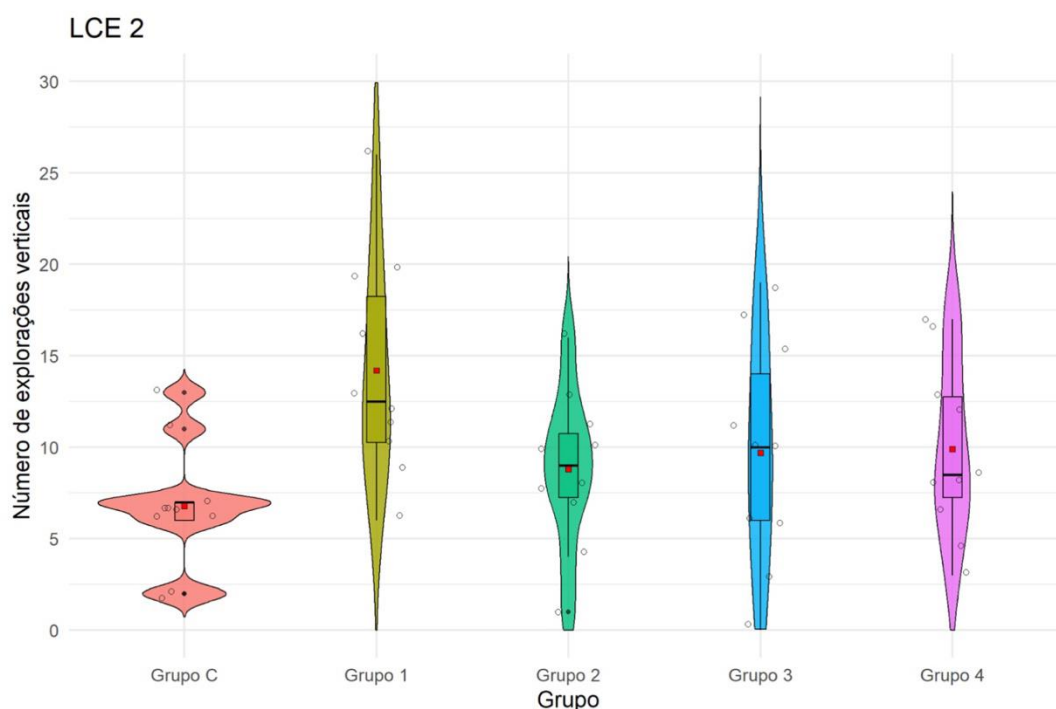


Figura 24 - Gráfico tipo *Violin plot* da variável *rearing* no LCE2 por grupo experimental. Distribuição individual das respostas comportamentais de *rearing* representada por gráfico de violino para cada grupo experimental no segundo tempo de avaliação (LCE2). Os pontos individuais representam os valores observados por animal; os *boxplots* indicam os quartis e a mediana, e o ponto vermelho representa a média de cada grupo.

7. *Head-dipping*

A análise do teste de Kruskal-Wallis (Tabela 44 – ANEXO 1) revelou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p = 0.006$).

Em termos descritivos, o G1 apresentou a maior média de eventos de *head-dipping* ($M = 12.3$; $DP = 7.29$), seguido pelo GC ($M = 6.5$), G3 ($M = 4.9$), G2 ($M = 4.22$) e G4 ($M = 2.7$). As comparações pareadas (Wilcoxon com correção de Holm) indicaram diferença significativa entre o G1 e o G4 ($p = 0.018$). Destaca-se que a comparação entre o G1 e o G2 ($p = 0,077$) – (Quadro 18 – ANEXO 1) – apresentou tendência à significância estatística, considerando o limiar convencional de $p \leq 0,05$.

Os dados de IRR reforçam esses achados (Quadro 19 – ANEXO 1): o G1 apresentou uma taxa de ocorrência de *head-dipping* mais de quatro vezes superior ao G4 ($IRR = 4.556$, $p < 0.0001$), mais de duas vezes superior ao G2 ($IRR = 2.913$, $p = 0.0069$), e aproximadamente 2,5 vezes superior ao G3 ($IRR = 2.510$, $p = 0.0199$) (Quadro 19 – ANEXO 1).

A Figura 25 ilustra a distribuição do comportamento de *head-dipping* no LCE2 entre os cinco grupos experimentais. Observa-se que o G1

apresentou os valores mais elevados dessa variável, com mediana visivelmente superior e ampla dispersão. Em contraste, os grupos que receberam tratamento com probiótico (G2, G3 e G4) apresentaram medianas inferiores e distribuições mais compactas, com menor amplitude interquartílica.

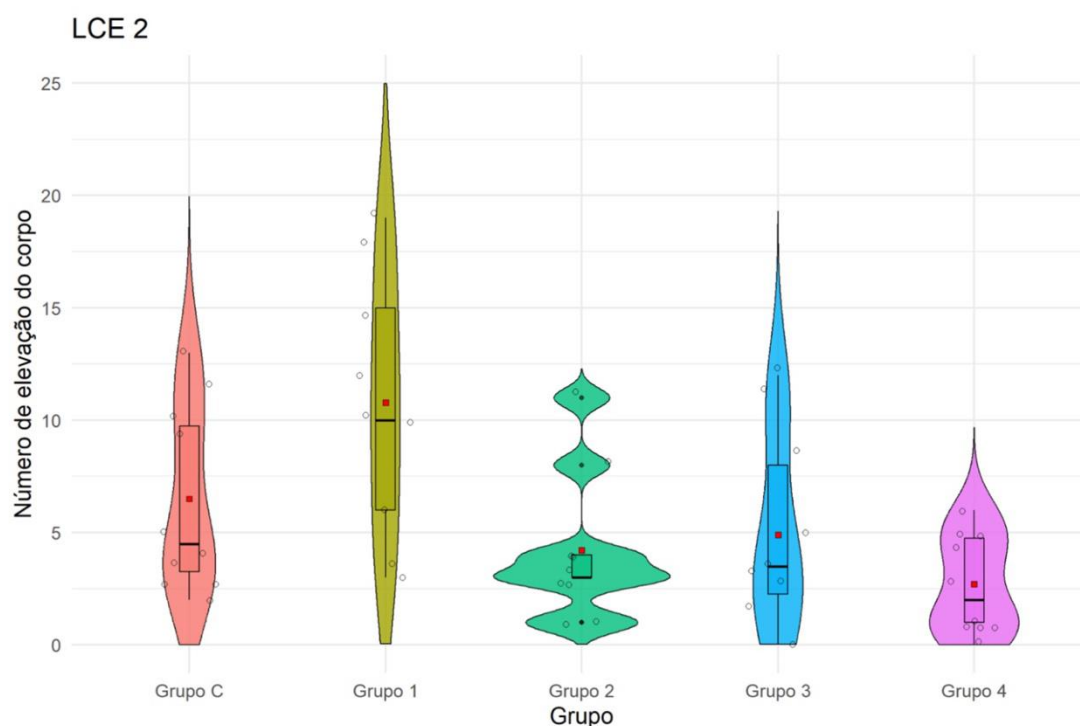


Figura 25 - Gráfico tipo *Violin plot* da variável *head-dipping* (LCE2). Distribuição dos dados de *head-dipping* por grupo experimental, 30 dias após a primeira exposição ao LCE. Os pontos individuais representam os valores observados por animal; os *boxplots* indicam os quartis e a mediana, e o ponto vermelho representa a média de cada grupo.

8. Segundo Tempo de *Grooming*

Na análise descritiva geral (Tabela 46 – ANEXO 1), a média geral de *grooming* foi de 18.92 episódios (DP = 13.35). O GC exibiu média mais

elevada (22.40 ± 12.92), seguido pelos G3 (20.60 ± 17.16), G2 (19.90 ± 15.10), G1 (17.70 ± 10.58) e G4 (14.00 ± 11.08). As medianas reforçam essa tendência, com destaque para o GC (21.0) e G1 (19.5), em contraste com o G4 (13.5), que apresentou os menores valores centrais de *grooming*.

Apesar dessas variações, o teste de Kruskal-Wallis não detectou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($H = 2.26$; $p = 0.704$). A análise de IRR (Tabela 47 – ANEXO 1), usando o GC como referência, mostrou que nenhum grupo apresentou diferenças significativas. Realizado o modelo de regressão binomial negativa, que estima a razão de taxas de incidência entre os grupos (IRR) (Tabela 47 - ANEXO 1), o G4 exibiu um IRR menor (IRR = 0.625; IC95%: 0.297–1.317; $p = 0.212$).

A análise visual por meio do gráfico tipo violino a seguir (Figura 26) reforça as observações descritivas ao revelar padrões distintos de dispersão e concentração dos dados entre os grupos experimentais. O GC apresentou distribuição mais ampla e simétrica, com maior variabilidade de *grooming*. Em contraste, o G4 (tratado exclusivamente com probiótico) apresentou a menor dispersão e uma densidade acentuadamente concentrada abaixo da mediana. Os grupos G1, G2 e G3 exibiram padrões intermediários, com densidades bimodais ou levemente assimétricas, indicando heterogeneidade individual dentro dos tratamentos.

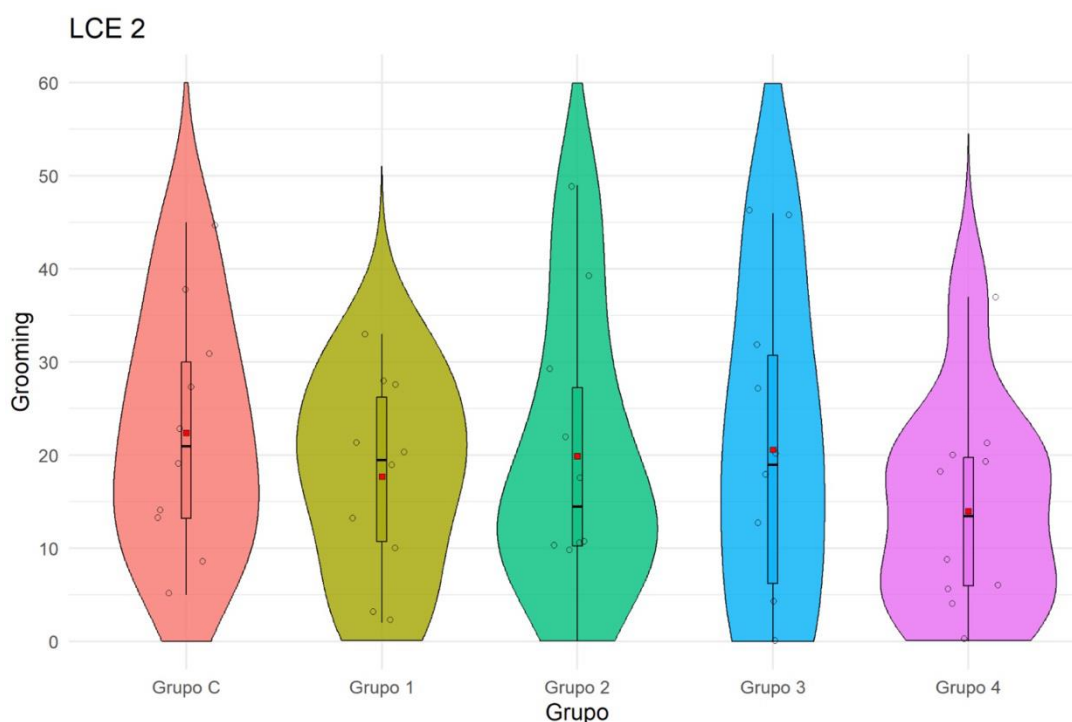


Figura 26 - Gráfico tipo *Violin plot*, representando a distribuição do número de episódios de *grooming* nos diferentes grupos durante o LCE2. Os pontos individuais representam os valores observados por animal; os *boxplots* indicam os quartis e a mediana, e o ponto vermelho representa a média de cada grupo.

9. Segundo Tempo de Contagem de Fezes

Na comparação entre grupos (Tabela 49 – ANEXO 1) (teste de Kruskal-Wallis, $p = 0.161$), não foram observadas diferenças estatisticamente significativas quanto ao número de fezes eliminadas. A média geral foi de 0,80 (DP = 1,21), com mediana de 0,00. O GC apresentou a maior média ($1,50 \pm 1,78$), seguido pelo G4 ($1,00 \pm 1,49$), enquanto o G2 (tratado com probiótico após a infecção) apresentou a menor média de defecações ($0,10 \pm 0,32$). Os demais grupos apresentaram valores intermediários: G1 ($0,90 \pm 0,88$) e G3 ($0,50 \pm 0,71$).

A análise *post-hoc* com ajuste de Tukey (Quadro 21 – ANEXO 1) revelou que nenhuma das comparações entre pares atingiu significância estatística ($p > 0.05$).

A Figura 27 a seguir ilustra esses dados. O GC exibiu a maior frequência de defecações, com mediana em torno de 2 e valores que atingiram até 6 episódios. Em contraste, o G1 apresentou redução no número de defecações, com distribuição menos dispersa.

De forma ainda mais pronunciada, o G2 apresentou os menores valores observados com predominância de indivíduos sem qualquer episódio de defecação durante o teste.

G3 e G4 também apresentaram número reduzido de defecações, com medianas em torno de 1 e menor variabilidade.

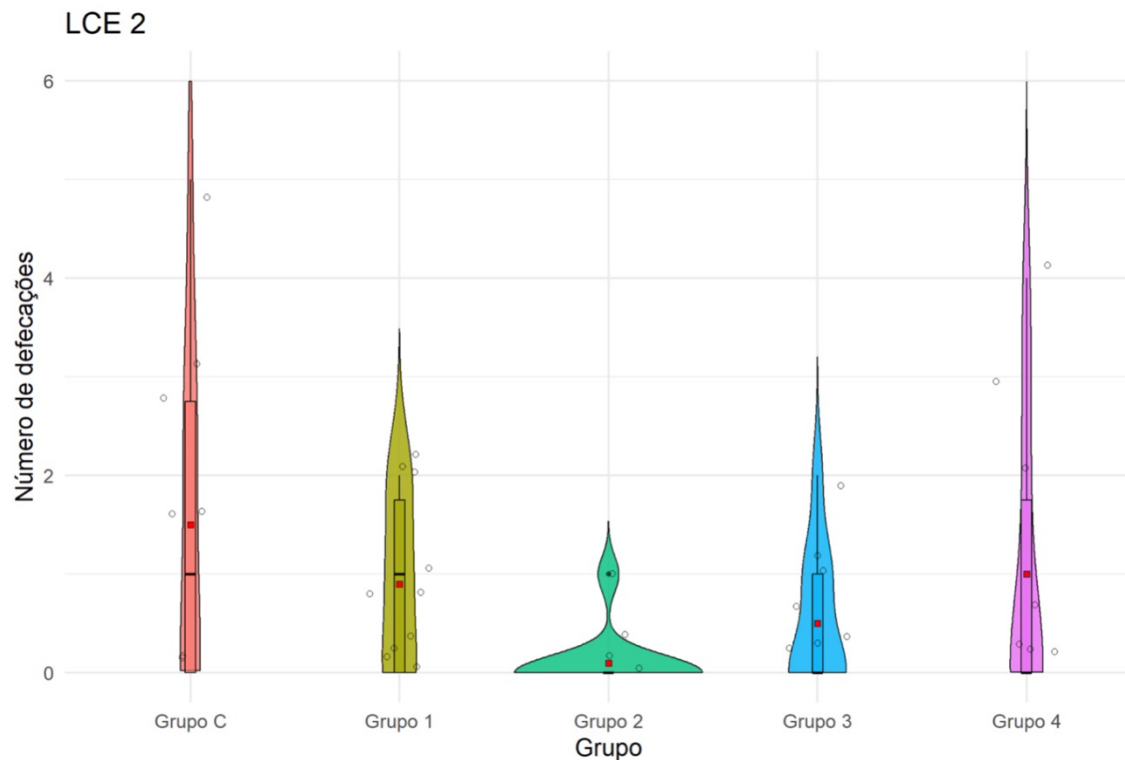


Figura 27 – Gráfico do tipo *Violin plot* ilustrando a distribuição do número de defecações por grupo experimental na sessão LCE2. Os pontos individuais representam os valores observados por animal; os *boxplots* indicam os quartis e a mediana, e o ponto vermelho representa a média de cada grupo.

II. Campo Aberto

1. Tempo de Centro (TC)

A estatística descritiva (Tabela 51 – ANEXO 1) revela que o grupo G1 apresentou o maior tempo médio no centro (33,10 s; DP = 36,65), seguido por G2 (26,20 s), G3 (21,40 s) e G4 (19,50 s), enquanto o grupo GC apresentou o menor tempo médio (10,60 s). A mediana do grupo G1 (24 s) foi substancialmente maior que a de GC (6,5 s).

A comparação entre grupos pelo teste de Kruskal-Wallis não indicou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p = 0,294$) (Tabela 51 – ANEXO 1).

A Figura 28 apresenta essa distribuição. O GC exibiu os menores tempos no centro, com valores concentrados abaixo de 25 segundos. Em contraste, o G1 apresentou mediana mais elevada e alta dispersão, incluindo valores extremos acima de 150 segundos. O G2 também apresentou tempo elevado no centro, com mediana superior à do controle. Já os G3 e G4 apresentaram valores intermediários, com medianas superiores às do controle.

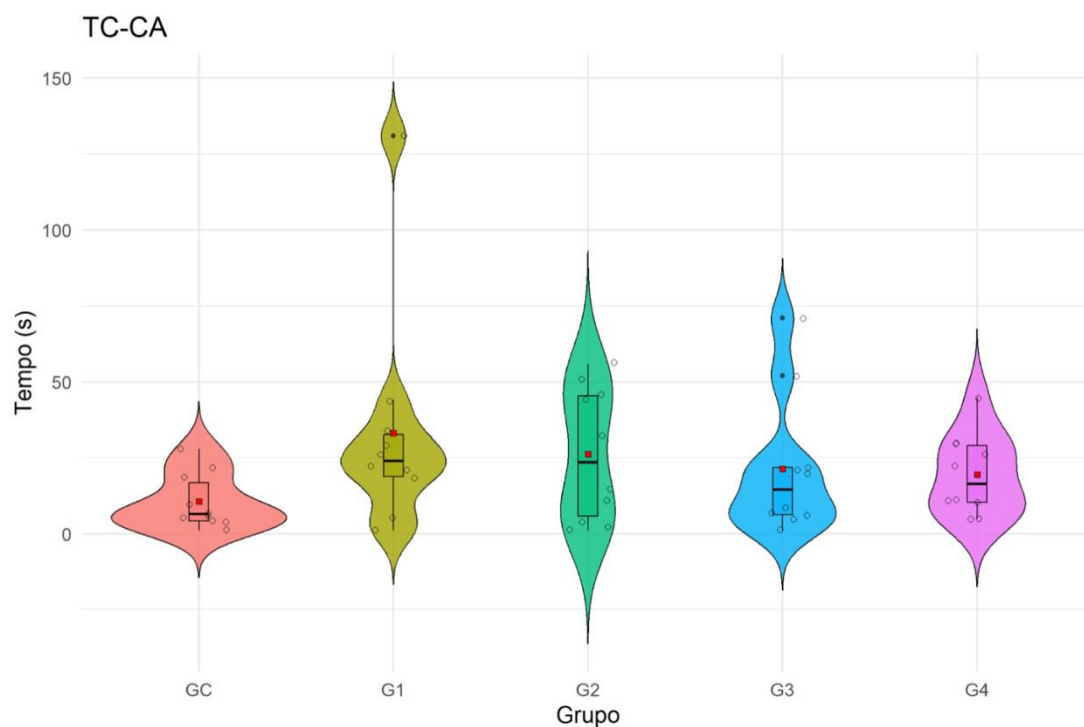


Figura 28 – Análise da variável TC no CA2. Gráfico tipo *Violin plot*, representando distribuição do TC (em segundos). Os pontos individuais

representam os valores observados por animal; os *boxplots* indicam os quartis e a mediana, e o ponto vermelho representa a média de cada grupo.

2. Tempo de periferia

Os dados descritivos (Tabela 53 – ANEXO 1) indicam que o GC apresentou o maior tempo médio na periferia (289,10 s; DP = 9,29), seguido pelos grupos G4 (279,70 s), G3 (277,10 s), G2 (270,80 s) e G1 (265,70 s). A mediana de GC (293,5 s) também foi a mais alta.

O teste de Kruskal-Wallis não revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos para a variável TP-CA ($p = 0,180$).

A Figura 29 a seguir apresenta a distribuição da variável. De modo geral, todos os grupos apresentaram medianas elevadas, acima de 260 segundos.

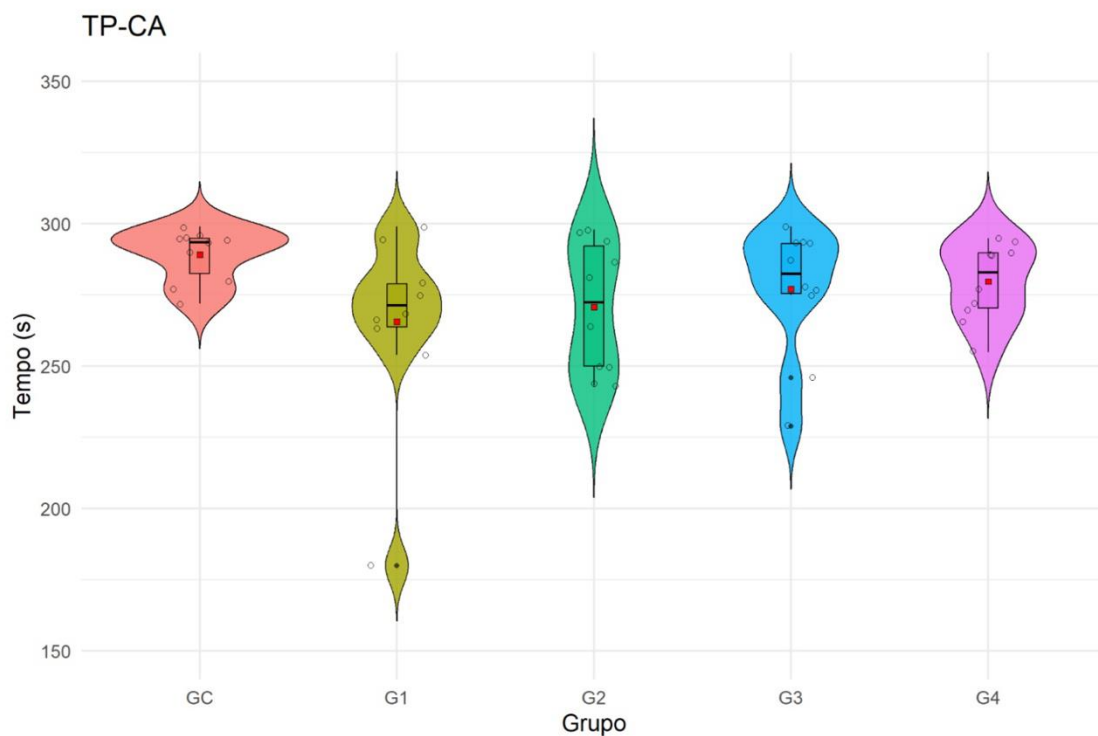


Figura 29 - Gráfico tipo *Violin plot*, representando a distribuição do tempo (em segundos) gasto na periferia da arena do CA entre os cinco grupos experimentais. Os pontos individuais representam os valores observados por animal; os *boxplots* indicam os quartis e a mediana, e o ponto vermelho representa a média de cada grupo.

3. Número de quadrantes

A análise descritiva (Tabela 55 – ANEXO 1) demonstrou que o grupo G1 apresentou o maior número médio de quadrantes cruzados (92,6; DP = 17,99), seguido por GC (82,2), G2 (80,0), G4 (65,1) e G3 (60,8). A mediana de G1 (97,5) também foi a mais elevada, e sua distribuição a mais concentrada.

O teste de Kruskal-Wallis apontou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,040$). Comparações múltiplas com correção

de Holm (Quadro 23 – ANEXO 1) revelaram diferença significativa apenas entre os grupos G1 e G4 ($p = 0,032$), sendo os demais contrastes não significativos.

A IRR (Tabela 56 – ANEXO 1) também foi calculada com GC como referência. Nenhuma comparação alcançou significância estatística ($p > 0,05$).

As comparações *post-hoc* realizadas para a variável número de quadrantes, com ajuste dos valores de p pelo método de Tukey, não revelaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais (Quadro 24 – ANEXO 1). No entanto, observou-se uma proximidade do limiar de significância ($p < 0,05$) na comparação entre o G1 e o G4 com $p = 0,0639$.

A Figura 30 a seguir ilustra esses achados. O GC apresentou os maiores valores de locomoção, com mediana acima de 100 quadrantes e ampla dispersão. O G1 mostrou leve redução na mediana e variabilidade moderada. Já o G2 apresentou valores levemente inferiores ao controle. Nos G3 e G4, observou-se maior redução no número de quadrantes, especialmente no G4, cuja mediana foi a menor entre todos os grupos, com valores concentrados entre 40 e 80 quadrantes.

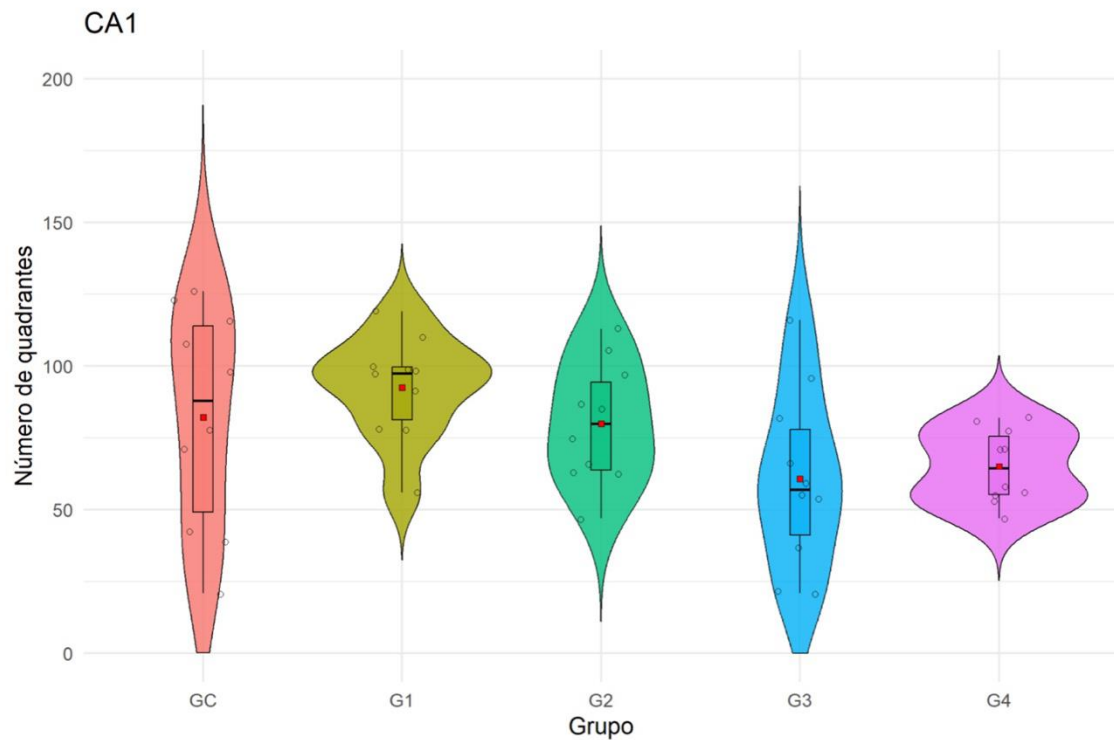


Figura 30 – Número de quadrantes cruzados no campo aberto. Gráfico tipo *Violin plot* ilustrando a distribuição do número total de quadrantes cruzados por roedores nos cinco grupos experimentais. Os pontos individuais representam os valores observados por animal; os *boxplots* indicam os quartis e a mediana, e o ponto vermelho representa a média de cada grupo.

4. *Rearing*

A média de *rearings* foi mais elevada no grupo G1 (23,20; DP = 10,37), infectado por *T. gondii* e tratado com placebo, com mediana de 20,5. Esse valor contrasta com os demais grupos: GC (11,90), G2 (10,60), G3 (10,90)

e G4 (12,80). A amplitude de variação em G1 (8 a 42 *rearing*s) também foi substancialmente maior que nos demais grupos.

Testes de Wilcoxon com correção de Holm (Quadro 45 – ANEXO 1) revelaram tendência de diferença entre G1 e GC ($p = 0,070$), G1 e G2 ($p = 0,058$), e G1 e G3 ($p = 0,057$), todas próximas ao limiar de significância. Essas comparações foram reforçadas pela análise de contraste com ajuste de Tukey, na qual os contrastes G1/G2 ($p = 0,0020$), G1/G3 ($p = 0,0031$) e G1/G4 ($p = 0,0340$) apresentaram significância estatística, bem como o contraste GC/G1 ($p = 0,0122$) (Quadro 26 – ANEXO 1).

A Figura 31 a seguir ilustra esses achados. Observa-se que o G1 apresentou os maiores valores de *rearing*, com mediana e dispersão claramente superiores às dos demais grupos. Em contraste, os G2, G3 e G4, exibiram reduções marcantes na frequência de *rearing*, com medianas semelhantes às do GC e menor variabilidade.

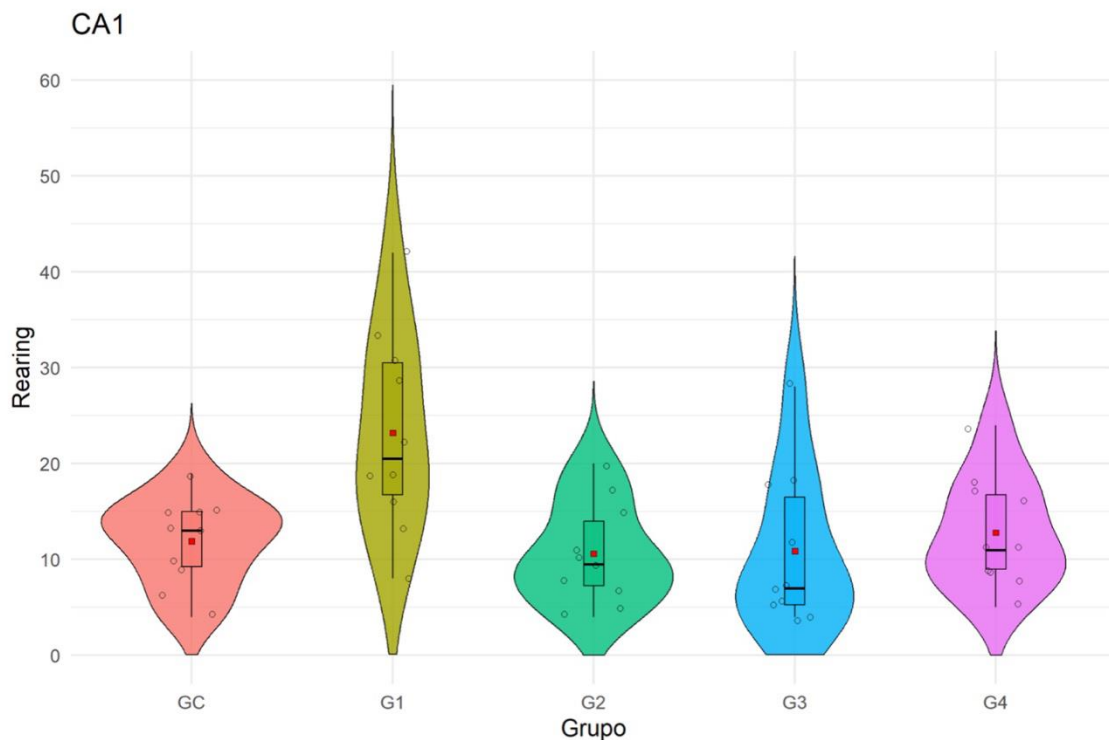


Figura 31 – Frequência de *rearings* no campo aberto. Gráfico tipo *Violin plot* demonstra a distribuição do número de *rearings* entre os cinco grupos experimentais. Os pontos individuais representam os valores observados por animal; os *boxplots* indicam os quartis e a mediana, e o ponto vermelho representa a média de cada grupo.

5 - Grooming

O teste de normalidade de Shapiro-Wilk (Tabela 59 – ANEXO 1) revelou que os grupos GC e G4 apresentaram distribuição não normal ($p = 0,0412$ e $p = 0,0005$, respectivamente), ao passo que os demais grupos (G1, G2 e G3) exibiram distribuição compatível com a normalidade ($p > 0,05$). Com base na heterogeneidade da distribuição, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, que não indicou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p = 0,155$) (Tabela 60 – ANEXO 1).

A análise descritiva (Tabela 60 – ANEXO 1) demonstra que o grupo G4 apresentou a maior média de *grooming* (32,70; DP = 37,18), com valores máximos bastante elevados (até 132 episódios), seguido de GC (26,20) e G2 (26,20). Em contraste, os grupos G1 e G3 exibiram médias inferiores (15,10 e 16,10, respectivamente), com distribuições mais compactas e amplitude reduzida.

A mediana de *grooming* foi mais alta no grupo G2 (26,0). Já a mediana mais baixa foi observada em G1 (13,0).

A Figura 32 a seguir mostra a distribuição da variável *grooming*. O G1 apresentou os menores valores de *grooming*. Em contraste, os grupos G2, G3 e G4, tratados com probiótico, exibiram medianas mais elevadas, com destaque para o G4, que apresentou ampla dispersão e valores extremos.

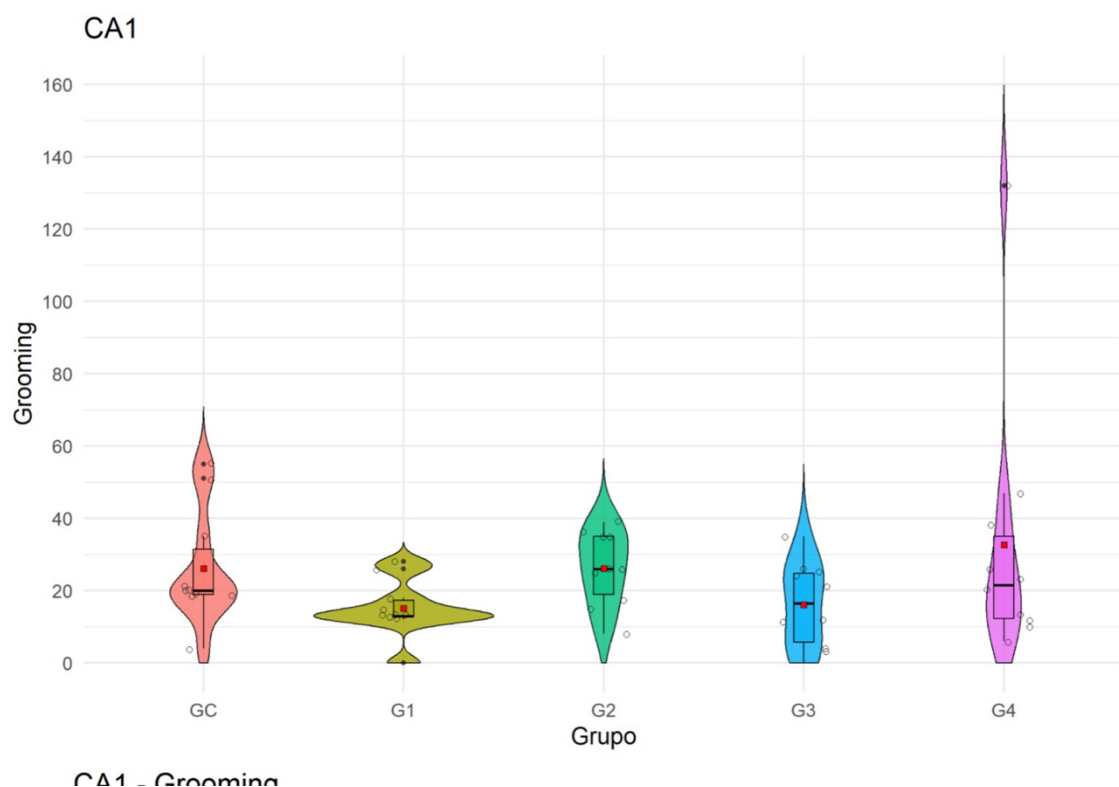


Figura 32 – Frequência de *grooming* no teste do campo aberto. Gráfico tipo *Violin plot* demonstrando a distribuição da frequência de *grooming* entre os grupos. Os pontos individuais representam os valores observados por animal; os *boxplots* indicam os quartis e a mediana, e o ponto vermelho representa a média de cada grupo.

6 - Segundo Tempo de Centro

O teste de Kruskal-Wallis revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais ($p = 0,008$).

A análise descritiva (Tabela 62 – ANEXO 1) demonstrou um padrão expressivo de variação entre os grupos. O G3 apresentou a maior média de tempo no centro (13,22 s; DP = 22,00) e amplitude máxima elevada (65 s), acompanhado de mediana de 3,0 s. Em seguida, os grupos G4 (6,30 s) e G2 (5,90 s) também apresentaram tempos relativamente superiores, enquanto G1 (3,60 s) e GC (1,56 s) apresentaram os menores tempos médios e medianas baixas (1,0 e 3,0 s, respectivamente).

Foram realizadas então comparações múltiplas *post-hoc* com o teste de Wilcoxon (Quadro 27 – ANEXO 1), corrigido pelo método de Holm, e que indicaram diferenças estatisticamente significativas entre GC e G2 ($p = 0,013$) e entre GC e G3 ($p = 0,041$).

A Figura 31 a seguir ilustra esses dados. De modo geral, todos os grupos apresentaram medianas baixas. No entanto, o G3 destacou-se por uma maior dispersão dos dados e presença de valores extremos, incluindo um animal com tempo substancialmente elevado. Os demais grupos, incluindo o

controle, apresentaram distribuições mais compactas, com valores medianos inferiores a 5 segundos.

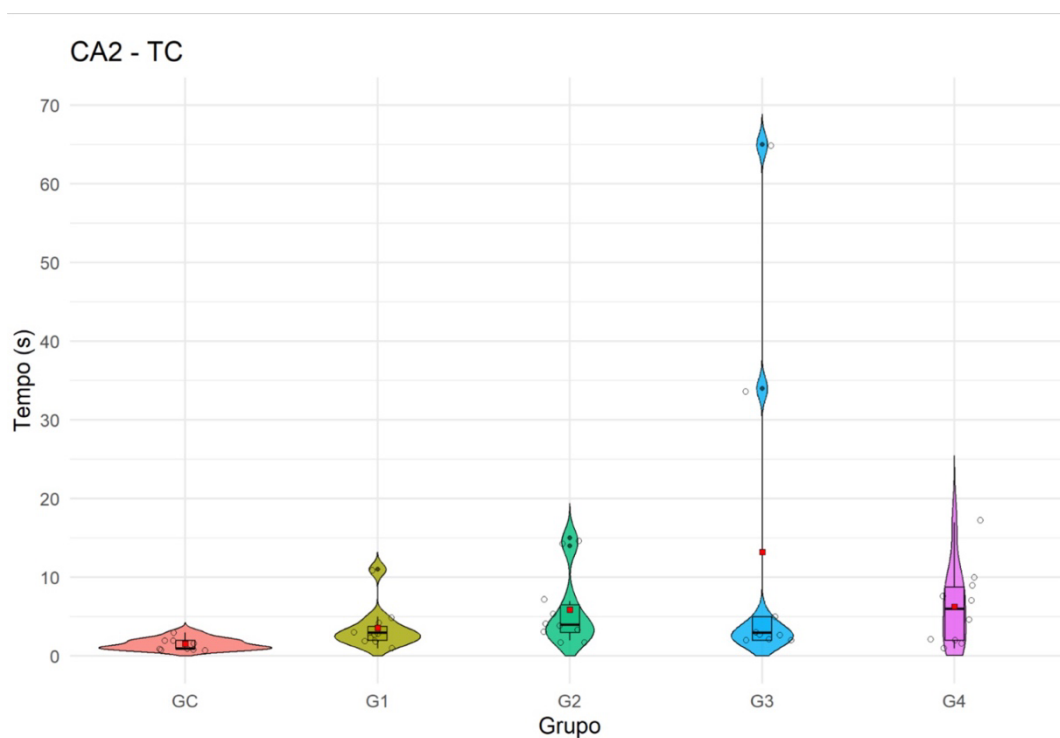


Figura 31 – TC no CA2 entre grupos experimentais.

Gráfico tipo *Violin plot* representa a distribuição do tempo (em segundos) em que os animais de cada grupo permaneceram no centro do CA2. Os pontos individuais representam os valores observados por animal; os *boxplots* indicam os quartis e a mediana, e o ponto vermelho representa a média de cada grupo.

7. Segundo Tempo de Periferia

O teste de Kruskal-Wallis (Tabela 64 – ANEXO 1) aplicado ao tempo na periferia não revelou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p = 0,353$). O grupo GC (placebo) apresentou o maior tempo médio na periferia (292,60 s), seguido por G1 (287,70 s), G2 (286,60 s), G4 (283,40 s) e

G3 (264,90 s). O G3 apresentou não apenas a menor média, mas também a maior dispersão dos dados (DP = 52,5 s). As medianas confirmam esse padrão, variando de 294,5 s (G3) a 286 s (G4), com todos os grupos mantendo tempos medianos elevados.

A Figura 32 a seguir ilustra esses achados. Observa-se que todos os grupos mantiveram medianas elevadas, próximas a 300 segundos. O G3 demonstrou maior variabilidade individual, com alguns animais exibindo tempos reduzidos.

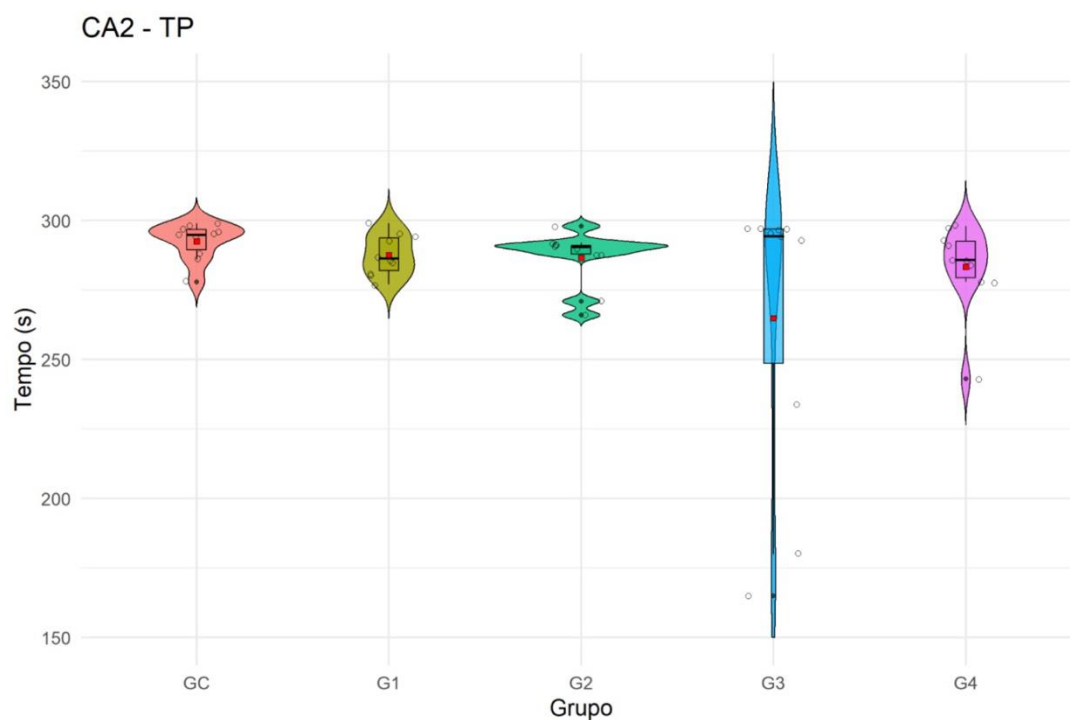


Figura 32 – Tempo de permanência na periferia da arena (CA2) entre os grupos experimentais. Gráfico *tipo Violin plot* representa a distribuição

do TP (em segundos) no CA2. Os pontos individuais representam os valores observados por animal; os *boxplots* indicam os quartis e a mediana, e o ponto vermelho representa a média de cada grupo.

8 – Segunda avaliação do número de quadrantes

A análise descritiva dos dados revelou variações substanciais na média de quadrantes atravessados entre os grupos (Tabela 66 – Anexo 1). O grupo G1 apresentou a maior média de locomoção ($M = 89,60$; $DP = 36,69$), seguido pelos grupos G2 e G4, com médias de 72,90 e 69,30, respectivamente. O grupo-controle (GC) exibiu menor média ($M = 61,30$; $DP = 29,19$). A mediana foi levemente superior à média em G1, G2 e G4, sugerindo assimetria à esquerda nos dados desses grupos. No entanto, o teste de Kruskal-Wallis (Tabela 66 – Anexo 1) não identificou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($H = 3.20$; $p = 0.563$), o que foi corroborado pela análise de razão de taxa de incidência (IRR), (Tabela 67 - ANEXO 1) que não detectou diferenças significativas quando os grupos experimentais foram comparados ao grupo-controle (todos os valores de $p > 0.05$).

As comparações múltiplas entre os pares de grupos, com correção de Tukey (Quadro 29 - ANEXO), confirmaram a ausência de significância estatística nas diferenças observadas, com valores de p variando entre 0.4263 e 0.999.

A Figura 33 apresenta a distribuição dessa variável. Observa-se que todos os grupos mantiveram níveis elevados de locomoção, com medianas

próximas ou superiores a 80 quadrantes. O G1 exibiu a maior mediana e ampla dispersão, enquanto o G4 apresentou valores mais concentrados.

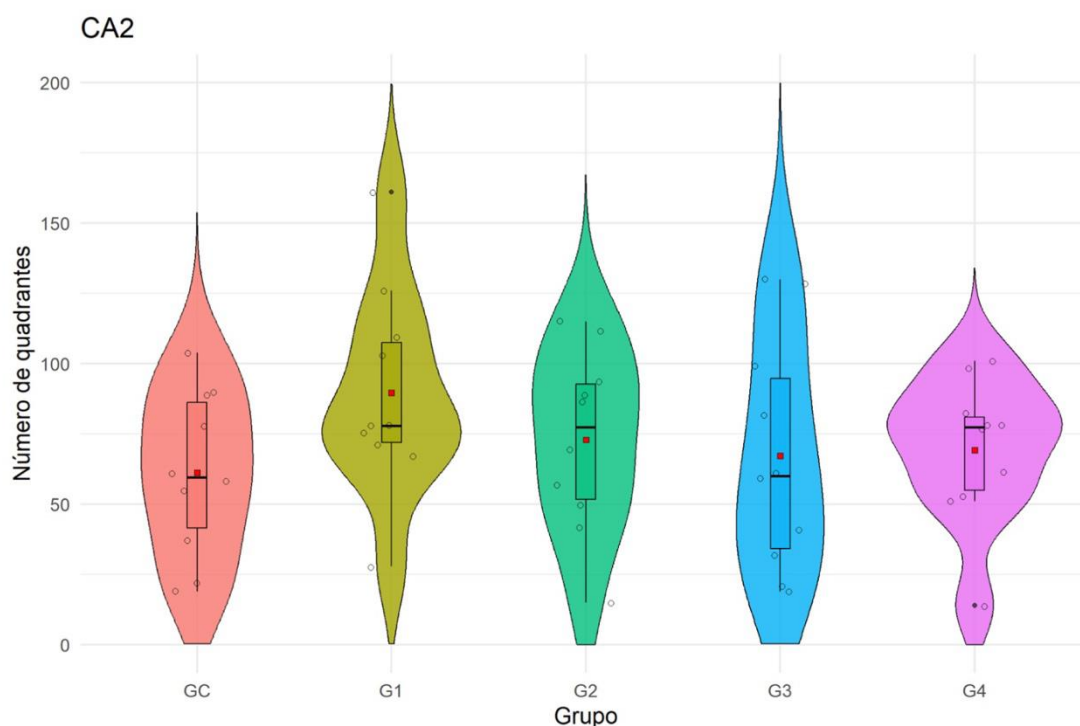


Figura 33. Gráfico tipo *Violin plot* representa a distribuição da variável "número de quadrantes" no teste do campo aberto (CA2), segundo os grupos experimentais. Os pontos individuais representam os valores observados por animal; os *boxplots* indicam os quartis e a mediana, e o ponto vermelho representa a média de cada grupo.

A estatística descritiva revelou que o grupo G1 apresentou o maior número médio de *rearings* ($14,0 \pm 7,48$), seguido por G2 ($8,0 \pm 4,94$), G3 ($7,2 \pm 7,38$) e G4 ($6,7 \pm 3,92$). O grupo-controle (GC) apresentou o menor número médio de *rearings* ($5,5 \pm 3,44$). A análise por regressão de Poisson com ajuste binomial negativo revelou que o grupo G1 apresentou uma razão de taxa de

incidência (IRR = 2,545; IC95%: 1,423–4,572; $p = 0,002$) significativamente superior ao grupo-controle.

Comparações múltiplas entre grupos com ajuste de Tukey (Quadro 39- ANEXO) evidenciaram diferença significativa entre GC e G1 ($p = 0,0143$), reforçando o impacto da infecção por *T. gondii* sobre o aumento da atividade exploratória. Nenhuma outra comparação par a par atingiu significância estatística.

A Figura 34 a seguir ilustra esses achados. O gráfico revela que o grupo G1 apresentou maior dispersão e média elevada de *rearing*, com distribuição assimétrica e tendência a valores altos.

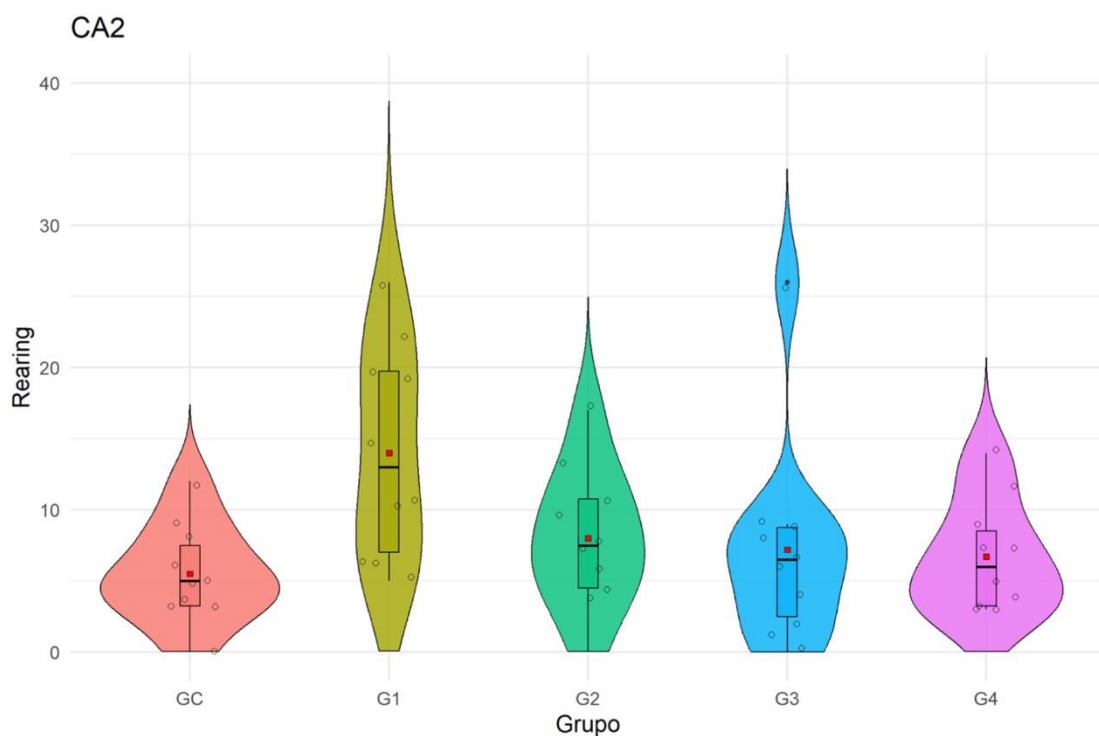


Figura 34 – Frequencia de *rearing* no CA2. Gráfico tipo *Violin plot* representa a distribuição dos valores individuais da variável *rearing* no CA2. Os pontos individuais representam os valores observados por animal; os

boxplots indicam os quartis e a mediana, e o ponto vermelho representa a média de cada grupo.

10 - Segundo Tempo da Variável *Grooming*

A análise descritiva (Tabela 72 – ANEXO 1) demonstrou que o G apresentou média mais elevada de *grooming* ($M = 24,4 \pm 23,24$) em comparação com os demais grupos. Por outro lado, o grupo G2 apresentou a menor média de *grooming* ($M = 15,5 \pm 13,20$). As medianas confirmam esse padrão, com o GC tendo 17,5 episódios e o G2, apenas 12. Embora o grupo G4 tenha exibido média elevada ($M = 24,5 \pm 9,16$), a dispersão dos dados nesse grupo foi menor, como evidenciado pelo desvio-padrão. O teste de Kruskal-Wallis não identificou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p = 0,383$), o que também foi corroborado pelos resultados do modelo de regressão binomial negativa (Tabela 73 – ANEXO 1), que não revelou diferenças relevantes nas razões de taxa de incidência (IRR), com todos os intervalos de confiança cruzando a unidade e valores de $p > 0,05$. Comparações par a par com correção de Tukey (Quadro 31 – ANEXO 1) também não evidenciaram contrastes significativos.

A Figura 35 a seguir oferece um panorama visual da distribuição dos dados por grupo. Observa-se que o GC apresentou maior amplitude de valores, com uma cauda superior que se estende até aproximadamente 80 episódios de *grooming*, indicando possível presença de *outliers* e alta variabilidade. Já os grupos G2 e G3 mostraram distribuições mais concentradas e achatadas, sugerindo menor expressão do comportamento. O grupo G4, por

sua vez, evidenciou dois modos na distribuição, sugerindo heterogeneidade intragrupo.

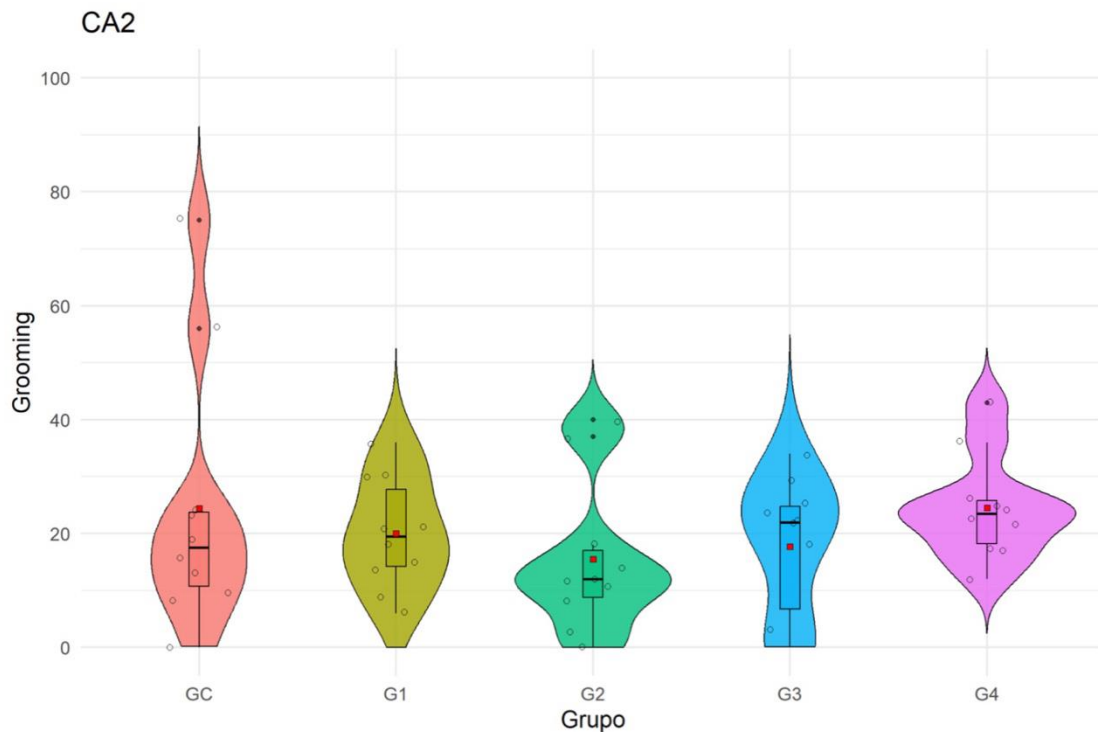


Figura 35 – Frequência de *Grooming* no CA2. Gráfico do tipo *Violin plot* representa a distribuição do número de episódios de *grooming* por grupo experimental no teste do campo aberto (CA2). Os pontos individuais representam os valores observados por animal; os *boxplots* indicam os quartis e a mediana, e o ponto vermelho representa a média de cada grupo.

III - Labirinto de Barnes

Verificou-se o desempenho de diferentes grupos experimentais ao longo dos dias de treinamento (Dia 1 a Dia 4) e nos testes finais sem e com estímulo de urina de predador (urina de gato).

1. Tempo de achar

As análises descritivas do tempo necessário para que os animais encontrassem a saída no LB demonstram uma ampla variabilidade nos tempos de latência entre os animais, com medianas que variaram de 22,5 até 300 segundos, refletindo diferentes níveis de desempenho e estratégias de busca ao longo do experimento (Quadro 32– ANEXO 1).

Para a análise estatística utilizou-se um modelo linear misto (Quadro 33 – ANEXO 1), também denominado modelo de efeitos mistos lineares.

Para a análise, dois modelos foram ajustados e comparados:

- Modelo 0 (fit0): inclui os efeitos fixos principais de condição (referente ao tempo: dias de teste e testes finais) e de grupo (categorias experimentais), além de um intercepto aleatório por animal ($1 | id_animal$), permitindo captar as variações individuais com base no desempenho.
- Modelo 1 (fit1): inclui os mesmos efeitos do modelo anterior, acrescidos da interação entre condição e grupo, possibilitando avaliar se a evolução do tempo de entrada ao longo do experimento difere entre os grupos.

A comparação entre os modelos revelou que a inclusão da interação entre condição e grupo (modelo 1) proporcionou uma melhora significativa no ajuste dos dados ($\chi^2 = 37,73$; gl = 20; $p = 0,0096$). Esse achado indica que o efeito da variável condição (tempo) sobre o desempenho — medido pelo tempo necessário para encontrar a saída — diferiu entre os grupos,

evidenciando padrões distintos de resposta ao longo do tempo entre os diferentes grupos experimentais (Quadro 33).

Ao comparar os grupos ao longo dos dias de teste, observa-se que os grupos experimentais tendem a apresentar reduções progressivas na latência média, em especial nos dias finais, em contraste com o grupo-controle, cujo desempenho permaneceu mais irregular. Essa tendência intensifica-se nos testes finais, nos quais os grupos que receberam intervenção comportam-se, em sua maioria, com tempos medianos menores do que os controles, tanto na presença quanto na ausência de urina de predador. Esses dados ficam ilustrados na figura 36:

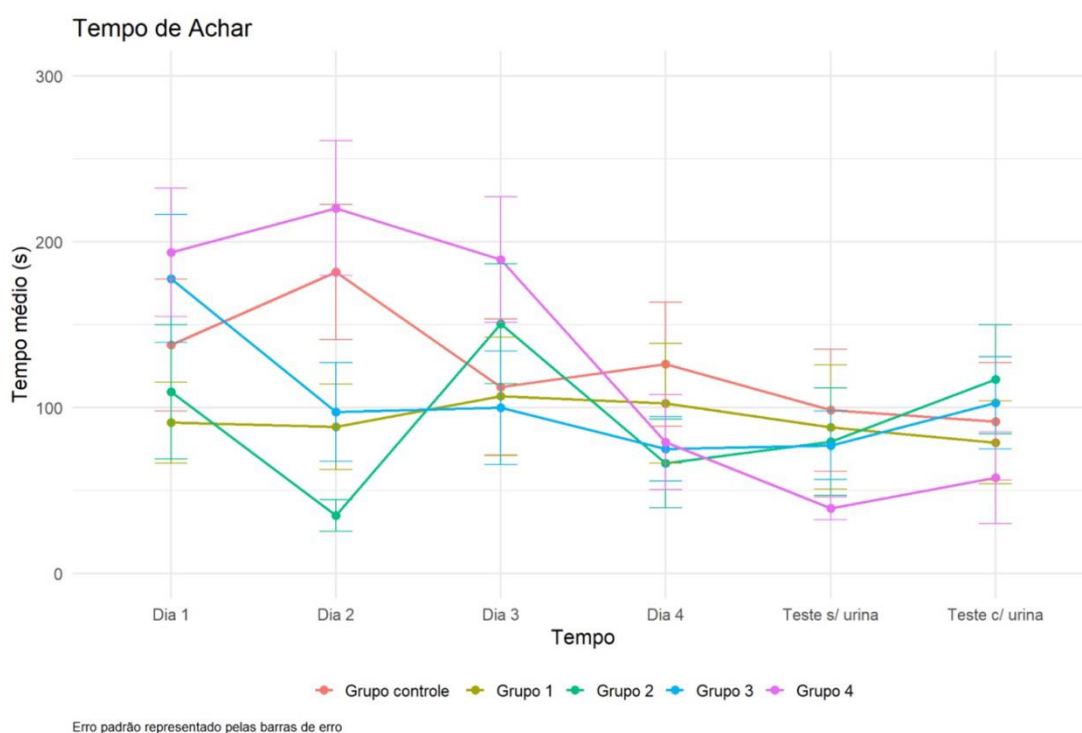


Figura 36 – Análise da variável “tempo de achar” no Labirinto de Barnes 1 (LB1).

O gráfico apresenta a média do tempo (em segundos) necessário para que os animais encontrassem a caixa de fuga no Labirinto de Barnes, comparando cinco grupos experimentais: GC (vermelho), G1 (oliva), G2 (verde), G3 (azul) e G4 (roxo). O desempenho foi avaliado ao longo de quatro dias consecutivos de treino e em dois testes finais: um sem e outro com exposição a estímulo olfativo aversivo (urina de predador). As barras verticais representam o erro padrão da média ($\pm EP$).

A análise das médias ajustadas (*Emmeans*) obtidas a partir do modelo estatístico (Quadro 34 – ANEXO 1) revela diferenças relevantes entre os grupos ao longo das distintas fases do experimento. As médias foram calculadas para cada grupo em cada condição experimental (dias de treino e testes finais), permitindo uma comparação padronizada entre os desempenhos.

No Dia 1, observou-se que o G4 apresentou a maior média de tempo para encontrar a caixa de fuga (193,6 segundos). Em contraste, o G1 obteve o menor tempo médio (91,0 segundos).

No Dia 2, essa tendência se manteve, com o G4 novamente exibindo a maior média (220,3 segundos), enquanto o G2 demonstrou uma queda acentuada, atingindo a menor média registrada até então (34,9 segundos).

Entre os Dias 3 e 4, observou-se uma tendência de redução progressiva nas médias da maioria dos grupos, compatível com o processo de aprendizagem da tarefa. No entanto, o G4 manteve valores relativamente altos até o Dia 3.

Nos testes finais, realizados com e sem exposição à urina de predador, destaca-se que o G4 apresentou a menor média de tempo no teste sem urina (39,4 segundos).

Em conjunto, esses achados ilustram como as médias ajustadas contribuem para identificar padrões específicos de desempenho ao longo do experimento e evidenciam diferenças relevantes entre os grupos quanto à velocidade e consistência na aquisição da tarefa espacial.

A análise inferencial entre os grupos experimentais foi conduzida por meio de comparações múltiplas com correção de Tukey, a fim de identificar diferenças estatisticamente significativas nos tempos médios de latência para encontrar a caixa de fuga em cada fase do experimento (Quadro 35 – ANEXOS 1).

No Dia 1, nenhuma das comparações entre os grupos resultou em diferença estatisticamente significativa, com todos os valores de p superiores a 0,05 após o ajuste. A maior diferença observada ocorreu entre o G1 e o G4, com uma diferença de -102,6 segundos ($p = 0,1362$), ainda assim sem alcançar significância estatística.

No Dia 2, por outro lado, diversas comparações revelaram diferenças estatisticamente significativas:

- O GC apresentou desempenho significativamente inferior ao G2, com uma diferença de 146,8 segundos ($p = 0,0083$).
- O G1 diferiu significativamente do G4, com menor tempo de latência (-131,9 segundos; $p = 0,0240$).

- A diferença entre o G2 e o G4 foi altamente significativa (-185,4 segundos; $p = 0,0003$), sendo esta a comparação mais robusta.
- O G3 também apresentou desempenho significativamente melhor que o G4, com diferença de -122,9 segundos ($p = 0,0432$).

No Dia 3, apesar de algumas diferenças numéricas expressivas — como entre o GC e o G4 (diferença de -76,9 segundos) —, nenhuma comparação atingiu significância estatística ($p > 0,05$).

Da mesma forma, nas fases subsequentes (Dia 4, Dia 5 com teste sem urina e teste com urina), não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em nenhuma das comparações realizadas.

1. Tempo de entrar

O gráfico a seguir ilustra as estatísticas descritivas da variável "tempo de entrar", analisada em cada grupo experimental ao longo dos quatro dias de avaliação e nos testes finais realizados com e sem exposição à urina de predador.

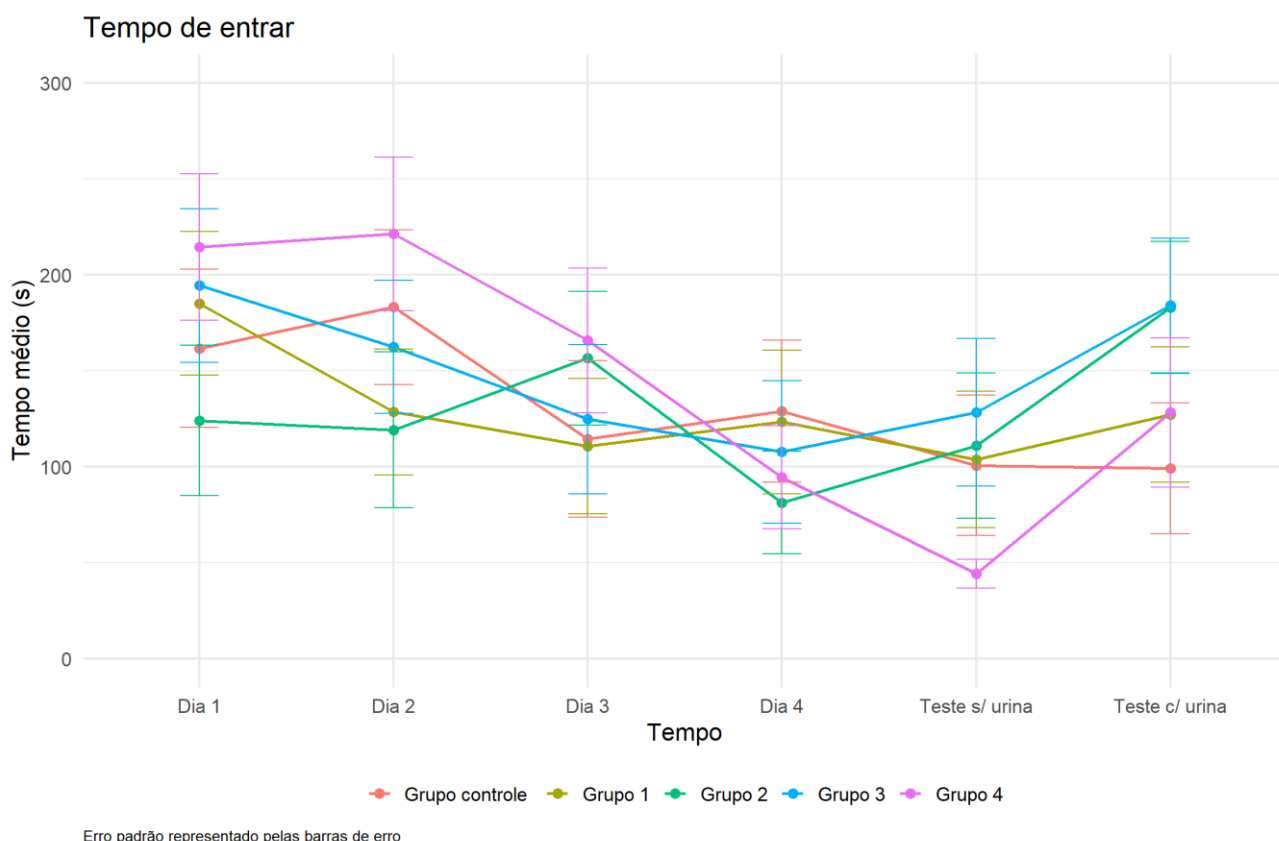


Figura 37 - Ilustra o tempo médio (em segundos) para entrar na caixa de fuga ao longo dos quatro dias de teste e nos testes finais com e sem exposição à urina de predador, estratificado por grupo experimental (GC, G1, G2, G3 e G4). As barras verticais correspondem ao erro padrão da média ($\pm EP$), oferecendo uma estimativa da variabilidade das respostas dentro de cada grupo e condição.

De maneira geral, o G4 apresentou os maiores tempos médios de entrada nos estágios iniciais do experimento (Quadro 36 – ANEXO 1), especialmente nos Dias 1 e 2. No entanto, esse padrão inverte-se de forma acentuada no teste final sem exposição à urina de predador, quando o grupo registra o menor tempo médio de entrada entre todos os grupos. O traçado,

contudo, inverte-se no teste com urina, quando a latência do tempo de entrar aumenta.

O G3, por sua vez, destacou-se por apresentar um pico de latência no teste com urina. Em contraste, os grupos GC e G1 exibiram padrões de desempenho bastante semelhantes, com uma redução gradual dos tempos médios ao longo dos dias de teste e pouca variação nos testes finais, independentemente da presença ou ausência da urina.

Nos testes finais, sem e com urina, as respostas dos grupos foram divergentes: alguns apresentaram aumento na latência (como os grupos G2, G3 e G4 no teste com urina), enquanto outros como os grupos GC e G1 se mostraram praticamente indiferentes ao estímulo aversivo.

A comparação entre os modelos com e sem a interação entre condição (tempo) e grupo experimental (Quadro 37 – ANEXO 1) demonstrou que a inclusão dessa interação no modelo mais complexo (modelo 1) não resultou em uma melhora estatisticamente significativa no ajuste dos dados, quando comparado ao modelo mais simples (modelo 0). O teste de razão de verossimilhança utilizado para essa comparação indicou um valor de p não significativo ($\chi^2 = 20,98$; $gl = 20$; $p = 0,3983$).

Esse resultado sugere que, embora variações visuais possam ser observadas entre os grupos ao longo do tempo, não há evidência estatística robusta de que os grupos tenham apresentado padrões de mudança distintos entre si.

Além da comparação entre modelos, foi conduzida uma análise de comparações múltiplas entre os grupos experimentais, com os resultados ajustados pelo método de Tukey para controle do erro tipo I em múltiplas comparações (Quadro 38 – ANEXO 1). Essas análises consideraram a média dos efeitos ao longo de todas as condições experimentais (dias de teste e testes finais), com o objetivo de verificar se havia diferenças significativas no tempo médio de entrada entre os grupos, independentemente do momento da avaliação, o que reforça o resultado anterior.

2. Erros Antes

Na análise descritiva (Quadro 39 – ANEXO 1), verifica-se que no GC, os escores de “erros antes” mantêm-se relativamente baixos e estáveis ao longo das avaliações. As médias variam entre 5,4 e 8,5, com o valor mais alto observado no Dia 2 e o mais baixo no Dia 3. A variabilidade entre os animais foi mais acentuada nos dois primeiros dias (com desvios-padrão de 7,15 e 6,74, respectivamente), diminuindo nos dias subsequentes.

O G1 apresentou, de forma geral, médias mais elevadas em comparação ao GC, principalmente entre os Dias 1 e 4, com valores médios entre 9,6 e 11,7. Os desvios-padrão mais altos indicam maior heterogeneidade entre os indivíduos desse grupo ao longo da tarefa.

No G2, os dados revelam um padrão bastante oscilante. A menor média de todo o conjunto foi registrada neste grupo no Dia 2 (3,7), enquanto no Dia 3 observou-se uma elevação expressiva, com média de 9,8. Durante os testes finais, o teste com urina resultou em uma média de 9,3,

compatível com os dias de avaliação de maior erro, enquanto o teste sem urina apresentou média mais próxima ao GC (7,4).

O G3 apresentou médias de erro mais próximas às do GC, oscilando entre 6,0 e 8,5. O valor mais baixo foi observado no teste sem urina, enquanto o mais alto ocorreu no teste com urina.

Por fim, o G4 iniciou o experimento com médias elevadas de erro, como no Dia 1 (10,3) e especialmente no Dia 3 (11,7). Entretanto, houve uma redução progressiva nos escores até o Dia 4 e nos testes finais. A variabilidade também foi mais acentuada nos primeiros dias (ex.: desvio-padrão de 7,8 no Dia 2), mas caiu nos testes finais, indicando uma tendência à maior homogeneidade de resposta. O teste sem urina apresentou a menor média de erro desse grupo (4,8), o que reflete adequada aquisição de memória espacial.

Os dados estão expostos no gráfico a seguir:

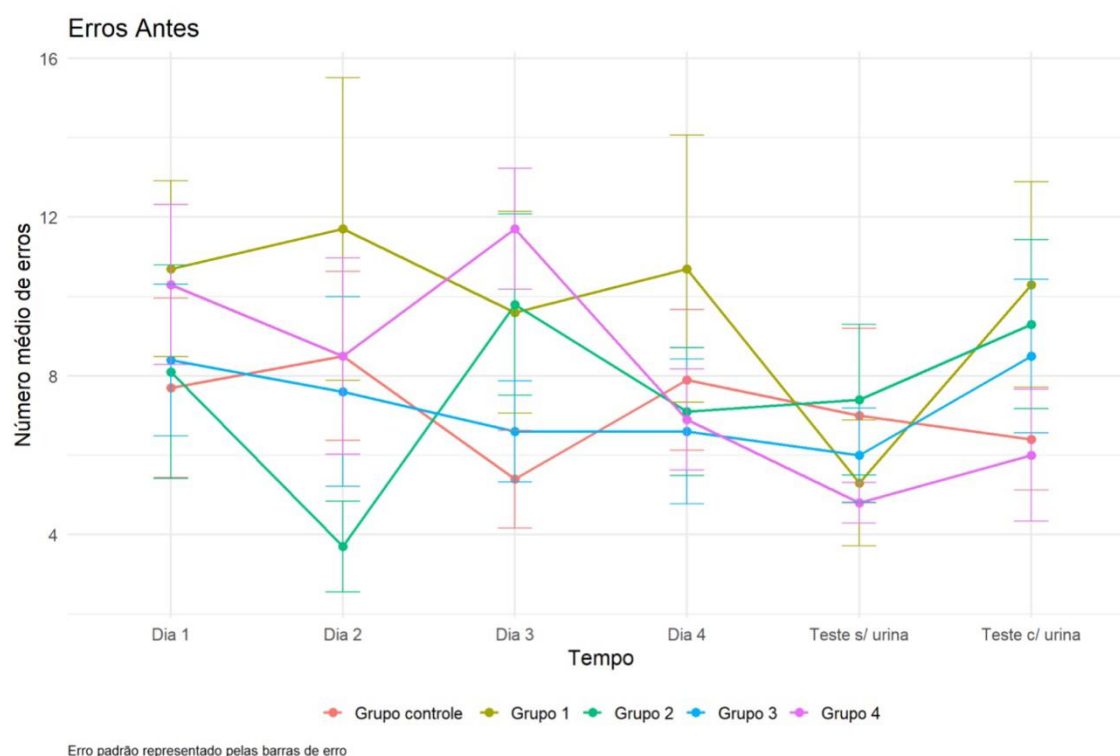


Figura 38 - Número médio de erros cometidos antes de encontrar a saída no LB1. O gráfico apresenta os valores médios da variável "erros antes" ao longo dos quatro dias de teste e nos testes finais realizados com e sem exposição à urina de predador, organizados por grupo experimental (GC, G1, G2, G3 e G4). As barras verticais correspondem ao erro-padrão da média, indicando o grau de variabilidade das observações dentro de cada grupo e condição.

A comparação modelos mistos para essa variável foi realizada por meio de uma análise de variância (ANOVA) baseada na razão de verossimilhança. O resultado ($p = 0,445$) indica que o modelo com interação (fit1) não apresentou melhoria significativa em relação ao modelo mais simples (fit0). Em outras palavras, não foi identificada evidência estatística de que os grupos

tenham se comportado de maneira diferencial ao longo das condições experimentais no que se refere ao número de erros cometidos antes da entrada (Quadro 40 – ANEXO 1).

Para avaliar o número de erros cometidos antes de os animais localizarem a saída no Labirinto de Barnes, ajustou-se um modelo de regressão binomial negativa com função de ligação logarítmica, considerando como variáveis preditoras os efeitos fixos de condição (diferentes dias de teste e fases finais) e grupo experimental, além de um intercepto aleatório para cada animal, a fim de modelar a variabilidade intraindividual (fórmula: Erros antes ~ condicao + grupo + (1 | id_animal)) (Quadro 41 – ANEXO 1).

A estimativa do parâmetro de dispersão ($\phi = 1,78$) indicou a presença de sobredispersão – condição em que a variância excede a média –, justificando a escolha de uma modelagem mais flexível do que o modelo de Poisson tradicional.

O intercepto estimado ($\beta_0 = 2,09$; $p < 0,001$) representa o logaritmo da média esperada de erros para o grupo de referência (GC, Dia 1). Entre os efeitos de condição, apenas a fase “Teste sem urina” apresentou uma redução significativa no número de erros em comparação à condição de referência (coeficiente = $-0,35$; $p = 0,038$), o que representa uma queda aproximada de 30% no número médio de erros ($\exp(-0,35) \approx 0,70$).

Em relação aos grupos experimentais, nenhum apresentou diferenças estatisticamente significativas quando comparado ao GC. Contudo, o

G1 demonstrou um valor de p próximo ao limiar de significância estatística ($p = 0,087$), com um coeficiente positivo ($\beta = 0,26$).

Os efeitos marginais estimados para cada condição temporal do experimento, calculados a partir do modelo ajustado, indicaram uma redução progressiva e discreta no número médio de erros ao longo dos dias, culminando em uma diminuição mais acentuada na fase “Teste sem urina”. Nessa condição, a média estimada foi de 6,18 erros (IC95%: 4,75 – 8,04), inferior à observada no Dia 1 (8,78; IC95%: 6,80 – 11,32), o que reforça os achados de melhoria estatisticamente significativa nessa fase. As demais fases não apresentaram diferenças relevantes entre si, mantendo médias entre 7,5 e 8,5 erros (Quadro 42 – ANEXO 1).

A análise de contrastes pareados entre as diferentes condições experimentais, com ajuste pelo método de Tukey, foi realizada para avaliar a existência de diferenças estatisticamente significativas no número médio de erros entre as fases do experimento. Os resultados são apresentados como razões de médias (*ratios*), que indicam quantas vezes uma condição apresentou, em média, mais (ou menos) erros do que outra.

Nenhum dos contrastes apresentou significância estatística após o ajuste de Tukey (todos os valores de $p > 0,05$), indicando ausência de diferenças estatisticamente significativas entre pares de condições (Quadro 43 – ANEXO 1).

A maior razão observada foi entre a condição “Dia 1” e “Teste sem urina” (razão = 1,419; $p = 0,3024$), o que sugere que o número médio de

erros no Dia 1 foi aproximadamente 42% maior do que na condição final. No entanto, essa diferença não atingiu significância estatística. As demais comparações apresentaram razões próximas de 1, com elevados valores de p , reforçando a similaridade estatística entre os desempenhos nas diferentes fases.

Em síntese, embora os efeitos marginais sugiram em tendência à redução do número de erros ao longo do tempo, as diferenças entre as condições não se mostraram estatisticamente significativas após a correção para múltiplas comparações.

Na sequência da análise, foi realizada uma comparação pareada entre os grupos experimentais, com ajuste de valor de p pelo método de Tukey, a fim de identificar possíveis diferenças estatisticamente significativas no número médio de erros cometidos (Quadro 45 – ANEXO 1). As razões de médias (*ratio*) representam o quociente entre o número médio de erros de um grupo em relação ao outro, com valores superiores a 1 indicando maior número de erros no numerador da razão.

Os resultados revelam que nenhuma das comparações entre os grupos apresentou significância estatística após correção (todos os valores de $p > 0,05$). A maior razão foi observada na comparação entre o G1 e o G3 (razão de incidência = 1,309; $p = 0,3933$), sugerindo que o G1 teve, em média, cerca de 31% mais erros que o G3, embora essa diferença não tenha atingido significância estatística.

O contraste entre o GC e o G1 resultou em uma razão inferior a 1 (0,770), com tendência de menor número de erros no controle, porém sem

significância ($p = 0,4276$). As demais comparações apresentaram razões próximas de 1, reforçando a ausência de diferenças consistentes entre os grupos.

Esses achados são coerentes com os efeitos marginais previamente observados, em que o G1 apresentou tendência a maior número de erros, mas sem evidência estatística robusta para afirmar diferenças em relação aos demais grupos.

3. Erros depois

O GC manteve níveis extremamente baixos ou nulos de erro em praticamente todas as condições (Quadro 46 – ANEXO 1). No Dia 1, houve uma média modesta de 0,8 erros, mas nos dias subsequentes e nos testes finais os valores médios foram próximos ou iguais a zero, com baixa variabilidade.

O grupo G1 iniciou o experimento com um número considerável de erros no Dia 1 (média de 7,8, com alto desvio-padrão de 9,87). Contudo, observou-se uma melhora progressiva nos dias seguintes, com redução significativa das médias, indicando a consolidação da aprendizagem. No teste sem urina, a média caiu para 1,8; no teste com urina, houve novo aumento (média de 3,6).

O grupo G2 apresentou variação considerável ao longo das fases. No Dia 2, a média atingiu 3,9 erros, com um desvio-padrão de 6,39, indicando grande dispersão de respostas. Nos testes finais, a média foi de 1,4 no teste sem urina, e de 5,2 no teste com urina, com aumento da variabilidade.

Esses dados sugerem que, em condições aversivas, mesmo após a localização da saída, o grupo procurou saídas alternativas para autoproteção.

O grupo G3 teve uma elevação expressiva nos erros no Dia 2 (média de 4,2), e novamente no Dia 4 (média de 4,8, com alto desvio-padrão de 13,81), indicando episódios pontuais de desorganização comportamental. No teste sem urina, a baixa média de 0,8 demonstra consolidação da memória espacial, contrastando com a média elevada do teste com urina (4,6). Esses resultados sugerem que esse grupo pode ter estado sensível a condições emocionais adversas, como a exposição ao odor de predador.

O grupo G4 iniciou o experimento com média de 1,5 erros no Dia 1, mas apresentou valores próximos de zero nos Dias 2 e 3. No Dia 4, a média voltou a subir levemente para 1,2. O teste sem urina resultou em praticamente nenhum erro (média de 0,1), o que demonstra consolidação da memória espacial, enquanto o teste com urina revelou média de 3,1 erros, com distribuição assimétrica. Esse padrão reforça a hipótese de que a presença de um estímulo aversivo afeta a capacidade de finalizar adequadamente a tarefa, mesmo após o animal ter localizado a caixa de fuga.

Em síntese, os dados indicam que a maioria dos grupos apresentou elevações no número de erros após a localização da caixa de fuga no teste com urina, com destaque para os grupos G1, G2, G3 e G4. Apenas o GC manteve estabilidade e baixo número de erros independentemente da condição. O gráfico a seguir ilustra esses dados:

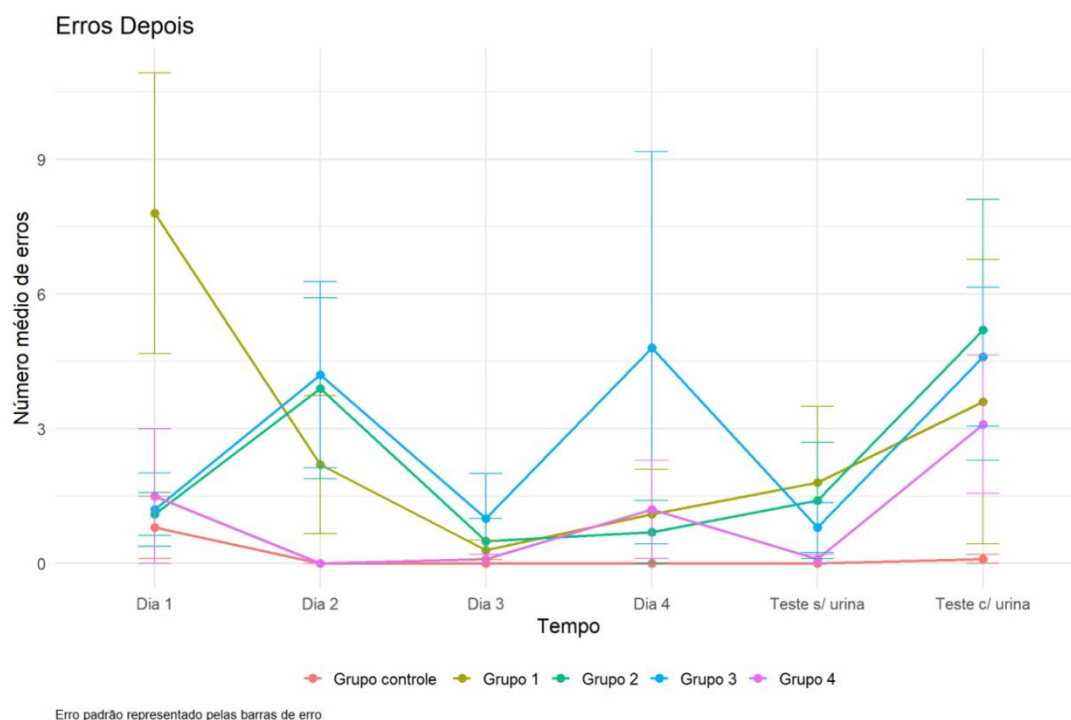


Figura 39 - Número médio de erros cometidos após a localização correta no Labirinto de Barnes. O gráfico ilustra o desempenho dos grupos experimentais ao longo dos quatro dias de avaliação e nos testes finais com e sem exposição à urina de predador, estratificado por grupo experimental (GC, G1, G2, G3 e G4). As barras verticais representam o erro-padrão da média.

De forma geral, o GC manteve desempenho estável e próximo de zero ao longo de todas as fases, sem oscilações relevantes, o que reforça, na análise dessa variável, sua função como grupo de base comportamental. Em contraste, o G1 apresentou um pico acentuado no Dia 1, com subsequente redução nos dias seguintes. No entanto, observa-se novo aumento nos testes finais, especialmente na condição com urina, sugerindo possível efeito positivo do estímulo aversivo sobre a organização da resposta.

O G2 demonstrou padrão de oscilação semelhante: após um pico no Dia 2 e queda no Dia 3, apresentou nova elevação nos testes finais, sendo mais pronunciada na presença de urina. O G3 também apresentou instabilidade, com aumento expressivo no Dia 4 e novo crescimento no teste com urina, o que sugere maior vulnerabilidade a condições emocionais adversas. Já o G4, embora tenha iniciado com médias discretas, apresentou aumento consistente no teste com urina de gato.

A análise estatística seguiu o modelo de efeitos mistos generalizados com distribuição binomial negativa já apresentadas nas variáveis anteriores (Quadro 47 – ANEXO 1). Esse resultado ($p=0,4634$) corrobora os achados anteriores descritos com base na tabela e no gráfico: embora se observem diferenças no número médio de erros entre grupos e condições – especialmente no teste com urina – essas diferenças não se mostraram estatisticamente robustas quando analisadas por meio de modelagem mista com controle de variabilidade individual.

Com o objetivo de avaliar diferenças no número de erros cometidos após a localização da caixa de fuga entre os grupos experimentais, foi realizada uma análise de comparações múltiplas entre pares de grupos, com ajuste de Tukey para controle do erro tipo I associado a múltiplas comparações (Quadro 48 – ANEXO 1). Os resultados foram calculados em escala logarítmica, com base nas médias dos escores ao longo de todas as condições experimentais. As comparações envolvendo GC revelaram diferenças estatisticamente significativas em relação aos grupos G1, G2 e G3. Especificamente, o grupo GC apresentou médias significativamente menores de

erros depois quando comparado ao G1 ($p = 0,0001$), ao G2 ($p = 0,0004$) e ao G3 ($p = 0,0001$). A comparação entre o GC e o G4 apresentou uma diferença relevante na razão entre os grupos, embora o valor de p (0,0568) não tenha atingido o critério convencional de significância estatística, apesar de se mostrar próximo do limiar de significância estatística.

Por outro lado, nenhuma das comparações entre os grupos experimentais (G1, G2, G3 e G4) resultou em diferenças estatisticamente significativas. Embora algumas razões entre pares tenham indicado diferenças numéricas expressivas, como no caso entre os grupos G3 e G4, aquelas não foram consideradas estatisticamente significativas.

4. Latência para entrar

As estatísticas descritivas dessa variável demonstram que o GC apresentou latências bastante reduzidas e estáveis ao longo dos dias, com médias inferiores a 3 segundos a partir do segundo dia de teste (Quadro 49 – ANEXO 1). A exceção ocorreu no Dia 1, em que a média foi mais elevada (23,9 s). No teste sem urina, a latência manteve-se baixa (2,2 s), próxima à dos dias anteriores. Já no teste com urina, observou-se um aumento da latência média (7,5 s), acompanhado de maior dispersão. No teste sem urina, a latência manteve-se baixa (2,2 s), próxima aos dos dias anteriores.

O G1 iniciou com uma latência extremamente elevada no Dia 1 (94,1 s) e, ainda que tenha reduzido consideravelmente ao longo dos dias, apresentou aumentos de latência nos testes finais, sobretudo no teste com urina (48,3 s). O elevado desvio-padrão nas primeiras sessões e nos testes sugere

alta variabilidade individual, com alguns animais apresentando respostas muito tardias.

O G2 demonstrou um perfil oscilante, com um pico acentuado de latência no Dia 2 (média de 84,3 s), seguido por uma queda substancial nos Dias 3 e 4. Nos testes finais, voltou a apresentar latência elevada, especialmente no teste com urina (65,9 s), o que sugere sensibilidade à manipulação ambiental. A dispersão foi ampla, particularmente no Dia 2 e no teste com urina, reforçando a variabilidade interindividual.

O G3 apresentou um padrão semelhante ao G2, com latências reduzidas em alguns dias (ex.: Dia 1: 16,5 s), mas incrementos marcantes nos testes finais, em especial no teste com urina (81,1 s), que registrou a maior média de latência entre todos os grupos e condições. A alta variabilidade e os valores máximos expressivos indicam que parte dos animais demonstrou respostas fortemente afetadas pela condição aversiva.

O grupo G4 exibiu uma curva distinta, com latência inicial moderada (20,9 s no Dia 1), queda abrupta no Dia 2 (1,0 s) e aumento nos testes finais, atingindo 70,5 s no teste com urina.

O gráfico a seguir ilustra os achados:

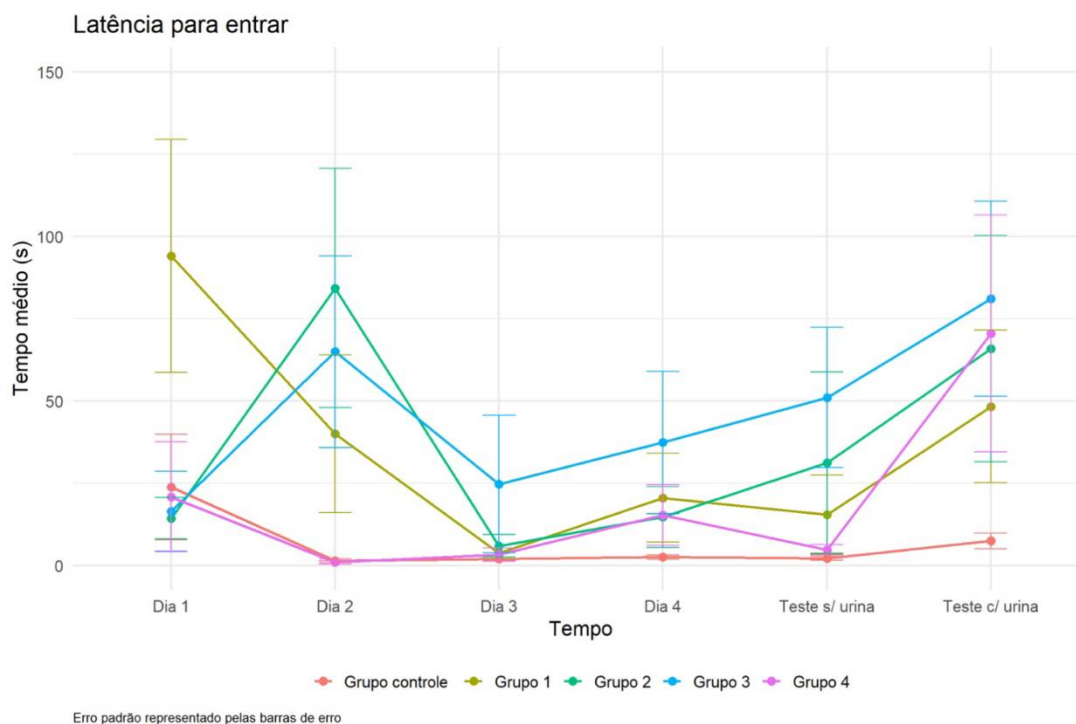


Figura 40 - Tempo médio de latência para entrar na caixa de fuga no Labirinto de Barnes. O gráfico ilustra a média do tempo (em segundos) necessário para que os animais de cada grupo experimental entrassem na caixa de fuga, ao longo dos quatro dias de treino e nos testes finais com e sem exposição ao odor de urina de predador. As linhas representam os cinco grupos avaliados (GC, G1, G2, G3 e G4), e as barras verticais indicam o erro-padrão da média, refletindo a variabilidade entre os sujeitos dentro de cada condição.

De maneira geral, o GC demonstrou desempenho consistente, com latências muito baixas e estáveis em todas as fases, incluindo os testes finais. Mesmo no teste com urina, sua curva manteve-se próxima da linha de base.

Os grupos experimentais, por outro lado, apresentaram padrões de resposta mais variáveis e menos previsíveis. O G1, por exemplo, iniciou com

uma média de latência muito elevada no Dia 1, seguido de uma queda significativa nos dias subsequentes, mas com um novo aumento no teste com urina.

O G2 exibiu o pico mais pronunciado no Dia 2, destacando-se como o grupo com a maior oscilação ao longo do tempo. Após queda nos dias 3 e 4, voltou a subir consideravelmente nos testes finais, especialmente sob exposição à urina.

O G3 também seguiu um padrão de oscilação com elevação progressiva da latência, atingindo o valor mais alto entre todos os grupos no teste com urina.

O G4 apresentou um perfil mais estável entre os dias 2 e 4, com melhora progressiva após o Dia 1. Entretanto, sua curva ascendeu abruptamente no teste com urina, acompanhando o padrão observado nos demais grupos tratados.

Com o objetivo de investigar se o padrão de “latência para entrada” na caixa de fuga ao longo do experimento variava entre os diferentes grupos experimentais, foi realizada uma análise estatística baseada em modelos lineares mistos. Os modelos ajustados e comparados seguem o padrão dos testes anteriores. A comparação entre os modelos foi realizada por meio de um teste de razão de verossimilhança, cujo resultado revelou que a inclusão da interação proporcionou um ajuste significativamente superior ($\chi^2 = 38,54$; $gl = 20$; $p = 0,0076$). Esse valor de p , inferior a 0,01, indica que o modelo com interação

(fit1) apresenta melhor desempenho estatístico do que o modelo mais simples (fit0), sendo preferível para descrever os dados (Quadro 50 – ANEXO 1).

Esse resultado demonstra que os grupos não apenas diferiram entre si em termos de latência média, mas também apresentaram padrões distintos de evolução temporal ao longo das fases do experimento. Em outras palavras, os efeitos do tempo sobre a latência de entrada variaram significativamente conforme o grupo, evidenciando interações específicas entre o tipo de intervenção e o desempenho comportamental ao longo do tempo.

Com o intuito de identificar diferenças específicas entre os grupos experimentais em cada fase do experimento, foi realizada uma análise de comparações múltiplas par a par da variável latência para entrar, com os valores transformados em escala logarítmica ($\log + 1$) para atender aos pressupostos do modelo. O método de correção de Tukey foi utilizado para controle do erro tipo I em múltiplas comparações, e os graus de liberdade foram ajustados pelo método de Kenward-Roger (QUADRO 51 – ANEXO 1).

De acordo com esses resultados, no primeiro dia de teste, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre o GC e os demais grupos. No entanto, destaca-se que o G1 apresentou latência significativamente maior que o G3 ($p = 0,0237$) e em relação ao G4 ($p = 0,0227$). Esses achados sugerem que o G1 teve maior dificuldade inicial para entrar na caixa de fuga, mesmo quando comparado a outros grupos experimentais.

No segundo dia, houve diferenças estatisticamente significativas entre o GC e os grupos G1, G2 e G3. O GC apresentou menor latência, com

valores de p variando entre 0,0400 e 0,0024. Além disso, o G4 também se diferenciou significativamente dos grupos G1, G2 e G3 ($p < 0,014$), indicando que manteve desempenho superior àqueles grupos nessa etapa. Esses resultados reforçam a hipótese de que o segundo dia marcou uma divergência importante no desempenho entre os grupos, com alguns consolidando a aprendizagem e outros ainda apresentando dificuldades expressivas.

No terceiro dia, nenhuma comparação atingiu significância estatística. As latências médias aproximaram-se entre os grupos, sugerindo um período de relativa estabilização do desempenho. A ausência de diferenças significativas pode indicar uma homogeneização da resposta comportamental após as primeiras sessões de treino.

De forma semelhante ao dia anterior, no quarto dia, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos. As médias mantiveram-se próximas, e as comparações par a par não apresentaram significância, o que reforça a noção de estabilidade comportamental ao final da fase de treino.

No quinto dia, no teste final sem exposição ao estímulo aversivo (urina de predador), apenas a comparação entre o GC e o G3 atingiu significância estatística ($p = 0,0443$), indicando que o G3 teve latência significativamente maior nessa condição. As demais comparações não revelaram diferenças significativas, embora algumas estimativas tenham sugerido tendência a divergências, como entre G1 e G3.

Sob condição aversiva, no teste com urina, nenhuma das comparações atingiu significância estatística.

Dessa forma, a análise par a par indica que as diferenças entre os grupos foram mais pronunciadas nos dias iniciais do experimento, especialmente no Dia 2, e tendem a se reduzir ao longo do tempo, o que é compatível com um processo de aprendizagem gradual. Nos testes finais, os efeitos do estímulo aversivo (urina) não produziram diferenças estatisticamente significativas claras entre os grupos, mas sugeriram aumento da latência no G3, que recebeu tratamento com probiótico antes da infecção.

5. *Grooming*

As estatísticas descritivas da variável *grooming* (Quadro 52 – ANEXO 1) demonstram que os animais do grupo GC exibiram baixa frequência de *grooming* na maioria das fases, com mediana igual a zero em todos os momentos. A exceção ocorreu no Dia 2, quando foi observada uma média de 12,5 episódios, com desvio-padrão elevado (33,0), indicando forte assimetria. Nos testes finais, a frequência de *grooming* permaneceu baixa: zero no teste sem urina e 2,1 no teste com urina.

O G1 apresentou valores discretos nos primeiros dias, com média de 0,5 no Dia 1, seguida de aumento no Dia 2 (média de 7,7). No Dia 4, a média de *grooming* subiu para 4,0, com mediana ainda em zero, refletindo a presença de respostas intensas em poucos indivíduos. Nos testes finais, o *grooming* permaneceu baixo: 2,8 (sem urina) e 2,2 (com urina).

O comportamento de *grooming* no G2 mostrou um padrão oscilante. A média foi modesta nos Dias 1 e 2 (1,6 e 0,4), com um pico expressivo no Dia 3 (5,2). No teste com urina, a média aumentou para 8,0 com alto desvio-

padrão (16,2), sugerindo que a exposição ao estímulo aversivo intensificou o comportamento de *grooming* em parte dos animais, enquanto o teste sem urina resultou em média de 2,8.

O G3 apresentou um padrão decrescente ao longo dos dias, com *grooming* médio de 3,8 no Dia 1, reduzindo progressivamente até 0,1 no Dia 4. Nos testes finais, manteve *grooming* muito baixo no teste sem urina (0,2), mas apresentou aumento para 1,8 no teste com urina, sugerindo leve reatividade ao estressor olfativo, embora inferior aos demais grupos.

O G4 destacou-se por apresentar as maiores médias de *grooming* durante o experimento, especialmente no Dia 2 (15,9) e Dia 3 (14,4). Esses valores elevados, combinados a altos desvios-padrão (17,2 e 20,5, respectivamente), indicam que esse grupo manifestou comportamento de *grooming* de forma intensa e dispersa, o que pode refletir uma maior sensibilidade emocional ou resposta exacerbada à tarefa. Nos testes finais, o *grooming* foi reduzido no teste sem urina (0,4), mas voltou a subir no teste com urina (5,1).

O gráfico a seguir ilustra esses achados:

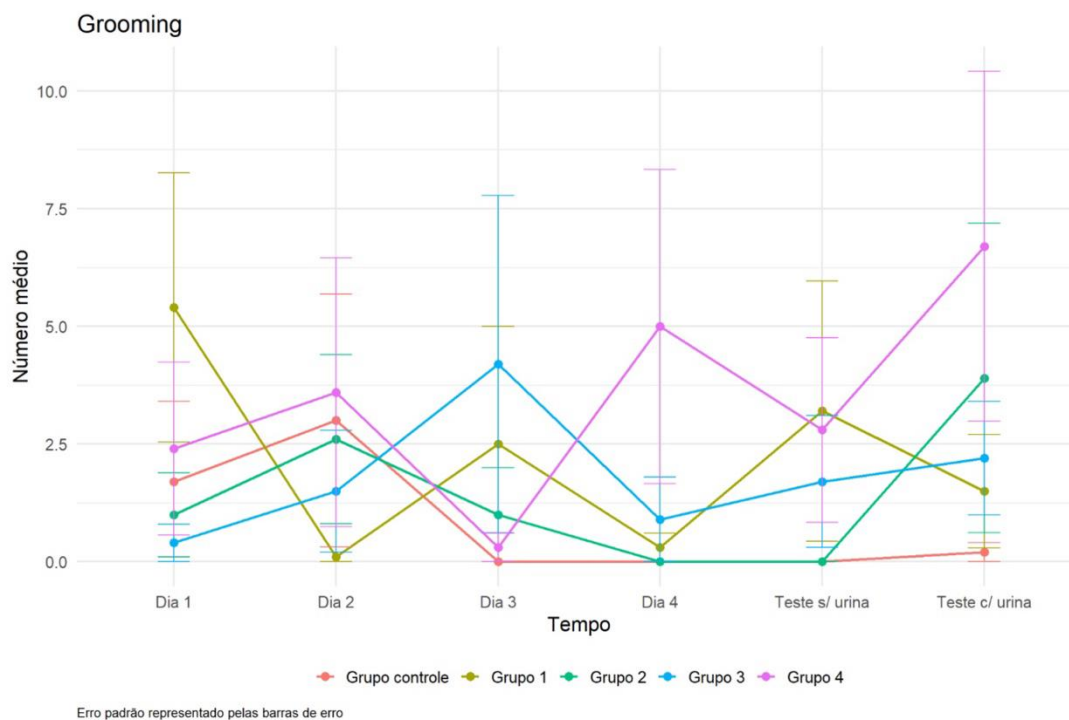


Figura 41 - Número médio de episódios de grooming no Labirinto de Barnes. O gráfico mostra a evolução do comportamento de *grooming* ao longo dos quatro dias de teste no Labirinto de Barnes e nos testes finais com e sem exposição à urina de predador, estratificado por grupo experimental. As linhas representam a média de *grooming* em cada condição, enquanto as barras verticais indicam o erro padrão da média, refletindo a variabilidade intragrupo.

Observa-se que o GC manteve níveis muito baixos de *grooming* durante todo o experimento, com valores médios próximos de zero em todas as fases, incluindo os testes finais.

Os grupos experimentais, em contraste, apresentaram flutuações acentuadas ao longo do tempo, tanto em magnitude quanto em variabilidade. O G1 demonstrou um pico de *grooming* no Dia 2, com redução

posterior e discreto aumento nos testes finais, sobretudo na ausência da urina, o que indica respostas emocionais episódicas e inconsistentes.

O G2 apresentou comportamento mais contido nos primeiros dias, mas demonstrou aumento expressivo no teste com urina, evidenciado pela elevação da curva nesse ponto específico.

O G3 exibiu uma curva descendente ao longo do treino, mas com discreta elevação no teste final com urina.

O G4 foi o que mais se destacou no gráfico, com valores médios elevados de *grooming* nos Dias 2, 3 e 4, e um pico acentuado no teste com urina, ultrapassando a média de todos os demais grupos.

Para investigar se o comportamento de *grooming* variou de forma diferenciada entre os grupos ao longo das fases do experimento, foi ajustado um modelo estatístico de efeitos mistos com distribuição binomial negativa, apropriado para dados de contagem com sobredispersão. A comparação entre ambos os modelos segue o padrão realizado nos parâmetros anteriores. A variável dependente foi o número de episódios de *grooming* registrados por animal em cada sessão.

A comparação entre os modelos foi realizada por meio de um teste de razão de verossimilhança, que resultou em $\chi^2 = 29,952$, com 20 graus de liberdade, e um valor de $p = 0,07064$ (Quadro 53 – ANEXO 1).

Embora esse valor de p não atinja o critério convencional de significância estatística ($p < 0,05$), aproxima-se do limiar de significância.

Para uma análise mais aprofundada, realizou-se o teste de comparações múltiplas, ajustadas pelo método de Tukey (Quadro 54 – ANEXO 1).

As comparações entre o GC e os demais grupos (G1, G2, G3 e G4) indicaram que, apesar de diferenças numéricas consideráveis nas razões entre os grupos, nenhuma das comparações atingiu significância estatística ao nível de 5%. A comparação entre o GC e o G4, por exemplo, resultou em um valor de $p = 0,0843$, próximo ao limiar de significância, mas não suficiente para garantir robustez estatística.

As comparações entre os grupos G1, G2, G3 e G4 também não revelaram diferenças significativas, com todos os valores de p acima de 0,3. A maior razão observada foi entre os grupos G1 e G2 (razão = 6,20), sugerindo que o G2 exibiu mais *grooming* do que o G1; no entanto, o valor de p correspondente foi 0,4113, indicando ausência de significância estatística, de novo devido possivelmente à dispersão dos dados.

IV - Teste com Labirinto de Barnes no segundo tempo (LB2)

1. Tempo de Achar no Segundo Momento

As estatísticas descritivas demonstram que o grupo GC apresentou média moderada de latência no Dia 1 (83,8 s), com diminuição no Dia 2 (43,1 s), leve aumento no Dia 3 (54,4 s), e nova elevação no Dia 4 (76,5 s). O teste sem urina resultou em média de 48,2 s, enquanto o teste com urina elevou a média para 84,9 s (Quadro 55 – ANEXO 1).

O G1 iniciou com latência elevada no Dia 1 (144,6 s), seguida por uma queda pronunciada no Dia 2 (49,2 s). Os dias seguintes apresentaram latências intermediárias, e tanto o teste sem urina (52,8 s) quanto o teste com urina (46,2 s) mostraram desempenho estável, com valores semelhantes e menores que no primeiro dia.

O G2 exibiu latência relativamente baixa e estável nos quatro dias iniciais (média entre 40,8 s e 74,8 s), e desempenho ainda melhor no teste sem urina (29,6 s). No teste com urina, a latência aumentou para 50,9 s, mantendo-se inferior aos valores observados no Dia 1.

O G3 apresentou latência elevada no Dia 1 (93,3 s), com queda nos dias seguintes, chegando a 44,8 s no Dia 4. No teste sem urina (41,2 s), o desempenho foi consistente com os dias de treino. No entanto, o teste com urina elevou a latência para 52,9 s, além de apresentar ampla dispersão (desvio-padrão alto).

O G4 iniciou com latência alta (99,2 s no Dia 1) e manteve valores elevados em todos os dias subsequentes (variando entre 68,6 s e 91,6 s). O teste sem urina resultou em média de 60,0 s, enquanto o teste com urina atingiu 80,8 s.

O gráfico a seguir ilustra esses dados:

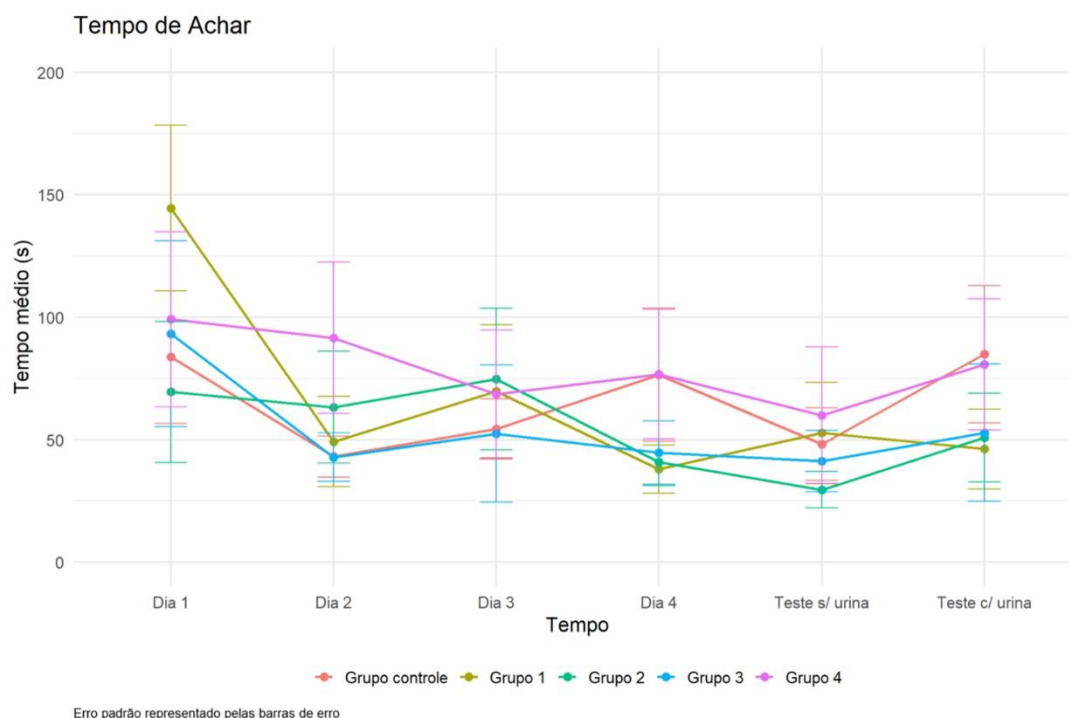


Figura 42 - Tempo médio para localizar a caixa de fuga no Labirinto de Barnes – Sessão LB2O gráfico apresenta a evolução do tempo médio (em segundos) para localizar a caixa de fuga no Labirinto de Barnes ao longo de quatro dias consecutivos de avaliação e nos testes finais com e sem exposição ao estímulo olfativo aversivo (urina de predador). O desempenho está estratificado por grupo experimental (GC, G1, G2, G3 e G4). As barras verticais representam o erro-padrão da média, indicando o grau de variabilidade intragrupo em cada condição.

De modo geral, observa-se uma tendência de redução nas latências entre o Dia 1 e os dias subsequentes. O GC iniciou com uma média de aproximadamente 84 segundos no Dia 1, reduziu essa latência no Dia 2 (cerca de 43 segundos), mas apresentou aumento progressivo nos Dias 3 e 4, voltando a atingir valores superiores a 75 segundos no teste com urina.

O G1 apresentou o maior tempo médio no Dia 1 (cerca de 145 segundos), seguido por uma queda abrupta no Dia 2 e estabilização nas condições seguintes. Diferentemente do GC, o G1 não demonstrou piora no teste com urina.

O G2 manteve desempenho estável e eficiente nos dias intermediários, com latências inferiores a 75 s, e apresentou melhora significativa no teste sem urina, com média próxima a 30 s. No teste com urina, a latência aumentou discretamente, mas ainda permaneceu inferior aos valores do início do experimento.

O G3 iniciou com latência elevada no Dia 1 (em torno de 93 segundos), reduzindo progressivamente até o Dia 4 (cerca de 45 segundos). No teste com urina, houve novo aumento da latência (em torno de 53 segundos), mantendo-se, no entanto, em patamar intermediário. Esse padrão indica recuperação da memória espacial ao longo do tempo, com certa sensibilidade ao estressor no teste final.

Por fim, o G4 foi o que apresentou as maiores latências médias ao longo de todo o experimento, com desempenho pouco variável mesmo após os dias de reaprendizagem. A curva de desempenho manteve-se acima de 90 segundos até o Dia 3, com apenas leve melhora nos testes finais. Esse perfil pode estar associado à baixa retenção da memória espacial em longo prazo, bem como a uma resposta emocional mais intensa diante da reapresentação da tarefa.

Com o objetivo de investigar a variação no tempo necessário para que os animais encontrassem a saída ao longo das diferentes fases do experimento e entre os distintos grupos experimentais, foi empregado um modelo estatístico de efeitos mistos lineares. Trata-se dos mesmos modelos analisados na variável anterior (Quadro 56 – ANEXO1).

A comparação entre os modelos revelou que a inclusão da interação entre condição e grupo (modelo 1) não proporcionou uma melhoria significativa no ajuste aos dados, conforme indicado pelo valor de $p = 0,886$. Esse resultado sugere que o efeito do tempo sobre o desempenho na tarefa, ou seja, o tempo necessário para encontrar a saída, foi estatisticamente semelhante entre os diferentes grupos experimentais. Em outras palavras, os grupos apresentaram padrões de evolução comportamental ao longo das fases do experimento que não diferiram de forma significativa entre si.

Seguindo a análise estatística, os contrastes entre os grupos experimentais foram realizados por meio do método de Tukey para ajuste dos valores de p , com base na média geral ao longo das condições (dias de teste e testes finais). Os resultados indicam que nenhuma das comparações par a par apresentou significância estatística (Quadro 57 – ANEXO 1).

2. Tempo de entrar no segundo momento

A análise das estatísticas descritivas (Quadro 58 – ANEXO 1) revela que o GC apresentou uma redução inicial de latência entre os Dias 1 e 2 (de 123,7 s para 73,3 s), seguida de manutenção de valores intermediários nos

dias seguintes e nos testes. Observa-se uma elevação discreta no teste com urina (95,3 s) em relação ao teste sem urina (87,7 s).

O G1 iniciou com a maior latência média no Dia 1 (206,9 s), mas apresentou queda significativa já no Dia 2 (75,0 s). A variação foi considerável entre os dias subsequentes, com novo aumento no teste com urina (127,5 s). A amplitude entre os quartis e os desvios-padrão elevados indica grande variabilidade interindividual, com alguns animais mantendo desempenho rápido e outros expressando latências máximas.

O G2 demonstrou padrão oscilante: após latência elevada nos dois primeiros dias (124,8 s e 136,8 s), houve redução nos Dias 3 e 4 (80,3 s e 54,0 s, respectivamente), mantendo-se estável no teste sem urina (56,2 s). No teste com urina, observou-se em nova elevação da latência (143,0 s).

O G3 iniciou com latência alta (178,0 s), seguida de queda progressiva até o Dia 4 (110,7 s). O desempenho melhorou no teste sem urina (69,6 s), mas voltou a se deteriorar, como esperado, no teste com urina (126,7 s).

O G4 demonstrou uma trajetória semelhante ao G3, com latência média de 118,6 s no Dia 1 e aumento no Dia 2 (148,0 s), seguido de desempenho mais eficiente no Dia 3 (91,7 s). No entanto, manteve latências elevadas no teste sem urina (100,6 s) e, principalmente, no teste com urina (169,2 s) – o valor mais alto entre todos os grupos.

O gráfico a seguir ilustra esses achados:

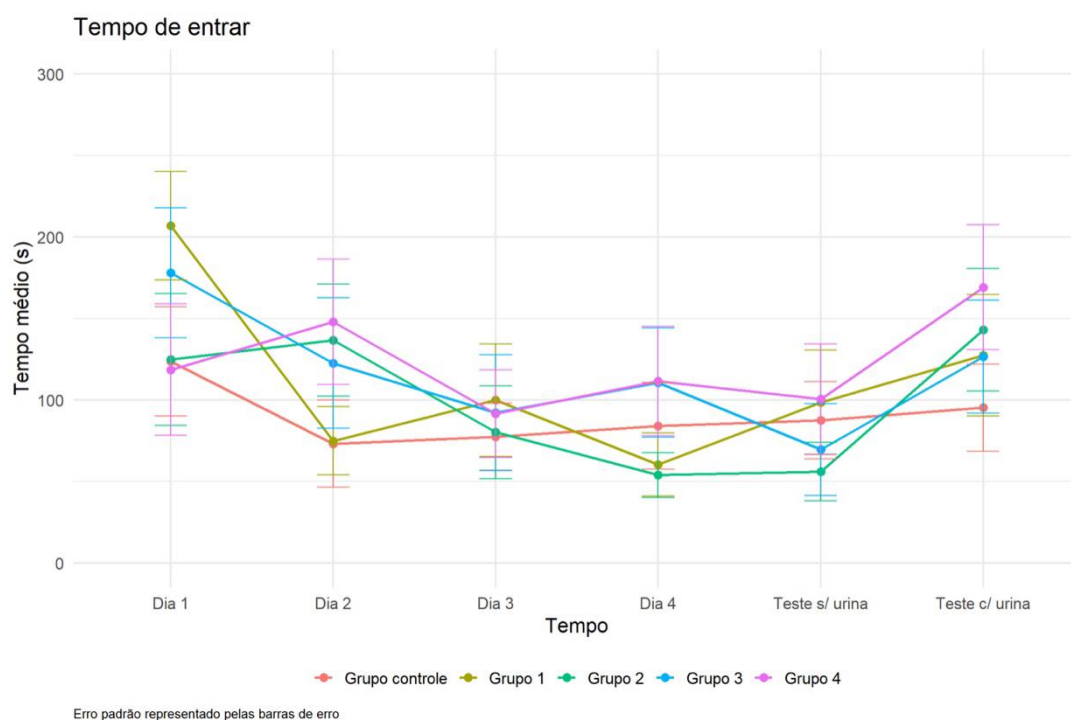


Figura 43 - Tempo de latência para entrada no compartimento alvo no LB2. Gráfico referente à variável tempo de entrar na caixa de fuga no Labirinto de Barnes, correspondente à repetição do experimento realizada 30 dias após o protocolo inicial. O gráfico exibe a média de tempo (em segundos) por grupo experimental ao longo dos quatro dias de teste e nos testes finais, com e sem exposição à urina de predador. As barras verticais representam o erro-padrão da média, refletindo a variabilidade intragrupo.

O gráfico demonstra que o GC apresentou uma trajetória relativamente estável ao longo do experimento, com leve queda entre o Dia 1 e o Dia 2, e manutenção de valores intermediários nos dias seguintes. Nos testes finais, houve um pequeno aumento da latência no teste com urina.

O G1 iniciou o experimento com o maior tempo médio de entrada entre todos os grupos (~207 s no Dia 1), seguido de uma queda abrupta no Dia

2, o que pode refletir rápida reaprendizagem ou reativação da memória da tarefa. No entanto, apresentou novo aumento de latência no teste com urina.

O G2, por sua vez, demonstrou um perfil de recuperação progressiva e estável, com redução gradual das latências até o Dia 4. Apresentou o menor tempo médio no teste sem urina (~56 s), indicando boa retenção da tarefa. No teste com urina, a latência aumentou consideravelmente.

O G3 seguiu um padrão semelhante ao G2, com redução das latências ao longo dos dias de treino, desempenho satisfatório no teste sem urina e novo aumento no teste com urina.

Por fim, o G4 apresentou o perfil mais alto e estável de latências médias ao longo dos dias de treino, mantendo tempos consistentemente elevados de entrada na caixa de fuga. No teste com urina, houve um pico acentuado, com tempo médio superior a 170 segundos.

Para a análise estatística optou-se, como nos testes anteriores, pelo modelo misto linear. Ambos os modelos seguem as configurações ajustadas na análise das variáveis anteriores. A comparação entre ambos os modelos foi realizada por meio de um teste de razão de verossimilhança, que avaliou se a inclusão da interação proporcionaria uma melhoria significativa no ajuste do modelo aos dados.

O valor de p obtido (0.5788) está muito acima do limiar convencional de significância (0.05), o que indica que a inclusão da interação entre grupo e condição não resultou em uma melhoria estatisticamente significativa no ajuste do modelo. Em outras palavras, o modelo mais complexo

(fit1) não é melhor que o modelo mais simples (fit0) para explicar a variação do tempo de entrada (Quadro 59 – ANEXO 1).

Esses resultados sugerem que o efeito do tempo (condição) sobre o comportamento de entrada foi semelhante entre os grupos experimentais. Ou seja, as trajetórias de latência ao longo do experimento foram estatisticamente paralelas, sem diferenças significativas na forma como os grupos evoluíram ao longo dos dias de reapresentação da tarefa.

Aplicou-se ainda um teste de comparações múltiplas entre os grupos experimentais para a variável “tempo de entrar” no Labirinto de Barnes, realizado 30 dias após o primeiro experimento. As comparações foram ajustadas pelo método de Tukey, e os graus de liberdade foram corrigidos pelo método de Kenward-Roger, adequado para modelos lineares mistos com medidas repetidas (Quadro 60 – ANEXO 1). A análise por comparações múltiplas confirma que, apesar de oscilações individuais e diferenças numéricas entre os grupos, não houve diferenças estatisticamente significativas no tempo de entrada entre os grupos experimentais durante o reteste.

3. Erros antes

As estatísticas descritivas da variável "erros antes" demonstram que o GC apresentou redução acentuada dos erros após o Dia 1 (média de 11,9), atingindo valores próximos de 6 a 7 nos Dias 2 a 4 (Quadro 61 – ANEXO 1). No teste sem urina, a média caiu para 4,5, sugerindo retenção parcial da tarefa. No teste com urina, houve um aumento para 7,8.

O G1 iniciou com média elevada de erros (14,7 no Dia 1), seguida por uma redução acentuada no Dia 2 (5,4), porém com oscilações nos dias seguintes. O teste sem urina (5,1) e o teste com urina (5,3) mantiveram valores semelhantes.

O G2 apresentou valores elevados nos dois primeiros dias (8,3 e 8,9), com melhora progressiva ao longo do experimento (média de 4,5 no Dia 4). O teste sem urina apresentou a menor média (3,6) entre todas as condições. No entanto, o teste com urina elevou a média para 6,4.

O G3 demonstrou menores médias de erros ao longo do experimento, com valores entre 4,1 e 6,5. No teste sem urina (6,3) e no teste com urina (5,7), manteve níveis similares.

O G4 apresentou valores consistentemente elevados de erro, com médias acima de 7 em todos os dias de treino, atingindo 9,9 no Dia 1 e 8,4 no Dia 4. No teste com urina, a média foi de 6,9, enquanto no teste sem urina foi de 4,4.

O gráfico a seguir ilustra essa situação:

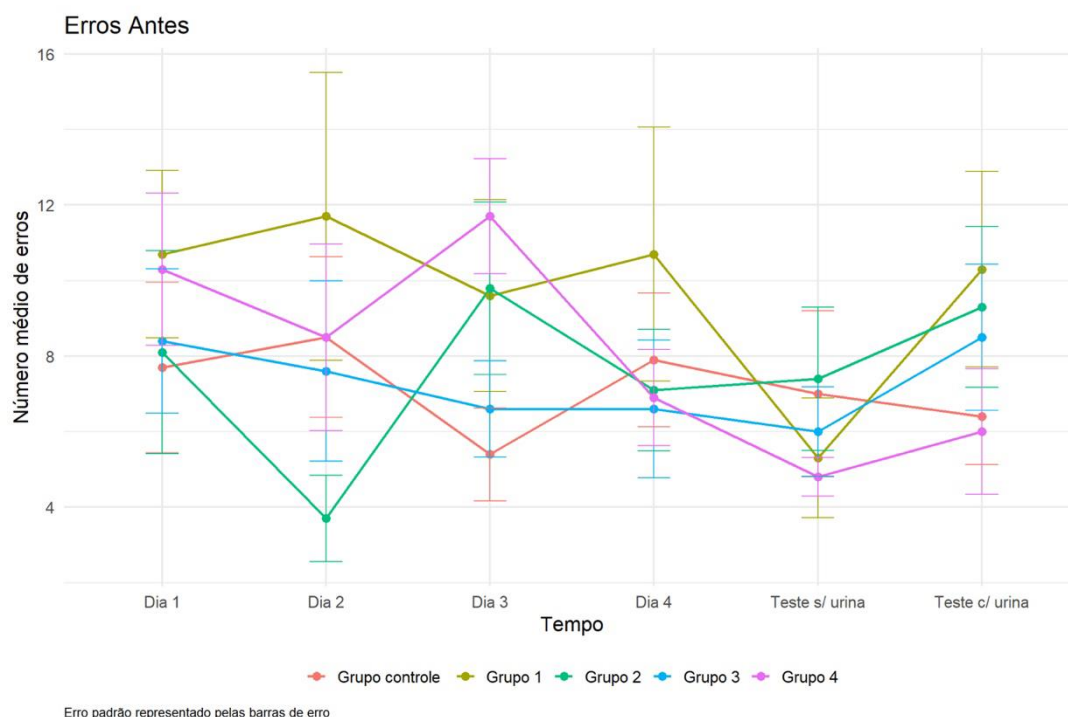


Figura 44 - Número médio de erros cometidos antes da entrada no compartimento alvo no LB2. O gráfico apresentado representa a média do número de erros cometidos antes da localização da caixa de fuga no Labirinto de Barnes, ao longo de quatro dias de reapresentação da tarefa e em dois testes finais (com e sem exposição à urina de predador), 30 dias após o experimento original. Os dados estão estratificados por grupo experimental, e as barras verticais representam o erro-padrão da média, indicando a variabilidade intragrupo.

O gráfico reforça as interpretações extraídas da tabela: há uma tendência de melhora da maioria dos grupos ao longo dos dias de reapresentação, com destaque para o G3, que manteve padrão estável e eficiente. Por outro lado, os grupos G1 e G2 demonstraram maior oscilação e maior número de erros, indicando possível dificuldade de consolidação da

memória espacial e maior sensibilidade emocional diante do estressor (urina de predador).

Visando a verificar se houve diferenças significativas entre os grupos experimentais ao longo das diferentes condições do experimento (dias de reapresentação da tarefa e testes finais), no que diz respeito ao número de erros cometidos antes da identificação correta da saída, foram ajustados dois modelos mistos com distribuição binomial negativa, adequada para dados de contagem com sobredispersão. A descrição dos modelos segue os padrões aplicados nas variáveis anteriores. A comparação entre ambos os modelos foi realizada por meio de um teste de razão de verossimilhança, que avalia se a inclusão da interação melhora significativamente o ajuste do modelo aos dados (Quadro 62 – ANEXO 2). O valor de $p = 0,4233$ indica que a inclusão da interação entre condição e grupo não resultou em melhora estatisticamente significativa no ajuste do modelo. Assim, não há evidência de que os grupos tenham se comportado de forma significativamente diferente em sua trajetória de erros ao longo das fases do experimento.

Procedeu-se então com uma leitura detalhada da análise de comparações múltiplas entre os grupos experimentais para a variável “erros antes”, realizada 30 dias após o primeiro experimento no Labirinto de Barnes. Os resultados foram ajustados pelo método de Tukey, e os testes realizados na escala logarítmica (Quadro 63 – ANEXO 1). Nenhuma das comparações atingiu significância estatística.

4. Erros depois

As estatísticas descritivas da variável "erros antes" do LB2 verificou que o GC apresentou médias de erros relativamente baixas ao longo dos quatro dias de reexposição (média entre 0,4 e 2,4), com medianas iguais a zero em todas as sessões, indicando que a maioria dos indivíduos não cometeu erros (Quadro 64 – ANEXO 1). No entanto, durante o teste sem urina de gato, observou-se um aumento expressivo na média de erros ($5,2 \pm 2,674$), com intervalo interquartil (IQR) de 11,25. Já no teste com urina, os animais desse grupo cometeram poucos erros (média = $0,9 \pm 0,900$).

O G1 demonstrou redução progressiva no número de erros entre os Dias 1 e 4 (médias de 4,4 para 2,2). No entanto, essa coesão cognitiva foi abalada durante o teste com urina de gato, quando os animais apresentaram um aumento acentuado nos erros ($5,9 \pm 2,510$; IQR = 11,75), sugerindo maior sensibilidade ao estresse olfativo. No teste sem urina, os erros se mantiveram em nível moderado ($3,3 \pm 2,261$).

O G2 teve desempenho irregular: apresentou valores elevados nos dias 1 e 2 (4,3 e 6,3 erros, respectivamente), seguido de redução abrupta nos dias 3 e 4 (0,2 e 0,9). O teste com urina elevou a média de erros para 3,9, enquanto no teste sem urina o desempenho foi superior (1,1).

O G3 também apresentou médias iniciais altas (5,9 erros no dia 1), com melhora gradual nos dias subsequentes. Entretanto, no teste com urina,

o número de erros voltou a se elevar ($4,2 \pm 1,519$) Já no teste sem urina, os animais mantiveram número baixo de erros ($0,5 \pm 0,342$).

O G4 destacou-se como aquele com melhor desempenho geral, mantendo baixas médias de erros (entre 0,5 e 2,8) durante todos os dias de reapresentação do labirinto. No teste com urina, embora tenha havido aumento no número de erros ($5,2 \pm 2,021$; IQR = 9,75), o desempenho se mostrou mais estável e menos disperso do que nos demais grupos.

O gráfico a seguir ilustra esse achado:

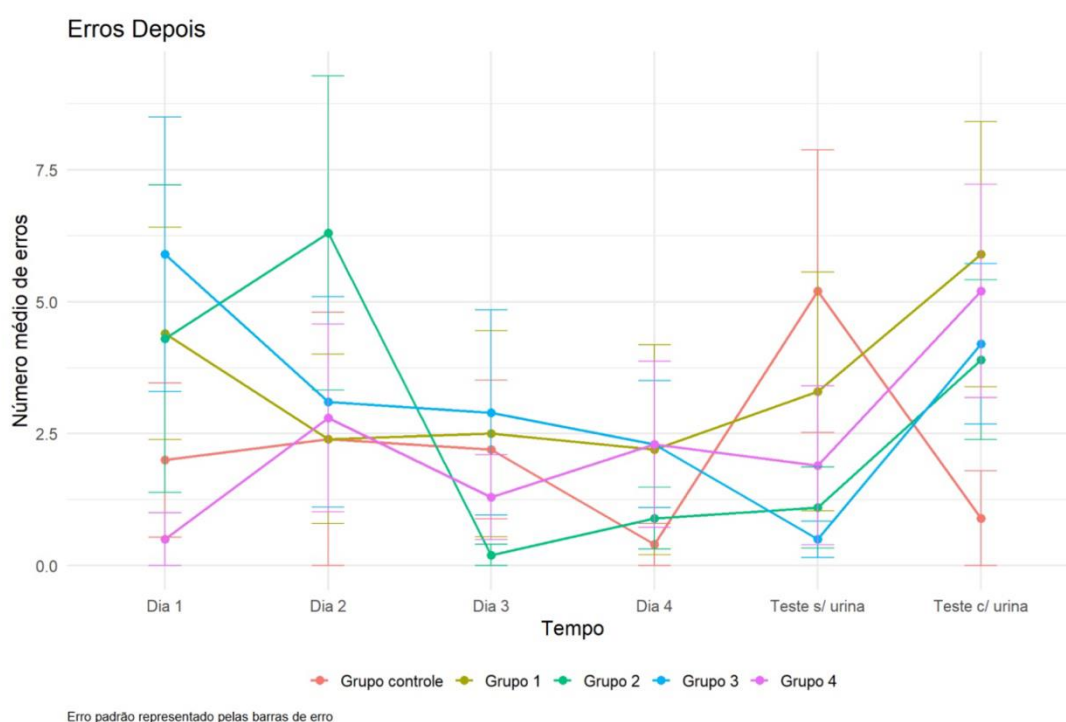


Figura 45 - Erros cometidos após a entrada no compartimento alvo no Labirinto de Barnes 2 (LB2). O gráfico apresenta a média do número de erros cometidos após a entrada no compartimento alvo durante a realização do Labirinto de Barnes 2 (LB2), ao longo de quatro dias de teste e nas fases com e sem estímulo olfativo (urina). As barras de erro representam o erro padrão da

média, permitindo observar a variabilidade intra e intergrupos ao longo das sessões. Esse parâmetro comportamental visa avaliar a manutenção da memória espacial e a precisão na busca pelo local alvo, mesmo após sua localização inicial

O GC apresentou comportamento atípico em relação aos demais: os animais cometeram mais erros na condição sem urina (média $\approx 5,2$) do que com urina ($\approx 0,9$). Em contraste, todos os grupos experimentais (G1 a G4) apresentaram aumento do número de erros na presença da urina de predador.

O G1 teve média de aproximadamente 5,9 erros com urina, contra 3,3 erros sem o estímulo, revelando sensibilidade significativa ao fator estressor. De forma ainda mais acentuada, o G3 apresentou a menor média de erros sem urina (0,5), que se elevou para 4,2 sob estresse. O G2 seguiu padrão semelhante, com aumento de 1,1 para 3,9 erros entre as condições. O G4 também sofreu queda sob estresse, com elevação dos erros de 1,9 para 5,2.

A fim de avaliar a influência dos fatores grupo experimental e condição olfativa (presença ou ausência de urina de gato) sobre a variável “erros depois” no Labirinto de Barnes – medida 30 dias após a fase inicial –, foi ajustado um modelo linear generalizado misto com distribuição binomial negativa, apropriado para dados de contagem com superdispersão. O modelo incluiu efeitos aleatórios por animal (id_animal) para controlar a variabilidade intraindividual.

A comparação foi realizada por meio do Teste de Razão de Verossimilhança (*Likelihood Ratio Test* - LRT). O modelo interativo apresentou AIC = 1006.01 e BIC = 1124.5, valores superiores aos do modelo aditivo (AIC = 980.73; BIC = 1025.2), o que indica pior ajuste. Embora o modelo interativo tenha exibido ligeira redução no desvio (de 956.73 para 942.01), o valor do teste LRT ($\chi^2 = 14.714$; $df = 20$; $p = 0.7925$) demonstrou que essa melhora não foi estatisticamente significativa (Quadro 65 – ANEXO 1).

Com o objetivo de identificar diferenças específicas entre os grupos experimentais na variável “erros depois”, foi conduzida uma análise *post-hoc* de comparações múltiplas par a par, com base no modelo estatístico misto previamente ajustado. Esse procedimento permite verificar quais pares de grupos apresentaram diferenças estatisticamente significativas no número médio de erros cometidos após o intervalo de 30 dias (Quadro 66 – ANEXO).

Os resultados indicaram que, embora diferenças numéricas tenham sido observadas entre os grupos em ambas as condições, nenhuma das comparações par a par atingiu significância estatística ao nível convencional ($p < 0,05$). Isso sugere que as variações observadas na média de erros entre os grupos experimentais não são suficientemente robustas para serem consideradas estatisticamente confiáveis quando comparadas diretamente duas a duas.

5. Latência para entrar

As estatísticas descritivas da variável "latência para entrar" do LB2 demonstram que houve, de maneira geral, uma tendência de redução da

latência ao longo dos quatro dias de reapresentação do labirinto em todos os grupos (Quadro 67 – ANEXO 1).

O GC apresentou latências decrescentes nos dias 1 a 4 (médias de 39,9 s a 7,7 s). Curiosamente, no teste final sem exposição à urina de gato, a média de latência aumentou para 39,5 s, com grande variabilidade, enquanto, na presença do estímulo olfativo aversivo, a latência foi consideravelmente menor (10,4 s).

O G1 também demonstrou melhora progressiva nos testes reapresentados (de 62,3 s para 22,4 s), apesar da elevada variabilidade interindividual (desvios-padrão > 50 s em todos os dias). No entanto, o desempenho foi sensivelmente prejudicado na condição com urina de gato (81,3 s), em contraste com a média intermediária observada na condição sem urina (45,8 s).

O G2 evidenciou desempenho flutuante, com latência elevada nos dias 1 e 2 (55,3 e 73,5 s), seguida por forte queda nos dias 3 e 4 (5,5 e 13,2 s). Contudo, a exposição à urina de gato comprometeu significativamente a latência (92,1 s). Na ausência do estressor, o desempenho foi melhor (26,6 s), embora com grande dispersão.

O G3 apresentou as latências médias mais altas de toda a amostra, especialmente nos dias 1 e 2 (84,7 e 79,8 s). Ainda que tenha ocorrido leve melhora no dia 3, os resultados do dia 4 (65,9 s) indicam manutenção de déficit ou de reatividade emocional persistente. Na condição sem urina, o grupo

demonstrou desempenho aceitável (28,4 s), mas com piora acentuada sob exposição ao estressor olfativo (73,8 s).

Por fim, o G4 apresentou latências relativamente baixas nos quatro dias de reapresentação (médias entre 19,4 e 34,8 s). No entanto, assim como nos demais grupos, a exposição à urina felina resultou em piora considerável no desempenho (88,4 s), com amplíssima dispersão dos dados (IQR = 188).

O gráfico a seguir ilustra esses achados:

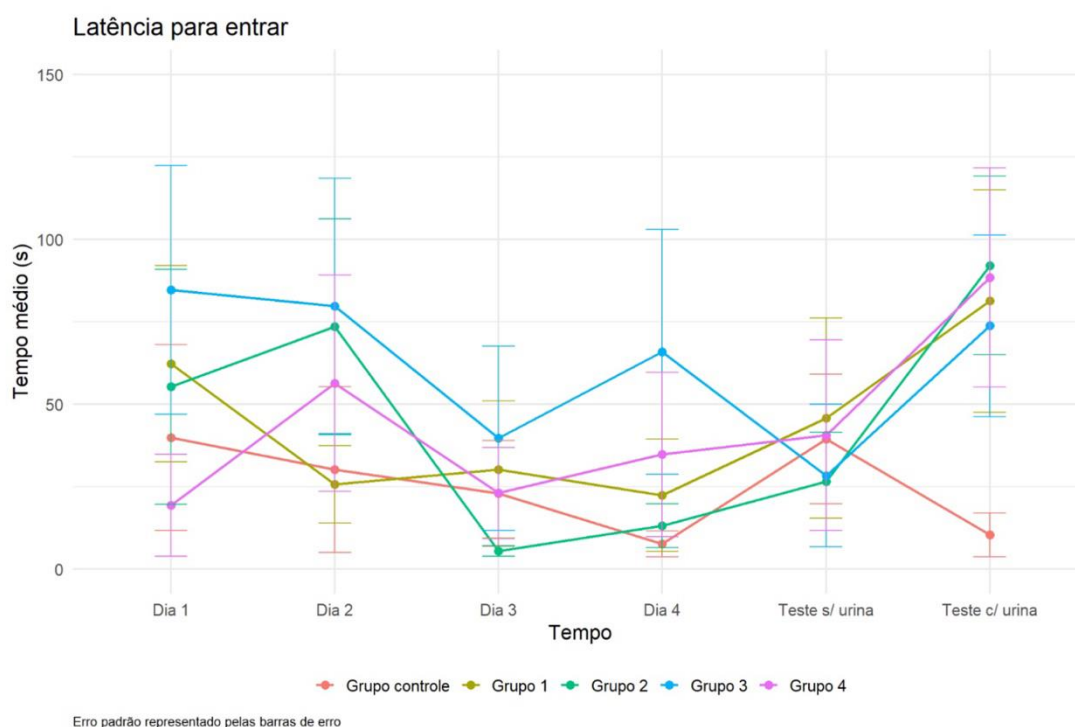


Figura 46 - Latência para entrada na caixa de fuga do LB2. O gráfico representativo da variável “latência para entrar” ilustra o tempo médio, em segundos, que os diferentes grupos experimentais levaram para acessar a

caixa de fuga no Labirinto de Barnes, comparando o desempenho dos animais em duas condições ambientais: sem urina de gato (condição neutra que avalia o processo de aprendizagem e retenção de memória espacial de longo prazo) e com urina (estímulo olfativo ansiogênico). A análise gráfica permite identificar padrões comportamentais modulados pela interação entre memória espacial e reatividade emocional.

O GC apresentou menor latência na condição com urina de gato, em comparação à condição sem o estímulo.

Em contrapartida, os grupos G1, G2, G3 e G4 apresentaram aumento substancial da latência na presença da urina de gato, evidenciando que o estressor ambiental comprometeu significativamente o desempenho dos animais. O G3, por sua vez, manteve desempenho elevado de latência em ambas as condições.

Para avaliar a influência dos fatores "grupo experimental" e "tempo" (quatro dias de treinamento e teste final com e sem urina) sobre a variável "latência para entrar", foi ajustado um modelo linear generalizado misto com distribuição binomial negativa e intercepto aleatório por animal.

Dois modelos foram comparados por meio do Teste de Razão de Verossimilhança (LRT), que segue os padrões descritos nos experimentos.

O modelo interativo apresentou pior ajuste em comparação ao modelo aditivo, e a diferença não foi estatisticamente significativa ($p = 0.9997$) (Quadro 68 – ANEXO 1). Assim, conclui-se que a interação entre grupo e

condição não contribui significativamente para explicar a latência observada, e que os efeitos principais atuam de forma aditiva e independente.

Conduziu-se, então, uma análise *post-hoc* de comparações múltiplas par a par com o objetivo de identificar quais pares de grupos experimentais diferiram significativamente entre si quanto ao tempo necessário para acessar a caixa de fuga, 30 dias após o primeiro experimento (Quadro 69 – ANEXO 1). A análise foi realizada de forma estratificada por condição ambiental (com e sem exposição à urina de gato), de modo a preservar a interpretação contextual da resposta comportamental.

Os resultados revelaram que nenhuma das comparações par a par atingiu significância estatística ao nível convencional ($p < 0,05$). Embora os dados descritivos e os gráficos de barras tenham evidenciado padrões distintos de desempenho entre os grupos, tais diferenças não se sustentaram estatisticamente quando avaliadas individualmente por pares. Esse achado reforça os resultados obtidos nos testes de modelo, que indicaram ausência de interação significativa entre os fatores “grupo” e “condição”.

6. *Grooming*

As estatísticas descritivas da variável “*grooming*” do LB2 mostram que no GC, o *grooming* se mostrou praticamente ausente ao longo dos quatro dias de reapresentação e em ambas as condições de teste (com e sem urina de gato), com médias variando de 0 a 3,0 e medianas invariavelmente nulas (Quadro 70 – ANEXO 1).

O G1 apresentou um pico acentuado de *grooming* no Dia 1 (média = 5,4), seguido por uma queda brusca nos dias subsequentes. No teste com urina, observou-se uma redução no *grooming* (1,5), enquanto na condição sem urina a média foi maior (3,2).

No G2, os valores foram moderados nos primeiros dias (1,0 a 2,6), mas aumentaram significativamente na condição com urina de gato (média = 3,9), associando-se a elevado desvio-padrão (DP = 10,4).

O G3 evidenciou *grooming* discreto nos dias iniciais, com um pico pronunciado no Dia 3 (média = 4,2). O teste com urina apresentou *grooming* mais intenso (2,2) do que a condição sem urina (1,7), denotando reação emocional leve, porém consistente, ao estressor ambiental.

Por fim, o G4 demonstrou oscilação acentuada nos níveis de *grooming*, com aumento expressivo nos Dias 2 e 4 (médias de 3,6 e 5,0, respectivamente) e uma elevação marcante na condição com urina (média = 6,7; IQR = 8,5).

O gráfico a seguir ilustra esses dados:

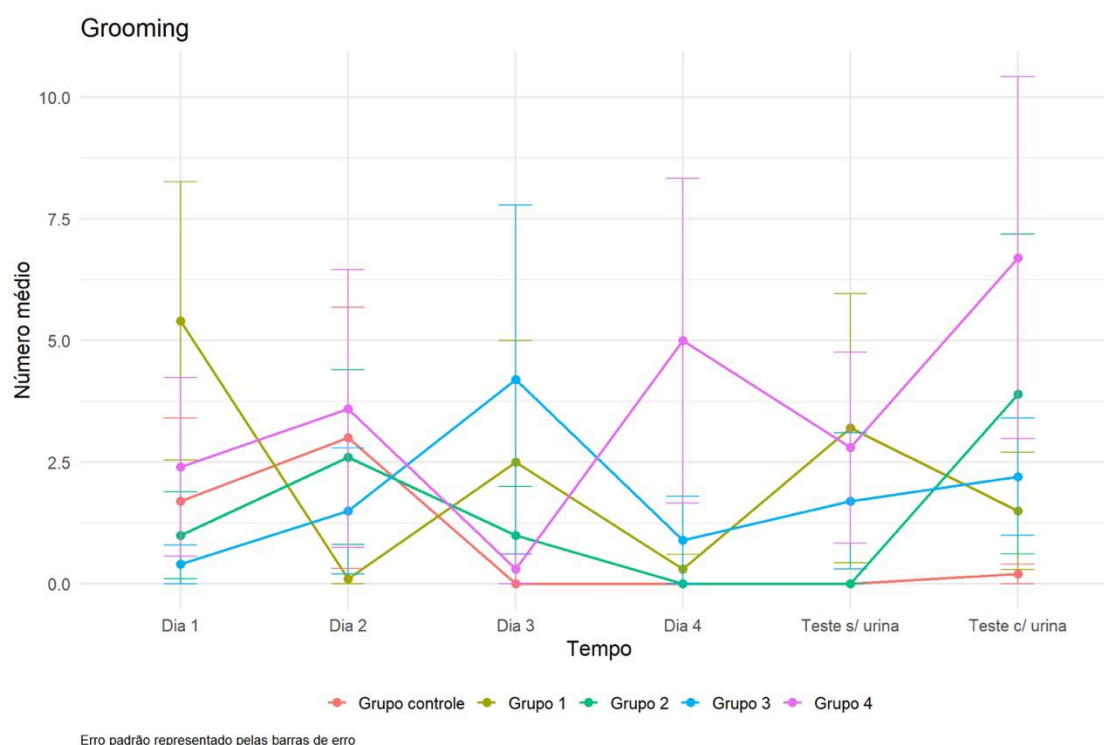


Figura 47 - Frequência de grooming no Labirinto de Barnes 2 (LB2). O gráfico representa a média do número de episódios de *grooming* (comportamento de auto-higiene) observados durante a realização do Labirinto de Barnes 2 (LB2), distribuídos ao longo de quatro dias de teste e duas fases adicionais com estímulo olfativo ausente ou presente (urina de gato). Os dados estão organizados conforme os cinco grupos experimentais: Grupo controle, Grupo 1 (*T. gondii* + placebo), Grupo 2 (*T. gondii* + probiótico), Grupo 3 (probiótico antes da infecção) e Grupo 4 (probiótico isolado). As barras de erro representam o erro padrão da média. Esse parâmetro é frequentemente associado à regulação emocional e ao estado ansioso, podendo indicar alterações comportamentais frente ao desafio espacial e estímulos ambientais.

O GC manteve níveis praticamente nulos de *grooming* em ambas as condições, com médias visivelmente próximas de zero.

Nos grupos experimentais (Grupos 1 a 4), o gráfico evidencia aumento notável do *grooming* na presença da urina de gato em comparação à condição neutra. O G4, em especial, apresentou o maior valor médio de *grooming* com urina entre todos os grupos, revelando alta vulnerabilidade emocional frente ao estímulo olfativo.

O Grupo 1, embora com menor magnitude, também apresentou *grooming* mais intenso com urina do que sem, ainda que a diferença seja menos marcada que nos demais grupos. Já o G3 manteve níveis moderados em ambas as condições, mas ainda demonstrando elevação sob estresse.

Para verificar a significância estatística dessas observações, foi ajustado um modelo linear generalizado misto com distribuição binomial negativa, incluindo efeitos fixos de grupo, condição (tempo em dias) e a interação entre ambos, bem como intercepto aleatório por animal.

A comparação entre o modelo aditivo (efeitos principais) e o modelo com interação foi realizada por meio do Teste de Razão de Verossimilhança (LRT). O modelo com interação apresentou pior ajuste em comparação ao modelo aditivo, e a diferença não foi estatisticamente significativa ($p = 0.9118$) (Quadro 71 – ANEXO 1).

Complementarmente, foi conduzida uma análise *post-hoc* de comparações múltiplas par a par com o objetivo de verificar quais pares específicos de grupos diferiram significativamente entre si em relação ao

comportamento de *grooming*, estratificando os dados por condição olfativa (com e sem urina de gato). Essa etapa foi realizada com base no modelo misto previamente ajustado, utilizando estimativas de diferença média, erros-padrão, estatísticas de teste (z) e respectivos valores de significância (Quadro 72 – ANEXO 1).

Os resultados revelaram que, apesar das diferenças aparentes observadas nas médias descritivas e nos gráficos, nenhuma das comparações par a par atingiu significância estatística ao nível convencional ($p < 0,05$). Ou seja, mesmo quando comparados dois a dois, os grupos experimentais não apresentaram diferenças estatisticamente robustas entre si quanto à expressão de *grooming*, nem na presença do estímulo olfativo ansiogênico nem na condição neutra.

7. Esquiva aversiva

As estatísticas descritivas da variável "tempo de esquiva" (em segundos), aferida nos grupos experimentais em três momentos distintos: sessão de treino, 210 minutos após o treino e 24 horas após o treino. O tempo de 30 dias não foi incluído nas análises estatísticas, pois todos os animais apresentaram desempenho máximo (300 segundos), impossibilitando o cálculo da variabilidade (Quadro 73 – ANEXO 1).

Durante o treino, todos os grupos exibiram latência média inferior a 80 segundos, indicando ausência de memória consolidada. O Grupo 4

apresentou valor médio mais elevado (79,5 s), com ampla variabilidade (DP = 62,92), sugerindo possível efeito antecipado do probiótico.

Na fase de memória de curto prazo (Pós 210 min), todos os grupos aumentaram significativamente a latência, com médias próximas de 300 segundos e desvios padrão muito reduzidos (ex.: DP = 0,0 para os Grupos Controle e 3), evidenciando aquisição robusta da esquiva.

Na avaliação da memória de longo prazo (Pós 24h), a latência média permaneceu elevada em todos os grupos. Os Grupos Controle, 2 e 3 mantiveram desempenho máximo (300 s), enquanto os Grupos 1 e 4 mostraram leve redução da média, com aumento da variabilidade intragrupo (DP = 59,4 e 63,2, respectivamente), sugerindo início de extinção da memória aversiva em parte dos animais.

Esse padrão de dados corrobora os achados inferenciais e será aprofundado nos testes estatísticos subsequentes.

A seguir, apresenta-se o gráfico com os tempos médios de latência nos três momentos avaliados, permitindo observar o desempenho de cada grupo ao longo das fases de aquisição, retenção e consolidação da memória aversiva.

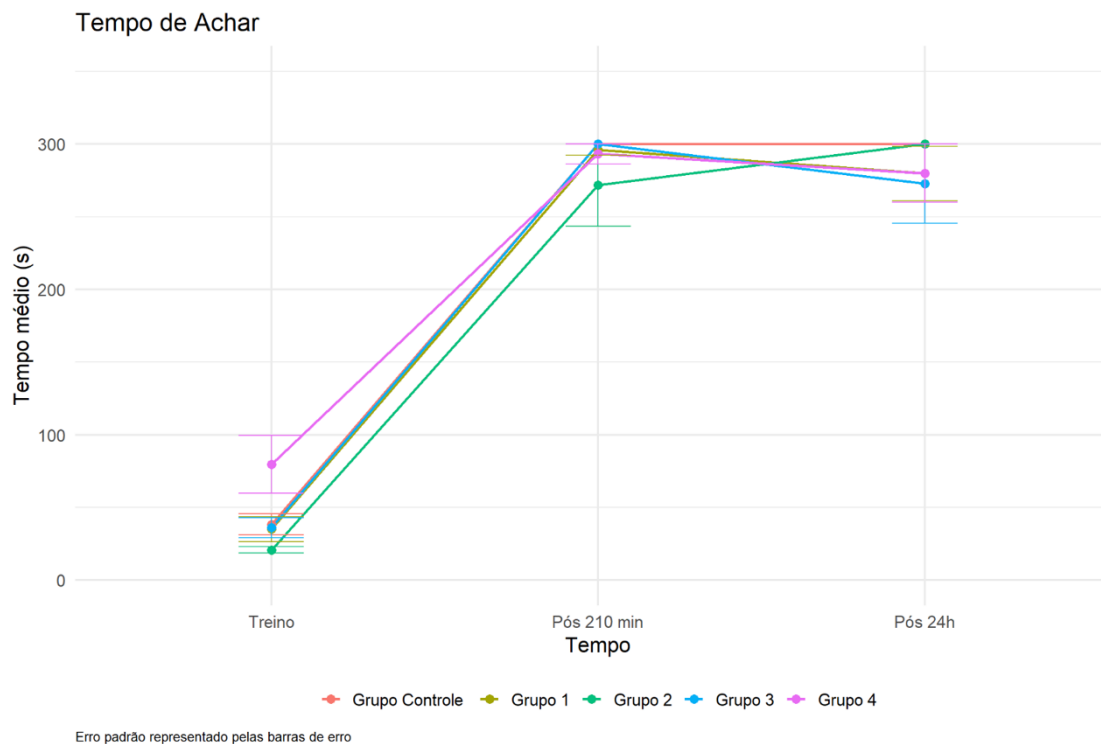


Figura 48 - O gráfico apresenta a latência média (em segundos) para a entrada no compartimento previamente associado ao estímulo aversivo (choque), utilizada como medida do desempenho na tarefa de esQUIVA. Foram avaliados cinco grupos experimentais ao longo de quatro momentos distintos: sessão de treino (aquisição), teste de memória de curto prazo (210 minutos após o treino), teste de memória de longo prazo (após 24 horas) e teste de memória remota (30 dias após o treino). A etapa de memória remota não está representada graficamente, pois todos os animais evitaram completamente o compartimento aversivo durante os 300 segundos de observação, resultando em ausência total de variabilidade e, conseqüentemente, impossibilitando a aplicação de testes estatísticos para esse ponto temporal.

A fim de avaliar os efeitos da condição experimental (tempo) e dos grupos experimentais sobre o desempenho na tarefa de esquiva aversiva, ajustou-se um modelo linear misto com intercepto aleatório por animal. A variável dependente foi a latência (em segundos) para entrada no compartimento previamente associado ao estímulo aversivo (Quadro 74 – ANEXO 1). O modelo incluiu como efeitos fixos os fatores grupo e condição (sem interação) e foi estimado por máxima verossimilhança restrita (REML), com graus de liberdade aproximados segundo *Satterthwaite*.

O intercepto aleatório indicou variabilidade moderada entre os animais (variância = 15.19), enquanto a variância residual foi elevada (1989.26), sugerindo considerável variação intraindividual ao longo das fases experimentais.

Entre os efeitos fixos, observou-se aumento significativo da latência nas fases pós 210 minutos ($\beta = 250.32$; $p < 0.001$) e Pós 24 horas ($\beta = 244.60$; $p < 0.001$), em comparação à fase de treino, evidenciando aquisição e consolidação da memória aversiva, independentemente do grupo experimental. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (todos $p > 0.05$), sugerindo que os tratamentos com *Toxoplasma gondii* e/ou *Lactobacillus rhamnosus* não exerceram efeito isolado sobre o desempenho na tarefa.

As comparações múltiplas entre os tempos experimentais, com ajuste de Tukey (Quadro 75 – ANEXO 1), confirmaram diferenças altamente significativas entre o treino e os testes Pós 210 minutos e Pós 24 horas ($p < 0.0001$), corroborando a aquisição da esquiva. Não houve diferença significativa

entre Pós 210 minutos e Pós 24 horas ($p = 0.7976$), indicando estabilidade da memória no intervalo de 24 horas.

V - Análise de metilação do promotor de AVP

Este capítulo tem por objetivo apresentar os resultados da análise da metilação da região promotora do gene da arginina-vasopressina (AVP), com foco nas alterações epigenéticas decorrentes da infecção por *Toxoplasma gondii* e no potencial efeito modulador do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* sobre esse processo. A abordagem experimental foi baseada na utilização de enzimas de restrição sensíveis à metilação (HpaII e BstUI), seguidas de quantificação por PCR em tempo real (MSRE-qPCR). As tabelas e gráficos apresentados a seguir sintetizam os dados obtidos para cada grupo experimental.

1. Análise com a enzima HpaII (sítio CCGG)

Para investigar possíveis variações nos níveis de metilação basal do DNA em condições fisiológicas, foi conduzido o teste de Mann-Whitney no GC, comparando animais tratados e não tratados com a enzima de restrição HpaII, sensível à metilação.

O teste não evidenciou diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos ($U = 36,5$; $p = 0,3245$). As medianas observadas foram bastante próximas: 22,21 no grupo não tratado e 22,40 no grupo tratado. A diferença absoluta entre as medianas foi de 0,1845, com estimativa de Hodges-Lehmann de 0,2000.

A enzima de restrição HpaII foi utilizada para avaliar alterações nos padrões de metilação do DNA no Grupo 1, composto por animais submetidos à infecção por *Toxoplasma gondii* sem intervenção probiótica. O teste de Mann-Whitney comparou animais tratados e não tratados com a enzima, a fim de verificar se a infecção isolada produziu efeitos epigenéticos detectáveis na região-alvo (Quadro 79 – ANEXO 1).

Os resultados não indicaram diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos ($U = 42$; $p = 0,5787$). As medianas foram muito semelhantes: 21,79 no grupo não tratado e 21,85 no grupo tratado. A diferença real entre as medianas foi de apenas 0,0595, com uma estimativa de Hodges-Lehmann de 0,0870.

No G2, que reuniu animais tratados com probiótico após a infecção por *Toxoplasma gondii*, foi aplicado o teste de Mann-Whitney para comparar os valores obtidos nos subgrupos com e sem digestão enzimática com HpaII.

O teste não revelou diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos ($U = 34$; $p = 0,2475$). As medianas foram similares: 22,24 no grupo não tratado e 22,37 no grupo tratado. A diferença real entre as medianas foi de 0,1265, com estimativa de Hodges-Lehmann de 0,1020 (Quadro 80 – ANEXO 1).

No G3, composto por animais que receberam o probiótico previamente à infecção por *Toxoplasma gondii*, foi realizada a análise estatística

da metilação por meio do teste de Mann-Whitney, comparando os subgrupos tratados e não tratados com a enzima de restrição HpaII.

Os resultados indicaram ausência de significância estatística na comparação entre os grupos ($U = 33,5$; $p = 0,2251$). As medianas observadas foram 22,31 para o grupo não tratado e 22,65 para o grupo tratado. A diferença absoluta entre as medianas foi de 0,3435, e a estimativa de Hodges-Lehmann foi de 0,2900 (Quadro 81 – ANEXO 1).

No G4, composto por animais que receberam apenas o probiótico, foi realizada uma análise comparativa entre os subgrupos tratados e não tratados com a enzima HpaII, sensível à metilação, utilizando o teste de Mann-Whitney.

Os resultados indicaram uma tendência estatística, embora não significativa, para maior digestibilidade no grupo tratado ($U = 26$; $p = 0,0719$). A mediana do grupo não tratado foi de 21,96, enquanto a do grupo tratado foi de 22,23. A diferença absoluta entre as medianas foi de 0,2710, com estimativa de Hodges-Lehmann de 0,2585 (Quadro 82 – ANEXO 1).

2. Análise com a enzima BstUI (sítio CGCG)

Para verificar possíveis diferenças na digestão do DNA com a enzima de restrição sensível à metilação BstUI, entre os animais do GC tratados e não tratados com a enzima, foi aplicado o teste não paramétrico de Mann-Whitney, considerando a distribuição dos dados e o tamanho amostral reduzido (Quadro 83 – ANEXO 1).

A análise revelou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois subgrupos ($U = 44$; $p = 0,6842$). As medianas foram praticamente idênticas entre os grupos: 23,85 para o grupo não tratado e 23,83 para o grupo tratado. A diferença absoluta entre as medianas foi de apenas -0,0165, com estimativa de Hodges-Lehmann de -0,1170. Esses resultados indicam que, dentro do GC, o tratamento com a enzima BstUI não alterou significativamente os níveis de digestão observados, sugerindo estabilidade nos padrões de metilação basal em condições fisiológicas.

No grupo de animais infectados com *Toxoplasma gondii* (G1) utilizou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney, adequado para amostras independentes com distribuição potencialmente não normal.

Os resultados demonstraram ausência de diferença estatisticamente significativa entre os dois subgrupos ($U = 38,5$; $p = 0,4040$). As medianas foram semelhantes, com 23,11 para o grupo não tratado e 23,18 para o grupo tratado, refletindo uma diferença real de apenas 0,0655. A estimativa de Hodges-Lehmann foi de -0,2450, o que corrobora a pequena magnitude da diferença observada (Quadro 84 – ANEXO 1).

Esses achados sugerem que, no contexto da infecção por *T. gondii*, a digestão com BstUI não revelou alterações detectáveis nos níveis de metilação, ao menos em termos de digestibilidade global do DNA na região avaliada, indicando que o tratamento enzimático não distinguiu subgrupos com metilação diferencial nesse ponto da análise.

Para o G2, que recebeu inoculação com *Toxoplasma gondii* e foi submetido ao tratamento com probiótico, aplicou-se o teste de Mann-Whitney, a fim de comparar os níveis de digestão enzimática entre os animais tratados e não tratados com BstUI.

O teste estatístico indicou ausência de significância estatística entre os grupos ($U = 28$; $p = 0,1051$). A mediana dos animais não tratados foi de 23,48, enquanto no grupo tratado foi de 23,18, resultando em uma diferença real de -0,3050. A estimativa de Hodges-Lehmann foi de -0,2960 (Quadro 85 – ANEXO 1).

No G3, composto por animais que receberam tratamento com probiótico antes da inoculação de *Toxoplasma gondii*, foi realizado o teste de Mann-Whitney com o objetivo de verificar diferenças nos padrões de digestão do DNA pela enzima de restrição sensível à metilação BstUI, entre animais tratados e não tratados com a enzima.

A análise não revelou diferença estatisticamente significativa entre os dois subgrupos ($U = 45$; $p = 0,7394$). As medianas foram próximas: 23,33 para os não tratados e 23,44 para os tratados, com uma diferença absoluta de 0,1135 e estimativa de Hodges-Lehmann de 0,1100. Esses resultados indicam ausência de modulação detectável na digestão enzimática do DNA nesse grupo experimental (Quadro 86 – ANEXO 1).

No G4, composto por animais que receberam exclusivamente o probiótico, sem inoculação por *Toxoplasma gondii*, foi realizada a análise do padrão de digestão do DNA com a enzima de restrição BstUI.

O teste de Mann-Whitney indicou ausência de diferença estatisticamente significativa entre os animais tratados e não tratados com a enzima ($U = 37$; $p = 0,3527$). As medianas dos grupos foram próximas: 23,28 no grupo não tratado e 23,09 no grupo tratado. A diferença absoluta entre as medianas foi de -0,1875, com estimativa de Hodges-Lehmann de -0,1910, o que reforça a homogeneidade entre os grupos.

Esses resultados sugerem que a infecção por *Toxoplasma gondii* não promoveu alterações significativas na metilação da região reconhecida pela enzima BstUI, indicando estabilidade epigenética nesse contexto experimental.

4. Análise gráfica de amplificação e curvas de dissociação

Os dados obtidos por PCR em tempo real foram acompanhados por gráficos de amplificação e curvas de dissociação, com o objetivo de verificar a qualidade das reações e interpretar visualmente o comportamento das amostras após digestão com enzimas sensíveis à metilação (Figuras 1, 2, 3, 4 e 5 – ANEXO 1).

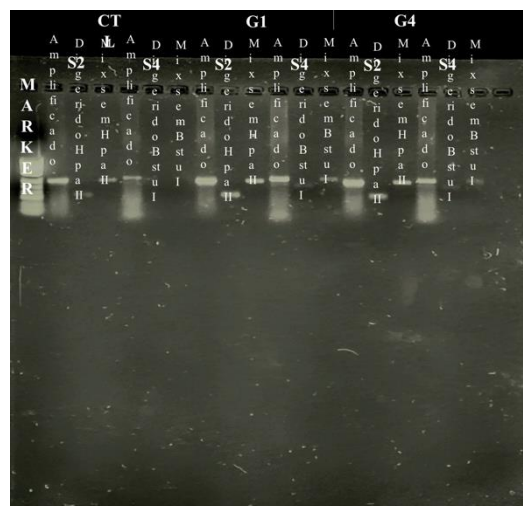


Figura 49 - Perfil de metilação do gene AVP em diferentes grupos experimentais.

Gel de eletroforese representando o padrão de digestão do DNA genômico após tratamento com enzima de restrição sensível à metilação, utilizado para análise epigenética da região promotora do gene AVP (arginina vasopressina). Estão representados os grupos Controle (CT), Grupo 1 (G1) e Grupo 4 (G4), cada um com diferentes amostras (S1 a S4). As colunas indicadas como A, D e M correspondem, respectivamente, à identificação do animal, à amostra de DNA e à amostra de DNA tratada com a enzima de restrição. A presença de bandas na fração "M" indica impedimento de digestão enzimática, o que sugere que a região está metilada. Por outro lado, a ausência de bandas após digestão indica regiões não metiladas, susceptíveis ao corte enzimático.

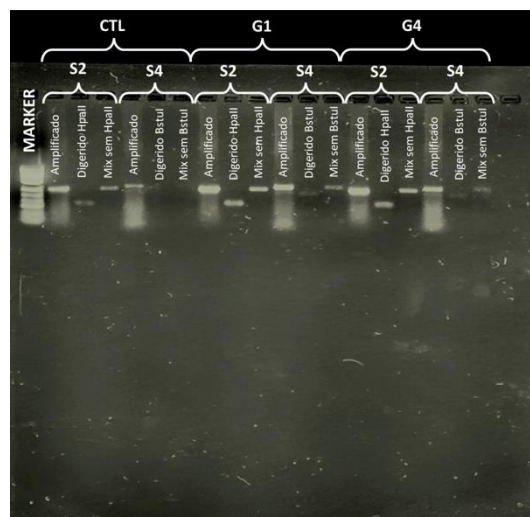


Figura 50 - Perfil de metilação do gene AVP utilizando as enzimas HpaII e BstUI nos grupos CTL, G1 e G4.

Imagem de gel de eletroforese apresentando a análise qualitativa da metilação do gene da arginina vasopressina (AVP), com o uso de duas enzimas de restrição sensíveis à metilação: HpaII e BstUI. As amostras foram divididas em três grupos experimentais — Controle (CTL), Grupo 1 (G1) e Grupo 4 (G4) — com dois indivíduos por grupo (S2 e S4). Cada conjunto inclui amostras amplificadas, digeridas com HpaII, digeridas com BstUI e controles negativos (mistura sem enzima).

A presença de bandas intensas nas amostras digeridas por HpaII ou BstUI sugere proteção contra a digestão, indicando regiões metiladas no DNA. Por outro lado, a ausência ou redução de bandas após digestão aponta para ausência de metilação nas regiões de reconhecimento das enzimas.

5. Discussão

Nos últimos anos, tem-se intensificado o debate acerca das potencialidades terapêuticas no tratamento de transtornos psiquiátricos, com destaque para o uso de probióticos como agentes promissores. Dentre eles, o *Lactobacillus rhamnosus* tem ganhado relevância por seus efeitos moduladores sobre o eixo microbiota–intestino–cérebro.

O presente estudo investigou os efeitos comportamentais e moleculares da infecção por *Toxoplasma gondii* e da administração do probiótico *L. rhamnosus* em diferentes paradigmas experimentais envolvendo roedores. Foram empregados modelos clássicos de ansiedade e cognição, como o Labirinto em Cruz Elevado (LCE), o Campo Aberto (CA), o Labirinto de Barnes (LB) e a Esquiva Aversiva (EA), além de análises epigenéticas voltadas para a metilação da região promotora do gene da vasopressina (AVP). Os achados permitem uma interpretação integrativa acerca da interação entre microrganismos, comportamento e plasticidade epigenética no contexto da neuroparasitologia.

Considerando que a ansiedade é uma emoção básica com importante valor adaptativo, associada à autopreservação e à antecipação de ameaças – sobretudo na defesa contra predadores – observou-se, no LCE, que a infecção crônica por *T. gondii* (G1) promoveu uma redução sustentada desse estado ansioso. Essa modulação foi evidenciada pelo aumento do tempo e do número de entradas nos braços abertos, maior incidência de comportamentos exploratórios (*rearing*, *head-dipping*) e redução dos escores de *grooming* e defecação. Tais achados estão de acordo com a literatura prévia, que sugere

que os efeitos do parasita comprometem a ansiedade natural dos hospedeiros, favorecendo a predação por felídeos – seus hospedeiros definitivos (7, 129).

A administração de *L. rhamnosus* produziu efeitos moduladores importantes, cuja natureza variou conforme o momento da intervenção. Quando aplicado antes da infecção (G3), o probiótico atenuou os efeitos ansiolíticos de *T. gondii*. O G2, tratado após a infecção, apresentou perfil intermediário. O Grupo 4 (G4), que recebeu apenas o probiótico e não foi infectado, funcionou em grande parte como um controle positivo, já que seu perfil comportamental foi praticamente indistinguível do grupo controle em quase todas as variáveis. A única divergência estatística entre G4 e GC foi observada no tempo gasto nos braços fechados durante a segunda sessão do LCE (LCE2). Esse achado isolado pode representar uma variável de confusão, uma vez que em todas as outras medidas o G4 reproduziu fielmente o comportamento do grupo controle. Assim, a administração de *L. rhamnosus* isoladamente em animais saudáveis não parece comprometer a homeostase emocional, reforçando sua adequação como grupo de referência em delineamentos experimentais.

Os dados do Campo Aberto corroboram os padrões anteriores: o G1 apresentou maior *rearing*, maior exploração central e cruzamento de quadrantes. Grupos que receberam o probiótico (G2 e G3) mostraram efeitos inibitórios sobre a atividade exploratória.

No Labirinto de Barnes, não houve efeito significativo sobre memória espacial entre os grupos na fase de teste, sugerindo que nem o parasita, nem o probiótico impactaram substancialmente os processos de aprendizagem espacial. No teste de Esquiva Aversiva, a retenção da memória

aversiva foi semelhante entre os grupos, o que sugere que os efeitos observados se concentram em aspectos espontâneos do comportamento emocional e exploratório, mais do que na memória aversiva condicionada.

Diversos mecanismos podem estar envolvidos nesses efeitos, como modulação inflamatória, alterações neuroquímicas e epigenéticas. *T. gondii* expressa enzimas semelhantes à tirosina-hidroxilase, aumentando dopamina em áreas como o estriado e núcleo accumbens, favorecendo comportamentos de aproximação e exploração (113, 178, 179). A infecção crônica também induz hipometilação do gene AVP na amígdala medial, promovendo sua superexpressão e alterando o processamento de pistas olfativas associadas ao medo inato⁽⁸⁾.

Pode-se levantar a hipótese de que esses mecanismos, atuando de forma integrada com a modulação da inflamação pela via NF- κ B, contribuam para a reversão da valência emocional observada nos animais infectados.

A via do fator nuclear kappa B (NF- κ B), reconhecidamente ativada por *Toxoplasma gondii* por meio de proteínas efetoras como a GRA15, induz a transcrição de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α e IL-6 (147). Em contrapartida, o probiótico *Lactobacillus rhamnosus* tem sido amplamente associado à inibição dessa via em diversos modelos experimentais, reduzindo a fosforilação da subunidade p65 e a degradação de I κ B α – eventos que culminam na menor expressão de mediadores inflamatórios (148, 149). Assim, a interação entre a ativação neuroimune desencadeada pelo parasita e a ação moduladora do probiótico sobre a sinalização inflamatória via NF- κ B pode estar na base da

atenuação dos comportamentos ansiosos observados, considerando o papel central da neuroinflamação na regulação dos estados emocionais.

Resultados similares foram descritos com outras cepas de *Lactobacillus*. Em estudo recente, *L. casei* demonstrou efeitos imunobiotic e paraprobiotic, reduzindo significativamente a carga parasitária, ativando macrófagos, e promovendo aumento de linfócitos T CD4⁺ e secreção de IFN- γ e TNF- α ⁽¹⁴⁰⁾. Já a combinação de *L. fermentum* e *L. delbrueckii* foi eficaz na proteção contra lesões hepáticas e intestinais, aumentando a resposta Th1 e suprimindo o dano oxidativo⁽¹³⁶⁾. Adicionalmente, *L. acidophilus* demonstrou benefício quando associado à espiamicina em modelos de toxoplasmose e diabetes, reduzindo a carga parasitária e a degeneração tecidual ⁽¹⁸⁰⁾.

O impacto dos probióticos também foi evidenciado em estudos de metagenômica funcional. Camundongos tratados com *Lactobacillus* apresentaram microbiota enriquecida em genes associados a ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e indóis, que promovem reforço das junções epiteliais e atenuação da inflamação, inclusive via downregulation de MyD88 e TLR4 ⁽¹⁸¹⁾.

As análises de metilação do promotor de AVP, conduzidas com as enzimas HpaII (sítio CCGG) e BstUI (sítio CGCG), não revelaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Contudo, a literatura sugere que o parasita pode induzir hipometilação nesse gene ⁽¹²⁹⁾. Essa discrepância pode estar relacionada a limitações amostrais ou à necessidade de avaliar outras regiões regulatórias.

Em síntese, a infecção por *T. gondii* induz fenótipo de baixa ansiedade, elevado comportamento exploratório e supressão autonômica. O *L. rhamnosus* exerce papel regulador, especialmente quando administrado de forma profilática, revertendo parcialmente os efeitos comportamentais do parasita. A integração desses dados aos achados da literatura sugere que os efeitos dos probióticos na toxoplasmose envolvem complexa rede de sinalização imunológica, metabólica e neuroepigenética, com implicações relevantes para distúrbios neuropsiquiátricos de base inflamatória ou infecciosa.

6. Conclusão

O presente estudo demonstrou que a administração de *Lactobacillus rhamnosus* exerce um papel modulador relevante sobre os efeitos comportamentais decorrentes da infecção crônica por *Toxoplasma gondii*.

Em paralelo, confirmou-se que a infecção crônica por esse parasita impacta de maneira significativa parâmetros comportamentais e neurobiológicos em ratos Wistar. Foram observadas alterações autonômicas, redução de indicadores de ansiedade e incremento do comportamento exploratório, corroborando a hipótese de que o *T. gondii* interfere em circuitos neurais relacionados ao medo e à resposta ao estresse.

A suplementação com *Lactobacillus rhamnosus* foi capaz de atenuar essas alterações induzidas pela infecção, revertendo parcialmente a supressão autonômica, normalizando o comportamento autoprotetivo e reduzindo manifestações ansiosas, além de inibir o excesso de comportamento

exploratório. Esse restabelecimento dos mecanismos de autodefesa contribui para a proteção do animal frente à predação, evidenciando a ação reguladora do probiótico no eixo microbiota–intestino–cérebro. Importa destacar que o efeito do *L. rhamnosus* mostrou-se mais consistente quando administrado profilaticamente, sugerindo que estratégias preventivas potencializam sua eficácia na modulação de respostas comportamentais.

De forma integrada, os achados sustentam a hipótese de que o *Lactobacillus rhamnosus* possui potencial para contrabalançar alterações neurocomportamentais associadas à infecção crônica por *T. gondii*, reforçando sua relevância translacional.

Mais amplamente, este trabalho confirma que o eixo microbiota–intestino–cérebro desempenha papel central na regulação de estados ansiosos e de comportamentos exploratórios. Além disso, aponta o *Lactobacillus rhamnosus* como candidato promissor em estratégias preventivas e terapêuticas voltadas a distúrbios neuropsiquiátricos associados a processos inflamatórios e infecciosos, consolidando a importância da interface entre neurociência, microbiologia e psiquiatria translacional.

Referências

1. Rahaman S, Govil P, Khan D, Jevremov TD. A 30-year bibliometric assessment and visualisation of emotion regulation research: applying network analysis and cluster analysis. *Information Discovery and delivery*. 2024;52(1):85-100.
2. Cryan JF, Dinan TG. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nature reviews neuroscience*. 2012;13(10):701-12.
3. Xu Y, Ren Y, Shao S, Chen X. Research trends on the gut-brain axis: A bibliometric analysis. *Asian journal of surgery*. 2025:S1015-9584 (24) 01834-7.
4. Parija SC. Neuroparasitology-A New Horizon. *Medknow*; 2023. p. 71-2.
5. Hughes DP, Libersat F. Neuroparasitology of parasite–insect associations. *Annual Review of Entomology*. 2018;63(1):471-87.
6. Vyas A, Kim S-K, Giacomini N, Boothroyd JC, Sapolsky RM. Behavioral changes induced by *Toxoplasma* infection of rodents are highly specific to aversion of cat odors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(15):6442-7.
7. Gonzalez LE, Rojnik B, Urrea F, Urdaneta H, Petrosino P, Colasante C, et al. *Toxoplasma gondii* infection lower anxiety as measured in the plus-maze and social interaction tests in rats: a behavioral analysis. *Behavioural brain research*. 2007;177(1):70-9.
8. Hari Dass SA, Vyas A. *Toxoplasma gondii* infection reduces predator aversion in rats through epigenetic modulation in the host medial amygdala. *Molecular ecology*. 2014;23(24):6114-22.
9. Bravo JA, Forsythe P, Chew MV, Escaravage E, Savignac HM, Dinan TG, et al. Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(38):16050-5.
10. Slykerman R, Hood F, Wickens K, Thompson J, Barthow C, Murphy R, et al. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* HN001 in pregnancy on postpartum symptoms of depression and anxiety: a randomised double-blind placebo-controlled trial. *EBioMedicine*. 2017;24:159-65.
11. Dinan TG, Stanton C, Cryan JF. Psychobiotics: a novel class of psychotropic. *Biological psychiatry*. 2013;74(10):720-6.
12. Chen J, Zhang C, Yang Z, Wu W, Zou W, Xin Z, et al. Intestinal microbiota imbalance resulted by anti-*Toxoplasma gondii* immune responses aggravate gut and brain injury. *Parasites & Vectors*. 2024;17(1):284.
13. Prandovszky E, Severance EG, Splan VW, Liu H, Xiao J, Yolken RH. *Toxoplasma*-induced behavior changes-is microbial dysbiosis the missing link? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2024;14:1415079.
14. Adolphs R. How should neuroscience study emotions? By distinguishing emotion states, concepts, and experiences. *Social cognitive and affective neuroscience*. 2017;12(1):24-31.
15. Fredrickson BL. The role of positive emotions in positive psychology: The broaden-and-build theory of positive emotions. *American psychologist*. 2001;56(3):218.
16. Lang PJ, Bradley MM, Cuthbert BN. Emotion, motivation, and anxiety: Brain mechanisms and psychophysiology. *Biological psychiatry*. 1998;44(12):1248-63.
17. Baumeister RF, Leary MR. The need to belong: Desire for interpersonal attachments as a fundamental human motivation. *Interpersonal development*. 2017:57-89.

18. Keltner D, Haidt J. Social functions of emotions at four levels of analysis. *Cognition & Emotion*. 1999;13(5):505-21.
19. LeDoux JE. Emotion circuits in the brain. *Fear and anxiety*. 2013;259-88.
20. Davis M, Whalen PJ. The amygdala: vigilance and emotion. *Molecular psychiatry*. 2001;6(1):13-34.
21. Sylvers P, Lilienfeld SO, LaPrairie JL. Differences between trait fear and trait anxiety: Implications for psychopathology. *Clinical psychology review*. 2011;31(1):122-37.
22. Blanchard DC, Griebel G, Blanchard RJ. The Mouse Defense Test Battery: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *European journal of pharmacology*. 2003;463(1-3):97-116.
23. Korte SM, De Boer SF, Bohus B. Fear-potential in the elevated plus-maze test depends on stressor controllability and fear conditioning. *Stress*. 1999;3(1):27-40.
24. Rodgers R, Dalvi A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 1997;21(6):801-10.
25. Suchecki D, Tiba P, Tufik S. Hormonal and behavioural responses of paradoxical sleep-deprived rats to the elevated plus maze. *Journal of neuroendocrinology*. 2002;14(7):549-54.
26. Lebow MA, Chen A. Overshadowed by the amygdala: the bed nucleus of the stria terminalis emerges as key to psychiatric disorders. *Molecular psychiatry*. 2016;21(4):450-63.
27. Grupe DW, Nitschke JB. Uncertainty and anticipation in anxiety: an integrated neurobiological and psychological perspective. *Nature Reviews Neuroscience*. 2013;14(7):488-501.
28. Sah P, Faber EL, Lopez de Armentia M, Power J. The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiological reviews*. 2003;83(3):803-34.
29. Kandel E, Schwartz J, Jessell T, Siegelbaum S, Hudspeth AJ. *Princípios de neurociências-5*: AMGH Editora; 2014.
30. Blaser MJ. The microbiome revolution. *The Journal of clinical investigation*. 2014;124(10):4162-5.
31. Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell*. 2012;148(6):1258-70.
32. Falony G, Joossens M, Vieira-Silva S, Wang J, Darzi Y, Faust K, et al. Population-level analysis of gut microbiome variation. *Science*. 2016;352(6285):560-4.
33. Salvardi M, Rosso G. Update on the gut microbiome in health and diseases. *World Journal of Methodology*. 2024;14(1):89196.
34. Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, Franceschi F, Miggiano GAD, Gasbarrini A, et al. What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. *Microorganisms*. 2019;7(1):14.
35. Cao Q, Shen M, Li R, Liu Y, Zeng Z, Zhou J, et al. Elucidating the specific mechanisms of the gut-brain axis: the short-chain fatty acids-microglia pathway. *Journal of Neuroinflammation*. 2025;22(1):1-23.
36. Dalile B, Van Oudenhove L, Vervliet B, Verbeke K. The role of short-chain fatty acids in microbiota-gut-brain communication. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2019;16(8):461-78.
37. Van Hul M, Cani PD, Petitfils C, De Vos WM, Tilg H, El-Omar EM. What defines a healthy gut microbiome? *Gut*. 2024;73(11):1893-908.
38. Silva YP, Bernardi A, Frozza RL. The role of short-chain fatty acids from gut microbiota in gut-brain communication. *Frontiers in endocrinology*. 2020;11:508738.

39. Lim ES, Rodriguez C, Holtz LR. Amniotic fluid from healthy term pregnancies does not harbor a detectable microbial community. *Microbiome*. 2018;6(1):87.
40. Liu Y, Ma J, Li X, Zhao H, Ai Q, Zhang L, et al. No microorganism was detected in amniotic fluid of healthy pregnancies from the second trimester to the delivery. *Microbiome*. 2025;13(1):20.
41. Stinson LF, Boyce MC, Payne MS, Keelan JA. The not-so-sterile womb: evidence that the human fetus is exposed to bacteria prior to birth. *Frontiers in microbiology*. 2019;10:1124.
42. Collado MC, Rautava S, Aakko J, Isolauri E, Salminen S. Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. *Scientific reports*. 2016;6(1):1-13.
43. Suárez-Martínez C, Santaella-Pascual M, Yagüe-Guirao G, Martínez-Graciá C. Infant gut microbiota colonization: influence of prenatal and postnatal factors, focusing on diet. *Frontiers in microbiology*. 2023;14:1236254.
44. Miller C, Luu K, Mikami B, Riel J, Qin Y, Khadka V, et al. Temporal investigation of the maternal origins of fetal gut microbiota. *Microorganisms*. 2024;12(9):1865.
45. Kim Y-H, Lee Ty, Kim H-Y, Jeong SJ, Han JH, Shin JE, et al. Natal factors influencing newborn's oral microbiome diversity. *Scientific Reports*. 2024;14(1):28161.
46. Kuziel GA, Rakoff-Nahoum S. The gut microbiome. *Current Biology*. 2022;32(6):R257-R64.
47. Magne F, Gotteland M, Gauthier L, Zazueta A, Pessoa S, Navarrete P, et al. The firmicutes/bacteroidetes ratio: a relevant marker of gut dysbiosis in obese patients? *Nutrients*. 2020;12(5):1474.
48. Fujio-Vejar S, Vasquez Y, Morales P, Magne F, Vera-Wolf P, Ugalde JA, et al. The gut microbiota of healthy Chilean subjects reveals a high abundance of the phylum Verrucomicrobia. *Frontiers in microbiology*. 2017;8:1221.
49. Afzaal M, Saeed F, Shah YA, Hussain M, Rabail R, Socol CT, et al. Human gut microbiota in health and disease: Unveiling the relationship. *Frontiers in microbiology*. 2022;13:999001.
50. Lloyd-Price J, Mahurkar A, Rahnavard G, Crabtree J, Orvis J, Hall AB, et al. Strains, functions and dynamics in the expanded Human Microbiome Project. *Nature*. 2017;550(7674):61-6.
51. Nam Y-D, Jung M-J, Roh SW, Kim M-S, Bae J-W. Comparative analysis of Korean human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. *PloS one*. 2011;6(7):e22109.
52. Barka EA, Vatsa P, Sanchez L, Gaveau-Vaillant N, Jacquard C, Klenk H-P, et al. Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiology and molecular biology reviews*. 2016;80(1):1-43.
53. O'callaghan A, Van Sinderen D. Bifidobacteria and their role as members of the human gut microbiota. *Frontiers in microbiology*. 2016;7:925.
54. Hill C, Lynch D, Murphy K, Ulaszewska M, Jeffery I, O'shea C, et al. Evolution of gut microbiota composition from birth to 24 weeks in the INFANTMET Cohort. *Microbiome* 5: 4. Holmes, D(2012) Europe plays catch-up on neonatal screening as US skips ahead, *Nature Medicine*. 2017;18(11):1596.
55. Holmes D. Europe plays catch-up on neonatal screening as US skips ahead. *Nature Medicine*. 2012;18(11):1596.
56. Rizzatti G, Lopetuso L, Gibiino G, Binda C, Gasbarrini A. Proteobacteria: a common factor in human diseases. *BioMed research international*. 2017;2017(1):9351507.

57. Litvak Y, Bäumlér AJ. Microbiota-nourishing immunity: a guide to understanding our microbial self. *Immunity*. 2019;51(2):214-24.
58. Zhou K. Strategies to promote abundance of *Akkermansia muciniphila*, an emerging probiotics in the gut, evidence from dietary intervention studies. *Journal of functional foods*. 2017;33:194-201.
59. Zhang T, Li Q, Cheng L, Buch H, Zhang F. *Akkermansia muciniphila* is a promising probiotic. *Microbial biotechnology*. 2019;12(6):1109-25.
60. de Vos WM, de Vos EA. Role of the intestinal microbiome in health and disease: from correlation to causation. *Nutrition reviews*. 2012;70(suppl_1):S45-S56.
61. Liang S, Wu X, Jin F. Gut-brain psychology: rethinking psychology from the microbiota-gut-brain axis. *Frontiers in integrative neuroscience*. 2018;12:33.
62. Lach G, Schellekens H, Dinan TG, Cryan JF. Anxiety, depression, and the microbiome: a role for gut peptides. *Neurotherapeutics*. 2018;15(1):36-59.
63. Bonaz B, Bazin T, Pellissier S. The vagus nerve at the interface of the microbiota-gut-brain axis. *Frontiers in neuroscience*. 2018;12:49.
64. Cryan JF, O'Riordan KJ, Cowan CS, Sandhu KV, Bastiaanssen TF, Boehme M, et al. The microbiota-gut-brain axis. *Physiological reviews*. 2019.
65. Bercik P, Park A, Sinclair D, Khoshdel A, Lu J, Huang X, et al. The anxiolytic effect of *Bifidobacterium longum* NCC3001 involves vagal pathways for gut-brain communication. *Neurogastroenterology & Motility*. 2011;23(12):1132-9.
66. Chandra S, Sisodia SS, Vassar RJ. The gut microbiome in Alzheimer's disease: what we know and what remains to be explored. *Molecular neurodegeneration*. 2023;18(1):9.
67. Sampson TR, Debelius JW, Thron T, Janssen S, Shastri GG, Ilhan ZE, et al. Gut microbiota regulate motor deficits and neuroinflammation in a model of Parkinson's disease. *cell*. 2016;167(6):1469-80. e12.
68. Blacher E, Bashiardes S, Shapiro H, Rothschild D, Mor U, Dori-Bachash M, et al. Potential roles of gut microbiome and metabolites in modulating ALS in mice. *Nature*. 2019;572(7770):474-80.
69. Berer K, Gerdes LA, Cekanaviciute E, Jia X, Xiao L, Xia Z, et al. Gut microbiota from multiple sclerosis patients enables spontaneous autoimmune encephalomyelitis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017;114(40):10719-24.
70. Kong G, Lê Cao K-A, Judd LM, Li S, Renoir T, Hannan AJ. Microbiome profiling reveals gut dysbiosis in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Neurobiology of Disease*. 2020;135:104268.
71. Liu L, Wang H, Chen X, Zhang Y, Zhang H, Xie P. Gut microbiota and its metabolites in depression: from pathogenesis to treatment. *EBioMedicine*. 2023;90.
72. Butler MI, Bastiaanssen TF, Long-Smith C, Morkl S, Berding K, Ritz NL, et al. The gut microbiome in social anxiety disorder: evidence of altered composition and function. *Translational Psychiatry*. 2023;13(1):95.
73. Chelakkot C, Ghim J, Ryu SH. Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. *Experimental & molecular medicine*. 2018;50(8):1-9.
74. Carabotti M, Scirocco A, Maselli MA, Severi C. The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. *Annals of gastroenterology: quarterly publication of the Hellenic Society of Gastroenterology*. 2015;28(2):203.
75. Bercik P, Collins S, Verdu E. Microbes and the gut-brain axis. *Neurogastroenterology & Motility*. 2012;24(5):405-13.

76. Kelly JR, Kennedy PJ, Cryan JF, Dinan TG, Clarke G, Hyland NP. Breaking down the barriers: the gut microbiome, intestinal permeability and stress-related psychiatric disorders. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2015;9:392.
77. Erny D, Hrabě de Angelis AL, Jaitin D, Wieghofer P, Staszewski O, David E, et al. Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nature neuroscience*. 2015;18(7):965-77.
78. De Palma G, Blennerhassett P, Lu J, Deng Y, Park A, Green W, et al. Microbiota and host determinants of behavioural phenotype in maternally separated mice. *Nature communications*. 2015;6(1):7735.
79. McVey Neufeld K, Mao Y, Bienenstock J, Foster J, Kunze W. The microbiome is essential for normal gut intrinsic primary afferent neuron excitability in the mouse. *Neurogastroenterology & Motility*. 2013;25(2):183-e88.
80. Strandwitz P. Neurotransmitter modulation by the gut microbiota. *Brain research*. 2018;1693:128-33.
81. Furness JB. The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2012;9(5):286-94.
82. Liu RT, Walsh RF, Sheehan AE. Prebiotics and probiotics for depression and anxiety: a systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2019;102:13-23.
83. Salminen S, Collado MC, Endo A, Hill C, Lebeer S, Quigley EM, et al. The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2021;18(9):649-67.
84. Rastogi S, Singh A. Gut microbiome and human health: Exploring how the probiotic genus *Lactobacillus* modulate immune responses. *Frontiers in Pharmacology*. 2022;13:1042189.
85. Segers ME, Lebeer S. Towards a better understanding of *Lactobacillus rhamnosus* GG-host interactions. *Microbial cell factories*. 2014;13(Suppl 1):S7.
86. Yan F, Polk DB. Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *Journal of biological chemistry*. 2002;277(52):50959-65.
87. Hojsak I, Abdović S, Szajewska H, Milošević M, Krznarić Ž, Kolaček S. *Lactobacillus* GG in the prevention of nosocomial gastrointestinal and respiratory tract infections. *Pediatrics*. 2010;125(5):e1171-e7.
88. Kalliomäki M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P, Isolauri E. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *The Lancet*. 2001;357(9262):1076-9.
89. Pedersen N, Andersen NN, Végh Z, Jensen L, Ankersen DV, Felding M, et al. Ehealth: low FODMAP diet vs *Lactobacillus rhamnosus* GG in irritable bowel syndrome. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2014;20(43):16215.
90. Steenbergen L, Sellaro R, van Hemert S, Bosch JA, Colzato LS. A randomized controlled trial to test the effect of multispecies probiotics on cognitive reactivity to sad mood. *Brain, behavior, and immunity*. 2015;48:258-64.
91. Dinan TG, Cryan JF. Gut microbiota: a missing link in psychiatry. *World Psychiatry*. 2020;19(1):111.
92. Li Y, Yang S, Lun J, Gao J, Gao X, Gong Z, et al. Inhibitory effects of the *Lactobacillus rhamnosus* GG effector protein HM0539 on inflammatory response through the TLR4/MyD88/NF- κ B axis. *Frontiers in Immunology*. 2020;11:551449.
93. Khairullah AR, Kurniawan SC, Widodo A, Effendi MH, Hasib A, Silaen OSM, et al. A comprehensive review of toxoplasmosis: Serious threat to human health. *The Open Public Health Journal*. 2024;17(1).

94. Gowda V, Dinesh S, Sharma S. Manipulative neuroparasites: uncovering the intricacies of neurological host control. *Archives of Microbiology*. 2023;205(9):314.
95. Delgado IL, Zúquete S, Santos D, Basto AP, Leitão A, Nolasco S. The apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Encyclopedia*. 2022;2(1):189-211.
96. Rahdar M, Farbod Y, Seydinejad S, Zarrin M. The effect of chronic experimental toxoplasmosis on some brain neurotransmitters level and behavior changes. *Experimental Parasitology*. 2023;251:108575.
97. Dubey J, Lindsay D, Speer C. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clinical microbiology reviews*. 1998;11(2):267-99.
98. Fallahi S, Rostami A, Nourollahpour Shiadeh M, Behniafar H, Paktinat S. An updated literature review on maternal-fetal and reproductive disorders of *Toxoplasma gondii* infection. *J Gynecol Obstet Hum Reprod*. 2018;47(3):133-40.
99. Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol*. 2000;30(12-13):1217-58.
100. Matta SK, Rinkenberger N, Dunay IR, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* infection and its implications within the central nervous system. *Nature Reviews Microbiology*. 2021;19(7):467-80.
101. Berenreiterová M, Flegr J, Kuběna AA, Němec P. The distribution of *Toxoplasma gondii* cysts in the brain of a mouse with latent toxoplasmosis: implications for the behavioral manipulation hypothesis. *PloS one*. 2011;6(12):e28925.
102. Miyazaki M, Yamashita T, Suzuki Y, Saito Y, Soeta S, Taira H, et al. A major urinary protein of the domestic cat regulates the production of feline, a putative pheromone precursor. *Chemistry & Biology*. 2006;13(10):1071-9.
103. Berdoy M, Webster JP, Macdonald DW. Fatal attraction in rats infected with *Toxoplasma gondii*. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*. 2000;267(1452):1591-4.
104. House PK, Vyas A, Sapolsky R. Predator cat odors activate sexual arousal pathways in brains of *Toxoplasma gondii* infected rats. *PloS one*. 2011;6(8):e23277.
105. Wang X, Qu L, Chen J, Jin Y, Hu K, Zhou Z, et al. *Toxoplasma* rhoptry proteins that affect encephalitis outcome. *Cell Death Discovery*. 2023;9(1):439.
106. Venugopal K, Chehade S, Werkmeister E, Barois N, Periz J, Lafont F, et al. Rab11A regulates dense granule transport and secretion during *Toxoplasma gondii* invasion of host cells and parasite replication. *PLoS Pathogens*. 2020;16(5):e1008106.
107. Tomita T, Bzik DJ, Ma YF, Fox BA, Markillie LM, Taylor RC, et al. The *Toxoplasma gondii* cyst wall protein CST1 is critical for cyst wall integrity and promotes bradyzoite persistence. *PLoS pathogens*. 2013;9(12):e1003823.
108. Waldman BS, Schwarz D, Wadsworth MH, Saeij JP, Shalek AK, Lourido S. Identification of a master regulator of differentiation in *Toxoplasma*. *Cell*. 2020;180(2):359-72. e16.
109. Zhao X-Y, Ewald SE. The molecular biology and immune control of chronic *Toxoplasma gondii* infection. *The Journal of clinical investigation*. 2020;130(7):3370-80.
110. Eberhard JN, Shallberg LA, Winn A, Chandrasekaran S, Giuliano CJ, Merritt EF, et al. Immune targeting and host-protective effects of the latent stage of *Toxoplasma gondii*. *Nature Microbiology*. 2025:1-14.
111. Haroon F, Händel U, Angenstein F, Goldschmidt J, Kreutzmann P, Lison H, et al. *Toxoplasma gondii* actively inhibits neuronal function in chronically infected mice. *PLoS One*. 2012;7(4):e35516.

112. Dellacasa-Lindberg I, Fuks JM, Arrighi RB, Lambert H, Wallin RP, Chambers BJ, et al. Migratory activation of primary cortical microglia upon infection with *Toxoplasma gondii*. *Infection and immunity*. 2011;79(8):3046-52.
113. Lüder CG, Giraldo-Velásquez M, Sendtner M, Gross U. *Toxoplasma gondii* in primary rat CNS cells: differential contribution of neurons, astrocytes, and microglial cells for the intracerebral development and stage differentiation. *Experimental parasitology*. 1999;93(1):23-32.
114. Stibbs H. Changes in brain concentrations of catecholamines and indoleamines in *Toxoplasma gondii* infected mice. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*. 1985;79(2):153-7.
115. Höglund E, Øverli Ø, Winberg S. Tryptophan metabolic pathways and brain serotonergic activity: a comparative review. *Front Endocrinol* 10: 158. 2019.
116. SM S. Stahl SM. *Psicofarmacologia: bases neurocientíficas e aplicações práticas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2022.
117. Brooks JM, Carrillo GL, Su J, Lindsay DS, Fox MA, Blader IJ. *Toxoplasma gondii* infections alter GABAergic synapses and signaling in the central nervous system. *MBio*. 2015;6(6):10.1128/mbio. 01428-15.
118. Chandrasekaran S, Kochanowsky JA, Merritt EF, Lagas JS, Swannigan A, Koshy AA. IFN- γ stimulated murine and human neurons mount anti-parasitic defenses against the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *Nature communications*. 2022;13(1):4605.
119. Everett A, Elsheikha HM. Neuroinflammation and schizophrenia: The role of *Toxoplasma gondii* infection and astrocytic dysfunction. *Journal of Neuroimmunology*. 2025;403:578588.
120. Moghaddami R, Mahdipour M, Ahmadpour E. Inflammatory pathways of *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy. *Travel Medicine and Infectious Disease*. 2024;62:102760.
121. Xiao J, Li Y, Rowley T, Huang J, Yolken RH, Viscidi RP. Immunotherapy targeting the PD-1 pathway alleviates neuroinflammation caused by chronic *Toxoplasma* infection. *Scientific reports*. 2023;13(1):1288.
122. Gigley JP, Fox BA, Bzik DJ. Cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii* develops primarily by local Th1 host immune responses in the absence of parasite replication. *The Journal of Immunology*. 2009;182(2):1069-78.
123. Wilson EH, Hunter CA. The role of astrocytes in the immunopathogenesis of toxoplasmic encephalitis. *International journal for parasitology*. 2004;34(5):543-8.
124. Rotondo F, Butz H, Syro LV, Yousef GM, Di Ieva A, Restrepo LM, et al. Arginine vasopressin (AVP): a review of its historical perspectives, current research and multifunctional role in the hypothalamo-hypophysial system. *Pituitary*. 2016;19:345-55.
125. Guyton A, Hall J. *Tratado de Fisiologia Médica* (Vol. 13ª edição). Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda; 2006.
126. Proczka M, Przybylski J, Cudnoch-Jędrzejewska A, Szczepańska-Sadowska E, Żera T. Vasopressin and breathing: review of evidence for respiratory effects of the antidiuretic hormone. *Frontiers in Plant Science*. 2021;12:744177.
127. Bankir L, Bichet DG, Morgenthaler NG. Vasopressin: physiology, assessment and osmosensation. *Journal of internal medicine*. 2017;282(4):284-97.
128. Hernández VS, Hernández OR, Perez de la Mora M, Gómora MJ, Fuxe K, Eiden LE, et al. Hypothalamic vasopressinergic projections innervate central amygdala GABAergic neurons: implications for anxiety and stress coping. *Frontiers in neural circuits*. 2016;10:92.

129. Tong WH, Abdulai-Saiku S, Vyas A. Arginine vasopressin in the medial amygdala causes greater post-stress recruitment of hypothalamic vasopressin neurons. *Molecular Brain*. 2021;14:1-5.
130. Singh DK, Hari Dass SA, Abdulai-Saiku S, Vyas A. Testosterone acts within the medial amygdala of rats to reduce innate fear to predator odor akin to the effects of *Toxoplasma gondii* infection. *Frontiers in Psychiatry*. 2020;11:630.
131. Tong WH, Pavey C, O'Handley R, Vyas A. Behavioral biology of *Toxoplasma gondii* infection. *Parasites & Vectors*. 2021;14:1-6.
132. Flegr J, Markoš A. Masterpiece of epigenetic engineering—how *Toxoplasma gondii* reprogrammes host brains to change fear to sexual attraction. *Wiley Online Library*; 2014.
133. Berger SL, Kouzarides T, Shiekhata R, Shilatifard A. An operational definition of epigenetics. *Genes & development*. 2009;23(7):781-3.
134. Cheeseman K, Weitzman JB. Host–parasite interactions: an intimate epigenetic relationship. *Cellular Microbiology*. 2015;17(8):1121-32.
135. Lim A, Kumar V, Hari Dass SA, Vyas A. *Toxoplasma gondii* infection enhances testicular steroidogenesis in rats. *Molecular ecology*. 2013;22(1):102-10.
136. Almallah TM, Khedr SI, El Nouby KA, Younis SS, Elazeem MA, Elmehy DA. The synergetic potential of *Lactobacillus delbrueckii* and *Lactobacillus fermentum* probiotics in alleviating the outcome of acute toxoplasmosis in mice. *Parasitology Research*. 2023;122(4):927-37.
137. Azad MAK, Sarker M, Wan D. Immunomodulatory effects of probiotics on cytokine profiles. *BioMed research international*. 2018;2018(1):8063647.
138. Ehrlich AM, Pacheco AR, Henrick BM, Taft D, Xu G, Huda MN, et al. Indole-3-lactic acid associated with *Bifidobacterium*-dominated microbiota significantly decreases inflammation in intestinal epithelial cells. *BMC microbiology*. 2020;20:1-13.
139. Yu K, Li Q, Sun X, Peng X, Tang Q, Chu H, et al. Bacterial indole-3-lactic acid affects epithelium–macrophage crosstalk to regulate intestinal homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2023;120(45):e2309032120.
140. Martínez-Gómez F, García-González LF, Mondragón-Flores R, Bautista-Garfias CR. Protection against *Toxoplasma gondii* brain cyst formation in mice immunized with *Toxoplasma gondii* cytoskeleton proteins and *Lactobacillus casei* as adjuvant. *Veterinary parasitology*. 2009;160(3-4):311-5.
141. Murgatroyd C, Patchev AV, Wu Y, Micale V, Bockmühl Y, Fischer D, et al. Dynamic DNA methylation programs persistent adverse effects of early-life stress. *Nature neuroscience*. 2009;12(12):1559-66.
142. Murgatroyd C, Spengler D. Epigenetics of early child development. *Frontiers in psychiatry*. 2011;2:16.
143. Fulneček J, Kovařík A. How to interpret methylation sensitive amplified polymorphism (MSAP) profiles? *BMC genetics*. 2014;15:1-9.
144. Roberts RJ, Macelis D. REBASE--restriction enzymes and methylases. *Nucleic acids research*. 1993;21(13):3125.
145. Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of neuroscience methods*. 1985;14(3):149-67.
146. Pinto WBVdR, Ko GM, Valero-Lapchik VB, Ariza CB, Porcionatto M. Teste de labirinto em cruz elevado: aplicações e contribuições no estudo de doenças neuropsiquiátricas em modelos animais. *Rev Soc Bras Ciênc Anim Lab*. 2012:102-20.
147. Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature protocols*. 2007;2(2):322-8.

148. Carobrez A, Bertoglio L. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2005;29(8):1193-205.
149. Walf AA, Frye CA. A review and update of mechanisms of estrogen in the hippocampus and amygdala for anxiety and depression behavior. *Neuropsychopharmacology*. 2006;31(6):1097-111.
150. Handley SL, Mithani S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 1984;327(1):1-5.
151. Kraeuter A-K, Guest PC, Sarnyai Z. The open field test for measuring locomotor activity and anxiety-like behavior. *Pre-clinical models: techniques and protocols*: Springer; 2018. p. 99-103.
152. Hall CS. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *Journal of Comparative psychology*. 1934;18(3):385.
153. Whimbey AE, Denenberg VH. Two independent behavioral dimensions in open-field performance. *Journal of comparative and physiological psychology*. 1967;63(3):500.
154. Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European journal of pharmacology*. 2003;463(1-3):3-33.
155. Walsh RN, Cummins RA. The open-field test: a critical review. *Psychological bulletin*. 1976;83(3):482.
156. Seibenhener ML, Wooten MC. Use of the open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *Journal of visualized experiments: JoVE*. 2015(96):52434.
157. Babovic D, O'tuathaigh C, O'connor A, O'sullivan G, Tighe O, Croke D, et al. Phenotypic characterization of cognition and social behavior in mice with heterozygous versus homozygous deletion of catechol-O-methyltransferase. *Neuroscience*. 2008;155(4):1021-9.
158. Görtz N, Lewejohann L, Tomm M, Ambrée O, Keyvani K, Paulus W, et al. Effects of environmental enrichment on exploration, anxiety, and memory in female TgCRND8 Alzheimer mice. *Behavioural brain research*. 2008;191(1):43-8.
159. Peris LR, Scheuber MI, Shan H, Braun M, Schwab ME. Barnes maze test for spatial memory: a new, sensitive scoring system for mouse search strategies. *Behavioural Brain Research*. 2024;458:114730.
160. Attar A, Liu T, Chan W-TC, Hayes J, Nejad M, Lei K, et al. A shortened Barnes maze protocol reveals memory deficits at 4-months of age in the triple-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *PloS one*. 2013;8(11):e80355.
161. Wang HL, Wang GH, Li QY, Shu C, Jiang MS, Guo Y. Prevalence of Toxoplasma infection in first-episode schizophrenia and comparison between Toxoplasma-seropositive and Toxoplasma-seronegative schizophrenia. *Acta Psychiatrica Scandinavica*. 2006;114(1):40-8.
162. Ramos-Vara JA. Technical aspects of immunohistochemistry. *Veterinary pathology*. 2005;42(4):405-26.
163. Curran T, Morgan JJ. Fos: An immediate-early transcription factor in neurons. *Journal of neurobiology*. 1995;26(3):403-12.
164. Smeyne RJ, Vendrell M, Hayward M, Baker SJ, Miao GG, Schilling K, et al. Continuous c-fos expression precedes programmed cell death in vivo. *Nature*. 1993;363(6425):166-9.

165. Silveira MCL, Sandner G, Graeff FG. Induction of Fos immunoreactivity in the brain by exposure to the elevated plus-maze. *Behavioural brain research*. 1993;56(1):115-8.
166. Tanaka KZ, He H, Tomar A, Niisato K, Huang AJ, McHugh TJ. The hippocampal engram maps experience but not place. *Science*. 2018;361(6400):392-7.
167. Hostetler CM, Ryabinin AE. The CRF system and social behavior: a review. *Frontiers in neuroscience*. 2013;7:92.
168. Cullinan WE, Herman JP, Battaglia DF, Akil H, Watson S. Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Neuroscience*. 1995;64(2):477-505.
169. Zhao D-Q, Ai H-B. Oxytocin and vasopressin involved in restraint water-immersion stress mediated by oxytocin receptor and vasopressin 1b receptor in rat brain. *PloS one*. 2011;6(8):e23362.
170. Bielsky IF, Hu S-B, Szegda KL, Westphal H, Young LJ. Profound impairment in social recognition and reduction in anxiety-like behavior in vasopressin V1a receptor knockout mice. *Neuropsychopharmacology*. 2004;29(3):483-93.
171. Bunck M, Czibere L, Horvath C, Graf C, Frank E, Keßler MS, et al. A hypomorphic vasopressin allele prevents anxiety-related behavior. *PloS one*. 2009;4(4):e5129.
172. Albers HE. The regulation of social recognition, social communication and aggression: vasopressin in the social behavior neural network. *Hormones and behavior*. 2012;61(3):283-92.
173. Donaldson ZR, Young LJ. Oxytocin, vasopressin, and the neurogenetics of sociality. *Science*. 2008;322(5903):900-4.
174. Caldwell HK, Lee H-J, Macbeth AH, Young III WS. Vasopressin: behavioral roles of an “original” neuropeptide. *Progress in neurobiology*. 2008;84(1):1-24.
175. Wang PS, Aguilar-Gaxiola S, Alonso J, Angermeyer MC, Borges G, Bromet EJ, et al. Use of mental health services for anxiety, mood, and substance disorders in 17 countries in the WHO world mental health surveys. *The Lancet*. 2007;370(9590):841-50.
176. Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition*: Elsevier; 2006.
177. Sherwin E, Sandhu KV, Dinan TG, Cryan JF. May the force be with you: the light and dark sides of the microbiota–gut–brain axis in neuropsychiatry. *CNS drugs*. 2016;30(11):1019-41.
178. Auger CJ, Coss D, Auger AP, Forbes-Lorman RM. Epigenetic control of vasopressin expression is maintained by steroid hormones in the adult male rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(10):4242-7.
179. Prandovszky E, Gaskell E, Martin H, Dubey J, Webster JP, McConkey GA. The neurotropic parasite *Toxoplasma gondii* increases dopamine metabolism. *PloS one*. 2011;6(9):e23866.
180. El Saftawy EA, Turkistani SA, Alghabban HM, Albadawi EA, Ibrahim BE, Morsy S, et al. Effects of *Lactobacilli acidophilus* and/or spiramycin as an adjunct in toxoplasmosis infection challenged with diabetes. *Food and Waterborne Parasitology*. 2023;32:e00201.
181. Yang J, Liu S, Zhao Q, Li X, Jiang K. Gut microbiota-related metabolite alpha-linolenic acid mitigates intestinal inflammation induced by oral infection with *Toxoplasma gondii*. *Microbiome*. 2023;11(1):273.

7. Resumo

Objetivo: Comparar sinais de ansiedade em ratos infectados experimentalmente por *Toxoplasma gondii* submetidos ao tratamento com *Lactobacillus rhamnosus* ou placebo.

Métodos: Conduziu-se um estudo experimental com 50 ratos machos da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, com idade entre seis e oito semanas. Os animais foram distribuídos em cinco grupos experimentais: Grupo Controle (placebo), Grupo 1 (infectado com *T. gondii* + placebo), Grupo 2 (*T. gondii* + *L. rhamnosus* após infecção), Grupo 3 (*L. rhamnosus* antes da infecção por *T. gondii*) e Grupo 4 (tratado apenas com *L. rhamnosus*, sem infecção). Entre 60 e 90 dias após a infecção, os animais foram submetidos a uma bateria de testes comportamentais para avaliação de sinais ansiosos e cognitivos, incluindo o Labirinto em Cruz Elevado, Campo Aberto, Esquiva Aversiva e Labirinto de Barnes. Paralelamente, foi realizada análise da metilação do gene promotor da vasopressina (AVP) na amígdala medial posterior, além de imunohistoquímica para marcação de c-FOS e AVP, com vistas a avaliar a ativação neuronal e os

níveis de expressão do neuropeptídeo em regiões relacionadas à regulação emocional e resposta ao estresse.

Resultados: Estudos prévios demonstram que o *Lactobacillus rhamnosus* possui efeito ansiolítico, modulando eixos neuroendócrinos e imunológicos. Com base nas análises comportamentais e moleculares conduzidas, observou-se que os grupos tratados com *L. rhamnosus*, especialmente o Grupo 3 (intervenção preventiva), apresentaram redução de comportamentos relacionados à ansiedade e melhor desempenho nas tarefas cognitivas, em comparação ao Grupo 1. Esses efeitos foram acompanhados por menor imunorreatividade para AVP e c-FOS na amígdala e por padrões de metilação compatíveis com regulação epigenética do gene AVP. Os achados sugerem efeito protetor do probiótico frente às alterações neurocomportamentais induzidas por *T. gondii*.

Conclusão: O tratamento com *Lactobacillus rhamnosus* foi capaz de modular comportamentos relacionados à ansiedade e à cognição em ratos infectados por *Toxoplasma gondii*, possivelmente por mecanismos epigenéticos e neuroendócrinos. Os dados reforçam o papel do eixo microbiota-intestino-cérebro na modulação da resposta emocional e apontam o uso de probióticos como estratégia terapêutica complementar em condições associadas à disbiose e inflamação neuropsiquiátrica.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*; *Lactobacillus rhamnosus*; ansiedade; epigenética; vasopressina; microbiota intestinal; comportamento.

Abstract

Objective: To compare anxiety-related behaviors in rats experimentally infected with *Toxoplasma gondii* and treated with *Lactobacillus rhamnosus* or placebo.

Methods: An experimental study was conducted using 50 male Wistar rats (*Rattus norvegicus*), aged six to eight weeks. Animals were allocated into five groups: Control (placebo), Group 1 (*T. gondii* + placebo), Group 2 (*T. gondii* + *L. rhamnosus* after infection), Group 3 (*L. rhamnosus* prior to *T. gondii* infection), and Group 4 (*L. rhamnosus* without infection). Between 60 and 90 days post-infection, animals underwent a series of behavioral tests to assess anxiety and cognition, including the Elevated Plus Maze, Open Field Test, Aversive Avoidance, and Barnes Maze. Additionally, DNA methylation of the AVP gene promoter in the posterior medial amygdala was analyzed, as well as immunohistochemical detection of c-FOS and AVP to evaluate neuronal activation and neuropeptide expression in stress- and emotion-related brain regions.

Results: Previous studies indicate that *Lactobacillus rhamnosus* exerts anxiolytic effects through neuroendocrine and immunological modulation. In this study, rats treated with *L. rhamnosus*, especially Group 3 (preventive intervention), exhibited reduced anxiety-like behaviors and improved cognitive performance compared to Group 1. These effects were accompanied by lower AVP and c-FOS immunoreactivity in the amygdala and methylation patterns suggestive of epigenetic regulation of the AVP gene. Findings indicate a protective role of the probiotic against *T. gondii*-induced neurobehavioral alterations.

Conclusion: Treatment with *Lactobacillus rhamnosus* modulated anxiety and cognitive behaviors in *T. gondii*-infected rats, likely via epigenetic and neuroendocrine mechanisms. These results highlight the relevance of the gut–brain–microbiota axis in emotional regulation and support the therapeutic potential of probiotics in conditions involving dysbiosis and neuroinflammation.

Keywords: *Toxoplasma gondii*; *Lactobacillus rhamnosus*; anxiety; epigenetics; vasopressin; gut microbiota; behavior.

Anexo I

1. Labirinto em cruz elevado.

1.1 Tempo de braço aberto

Tabela 1 – Teste de normalidade de Shapiro-Wilk aplicado à variável tempo de permanência nos braços abertos (TBA) no labirinto em cruz elevado (LCE), para cada grupo experimental.

Teste de normalidade: Shapiro-Wilk			
TBA - LCE1			
Grupo	N	Valor-p	Normalidade
GC	10	0.0001	Não
G1	10	0.0000	Não
G2	10	0.0249	Não
G3	10	NA	Indefinido
G4	10	0.0000	Não

Tabela 2 -. Estatísticas descritivas da variável TB no LCE1

Variable	Grupo						p-value [†]
	Overall N = 50	GC N = 10	G1 N = 10	G2 N = 10	G3 N = 10	G4 N = 10	
TBA-LCE 1							0.004
Mean (SD)	14.82 (42.37)	11.00 (18.15)	42.90 (82.17)	5.50 (6.40)	0.00 (0.00)	14.70 (37.69)	
Median (Q1, Q3)	0.00 (0.00, 14.00)	3.00 (0.00, 9.00)	21.50 (3.00, 30.00)	3.00 (0.00, 12.00)	0.00 (0.00, 0.00)	0.00 (0.00, 6.00)	
Min, Max	0.00, 274.00	0.00, 45.00	0.00, 274.00	0.00, 16.00	0.00, 0.00	0.00, 121.00	

[†] Kruskal-Wallis rank sum test

São exibidas a média e desvio padrão (Mean, SD), a mediana com primeiro e terceiro quartis (Median, Q1, Q3), e os valores mínimo e máximo (Min, Max).

Quadro 1 – Comparações Múltiplas entre Grupos para o TBA no LCE1 — Teste de Wilcoxon

```
##
## Pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum test with continuity correction
##
## data: df_lce1$TBA-LCE 1` and df_lce1$grupo
##
##      GC      G1      G2      G3
## G1 0.8242 -      -      -
## G2 1.0000 0.2232 -      -
## G3 0.0535 0.0075 0.0535 -
## G4 1.0000 0.2539 1.0000 0.2232
##
## P value adjustment method: holm
```

A tabela apresenta os valores de p resultantes das comparações par a par entre os grupos experimentais quanto à variável TBA no LCE. As comparações foram realizadas utilizando o teste de soma de postos de Wilcoxon com correção de continuidade, e os valores de p foram ajustados pelo método de Holm para controle do erro tipo I.

1.2 - Tempo de permanência nos braços fechados

Tabela 4 – Teste de normalidade de Shapiro-Wilk para a variável TBF no LCE1.

Teste de normalidade: Shapiro-Wilk			
TBF - LCE1			
Grupo	N	Valor-p	Normalidade
GC	10	0.0360	Não
G1	10	0.0156	Não
G2	10	0.4936	Sim
G3	10	0.0003	Não
G4	10	0.0001	Não

Tabela 5 – Estatísticas descritivas da variável TBF no LCE 1.

Variable	Grupo						p-value [†]
	Overall N = 50	GC N = 10	G1 N = 10	G2 N = 10	G3 N = 10	G4 N = 10	
TBF- LCE 1							0.233
Mean (SD)	247.96 (63.52)	260.60 (32.43)	217.00 (86.48)	254.30 (31.56)	237.70 (91.09)	270.20 (46.78)	
Median (Q1, Q3)	269.50 (241.00, 289.00)	269.50 (249.00, 280.00)	246.50 (200.00, 274.00)	259.50 (225.00, 276.00)	268.50 (247.00, 292.00)	291.00 (272.00, 294.00)	
Min, Max	0.00, 297.00	182.00, 297.00	21.00, 296.00	208.00, 296.00	0.00, 296.00	143.00, 296.00	

[†] Kruskal-Wallis rank sum test

São exibidas a média e desvio padrão (Mean, SD), a mediana com primeiro e terceiro quartis (Median, Q1, Q3), e os valores mínimo e máximo (Min, Max).

1.3 Tempo de Centro

Tabela 6 - Teste de normalidade de Shapiro-Wilk para a variável TC no LCE1.

Teste de normalidade: Shapiro-Wilk			
TC - LCE1			
Grupo	N	Valor-p	Normalidade
GC	10	0.0843	Sim
G1	10	0.0024	Não
G2	10	0.5530	Sim
G3	10	0.0003	Não
G4	10	0.0550	Sim

Tabela 7 - Estatísticas descritivas da variável TBF no LCE1.

Variable	Grupo						p-value ¹
	Overall N = 50	GC N = 10	G1 N = 10	G2 N = 10	G3 N = 10	G4 N = 10	
TC- LCE 1							0.248
Mean (SD)	37.22 (49.58)	28.40 (23.10)	40.10 (47.62)	40.20 (28.24)	62.30 (91.09)	15.10 (11.67)	
Median (Q1, Q3)	23.50 (8.00, 41.00)	21.50 (15.00, 34.00)	24.50 (9.00, 42.00)	36.50 (20.00, 61.00)	31.50 (8.00, 53.00)	9.00 (6.00, 23.00)	
Min, Max	3.00, 300.00	3.00, 73.00	4.00, 160.00	4.00, 87.00	4.00, 300.00	4.00, 36.00	

¹ Kruskal-Wallis rank sum test

São exibidas a média e desvio padrão (Mean, SD), a mediana com primeiro e terceiro quartis (Median, Q1, Q3), e os valores mínimo e máximo (Min, Max).

1.4 Entradas no braço aberto

Tabela 8 – Teste de normalidade de Shapiro-Wilk para a variável EBA no LCE1.

Teste de normalidade: Shapiro-Wilk			
EBA			
Grupo	N	Valor-p	Normalidade
GC	10	0.0739	Sim
G1	10	0.2604	Sim
G2	10	0.0441	Não
G3	10	NA	Indefinido
G4	10	NA	Indefinido

Tabela 9 – Estatísticas descritivas da variável EBA no LCE 1.

Variável	Grupo						p-value ¹
	Overall N = 50	GC N = 10	G1 N = 10	G2 N = 10	G3 N = 10	G4 N = 10	
EBA- LCE 1							0.000
Mean (SD)	1.20 (1.69)	1.00 (1.05)	2.90 (2.38)	1.70 (1.64)	0.00 (0.00)	0.40 (0.52)	
Median (Q1, Q3)	0.50 (0.00, 2.00)	1.00 (0.00, 2.00)	2.00 (1.00, 4.00)	2.00 (0.00, 3.00)	0.00 (0.00, 0.00)	0.00 (0.00, 1.00)	
Min, Max	0.00, 8.00	0.00, 3.00	0.00, 8.00	0.00, 4.00	0.00, 0.00	0.00, 1.00	

¹ Kruskal-Wallis rank sum test

São exibidas a média e desvio padrão (Mean, SD), a mediana com primeiro e terceiro quartis (Median, Q1, Q3), e os valores mínimo e máximo (Min, Max).

Quadro 2 - Comparações pareadas entre os grupos quanto à variável EBA no LCE1 utilizando teste de Wilcoxon com correção de Holm.

```
##
## Pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum test with continuity correction
##
## data: df_lce1$`EBA- LCE 1` and df_lce1$grupo
##
##      GC      G1      G2      G3
## G1 0.2015 -      -      -
## G2 0.5977 0.5977 -      -
## G3 0.0466 0.0022 0.0466 -
## G4 0.5977 0.0226 0.3220 0.2015
##
## P value adjustment method: holm
```

1.5 Entradas no braço fechado

Tabela 10 - Teste de normalidade de Shapiro-Wilk para a variável EBF no LCE 1.

Teste de normalidade: Shapiro-Wilk			
EBF			
Grupo	N	Valor-p	Normalidade
GC	10	0.0635	Sim
G1	10	0.0317	Não
G2	10	0.1451	Sim
G3	10	0.0289	Não
G4	10	0.0006	Não

Tabela 11 - Estatísticas descritivas da variável EBF no LCE1

Variável	Grupo						p-value [†]
	Overall N = 50	GC N = 10	G1 N = 10	G2 N = 10	G3 N = 10	G4 N = 10	
EBF- LCE 1							0.005
Mean (SD)	2.78 (1.84)	3.30 (2.45)	3.10 (1.45)	4.10 (1.60)	1.70 (1.42)	1.70 (0.95)	
Median (Q1, Q3)	2.50 (1.00, 4.00)	3.00 (1.00, 4.00)	4.00 (2.00, 4.00)	4.00 (3.00, 6.00)	1.00 (1.00, 2.00)	1.00 (1.00, 3.00)	
Min, Max	0.00, 9.00	1.00, 9.00	1.00, 5.00	2.00, 6.00	0.00, 5.00	1.00, 3.00	

[†] Kruskal-Wallis rank sum test

São exibidas a média e desvio padrão (Mean, SD), a mediana com primeiro e terceiro quartis (Median, Q1, Q3), e os valores mínimo e máximo (Min, Max).

Quadro 3 - Comparações de Razões entre Grupos para Entradas nos Braços Abertos no LCE1 — Escala Logarítmica.

```
## contrast ratio SE df null z.ratio p.value
## GC / G1 1.065 0.266 Inf 1 0.250 0.9991
## GC / G2 0.805 0.188 Inf 1 -0.928 0.8861
## GC / G3 1.941 0.580 Inf 1 2.222 0.1715
## GC / G4 1.941 0.580 Inf 1 2.222 0.1715
## G1 / G2 0.756 0.180 Inf 1 -1.175 0.7659
## G1 / G3 1.824 0.550 Inf 1 1.991 0.2705
## G1 / G4 1.824 0.550 Inf 1 1.991 0.2705
## G2 / G3 2.412 0.696 Inf 1 3.052 0.0193
## G2 / G4 2.412 0.696 Inf 1 3.052 0.0193
## G3 / G4 1.000 0.343 Inf 1 0.000 1.0000
##
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of 5 estimates
## Tests are performed on the log scale
```

São apresentadas as razões entre médias geométricas dos grupos (*ratio*), o erro padrão (*SE*), o valor da estatística z (*z.ratio*) e o valor de p ajustado (*p.value*) utilizando o método de Tukey para múltiplas comparações.

1.6 Fundo de Braço Aberto

Tabela 12 – Estatísticas descritivas da variável FBA no LCE1.

Variable	Grupo						p-value [†]
	Overall N = 50	GC N = 10	G1 N = 10	G2 N = 10	G3 N = 10	G4 N = 10	
FBA- LCE 1							0.459
Mean (SD)	0.10 (0.36)	0.20 (0.42)	0.10 (0.32)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.20 (0.63)	
Median (Q1, Q3)	0.00 (0.00, 0.00)	0.00 (0.00, 0.00)	0.00 (0.00, 0.00)	0.00 (0.00, 0.00)	0.00 (0.00, 0.00)	0.00 (0.00, 0.00)	
Min, Max	0.00, 2.00	0.00, 1.00	0.00, 1.00	0.00, 0.00	0.00, 0.00	0.00, 2.00	

[†] Kruskal-Wallis rank sum test

São exibidas a média e desvio padrão (Mean, SD), a mediana com primeiro e terceiro quartis (Median, Q1, Q3), e os valores mínimo e máximo (Min, Max).

1.7 Fundo de braço Fechado

Tabela 13 – Teste de normalidade de Shapiro-Wilk para a FBF no LCE1.

Teste de normalidade: Shapiro-Wilk			
FBF - LCE1			
Grupo	N	Valor-p	Normalidade
GC	10	0.2856	Sim
G1	10	0.2247	Sim
G2	10	0.3283	Sim
G3	10	0.1727	Sim
G4	10	0.0053	Não

Tabela 14 - Estatísticas descritivas da variável FBF no LCE1.

Variable	Grupo						p-value [†]
	Overall N = 50	GC N = 10	G1 N = 10	G2 N = 10	G3 N = 10	G4 N = 10	
FBF- LCE 1							0.044
Mean (SD)	3.98 (1.85)	5.10 (2.85)	3.20 (1.48)	4.70 (1.16)	3.10 (1.52)	3.80 (1.03)	
Median (Q1, Q3)	4.00 (3.00, 5.00)	4.00 (4.00, 7.00)	3.50 (2.00, 4.00)	4.50 (4.00, 5.00)	3.00 (3.00, 4.00)	4.00 (4.00, 4.00)	
Min, Max	0.00, 11.00	1.00, 11.00	1.00, 5.00	3.00, 7.00	0.00, 6.00	2.00, 5.00	

[†] Kruskal-Wallis rank sum test

São exibidas a média e desvio padrão (Mean, SD), a mediana com primeiro e terceiro quartis (Median, Q1, Q3), e os valores mínimo e máximo (Min, Max).

Quadro 4 - Comparações múltiplas dos grupos experimentais para a variável FBF, utilizando o teste de Wilcoxon com correção de Holm.

```
##
## Pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum test with continuity correction
##
## data: df_lce1$`FBF- LCE 1` and df_lce1$grupo
##
##      GC   G1   G2   G3
## G1 0.91 -   -   -
## G2 1.00 0.35 -   -
## G3 0.35 1.00 0.11 -
## G4 1.00 1.00 0.91 0.91
##
## P value adjustment method: holm
```

1.8 Rearing

Tabela 15 - Teste de normalidade de Shapiro-Wilk para a variável “*Rearing*” no LCE1.

Teste de normalidade: Shapiro-Wilk			
Rearing			
Grupo	N	Valor-p	Normalidade
GC	10	0.1651	Sim
G1	10	0.6651	Sim
G2	10	0.1936	Sim
G3	10	0.7661	Sim
G4	10	0.5392	Sim

Quadro 5 - Teste de Levene para homogeneidade de variâncias para a variável *rearing* no LCE1.

```
## Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
##      Df F value Pr(>F)
## group 4  2.6517 0.04524 *
##      45
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Tabela 16 - Estatísticas descritivas do número de rearing (explorações verticais) por grupo experimental no LCE1.

Variável	Grupo						p-value [†]
	Overall N = 50	GC N = 10	G1 N = 10	G2 N = 10	G3 N = 10	G4 N = 10	
Rearing-LCE 1							0.414
Mean (SD)	11.14 (4.51)	12.10 (4.23)	12.20 (6.48)	12.20 (2.44)	8.80 (5.39)	10.40 (2.37)	
Median (Q1, Q3)	11.00 (9.00, 15.00)	10.00 (9.00, 16.00)	13.00 (5.00, 17.00)	11.50 (11.00, 15.00)	9.50 (4.00, 13.00)	10.00 (9.00, 12.00)	
Min, Max	0.00, 22.00	7.00, 19.00	2.00, 22.00	8.00, 15.00	0.00, 16.00	7.00, 14.00	
[†] Kruskal-Wallis rank sum test							

São exibidas a média e desvio padrão (Mean, SD), a mediana com primeiro e terceiro quartis (Median, Q1, Q3), e os valores mínimo e máximo (Min, Max).

1.9 Head dipping

Tabela 17 - Teste de normalidade de Shapiro-Wilk para a variável *head dipping*.

Teste de normalidade: Shapiro-Wilk			
Head dipping			
Grupo	N	Valor-p	Normalidade
GC	10	0.0076	Não
G1	10	0.6201	Sim
G2	10	0.4985	Sim
G3	10	0.0155	Não
G4	10	0.0012	Não

Tabela 18 - Estatísticas descritivas da variável *head dipping*

Variável	Grupo						p-value [†]
	Overall N = 50	GC N = 10	G1 N = 10	G2 N = 10	G3 N = 10	G4 N = 10	
Head dipping-LCE1							0.077
Mean (SD)	4.92 (4.60)	5.80 (5.14)	6.90 (5.40)	5.50 (3.54)	2.50 (1.18)	3.90 (5.69)	
Median (Q1, Q3)	3.50 (2.00, 6.00)	4.50 (4.00, 6.00)	7.00 (3.00, 10.00)	5.00 (3.00, 8.00)	3.00 (2.00, 3.00)	1.00 (1.00, 5.00)	
Min, Max	0.00, 19.00	0.00, 19.00	0.00, 17.00	1.00, 13.00	0.00, 4.00	0.00, 18.00	
[†] Kruskal-Wallis rank sum test							

São exibidas a média e desvio padrão (Mean, SD), a mediana com primeiro e terceiro quartis (Median, Q1, Q3), e os valores mínimo e máximo (Min, Max).

Tabela 19 - Regressão binomial negativa da variável *head dipping*

Characteristic	N	IRR	95% CI	p-value
grupo	50			
GC		—	—	
G1		1.190	0.581, 2.440	0.634
G2		0.948	0.458, 1.963	0.886
G3		0.431	0.196, 0.938	0.034
G4		0.672	0.318, 1.417	0.296
Abbreviations: CI = Confidence Interval, IRR = Incidence Rate Ratio				

Quadro 6 - Comparações múltiplas entre os grupos para a variável *head dipping*, utilizando contrastes com correção de Tukey.

```
## contrast ratio SE df null z.ratio p.value
## GC / G1 0.841 0.306 Inf 1 -0.476 0.9895
## GC / G2 1.055 0.390 Inf 1 0.144 0.9999
## GC / G3 2.320 0.923 Inf 1 2.115 0.2136
## GC / G4 1.487 0.564 Inf 1 1.046 0.8339
## G1 / G2 1.255 0.459 Inf 1 0.620 0.9720
## G1 / G3 2.760 1.090 Inf 1 2.574 0.0753
## G1 / G4 1.769 0.665 Inf 1 1.518 0.5506
## G2 / G3 2.200 0.878 Inf 1 1.975 0.2780
## G2 / G4 1.410 0.537 Inf 1 0.903 0.8959
## G3 / G4 0.641 0.262 Inf 1 -1.089 0.8124
##
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of 5 estimates
## Tests are performed on the log scale
```

1.10 Grooming

Tabela 20 - Teste de normalidade de Shapiro-Wilk aplicado à variável *grooming* no LCE1.

Teste de normalidade: Shapiro-Wilk			
Grooming			
Grupo	N	Valor-p	Normalidade
GC	10	0.0003	Não
G1	10	0.0002	Não
G2	10	0.0049	Não
G3	10	0.0190	Não
G4	10	0.2869	Sim

Tabela 21 – Estatísticas descritivas da variável *grooming* no LCE1.

Variável	Grupo						p-value [†]
	Overall N = 50	GC N = 10	G1 N = 10	G2 N = 10	G3 N = 10	G4 N = 10	
Grooming							0.170
Mean (SD)	1.24 (1.52)	1.00 (1.76)	0.60 (1.07)	2.00 (2.16)	0.90 (1.10)	1.70 (0.95)	
Median (Q1, Q3)	0.50 (0.00, 2.00)	0.00 (0.00, 2.00)	0.00 (0.00, 1.00)	1.50 (0.00, 4.00)	0.50 (0.00, 2.00)	2.00 (1.00, 2.00)	
Min, Max	0.00, 5.00	0.00, 5.00	0.00, 3.00	0.00, 5.00	0.00, 3.00	0.00, 3.00	

[†] Kruskal-Wallis rank sum test

São exibidas a média e desvio padrão (Mean, SD), a mediana com primeiro e terceiro quartis (Median, Q1, Q3), e os valores mínimo e máximo (Min, Max).

Tabela 22 – Razão de Taxa de Incidência (IRR) do Comportamento de Grooming no LCE1.

Characteristic	N	IRR	95% CI	p-value
grupo	50			
GC		—	—	
G1		0.600	0.160, 2.125	0.433
G2		2.000	0.679, 6.080	0.212
G3		0.900	0.270, 2.979	0.862
G4		1.700	0.567, 5.236	0.346
Abbreviations: CI = Confidence Interval, IRR = Incidence Rate Ratio				

São exibidos o número total de animais (*N*), o valor da IRR, o intervalo de confiança de 95% (95% CI) e o valor de *p* associado.

Quadro 7 - Contrastes múltiplos entre os grupos para a variável *grooming*, com ajuste de *p*-valor pelo método de Tukey.

```
## contrast ratio SE df null z.ratio p.value
## GC / G1 1.667 1.090 Inf 1 0.783 0.9355
## GC / G2 0.500 0.278 Inf 1 -1.248 0.7232
## GC / G3 1.111 0.676 Inf 1 0.173 0.9998
## GC / G4 0.588 0.331 Inf 1 -0.942 0.8806
## G1 / G2 0.300 0.184 Inf 1 -1.965 0.2830
## G1 / G3 0.667 0.440 Inf 1 -0.614 0.9730
## G1 / G4 0.353 0.219 Inf 1 -1.680 0.4461
## G2 / G3 2.222 1.260 Inf 1 1.412 0.6197
## G2 / G4 1.176 0.608 Inf 1 0.314 0.9979
## G3 / G4 0.529 0.303 Inf 1 -1.110 0.8016
##
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of 5 estimates
## Tests are performed on the log scale
```

Tabela 23 - Teste de normalidade de Shapiro-Wilk para a variável “fezes” por grupo experimental.

Teste de normalidade: Shapiro-Wilk			
Fezes			
Grupo	N	Valor-p	Normalidade
GC	10	0.1246	Sim
G1	10	0.2282	Sim
G2	10	0.6678	Sim
G3	10	0.2247	Sim
G4	10	0.5733	Sim

Quadro 8 - Teste de Levene para homogeneidade de variâncias para a variável “fezes” por grupo experimental.

```
## Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
##      Df F value Pr(>F)
## group 4  0.1425 0.9654
##      45
```

Tabela 24 – Estatísticas descritivas para a variável “fezes” no LCE-1.

Variável	Grupo						p-value [†]
	Overall N = 50	GC N = 10	G1 N = 10	G2 N = 10	G3 N = 10	G4 N = 10	
Fezes-LCE 1							0.875
Mean (SD)	2.08 (1.66)	2.30 (1.95)	1.70 (1.64)	2.20 (1.55)	1.80 (1.48)	2.40 (1.90)	
Median (Q1, Q3)	2.00 (1.00, 3.00)	1.50 (1.00, 3.00)	1.50 (0.00, 3.00)	2.00 (1.00, 3.00)	1.50 (1.00, 3.00)	2.00 (1.00, 4.00)	
Min, Max	0.00, 6.00	0.00, 6.00	0.00, 5.00	0.00, 5.00	0.00, 4.00	0.00, 6.00	

[†] Kruskal-Wallis rank sum test

São exibidas a média e desvio padrão (Mean, SD), a mediana com primeiro e terceiro quartis (Median, Q1, Q3), e os valores mínimo e máximo (Min, Max).

1.12 Segundo tempo de braço aberto

Tabela 25 - Teste de normalidade de Shapiro-Wilk para a variável TBA no LCE 2.

Teste de normalidade: Shapiro-Wilk			
TBA - LCE2			
Grupo	N	Valor-p	Normalidade
Grupo C	10	0.0014	Não
Grupo 1	10	0.1472	Sim
Grupo 2	10	0.0062	Não
Grupo 3	10	0.0001	Não
Grupo 4	10	NA	Indefinido

Tabela 26 - Estatísticas descritivas do TBA no LCE2.

Variable	Grupo						p-value [†]
	Overall N = 50	Grupo C N = 10	Grupo 1 N = 10	Grupo 2 N = 10	Grupo 3 N = 10	Grupo 4 N = 10	
Tempo BA - LCE 2							0.013
Mean (SD)	39.34 (67.62)	65.40 (92.30)	62.70 (57.52)	19.70 (24.71)	48.70 (94.15)	0.20 (0.63)	
Median (Q1, Q3)	1.50 (0.00, 48.00)	18.50 (0.00, 138.00)	53.50 (24.00, 69.00)	3.50 (0.00, 42.00)	0.00 (0.00, 54.00)	0.00 (0.00, 0.00)	
Min, Max	0.00, 300.00	0.00, 223.00	0.00, 184.00	0.00, 62.00	0.00, 300.00	0.00, 2.00	

[†] Kruskal-Wallis rank sum test

São exibidas a média e desvio padrão (Mean, SD), a mediana com primeiro e terceiro quartis (Median, Q1, Q3), e os valores mínimo e máximo (Min, Max).

Quadro 9 - Comparações par a par entre os grupos para a variável TBA, com correção de *p*-valor pelo método de Holm.

```
##
## Pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum test with continuity correction
##
## data: df_lce2$`Tempo BA - LCE 2` and df_lce2$grupo
##
##      Grupo C Grupo 1 Grupo 2 Grupo 3
## Grupo 1 1.000    -      -      -
## Grupo 2 1.000  0.355    -      -
## Grupo 3 1.000  0.859  1.000    -
## Grupo 4 0.050  0.014  0.150  0.607
##
## P value adjustment method: holm
```

1.13 Segundo Tempo de Braço Fechado

Tabela 27 - Teste de normalidade (Shapiro-Wilk) para a variável TBF no LCE2.

Teste de normalidade: Shapiro-Wilk			
TBF - LCE2			
Grupo	N	Valor-p	Normalidade
Grupo C	10	0.0399	Não
Grupo 1	10	0.2185	Sim
Grupo 2	10	0.1166	Sim
Grupo 3	10	0.0107	Não
Grupo 4	10	0.0044	Não

Tabela 28 - Estatísticas descritivas para o TBF no LCE2.

Variable	Grupo						p-value ¹
	Overall N = 50	Grupo C N = 10	Grupo 1 N = 10	Grupo 2 N = 10	Grupo 3 N = 10	Grupo 4 N = 10	
Tempo BF - LCE 2							0.005
Mean (SD)	226.18 (75.53)	190.20 (93.47)	189.70 (76.56)	247.50 (36.19)	223.50 (89.50)	280.00 (22.29)	
Median (Q1, Q3)	250.50 (198.00, 280.00)	230.50 (124.00, 268.00)	196.00 (177.00, 255.00)	249.00 (217.00, 280.00)	249.50 (183.00, 280.00)	291.00 (252.00, 297.00)	
Min, Max	0.00, 300.00	44.00, 278.00	30.00, 283.00	198.00, 292.00	0.00, 300.00	244.00, 299.00	

¹ Kruskal-Wallis rank sum test

São exibidas a média e desvio padrão (Mean, SD), a mediana com primeiro e terceiro quartis (Median, Q1, Q3), e os valores mínimo e máximo (Min, Max).

Quadro 10 - Testes de comparações pareadas entre os grupos experimentais para a variável TBF no LCE 2.

```
##
## Pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum exact test
##
## data: df_lce2$`Tempo BF - LCE 2` and df_lce2$grupo
##
##      Grupo C Grupo 1 Grupo 2 Grupo 3
## Grupo 1 1.000    -      -      -
## Grupo 2 0.952  0.163    -      -
## Grupo 3 0.990  0.990  1.000    -
## Grupo 4 0.041  0.022  0.124  0.453
##
## P value adjustment method: holm
```

1.14 Segundo Tempo de Centro

Tabela 29 - Teste de normalidade de Shapiro-Wilk aplicado à variável TC no LCE2.

Teste de normalidade: Shapiro-Wilk			
TC - LCE2			
Grupo	N	Valor-p	Normalidade
Grupo C	10	0.0038	Não
Grupo 1	10	0.0215	Não
Grupo 2	10	0.0880	Sim
Grupo 3	10	0.0043	Não
Grupo 4	10	0.0049	Não

Tabela 30 - Tabela descritiva das estatísticas da variável "tempo de centro" (TC) no LCE2.

Variable	Grupo						p-value [†]
	Overall N = 50	Grupo C N = 10	Grupo 1 N = 10	Grupo 2 N = 10	Grupo 3 N = 10	Grupo 4 N = 10	
Tempo C - LCE 2							0.117
Mean (SD)	35.50 (34.70)	44.10 (44.87)	47.60 (36.50)	38.20 (29.10)	27.80 (35.88)	19.80 (21.99)	
Median (Q1, Q3)	27.50 (12.00, 48.00)	32.50 (23.00, 55.00)	38.50 (21.00, 62.00)	29.50 (20.00, 44.00)	21.00 (4.00, 29.00)	9.00 (3.00, 48.00)	
Min, Max	0.00, 161.00	1.00, 161.00	16.00, 136.00	8.00, 102.00	0.00, 117.00	1.00, 56.00	

[†] Kruskal-Wallis rank sum test

São exibidas a média e desvio padrão (Mean, SD), a mediana com primeiro e terceiro quartis (Median, Q1, Q3), e os valores mínimo e máximo (Min, Max).

1.15 Segundo tempo de Entrada em Braço Aberto (EBA 2)

Tabela 31 – Teste de normalidade de Shapiro-Wilk para a variável EBA no LCE2.

Teste de normalidade: Shapiro-Wilk			
EBA			
Grupo	N	Valor-p	Normalidade
Grupo C	10	0.1977	Sim
Grupo 1	10	0.4836	Sim
Grupo 2	10	0.0325	Não
Grupo 3	10	0.0021	Não
Grupo 4	10	0.0810	Sim

Tabela 32 – Estatística descritiva para a variável EBA no LCE2.

Variável	Grupo						p-value [†]
	Overall N = 50	Grupo C N = 10	Grupo 1 N = 10	Grupo 2 N = 10	Grupo 3 N = 10	Grupo 4 N = 10	
EBA - LCE 2							0.013
Mean (SD)	1.86 (2.06)	1.40 (1.35)	3.80 (2.74)	0.90 (0.99)	0.70 (1.06)	2.50 (2.07)	
Median (Q1, Q3)	1.00 (0.00, 3.00)	1.00 (0.00, 2.00)	4.50 (2.00, 5.00)	1.00 (0.00, 1.00)	0.00 (0.00, 1.00)	2.00 (1.00, 3.00)	
Min, Max	0.00, 8.00	0.00, 4.00	0.00, 8.00	0.00, 3.00	0.00, 3.00	0.00, 6.00	

[†] Kruskal-Wallis rank sum test

São exibidas a média e desvio padrão (Mean, SD), a mediana com primeiro e terceiro quartis (Median, Q1, Q3), e os valores mínimo e máximo (Min, Max).

Quadro 11 – Comparações por Pares entre Grupos para Entradas nos Braços Abertos no LCE2 — Teste de Wilcoxon.

```
##
## Pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum test with continuity correction
##
## data: df_lce2$`EBA - LCE 2` and df_lce2$grupo
##
##      Grupo C Grupo 1 Grupo 2 Grupo 3
## Grupo 1 0.32  -      -      -
## Grupo 2 1.00  0.17  -      -
## Grupo 3 1.00  0.11  1.00  -
## Grupo 4 1.00  1.00  0.32  0.17
##
## P value adjustment method: holm
```

Quadro 12 – Análise de contrastes múltiplos com correção de Tukey para a variável EBA no LCE2.

```
## contrast      ratio    SE df null z.ratio p.value
## Grupo C / Grupo 1 0.368 0.144 Inf 1 -2.556 0.0788
## Grupo C / Grupo 2 1.556 0.758 Inf 1 0.907 0.8944
## Grupo C / Grupo 3 2.000 1.040 Inf 1 1.336 0.6687
## Grupo C / Grupo 4 0.560 0.228 Inf 1 -1.422 0.6136
## Grupo 1 / Grupo 2 4.222 1.850 Inf 1 3.284 0.0090
## Grupo 1 / Grupo 3 5.429 2.570 Inf 1 3.574 0.0032
## Grupo 1 / Grupo 4 1.520 0.529 Inf 1 1.203 0.7499
## Grupo 2 / Grupo 3 1.286 0.715 Inf 1 0.452 0.9914
## Grupo 2 / Grupo 4 0.360 0.163 Inf 1 -2.251 0.1612
## Grupo 3 / Grupo 4 0.280 0.137 Inf 1 -2.611 0.0684
##
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of 5 estimates
## Tests are performed on the log scale
```

1.16 Segundo Tempo de Entrada no Braço Fechado (EBF2)

Tabela 33 - Teste de normalidade de Shapiro-Wilk para a variável EBF no LCE2.

Teste de normalidade: Shapiro-Wilk			
EBF			
Grupo	N	Valor-p	Normalidade
Grupo C	10	0.3986	Sim
Grupo 1	10	0.2418	Sim
Grupo 2	10	0.0049	Não
Grupo 3	10	0.3946	Sim
Grupo 4	10	0.0088	Não

Tabela 34 - Estatísticas para a variável EBF – LCE2.

Variável	Grupo						p-value [†]
	Overall N = 50	Grupo C N = 10	Grupo 1 N = 10	Grupo 2 N = 10	Grupo 3 N = 10	Grupo 4 N = 10	
EBF - LCE 2							0.030
Mean (SD)	3.74 (2.61)	3.80 (2.44)	5.60 (2.22)	4.20 (3.43)	2.50 (1.84)	2.60 (1.96)	
Median (Q1, Q3)	3.00 (2.00, 5.00)	3.50 (2.00, 5.00)	6.00 (5.00, 7.00)	4.00 (2.00, 5.00)	2.00 (1.00, 3.00)	2.00 (1.00, 3.00)	
Min, Max	0.00, 13.00	1.00, 9.00	1.00, 8.00	1.00, 13.00	0.00, 6.00	1.00, 6.00	

[†] Kruskal-Wallis rank sum test

São exibidas a média e desvio padrão (Mean, SD), a mediana com primeiro e terceiro quartis (Median, Q1, Q3), e os valores mínimo e máximo (Min, Max).

Quadro 13 - Comparações pareadas entre grupos experimentais utilizando o teste de Wilcoxon com correção de Holm na variável EBF no LCE2.

```
##
## Pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum test with continuity correction
##
## data: df_lce2$`EBF - LCE 2` and df_lce2$grupo
##
##      Grupo C Grupo 1 Grupo 2 Grupo 3
## Grupo 1 0.607  -      -      -
## Grupo 2 1.000  0.539  -      -
## Grupo 3 1.000  0.085  1.000  -
## Grupo 4 1.000  0.114  1.000  1.000
##
## P value adjustment method: holm
```

Tabela 35 - Razão de Taxa de Incidência (IRR) das Entradas nos Braços Fechados no LCE2.

Characteristic	N	IRR	95% CI	p-value
grupo	50			
Grupo C		—	—	
Grupo 1		1.474	0.897, 2.440	0.128
Grupo 2		1.105	0.656, 1.867	0.707
Grupo 3		0.658	0.366, 1.167	0.156
Grupo 4		0.684	0.383, 1.209	0.194
Abbreviations: CI = Confidence Interval, IRR = Incidence Rate Ratio				

Para cada grupo, são apresentados o número de animais (N), a razão de taxa de incidência (IRR), o intervalo de confiança de 95% (95% CI) e o valor de p correspondente.

1.17 Segundo Tempo de Fundo de Braço Aberto

Tabela 36 - Teste de normalidade de Shapiro-Wilk para a variável FBA no LCE2.

Teste de normalidade: Shapiro-Wilk			
FBA - LCE2			
Grupo	N	Valor-p	Normalidade
Grupo C	10	NA	Indefinido
Grupo 1	10	0.0406	Não
Grupo 2	10	NA	Indefinido
Grupo 3	10	0.0000	Não
Grupo 4	10	NA	Indefinido

Tabela 37 – Estatísticas descritivas da variável FBA no LCE2.

Variable	Grupo						p-value [†]
	Overall N = 50	Grupo C N = 10	Grupo 1 N = 10	Grupo 2 N = 10	Grupo 3 N = 10	Grupo 4 N = 10	
FBA - LCE 2							0.020
Mean (SD)	1.02 (2.19)	0.40 (0.84)	2.60 (2.80)	0.20 (0.63)	1.10 (2.60)	0.80 (2.53)	
Median (Q1, Q3)	0.00 (0.00, 1.00)	0.00 (0.00, 0.00)	1.50 (0.00, 5.00)	0.00 (0.00, 0.00)	0.00 (0.00, 0.00)	0.00 (0.00, 0.00)	
Min, Max	0.00, 8.00	0.00, 2.00	0.00, 7.00	0.00, 2.00	0.00, 8.00	0.00, 8.00	
[†] Kruskal-Wallis rank sum test							

São exibidas a média e desvio padrão (Mean, SD), a mediana com primeiro e terceiro quartis (Median, Q1, Q3), e os valores mínimo e máximo (Min, Max).

Quadro 14 – Comparações múltiplas entre grupos – teste de Wilcoxon com correção de Holm para a variável FBA no LCE2.

```
##
## Pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum test with continuity correction
##
## data: df_lce2$`FBA - LCE 2` and df_lce2$grupo
##
##      Grupo C Grupo 1 Grupo 2 Grupo 3
## Grupo 1 0.237  -      -      -
## Grupo 2 1.000  0.092  -      -
## Grupo 3 1.000  0.573  1.000  -
## Grupo 4 1.000  0.237  1.000  1.000
##
## P value adjustment method: holm
```

1.18 Segundo Tempo de Fundo de Braço Fechado

Tabela 38 - Teste de normalidade de Shapiro-Wilk aplicado à variável FBF no LCE2.

Teste de normalidade: Shapiro-Wilk			
FBF - LCE2			
Grupo	N	Valor-p	Normalidade
Grupo C	10	0.1474	Sim
Grupo 1	10	0.0364	Não
Grupo 2	10	0.6367	Sim
Grupo 3	10	0.0530	Sim
Grupo 4	10	0.7695	Sim

Tabela 39 – Estatística descritiva para a variável FBF no LCE2.

Variable	Grupo						p-value [†]
	Overall N = 50	Grupo C N = 10	Grupo 1 N = 10	Grupo 2 N = 10	Grupo 3 N = 10	Grupo 4 N = 10	
FBF - LCE 2							0.385
Mean (SD)	4.04 (2.53)	4.40 (2.99)	4.60 (2.88)	4.80 (2.20)	3.10 (2.51)	3.30 (1.95)	
Median (Q1, Q3)	4.00 (2.00, 6.00)	3.50 (3.00, 6.00)	6.00 (2.00, 6.00)	5.00 (4.00, 7.00)	2.50 (2.00, 3.00)	3.50 (2.00, 4.00)	
Min, Max	0.00, 11.00	1.00, 11.00	0.00, 8.00	1.00, 8.00	0.00, 8.00	0.00, 7.00	

[†] Kruskal-Wallis rank sum test

São exibidas a média e desvio padrão (Mean, SD), a mediana com primeiro e terceiro quartis (Median, Q1, Q3), e os valores mínimo e máximo (Min, Max).

1.19 Segunda Tempo de *Rearing*

Tabela 40 - Teste de normalidade de Shapiro-Wilk para a variável "rearing" na sessão LCE2.

Teste de normalidade: Shapiro-Wilk			
Rearing			
Grupo	N	Valor-p	Normalidade
Grupo C	10	0.1749	Sim
Grupo 1	10	0.7128	Sim
Grupo 2	10	0.9731	Sim
Grupo 3	10	0.8841	Sim
Grupo 4	10	0.5330	Sim

Quadro 15 - Teste de homogeneidade de variância de Levene para a variável “rearing” (LCE2).

```
## Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
##      Df F value Pr(>F)
## group 4  1.0405  0.397
##      45
```

Tabela 41 - Estatísticas descritivas da variável “rearing” no LCE2 por grupo experimental.

Variável	Grupo						p-value [†]
	Overall N = 50	Grupo C N = 10	Grupo 1 N = 10	Grupo 2 N = 10	Grupo 3 N = 10	Grupo 4 N = 10	
Rearing - LCE 2							0.060
Mean (SD)	9.88 (5.40)	6.80 (3.39)	14.20 (6.03)	8.80 (4.29)	9.70 (6.11)	9.90 (4.75)	
Median (Q1, Q3)	9.50 (6.00, 13.00)	7.00 (6.00, 7.00)	12.50 (10.00, 19.00)	9.00 (7.00, 11.00)	10.00 (6.00, 15.00)	8.50 (7.00, 13.00)	
Min, Max	0.00, 26.00	2.00, 13.00	6.00, 26.00	1.00, 16.00	0.00, 19.00	3.00, 17.00	

[†] Kruskal-Wallis rank sum test

São exibidas a média e desvio padrão (Mean, SD), a mediana com primeiro e terceiro quartis (Median, Q1, Q3), e os valores mínimo e máximo (Min, Max).

Tabela 42 - Razão de taxa de incidência da variável “rearing” no LCE2 com intervalo de confiança de 95%.

Characteristic	N	IRR	95% CI	p-value
grupo	50			
Grupo C		—	—	
Grupo 1		2.088	1.335, 3.280	0.001
Grupo 2		1.294	0.812, 2.067	0.279
Grupo 3		1.426	0.899, 2.270	0.132
Grupo 4		1.456	0.918, 2.314	0.111
Abbreviations: CI = Confidence Interval, IRR = Incidence Rate Ratio				

Para cada grupo, são apresentados o número de animais (*N*), a razão de taxa de incidência (*IRR*), o intervalo de confiança de 95% (*95% CI*) e o valor de *p* correspondente.

Quadro 16 - Comparações de Razões entre Grupos para Entradas nos Braços Fechados no LCE2 — Escala Logarítmica

```
## contrast      ratio    SE df null z.ratio p.value
## Grupo C / Grupo 1 0.479 0.110 Inf 1 -3.216 0.0114
## Grupo C / Grupo 2 0.773 0.184 Inf 1 -1.082 0.8158
## Grupo C / Grupo 3 0.701 0.165 Inf 1 -1.505 0.5592
## Grupo C / Grupo 4 0.687 0.162 Inf 1 -1.594 0.5009
## Grupo 1 / Grupo 2 1.614 0.358 Inf 1 2.160 0.1952
## Grupo 1 / Grupo 3 1.464 0.321 Inf 1 1.739 0.4100
## Grupo 1 / Grupo 4 1.434 0.314 Inf 1 1.649 0.4657
## Grupo 2 / Grupo 3 0.907 0.208 Inf 1 -0.426 0.9932
## Grupo 2 / Grupo 4 0.889 0.203 Inf 1 -0.516 0.9858
## Grupo 3 / Grupo 4 0.980 0.221 Inf 1 -0.090 1.0000
##
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of 5 estimates
## Tests are performed on the log scale
```

Estão listadas as razões (*ratio*), erro padrão (*SE*), estatística *z* (*z.ratio*) e valores de *p* ajustados pelo método de Tukey, considerando o erro tipo I nas comparações múltiplas.

1.20 Segundo Tempo de *Head dipping*

Tabela 43 – Teste de normalidade de Shapiro-Wilk aplicado à variável “*head dipping*” no LCE2.

Teste de normalidade: Shapiro-Wilk			
Head dipping			
Grupo	N	Valor-p	Normalidade
Grupo C	10	0.0934	Sim
Grupo 1	10	0.7576	Sim
Grupo 2	9	0.0502	Sim
Grupo 3	10	0.1889	Sim
Grupo 4	10	0.1097	Sim

Quadro 17 - Teste de Levene para a variável *head dipping* no LCE 2.

```
## Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
##      Df F value Pr(>F)
## group  4  2.4658 0.05874 .
##      44
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Tabela 44 - Tabela descritiva dos dados da variável *head dipping* no LCE2.

Variável	Grupo						p-value [†]
	Overall N = 50	Grupo C N = 10	Grupo 1 N = 10	Grupo 2 N = 10	Grupo 3 N = 10	Grupo 4 N = 10	
Head dipping - LCE 2							0.006
Mean (SD)	6.16 (5.54)	6.50 (4.09)	12.30 (7.29)	4.22 (3.27)	4.90 (4.33)	2.70 (2.16)	
Median (Q1, Q3)	4.00 (3.00, 10.00)	4.50 (3.00, 10.00)	11.00 (6.00, 18.00)	3.00 (3.00, 4.00)	3.50 (2.00, 9.00)	2.00 (1.00, 5.00)	
Min, Max	0.00, 26.00	2.00, 13.00	3.00, 26.00	1.00, 11.00	0.00, 12.00	0.00, 6.00	
Missing	1	0	0	1	0	0	

[†] Kruskal-Wallis rank sum test

São exibidas a média e desvio padrão (Mean, SD), a mediana com primeiro e terceiro quartis (Median, Q1, Q3), e os valores mínimo e máximo (Min, Max).

Quadro 18 - Comparações par-a-par com teste de Wilcoxon corrigido por Holm para a variável "head dipping" (LCE2).

```
##
## Pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum test with continuity correction
##
## data: df_lce2$`Head dipping - LCE 2` and df_lce2$grupo
##
##      Grupo C Grupo 1 Grupo 2 Grupo 3
## Grupo 1 0.345      -      -      -
## Grupo 2 0.860  0.077      -      -
## Grupo 3 1.000  0.135  1.000      -
## Grupo 4 0.304  0.018  1.000  1.000
##
## P value adjustment method: holm
```

Quadro 19 - Comparações múltiplas entre grupos experimentais para a variável *head dipping* no LCE 2.

```
## contrast      ratio      SE df null z.ratio p.value
## Grupo C / Grupo 1 0.528 0.155 Inf  1 -2.168 0.1919
## Grupo C / Grupo 2 1.539 0.506 Inf  1  1.311 0.6841
## Grupo C / Grupo 3 1.327 0.417 Inf  1  0.899 0.8974
## Grupo C / Grupo 4 2.407 0.818 Inf  1  2.586 0.0730
## Grupo 1 / Grupo 2 2.913 0.926 Inf  1  3.365 0.0069
## Grupo 1 / Grupo 3 2.510 0.760 Inf  1  3.041 0.0199
## Grupo 1 / Grupo 4 4.556 1.500 Inf  1  4.610 <.0001
## Grupo 2 / Grupo 3 0.862 0.290 Inf  1 -0.442 0.9921
## Grupo 2 / Grupo 4 1.564 0.564 Inf  1  1.241 0.7275
## Grupo 3 / Grupo 4 1.815 0.630 Inf  1  1.717 0.4234
##
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of 5 estimates
## Tests are performed on the log scale
```

1.21 Segundo Tempo de *Grooming*

Tabela 45 - Teste de normalidade Shapiro-Wilk aplicado à variável *grooming* no LCE2

Teste de normalidade: Shapiro-Wilk			
Grooming			
Grupo	N	Valor-p	Normalidade
Grupo C	10	0.8554	Sim
Grupo 1	10	0.6277	Sim
Grupo 2	10	0.3221	Sim
Grupo 3	10	0.3401	Sim
Grupo 4	10	0.3149	Sim

Quadro 20 - Teste de Levene para a variável *grooming* no LCE2.

```
## Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
##      Df F value Pr(>F)
## group 4  0.6777  0.611
##      45
```

Tabela 46 – Estatísticas descritivas para a variável *grooming* no LCE2.

Variável	Grupo						p-value [†]
	Overall N = 50	Grupo C N = 10	Grupo 1 N = 10	Grupo 2 N = 10	Grupo 3 N = 10	Grupo 4 N = 10	
Grooming-LCE 2							0.704
Mean (SD)	18.92 (13.35)	22.40 (12.92)	17.70 (10.58)	19.90 (15.10)	20.60 (17.16)	14.00 (11.08)	
Median (Q1, Q3)	18.50 (9.00, 28.00)	21.00 (13.00, 31.00)	19.50 (10.00, 28.00)	14.50 (10.00, 29.00)	19.00 (4.00, 32.00)	13.50 (6.00, 20.00)	
Min, Max	0.00, 49.00	5.00, 45.00	2.00, 33.00	0.00, 49.00	0.00, 46.00	0.00, 37.00	

[†] Kruskal-Wallis rank sum test

São exibidas a média e desvio padrão (Mean, SD), a mediana com primeiro e terceiro quartis (Median, Q1, Q3), e os valores mínimo e máximo (Min, Max).

Tabela 47 – Razão de Taxa de Incidência do Comportamento de Grooming no LCE2 por Grupo Experimental

Characteristic	N	IRR	95% CI	p-value
grupo	50			
Grupo C		—	—	
Grupo 1		0.790	0.376, 1.659	0.530
Grupo 2		0.888	0.424, 1.862	0.752
Grupo 3		0.920	0.439, 1.927	0.823
Grupo 4		0.625	0.297, 1.317	0.212
Abbreviations: CI = Confidence Interval, IRR = Incidence Rate Ratio				

Para cada grupo, são apresentados o número de animais (*N*), a razão de taxa de incidência (*IRR*), o intervalo de confiança de 95% (95% *CI*) e o valor de *p* correspondente.

1.22 Segundo Tempo de Contagem de Fezes

Tabela 48 - Teste de normalidade de Shapiro-Wilk aplicado à variável "fezes" no LCE2.

Teste de normalidade: Shapiro-Wilk			
Fezes			
Grupo	N	Valor-p	Normalidade
Grupo C	10	0.0231	Não
Grupo 1	10	0.0167	Não
Grupo 2	10	NA	Indefinido
Grupo 3	10	0.0021	Não
Grupo 4	10	0.0023	Não

Tabela 49 - Estatísticas descritivas da variável "fezes" no LCE2.

Variável	Grupo						p-value [†]
	Overall N = 50	Grupo C N = 10	Grupo 1 N = 10	Grupo 2 N = 10	Grupo 3 N = 10	Grupo 4 N = 10	
Fezes - LCE 2							0.161
Mean (SD)	0.80 (1.21)	1.50 (1.78)	0.90 (0.88)	0.10 (0.32)	0.50 (0.71)	1.00 (1.49)	
Median (Q1, Q3)	0.00 (0.00, 1.00)	1.00 (0.00, 3.00)	1.00 (0.00, 2.00)	0.00 (0.00, 0.00)	0.00 (0.00, 1.00)	0.00 (0.00, 2.00)	
Min, Max	0.00, 5.00	0.00, 5.00	0.00, 2.00	0.00, 1.00	0.00, 2.00	0.00, 4.00	
[†] Kruskal-Wallis rank sum test							

São exibidas a média e desvio padrão (Mean, SD), a mediana com primeiro e terceiro quartis (Median, Q1, Q3), e os valores mínimo e máximo (Min, Max).

Quadro 21 - Comparações múltiplas entre pares de grupos para a variável "fezes", com ajuste de Tukey para múltiplas comparações.

```
## contrast      ratio      SE df null z.ratio p.value
## Grupo C / Grupo 1  1.67   0.941 Inf    1   0.904  0.8954
## Grupo C / Grupo 2 15.00 16.500 Inf    1   2.464  0.0989
## Grupo C / Grupo 3   3.00   1.920 Inf    1   1.720  0.4215
## Grupo C / Grupo 4   1.50   0.832 Inf    1   0.731  0.9494
## Grupo 1 / Grupo 2   9.00 10.100 Inf    1   1.963  0.2841
## Grupo 1 / Grupo 3   1.80   1.210 Inf    1   0.874  0.9066
## Grupo 1 / Grupo 4   0.90   0.534 Inf    1  -0.177  0.9998
## Grupo 2 / Grupo 3   0.20   0.232 Inf    1  -1.390  0.6343
## Grupo 2 / Grupo 4   0.10   0.111 Inf    1  -2.067  0.2346
## Grupo 3 / Grupo 4   0.50   0.332 Inf    1  -1.043  0.8351
##
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of 5 estimates
## Tests are performed on the log scale
```

2. Campo Aberto

2.1 Tempo de Centro

Tabela 50 - Resultados do teste de normalidade de Shapiro-Wilk aplicado à variável "tempo no centro" do campo aberto (TC-CA).

Teste de normalidade: Shapiro-Wilk			
TC-CA			
Grupo	N	Valor-p	Normalidade
GC	10	0.0648	Sim
G1	10	0.0009	Não
G2	10	0.1108	Sim
G3	10	0.0146	Não
G4	10	0.2468	Sim

Tabela 51 - Estatísticas descritivas da variável TC do CA.

Variable	Grupo						p-value [†]
	Overall N = 50	GC N = 10	G1 N = 10	G2 N = 10	G3 N = 10	G4 N = 10	
TC-CA							0.294
Mean (SD)	22.16 (23.12)	10.60 (9.12)	33.10 (36.65)	26.20 (21.90)	21.40 (22.81)	19.50 (13.23)	
Median (Q1, Q3)	18.50 (5.00, 30.00)	6.50 (4.00, 19.00)	24.00 (18.00, 34.00)	23.50 (4.00, 46.00)	14.50 (6.00, 22.00)	16.50 (10.00, 30.00)	
Min, Max	1.00, 131.00	1.00, 28.00	1.00, 131.00	1.00, 56.00	1.00, 71.00	5.00, 45.00	

[†] Kruskal-Wallis rank sum test

São exibidas a média e desvio padrão (Mean, SD), a mediana com primeiro e terceiro quartis (Median, Q1, Q3), e os valores mínimo e máximo (Min, Max).

2.2 Tempo de Periferia

Tabela 52 - Teste de Shapiro-Wilk aplicado à TP no CA.

Teste de normalidade: Shapiro-Wilk			
TP-CA			
Grupo	N	Valor-p	Normalidade
GC	10	0.0496	Não
G1	10	0.0053	Não
G2	10	0.0680	Sim
G3	10	0.0329	Não
G4	10	0.2687	Sim

Tabela 53 - Estatísticas descritivas da variável TP no CA.

Grupo							
Variável	Overall N = 50	GC N = 10	G1 N = 10	G2 N = 10	G3 N = 10	G4 N = 10	p- value [†]
TP-CA							0.180
Mean (SD)	276.48 (22.53)	289.10 (9.29)	265.70 (33.07)	270.80 (22.93)	277.10 (22.74)	279.70 (13.65)	
Median (Q1, Q3)	279.50 (266.00, 294.00)	293.50 (280.00, 295.00)	271.50 (263.00, 279.00)	272.50 (250.00, 294.00)	282.50 (275.00, 293.00)	283.00 (270.00, 290.00)	
Min, Max	180.00, 299.00	272.00, 299.00	180.00, 299.00	243.00, 298.00	229.00, 299.00	255.00, 295.00	

[†] Kruskal-Wallis rank sum test

São exibidas a média e desvio padrão (Mean, SD), a mediana com primeiro e terceiro quartis (Median, Q1, Q3), e os valores mínimo e máximo (Min, Max).

2.3 - Número de Quadrantes

Tabela 54 – Teste de normalidade de Shapiro-Wilk para Número de quadrantes no CA.

Teste de normalidade: Shapiro-Wilk			
N quadrantes-CA			
Grupo	N	Valor-p	Normalidade
GC	10	0.3130	Sim
G1	10	0.5881	Sim
G2	10	0.8875	Sim
G3	10	0.7328	Sim
G4	10	0.2590	Sim

Quadro 22 – Teste de Levene para a variável número de quadrantes no CA.

```
## Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
##      Df F value Pr(>F)
## group 4  3.5203 0.01391 *
##      45
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Tabela 55 – Estatística descritiva para a variável “número de quadrantes” no CA.

Variável	Grupo						p-value [†]
	Overall N = 50	GC N = 10	G1 N = 10	G2 N = 10	G3 N = 10	G4 N = 10	
N quadrantes-CA							0.040
Mean (SD)	76.14 (27.36)	82.20 (38.02)	92.60 (17.99)	80.00 (21.08)	60.80 (30.73)	65.10 (12.73)	
Median (Q1, Q3)	77.50 (56.00, 98.00)	88.00 (42.00, 116.00)	97.50 (78.00, 100.00)	80.00 (63.00, 97.00)	57.00 (37.00, 82.00)	64.50 (55.00, 77.00)	
Min, Max	21.00, 126.00	21.00, 126.00	56.00, 119.00	47.00, 113.00	21.00, 116.00	47.00, 82.00	

[†] Kruskal-Wallis rank sum test

São exibidas a média e desvio padrão (Mean, SD), a mediana com primeiro e terceiro quartis (Median, Q1, Q3), e os valores mínimo e máximo (Min, Max).

Quadro 23 – Comparações múltiplas de Wilcoxon com correção de Holm.

```
##
## Pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum test with continuity correction
##
## data: df_campo_aberto$`N quadrantes-CA` and df_campo_aberto$grupo
##
##      GC      G1      G2      G3
## G1 1.000 -        -        -
## G2 1.000 1.000 -        -
## G3 1.000 0.155 0.786 -
## G4 1.000 0.032 0.768 1.000
##
## P value adjustment method: holm
```

Tabela 56 – Razão de Taxa de Incidência (IRR) do Número de Quadrantes Cruzados no CA.

Characteristic	N	IRR	95% CI	p-value
grupo	50			
GC		—	—	
G1		1.127	0.826, 1.537	0.451
G2		0.973	0.713, 1.329	0.864
G3		0.740	0.540, 1.013	0.059
G4		0.792	0.579, 1.083	0.144
Abbreviations: CI = Confidence Interval, IRR = Incidence Rate Ratio				

São exibidos o número de animais por grupo (*N*), a Razão de Taxa de Incidência (*IRR*) em comparação com o grupo controle (GC), os intervalos de confiança de 95% (95% CI) e os valores de *p* correspondentes.

Quadro 24 - Comparações *post hoc* com correção de Tukey.

```
## contrast ratio SE df null z.ratio p.value
## GC / G1 0.888 0.140 Inf 1 -0.753 0.9438
## GC / G2 1.028 0.163 Inf 1 0.171 0.9998
## GC / G3 1.352 0.216 Inf 1 1.885 0.3255
## GC / G4 1.263 0.202 Inf 1 1.461 0.5881
## G1 / G2 1.157 0.183 Inf 1 0.924 0.8878
## G1 / G3 1.523 0.243 Inf 1 2.636 0.0639
## G1 / G4 1.422 0.226 Inf 1 2.213 0.1748
## G2 / G3 1.316 0.211 Inf 1 1.714 0.4251
## G2 / G4 1.229 0.196 Inf 1 1.290 0.6974
## G3 / G4 0.934 0.150 Inf 1 -0.424 0.9932
##
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of 5 estimates
## Tests are performed on the log scale
```

2.4 Rearing

Tabela 57 – Teste de normalidade de Shapiro-Wilk para a variável *rearing* no CA.

Teste de normalidade: Shapiro-Wilk			
Rearing-CA			
Grupo	N	Valor-p	Normalidade
GC	10	0.6680	Sim
G1	10	0.8984	Sim
G2	10	0.5970	Sim
G3	10	0.0320	Não
G4	10	0.5320	Sim

Tabela 58 – Estatística descritiva da variável *rearing* no CA.

Variável	Grupo						p-value [†]
	Overall N = 50	GC N = 10	G1 N = 10	G2 N = 10	G3 N = 10	G4 N = 10	
Rearing-CA							0.013
Mean (SD)	13.88 (8.33)	11.90 (4.61)	23.20 (10.37)	10.60 (5.23)	10.90 (8.02)	12.80 (5.77)	
Median (Q1, Q3)	12.50 (8.00, 18.00)	13.00 (9.00, 15.00)	20.50 (16.00, 31.00)	9.50 (7.00, 15.00)	7.00 (5.00, 18.00)	11.00 (9.00, 17.00)	
Min, Max	4.00, 42.00	4.00, 19.00	8.00, 42.00	4.00, 20.00	4.00, 28.00	5.00, 24.00	

[†] Kruskal-Wallis rank sum test

São exibidas a média e desvio padrão (Mean, SD), a mediana com primeiro e terceiro quartis (Median, Q1, Q3), e os valores mínimo e máximo (Min, Max).

Quadro 45 – Comparações múltiplas com teste de Wilcoxon e correção de Holm para controle de erros do tipo 1 para a variável “rearing” no CA.

```
##
## Pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum test with continuity correction
##
## data: df_campo_aberto$`Rearing-CA` and df_campo_aberto$grupo
##
##      GC      G1      G2      G3
## G1 0.070 -      -      -
## G2 1.000 0.058 -      -
## G3 1.000 0.057 1.000 -
## G4 1.000 0.146 1.000 1.000
##
## P value adjustment method: holm
```

Quadro 26 - Comparações múltiplas entre grupos experimentais para a variável "rearing" no CA, com ajuste de Tukey.

```
## contrast ratio      SE df null z.ratio p.value
## GC / G1 0.513 0.107 Inf 1 -3.194 0.0122
## GC / G2 1.123 0.248 Inf 1 0.524 0.9850
## GC / G3 1.092 0.241 Inf 1 0.398 0.9947
## GC / G4 0.930 0.202 Inf 1 -0.336 0.9973
## G1 / G2 2.189 0.463 Inf 1 3.704 0.0020
## G1 / G3 2.128 0.449 Inf 1 3.582 0.0031
## G1 / G4 1.812 0.376 Inf 1 2.865 0.0340
## G2 / G3 0.972 0.217 Inf 1 -0.125 0.9999
## G2 / G4 0.828 0.182 Inf 1 -0.859 0.9118
## G3 / G4 0.852 0.186 Inf 1 -0.734 0.9487
##
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of 5 estimates
## Tests are performed on the log scale
```

Os valores apresentados correspondem à razão de contrastes entre grupos (escala logarítmica), erro padrão (SE), razão z e valores de p ajustados para comparações múltiplas.

2.5 - Grooming

Tabela 59 – Teste de normalidade de Shapiro-Wilk para a variável *grooming* no CA.

Teste de normalidade: Shapiro-Wilk			
Grooming-CA			
Grupo	N	Valor-p	Normalidade
GC	10	0.0412	Não
G1	10	0.1330	Sim
G2	10	0.4106	Sim
G3	10	0.5237	Sim
G4	10	0.0005	Não

Tabela 60 – Estatística descritiva da variável *grooming* no CA.

Variável	Grupo						p-value [†]
	Overall N = 50	GC N = 10	G1 N = 10	G2 N = 10	G3 N = 10	G4 N = 10	
Grooming-CA							0.155
Mean (SD)	23.26 (20.06)	26.20 (15.95)	15.10 (7.81)	26.20 (10.32)	16.10 (11.74)	32.70 (37.18)	
Median (Q1, Q3)	20.00 (13.00, 26.00)	20.00 (19.00, 35.00)	13.00 (13.00, 18.00)	26.00 (17.00, 35.00)	16.50 (4.00, 25.00)	21.50 (12.00, 38.00)	
Min, Max	0.00, 132.00	4.00, 55.00	0.00, 28.00	8.00, 39.00	0.00, 35.00	6.00, 132.00	

[†] Kruskal-Wallis rank sum test

São exibidas a média e desvio padrão (Mean, SD), a mediana com primeiro e terceiro quartis (Median, Q1, Q3), e os valores mínimo e máximo (Min, Max).

2.6 Segundo Tempo de Centro

Tabela 61 – Teste de normalidade de Shapiro-Wilk para a variável TC no CA2.

Teste de normalidade: Shapiro-Wilk			
TC - CA2			
Grupo	N	Valor-p	Normalidade
GC	9	0.0077	Não
G1	10	0.0021	Não
G2	10	0.0052	Não
G3	9	0.0001	Não
G4	10	0.1729	Sim

Tabela 62 – Estatísticas descritivas da variável "tempo de centro" no CA2.

Variable	Grupo						p-value [†]
	Overall N = 50	GC N = 10	G1 N = 10	G2 N = 10	G3 N = 10	G4 N = 10	
TC - CA2							0.008
Mean (SD)	6.06 (10.40)	1.56 (0.73)	3.60 (2.84)	5.90 (4.77)	13.22 (22.00)	6.30 (4.99)	
Median (Q1, Q3)	3.00 (2.00, 5.00)	1.00 (1.00, 2.00)	3.00 (2.00, 4.00)	4.00 (3.00, 7.00)	3.00 (2.00, 5.00)	6.00 (2.00, 9.00)	
Min, Max	1.00, 65.00	1.00, 3.00	1.00, 11.00	2.00, 15.00	2.00, 65.00	1.00, 17.00	
Missing	2	1	0	0	1	0	

[†] Kruskal-Wallis rank sum test

São exibidas a média e desvio padrão (Mean, SD), a mediana com primeiro e terceiro quartis (Median, Q1, Q3), e os valores mínimo e máximo (Min, Max).

Quadro 27 – Comparações par a par entre grupos experimentais para a variável "tempo no centro" no teste do Campo Aberto (CA), utilizando o teste de Wilcoxon com correção pelo método Holm.

```
##
## Pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum test with continuity correction
##
## data: df_campo_aberto2$`TC` - CA2` and df_campo_aberto2$grupo
##
##      GC      G1      G2      G3
## G1 0.098 -        -        -
## G2 0.013 0.998 -        -
## G3 0.041 1.000 1.000 -
## G4 0.081 1.000 1.000 1.000
##
## P value adjustment method: holm
```

2.7 Segundo Tempo de periferia

Tabela 63 – Teste de normalidade de Shapiro-Wilk para TP no CA2.

Teste de normalidade: Shapiro-Wilk			
CA2 - TP			
Grupo	N	Valor-p	Normalidade
GC	10	0.0459	Não
G1	10	0.7249	Sim
G2	10	0.0061	Não
G3	10	0.0003	Não
G4	10	0.0080	Não

Tabela 64 – Estatísticas descritivas do TP no CA2.

Variable	Grupo						p-value [†]
	Overall N = 50	GC N = 10	G1 N = 10	G2 N = 10	G3 N = 10	G4 N = 10	
TP- CA2							0.353
Mean (SD)	283.04 (26.10)	292.60 (6.60)	287.70 (7.29)	286.60 (10.00)	264.90 (52.50)	283.40 (15.82)	
Median (Q1, Q3)	291.00 (284.00, 295.00)	295.00 (288.00, 297.00)	286.50 (281.00, 294.00)	290.50 (288.00, 291.00)	294.50 (234.00, 297.00)	286.00 (278.00, 293.00)	
Min, Max	165.00, 299.00	278.00, 299.00	277.00, 299.00	266.00, 298.00	165.00, 297.00	243.00, 298.00	
[†] Kruskal-Wallis rank sum test							

São exibidas a média e desvio padrão (Mean, SD), a mediana com primeiro e terceiro quartis (Median, Q1, Q3), e os valores mínimo e máximo (Min, Max).

2.8 Segunda avaliação do número de quadrantes

Tabela 65 - Teste de normalidade (Shapiro-Wilk) para a variável "número de quadrantes" no CA2.

Teste de normalidade: Shapiro-Wilk			
N quadrantes-CA			
Grupo	N	Valor-p	Normalidade
GC	10	0.6360	Sim
G1	10	0.6742	Sim
G2	10	0.8022	Sim
G3	10	0.2953	Sim
G4	10	0.3304	Sim

Quadro 28 - Teste de Levene para a variável "número de quadrantes" no CA2.

```
## Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
##      Df F value Pr(>F)
## group 4  0.6363 0.6393
##      45
```

Tabela 66 - Estatísticas descritivas da variável "número de quadrantes" no CA2.

Variável	Grupo						p-value [†]
	Overall N = 50	GC N = 10	G1 N = 10	G2 N = 10	G3 N = 10	G4 N = 10	
N quadrantes - CA2							0.563
Mean (SD)	72.06 (33.47)	61.30 (29.19)	89.60 (36.69)	72.90 (32.11)	67.20 (41.31)	69.30 (25.66)	
Median (Q1, Q3)	76.00 (51.00, 94.00)	59.50 (37.00, 89.00)	78.00 (71.00, 109.00)	77.50 (50.00, 94.00)	60.00 (32.00, 99.00)	77.50 (53.00, 82.00)	
Min, Max	14.00, 161.00	19.00, 104.00	28.00, 161.00	15.00, 115.00	19.00, 130.00	14.00, 101.00	

[†] Kruskal-Wallis rank sum test

São exibidas a média e desvio padrão (Mean, SD), a mediana com primeiro e terceiro quartis (Median, Q1, Q3), e os valores mínimo e máximo (Min, Max).

Tabela 67 - Razão de taxa de incidência da variável "número de quadrantes" no CA2.

Characteristic	N	IRR	95% CI	p-value
grupo	50			
GC		—	—	
G1		1.462	0.945, 2.260	0.087
G2		1.189	0.768, 1.841	0.436
G3		1.096	0.708, 1.698	0.680
G4		1.131	0.730, 1.751	0.581
Abbreviations: CI = Confidence Interval, IRR = Incidence Rate Ratio				

Apresentam-se os valores de IRR (Incidence Rate Ratio), intervalos de confiança (IC 95%) e valores de p para cada grupo experimental em comparação ao grupo controle (GC).

Quadro 29 - Comparações múltiplas entre pares de grupos utilizando ajuste de Tukey para a variável "número de quadrantes".

```
## contrast ratio SE df null z.ratio p.value
## GC / G1 0.684 0.152 Inf 1 -1.712 0.4263
## GC / G2 0.841 0.187 Inf 1 -0.780 0.9365
## GC / G3 0.912 0.203 Inf 1 -0.413 0.9939
## GC / G4 0.885 0.197 Inf 1 -0.552 0.9818
## G1 / G2 1.229 0.272 Inf 1 0.933 0.8842
## G1 / G3 1.333 0.295 Inf 1 1.300 0.6914
## G1 / G4 1.293 0.286 Inf 1 1.161 0.7735
## G2 / G3 1.085 0.241 Inf 1 0.367 0.9961
## G2 / G4 1.052 0.233 Inf 1 0.228 0.9994
## G3 / G4 0.970 0.215 Inf 1 -0.139 0.9999
##
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of 5 estimates
## Tests are performed on the log scale
```

2.8 Segunda avaliação da variável rearing

Tabela 68 - Teste de normalidade de Shapiro-Wilk aplicado à variável "rearing" no CA2.

Teste de normalidade: Shapiro-Wilk			
Rearing-CA			
Grupo	N	Valor-p	Normalidade
GC	10	0.9109	Sim
G1	10	0.3899	Sim
G2	10	0.9943	Sim
G3	10	0.0090	Não
G4	10	0.1211	Sim

Tabela 69 - Estatísticas descritivas da variável “rearing” no teste do campo aberto (CA2).

Variável	Grupo						p-value [†]
	Overall N = 50	GC N = 10	G1 N = 10	G2 N = 10	G3 N = 10	G4 N = 10	
Rearing - CA2							0.052
Mean (SD)	8.28 (6.23)	5.50 (3.44)	14.00 (7.48)	8.00 (4.94)	7.20 (7.38)	6.70 (3.92)	
Median (Q1, Q3)	7.00 (4.00, 11.00)	5.00 (3.00, 8.00)	13.00 (6.00, 20.00)	7.50 (4.00, 11.00)	6.50 (2.00, 9.00)	6.00 (3.00, 9.00)	
Min, Max	0.00, 26.00	0.00, 12.00	5.00, 26.00	0.00, 17.00	0.00, 26.00	3.00, 14.00	

[†] Kruskal-Wallis rank sum test

São exibidas a média e desvio padrão (Mean, SD), a mediana com primeiro e terceiro quartis (Median, Q1, Q3), e os valores mínimo e máximo (Min, Max).

.

Tabela 70 - Razão de taxa de incidência (IRR) da variável "rearing" no teste do CA2, por grupo experimental, com intervalo de confiança de 95%.

Characteristic	N	IRR	95% CI	p-value
grupo	50			
GC		—	—	
G1		2.545	1.423, 4.572	0.002
G2		1.455	0.798, 2.656	0.221
G3		1.309	0.715, 2.400	0.382
G4		1.218	0.663, 2.241	0.524
Abbreviations: CI = Confidence Interval, IRR = Incidence Rate Ratio				

Apresentam-se os valores de IRR (Incidence Rate Ratio), intervalos de confiança (IC95%) e *p*-valores para cada grupo experimental em relação ao grupo controle (GC).

Quadro 30 - Comparações múltiplas entre grupos experimentais para a variável "rearing" no teste do Campo Aberto (CA2), com ajuste de Tukey.

```
## contrast ratio SE df null z.ratio p.value
## GC / G1 0.393 0.117 Inf 1 -3.146 0.0143
## GC / G2 0.688 0.210 Inf 1 -1.225 0.7367
## GC / G3 0.764 0.235 Inf 1 -0.874 0.9065
## GC / G4 0.821 0.254 Inf 1 -0.637 0.9690
## G1 / G2 1.750 0.503 Inf 1 1.948 0.2918
## G1 / G3 1.944 0.563 Inf 1 2.296 0.1461
## G1 / G4 2.090 0.609 Inf 1 2.529 0.0843
## G2 / G3 1.111 0.332 Inf 1 0.353 0.9967
## G2 / G4 1.194 0.359 Inf 1 0.590 0.9766
## G3 / G4 1.075 0.325 Inf 1 0.238 0.9993
##
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of 5 estimates
## Tests are performed on the log scale
```

2.10 Segundo tempo de *grooming*

Tabela 71 - Teste de normalidade de Shapiro-Wilk para a variável *grooming* no CA2.

Teste de normalidade: Shapiro-Wilk			
Grooming-CA			
Grupo	N	Valor-p	Normalidade
GC	10	0.0258	Não
G1	10	0.7930	Sim
G2	10	0.0687	Sim
G3	10	0.1033	Sim
G4	10	0.3727	Sim

Tabela 72 - Estatísticas descritivas do comportamento de *grooming* no CA2.

Variável	Grupo						p-value [†]
	Overall N = 50	GC N = 10	G1 N = 10	G2 N = 10	G3 N = 10	G4 N = 10	
Grooming - CA2							0.383
Mean (SD)	20.42 (14.31)	24.40 (23.24)	20.00 (9.66)	15.50 (13.20)	17.70 (12.32)	24.50 (9.16)	
Median (Q1, Q3)	18.50 (12.00, 25.00)	17.50 (10.00, 24.00)	19.50 (14.00, 30.00)	12.00 (8.00, 18.00)	22.00 (3.00, 25.00)	23.50 (17.00, 26.00)	
Min, Max	0.00, 75.00	0.00, 75.00	6.00, 36.00	0.00, 40.00	0.00, 34.00	12.00, 43.00	

São exibidas a média e desvio padrão (Mean, SD), a mediana com primeiro e terceiro quartis (Median, Q1, Q3), e os valores mínimo e máximo (Min, Max).

Tabela 73 - Razão de taxa de incidência da variável "*grooming*" no CA2, por grupo experimental, com intervalo de confiança de 95%.

Characteristic	N	IRR	95% CI	p-value
grupo	50			
GC		—	—	
G1		0.820	0.413, 1.627	0.567
G2		0.635	0.319, 1.266	0.194
G3		0.725	0.365, 1.442	0.356
G4		1.004	0.507, 1.988	0.991
Abbreviations: CI = Confidence Interval, IRR = Incidence Rate Ratio				

Apresentam-se os valores de IRR (Incidence Rate Ratio), intervalos de confiança (IC95%) e *p*-valores obtidos para cada grupo experimental em comparação ao grupo controle (GC).

Quadro 31 - Comparações múltiplas entre grupos experimentais para a variável "*rearing*" no teste do Campo Aberto (CA2), com ajuste de Tukey.

```
## contrast ratio SE df null z.ratio p.value
## GC / G1 1.220 0.423 Inf 1 0.573 0.9790
## GC / G2 1.574 0.550 Inf 1 1.300 0.6915
## GC / G3 1.379 0.480 Inf 1 0.923 0.8883
## GC / G4 0.996 0.344 Inf 1 -0.012 1.0000
## G1 / G2 1.290 0.452 Inf 1 0.727 0.9502
## G1 / G3 1.130 0.395 Inf 1 0.350 0.9968
## G1 / G4 0.816 0.283 Inf 1 -0.585 0.9774
## G2 / G3 0.876 0.308 Inf 1 -0.378 0.9957
## G2 / G4 0.633 0.221 Inf 1 -1.311 0.6841
## G3 / G4 0.722 0.251 Inf 1 -0.934 0.8836
##
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of 5 estimates
## Tests are performed on the log scale
```

A tabela apresenta as razões de contraste (em escala logarítmica), erros padrão (SE), valores de z e p ajustados para múltiplas comparações entre os grupos.

Labirinto de Barnes

1. Tempo de Achar

Quadro 32 – Estatísticas descritivas da variável "tempo de achar" no Labirinto em Cruz Elevado (LB1), por grupo experimental e condição.

Grupo	Condição	n	Missing	Mínimo	Máximo	Média	Mediana	Q1	Q3	IQR	Desvio Padrão	Erro Padrão
Grupo controle	Dia 1	10	0	16	300	137.8	98.5	22.5	273.5	251.0	125.476	39.679
Grupo controle	Dia 2	10	0	6	300	181.7	206.0	82.5	300.0	217.5	128.859	40.749
Grupo controle	Dia 3	10	0	12	300	112.5	41.5	30.25	237.75	207.5	130.002	41.11
Grupo controle	Dia 4	10	0	12	300	126.2	73.0	59.0	232.5	173.5	118.064	37.335
Grupo controle	Teste s/ urina	10	0	3	300	98.5	38.5	21.5	144.0	122.5	116.387	36.805
Grupo controle	Teste c/ urina	10	0	3	300	91.7	46.5	35.5	74.0	38.5	111.988	35.414
Grupo 1	Dia 1	10	0	11	278	91.0	73.0	47.25	113.5	66.25	77.407	24.478
Grupo 1	Dia 2	10	0	7	213	88.4	54.0	35.25	154.75	119.5	81.446	25.755
Grupo 1	Dia 3	10	0	2	300	106.9	62.5	22.25	150.75	128.5	112.635	35.618

Grupo 1	Dia 4	10	0	4	300	102.7	56.5	16.25	139.5	123.25	114.309	36.148
Grupo 1	Teste s/ urina	10	0	2	300	88.3	22.5	10.75	109.75	99.0	118.103	37.347
Grupo 1	Teste c/ urina	10	0	5	227	79.0	62.5	11.25	100.5	89.25	78.932	24.96
Grupo 2	Dia 1	10	0	14	300	109.7	38.0	19.5	227.5	208.0	127.965	40.466
Grupo 2	Dia 2	10	0	3	84	34.9	26.0	13.25	53.0	39.75	30.19	9.547
Grupo 2	Dia 3	10	0	29	300	150.6	113.0	50.75	273.5	222.75	114.416	36.181
Grupo 2	Dia 4	10	0	18	300	66.5	41.0	24.75	50.75	26.0	84.517	26.727
Grupo 2	Teste s/ urina	10	0	12	300	79.6	32.0	20.25	70.5	50.25	102.292	32.347
Grupo 2	Teste c/ urina	10	0	6	300	117.1	86.5	47.75	138.0	90.25	104.533	33.056
Grupo 3	Dia 1	10	0	12	300	177.9	199.0	61.5	300.0	238.5	121.948	38.563
Grupo 3	Dia 2	10	0	8	300	97.4	74.5	23.5	153.5	130.0	94.32	29.827
Grupo 3	Dia 3	10	0	18	300	100.0	63.0	34.0	86.0	52.0	108.336	34.259
Grupo 3	Dia 4	10	0	6	158	75.2	77.5	15.0	121.75	106.75	61.461	19.436
Grupo 3	Teste s/ urina	10	0	5	177	77.3	50.5	30.0	119.25	89.25	65.209	20.621
Grupo 3	Teste c/ urina	10	0	7	300	102.9	95.0	47.75	123.0	75.25	87.701	27.733
Grupo 4	Dia 1	10	0	16	300	193.6	246.0	79.0	300.0	221.0	122.179	38.637
Grupo 4	Dia 2	10	0	23	300	220.3	300.0	105.0	300.0	195.0	128.413	40.608
Grupo 4	Dia 3	10	0	52	300	189.4	225.0	63.0	300.0	237.0	119.659	37.839
Grupo 4	Dia 4	10	0	3	300	79.3	51.5	25.0	79.25	54.25	90.240	28.537
Grupo 4	Teste s/ urina	10	0	18	85	39.4	38.0	20.25	47.5	27.25	21.813	6.898
Grupo 4	Teste c/ urina	10	0	3	300	57.8	30.0	25.0	41.75	16.75	87.392	27.636

Apresentam-se os valores de n, mínimo, máximo, média, mediana, primeiro e terceiro quartis (Q1–Q3), intervalo interquartil (IQR), desvio padrão e erro padrão da variável "tempo de achar" (em segundos), registrada em diferentes dias (Dia 1 a Dia 4) e nas condições com e sem exposição à urina de predador.

Quadro 33 - Comparação entre modelos mistos para a variável "tempo de achar" no Labirinto Barnes (LB1).

```
## Data: df_barnes_1
## Models:
## fit0: `Tempo de achar` ~ condicao + grupo + (1 | id_animal)
## fit1: `Tempo de achar` ~ condicao * grupo + (1 | id_animal)
##      npar      AIC      BIC logLik -2*log(L) Chisq Df Pr(>Chisq)
## fit0   12 3647.6 3692.0 -1811.8   3623.6
## fit1   32 3649.8 3768.4 -1792.9   3585.8 37.73 20   0.009554 **
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

A tabela apresenta a comparação entre dois modelos mistos lineares: um modelo aditivo (fit0), que considera os efeitos principais de grupo e condição experimental, e um modelo com interação (fit1), que avalia a interação entre esses fatores. *npar* refere-se ao número de parâmetros estimados no modelo; *AIC* (Akaike Information Criterion); *BIC* (Bayesian Information Criterion); *logLik* representa o logaritmo da verossimilhança; $-2\log(L)^*$ indica a deviance do modelo; *Chisq* corresponde à estatística do teste do qui-quadrado; *Df* aos graus de liberdade da comparação; e $Pr(>Chisq)$ ao valor de p associado ao teste.

Quadro 34 - Estimativas marginais do tempo de entrada no alvo no Labirinto Barnes (LB1), por grupo experimental e condição.

```

## condicao = Dia 1:
## grupo          emmean    SE    df lower.CL upper.CL
## Grupo controle  137.8  32.7  212    73.42   202.2
## Grupo 1         91.0  32.7  212    26.62   155.4
## Grupo 2        109.7  32.7  212    45.32   174.1
## Grupo 3        177.9  32.7  212   113.52   242.3
## Grupo 4        193.6  32.7  212   129.22   258.0
##
## condicao = Dia 2:
## grupo          emmean    SE    df lower.CL upper.CL
## Grupo controle  181.7  32.7  212   117.32   246.1
## Grupo 1         88.4  32.7  212    24.02   152.8
## Grupo 2         34.9  32.7  212   -29.48    99.3
## Grupo 3         97.4  32.7  212    33.02   161.8
## Grupo 4        220.3  32.7  212   155.92   284.7
##
## condicao = Dia 3:
## grupo          emmean    SE    df lower.CL upper.CL
## Grupo controle  112.5  32.7  212    48.12   176.9
## Grupo 1        106.9  32.7  212    42.52   171.3
## Grupo 2        150.6  32.7  212    86.22   215.0
## Grupo 3        100.0  32.7  212    35.62   164.4
## Grupo 4        189.4  32.7  212   125.02   253.8
##
## condicao = Dia 4:
## grupo          emmean    SE    df lower.CL upper.CL
## Grupo controle  126.2  32.7  212    61.82   190.6
## Grupo 1        102.7  32.7  212    38.32   167.1
## Grupo 2         66.5  32.7  212     2.12   130.9
## Grupo 3         75.2  32.7  212    10.82   139.6
## Grupo 4         79.3  32.7  212    14.92   143.7
##
## condicao = Teste s/ urina:
## grupo          emmean    SE    df lower.CL upper.CL
## Grupo controle   98.5  32.7  212    34.12   162.9
## Grupo 1          88.3  32.7  212    23.92   152.7
## Grupo 2          79.6  32.7  212    15.22   144.0
## Grupo 3          77.3  32.7  212    12.92   141.7
## Grupo 4          39.4  32.7  212   -24.98   103.8
##
## condicao = Teste c/ urina:
## grupo          emmean    SE    df lower.CL upper.CL
## Grupo controle   91.7  32.7  212    27.32   156.1
## Grupo 1          79.0  32.7  212    14.62   143.4
## Grupo 2         117.1  32.7  212    52.72   181.5
## Grupo 3         102.9  32.7  212    38.52   167.3
## Grupo 4          57.8  32.7  212    -6.58   122.2
##
## Degrees-of-freedom method: kenward-roger
## Confidence level used: 0.95

```

Apresentam-se as médias estimadas (emmeans), erros padrão (SE), graus de liberdade (df) e intervalos de confiança de 95% (limites inferior e superior) para o tempo de entrada no compartimento alvo, em diferentes dias (Dia 1 a Dia 4) e sob condições com e sem exposição à urina de predador. Os

valores foram calculados com base em modelo misto linear, utilizando o método de Kenward-Roger para os graus de liberdade.

Quadro 35 - Comparações múltiplas entre grupos experimentais para a variável "tempo de achar" no Labirinto Barnes (LB1), por condição, com ajuste de Tukey.

```
## condicao = Dia 1:
## contrast      estimate  SE  df t.ratio p.value
## Grupo controle - Grupo 1    46.8 43.9 261   1.067 0.8234
## Grupo controle - Grupo 2    28.1 43.9 261   0.640 0.9683
## Grupo controle - Grupo 3   -40.1 43.9 261  -0.914 0.8914
## Grupo controle - Grupo 4   -55.8 43.9 261  -1.272 0.7088
## Grupo 1 - Grupo 2          -18.7 43.9 261  -0.426 0.9931
## Grupo 1 - Grupo 3          -86.9 43.9 261  -1.981 0.2784
## Grupo 1 - Grupo 4         -102.6 43.9 261  -2.338 0.1362
## Grupo 2 - Grupo 3          -68.2 43.9 261  -1.554 0.5281
## Grupo 2 - Grupo 4          -83.9 43.9 261  -1.912 0.3134
## Grupo 3 - Grupo 4          -15.7 43.9 261  -0.358 0.9965
##
## condicao = Dia 2:
## contrast      estimate  SE  df t.ratio p.value
## Grupo controle - Grupo 1    93.3 43.9 261   2.126 0.2120
## Grupo controle - Grupo 2   146.8 43.9 261   3.346 0.0083
## Grupo controle - Grupo 3    84.3 43.9 261   1.921 0.3086
## Grupo controle - Grupo 4   -38.6 43.9 261  -0.880 0.9042
```

```

## Grupo 1 - Grupo 2      53.5 43.9 261  1.219 0.7401
## Grupo 1 - Grupo 3      -9.0 43.9 261 -0.205 0.9996
## Grupo 1 - Grupo 4     -131.9 43.9 261 -3.006 0.0240
## Grupo 2 - Grupo 3     -62.5 43.9 261 -1.425 0.6124
## Grupo 2 - Grupo 4     -185.4 43.9 261 -4.226 0.0003
## Grupo 3 - Grupo 4     -122.9 43.9 261 -2.801 0.0432
##
## condicao = Dia 3:
## contrast      estimate   SE  df t.ratio p.value
## Grupo controle - Grupo 1    5.6 43.9 261  0.128 0.9999
## Grupo controle - Grupo 2   -38.1 43.9 261 -0.868 0.9082
## Grupo controle - Grupo 3   12.5 43.9 261  0.285 0.9986
## Grupo controle - Grupo 4   -76.9 43.9 261 -1.753 0.4037
## Grupo 1 - Grupo 2         -43.7 43.9 261 -0.996 0.8570
## Grupo 1 - Grupo 3          6.9 43.9 261  0.157 0.9999
## Grupo 1 - Grupo 4        -82.5 43.9 261 -1.880 0.3305
## Grupo 2 - Grupo 3         50.6 43.9 261  1.153 0.7778
## Grupo 2 - Grupo 4        -38.8 43.9 261 -0.884 0.9025
## Grupo 3 - Grupo 4        -89.4 43.9 261 -2.038 0.2510
##
## condicao = Dia 4:
## contrast      estimate   SE  df t.ratio p.value
## Grupo controle - Grupo 1   23.5 43.9 261  0.536 0.9836
## Grupo controle - Grupo 2   59.7 43.9 261  1.361 0.6534
## Grupo controle - Grupo 3   51.0 43.9 261  1.162 0.7728
## Grupo controle - Grupo 4   46.9 43.9 261  1.069 0.8223
## Grupo 1 - Grupo 2         36.2 43.9 261  0.825 0.9227
## Grupo 1 - Grupo 3         27.5 43.9 261  0.627 0.9707
## Grupo 1 - Grupo 4         23.4 43.9 261  0.533 0.9838
## Grupo 2 - Grupo 3        -8.7 43.9 261 -0.198 0.9997
## Grupo 2 - Grupo 4       -12.8 43.9 261 -0.292 0.9984
## Grupo 3 - Grupo 4        -4.1 43.9 261 -0.093 1.0000

```

```

##
## condicao = Teste s/ urina:
## contrast          estimate   SE   df t.ratio p.value
## Grupo controle - Grupo 1    10.2 43.9 261   0.232 0.9994
## Grupo controle - Grupo 2    18.9 43.9 261   0.431 0.9928
## Grupo controle - Grupo 3    21.2 43.9 261   0.483 0.9888
## Grupo controle - Grupo 4    59.1 43.9 261   1.347 0.6620
## Grupo 1 - Grupo 2           8.7 43.9 261   0.198 0.9997
## Grupo 1 - Grupo 3          11.0 43.9 261   0.251 0.9991
## Grupo 1 - Grupo 4          48.9 43.9 261   1.115 0.7988
## Grupo 2 - Grupo 3           2.3 43.9 261   0.052 1.0000
## Grupo 2 - Grupo 4          40.2 43.9 261   0.916 0.8905
## Grupo 3 - Grupo 4          37.9 43.9 261   0.864 0.9098
##
## condicao = Teste c/ urina:
## contrast          estimate   SE   df t.ratio p.value
## Grupo controle - Grupo 1    12.7 43.9 261   0.289 0.9985
## Grupo controle - Grupo 2   -25.4 43.9 261  -0.579 0.9781
## Grupo controle - Grupo 3   -11.2 43.9 261  -0.255 0.9991
## Grupo controle - Grupo 4    33.9 43.9 261   0.773 0.9383
## Grupo 1 - Grupo 2          -38.1 43.9 261  -0.868 0.9082
## Grupo 1 - Grupo 3          -23.9 43.9 261  -0.545 0.9825
## Grupo 1 - Grupo 4          21.2 43.9 261   0.483 0.9888
## Grupo 2 - Grupo 3          14.2 43.9 261   0.324 0.9976
## Grupo 2 - Grupo 4          59.3 43.9 261   1.352 0.6591
## Grupo 3 - Grupo 4          45.1 43.9 261   1.028 0.8423
##
## Degrees-of-freedom method: kenward-roger
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of

```

5 estimates

Apresentam-se os contrastes entre grupos para cada condição experimental (Dias 1 a 4, Teste com urina e Teste sem urina), com os respectivos valores estimados de diferença (estimate), erro padrão (SE), graus de liberdade (df), estatística t (t.ratio) e valor de p ajustado pelo método de Tukey. Os resultados foram obtidos com base em modelo misto linear e cálculo dos graus de liberdade pelo método de Kenward-Roger.

1. Tempo de entrar

Quadro 36 - Estatísticas descritivas do tempo de entrada no alvo no Labirinto Barnes (LB1), por grupo experimental e condição.

Grupo	Condição	n	Missing	Mínimo	Máximo	Média	Mediana	Q1	Q3	IQR	Desvio padrão	Erro padrão
Grupo controle	Dia 1	10	0	25	300	161.7	139.5	40.00	300.00	260.00	130.016	41.115
Grupo controle	Dia 2	10	0	8	300	183.2	208.0	85.25	300.00	214.75	127.527	40.327
Grupo controle	Dia 3	10	0	13	300	114.5	46.5	32.50	238.25	205.75	128.707	40.701
Grupo controle	Dia 4	10	0	13	300	128.8	77.0	62.25	235.50	173.25	116.956	36.985
Grupo controle	Teste s/ urina	10	0	4	300	100.7	42.5	22.25	147.50	125.25	115.566	36.545
Grupo controle	Teste c/ urina	10	0	5	300	99.2	52.0	45.50	83.00	37.50	107.963	34.141
Grupo 1	Dia 1	10	0	14	300	185.1	196.5	99.50	300.00	200.50	118.308	37.412
Grupo 1	Dia 2	10	0	17	300	128.5	108.0	39.00	213.75	174.75	103.816	32.830
Grupo 1	Dia 3	10	0	4	300	110.7	64.5	30.25	155.00	124.75	111.482	35.254
Grupo 1	Dia 4	10	0	7	300	123.3	77.5	25.75	208.25	182.50	118.051	37.331
Grupo 1	Teste s/ urina	10	0	4	300	103.8	66.0	22.25	122.75	100.50	112.478	35.569
Grupo 1	Teste c/ urina	10	0	10	300	127.3	115.5	30.75	204.00	173.25	111.514	35.264
Grupo 2	Dia 1	10	0	20	300	124.1	67.5	24.50	249.25	224.75	123.647	39.101
Grupo 2	Dia 2	10	0	10	300	119.2	62.5	18.25	249.50	231.25	128.568	40.657
Grupo 2	Dia 3	10	0	31	300	156.6	131.5	58.25	273.50	215.25	110.198	34.848
Grupo 2	Dia 4	10	0	25	300	81.3	51.0	31.00	93.00	62.00	84.397	26.689
Grupo 2	Teste s/ urina	10	0	19	300	110.9	47.0	24.00	202.00	178.00	119.647	37.836
Grupo 2	Teste c/ urina	10	0	10	300	183.0	159.5	101.25	300.00	198.75	108.916	34.442

Grupo 3	Dia 1	10	0	13	300	194.4	273.0	68.00	300.00	232.00	126.831	40.107
Grupo 3	Dia 2	10	0	20	300	162.4	155.5	64.75	272.00	207.25	109.388	34.592
Grupo 3	Dia 3	10	0	20	300	124.8	68.0	40.00	246.50	206.50	122.859	38.852
Grupo 3	Dia 4	10	0	0	300	107.7	69.5	14.00	156.00	142.00	117.113	37.034
Grupo 3	Teste s/ urina	10	0	17	300	128.4	63.5	40.50	254.75	214.25	121.534	38.432
Grupo 3	Teste c/ urina	10	0	14	300	184.0	171.0	109.25	300.00	190.75	110.818	35.044
Grupo 4	Dia 1	10	0	27	300	214.5	300.0	102.50	300.00	197.50	120.889	38.228
Grupo 4	Dia 2	10	0	25	300	221.3	300.0	108.00	300.00	192.00	126.825	40.105
Grupo 4	Dia 3	10	0	30	300	165.8	114.0	66.75	300.00	233.25	119.450	37.774
Grupo 4	Dia 4	10	0	12	300	94.6	67.5	49.50	104.25	54.75	84.840	26.829
Grupo 4	Teste s/ urina	10	0	20	94	44.2	42.5	23.50	54.50	31.00	23.602	7.464
Grupo 4	Teste c/ urina	10	0	15	300	128.3	66.5	34.25	257.75	223.50	122.855	38.850

Apresentam-se os valores de n, mínimo, máximo, média, mediana, primeiro e terceiro quartis (Q1–Q3), intervalo interquartil (IQR), desvio padrão e erro padrão da variável "tempo de entrar" (em segundos), registrada em diferentes dias (Dia 1 a Dia 4) e nas condições com e sem exposição à urina de predador.

Quadro 37 - Comparação entre modelos mistos para a variável "tempo de entrar" no Labirinto Barnes (LB1).

```
## Data: df_barnes_1
## Models:
## fit0: `Tempo de entrar` ~ condicao + grupo + (1 | id_animal)
## fit1: `Tempo de entrar` ~ condicao * grupo + (1 | id_animal)
##      npar  AIC    BIC logLik -2*log(L)  Chisq Df Pr(>Chisq)
## fit0   12 3693 3737.4 -1834.5      3669
## fit1   32 3712 3830.5 -1824.0      3648 20.981 20      0.3983
```

A tabela apresenta a comparação entre dois modelos mistos lineares: um modelo aditivo (fit0), que considera os efeitos principais de grupo e condição experimental, e um modelo com interação (fit1), que avalia a interação entre esses fatores. Ambos os modelos incluem intercepto aleatório para o fator "animal". Os critérios de ajuste (AIC e BIC), a verossimilhança (logLik), a

deviance ($-2 \cdot \log L$) e o teste de razão de verossimilhança (Chisq) são apresentados. $npar$ refere-se ao número de parâmetros estimados no modelo; AIC (Akaike Information Criterion); BIC (Bayesian Information Criterion); $\log Lik$ representa o logaritmo da verossimilhança; $-2 \log(L)^*$ indica a deviance do modelo; Chisq corresponde à estatística do teste do qui-quadrado; Df aos graus de liberdade da comparação; e $Pr(>\text{Chisq})$ ao valor de p associado ao teste.

Quadro 38 - Comparações múltiplas entre grupos experimentais para a variável "tempo de entrar" no Labirinto Barnes (LB1), com ajuste de Tukey.

```
## contrast                estimate    SE  df t.ratio p.value
## Grupo controle - Grupo 1      1.57 19.9 281   0.079  1.0000
## Grupo controle - Grupo 2      2.17 19.9 281   0.109  1.0000
## Grupo controle - Grupo 3     -18.93 19.9 281  -0.954  0.8754
## Grupo controle - Grupo 4     -13.43 19.9 281  -0.677  0.9613
## Grupo 1 - Grupo 2              0.60 19.9 281   0.030  1.0000
## Grupo 1 - Grupo 3            -20.50 19.9 281  -1.033  0.8401
## Grupo 1 - Grupo 4            -15.00 19.9 281  -0.756  0.9429
## Grupo 2 - Grupo 3            -21.10 19.9 281  -1.063  0.8254
## Grupo 2 - Grupo 4            -15.60 19.9 281  -0.786  0.9346
## Grupo 3 - Grupo 4              5.50 19.9 281   0.277  0.9987
##
## Results are averaged over the levels of: condicao
## Degrees-of-freedom method: kenward-roger
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of 5 estimates
```

2. Erros antes

Quadro 39 - Estatísticas descritivas do número de erros antes de entrar no alvo no Labirinto Barnes (LB1), por grupo experimental e condição.

Grupo	Condição	n	Missing	Mínimo	Máximo	Média	Mediana	Q1	Q3	IQR	Desvio padrão	Erro padrão
Grupo controle	Dia 1	10	0	1	21	7.7	7.5	2.00	8.00	6.00	7.150	2.261
Grupo controle	Dia 2	10	0	0	23	8.5	8.0	4.50	9.00	4.50	6.737	2.130
Grupo controle	Dia 3	10	0	1	12	5.4	4.0	2.50	8.00	5.50	3.893	1.231
Grupo controle	Dia 4	10	0	1	19	7.9	7.0	4.25	11.75	7.50	5.607	1.773
Grupo controle	Teste s/ urina	10	0	0	21	7.0	6.0	1.50	8.75	7.25	6.960	2.201
Grupo controle	Teste c/ urina	10	0	0	13	6.4	7.0	4.25	9.00	4.75	4.006	1.267
Grupo 1	Dia 1	10	0	1	21	10.7	10.0	6.50	15.00	8.50	7.025	2.221
Grupo 1	Dia 2	10	0	0	34	11.7	7.0	3.00	21.00	18.00	12.056	3.812
Grupo 1	Dia 3	10	0	0	23	9.6	9.5	3.00	14.25	11.25	8.030	2.539
Grupo 1	Dia 4	10	0	0	28	10.7	7.5	1.50	19.50	18.00	10.646	3.367
Grupo 1	Teste s/ urina	10	0	0	15	5.3	4.5	2.00	6.75	4.75	5.012	1.585
Grupo 1	Teste c/ urina	10	0	0	23	10.3	12.0	2.00	14.75	12.75	8.193	2.591
Grupo 2	Dia 1	10	0	1	27	8.1	5.0	1.50	13.25	11.75	8.504	2.689
Grupo 2	Dia 2	10	0	0	10	3.7	2.0	1.25	4.75	3.50	3.622	1.146
Grupo 2	Dia 3	10	0	2	21	9.8	6.0	4.50	15.50	11.00	7.223	2.284
Grupo 2	Dia 4	10	0	1	16	7.1	6.0	3.25	9.25	6.00	5.087	1.609
Grupo 2	Teste s/ urina	10	0	2	22	7.4	6.5	3.25	8.75	5.50	6.004	1.899
Grupo 2	Teste c/ urina	10	0	0	24	9.3	9.0	5.25	11.75	6.50	6.717	2.124
Grupo 3	Dia 1	10	0	1	18	8.4	9.0	2.75	11.25	8.50	6.041	1.910
Grupo 3	Dia 2	10	0	0	25	7.6	4.0	3.25	9.75	6.50	7.560	2.391
Grupo 3	Dia 3	10	0	2	13	6.6	6.5	3.00	9.75	6.75	4.033	1.275
Grupo 3	Dia 4	10	0	0	18	6.6	5.5	3.00	9.00	6.00	5.777	1.827
Grupo 3	Teste s/ urina	10	0	0	11	6.0	7.0	3.00	8.75	5.75	3.742	1.183
Grupo 3	Teste c/ urina	10	0	0	22	8.5	8.0	5.75	10.25	4.50	6.115	1.934
Grupo 4	Dia 1	10	0	0	19	10.3	10.5	6.25	16.00	9.75	6.378	2.017
Grupo 4	Dia 2	10	0	0	22	8.5	5.5	3.00	11.75	8.75	7.821	2.473
Grupo 4	Dia 3	10	0	6	18	11.7	11.5	7.00	16.00	9.00	4.809	1.521
Grupo 4	Dia 4	10	0	1	12	6.9	8.0	3.75	9.75	6.00	4.012	1.269
Grupo 4	Teste s/ urina	10	0	3	8	4.8	5.0	3.25	5.75	2.50	1.619	512
Grupo 4	Teste c/ urina	10	0	0	19	6.0	5.0	3.50	7.00	3.50	5.249	1.660

A tabela apresenta os valores de n , mínimo, máximo, média, mediana, primeiro e terceiro quartis (Q1–Q3), intervalo interquartil (IQR), desvio padrão e erro padrão da variável “número de erros antes”, registrados durante a realização do teste no Labirinto Barnes (LB1).

Quadro 40 – Comparação entre modelos mistos para a variável "erros antes" no Labirinto Barnes (LB1).

```
## Data: df_barnes_1
## Models:
## fit0: `Erros antes` ~ condicao + grupo + (1 | id_animal), zi=-0, disp=-1
## fit1: `Erros antes` ~ condicao * grupo + (1 | id_animal), zi=-0, disp=-1
##      Df      AIC      BIC  logLik deviance  Chisq Chi Df Pr(>Chisq)
## fit0 12 1867.9 1912.3 -921.93  1843.9
## fit1 32 1887.7 2006.2 -911.83  1823.7 20.208    20    0.445
```

A tabela apresenta a comparação entre dois modelos mistos lineares: um modelo aditivo (fit0), que considera os efeitos principais de grupo e condição experimental, e um modelo com interação (fit1), que avalia a interação entre esses fatores. Ambos os modelos incluem intercepto aleatório para o fator "animal". Os critérios de ajuste (AIC e BIC), a verossimilhança (logLik), a deviance ($-2 \cdot \log L$) e o teste de razão de verossimilhança (Chisq) são apresentados. *npar* refere-se ao número de parâmetros estimados no modelo; *AIC* (Akaike Information Criterion); *BIC* (Bayesian Information Criterion); *logLik* representa o logaritmo da verossimilhança; $-2 \log(L)^*$ indica a deviance do modelo; *Chisq* corresponde à estatística do teste do qui-quadrado; *Df* aos graus de liberdade da comparação; e *Pr(>Chisq)* ao valor de p associado ao teste.

Quadro 41 - Parâmetros estimados do modelo misto generalizado para a variável "erros antes" no Labirinto Barnes (LB1).

```
## Family: nbinom2 ( log )
## Formula: `Erros antes` ~ condicao + grupo + (1 | id_animal)
## Data: df_barnes_1
##
##          AIC          BIC      logLik -2*log(L)  df.resid
##      1867.9      1912.3      -921.9      1843.9       288
##
## Random effects:
##
## Conditional model:
##      Groups      Name      Variance Std.Dev.
## id_animal (Intercept) 0.03197  0.1788
## Number of obs: 300, groups: id_animal, 10
##
## Dispersion parameter for nbinom2 family (): 1.78
##
## Conditional model:
##
##              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
## (Intercept)      2.094423   0.163591  12.803   <2e-16 ***
## condicaoDia 2      -0.121564   0.167025  -0.728   0.4667
## condicaoDia 3      -0.043138   0.165285  -0.261   0.7941
## condicaoDia 4      -0.147912   0.165990  -0.891   0.3729
## condicaoTeste s/ urina -0.350019   0.168986  -2.071   0.0383 *
## condicaoTeste c/ urina -0.097340   0.166410  -0.585   0.5586
## grupoGrupo 1       0.261827   0.153100   1.710   0.0872 .
## grupoGrupo 2       0.037087   0.155125   0.239   0.8110
## grupoGrupo 3      -0.007167   0.154515  -0.046   0.9630
## grupoGrupo 4       0.096333   0.154213   0.625   0.5322
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Apresentam-se os coeficientes estimados de efeitos fixos de grupo e condição experimental sobre a variável "erros antes", modelada por regressão binomial negativa (nbinom2), com intercepto aleatório por animal (id_animal). A tabela inclui os valores estimados (Estimate), erro padrão (Std. Error), estatística z (z value) e respectivos valores de p (Pr(>|z|)). O modelo considerou o grupo controle e o Dia 1 como categorias de referência.

Quadro 42 - Estimativas marginais da variável "erros antes" no LB1, por condição experimental.

```
## condicao      response      SE df asymp.LCL asymp.UCL
## Dia 1         8.78 1.140 Inf      6.80      11.32
## Dia 2         7.77 1.020 Inf      6.00      10.06
## Dia 3         8.41 1.100 Inf      6.51      10.85
## Dia 4         7.57 0.994 Inf      5.85      9.79
## Teste s/ urina 6.18 0.830 Inf      4.75      8.04
## Teste c/ urina 7.96 1.040 Inf      6.16      10.29
##
## Results are averaged over the levels of: grupo
## Confidence level used: 0.95
## Intervals are back-transformed from the log scale
```

Apresentam-se as médias ajustadas (response) e os respectivos intervalos de confiança de 95% (asyp.LCL – limite inferior; asyp.UCL – limite superior) para o número de erros cometidos antes da entrada no compartimento alvo, considerando cada condição experimental (Dias 1 a 4, Teste com urina e Teste sem urina). Os valores foram obtidos a partir de modelo misto com distribuição binomial negativa, e representam os efeitos principais de condição, com os resultados marginalizados sobre os grupos experimentais.

Quadro 43 - Comparações múltiplas entre condições experimentais para a variável "erros antes" no Labirinto Barnes (LB1), com ajuste de Tukey.

```

## contrast ratio SE df null z.ratio p.value
## Dia 1 / Dia 2 1.129 0.189 Inf 1 0.728 0.9786
## Dia 1 / Dia 3 1.044 0.173 Inf 1 0.261 0.9998
## Dia 1 / Dia 4 1.159 0.192 Inf 1 0.891 0.9488
## Dia 1 / (Teste s/ urina) 1.419 0.240 Inf 1 2.071 0.3024
## Dia 1 / (Teste c/ urina) 1.102 0.183 Inf 1 0.585 0.9921
## Dia 2 / Dia 3 0.925 0.155 Inf 1 -0.468 0.9972
## Dia 2 / Dia 4 1.027 0.172 Inf 1 0.158 1.0000
## Dia 2 / (Teste s/ urina) 1.257 0.215 Inf 1 1.334 0.7661
## Dia 2 / (Teste c/ urina) 0.976 0.163 Inf 1 -0.145 1.0000
## Dia 3 / Dia 4 1.110 0.185 Inf 1 0.629 0.9889
## Dia 3 / (Teste s/ urina) 1.359 0.230 Inf 1 1.812 0.4582
## Dia 3 / (Teste c/ urina) 1.056 0.176 Inf 1 0.326 0.9995
## Dia 4 / (Teste s/ urina) 1.224 0.208 Inf 1 1.188 0.8430
## Dia 4 / (Teste c/ urina) 0.951 0.159 Inf 1 -0.303 0.9997
## (Teste s/ urina) / (Teste c/ urina) 0.777 0.132 Inf 1 -1.489 0.6711
##
## Results are averaged over the levels of: grupo
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of 6 estimates
## Tests are performed on the log scale

```

Apresentam-se as razões de médias (ratio) entre as condições experimentais, com os respectivos erros padrão (SE), razão z (z.ratio) e valores de *p* ajustados pelo método de Tukey. Os testes foram realizados com base em modelo misto generalizado com distribuição binomial negativa, utilizando escala logarítmica, e os resultados estão marginalizados sobre os grupos experimentais. As comparações envolvem os dias sucessivos de teste (Dia 1 a Dia 4) e as exposições com e sem urina de predador.

Quadro 44 - Estimativas marginais da variável "erros antes" no LB1, por grupo experimental.

```
## grupo          response      SE  df asymp.LCL asymp.UCL
## Grupo controle      7.15 0.881 Inf      5.62      9.11
## Grupo 1              9.30 1.130 Inf      7.33     11.79
## Grupo 2              7.42 0.912 Inf      5.84      9.45
## Grupo 3              7.10 0.872 Inf      5.58      9.04
## Grupo 4              7.88 0.960 Inf      6.20     10.00
##
## Results are averaged over the levels of: condicao
## Confidence level used: 0.95
## Intervals are back-transformed from the log scale
```

Apresentam-se as médias ajustadas (response) e os respectivos intervalos de confiança de 95% (asympt.LCL – limite inferior; asymp.UCL – limite superior) para o número de erros cometidos antes da entrada no compartimento alvo, calculadas para cada grupo experimental. Os resultados foram obtidos a partir de modelo misto generalizado com distribuição binomial negativa, com os efeitos marginalizados sobre as condições experimentais. Os intervalos foram retrotransformados da escala logarítmica para facilitar a interpretação.

Quadro 45 - Comparações múltiplas entre grupos experimentais para a variável "erros antes" no Labirinto Barnes (LB1), com ajuste de Tukey.

```
## contrast          ratio      SE  df null z.ratio p.value
## Grupo controle / Grupo 1 0.770 0.118 Inf      1 -1.710 0.4276
## Grupo controle / Grupo 2 0.964 0.149 Inf      1 -0.239 0.9993
## Grupo controle / Grupo 3 1.007 0.156 Inf      1 0.046 1.0000
## Grupo controle / Grupo 4 0.908 0.140 Inf      1 -0.625 0.9712
## Grupo 1 / Grupo 2        1.252 0.192 Inf      1 1.469 0.5829
## Grupo 1 / Grupo 3        1.309 0.199 Inf      1 1.767 0.3933
## Grupo 1 / Grupo 4        1.180 0.180 Inf      1 1.087 0.8132
## Grupo 2 / Grupo 3        1.045 0.161 Inf      1 0.288 0.9985
## Grupo 2 / Grupo 4        0.942 0.145 Inf      1 -0.386 0.9953
## Grupo 3 / Grupo 4        0.902 0.138 Inf      1 -0.674 0.9620
##
## Results are averaged over the levels of: condicao
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of 5 estimates
## Tests are performed on the log scale
```

Apresentam-se as razões de médias (ratio) entre os grupos experimentais, com os respectivos erros padrão (SE), razão z (z.ratio) e valores

de p ajustados pelo método de Tukey. Os resultados foram obtidos a partir de modelo misto com distribuição binomial negativa, com efeitos marginalizados sobre as condições experimentais. Os testes foram realizados na escala logarítmica e posteriormente retrotransformados para interpretação no domínio original.

3. Erros depois

Quadro 46 – Estatísticas descritivas do número de erros após a entrada no alvo no LB1, por grupo experimental e condição.

Grupo	Condição	n	Missing	Mínimo	Máximo	Média	Mediana	Q1	Q3	IQR	Desvio padrão	Erro padrão
Grupo controle	Dia 1	10	0	0	7	0.8	0.0	0	0.00	0.00	2.201	696
Grupo controle	Dia 2	10	0	0	0	0.0	0.0	0	0.00	0.00	0	0
Grupo controle	Dia 3	10	0	0	0	0.0	0.0	0	0.00	0.00	0	0
Grupo controle	Dia 4	10	0	0	0	0.0	0.0	0	0.00	0.00	0	0
Grupo controle	Teste s/ urina	10	0	0	0	0.0	0.0	0	0.00	0.00	0	0
Grupo controle	Teste c/ urina	10	0	0	1	0.1	0.0	0	0.00	0.00	316	100
Grupo 1	Dia 1	10	0	0	27	7.8	2.5	0	13.50	13.50	9.875	3.123
Grupo 1	Dia 2	10	0	0	14	2.2	0.0	0	0.00	0.00	4.849	1.533
Grupo 1	Dia 3	10	0	0	2	0.3	0.0	0	0.00	0.00	675	213
Grupo 1	Dia 4	10	0	0	10	1.1	0.0	0	0.00	0.00	3.143	994
Grupo 1	Teste s/ urina	10	0	0	17	1.8	0.0	0	0.00	0.00	5.350	1.692
Grupo 1	Teste c/ urina	10	0	0	32	3.6	0.0	0	0.75	0.75	10.024	3.170
Grupo 2	Dia 1	10	0	0	4	1.1	0.0	0	2.00	2.00	1.524	482
Grupo 2	Dia 2	10	0	0	19	3.9	0.0	0	6.00	6.00	6.385	2.019
Grupo 2	Dia 3	10	0	0	5	0.5	0.0	0	0.00	0.00	1.581	500
Grupo 2	Dia 4	10	0	0	7	0.7	0.0	0	0.00	0.00	2.214	700
Grupo 2	Teste s/ urina	10	0	0	13	1.4	0.0	0	0.00	0.00	4.088	1.293

Grupo 2	Teste c/ urina	10	0	0	25	5.2	0.0	0	6.75	6.75	9.187	2.905
Grupo 3	Dia 1	10	0	0	8	1.2	0.0	0	0.75	0.75	2.573	814
Grupo 3	Dia 2	10	0	0	15	4.2	0.0	0	10.00	10.00	6.563	2.075
Grupo 3	Dia 3	10	0	0	10	1.0	0.0	0	0.00	0.00	3.162	1.000
Grupo 3	Dia 4	10	0	0	44	4.8	0.0	0	0.75	0.75	13.807	4.366
Grupo 3	Teste s/ urina	10	0	0	5	0.8	0.0	0	0.00	0.00	1.751	554
Grupo 3	Teste c/ urina	10	0	0	10	4.6	4.0	0	9.00	9.00	4.881	1.543
Grupo 4	Dia 1	10	0	0	15	1.5	0.0	0	0.00	0.00	4.743	1.500
Grupo 4	Dia 2	10	0	0	0	0.0	0.0	0	0.00	0.00	0	0
Grupo 4	Dia 3	10	0	0	1	0.1	0.0	0	0.00	0.00	316	100
Grupo 4	Dia 4	10	0	0	11	1.2	0.0	0	0.00	0.00	3.458	1.093
Grupo 4	Teste s/ urina	10	0	0	1	0.1	0.0	0	0.00	0.00	316	100
Grupo 4	Teste c/ urina	10	0	0	12	3.1	0.0	0	6.25	6.25	4.864	1.538

Apresentam-se os valores de n, mínimo, máximo, média, mediana, primeiro e terceiro quartis (Q1–Q3), intervalo interquartil (IQR), desvio padrão e erro padrão da variável "erros depois", que representa o número de erros cometidos pelos animais após entrarem no compartimento alvo. Os dados estão organizados por grupo experimental (Controle, G1 a G4) e por condição de teste (Dias 1 a 4, Teste com urina e Teste sem urina).

Quadro 47 – Comparação entre modelos mistos para a variável "erros depois" no Labirinto Barnes (LB1).

```
## Data: df_barnes_1
## Models:
## fit0_ed: `Erros depois` ~ condicao + grupo + (1 | id_animal), zi=-0, disp=-1
## fit1_ed: `Erros depois` ~ condicao * grupo + (1 | id_animal), zi=-0, disp=-1
##           Df      AIC      BIC  logLik deviance  Chisq Chi Df Pr(>Chisq)
## fit0_ed 12 683.91 728.36 -329.96   659.91
## fit1_ed 32 704.00 822.52 -320.00   640.00 19.912    20    0.4634
```

A tabela apresenta a comparação entre dois modelos mistos lineares: um modelo aditivo (fit0), que considera os efeitos principais de grupo e condição experimental, e um modelo com interação (fit1), que avalia a interação entre esses fatores. Ambos os modelos incluem intercepto aleatório para o fator "animal". Os critérios de ajuste (AIC e BIC), a verossimilhança (logLik), a deviance ($-2 \cdot \log L$) e o teste de razão de verossimilhança (Chisq) são apresentados. *npar* refere-se ao número de parâmetros estimados no modelo; *AIC* (Akaike Information Criterion); *BIC* (Bayesian Information Criterion); *logLik* representa o logaritmo da verossimilhança; $-2 \log(L)^*$ indica a deviance do modelo; *Chisq* corresponde à estatística do teste do qui-quadrado; *Df* aos graus de liberdade da comparação; e *Pr(>Chisq)* ao valor de *p* associado ao teste.

Quadro 48 – Comparações múltiplas entre grupos experimentais para a variável "erros depois" no Labirinto Barnes (LB1), com ajuste de Tukey.

```
## contrast          ratio      SE df null z.ratio p.value
## Grupo controle / Grupo 1 0.0385 0.0286 Inf    1 -4.380 0.0001
## Grupo controle / Grupo 2 0.0398 0.0314 Inf    1 -4.086 0.0004
## Grupo controle / Grupo 3 0.0278 0.0220 Inf    1 -4.529 0.0001
## Grupo controle / Grupo 4 0.1266 0.0976 Inf    1 -2.681 0.0568
## Grupo 1 / Grupo 2      1.0331 0.6280 Inf    1  0.054 1.0000
## Grupo 1 / Grupo 3      0.7224 0.4480 Inf    1 -0.524 0.9849
## Grupo 1 / Grupo 4      3.2885 2.1100 Inf    1  1.858 0.3404
## Grupo 2 / Grupo 3      0.6992 0.4260 Inf    1 -0.587 0.9770
## Grupo 2 / Grupo 4      3.1831 2.0800 Inf    1  1.771 0.3904
## Grupo 3 / Grupo 4      4.5523 2.8900 Inf    1  2.386 0.1191
##
## Results are averaged over the levels of: condicao
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of 5 estimates
## Tests are performed on the log scale
```

Apresentam-se as razões de médias (ratio) entre os grupos experimentais, com os respectivos erros padrão (SE), estatísticas z (z.ratio) e valores de *p* ajustados pelo método de Tukey. Os testes foram realizados com

base em um modelo misto com distribuição binomial negativa, na escala logarítmica, com os efeitos marginalizados sobre as condições experimentais.

4. Latência para entrar

Quadro 49 – Estatísticas Descritivas da variável “Latência para Entrar” no LB1.

Grupo	Condição	n	Mínimo	Máximo	Média	Mediana	Desvio padrão	Erro padrão
Controle	Dia 1	10	0	167	23.9	9.5	50.731	16.043
Controle	Dia 2	10	0	5	1.5	1.0	1.841	582
Controle	Dia 3	10	0	5	2.0	2.0	1.886	596
Controle	Dia 4	10	0	6	2.6	3.0	2.066	653
Controle	Teste s/ urina	10	0	5	2.2	2.0	2.044	646
Controle	Teste c/ urina	10	0	26	7.5	6.5	7.59	2.4
Grupo 1	Dia 1	10	2	254	94.1	16.5	111.862	35.374
Grupo 1	Dia 2	10	1	233	40.1	8.5	75.843	23.984
Grupo 1	Dia 3	10	0	18	3.8	2.0	5.181	1.638
Grupo 1	Dia 4	10	0	138	20.6	3.0	42.826	13.543
Grupo 1	Teste s/ urina	10	0	123	15.5	2.5	38.068	12.038
Grupo 1	Teste c/ urina	10	3	240	48.3	20.0	73.318	23.185
Grupo 2	Dia 1	10	0	55	14.4	6.0	19.979	6.318
Grupo 2	Dia 2	10	2	283	84.3	11.0	114.835	36.314
Grupo 2	Dia 3	10	0	35	6.0	2.0	10.863	3.435
Grupo 2	Dia 4	10	0	97	14.8	5.5	29.348	9.281
Grupo 2	Teste s/ urina	10	0	279	31.3	3.5	87.075	27.535
Grupo 2	Teste c/ urina	10	0	271	65.9	7.0	108.765	34.395
Grupo 3	Dia 1	10	0	124	16.5	1.5	38.492	12.172
Grupo 3	Dia 2	10	2	260	65.0	18.5	92.074	29.116

Grupo 3	Dia 3	10	0	212	24.8	4.0	65.872	20.83
Grupo 3	Dia 4	10	0	178	37.4	4.0	68.147	21.55
Grupo 3	Teste s/ urina	10	0	180	51.1	5.0	67.479	21.339
Grupo 3	Teste c/ urina	10	0	289	81.1	58.0	93.812	29.666
Grupo 4	Dia 1	10	0	170	20.9	2.0	52.794	16.695
Grupo 4	Dia 2	10	0	4	1.0	0.0	1.7	537
Grupo 4	Dia 3	10	0	20	3.4	1.5	6.114	1.933
Grupo 4	Dia 4	10	0	98	15.3	6.5	29.258	9.252
Grupo 4	Teste s/ urina	10	1	18	4.8	3.0	5.138	1.625
Grupo 4	Teste c/ urina	10	0	293	70.5	9.5	113.777	35.979

Este quadro apresenta as estatísticas descritivas da variável "latência para entrar" no LB1, para diferentes grupos experimentais submetidos a distintas condições (quatro dias consecutivos de teste e testes com e sem urina felina). Estão incluídas as seguintes métricas para cada grupo-condição: número de animais (n), valores mínimo e máximo, média, mediana, desvio padrão e erro padrão.

Quadro 50 – Comparação de Modelos Lineares Generalizados Mistos para a Latência de Entrada no LB1.

```
## Data: df_barnes_1
## Models:
## fit0: log(`Latência p/ entrar` + 1) ~ condicao + grupo + (1 | id_animal)
## fit1: log(`Latência p/ entrar` + 1) ~ condicao * grupo + (1 | id_animal)
##      npar    AIC    BIC  logLik -2*log(L)  Chisq Df Pr(>Chisq)
## fit0    12 1097.5 1141.9 -536.73   1073.5
## fit1    32 1098.9 1217.4 -517.46   1034.9 38.54 20    0.007603 **
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

A tabela apresenta a comparação entre dois modelos mistos lineares: um modelo aditivo (fit0), que considera os efeitos principais de grupo e condição experimental, e um modelo com interação (fit1), que avalia a interação entre esses fatores. Ambos os modelos incluem intercepto aleatório para o fator "animal". Os critérios de ajuste (AIC e BIC), a verossimilhança (logLik), a deviance ($-2 \cdot \log L$) e o teste de razão de verossimilhança (Chisq) são apresentados. *npar* refere-se ao número de parâmetros estimados no modelo; *AIC* (Akaike Information Criterion); *BIC* (Bayesian Information Criterion); *logLik* representa o logaritmo da verossimilhança; $-2 \log(L)^*$ indica a deviance do modelo; *Chisq* corresponde à estatística do teste do qui-quadrado; *Df* aos graus de liberdade da comparação; e *Pr(>Chisq)* ao valor de *p* associado ao teste.

Quadro 51 – Comparações Post Hoc com Correção de Tukey para Latência de Entrada no LB1 por Grupo Experimental e Condição.

condicao = Dia 1:	
	## contrast estimate SE df t.ratio p.value
74 00 04 41	## Grupo controle - Grupo 1 -1.30720 0.639 261 -2.045 0.24
	## Grupo controle - Grupo 2 0.02883 0.639 261 0.045 1.00
	## Grupo controle - Grupo 3 0.61703 0.639 261 0.966 0.87
	## Grupo controle - Grupo 4 0.62624 0.639 261 0.980 0.86
	## Grupo 1 - Grupo 2 1.33603 0.639 261 2.091 0.2272
	## Grupo 1 - Grupo 3 1.92423 0.639 261 3.011 0.0237
	## Grupo 1 - Grupo 4 1.93345 0.639 261 3.025 0.0227

	## Grupo 2 - Grupo 3	0.58821	0.639	261	0.920	0.8889
	## Grupo 2 - Grupo 4	0.59742	0.639	261	0.935	0.8831
	## Grupo 3 - Grupo 4	0.00921	0.639	261	0.014	1.0000
	##					
	## condicao = Dia 2:					
	## contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
00	## Grupo controle - Grupo 1	-1.80788	0.639	261	-2.829	0.04
26	## Grupo controle - Grupo 2	-2.35075	0.639	261	-3.678	0.00
24	## Grupo controle - Grupo 3	-2.36753	0.639	261	-3.705	0.00
59	## Grupo controle - Grupo 4	0.23795	0.639	261	0.372	0.99
	## Grupo 1 - Grupo 2	-0.54287	0.639	261	-0.849	0.9147
	## Grupo 1 - Grupo 3	-0.55966	0.639	261	-0.876	0.9056
	## Grupo 1 - Grupo 4	2.04583	0.639	261	3.201	0.0132
	## Grupo 2 - Grupo 3	-0.01679	0.639	261	-0.026	1.0000
	## Grupo 2 - Grupo 4	2.58870	0.639	261	4.051	0.0006
	## Grupo 3 - Grupo 4	2.60549	0.639	261	4.077	0.0006
	##					
	## condicao = Dia 3:					
	## contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
07	## Grupo controle - Grupo 1	-0.35730	0.639	261	-0.559	0.98
31	## Grupo controle - Grupo 2	-0.27191	0.639	261	-0.425	0.99
66	## Grupo controle - Grupo 3	-0.82547	0.639	261	-1.292	0.69
00	## Grupo controle - Grupo 4	-0.00364	0.639	261	-0.006	1.00
	## Grupo 1 - Grupo 2	0.08539	0.639	261	0.134	0.9999
	## Grupo 1 - Grupo 3	-0.46817	0.639	261	-0.733	0.9487
	## Grupo 1 - Grupo 4	0.35367	0.639	261	0.553	0.9814
	## Grupo 2 - Grupo 3	-0.55356	0.639	261	-0.866	0.9090

	## Grupo 2 - Grupo 4	0.26827	0.639	261	0.420	0.9935
	## Grupo 3 - Grupo 4	0.82184	0.639	261	1.286	0.7001
	##					
	## condicao = Dia 4:					
	## contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
48	## Grupo controle - Grupo 1	-0.69263	0.639	261	-1.084	0.81
15	## Grupo controle - Grupo 2	-0.78861	0.639	261	-1.234	0.73
35	## Grupo controle - Grupo 3	-1.27202	0.639	261	-1.990	0.27
33	## Grupo controle - Grupo 4	-0.96858	0.639	261	-1.516	0.55
	## Grupo 1 - Grupo 2	-0.09598	0.639	261	-0.150	0.9999
	## Grupo 1 - Grupo 3	-0.57939	0.639	261	-0.907	0.8942
	## Grupo 1 - Grupo 4	-0.27595	0.639	261	-0.432	0.9927
	## Grupo 2 - Grupo 3	-0.48341	0.639	261	-0.756	0.9427
	## Grupo 2 - Grupo 4	-0.17997	0.639	261	-0.282	0.9986
	## Grupo 3 - Grupo 4	0.30344	0.639	261	0.475	0.9896
	##					
	## condicao = Teste s/ urina:					
	## contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
07	## Grupo controle - Grupo 1	-0.55051	0.639	261	-0.861	0.91
14	## Grupo controle - Grupo 2	-0.88154	0.639	261	-1.379	0.64
43	## Grupo controle - Grupo 3	-1.78398	0.639	261	-2.792	0.04
93	## Grupo controle - Grupo 4	-0.58756	0.639	261	-0.919	0.88
	## Grupo 1 - Grupo 2	-0.33104	0.639	261	-0.518	0.9855
	## Grupo 1 - Grupo 3	-1.23347	0.639	261	-1.930	0.3040
	## Grupo 1 - Grupo 4	-0.03706	0.639	261	-0.058	1.0000
	## Grupo 2 - Grupo 3	-0.90243	0.639	261	-1.412	0.6204
	## Grupo 2 - Grupo 4	0.29398	0.639	261	0.460	0.9907

```

## Grupo 3 - Grupo 4      1.19641 0.639 261  1.872  0.3350
##
## condicao = Teste c/ urina:
## contrast      estimate    SE  df t.ratio p.value
## Grupo controle - Grupo 1 -1.38568 0.639 261  -2.168  0.19
51
## Grupo controle - Grupo 2 -0.80023 0.639 261  -1.252  0.72
06
## Grupo controle - Grupo 3 -1.68429 0.639 261  -2.636  0.06
70
## Grupo controle - Grupo 4 -1.14904 0.639 261  -1.798  0.37
69
## Grupo 1 - Grupo 2      0.58546 0.639 261   0.916  0.8905
## Grupo 1 - Grupo 3     -0.29860 0.639 261  -0.467  0.9902
## Grupo 1 - Grupo 4      0.23664 0.639 261   0.370  0.9960
## Grupo 2 - Grupo 3     -0.88406 0.639 261  -1.383  0.6389
## Grupo 2 - Grupo 4     -0.34881 0.639 261  -0.546  0.9824
## Grupo 3 - Grupo 4      0.53525 0.639 261   0.838  0.9187
##
## Note: contrasts are still on the log(mu + 1) scale. Consider u
sing
##      regrid() if you want contrasts of back-transformed estima
tes.
## Degrees-of-freedom method: kenward-roger
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of
5 estimates

```

O quadro apresenta os resultados das comparações múltiplas post hoc entre grupos experimentais, dentro de cada condição de teste (Dias 1 a 4, Teste sem urina e Teste com urina), referentes à variável transformada $\log(\text{latência para entrar} + 1)$ no Labirinto Barnes (LB1). O método de correção de Tukey foi utilizado para controle do erro do tipo I nas comparações entre cinco grupos experimentais. São exibidos os contrastes entre pares de grupos,

estimativas de diferença (estimate), erro padrão (SE), graus de liberdade (df), estatística t (t.ratio) e valor de p ajustado (p.value).

5. Grooming

Quadro 52 - Estatísticas Descritivas do Comportamento de Grooming no LB1.

Grupo	Condição	n	Mínimo	Máximo	Média	Mediana	Desvio Padrão	Erro Padrão
Controle	Dia 1	10	0	12	1.2	0.0	3.795	1.2
Controle	Dia 2	10	0	105	12.5	0.0	33.04	10.448
Controle	Dia 3	10	0	11	1.8	0.0	3.91	1.236
Controle	Dia 4	10	0	24	3.9	0.0	8.491	2.685
Controle	Teste s/ urina	10	0	0	0.0	0.0	0.0	0.0
Controle	Teste c/ urina	10	0	21	2.1	0.0	6.641	2.1
Grupo 1	Dia 1	10	0	2	0.5	0.0	0.85	269
Grupo 1	Dia 2	10	0	65	7.7	0.0	20.375	6.443
Grupo 1	Dia 3	10	0	10	1.7	0.0	3.653	1.155
Grupo 1	Dia 4	10	0	18	4.0	0.0	7.118	2.251
Grupo 1	Teste s/ urina	10	0	18	2.8	0.0	6.197	1.96
Grupo 1	Teste c/ urina	10	0	22	2.2	0.0	6.957	2.2
Grupo 2	Dia 1	10	0	10	1.6	0.0	3.502	1.108
Grupo 2	Dia 2	10	0	2	0.4	0.0	843	267
Grupo 2	Dia 3	10	0	20	5.2	0.0	7.969	2.52
Grupo 2	Dia 4	10	0	8	1.3	0.0	2.584	817
Grupo 2	Teste s/ urina	10	0	21	2.8	0.0	6.763	2.139
Grupo 2	Teste c/ urina	10	0	51	8.0	0.0	16.248	5.138
Grupo 3	Dia 1	10	0	27	3.8	0.0	8.854	2.8
Grupo 3	Dia 2	10	0	20	3.3	0.0	6.567	2.077
Grupo 3	Dia 3	10	0	4	0.6	0.0	1.35	427
Grupo 3	Dia 4	10	0	1	0.1	0.0	316	0.1
Grupo 3	Teste s/ urina	10	0	1	0.2	0.0	422	133

Grupo 3	Teste c/ urina	10	0	8	1.8	0.0	3.048	964
Grupo 4	Dia 1	10	0	18	3.2	0.0	6.25	1.977
Grupo 4	Dia 2	10	0	47	15.9	0.0	17.233	5.45
Grupo 4	Dia 3	10	0	56	14.4	0.0	20.576	6.507
Grupo 4	Dia 4	10	0	26	4.1	0.0	9.024	2.854
Grupo 4	Teste s/ urina	10	0	4	0.4	0.0	1.265	0.4
Grupo 4	Teste c/ urina	10	0	32	5.1	0.0	10.671	3.375

A tabela apresenta as estatísticas descritivas do comportamento de *grooming* (autolimpeza) observado em diferentes grupos experimentais (Controle, Grupo 1 a Grupo 4) e em distintas condições de teste (dias sucessivos e exposição a urina de predador ou não) no LB1. Os dados incluem média, mediana, valores mínimo e máximo, desvio padrão e erro padrão para cada grupo e condição (n = 10 por grupo).

Quadro 53 – Comparação de Modelos Mistos Generalizados para o Comportamento de *Grooming*.

```
## Data: df_barnes_2
## Models:
## fit0_grooming: Grooming ~ condicao + grupo + (1 | id_animal), zi=~0, disp=~1
## fit1_grooming: Grooming ~ condicao * grupo + (1 | id_animal), zi=~0, disp=~1
##           Df      AIC      BIC logLik deviance Chisq Chi Df Pr(>Chisq)
## fit0_grooming 12 631.88 676.32 -303.94 607.88
## fit1_grooming 32 641.93 760.45 -288.96 577.93 29.952 20 0.07064 .
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

A tabela apresenta a comparação entre dois modelos mistos lineares: um modelo aditivo (fit0), que considera os efeitos principais de grupo e condição experimental, e um modelo com interação (fit1), que avalia a interação entre esses fatores. Ambos os modelos incluem intercepto aleatório para o fator "animal". Os critérios de ajuste (AIC e BIC), a verossimilhança (logLik), a deviance ($-2 \cdot \log L$) e o teste de razão de verossimilhança (Chisq) são apresentados. *npar* refere-se ao número de parâmetros estimados no modelo; *AIC* (Akaike Information Criterion); *BIC* (Bayesian Information Criterion); *logLik* representa o logaritmo da verossimilhança; $-2 \log(L)^*$ indica a deviance do modelo; *Chisq* corresponde à estatística do teste do qui-quadrado; *Df* aos graus de liberdade da comparação; e *Pr(>Chisq)* ao valor de *p* associado ao teste.

Quadro 54 – Comparações Par a Par entre Grupos Experimentais para o Comportamento de Grooming no Labirinto (LB1).

```
## contrast          ratio      SE df null z.ratio p.value
## Grupo controle / Grupo 1 0.0959 0.1030 Inf 1 -2.175 0.1891
## Grupo controle / Grupo 2 0.5948 0.5300 Inf 1 -0.583 0.9776
## Grupo controle / Grupo 3 0.3218 0.3280 Inf 1 -1.111 0.8007
## Grupo controle / Grupo 4 0.1016 0.0919 Inf 1 -2.529 0.0843
## Grupo 1 / Grupo 2      6.2016 6.5200 Inf 1 1.737 0.4113
## Grupo 1 / Grupo 3      3.3552 3.5300 Inf 1 1.151 0.7792
## Grupo 1 / Grupo 4      1.0595 1.0900 Inf 1 0.056 1.0000
## Grupo 2 / Grupo 3      0.5410 0.4510 Inf 1 -0.736 0.9480
## Grupo 2 / Grupo 4      0.1708 0.1610 Inf 1 -1.874 0.3314
## Grupo 3 / Grupo 4      0.3158 0.3120 Inf 1 -1.166 0.7711
##
## Results are averaged over the levels of: condicao
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of 5 estimates
## Tests are performed on the log scale
```

O quadro apresenta os resultados das comparações múltiplas entre os grupos experimentais para a variável "*grooming*", com ajuste de *p*-valores pelo método de Tukey. Os contrastes consideram a razão entre os grupos em escala logarítmica, com base em modelos mistos ajustados por condição experimental.

1. Tempo de Achar no segundo momento

Quadro 55 - Estatísticas descritivas da variável "Tempo de Achar" no LB2.

Grupo	Condição	n	Missing	Mínimo	Máximo	Média	Mediana	Q1	Q3	IQR	Desvio Padrão	Erro Padrão
Grupo controle	Dia 1	10.0	0.0	6.0	234.0	83.8	37.0	26.75	155.0	128.25	85.555	27.055
Grupo controle	Dia 2	10.0	0.0	12.0	100.0	43.1	38.5	23.0	57.5	34.5	26.43	8.358
Grupo controle	Dia 3	10.0	0.0	6.0	111.0	54.4	59.0	18.75	81.0	62.25	38.896	12.3
Grupo controle	Dia 4	10.0	0.0	7.0	300.0	76.5	52.5	26.5	89.5	63.0	85.752	27.117
Grupo controle	Teste s/ urina	10.0	0.0	2.0	126.0	48.2	33.5	9.25	86.25	77.0	46.695	14.766
Grupo controle	Teste c/ urina	10.0	0.0	4.0	300.0	84.9	60.0	24.5	106.0	81.5	88.436	27.966
Grupo 1	Dia 1	10.0	0.0	10.0	300.0	144.6	130.0	65.25	217.5	152.25	106.715	33.746
Grupo 1	Dia 2	10.0	0.0	4.0	171.0	49.2	22.5	9.0	58.75	49.75	58.202	18.405
Grupo 1	Dia 3	10.0	0.0	10.0	300.0	69.8	39.0	27.0	80.5	53.5	85.714	27.105
Grupo 1	Dia 4	10.0	0.0	7.0	116.0	38.0	30.0	24.5	46.25	21.75	31.301	9.898
Grupo 1	Teste s/ urina	10.0	0.0	9.0	226.0	52.8	29.5	15.0	61.5	46.5	65.428	20.69
Grupo 1	Teste c/ urina	10.0	0.0	3.0	180.0	46.2	34.0	16.0	53.75	37.75	51.335	16.234
Grupo 2	Dia 1	10.0	0.0	5.0	300.0	69.5	31.0	13.25	81.25	68.0	90.857	28.731
Grupo 2	Dia 2	10.0	0.0	8.0	244.0	63.3	35.5	21.25	76.0	54.75	72.409	22.898
Grupo 2	Dia 3	10.0	0.0	8.0	300.0	74.8	46.0	11.25	93.5	82.25	91.396	28.902
Grupo 2	Dia 4	10.0	0.0	6.0	88.0	40.8	34.5	16.25	60.5	44.25	29.925	9.463
Grupo 2	Teste s/ urina	10.0	0.0	3.0	73.0	29.6	29.5	8.25	40.0	31.75	23.429	7.409
Grupo 2	Teste c/ urina	10.0	0.0	7.0	160.0	50.9	28.0	11.25	56.5	45.25	57.13	18.066
Grupo 3	Dia 1	10.0	0.0	4.0	300.0	93.3	28.5	12.75	146.25	133.5	119.957	37.934
Grupo 3	Dia 2	10.0	0.0	4.0	102.0	42.9	35.0	18.5	65.5	47.0	31.321	9.904
Grupo 3	Dia 3	10.0	0.0	6.0	300.0	52.5	24.0	13.5	32.5	19.0	88.708	28.052

Grupo 3	Dia 4	10.0	0.0	6.0	117.0	44.8	31.5	12.25	66.5	54.25	40.827	12.911
Grupo 3	Teste s/ urina	10.0	0.0	5.0	108.0	41.2	25.5	14.75	68.5	53.75	39.538	12.503
Grupo 3	Teste c/ urina	10.0	0.0	4.0	300.0	52.9	27.5	10.75	40.75	30.0	88.439	27.967
Grupo 4	Dia 1	10.0	0.0	5.0	300.0	99.2	41.5	23.5	128.75	105.25	113.077	35.758
Grupo 4	Dia 2	10.0	0.0	8.0	300.0	91.6	62.5	14.5	149.25	134.75	97.878	30.952
Grupo 4	Dia 3	10.0	0.0	25.0	300.0	68.6	38.0	32.75	57.75	25.0	82.765	26.173
Grupo 4	Dia 4	10.0	0.0	21.0	300.0	76.8	52.5	26.75	79.75	53.0	83.603	26.438
Grupo 4	Teste s/ urina	10.0	0.0	4.0	300.0	60.0	25.5	20.0	58.0	38.0	87.891	27.794
Grupo 4	Teste c/ urina	10.0	0.0	4.0	300.0	80.8	59.0	39.0	99.5	60.5	84.714	26.789

Quadro 56 – Comparação de Modelos Lineares Mistos para a Variável "Tempo de Achar" no LB2.

```
## Data: df_barnes_2
## Models:
## fit0: `Tempo de achar` ~ condicao + grupo + (1 | id_animal)
## fit1: `Tempo de achar` ~ condicao * grupo + (1 | id_animal)
##      npar    AIC    BIC  logLik -2*log(L)  Chisq Df Pr(>Chisq)
## fit0    12 3437.0 3481.5 -1706.5   3413.0
## fit1    32 3464.3 3582.8 -1700.1   3400.3 12.794 20     0.886
```

A tabela apresenta a comparação entre dois modelos mistos lineares: um modelo aditivo (fit0), que considera os efeitos principais de grupo e condição experimental, e um modelo com interação (fit1), que avalia a interação entre esses fatores. Ambos os modelos incluem intercepto aleatório para o fator "animal". Os critérios de ajuste (AIC e BIC), a verossimilhança (logLik), a deviance ($-2 \cdot \log L$) e o teste de razão de verossimilhança (Chisq) são apresentados. *npar* refere-se ao número de parâmetros estimados no modelo; *AIC* (Akaike Information Criterion); *BIC* (Bayesian Information Criterion); *logLik*

representa o logaritmo da verossimilhança; $-2\log(L)^*$ indica a deviance do modelo; *Chisq* corresponde à estatística do teste do qui-quadrado; *Df* aos graus de liberdade da comparação; e $Pr(>Chisq)$ ao valor de p associado ao teste.

Quadro 57 - Comparações Post Hoc com Correção de Tukey para a Variável "Tempo de Achar" no LB2.

```
## contrast estimate SE df t.ratio p.value
## Grupo controle - Grupo 1 -1.617 13 281 -0.124 0.9999
## Grupo controle - Grupo 2 10.333 13 281 0.794 0.9321
## Grupo controle - Grupo 3 10.550 13 281 0.811 0.9271
## Grupo controle - Grupo 4 -14.350 13 281 -1.103 0.8048
## Grupo 1 - Grupo 2 11.950 13 281 0.919 0.8895
## Grupo 1 - Grupo 3 12.167 13 281 0.935 0.8829
## Grupo 1 - Grupo 4 -12.733 13 281 -0.979 0.8646
## Grupo 2 - Grupo 3 0.217 13 281 0.017 1.0000
## Grupo 2 - Grupo 4 -24.683 13 281 -1.898 0.3210
## Grupo 3 - Grupo 4 -24.900 13 281 -1.914 0.3121
##
## Results are averaged over the levels of: condicao
## Degrees-of-freedom method: kenward-roger
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of 5 estimates
```

Foi utilizado o método de Tukey para ajuste dos valores de p em múltiplas comparações, e o método de Kenward-Roger para cálculo dos graus de liberdade. A coluna *estimate* representa a diferença média estimada entre os grupos comparados; *SE* refere-se ao erro padrão dessa estimativa; *df* indica os graus de liberdade utilizados no teste; *t.ratio* corresponde à razão t obtida na comparação; e *p.value* mostra o valor de p ajustado segundo o método de Tukey para múltiplas comparações.

Quadro 58 – Estatísticas descritivas da variável "Tempo de Entrar" no LB2.

Grupo	Condição	N	Missing	Mínimo	Máximo	Média	Mediana	Q1	Q3	IQR	Desvio Padrão	Erro Padrão
Grupo controle	Dia 1	10.0	0.0	7.0	300.0	123.7	102.0	35.25	196.5	161.25	105.747	33.44
Grupo controle	Dia 2	10.0	0.0	14.0	300.0	73.3	49.0	27.0	70.25	43.25	84.233	26.637
Grupo controle	Dia 3	10.0	0.0	9.0	226.0	77.4	67.0	29.0	106.0	77.0	64.986	20.55
Grupo controle	Dia 4	10.0	0.0	10.0	300.0	84.2	70.0	29.5	94.0	64.5	84.076	26.587
Grupo controle	Teste s/ urina	10.0	0.0	3.0	245.0	87.7	71.5	32.0	109.0	77.0	75.093	23.746
Grupo controle	Teste c/ urina	10.0	0.0	25.0	300.0	95.3	81.5	29.25	114.25	85.0	84.264	26.647
Grupo 1	Dia 1	10.0	0.0	14.0	300.0	206.9	229.0	133.0	300.0	167.0	105.248	33.282
Grupo 1	Dia 2	10.0	0.0	6.0	219.0	75.0	62.5	20.25	100.0	79.75	66.177	20.927
Grupo 1	Dia 3	10.0	0.0	12.0	300.0	100.0	56.0	39.25	97.25	58.0	109.125	34.508
Grupo 1	Dia 4	10.0	0.0	9.0	210.0	60.4	32.5	30.25	68.5	38.25	61.281	19.379
Grupo 1	Teste s/ urina	10.0	0.0	10.0	300.0	98.6	58.0	21.0	157.0	136.0	101.764	32.18
Grupo 1	Teste c/ urina	10.0	0.0	5.0	300.0	127.5	68.5	44.0	228.25	184.25	117.498	37.156
Grupo 2	Dia 1	10.0	0.0	6.0	300.0	124.8	78.0	14.5	260.0	245.5	127.863	40.434
Grupo 2	Dia 2	10.0	0.0	12.0	300.0	136.8	109.0	50.75	234.25	183.5	108.956	34.455
Grupo 2	Dia 3	10.0	0.0	12.0	300.0	80.3	53.5	15.5	101.5	86.0	90.16	28.511
Grupo 2	Dia 4	10.0	0.0	9.0	155.0	54.0	40.0	27.25	70.0	42.75	43.251	13.677
Grupo 2	Teste s/ urina	10.0	0.0	9.0	170.0	56.2	35.5	13.75	69.5	55.75	56.643	17.912
Grupo 2	Teste c/ urina	10.0	0.0	10.0	300.0	143.0	128.5	35.5	262.5	227.0	118.779	37.561
Grupo 3	Dia 1	10.0	0.0	7.0	300.0	178.0	197.5	51.75	300.0	248.25	126.162	39.896
Grupo 3	Dia 2	10.0	0.0	6.0	300.0	122.7	69.0	24.25	252.25	228.0	126.171	39.899
Grupo 3	Dia 3	10.0	0.0	10.0	300.0	92.2	45.0	21.0	82.0	61.0	112.309	35.515
Grupo 3	Dia 4	10.0	0.0	11.0	300.0	110.7	73.0	49.25	118.5	69.25	105.696	33.424
Grupo 3	Teste s/ urina	10.0	0.0	8.0	300.0	69.6	29.5	19.5	92.75	73.25	88.928	28.122
Grupo 3	Teste c/ urina	10.0	0.0	7.0	300.0	126.7	94.5	44.25	198.5	154.25	109.753	34.707
Grupo 4	Dia 1	10.0	0.0	7.0	300.0	118.6	54.0	25.0	248.0	223.0	127.37	40.278
Grupo 4	Dia 2	10.0	0.0	11.0	300.0	148.0	127.5	51.0	273.25	222.25	121.302	38.359
Grupo 4	Dia 3	10.0	0.0	29.0	300.0	91.7	59.5	40.25	88.75	48.5	84.727	26.793
Grupo 4	Dia 4	10.0	0.0	23.0	300.0	111.6	75.0	34.5	126.75	92.25	105.811	33.46
Grupo 4	Teste s/ urina	10.0	0.0	25.0	300.0	100.6	56.0	39.5	83.25	43.75	106.792	33.771
Grupo 4	Teste c/ urina	10.0	0.0	42.0	300.0	169.2	150.0	52.0	300.0	248.0	120.787	38.196

A tabela apresenta estatísticas descritivas da variável "tempo de entrar" (em segundos) no LB2. As métricas incluem média, mediana, valores

mínimo e máximo, quartis (Q1 e Q3), intervalo interquartil (IQR), desvio padrão e erro padrão da média. Cada condição contou com $n=10$ animais. Esses dados fornecem uma visão abrangente do desempenho dos grupos em tarefas de memória espacial e comportamento de evasão.

Quadro 59 – Comparação de Modelos Lineares Mistos para a Variável "Tempo de Entrar" no LB2.

## Data: df_barnes_2									
## Models:									
## fit0: `Tempo de entrar` ~ condicao + grupo + (1 id_animal)									
## fit1: `Tempo de entrar` ~ condicao * grupo + (1 id_animal)									
##	npar	AIC	BIC	logLik	-2*log(L)	Chisq	Df	Pr(>Chisq)	
## fit0	12	3600.2	3644.6	-1788.1	3576.2				
## fit1	32	3622.1	3740.6	-1779.0	3558.1	18.131	20	0.5788	

A tabela apresenta a comparação entre dois modelos mistos lineares: um modelo aditivo (fit0), que considera os efeitos principais de grupo e condição experimental, e um modelo com interação (fit1), que avalia a interação entre esses fatores. Ambos os modelos incluem intercepto aleatório para o fator "animal". Os critérios de ajuste (AIC e BIC), a verossimilhança (logLik), a deviance ($-2 \cdot \log L$) e o teste de razão de verossimilhança (Chisq) são apresentados. *npar* refere-se ao número de parâmetros estimados no modelo; *AIC* (Akaike Information Criterion); *BIC* (Bayesian Information Criterion); *logLik* representa o logaritmo da verossimilhança; $-2 \log(L)$ indica a deviance do modelo; *Chisq* corresponde à estatística do teste do qui-quadrado; *Df* aos graus de liberdade da comparação; e *Pr(>Chisq)* ao valor de p associado ao teste.

Quadro 60 – Comparações Post Hoc com Correção de Tukey para a Variável "Tempo de Entrar" no LB2.

```
## contrast estimate SE df t.ratio p.value
## Grupo controle - Grupo 1 -21.13 16.9 281 -1.250 0.7218
## Grupo controle - Grupo 2 -8.92 16.9 281 -0.527 0.9845
## Grupo controle - Grupo 3 -26.38 16.9 281 -1.561 0.5239
## Grupo controle - Grupo 4 -33.02 16.9 281 -1.953 0.2919
## Grupo 1 - Grupo 2 12.22 16.9 281 0.723 0.9511
## Grupo 1 - Grupo 3 -5.25 16.9 281 -0.311 0.9980
## Grupo 1 - Grupo 4 -11.88 16.9 281 -0.703 0.9557
## Grupo 2 - Grupo 3 -17.47 16.9 281 -1.033 0.8398
## Grupo 2 - Grupo 4 -24.10 16.9 281 -1.426 0.6116
## Grupo 3 - Grupo 4 -6.63 16.9 281 -0.392 0.9950
##
## Results are averaged over the levels of: condicao
## Degrees-of-freedom method: kenward-roger
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of 5 estimates
```

A tabela apresenta os resultados das comparações múltiplas entre os grupos experimentais em relação à variável "Tempo de Entrar" no Labirinto Barnes (LB2), considerando a média dos níveis da variável condição. Os valores foram ajustados pelo método de Tukey para controle do erro tipo I em múltiplas comparações, e os graus de liberdade foram estimados pelo método de Kenward-Roger. Para cada contraste entre pares de grupos, são exibidos: a diferença média estimada (*estimate*), o erro padrão (*SE*), os graus de liberdade (*df*), a razão t (*t.ratio*) e o valor de p ajustado (*p.value*).

2. Erros antes

Quadro 61 - Estatísticas descritivas da variável "Erros Antes" no LB2.

Grupo	Condição	n	Missing	Mínimo	Máximo	Média	Mediana	Q1	Q3	IQR	Desvio Padrão	Erro Padrão
Grupo controle	Dia 1	10.0	0.0	2.0	21.0	11.9	14.5	5.5	16.75	11.25	6.983	2.208
Grupo controle	Dia 2	10.0	0.0	1.0	16.0	6.1	5.0	3.25	8.0	4.75	4.408	1.394
Grupo controle	Dia 3	10.0	0.0	1.0	18.0	6.5	6.5	2.25	8.75	6.5	5.233	1.655
Grupo controle	Dia 4	10.0	0.0	0.0	24.0	7.3	7.0	3.25	8.0	4.75	6.667	2.108
Grupo controle	Teste s/ urina	10.0	0.0	0.0	14.0	4.5	4.5	0.5	6.0	5.5	4.403	1.392
Grupo controle	Teste c/ urina	10.0	0.0	0.0	20.0	7.8	6.5	4.25	9.75	5.5	5.653	1.788
Grupo 1	Dia 1	10.0	0.0	1.0	26.0	14.7	15.5	7.0	22.5	15.5	9.452	2.989
Grupo 1	Dia 2	10.0	0.0	0.0	13.0	5.4	3.0	1.25	10.25	9.0	5.082	1.607
Grupo 1	Dia 3	10.0	0.0	1.0	32.0	9.2	6.5	3.25	13.0	9.75	9.319	2.947
Grupo 1	Dia 4	10.0	0.0	1.0	12.0	5.6	5.5	4.0	7.5	3.5	3.204	1.013
Grupo 1	Teste s/ urina	10.0	0.0	1.0	11.0	5.1	5.0	2.0	8.25	6.25	3.665	1.159
Grupo 1	Teste c/ urina	10.0	0.0	0.0	12.0	5.3	4.5	2.25	9.25	7.0	4.296	1.359
Grupo 2	Dia 1	10.0	0.0	0.0	21.0	8.3	5.5	2.5	13.75	11.25	7.394	2.338
Grupo 2	Dia 2	10.0	0.0	1.0	22.0	8.9	8.0	4.25	13.5	9.25	6.674	2.111
Grupo 2	Dia 3	10.0	0.0	0.0	14.0	6.0	5.5	1.25	10.0	8.75	5.228	1.653
Grupo 2	Dia 4	10.0	0.0	1.0	11.0	4.5	3.5	2.25	5.0	2.75	3.206	1.014
Grupo 2	Teste s/ urina	10.0	0.0	0.0	11.0	3.6	3.0	1.25	5.0	3.75	3.373	1.067
Grupo 2	Teste c/ urina	10.0	0.0	0.0	19.0	6.4	5.5	1.75	9.25	7.5	5.985	1.893
Grupo 3	Dia 1	10.0	0.0	0.0	12.0	4.4	4.0	1.25	6.75	5.5	3.718	1.176
Grupo 3	Dia 2	10.0	0.0	0.0	16.0	6.1	5.0	3.25	7.0	3.75	4.795	1.516
Grupo 3	Dia 3	10.0	0.0	1.0	7.0	4.1	4.0	3.0	5.5	2.5	2.025	0.64
Grupo 3	Dia 4	10.0	0.0	1.0	18.0	6.5	5.5	2.0	9.75	7.75	5.642	1.784
Grupo 3	Teste s/ urina	10.0	0.0	0.0	21.0	6.3	3.5	2.0	5.75	3.75	7.454	2.357
Grupo 3	Teste c/ urina	10.0	0.0	0.0	23.0	5.7	4.5	1.5	5.75	4.25	6.8	2.15
Grupo 4	Dia 1	10.0	0.0	1.0	22.0	9.9	9.5	4.5	14.5	10.0	7.141	2.258
Grupo 4	Dia 2	10.0	0.0	0.0	24.0	9.2	7.5	2.25	14.5	12.25	8.404	2.657
Grupo 4	Dia 3	10.0	0.0	3.0	16.0	7.2	5.5	5.0	9.75	4.75	4.05	1.281
Grupo 4	Dia 4	10.0	0.0	3.0	19.0	8.4	8.0	4.75	10.0	5.25	4.835	1.529
Grupo 4	Teste s/ urina	10.0	0.0	0.0	10.0	4.4	3.5	1.25	7.5	6.25	3.627	1.147
Grupo 4	Teste c/ urina	10.0	0.0	0.0	15.0	6.9	7.5	4.0	9.5	5.5	5.021	1.588

Quadro 62 - Comparação entre modelos mistos generalizados para a variável "Erros Antes" no LB2.

```
## Data: df_barnes_2
## Models:
## fit0: `Erros antes` ~ condicao + grupo + (1 | id_animal), zi=-0, disp=-1
## fit1: `Erros antes` ~ condicao * grupo + (1 | id_animal), zi=-0, disp=-1
##      Df      AIC      BIC logLik deviance Chisq Chi Df Pr(>Chisq)
## fit0 12 1782.2 1826.7 -879.12 1758.2
## fit1 32 1801.7 1920.2 -868.84 1737.7 20.562 20 0.4233
```

A tabela apresenta a comparação entre dois modelos mistos lineares: um modelo aditivo (fit0), que considera os efeitos principais de grupo e condição experimental, e um modelo com interação (fit1), que avalia a interação entre esses fatores. Ambos os modelos incluem intercepto aleatório para o fator "animal". Os critérios de ajuste (AIC e BIC), a verossimilhança (logLik), a deviance ($-2 \cdot \log L$) e o teste de razão de verossimilhança (Chisq) são apresentados. *npar* refere-se ao número de parâmetros estimados no modelo; *AIC* (Akaike Information Criterion); *BIC* (Bayesian Information Criterion); *logLik* representa o logaritmo da verossimilhança; $-2 \log(L)$ indica a deviance do modelo; *Chisq* corresponde à estatística do teste do qui-quadrado; *Df* aos graus de liberdade da comparação; e *Pr(>Chisq)* ao valor de p associado ao teste.

Quadro 63 – Comparações múltiplas entre grupos experimentais para a variável "Erros Antes" no LB2.

```
## contrast          ratio    SE  df null z.ratio p.value
## Grupo controle / Grupo 1 0.987 0.154 Inf 1 -0.082 1.0000
## Grupo controle / Grupo 2 1.160 0.182 Inf 1 0.944 0.8798
## Grupo controle / Grupo 3 1.274 0.202 Inf 1 1.528 0.5443
## Grupo controle / Grupo 4 0.958 0.149 Inf 1 -0.274 0.9988
## Grupo 1 / Grupo 2      1.175 0.185 Inf 1 1.020 0.8462
## Grupo 1 / Grupo 3      1.291 0.206 Inf 1 1.601 0.4966
## Grupo 1 / Grupo 4      0.971 0.151 Inf 1 -0.191 0.9997
## Grupo 2 / Grupo 3      1.099 0.176 Inf 1 0.587 0.9770
## Grupo 2 / Grupo 4      0.826 0.130 Inf 1 -1.215 0.7424
## Grupo 3 / Grupo 4      0.752 0.119 Inf 1 -1.802 0.3723
##
## Results are averaged over the levels of: condicao
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of 5 estimates
## Tests are performed on the log scale
```

O quadro apresenta os resultados das comparações múltiplas entre os grupos experimentais em relação à variável "Erros Antes", avaliados no Labirinto de Barnes (LB2). As comparações foram realizadas por meio de estimativas de razão de médias (ratio) no log scale, com erros padrão (SE), razão z (z.ratio) e valores de p correspondentes, ajustados pelo método de Tukey para controle do erro tipo I em comparações múltiplas. Os resultados foram agregados sobre os níveis da variável *condição*.

3. Erros depois

Quadro 64 - Estatísticas descritivas da variável "Erros Depois" no Labirinto de Barnes – Sessão LB2

Grupo	Condição	n	Missing	Mínimo	Máximo	Média	Mediana	Q1	Q3	IQR	Desvio Padrão	Erro Padrão
Grupo controle	Dia 1	10.0	0.0	0.0	14.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.619	1.461
Grupo controle	Dia 2	10.0	0.0	0.0	24.0	2.4	0.0	0.0	0.0	0.0	7.589	2.4
Grupo controle	Dia 3	10.0	0.0	0.0	11.0	2.2	0.0	0.0	1.0	1.0	4.158	1.315
Grupo controle	Dia 4	10.0	0.0	0.0	4.0	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	1.265	0.4

Grupo controle	Teste s/ urina	10.0	0.0	0.0	20.0	5.2	0.0	0.0	11.25	11.25	8.456	2.674
Grupo controle	Teste c/ urina	10.0	0.0	0.0	9.0	0.9	0.0	0.0	0.0	0.0	2.846	0.9
Grupo 1	Dia 1	10.0	0.0	0.0	15.0	4.4	0.0	0.0	9.25	9.25	6.363	2.012
Grupo 1	Dia 2	10.0	0.0	0.0	13.0	2.4	0.0	0.0	0.0	0.0	5.082	1.607
Grupo 1	Dia 3	10.0	0.0	0.0	20.0	2.5	0.5	0.0	1.0	1.0	6.187	1.956
Grupo 1	Dia 4	10.0	0.0	0.0	20.0	2.2	0.0	0.0	0.0	0.0	6.286	1.988
Grupo 1	Teste s/ urina	10.0	0.0	0.0	20.0	3.3	0.0	0.0	0.0	0.0	7.15	2.261
Grupo 1	Teste c/ urina	10.0	0.0	0.0	19.0	5.9	0.0	0.0	11.75	11.75	7.937	2.51
Grupo 2	Dia 1	10.0	0.0	0.0	25.0	4.3	0.0	0.0	0.0	0.0	9.214	2.914
Grupo 2	Dia 2	10.0	0.0	0.0	25.0	6.3	0.5	0.0	10.25	10.25	9.417	2.978
Grupo 2	Dia 3	10.0	0.0	0.0	2.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	632	0.2
Grupo 2	Dia 4	10.0	0.0	0.0	6.0	0.9	0.0	0.0	1.0	1.0	1.853	586
Grupo 2	Teste s/ urina	10.0	0.0	0.0	7.0	1.1	0.0	0.0	0.0	0.0	2.424	767
Grupo 2	Teste c/ urina	10.0	0.0	0.0	14.0	3.9	2.0	0.0	7.25	7.25	4.795	1.516
Grupo 3	Dia 1	10.0	0.0	0.0	20.0	5.9	0.0	0.0	11.75	11.75	8.225	2.601
Grupo 3	Dia 2	10.0	0.0	0.0	16.0	3.1	0.0	0.0	0.75	0.75	6.297	1.991
Grupo 3	Dia 3	10.0	0.0	0.0	16.0	2.9	0.0	0.0	0.0	0.0	6.154	1.946
Grupo 3	Dia 4	10.0	0.0	0.0	11.0	2.3	0.0	0.0	4.0	4.0	3.802	1.202
Grupo 3	Teste s/ urina	10.0	0.0	0.0	3.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	1.08	342
Grupo 3	Teste c/ urina	10.0	0.0	0.0	14.0	4.2	3.0	0.0	7.0	7.0	4.803	1.519
Grupo 4	Dia 1	10.0	0.0	0.0	5.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	1.581	0.5
Grupo 4	Dia 2	10.0	0.0	0.0	17.0	2.8	0.0	0.0	2.25	2.25	5.613	1.775
Grupo 4	Dia 3	10.0	0.0	0.0	7.0	1.3	0.0	0.0	0.75	0.75	2.541	803
Grupo 4	Dia 4	10.0	0.0	0.0	15.0	2.3	0.0	0.0	0.75	0.75	4.968	1.571
Grupo 4	Teste s/ urina	10.0	0.0	0.0	15.0	1.9	0.0	0.0	0.0	0.0	4.771	1.509
Grupo 4	Teste c/ urina	10.0	0.0	0.0	16.0	5.2	1.5	0.0	9.75	9.75	6.391	2.021

A tabela apresenta os valores descritivos da variável "Erros Depois" no LB2. As métricas estatísticas incluem média, mediana, valores mínimo e máximo, primeiro e terceiro quartis (Q1 e Q3), intervalo interquartil (IQR), desvio padrão e erro padrão da média, com $n=10$ animais por condição.

Quadro 65 – Comparação entre modelos mistos para a variável "Erros Depois" no Labirinto de Barnes – Sessão LB2.

```
## Data: df_barnes_2
## Models:
## fit0_ed: `Erros depois` ~ condicao + grupo + (1 | id_animal), zi=~0, disp=~1
## fit1_ed: `Erros depois` ~ condicao * grupo + (1 | id_animal), zi=~0, disp=~1
##           Df      AIC      BIC  logLik deviance  Chisq Chi Df Pr(>Chisq)
## fit0_ed 12  980.73 1025.2 -478.36   956.73
## fit1_ed 32 1006.01 1124.5 -471.01   942.01 14.714    20    0.7925
```

A tabela apresenta a comparação entre dois modelos mistos lineares: um modelo aditivo (fit0), que considera os efeitos principais de grupo e condição experimental, e um modelo com interação (fit1), que avalia a interação entre esses fatores. Ambos os modelos incluem intercepto aleatório para o fator "animal". Os critérios de ajuste (AIC e BIC), a verossimilhança (logLik), a deviance ($-2 \cdot \log L$) e o teste de razão de verossimilhança (Chisq) são apresentados. *npar* refere-se ao número de parâmetros estimados no modelo; *AIC* (Akaike Information Criterion); *BIC* (Bayesian Information Criterion); *logLik* representa o logaritmo da verossimilhança; $-2 \log(L)$ indica a *deviance* do modelo; *Chisq* corresponde à estatística do teste do qui-quadrado; *Df* aos graus de liberdade da comparação; e *Pr(>Chisq)* ao valor de *p* associado ao teste.

Quadro 66 – Comparações múltiplas entre grupos experimentais para a variável "Erros Depois" no Labirinto de Barnes – Sessão LB2

```
## contrast ratio SE df null z.ratio p.value
## Grupo controle / Grupo 1 0.665 0.369 Inf 1 -0.735 0.9485
## Grupo controle / Grupo 2 0.969 0.560 Inf 1 -0.055 1.0000
## Grupo controle / Grupo 3 0.722 0.412 Inf 1 -0.570 0.9794
## Grupo controle / Grupo 4 0.977 0.557 Inf 1 -0.041 1.0000
## Grupo 1 / Grupo 2 1.457 0.808 Inf 1 0.679 0.9611
## Grupo 1 / Grupo 3 1.086 0.588 Inf 1 0.152 0.9999
## Grupo 1 / Grupo 4 1.470 0.801 Inf 1 0.706 0.9551
## Grupo 2 / Grupo 3 0.745 0.413 Inf 1 -0.531 0.9842
## Grupo 2 / Grupo 4 1.009 0.565 Inf 1 0.015 1.0000
## Grupo 3 / Grupo 4 1.354 0.749 Inf 1 0.547 0.9823
##
## Results are averaged over the levels of: condicao
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of 5 estimates
## Tests are performed on the log scale
```

O quadro apresenta os resultados das comparações par a par entre os grupos experimentais em relação à variável "Erros Depois" no LB2. As comparações são baseadas nas razões de médias (*ratio*) em escala logarítmica, com respectivos erros padrão (SE), estatísticas z (z.ratio) e valores de *p*, ajustados pelo método de Tukey para controle do erro tipo I. Os resultados estão agregados sobre os níveis da variável *condição*.

4. Latência para entrar - Estatísticas descritivas da variável "Latência para Entrar" no LB2.

Quadro 67 – Estatísticas descritivas da variável "Latência para Entrar" no LB2.

Grupo	Condição	n	Missing	Mínimo	Máximo	Média	Mediana	Q1	Q3	IQR	Desvio Padrão	Erro Padrão
Grupo controle	Dia 1	10.0	0.0	1.0	280.0	39.9	3.5	2.0	5.75	3.75	89.081	28.17
Grupo controle	Dia 2	10.0	0.0	2.0	256.0	30.2	5.0	2.25	6.75	4.5	79.421	25.115

Grupo controle	Dia 3	10.0	0.0	1.0	165.0	23.0	3.5	3.0	15.5	12.5	50.546	15.984
Grupo controle	Dia 4	10.0	0.0	0.0	42.0	7.7	4.0	1.5	6.75	5.25	12.383	3.916
Grupo controle	Teste s/ urina	10.0	0.0	1.0	170.0	39.5	4.5	2.25	65.0	62.75	62.151	19.654
Grupo controle	Teste c/ urina	10.0	0.0	0.0	69.0	10.4	3.5	1.25	6.5	5.25	20.903	6.61
Grupo 1	Dia 1	10.0	0.0	0.0	283.0	62.3	5.0	4.0	99.0	95.0	94.283	29.815
Grupo 1	Dia 2	10.0	0.0	2.0	94.0	25.8	5.5	3.25	37.5	34.25	37.055	11.718
Grupo 1	Dia 3	10.0	0.0	0.0	215.0	30.2	9.0	2.0	15.75	13.75	65.713	20.78
Grupo 1	Dia 4	10.0	0.0	1.0	175.0	22.4	2.5	1.25	9.0	7.75	53.986	17.072
Grupo 1	Teste s/ urina	10.0	0.0	1.0	285.0	45.8	2.0	1.0	7.75	6.75	95.96	30.345
Grupo 1	Teste c/ urina	10.0	0.0	1.0	260.0	81.3	18.0	5.75	157.0	151.25	106.869	33.795
Grupo 2	Dia 1	10.0	0.0	0.0	274.0	55.3	2.0	1.0	4.5	3.5	112.663	35.627
Grupo 2	Dia 2	10.0	0.0	4.0	260.0	73.5	15.0	6.75	103.0	96.25	103.398	32.697
Grupo 2	Dia 3	10.0	0.0	0.0	19.0	5.5	4.5	3.25	5.75	2.5	5.148	1.628
Grupo 2	Dia 4	10.0	0.0	1.0	70.0	13.2	5.0	3.0	10.75	7.75	20.911	6.613
Grupo 2	Teste s/ urina	10.0	0.0	1.0	130.0	26.6	5.5	3.25	8.0	4.75	47.193	14.924
Grupo 2	Teste c/ urina	10.0	0.0	2.0	266.0	92.1	103.5	9.0	135.75	126.75	85.738	27.113
Grupo 3	Dia 1	10.0	0.0	0.0	290.0	84.7	3.0	2.25	168.75	166.5	119.044	37.645
Grupo 3	Dia 2	10.0	0.0	2.0	274.0	79.8	5.0	3.25	175.0	171.75	122.526	38.746
Grupo 3	Dia 3	10.0	0.0	0.0	285.0	39.7	4.5	3.25	21.5	18.25	88.352	27.939
Grupo 3	Dia 4	10.0	0.0	4.0	288.0	65.9	8.0	5.0	28.5	23.5	117.376	37.118
Grupo 3	Teste s/ urina	10.0	0.0	1.0	218.0	28.4	2.5	2.0	3.75	1.75	68.159	21.554
Grupo 3	Teste c/ urina	10.0	0.0	0.0	245.0	73.8	55.0	2.0	95.75	93.75	86.876	27.473
Grupo 4	Dia 1	10.0	0.0	0.0	158.0	19.4	2.5	1.25	7.5	6.25	48.949	15.479
Grupo 4	Dia 2	10.0	0.0	0.0	272.0	56.4	5.0	3.0	29.75	26.75	103.613	32.765
Grupo 4	Dia 3	10.0	0.0	0.0	135.0	23.1	3.5	2.0	12.5	10.5	43.646	13.802
Grupo 4	Dia 4	10.0	0.0	0.0	254.0	34.8	6.5	2.25	7.75	5.5	78.953	24.967
Grupo 4	Teste s/ urina	10.0	0.0	0.0	296.0	40.6	2.5	1.25	24.75	23.5	91.494	28.933
Grupo 4	Teste c/ urina	10.0	0.0	0.0	236.0	88.4	19.5	4.0	192.0	188.0	105.008	33.206

Os parâmetros estatísticos incluem média, mediana, valores mínimo e máximo, quartis (Q1 e Q3), intervalo interquartil (IQR), desvio padrão e erro padrão da média.

Quadro 68 – Comparação entre modelos mistos para a variável "Latência para Entrar" no Labirinto de Barnes – Sessão LB2

```
## Data: df_barnes_2
## Models:
## fit0: `Latência p/ entrar` ~ condicao + grupo + (1 | id_animal)
## fit1: `Latência p/ entrar` ~ condicao * grupo + (1 | id_animal)
##      npar    AIC    BIC  logLik -2*log(L)  Chisq Df Pr(>Chisq)
## fit0   12 3487.1 3531.5 -1731.5   3463.1
## fit1   32 3512.5 3631.1 -1724.3   3448.5 14.515 20    0.8035
```

A tabela apresenta a comparação entre dois modelos mistos lineares: um modelo aditivo (fit0), que considera os efeitos principais de grupo e condição experimental, e um modelo com interação (fit1), que avalia a interação entre esses fatores. Ambos os modelos incluem intercepto aleatório para o fator "animal". Os critérios de ajuste (AIC e BIC), a verossimilhança (logLik), a deviance ($-2 \cdot \log L$) e o teste de razão de verossimilhança (Chisq) são apresentados. *npar* refere-se ao número de parâmetros estimados no modelo; *AIC* (Akaike Information Criterion); *BIC* (Bayesian Information Criterion); *logLik* representa o logaritmo da verossimilhança; $-2 \log(L)$ indica a deviance do modelo; *Chisq* corresponde à estatística do teste do qui-quadrado; *Df* aos graus de liberdade da comparação; e *Pr(>Chisq)* ao valor de *p* associado ao teste.

Quadro 69 – Comparações múltiplas entre grupos experimentais para a variável "Latência para Entrar" no Labirinto de Barnes – Sessão LB2.

```
## contrast estimate SE df t.ratio p.value
## Grupo controle - Grupo 1 -19.517 14.2 281 -1.377 0.6431
## Grupo controle - Grupo 2 -19.250 14.2 281 -1.358 0.6551
## Grupo controle - Grupo 3 -36.933 14.2 281 -2.605 0.0721
## Grupo controle - Grupo 4 -18.667 14.2 281 -1.317 0.6810
## Grupo 1 - Grupo 2 0.267 14.2 281 0.019 1.0000
## Grupo 1 - Grupo 3 -17.417 14.2 281 -1.229 0.7347
## Grupo 1 - Grupo 4 0.850 14.2 281 0.060 1.0000
## Grupo 2 - Grupo 3 -17.683 14.2 281 -1.247 0.7235
## Grupo 2 - Grupo 4 0.583 14.2 281 0.041 1.0000
## Grupo 3 - Grupo 4 18.267 14.2 281 1.289 0.6985
##
## Results are averaged over the levels of: condicao
## Degrees-of-freedom method: kenward-roger
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of 5 estimates
```

Os valores apresentados correspondem às estimativas de diferença média (em segundos), acompanhadas do erro padrão (SE), graus de liberdade (df), razão t (t.ratio) e valor de p ajustado pelo método de Tukey. Os resultados foram calculados com base no método de Kenward-Roger para correção dos graus de liberdade, e os valores são médias ajustadas considerando todos os níveis da variável condição.

5. *Grooming* no segundo momento

Quadro 70 - Estatísticas descritivas da variável "*Grooming*" no o

LB2

Grupo	Condição	n	Missing	Mínimo	Máximo	Média	Mediana	Q1	Q3	IQR	Desvio Padrão	Erro Padrão
Grupo controle	Dia 1	10.0	0.0	0.0	17.0	1.7	0.0	0.0	0.0	0.0	5.376	1.7
Grupo controle	Dia 2	10.0	0.0	0.0	27.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	8.485	2.683
Grupo controle	Dia 3	10.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Grupo controle	Dia 4	10.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

Grupo controle	Teste s/ urina	10.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Grupo controle	Teste c/ urina	10.0	0.0	0.0	2.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	632	0.2
Grupo 1	Dia 1	10.0	0.0	0.0	23.0	5.4	0.0	0.0	6.0	6.0	9.046	2.86
Grupo 1	Dia 2	10.0	0.0	0.0	1.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	316	0.1
Grupo 1	Dia 3	10.0	0.0	0.0	25.0	2.5	0.0	0.0	0.0	0.0	7.906	2.5
Grupo 1	Dia 4	10.0	0.0	0.0	3.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	949	0.3
Grupo 1	Teste s/ urina	10.0	0.0	0.0	28.0	3.2	0.0	0.0	1.0	1.0	8.741	2.764
Grupo 1	Teste c/ urina	10.0	0.0	0.0	12.0	1.5	0.0	0.0	0.0	0.0	3.808	1.204
Grupo 2	Dia 1	10.0	0.0	0.0	9.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.828	894
Grupo 2	Dia 2	10.0	0.0	0.0	18.0	2.6	0.0	0.0	2.25	2.25	5.68	1.796
Grupo 2	Dia 3	10.0	0.0	0.0	10.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.162	1.0
Grupo 2	Dia 4	10.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Grupo 2	Teste s/ urina	10.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Grupo 2	Teste c/ urina	10.0	0.0	0.0	33.0	3.9	0.0	0.0	0.0	0.0	10.397	3.288
Grupo 3	Dia 1	10.0	0.0	0.0	4.0	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	1.265	0.4
Grupo 3	Dia 2	10.0	0.0	0.0	13.0	1.5	0.0	0.0	0.0	0.0	4.089	1.293
Grupo 3	Dia 3	10.0	0.0	0.0	36.0	4.2	0.0	0.0	0.0	0.0	11.331	3.583
Grupo 3	Dia 4	10.0	0.0	0.0	9.0	0.9	0.0	0.0	0.0	0.0	2.846	0.9
Grupo 3	Teste s/ urina	10.0	0.0	0.0	14.0	1.7	0.0	0.0	0.0	0.0	4.423	1.399
Grupo 3	Teste c/ urina	10.0	0.0	0.0	10.0	2.2	0.0	0.0	3.0	3.0	3.824	1.209
Grupo 4	Dia 1	10.0	0.0	0.0	18.0	2.4	0.0	0.0	0.0	0.0	5.797	1.833
Grupo 4	Dia 2	10.0	0.0	0.0	29.0	3.6	0.0	0.0	2.25	2.25	9.046	2.86
Grupo 4	Dia 3	10.0	0.0	0.0	3.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	949	0.3
Grupo 4	Dia 4	10.0	0.0	0.0	26.0	5.0	0.0	0.0	0.0	0.0	10.551	3.337
Grupo 4	Teste s/ urina	10.0	0.0	0.0	18.0	2.8	0.0	0.0	0.0	0.0	6.197	1.96
Grupo 4	Teste c/ urina	10.0	0.0	0.0	37.0	6.7	0.0	0.0	8.5	8.5	11.767	3.721

Os parâmetros estatísticos incluem média, mediana, valores mínimo e máximo, quartis (Q1 e Q3), intervalo interquartil (IQR), desvio padrão e erro padrão da média.

Quadro 71 – Comparação entre modelos mistos para a variável "Grooming" no LB2.

```
## Data: df_barnes_2
## Models:
## fit0_grooming: Grooming ~ condicao + grupo + (1 | id_animal), zi=-0, disp=-1
## fit1_grooming: Grooming ~ condicao * grupo + (1 | id_animal), zi=-0, disp=-1
##           Df      AIC      BIC logLik deviance Chisq Chi Df Pr(>Chisq)
## fit0_grooming 12 631.88 676.32 -303.94 607.88
## fit1_grooming 32 641.93 760.45 -288.96 577.93 29.952 20 0.07064 .
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

A tabela apresenta a comparação entre dois modelos mistos lineares: um modelo aditivo (fit0), que considera os efeitos principais de grupo e condição experimental, e um modelo com interação (fit1), que avalia a interação entre esses fatores. *npar* refere-se ao número de parâmetros estimados no modelo; *AIC* (Akaike Information Criterion); *BIC* (Bayesian Information Criterion); *logLik* representa o logaritmo da verossimilhança; $-2\log(L)^*$ indica a deviance do modelo; *Chisq* corresponde à estatística do teste do qui-quadrado; *Df* aos graus de liberdade da comparação; e *Pr(>Chisq)* ao valor de *p* associado ao teste.

Quadro 72 – Comparações Post Hoc de Razões entre Grupos para a Variável "Tempo de Achar" LB2 — Escala Logarítmica

```
## contrast          ratio      SE df null z.ratio p.value
## Grupo controle / Grupo 1 0.0959 0.1030 Inf 1 -2.175 0.1891
## Grupo controle / Grupo 2 0.5948 0.5300 Inf 1 -0.583 0.9776
## Grupo controle / Grupo 3 0.3218 0.3280 Inf 1 -1.111 0.8007
## Grupo controle / Grupo 4 0.1016 0.0919 Inf 1 -2.529 0.0843
## Grupo 1 / Grupo 2      6.2016 6.5200 Inf 1 1.737 0.4113
## Grupo 1 / Grupo 3      3.3552 3.5300 Inf 1 1.151 0.7792
## Grupo 1 / Grupo 4      1.0595 1.0900 Inf 1 0.056 1.0000
## Grupo 2 / Grupo 3      0.5410 0.4510 Inf 1 -0.736 0.9480
## Grupo 2 / Grupo 4      0.1708 0.1610 Inf 1 -1.874 0.3314
## Grupo 3 / Grupo 4      0.3158 0.3120 Inf 1 -1.166 0.7711
##
## Results are averaged over the levels of: condicao
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of 5 estimates
## Tests are performed on the log scale
```

O quadro apresenta os resultados das comparações múltiplas entre os grupos experimentais para a variável "Tempo de Achar" no LB2, utilizando razões entre médias em escala logarítmica. As comparações foram ajustadas pelo método de Tukey para controle do erro tipo I em múltiplas comparações. A coluna *ratio* representa a razão entre as médias geométricas dos grupos comparados, expressa na escala logarítmica; *SE* refere-se ao erro padrão associado a essa razão; *z.ratio* corresponde à estatística do teste z utilizada para avaliar a diferença entre os grupos; e *p.value* indica o valor de p ajustado pelo método de Tukey para múltiplas comparações.

Esquiva Aversiva

Quadro 73 - Estatísticas descritivas da variável "tempo de esquiva aversiva" nas diferentes fases experimentais.

Grupo	Condição	n	Mínimo	Máximo	Média	Mediana	Q1	Q3	IQR	Desvio padrão	Erro padrão
Grupo Controle	Treino	10	12.0	78.0	38.2	35.5	20.0	45.5	25.5	22.866	7.231
Grupo Controle	Pós 210 min	10	300.0	300.0	300.0	300.0	300.0	300.0	0.0	0.0	0.0
Grupo Controle	Pós 24h	10	300.0	300.0	300.0	300.0	300.0	300.0	0.0	0.0	0.0

Grupo Controle	Pós 30 dias	0									
Grupo 1	Treino	10	12.0	105.0	35.0	27.0	20.25	39.25	19.0	26.758	8.462
Grupo 1	Pós 210 min	10	261.0	300.0	296.1	300.0	300.0	300.0	0.0	12.333	3.9
Grupo 1	Pós 24h	10	111.0	300.0	279.7	300.0	300.0	300.0	0.0	59.438	18.796
Grupo 1	Pós 30 dias	0									
Grupo 2	Treino	10	12.0	35.0	20.8	18.5	16.5	24.0	7.5	6.779	2.144
Grupo 2	Pós 210 min	10	18.0	300.0	271.8	300.0	300.0	300.0	0.0	89.176	28.2
Grupo 2	Pós 24h	10	300.0	300.0	300.0	300.0	300.0	300.0	0.0	0.0	0.0
Grupo 2	Pós 30 dias	0									
Grupo 3	Treino	10	17.0	90.0	36.0	32.0	22.0	42.25	20.25	21.613	6.835
Grupo 3	Pós 210 min	10	300.0	300.0	300.0	300.0	300.0	300.0	0.0	0.0	0.0
Grupo 3	Pós 24h	10	28.0	300.0	272.8	300.0	300.0	300.0	0.0	86.014	27.2
Grupo 3	Pós 30 dias	0									
Grupo 4	Treino	10	19.0	204.0	79.5	53.0	36.25	94.0	57.75	62.92	19.897
Grupo 4	Pós 210 min	10	232.0	300.0	293.2	300.0	300.0	300.0	0.0	21.503	6.8
Grupo 4	Pós 24h	10	100.0	300.0	280.0	300.0	300.0	300.0	0.0	63.246	20.0
Grupo 4	Pós 30 dias	0									

O quadro apresenta as estatísticas descritivas da variável "tempo de esquia aversiva" (em segundos), medida pela latência para entrada no compartimento associado ao choque, durante os quatro momentos experimentais: treino (aquisição), teste de memória de curto prazo (210 minutos), de longo prazo (24 horas) e remota (30 dias). A ausência de variabilidade na fase de 30 dias impossibilitou a análise estatística, pois nenhum animal ingressou no compartimento nesse intervalo de tempo. O aumento acentuado da latência após o treino, com manutenção até 24h, sugere consolidação robusta da memória aversiva nos diferentes grupos, com variações intergrupais possivelmente associadas às intervenções experimentais.

Quadro 74 - Parâmetros do Modelo Linear Misto para a Variável

"Esquiva Aversiva".

```
## Linear mixed model fit by REML. t-tests use Satterthwaite's method [
## lmerModLmerTest]
## Formula: Esquiva ~ condicao + grupo + (1 | id_animal)
## Data: df_esquiva
##
## REML criterion at convergence: 1516.7
##
## Scaled residuals:
##      Min       1Q   Median       3Q      Max
## -5.8809 -0.1013  0.1173  0.3638  3.3537
##
## Random effects:
## Groups      Name                Variance Std.Dev.
## id_animal (Intercept)    15.19    3.897
## Residual                1989.26   44.601
## Number of obs: 150, groups: id_animal, 10
##
## Fixed effects:
##              Estimate Std. Error    df t value Pr(>|t|)
## (Intercept)    47.760     9.713 124.465   4.917 2.72e-06 ***
## condicaoPós 210 min 250.320     8.920 134.000  28.062 < 2e-16 ***
## condicaoPós 24h    244.600     8.920 134.000  27.421 < 2e-16 ***
## grupoGrupo 1      -9.133    11.516 134.000  -0.793  0.429
## grupoGrupo 2     -15.200    11.516 134.000  -1.320  0.189
## grupoGrupo 3      -9.800    11.516 134.000  -0.851  0.396
## grupoGrupo 4       4.833    11.516 134.000   0.420  0.675
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

O quadro apresenta os resultados do modelo linear misto ajustado para a variável "esquiva aversiva", considerando como efeitos fixos os fatores "condição" (momento da avaliação: Treino, Pós 210 min, Pós 24h) e "grupo experimental", com intercepto aleatório por animal (id_animal). O modelo foi estimado por máxima verossimilhança restrita (REML) e utilizou o método de *Satterthwaite* para cálculo dos graus de liberdade.

Quadro 75 - Comparações Post Hoc entre Condições Experimentais na Tarefa de EA

```
## contrast          estimate    SE  df t.ratio p.value
## Treino - Pós 210 min  -250.32  8.92 134 -28.062  <.0001
## Treino - Pós 24h      -244.60  8.92 134 -27.421  <.0001
## Pós 210 min - Pós 24h    5.72  8.92 134   0.641  0.7976
##
## Results are averaged over the levels of: grupo
## Degrees-of-freedom method: kenward-roger
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of 3 estimates
```

O quadro apresenta os resultados das comparações múltiplas entre as condições experimentais (Treino, Pós 210 minutos e Pós 24 horas), realizadas por meio do método de Tukey com ajuste para comparações entre três estimativas.

Análise de metilação do gene promotor de AVP

Quadro 76 - Valores de Ct (Cycle Threshold) e Δ Ct obtidos por qPCR após digestão com a enzima de restrição HpaII, sensível à metilação, no promotor do gene AVP (arginina vasopressina). Para cada uma das 50 amostras analisadas, a tabela apresenta os valores individuais de Ct (duplicata), a média dos dois ciclos (Ct mean) e o valor de Δ Ct calculado entre as amostras digeridas (com HpaII) e as respectivas não digeridas. Valores de Δ Ct próximos de zero ou negativos indicam presença de metilação (DNA não clivado), enquanto valores positivos sugerem hipometilação (DNA digerido). As linhas estão coloridas de acordo com o grupo experimental:

- verde (1–10): Grupo Controle;
- vermelho (11–20): Grupo 1;
- azul (21–30): Grupo 2;
- laranja (31–40): Grupo 3;
- roxo (41–50): Grupo 4.

Sample Name	Target Name	Ct Threshold	Cr n1	Cr n2	Ct mean	Sample Name	Target Name	Ct Threshold	Cr n1	Cr n2	Ct mean	DELTA CT (nt - t)
1 - H	AVP2	0,1	22,044	21,991	22,017	1 + H	AVP2	0,1	21,727	21,878	21,802	0,215
2 - H	AVP2	0,1	22,899	22,473	22,686	2 + H	AVP2	0,1	22,842	22,789	22,816	-0,130
3 - H	AVP2	0,1	21,465	21,437	21,451	3 + H	AVP2	0,1	21,671	21,601	21,636	-0,184
4 - H	AVP2	0,1	22,584	22,473	22,529	4 + H	AVP2	0,1	22,620	22,633	22,626	-0,097
5 - H	AVP2	0,1	22,872	22,782	22,827	5 + H	AVP2	0,1	22,686	22,630	22,658	0,169
6 - H	AVP2	0,1	22,455	22,362	22,409	6 + H	AVP2	0,1	22,223	21,873	22,048	0,361
7 - H	AVP2	0,1	21,779	21,500	21,639	7 + H	AVP2	0,1	22,095	22,243	22,169	-0,530
8 - H	AVP2	0,1	22,676	22,304	22,490	8 + H	AVP2	0,1	22,773	22,701	22,737	-0,247
9 - H	AVP2	0,1	21,888	21,385	21,636	9 + H	AVP2	0,1	21,990	21,856	21,923	-0,287
10 - H	AVP2	0,1	22,032	21,430	21,731	10 + H	AVP2	0,1	25,508	25,040	25,274	-3,543
11 - H	AVP2	0,1	22,199	21,925	22,062	11 + H	AVP2	0,1	21,914	21,886	21,900	0,162
12 - H	AVP2	0,1	21,660	22,047	21,853	12 + H	AVP2	0,1	21,810	22,023	21,916	-0,063
13 - H	AVP2	0,1	22,556	22,207	22,382	13 + H	AVP2	0,1	22,552	22,760	22,656	-0,275
14 - H	AVP2	0,1	21,813	21,646	21,730	14 + H	AVP2	0,1	21,839	21,765	21,802	-0,072
15 - H	AVP2	0,1	22,518	22,402	22,460	15 + H	AVP2	0,1	22,648	22,328	22,488	-0,027
16 - H	AVP2	0,1	21,762	21,384	21,573	16 + H	AVP2	0,1	21,608	21,579	21,594	-0,021
17 - H	AVP2	0,1	22,396	22,376	22,386	17 + H	AVP2	0,1	22,765	Undeterm	22,765	-0,379
18 - H	AVP2	0,1	21,805	21,592	21,698	18 + H	AVP2	0,1	21,775	21,766	21,770	-0,072
19 - H	AVP2	0,1	21,406	21,245	21,325	19 + H	AVP2	0,1	21,504	21,559	21,531	-0,206
20 - H	AVP2	0,1	21,172	20,900	21,036	20 + H	AVP2	0,1	21,026	21,069	21,048	-0,012
21 - H	AVP2	0,1	22,449	22,398	22,423	21 + H	AVP2	0,1	22,773	22,258	22,516	-0,092
22 - H	AVP2	0,1	22,745	21,989	22,367	22 + H	AVP2	0,1	21,838	21,505	21,671	0,696
23 - H	AVP2	0,1	21,540	21,353	21,447	23 + H	AVP2	0,1	22,174	25,676	23,925	-2,478
24 - H	AVP2	0,1	22,300	22,252	22,276	24 + H	AVP2	0,1	22,452	22,417	22,434	-0,158
25 - H	AVP2	0,1	22,561	21,629	22,095	25 + H	AVP2	0,1	22,307	Undeterm	22,307	-0,212
26 - H	AVP2	0,1	22,509	22,404	22,457	26 + H	AVP2	0,1	22,270	21,939	22,104	0,352
27 - H	AVP2	0,1	21,869	21,814	21,842	27 + H	AVP2	0,1	22,313	22,033	22,173	-0,332
28 - H	AVP2	0,1	21,707	21,449	21,578	28 + H	AVP2	0,1	22,037	21,730	21,884	-0,306
29 - H	AVP2	0,1	22,616	22,352	22,484	29 + H	AVP2	0,1	22,574	22,363	22,469	0,015
30 - H	AVP2	0,1	22,138	22,287	22,212	30 + H	AVP2	0,1	22,623	22,426	22,525	-0,312
31 - H	AVP2	0,1	22,679	22,209	22,444	31 + H	AVP2	0,1	22,651	22,892	22,772	-0,327
32 - H	AVP2	0,1	22,297	22,240	22,268	32 + H	AVP2	0,1	22,441	22,262	22,351	-0,083
33 - H	AVP2	0,1	22,099	21,806	21,952	33 + H	AVP2	0,1	22,157	21,798	21,978	-0,026
34 - H	AVP2	0,1	21,727	21,752	21,740	34 + H	AVP2	0,1	22,936	22,698	22,817	-1,077
35 - H	AVP2	0,1	22,896	22,859	22,878	35 + H	AVP2	0,1	22,840	22,519	22,680	0,198
36 - H	AVP2	0,1	22,931	22,683	22,807	36 + H	AVP2	0,1	23,118	22,661	22,890	-0,082
37 - H	AVP2	0,1	22,442	22,260	22,351	37 + H	AVP2	0,1	22,752	22,499	22,626	-0,275
38 - H	AVP2	0,1	22,132	21,689	21,910	38 + H	AVP2	0,1	22,593	22,004	22,298	-0,388
39 - H	AVP2	0,1	22,196	21,703	21,949	39 + H	AVP2	0,1	22,267	22,072	22,169	-0,220
40 - H	AVP2	0,1	23,451	22,858	23,055	40 + H	AVP2	0,1	23,446	22,919	23,183	-0,128
41 - H	AVP2	0,1	22,247	22,378	22,312	41 + H	AVP2	0,1	22,416	22,109	22,263	0,050
42 - H	AVP2	0,1	22,117	21,764	21,940	42 + H	AVP2	0,1	23,167	22,072	22,620	-0,679
43 - H	AVP2	0,1	21,998	21,962	21,980	43 + H	AVP2	0,1	22,501	22,294	22,397	-0,417
44 - H	AVP2	0,1	22,001	22,649	22,325	44 + H	AVP2	0,1	22,369	22,093	22,231	0,094
45 - H	AVP2	0,1	21,496	21,456	21,476	45 + H	AVP2	0,1	21,791	21,624	21,707	-0,232
46 - H	AVP2	0,1	21,636	21,838	21,737	46 + H	AVP2	0,1	22,363	22,100	22,231	-0,494
47 - H	AVP2	0,1	22,040	22,026	22,033	47 + H	AVP2	0,1	22,231	22,150	22,190	-0,157
48 - H	AVP2	0,1	21,948	21,831	21,889	48 + H	AVP2	0,1	22,128	22,263	22,195	-0,306
49 - H	AVP2	0,1	22,053	22,250	22,152	49 + H	AVP2	0,1	22,407	22,614	22,511	-0,359
50 - H	AVP2	0,1	22,045	21,811	21,928	50 + H	AVP2	0,1	21,897	21,931	21,914	0,014

Quadro 77 - Valores de Ct (Cycle Threshold) e ΔCt obtidos por qPCR após digestão com a enzima de restrição BstUI, sensível à metilação, aplicada à análise do promotor do gene AVP. Para cada uma das 50 amostras, são apresentados os valores individuais de Ct em duplicata (Ct n1 e Ct n2), a média entre eles (Ct mean) e o valor de ΔCt , calculado como a diferença entre a amostra digerida e a não digerida (nt – t). Valores de ΔCt próximos de zero ou

negativos indicam metilação preservada (DNA não clivado pela BstUI), enquanto valores positivos sugerem hipometilação (DNA clivado). As cores das linhas indicam os grupos experimentais:

- verde (1–10): Grupo Controle;
- vermelho (11–20): *Grupo 1*;
- azul (21–30): *Grupo 2*;
- laranja (31–40): Grupo 3;
- roxo (41–50): Grupo 4.

Sample Name	Target Name	Ct Threshold	Ct n1	Ct n2	Ct mean	Sample Name	Target Name	Ct Threshold	Ct n1	Ct n2	Ct mean	DELTA CT (nt - t)
1 - B	AVP4	0,1	24,058	23,836	23,947	1 + B	AVP4	0,1	23,536	24,578	24,057	-0,110
2 - B	AVP4	0,1	24,455	24,403	24,429	2 + B	AVP4	0,1	23,966	24,274	24,120	0,309
3 - B	AVP4	0,1	23,600	23,494	23,547	3 + B	AVP4	0,1	23,430	23,196	23,313	0,234
4 - B	AVP4	0,1	24,147	24,012	24,079	4 + B	AVP4	0,1	23,994	23,965	23,979	0,100
5 - B	AVP4	0,1	24,763	24,633	24,698	5 + B	AVP4	0,1	24,179	24,338	24,258	0,440
6 - B	AVP4	0,1	23,647	23,382	23,514	6 + B	AVP4	0,1	23,289	23,307	23,298	0,216
7 - B	AVP4	0,1	24,071	23,425	23,748	7 + B	AVP4	0,1	23,649	23,134	23,392	0,357
8 - B	AVP4	0,1	24,018	24,025	24,021	8 + B	AVP4	0,1	23,937	24,692	24,314	-0,293
9 - B	AVP4	0,1	23,185	22,802	22,993	9 + B	AVP4	0,1	22,828	22,933	22,881	0,112
10 - B	AVP4	0,1	23,658	23,365	23,511	10 + B	AVP4	0,1	23,696	23,669	23,683	-0,171
11 - B	AVP4	0,1	23,692	23,857	23,775	11 + B	AVP4	0,1	23,059	24,026	23,542	0,232
12 - B	AVP4	0,1	23,037	22,926	22,981	12 + B	AVP4	0,1	23,129	23,353	23,241	-0,260
13 - B	AVP4	0,1	23,966	23,662	23,814	13 + B	AVP4	0,1	24,159	23,786	23,972	-0,159
14 - B	AVP4	0,1	23,232	23,250	23,241	14 + B	AVP4	0,1	23,067	23,158	23,112	0,129
15 - B	AVP4	0,1	24,022	23,413	23,718	15 + B	AVP4	0,1	Undeterm	23,601	23,601	0,117
16 - B	AVP4	0,1	23,074	22,321	22,698	16 + B	AVP4	0,1	22,512	22,198	22,355	0,343
17 - B	AVP4	0,1	24,322	24,136	24,229	17 + B	AVP4	0,1	23,395	23,270	23,332	0,897
18 - B	AVP4	0,1	22,701	22,762	22,732	18 + B	AVP4	0,1	22,505	22,546	22,525	0,206
19 - B	AVP4	0,1	22,810	22,273	22,542	19 + B	AVP4	0,1	22,136	22,187	22,161	0,381
20 - B	AVP4	0,1	22,694	22,166	22,430	20 + B	AVP4	0,1	22,280	22,052	22,166	0,264
21 - B	AVP4	0,1	24,195	23,197	23,696	21 + B	AVP4	0,1	23,284	24,133	23,708	-0,012
22 - B	AVP4	0,1	23,704	23,260	23,482	22 + B	AVP4	0,1	22,798	23,447	23,123	0,360
23 - B	AVP4	0,1	23,526	23,332	23,429	23 + B	AVP4	0,1	23,041	23,218	23,130	0,299
24 - B	AVP4	0,1	23,733	23,277	23,505	24 + B	AVP4	0,1	23,000	23,338	23,169	0,336
25 - B	AVP4	0,1	23,656	23,304	23,480	25 + B	AVP4	0,1	21,438	21,512	21,475	2,005
26 - B	AVP4	0,1	23,899	23,591	23,745	26 + B	AVP4	0,1	23,543	23,468	23,506	0,239
27 - B	AVP4	0,1	23,650	23,075	23,363	27 + B	AVP4	0,1	23,264	23,176	23,220	0,143
28 - B	AVP4	0,1	22,917	22,354	22,636	28 + B	AVP4	0,1	22,655	22,423	22,539	0,096
29 - B	AVP4	0,1	23,891	23,444	23,668	29 + B	AVP4	0,1	23,140	23,233	23,187	0,481
30 - B	AVP4	0,1	23,768	23,200	23,484	30 + B	AVP4	0,1	23,428	23,600	23,514	-0,030
31 - B	AVP4	0,1	23,274	22,878	23,076	31 + B	AVP4	0,1	24,256	24,817	24,536	-1,460
32 - B	AVP4	0,1	22,935	22,592	22,764	32 + B	AVP4	0,1	23,101	23,273	23,187	-0,423
33 - B	AVP4	0,1	23,144	23,375	23,259	33 + B	AVP4	0,1	22,988	23,044	23,016	0,243
34 - B	AVP4	0,1	23,454	23,660	23,557	34 + B	AVP4	0,1	23,979	23,977	23,978	-0,421
35 - B	AVP4	0,1	24,270	24,067	24,168	35 + B	AVP4	0,1	23,575	23,743	23,659	0,509
36 - B	AVP4	0,1	23,473	23,321	23,397	36 + B	AVP4	0,1	23,584	23,473	23,528	-0,131
37 - B	AVP4	0,1	23,639	23,623	23,631	37 + B	AVP4	0,1	23,396	23,314	23,355	0,276
38 - B	AVP4	0,1	23,179	22,636	22,907	38 + B	AVP4	0,1	22,922	22,664	22,793	0,114
39 - B	AVP4	0,1	23,285	23,154	23,219	39 + B	AVP4	0,1	22,982	23,140	23,061	0,158
40 - B	AVP4	0,1	24,277	23,782	24,030	40 + B	AVP4	0,1	24,431	24,525	24,478	-0,449
41 - B	AVP4	0,1	23,925	23,728	23,826	41 + B	AVP4	0,1	23,638	24,346	23,992	-0,165
42 - B	AVP4	0,1	23,996	23,323	23,659	42 + B	AVP4	0,1	23,229	23,342	23,286	0,374
43 - B	AVP4	0,1	23,777	23,395	23,586	43 + B	AVP4	0,1	23,334	23,495	23,414	0,172
44 - B	AVP4	0,1	23,469	23,266	23,367	44 + B	AVP4	0,1	25,531	25,831	25,681	-2,313
45 - B	AVP4	0,1	23,122	22,670	22,896	45 + B	AVP4	0,1	22,647	22,532	22,589	0,307
46 - B	AVP4	0,1	23,342	23,225	23,284	46 + B	AVP4	0,1	22,893	22,947	22,920	0,364
47 - B	AVP4	0,1	23,293	23,178	23,235	47 + B	AVP4	0,1	22,861	23,307	23,084	0,151
48 - B	AVP4	0,1	23,271	23,008	23,139	48 + B	AVP4	0,1	22,670	22,828	22,749	0,390
49 - B	AVP4	0,1	23,600	22,955	23,277	49 + B	AVP4	0,1	22,989	23,215	23,102	0,176
50 - B	AVP4	0,1	23,277	22,941	23,109	50 + B	AVP4	0,1	22,762	23,095	22,929	0,181

Quadro 78 - Resultados do teste de Mann-Whitney para H_{paII}

no grupo controle.

Parâmetro	Valor
Grupos comparados	Não tratado vs. Tratado
Teste estatístico aplicado	Mann-Whitney (bilateral)
Valor de p	0,3245
Diferença estatisticamente significativa	Não
Mediana do grupo não tratado (n = 10)	22,21
Mediana do grupo tratado (n = 10)	22,40
Diferença real entre as medianas	0,1845
Estimativa de Hodges-Lehmann	0,2000
Soma dos postos (não tratado, tratado)	91,5 ; 118,5
Estatística U	36,5

Quadro 79 – Resultados do teste de Mann-Whitney para H_{paII}

no Grupo 1 (*Toxoplasma gondii*)

Parâmetro	Valor
Grupos comparados	Não tratado vs. Tratado
Teste estatístico aplicado	Mann-Whitney (bilateral)
Valor de p	0,5787
Diferença estatisticamente significativa	Não
Mediana do grupo não tratado (n = 10)	21,79
Mediana do grupo tratado (n = 10)	21,85
Diferença real entre as medianas	0,0595
Estimativa de Hodges-Lehmann	0,0870
Soma dos postos (não tratado, tratado)	97 ; 113
Estatística U	42

Quadro 80 – Resultados do teste de Mann-Whitney para H_{paII}

no Grupo 2 (*Toxoplasma gondii* + probiótico)

Parâmetro	Valor
Grupos comparados	Não tratado vs. Tratado

Teste estatístico aplicado	Mann-Whitney (bilateral)
Valor de p	0,2475
Diferença estatisticamente significativa	Não
Mediana do grupo não tratado (n = 10)	22,24
Mediana do grupo tratado (n = 10)	22,37
Diferença real entre as medianas	0,1265
Estimativa de Hodges-Lehmann	0,1020
Soma dos postos (não tratado, tratado)	89 ; 121
Estatística U	34

Quadro 81 – Resultados do teste de Mann-Whitney para H_{paII} no Grupo 3 (Probiótico + *Toxoplasma gondii*).

Parâmetro	Valor
Grupos comparados	Não tratado vs. Tratado
Teste estatístico aplicado	Mann-Whitney (bilateral)
Valor de p	0,2251
Diferença estatisticamente significativa	Não
Mediana do grupo não tratado (n = 10)	22,31
Mediana do grupo tratado (n = 10)	22,65
Diferença real entre as medianas	0,3435
Estimativa de Hodges-Lehmann	0,2900
Soma dos postos (não tratado, tratado)	88,5 ; 121,5
Estatística U	33,5

Quadro 82 - Resultados do teste de Mann-Whitney para H_{paII} no Grupo 4.

Parâmetro	Valor
Grupos comparados	Não tratado vs. Tratado
Teste estatístico aplicado	Mann-Whitney (bilateral)
Valor de p	0,0719
Diferença estatisticamente significativa	Não
Mediana do grupo não tratado (n = 10)	21,96
Mediana do grupo tratado (n = 10)	22,23
Diferença real entre as medianas	0,2710
Estimativa de Hodges-Lehmann	0,2585
Soma dos postos (não tratado, tratado)	81 ; 129
Estatística U	26

Quadro 83 - Resultados do teste de Mann-Whitney para a comparação entre animais do grupo controle tratados e não tratados com a enzima de restrição BstUI.

Parâmetro	Valor
Grupos comparados	Não tratado vs. Tratado
Teste estatístico aplicado	Mann-Whitney (bilateral)
Valor de p	0,6842
Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)	Não
Mediana do grupo não tratado (n = 10)	23,85
Mediana do grupo tratado (n = 10)	23,83
Diferença real entre as medianas	-0,0165
Estimativa de Hodges-Lehmann	-0,1170
Soma dos postos (não tratado, tratado)	111 ; 99
Estatística U	44

Quadro 84 - Resultados do teste de Mann-Whitney para BstUI no Grupo 1.

Parâmetro	Valor
Grupos comparados	Não tratado vs. Tratado
Teste estatístico aplicado	Mann-Whitney (bilateral)
Valor de p	0,4040
Diferença estatisticamente significativa	Não
Mediana do grupo não tratado (n = 10)	23,11
Mediana do grupo tratado (n = 10)	23,18
Diferença real entre as medianas	0,0655
Estimativa de Hodges-Lehmann	-0,2450
Soma dos postos (não tratado, tratado)	116,5 ; 93,5
Estatística U	38,5

Quadro 85 - Resultados do teste de Mann-Whitney para BstUI

no Grupo 2.

Parâmetro	Valor
Grupos comparados	Não tratado vs. Tratado
Teste estatístico aplicado	Mann-Whitney (bilateral)
Valor de p	0,1051
Diferença estatisticamente significativa	Não
Mediana do grupo não tratado (n = 10)	23,48
Mediana do grupo tratado (n = 10)	23,18
Diferença real entre as medianas	-0,3050
Estimativa de Hodges-Lehmann	-0,2960
Soma dos postos (não tratado, tratado)	127 ; 83
Estatística U	28

Quadro 86 - Resultados do teste de Mann-Whitney para BstUI

no Grupo 3.

Parâmetro	Valor
Grupos comparados	Não tratado vs. Tratado
Teste estatístico aplicado	Mann-Whitney (bilateral)
Valor de p	0,7394
Diferença estatisticamente significativa	Não
Mediana do grupo não tratado (n = 10)	23,33
Mediana do grupo tratado (n = 10)	23,44
Diferença real entre as medianas	0,1135
Estimativa de Hodges-Lehmann	0,1100
Soma dos postos (não tratado, tratado)	100 ; 110
Estatística U	45

Quadro 87 - Resultados do teste de Mann-Whitney para BstUI

no Grupo 4.

Parâmetro	Valor
Grupos comparados	Não tratado vs. Tratado
Teste estatístico aplicado	Mann-Whitney (bilateral)
Valor de p	0,3527
Diferença estatisticamente significativa	Não
Mediana do grupo não tratado (n = 10)	23,28
Mediana do grupo tratado (n = 10)	23,09
Diferença real entre as medianas	-0,1875
Estimativa de Hodges-Lehmann	-0,1910
Soma dos postos (não tratado, tratado)	118 ; 92
Estatística U	37

Curvas de melt

1. Grupo controle

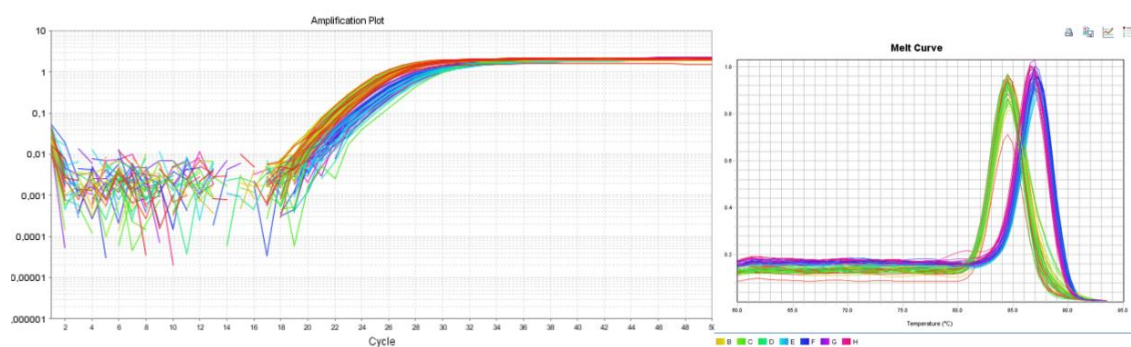


Figura 1 - Gráficos de amplificação (à esquerda) e de dissociação (à direita) das amostras do grupo controle (CTL) obtidos por qPCR após digestão com enzimas de restrição sensíveis à metilação (MSRE-qPCR).

As curvas de amplificação mostram o sinal de fluorescência (ΔRn) em função do número de ciclos, enquanto as curvas de dissociação avaliam a especificidade dos produtos amplificados em função da temperatura de melting (T_m). Cores diferentes indicam poços distintos da placa de 96 poços.

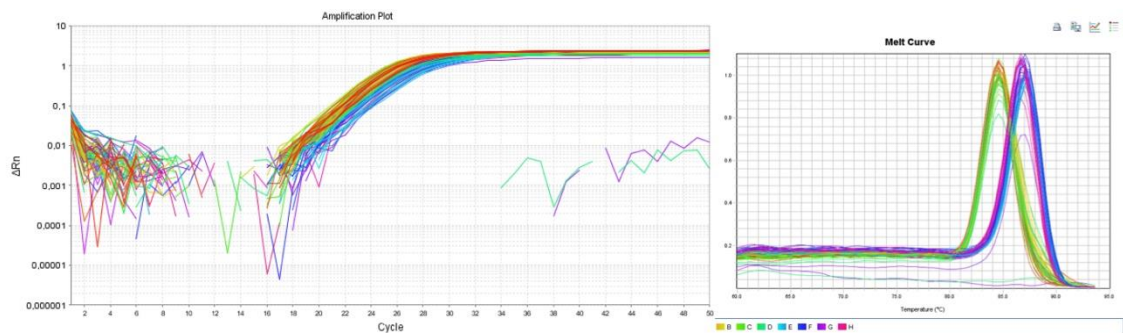


Figura 2 - Gráficos de amplificação (à esquerda) e de dissociação (à direita) das amostras do grupo 1 (animais infectados por *Toxoplasma gondii*, não tratados com probiótico). As curvas de amplificação representam a variação da fluorescência (ΔRn) ao longo dos ciclos de PCR, enquanto as curvas de dissociação indicam a temperatura de melting (T_m) dos produtos amplificados. Cada curva corresponde a uma amostra individual processada em condições de digestão com enzimas de restrição sensíveis à metilação.

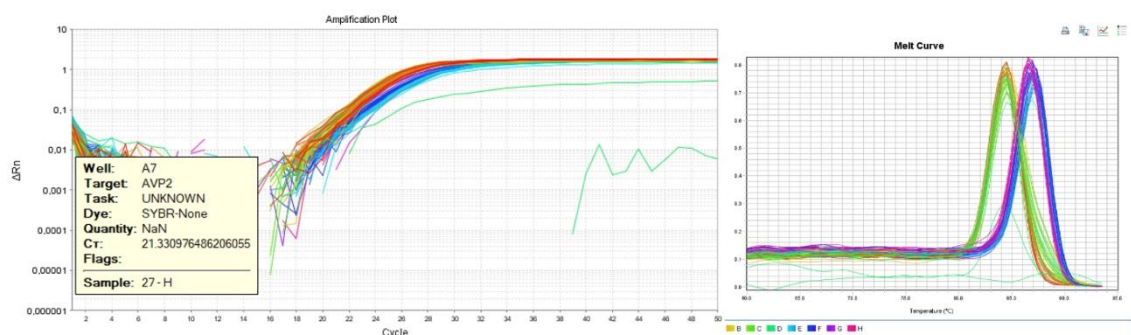


Figura 3 - Gráficos de amplificação (à esquerda) e curva de dissociação (à direita) das amostras do Grupo 2, composto por animais infectados por *Toxoplasma gondii* e tratados posteriormente com o probiótico *Lactobacillus rhamnosus*. O gráfico de amplificação representa a fluorescência (ΔRn) em função do número de ciclos da PCR, enquanto o gráfico de dissociação indica as temperaturas de melting (T_m) dos produtos amplificados. Cada curva representa uma amostra individual digerida com enzima de restrição sensível à metilação.

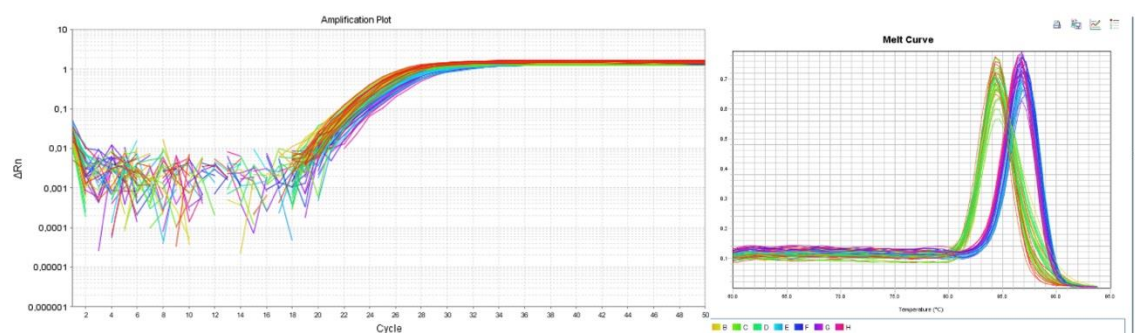


Figura 4 - Gráficos de amplificação (à esquerda) e curva de dissociação (à direita) das amostras do Grupo 3, composto por animais que receberam o probiótico *Lactobacillus rhamnosus* previamente à infecção por *Toxoplasma gondii*. O gráfico de amplificação representa a fluorescência (ΔRn) ao longo dos ciclos da PCR, enquanto o gráfico de dissociação mostra a temperatura de melting (T_m) dos produtos amplificados. Cada curva corresponde a uma amostra individual submetida à digestão com enzimas de restrição sensíveis à metilação.

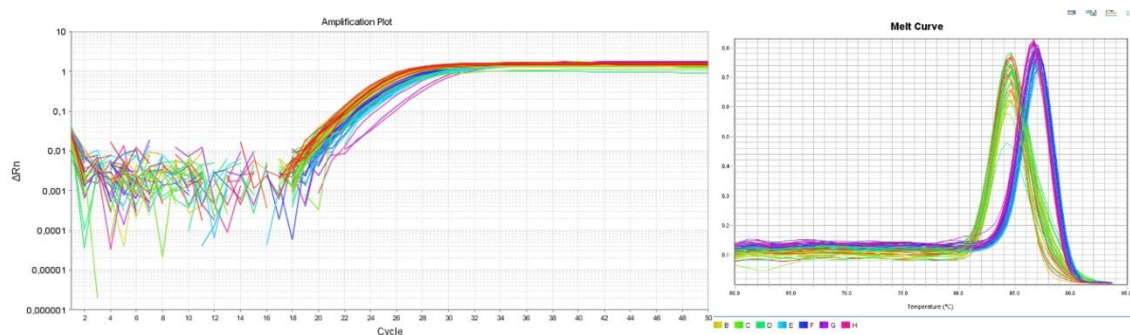


Figura 5 - Gráficos de amplificação (à esquerda) e curva de dissociação (à direita) das amostras do Grupo 4, composto por animais tratados com o probiótico *Lactobacillus rhamnosus*, sem exposição à infecção por *Toxoplasma gondii*. O gráfico de amplificação mostra a fluorescência (ΔRn) ao longo dos ciclos da PCR, enquanto o gráfico de dissociação (melt curve) apresenta a distribuição das temperaturas de melting (T_m) dos produtos amplificados. Cada curva representa uma amostra individual submetida à digestão com enzimas de restrição sensíveis à metilação.

Quadro 88 - Contagem de Células Imunorreativas a AVP e FOS nas Regiões Dorsal e Ventral da Amígdala Medial Posterior

		Dorsal	Ventral
GC A2 Cx15	AVP	193	196
GC A2 Cx14	AVP	155	138
GC AN4 Cx13	FOS	158	31
GC A3 Cx13	FOS	124	107
GC AN1 Cx15	AVP	0	0
GC AN3 Cx15	AVP	65	276

GC AN3A Cx13	AVP	146	101
GC AN4 Cx15	AVP	113	84
GC AN5 Cx14	FOS	244	105
GC AN1 Cx15	FOS (1)	202	127
GC AN2 Cx15	FOS	157	217
GC AN3 Cx15	FOS	207	251
GC AN4 Cx15	FOS	105	244
GC AN5 Cx14	FOS	318	163
G1 A1 Cx3	FOS	165	386
	AVP		
G1 AN1 Cx2	FOS	3	34
G1 AN3 Cx3	FOS	322	350
G1 AN3 Cx3	AVP	88	58
G1 AN1 Cx2	AVP	0	0
G1 AN2 Cx3	AVP	143	200
G1 AN4 Cx1	AVP	14	17
G1 AN4 Cx1	AVP(5)	23	159
G1 AN2 Cx3	FOS(2)	307	186
G1 AN3 Cx3	FOS	229	276
G1 AN4 Cx1	FOS(5)	147	290
G1 AN4 Cx1	FOS(3)	33	119
G2 A1 Cx6	AVP	46	73
	FOS	51	45
G2 A2 Cx5	AVP		
	FOS		

G2 AN4 Cx4	FOS	0	0
G2 AN4 Cx4	AVP	0	0
G2 AN4 Cx6	AVP	328	35
G2 AN5 Cx4	AVP	134	35
G2 AN4 Cx6	FOS	228	0
G3 AN1 Cx8	AVP	282	178
G3 AN2 Cx8	AVP	313	114
G3 AN4 Cx7	AVP	142	180
G3 AN4 Cx7	FOS	129	298
G3 AN4 Cx9	FOS	136	144
G3 AN4 Cx9	AVP	115	126
G3 AN5 Cx7	AVP	303	307
G3 AN4 Cx7	FOS	47	179
G3 AN1 Cx8	FOS	239	148
G3 AN2 Cx8	FOS	155	88
G3 AN3 Cx9	FOS	111	133
G3 AN3 Cx9	AVP	109	84
G3 AN2 Cx9	FOS	169	157
G3 AN2 Cx9	AVP	290	228
G4 A5 Cx10	AVP	(Lâmina ? ruim)	
	FOS	248	145
G4 AN1 CX11	AVP	192	325
G4 AN3 CX10	AVP	262	176
G4 AN5 CX11	AVP	112	159

G4 AN1 CX11	FOS(2)	169	277
G4 AN2 CX11	FOS	257	57
G4 AN3 CX10	FOS	330	243
G4 AN5 CX11	FOS	180	113

A tabela apresenta a contagem de células imunorreativas para os marcadores AVP (arginina-vasopressina) e FOS (proteína de expressão imediata) em cortes coronoides da amígdala medial posterior (MePD), obtidos por meio de imunohistoquímica. As quantificações foram realizadas separadamente nas regiões dorsal e ventral da MePD, em animais pertencentes a diferentes grupos experimentais (GC, G1, G2, G3 e G4). Cada entrada da tabela informa o grupo, o número do animal e a identificação da caixa (Cx) na qual o animal permaneceu alojado durante o experimento. A tabela ainda está em processo de finalização, pois algumas lâminas precisaram ser refeitas. Esses dados servirão como base para análises quantitativas voltadas à compreensão dos efeitos da infecção por *Toxoplasma gondii* e da administração de probióticos sobre a expressão regional de AVP e FOS na MePD.

Anexo II

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO (POP)	
	Extração DNA amígdala com <i>DNeasy Kit</i> QIAGEN	
Elaboração: Equipe Técnica - Cynthia Bartolomeo		Data: Fevereiro/2024
Objetivo:	Definir o procedimento para extração de DNA de amígdala com o <i>DNeasy kit</i> da QIAGEN.	
Materiais:		
	Local	
• <i>Buffer ATL</i>	Armário “Materiais PCR”, dentro da caixa “Extração DNA”	
• <i>Proteinase K</i>		
• <i>Buffer AL</i>		
• <i>Buffer AW1</i>		
• <i>Buffer AW2</i>		
• <i>Buffer AE</i>		
• Etanol Absoluto gelado	Freezer que ficava no NB2	
• Bastão de vidro	Autoclavados, no armário “Materiais PCR”	
• Colunas kit	Armário NB2, na caixa DNeasy kit	
• Tubo coletor		
• Banho seco		
• Vortex		
• Centrífuga		
Procedimento:		
1. Separar os eppendorfs contendo as amígdalas.		
2. Adicionar 180 µL de <i>Buffer ATL</i> .		
3. Macerar o tecido com bastão de vidro.		
4. Vortexar para homogeneizar o tampão ao tecido macerado.		
5. Adicionar 20 µL de <i>Proteinase K</i> .		
6. Vortexar bem até homogeneizar.		
7. Incubar em banho seco por ≥ 1 hora à 56 °C, vortexando de tempos em tempos (30 em 30 minutos) para que o tecido seja completamente dissolvido.		

8. Ao término da incubação, vortexar o eppendorf por 15 segundos.
9. Adicionar 200 µL de <i>Buffer AL</i> .
10. Vortexar bem até homogeneizar.
11. Incubar em banho seco por 10 min à 70 °C.
12. Adicionar 200 µL de Etanol Absoluto gelado.
13. Vortexar bem até homogeneizar.
14. Colocar todo conteúdo na coluna.
15. Centrifugar 8000 rpm por 1 minuto.
16. Trocar apenas o <u>tubo coletor</u> .
17. Adicionar 500 µL de <i>Buffer AW1</i> .
18. Centrifugar 8000 rpm por 1 minuto.
19. Trocar apenas o <u>tubo coletor</u> .
20. Adicionar 500 µL de <i>Buffer AW2</i> .
21. Centrifugar 14000 rpm por 3 minutos.
22. Transferir a coluna para um novo eppendorf (1,5 mL).
23. Adicionar à coluna 25 µL de <i>Buffer AE</i> .
24. Incubar à temperatura ambiente por 1 minuto.
25. Adicionar à coluna mais 25 µL de <i>Buffer AE</i> .
26. Incubar, novamente, à temperatura ambiente por 1 minuto.
27. Centrifugar 8000 rpm por 1 minuto.
28. Dosar a concentração de DNA da amostra. Como branco, utilizar o <i>Buffer AE</i> .
29. Armazenar no -20 °C.

Anexo III



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE SÃO PAULO
E FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA SANTA CASA DE SÃO PAULO
Rua Marques de Itu, 381 - 5º andar, Santa Cecília CEP 01221-010 - São Paulo - SP



São Paulo, 07 de Fevereiro de 2022.

Projeto nº 001/22
Informe este número para
identificar seu projeto na CEUA

Ilmo. (a). Sr. (a).

Dr. Marcelo Jenné Mimica

Departamento de Ciências Patológicas

A Comissão de Ética no Uso de Animais da ISCMSP e FCMSCSP, em reunião ordinária, dia **07/02/2022**, e no cumprimento de suas atribuições, após análise do Projeto: **"Avaliação de resposta ansiolítica em ratos infectados por Toxoplasma gondii tratados em Lactobacillus rhamnosus comparados com placebo."**, nesta data emitiu parecer enquadrando-o na seguinte categoria:

☒ **Aprovado para 60 ratos Wistar**

☐ **Com pendência –**

☐ **Não aprovado**

Profª. Dra. Valéria Vieira Chida
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais da
ISCMSP e FCMSCSP