



**UNESP - Universidade Estadual Paulista**  
**“Júlio de Mesquita Filho”**  
**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**



**Stephany Viatela Ramirez**

**Avaliação das respostas de ansiedade induzidas pelo estresse de  
testemunho da derrota social precoce e tardia em camundongos machos  
e fêmeas**

**Araraquara, SP**

**2024**



**UNESP - Universidade Estadual Paulista**  
**“Júlio de Mesquita Filho”**  
**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**



**Stephany Viatela Ramirez**

**Avaliação das respostas de ansiedade induzidas pelo estresse de  
testemunho da derrota social precoce e tardia em camundongos machos  
e fêmeas**

Dissertação apresentada à Universidade  
Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de  
Ciências Farmacêuticas, Araraquara para  
obtenção do título de Mestre em Ciências,  
na Área de Ciências Fisiológicas

**Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz  
Nunes de Souza**

**Araraquara, SP**

**2024**

---

**R173a** Ramirez, Stephany Viatela.  
Avaliação das respostas de ansiedade induzidas pelo estresse  
detestemunho da derrota social precoce e tardia em camundongos  
machos e fêmeas / Stephany Viatela Ramirez. – Araraquara, 2024.  
61 f. : il.

Orientador: Ricardo Luiz Nunes de Souza.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de  
Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de  
Pós-graduação em Ciências Fisiológicas.

1. Estresse de testemunha de derrota social. 2. Derrota social. 3.  
Estresse precoce e tardio. 4. Diferenças sexuais em camundongos. 5.  
Ansiedade. 6. Comportamentos relacionados com ansiedade. I.  
Souza, Ricardo Luiz Nunes de, orient. II. Título.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:** Avaliação das respostas de ansiedade induzidas pelo estresse de testemunho da derrota social precoce e tardia em camundongos machos e fêmeas

**AUTORA: STEPHANY VIATELA RAMÍREZ**

**ORIENTADOR: RICARDO LUIZ NUNES DE SOUZA**

**COORIENTADOR: LUCAS CANTO DE SOUZA**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciências Fisiológicas, área: Ciências Fisiológicas pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. RICARDO LUIZ NUNES DE SOUZA (Participação Presencial)  
Departamento de Farmacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Prof. Dr. SILVIO MORATO DE CARVALHO (Participação Presencial)  
Departamento de Psicologia e Educação / Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP)

Prof. Dr. MARCELO TADEU MARIN (Participação Presencial)  
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Araraquara, 05 de setembro de 2024

## AGRADECIMENTOS

Quero expressar minha mais profunda gratidão à minha mãe, Deicy. Obrigada por sempre ter sido mais forte que os problemas, por encarar o mundo a cada dia com coragem, ajudando-nos a seguir nossos sonhos e mantendo a vontade de conquistar os seus. Sua resiliência é incrível e inspiradora. Obrigada por sempre acreditar em mim, mesmo com medo e incertezas do que poderia acontecer nesta jornada. Seu apoio incondicional, seus conselhos sábios e seu carinho constante me deram a coragem e a força necessária para continuar. Esta conquista também é de você, pois sem você ao meu lado, eu não teria chegado até aqui. Sou eternamente grata por tudo que fez e continua fazendo por mim.

À minha irmã, Viviana, dedico um agradecimento especial por sua força inabalável nos momentos difíceis, especialmente quando você mais precisou de mim e eu não pude estar por perto. Agradeço por suportar e lutar cada dia, por compartilhar meus sonhos e, mesmo à distância, por manter vivos os abraços e o amor que sempre me aqueceram nos dias mais cinzentos. Seu apoio constante e suas palavras encorajadoras foram fundamentais para enfrentar os desafios de cada dia. Obrigada por me lembrar que podemos chegar muito longe enfrentando a vida juntas.

Com todo o meu coração, gostaria de agradecer aos meus avós, Glória, Lauro e Tulia. Vocês sempre foram um pilar de força e amor ao longo de toda a minha vida. Agradeço por todo o apoio e por me incentivarem a seguir meus sonhos. Esta conquista não poderia ter acontecido sem vocês acreditando em mim. Obrigada por olharem para o meu futuro com esperança de que se cumpram meus sonhos, e com a nostalgia de saber que nesses sonhos também estão aqueles que vocês tanto gostariam de ter realizado. Sou eternamente grata por tudo que fizeram para eu conseguir chegar até aqui.

À luz dos meus dias, meu namorado Jonathan Penagos. *Navegar pelas águas turbulentas da minha vida se tornou mais fácil, pois seu amor, como um colete salvavidas, me sustenta e alivia o peso das ondas, permitindo-me desfrutar do calor do sol em meio ao caos.* Obrigada por sempre me apoiar e acreditar em mim, em nós, por me impulsionar e enfrentar cada dia ao meu lado, ajudando-me a ser melhor e mantendo-me firme para que eu não desistisse. Esta

conquista não é só minha, é nossa, pois seu amor e compreensão foram fundamentais para alcançar este objetivo.

À Cristhiam pelo apoio para começar este sonho.

À Karen pela motivação e força constante durante o caminho, e ao resto da minha família que foi parte desta jornada.

Aos meus amigos, que estão espalhados pelo mundo, mas que se mantêm presentes no meu coração.

À H, que sempre acreditou que eu tinha tanto a dar que poderia conquistar o mundo se quisesse. Obrigada por acompanhar meu caminho desde o começo, por ver mais em mim do que às vezes eu via, por compreender minha ausência e escutar meu silêncio.

À Julián Cifuentes, que acreditou em mim e apoio meus sonhos.

À família Rivera, que me impulsionou e acreditou em mim desde o começo. Obrigada pelo apoio durante o caminho.

À Felipe Forero, minha dupla inigualável. Sinto uma profunda gratidão pelo apoio incondicional que sempre fez parte da nossa história, pelas experiências compartilhadas - que sem dúvida são parte das melhores lembranças da minha vida no Brasil -, pelas conversas longas e profundas, pelos aprendizados compartilhados e os ensinamentos que levo para a vida. Obrigada por abraçar minhas crises, acompanhar minha solidão e tornar a vida cotidiana mais leve e acolhedora.

À Silvia Cardenas, meu pedacinho de família longe de casa. Um profundo agradecimento pelo amor sincero por trás de cada ação, pelo apoio constante, pela ajuda desinteressada, pelas experiências compartilhadas e pelas lembranças que levarei comigo daqui em diante. Obrigada por me compreender, tanto na presença quanto na ausência, por me escutar e por sempre dar um toque especial aos meus dias com seu jeito único de ser.

Aos "gringos" que me fizeram sentir em casa, mesmo estando tão longe dela.

Aos meus amigos brasileiros que levarei comigo sempre no coração:

-À Katellyn, obrigada pelos aprendizados compartilhados, pelas lições de vida, pelo apoio constante e os momentos que deixam o coração quentinho só de lembrar.

-À Flavio, pelo apoio e ajuda durante o caminho, obrigada por encher meus dias -até os mais difíceis- de risadas e felicidade com sua energia avassaladora.

-À Caio, obrigada pela companhia, pelas longas conversas no laboratório, fazendo mais leves às madrugadas de trabalho, pela confiança e o carinho.

Gostaria de expressar minha profunda gratidão ao Prof. Dr. Javier Leonardo Rico, que desempenhou um papel fundamental na minha trajetória acadêmica. Obrigada por me apresentar às maravilhas da ciência e aos inúmeros caminhos da pesquisa. A você, devo não apenas o conhecimento adquirido, mas também a confiança e o estímulo que me trouxeram até aqui.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza, pela oportunidade de crescer profissional e pessoalmente em um novo país. Agradeço profundamente por sua paciência, ajuda e compreensão ao longo desta jornada que teve bastantes desafios. Sou grata por sua contínua crença em mim durante os momentos difíceis e por sempre estar disposto a ajudar.

À Julián Humberto Ávalo, pela colaboração e companhia nas longas jornadas de coleta de dados. Obrigado pelo aprendizado compartilhado, pelo trabalho em equipe e pela dedicação constante. Iniciamos esta jornada juntos, e seu esforço e comprometimento foram essenciais para o sucesso deste projeto. Agradeço por toda a ajuda e parceria ao longo desse caminho.

Ao Dr. Lucas Canto de Souza, a Dra. Daniela Baptista de Souza e o Dr. Gessynger Morais Silva. Obrigada por sua orientação inestimável e por todo o apoio ao longo desta jornada. Suas valiosas contribuições, paciência e incentivo foram essenciais durante o processo. Esta conquista é resultado do esforço conjunto, sou muito grata por todo o conhecimento e dedicação que compartilharam comigo.

Ao Brasil, pelas inúmeras oportunidades e novos horizontes que me foram proporcionados. Agradeço por ter me acolhido e me permitido crescer tanto pessoal quanto profissionalmente.

À Araraquara, meu lar, por me permitir me conhecer e me reconstruir, pelos seus pores do sol mágicos com cheiro de laranja e pelas suas ruas tranquilas e acolhedoras, repletas de terra vermelha.

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

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

À CNPq, processo nº 131042/2022-0, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo auxílio financeiro e bolsa no país concedidos

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

## RESUMO

O estresse é uma resposta complexa do organismo a estímulos desafiadores, envolvendo alterações neuroendócrinas, fisiológicas e comportamentais. A exposição prolongada e crônica ao estresse afeta a saúde física e mental, aumentando a vulnerabilidade a transtornos como ansiedade e depressão. Evidências sugerem que os efeitos do estresse são diferenciados por variáveis como sexo e idade. Em modelos animais, o estudo do estresse social tem sido feito com o modelo de derrota social; no entanto, este apresenta diversas limitações. O modelo de estresse de testemunha à derrota social (ETDS) surge como uma alternativa que inclui condições biologicamente relevantes que são excluídas no modelo original (diferenças sexuais, estresse físico vs psicológico). Por isso, este estudo teve como objetivo avaliar respostas relacionadas à ansiedade em camundongos machos e fêmeas expostos ao modelo de estresse (ETDS) em duas fases de desenvolvimento: precoce (21-31 dias pós-natal - DPN) e tardia (56-70 DPN), avaliando indicadores como tempo gasto e o número de entradas em entornos abertos e de interação social. Para isso, dois experimentos foram conduzidos. No Experimento 1, camundongos machos e fêmeas, aos 58-70 DPN, foram submetidos a 10 dias de ETDS ou a um protocolo de interação não agressiva (TINA) e, posteriormente, a testes comportamentais para medir respostas relacionadas com ansiedade: (i) teste de interação social (TIS), labirinto em cruz elevado (LCE) e campo aberto (CA). No Experimento 2, foi avaliado o efeito tardio do ETDS precoce. Camundongos machos e fêmeas, aos 21-31 DPN, foram submetidos a 10 dias de ETDS ou TINA, seguidos por um período de 29 dias sem exposição a estressores. No DPN 59, os animais foram submetidos a uma sessão de gatilho (ETDS ou TINA) e, em seguida, realizaram os mesmos testes comportamentais do Experimento 1. Os principais resultados demonstraram que o modelo de ETDS tem efeitos diversos e dependentes do sexo e da idade dos animais nas alterações comportamentais relacionadas com ansiedade em testes como o TIS, LCE e CA., No entanto, o modelo parece ter um efeito menos intenso do que a derrota social direta, e o nível de estresse pode não ser suficiente para produzir mudanças comportamentais significativas em todos os grupos ou condições.

**Palavras-chave:** Estresse de testemunha de derrota social; derrota social; estresse precoce e tardio; diferenças sexuais em camundongos; ansiedade; comportamentos relacionados com ansiedade.

## ABSTRACT

Stress is a complex response of the organism to challenging stimuli, involving neuroendocrine, physiological, and behavioral changes. Prolonged and chronic exposure to stress affects physical and mental health, increasing vulnerability to disorders such as anxiety and depression. Evidence suggests that the effects of stress are differentiated by variables such as sex and age. In animal models, the study of social stress has been conducted using the social defeat model; however, this model presents several limitations. The witness to social defeat stress (WSDS) model emerges as an alternative that includes biologically relevant conditions excluded in the original model (sexual differences, physical vs. psychological stress). Therefore, this study aimed to evaluate anxiety-related responses in male and female mice exposed to the WSDS model in two developmental phases: early (21-31 postnatal days - PND) and late (56-70 PND), evaluating indicators such as time spent and the number of entries in open environments and social interaction. Two experiments were conducted. In Experiment 1, male and female mice, at 58-70 PND, were subjected to 10 days of WSDS or a non-aggressive interaction protocol (NAIP) and subsequently to behavioral tests to measure anxiety-related responses: (i) social interaction test (SIT), elevated plus maze (EPM), and open field test (OFT). In Experiment 2, the late effect of early WSDS was evaluated. Male and female mice, at 21-31 PND, were subjected to 10 days of WSDS or NAIP, followed by a 29-day period without exposure to stressors. On PND 59, the animals were subjected to a trigger session (WSDS or NAIP) and then performed the same behavioral tests as in Experiment 1. The main results demonstrated that the WSDS model has diverse effects depending on the sex and age of the animals on anxiety-related behavioral changes in tests such as SIT, EPM, and OFT. However, the model appears to have a less intense effect than direct social defeat, and the level of stress may not be sufficient to produce significant behavioral changes in all groups or conditions.

**Keywords:** witness to social defeat stress; social defeat; early and late stress; sexual differences in mice; anxiety; anxiety-related behaviors.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	11
2 HIPÓTESE.....	17
3.1 OBJETIVO GERAL.....	17
3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS .....	17
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	17
4.1 Sujeitos .....	18
4.2 Estresse de testemunha de derrota social (ETDS).....	18
4.3 Interação não agressiva (TINA) .....	19
4.4 Teste de interação social (TIS).....	20
4.5 Labirinto em cruz elevado (LCE).....	21
4.6 Campo aberto (CA) .....	22
4.7 Delineamento Experimental .....	23
4.7.1 Experimento 1. ....	23
4.7.2 Experimento 2. ....	24
4.8 Análise estatística. ....	25
4.9 Ética.....	26
5 RESULTADOS .....	26
5.1 Experimento 1: .....	26
5.1.1 Teste de interação social (TIS).....	26
5.1.2 Labirinto em cruz elevado (LCE) .....	29
5.1.3 Campo aberto (CA) .....	32
5.2 Experimento 2. ....	36
5.2.1 Teste de interação social (TIS).....	36
5.2.2 Labirinto em cruz elevado (LCE) .....	39
5.2.3 Campo aberto (CA) .....	42
6 DISCUSSÃO.....	45
7 CONCLUSÃO.....	52
REFERÊNCIAS .....	53

## 1 INTRODUÇÃO

É essencial adaptar-se às circunstâncias em constante mudança, enfrentando situações imprevisíveis e desafiadoras ou que possam representar uma ameaça à saúde e à sobrevivência (Ulrich-Lai; Herman, 2009). Para lidar com esses entornos, o corpo humano possui uma rede complexa e integrada de sistemas de resposta ao estresse, que inclui diversas alterações neuroendócrinas, fisiológicas e comportamentais. Essas reações visam manter o bom funcionamento do organismo, independentemente do tipo de estressor enfrentado (Selye, 1936; Hariri; Holmes, 2015).

A resposta ao estresse é influenciada tanto por fatores intrínsecos ao estímulo estressante (como duração e intensidade) quanto por características individuais (Ellis; Jackson; Boyce, 2006; Joëls; Baram, 2009). Essa resposta varia entre os indivíduos, tornando um mesmo estímulo relativamente inofensivo para alguns e uma ameaça potencial para outros (Lazarus; Folkman, 1984). Essa variação é baseada em fatores objetivos, como idade, sexo e genética, assim como em fatores subjetivos, como memórias armazenadas que afetam a interpretação das entradas sensoriais (Novais *et al.*, 2017). Além disso, a capacidade de lidar com um estressor também depende de fatores individuais, incluindo genética (Kloet; Joëls; Holsboer, 2005; Boyce; Ellis, 2005), idade e sexo (Bale; Epperson, 2015), além das características do próprio estressor, como intensidade, imprevisibilidade e duração (Luine, 2023).

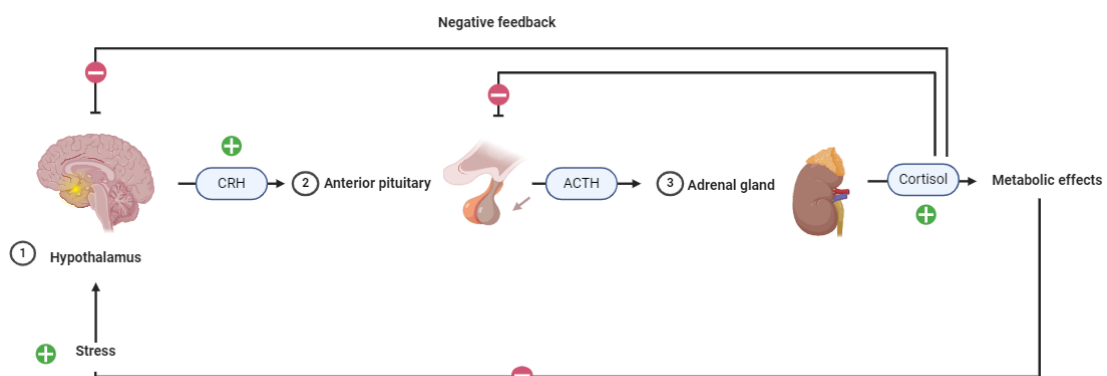
A detecção de estímulos estressantes, sejam físicos ou psicológicos envolve uma variedade de áreas cerebrais, como o córtex pré-frontal, a amígdala e o hipocampo, que combinam esforços para interpretar eventos como perigos reais ou potenciais (estressores) (Ellis; Jackson; Boyce, 2006; Doewes; Gangadhar; Subburaj, 2021). As respostas fisiológicas e comportamentais emitidas em situações de estresse estão reguladas principalmente pela atividade do sistema nervoso simpático (SNS) e do eixo hipotálamo-pituitária (ou hipófise)-adrenal (HPA) (Hariri; Holmes, 2015; Kloet; Joëls; Holsboer, 2005).

Quando uma situação estressante é percebida, os neurônios parvocelulares do núcleo paraventricular hipotalâmico liberam CRH (hormônio liberador de corticotrofina) na corrente sanguínea, o que estimula a glândula hipófise anterior a liberar ACTH (hormônio adrenocorticotrófico). Este hormônio viaja até as glândulas adrenais, situadas acima dos rins, ativando o córtex adrenal a produzir e liberar

glicocorticoides (como o cortisol e corticosterona, em humanos e roedores, respectivamente) (Figura 1) (Kloet; Joëls; Holsboer, 2005; Ulrich-Lai; Herman, 2009).

Simultaneamente, o sistema nervoso simpático é ativado, resultando na liberação de noradrenalina pelos nervos simpáticos e de adrenalina pela medula adrenal. Esses hormônios aumentam a frequência cardíaca, alteram o diâmetro dos vasos sanguíneos e aumentam a respiração, preparando o corpo para uma resposta imediata de luta ou fuga diante da situação estressante. Após a resolução do estresse, o sistema se normaliza através de mecanismos de feedback negativo; o cortisol atua sobre o hipotálamo e a hipófise para reduzir a liberação de CRH e ACTH e encerrar a resposta ao estresse (Joëls; Baram, 2009; Hariri; Holmes, 2015; Doewes; Gangadhar; Subburaj, 2021).

**Figura 1.** Resposta do eixo HPA ao estresse. Ilustra a sequência de eventos que ocorrem na ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), desde a percepção do estresse até a regulação pelo feedback negativo: (1) ativação do hipotálamo e liberação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH), (2) estimulação da glândula hipófise anterior e liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), (3) ativação do córtex adrenal e liberação de glicocorticoides (cortisol).



**Fonte:** Esquema adaptado do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal. Fonte: Adaptado de "Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis", por BioRender.com, 2024.

Quando o corpo enfrenta uma ameaça imediata, como um perigo físico ou um evento emocionalmente intenso, a ativação rápida do eixo HPA e do sistema nervoso simpático permite uma resposta eficaz e adaptativa. Se o organismo gera uma resposta rápida e de curta duração, trata-se de um estresse agudo (Sapolsky, 2010). No entanto, quando as demandas ambientais excedem as habilidades adaptativas do organismo (exposição prolongada ou desregulada a estressores) e a resposta se prolonga ao longo do tempo (constante ativação do eixo HPA), ocorre desgaste nas funções bioquímicas, resultando em um estado de estresse crônico (Hariri; Holmes,

2015; Kloet; Joëls; Holsboer, 2005; Doewes; Gangadhar; Subburaj, 2021; Novais *et al.*, 2017).

O estresse crônico exerce um efeito significativo em vários sistemas do corpo humano. Provoca ativação persistente do sistema cardiovascular, aumentando o risco de hipertensão e doenças cardiovasculares (Fontes *et al.*, 2023). A nível metabólico, induz alterações que predispõem a doenças como a diabetes, afeta o armazenamento de gordura abdominal e gera alterações no comportamento alimentar. No sistema imunológico, a ativação das defesas é temporária e gera supressão imunológica, aumentando a probabilidade e a gravidade de doenças infecciosas (Glaser; Kiecolt-Glaser, 2005). No sistema nervoso, a função cerebral é afetada, prejudicando o aprendizado, a memória e a regulação emocional (Kloet; Joëls; Holsboer, 2005).

Diversos estudos mostram que a exposição ao estresse crônico pode não apenas agravar doenças pré-existentes, mas também enfraquecer as defesas do organismo contra novas doenças (Mcewen, 1998), além disso, o estresse predispõe o organismo a alterações que estão relacionadas ao desenvolvimento de transtornos psicológicos como ansiedade, depressão e estresse pós-traumático (Planchez; Surget; Belzung, 2019; Faria; Laverde; Nunes-De-Souza, 2020).

Atualmente, na área da saúde mental, os transtornos de ansiedade são os mais prevalentes em nível global, afetando aproximadamente 4% da população mundial, o que equivale a 301 milhões de pessoas, sendo as mulheres mais acometidas (7,7%) do que os homens (3,6%) (Institute For Health Metrics And Evaluation, 2019). A ansiedade é um estado natural e adaptativo que prepara o corpo para situações potencialmente ameaçadoras, caracterizado por alterações fisiológicas como aumento da frequência cardíaca, sudorese, tremores e falta de ar; reações emocionais, incluindo medo intenso, preocupação excessiva e dificuldade de concentração; alterações comportamentais, como evitação e fuga de situações ansiogênicas, inquietação e vigilância aumentada. No entanto, quando a ansiedade é persistente, excessiva e desproporcional em relação à situação, ela pode se tornar um transtorno de ansiedade, interferindo significativamente na vida diária e no bem-estar do indivíduo (Mobbs *et al.*, 2015).

A utilização de modelos animais para estudar respostas relacionadas aos transtornos psicológicos em um contexto experimental é uma abordagem comum e valiosa na pesquisa científica (Kokras; Dalla, 2014). Esses modelos permitem investigar a etiologia dos transtornos, identificando as causas e os fatores que

contribuem para o seu desenvolvimento, possibilitam a exploração de novas abordagens terapêuticas, testando tratamentos e intervenções antes de serem aplicados em humanos, permitem examinar circuitos neuronais específicos e vias moleculares, proporcionando uma compreensão detalhada de como diferentes áreas do cérebro e os processos moleculares estão envolvidos (Bartolomucci *et al.*, 2009).

Os modelos animais estão baseados em 3 tipos de validade: (i) a validade de construto ou etiológica diz respeito à adequação dos métodos utilizados para desenvolver um modelo, replicando os processos causais de uma doença em seres humanos; (ii) a validade aparente indica que um modelo reproduz características essenciais de uma condição humana, como aspectos anatômicos, bioquímicos, neuropatológicos ou comportamentais; (iii) a validade preditiva ou farmacológica implica que um modelo responde aos tratamentos de maneira que antecipa seus efeitos em humanos (Willner, 1984).

Para estudar alterações comportamentais e neurobiológicas relacionadas com estresse e ansiedade, destaca-se a exposição ao estresse de derrota social (EDS) em roedores, devido à sua relevância etológica e similaridade com o estresse psicossocial vivenciado por humanos (Huhman, 2006; Takahashi *et al.*, 2018). O protocolo envolve a exposição de roedores a confrontos intensos, inescapáveis e imprevisíveis com um coespecífico agressor (Tidey; Miczek, 1996; Sgoifo; Carnevali; Grippo, 2014). Este procedimento, que gera altos níveis de estresse físico e psicológico, pode causar alterações comportamentais e neuronais similares às observadas em humanos com ansiedade e/ou depressão (Golden *et al.*, 2011; Nestler; Hyman, 2010; Planchez; Surget; Belzung, 2019; Santos-Costa *et al.*, 2021).

Embora o modelo de EDS tenha alta validação e seja amplamente utilizado, suas limitações também são consideráveis. Uma das principais dificuldades é que as lesões físicas envolvidas podem influenciar nas alterações comportamentais observadas posteriormente nos animais (Bartolomucci *et al.*, 2009; Nakatake, *et al.*, 2020). Além disso, o protocolo original apresenta dificuldade para avaliar respostas comportamentais e fisiológicas em fêmeas, pois a maioria das cepas de camundongos deste sexo apresenta níveis baixos de agressividade, sendo necessárias modificações contextuais ou biológicas para induzir os efeitos do EDS (Palanza, 2001). Conseqüentemente, a maioria das pesquisas com o modelo tem sido realizada apenas com machos, deixando um vazio conceitual na compreensão dos efeitos do

estresse social em fêmeas, a população mais afetada por doenças de caráter afetivo-emocional (Kokras; Dalla, 2014).

Essa lacuna também dificulta a compreensão das distinções marcantes entre machos e fêmeas na resposta ao estresse e na manifestação de comportamentos relacionados com transtornos psicológicos como ansiedade e depressão (Takahashi *et al.*, 2018). Diversos estudos mostram que roedores fêmeas tem maior resiliência ao estresse, mostrando maior exploração em entornos novos e maior interação social com um animal desconhecido em testes de interação social, enquanto os machos tendem a apresentar maior suscetibilidade a comportamentos de evitação e passividade, como congelamento em condições de estresse (Carnevali *et al.*, 2020).

Os efeitos do estresse podem variar significativamente não apenas devido às diferenças sexuais, mas também em função da idade do animal e do momento da vida em que ocorreu a exposição ao estresse (Planchez; Surget; Belzung, 2019). Em roedores, identificam-se marcadores comportamentais e neurobiológicos específicos em diferentes estágios da vida (Kokras; Dalla, 2014; Adriani; Laviola, 2000; Laviola *et al.*, 2003).

No período inicial (DPN 21-34), ocorrem mudanças no desenvolvimento neural e comportamental, com aumento na plasticidade sináptica (Laviola *et al.*, 2003). Roedores expostos ao estresse nessa fase podem desenvolver respostas exageradas ao estresse e à novidade na vida adulta, afetando a regulação emocional e aumentando a vulnerabilidade a comportamentos relacionados com ansiedade e depressão (Bartolomucci *et al.*, 2009). A fase peripuberal (DPN 28-42) é crítica para a consolidação e refinamento dos circuitos neurais, especialmente aqueles envolvidos na regulação emocional e no processamento de recompensas (Schneider, 2013). A exposição ao estresse durante essa fase pode levar a respostas únicas ao estresse e à novidade, indicando uma maior sensibilidade e uma possível "programação" do sistema de resposta ao estresse para ser hiper-reativo na vida adulta (Adriani; Laviola, 2000; Bangasser; Valentino, 2014).

No meio da adolescência (DPN 34–46), há intensificação de comportamentos exploratórios e na atividade dos circuitos neurais relacionados à recompensa e à aversão; a exposição ao estresse durante este período pode reduzir o comportamento exploratório, levando a uma diminuição na capacidade de se adaptar a novos ambientes, isso pode resultar em um comportamento mais restrito e de evitação na vida adulta (Babicola *et al.*, 2021). Na fase tardia da adolescência (DPN 46-59),

ajustam-se as redes neurais, aumentando a eficiência na comunicação cerebral. A exposição ao estresse pode perturbar esses processos, levando a alterações duradouras na estrutura e função cerebral e mudanças comportamentais que compreendem comportamentos de enfrentamento passivo em situações estressantes, maior aversão ao risco e uma preferência por ambientes familiares e seguros (Schneider, 2013). Na fase adulta jovem (DPN 60), a maioria dos processos críticos de desenvolvimento neural já foram completados (Premachandran *et al.*, 2020). Eventos estressantes durante esta fase podem aumentar os comportamentos relacionados com ansiedade, como a preferência por áreas protegidas no labirinto em cruz elevado e maior tigmotaxia no teste de campo aberto (Babicola *et al.*, 2021). Isso reflete uma maior aversão ao risco e uma tendência a evitar situações potencialmente ameaçadoras (Bangasser; Valentino, 2014).

A adolescência e a vida precoce são períodos críticos onde o estresse pode levar a alterações duradouras na função cerebral e no comportamento, com diferenças notáveis entre machos e fêmeas (Navarrete *et al.*, 2024). Na fase adulta jovem, embora o cérebro seja mais resiliente, o estresse ainda pode causar mudanças significativas na função cognitiva e comportamental, aumentando a vulnerabilidade a apresentar comportamentos relacionados com transtornos psicológicos como ansiedade e depressão (Bartolomucci *et al.*, 2009).

É crucial desenvolver e validar modelos apropriados para estudar o estresse social, contemplando mais variáveis e superando as limitações atuais. O modelo de estresse de testemunha à derrota social (ETDS) inclui condições biologicamente relevantes que no modelo original de derrota social tradicionalmente são excluídos (Warren *et al.*, 2020). Este modelo envolve a exposição de um animal à observação de um coespecífico sendo submetido a uma confrontação e, posteriormente, a uma derrota social, sem que o observador sofra diretamente qualquer agressão física (Iñiguez *et al.*, 2018, Warren *et al.*, 2013). Esse modelo é particularmente útil para estudar os efeitos do estresse em fêmeas, já que evita as dificuldades associadas à baixa agressividade das fêmeas em protocolos de derrota social (Finnell *et al.*, 2018), além de permitir a distinção entre estresse físico e psicológico observados durante o procedimento (Warren *et al.*, 2020; Nakatake *et al.*, 2020).

Estudos demonstram que o estresse vicário pode induzir respostas comportamentais e fisiológicas semelhantes às observadas em situações de estresse direto (Iñiguez *et al.*, 2018; Carnevali *et al.*, 2020; Sial *et al.*, 2016). Pesquisas indicam

que roedores tanto machos quanto fêmeas expostos ao estresse vicário podem exibir comportamentos relacionados à ansiedade (redução na exploração, preferência por áreas fechadas, evitação social e congelamento) e depressão (desamparo aprendido, perda de peso, anedonia) (Iniguez *et al.*, 2018; Patki *et al.*, 2014, 2015; Finnell *et al.*, 2018; Warren *et al.*, 2014; Huhman, 2006), embora possam existir diferenças significativas nas respostas dependendo de cada sexo (Finnell *et al.*, 2018), das diferentes fases de desenvolvimento em que é experimentado o estresse (Warren *et al.*, 2014), e das diferenças entre espécies (Patki *et al.*, 2014). A inclusão do estresse social vicário como uma ferramenta experimental permite uma abordagem mais ampla e menos invasiva para investigar os mecanismos subjacentes às respostas ao estresse e aos transtornos psicológicos (Warren *et al.*, 2014, 2020).

## **2 HIPÓTESE**

Com base nas evidências que demonstram que o modelo de estresse de testemunha de derrota social (ETDS) provoca mudanças comportamentais e emocionais, a hipótese deste estudo prevê que a exposição ao ETDS em camundongos pode modificar as respostas comportamentais associadas à ansiedade avaliadas no (i) labirinto em cruz elevado (LCE) e campo aberto (CA), além de gerar alterações no comportamento social no (ii) teste de interação social (TIS), sendo que essas alterações comportamentais podem variar de acordo com o sexo e a idade dos sujeitos experimentais.

### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar as respostas relacionadas à ansiedade em camundongos machos e fêmeas expostos ao modelo de estresse de testemunha de derrota social (ETDS) em duas fases de desenvolvimento: precoce (21-31 DPN) e tardia (56-70 DPN).

### **3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

3.2.1 Avaliar respostas relacionadas à ansiedade no labirinto em cruz elevado (LCE) e no campo aberto (CA) em camundongos machos e fêmeas expostos ao modelo de estresse de testemunha da derrota social (ETDS) tanto precoce (21-31 DPN) quanto tardio (56-70 DPN).

3.2.2 Avaliar respostas de evitação social no teste de interação social (TIS) em camundongos machos e fêmeas expostos ao modelo de estresse de testemunha da derrota social (ETDS) tanto precoce (21-31 DPN) quanto tardio (56-70 DPN).

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **4.1 Sujeitos**

Foram utilizados noventa e seis camundongos Swiss-Webster, machos e fêmeas, com 21 e 56 dias pós-nascimento (DPN), para testemunhar a derrota social e as interações não agressivas. Além disso, foram usados vinte e quatro camundongos Swiss-Webster machos como intrusos (60 DPN), quarenta e oito machos para interação não agressiva (60 DPN) e vinte e cinco machos como residentes na derrota social (70-365 DPN). Os animais foram fornecidos pelo Centro de Pesquisa e Produção de Animais (CPPA) da Universidade Estadual Paulista em Botucatu, SP, Brasil. Todos os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (FCFAR-UNESP).

Os camundongos foram mantidos em um ciclo claro/escuro de 12 horas, com as luzes acendendo às 07:00 horas, em um ambiente com temperatura controlada ( $23 \pm 1$  °C). Eles foram alojados em grupos de seis animais em caixas grandes de polipropileno (41 x 34 x 16 cm). Comida e água foram disponibilizadas ad libitum, exceto durante breves períodos de teste. Todos os animais eram ingênuos no início dos experimentos. Os camundongos agressores (residentes) foram alojados individualmente em gaiolas de 28 x 17 x 12 cm sob condições ambientais semelhantes (ciclo claro/escuro e temperatura controlada) e foram reutilizados de acordo com um cronograma de rotação estabelecido pelo experimentador.

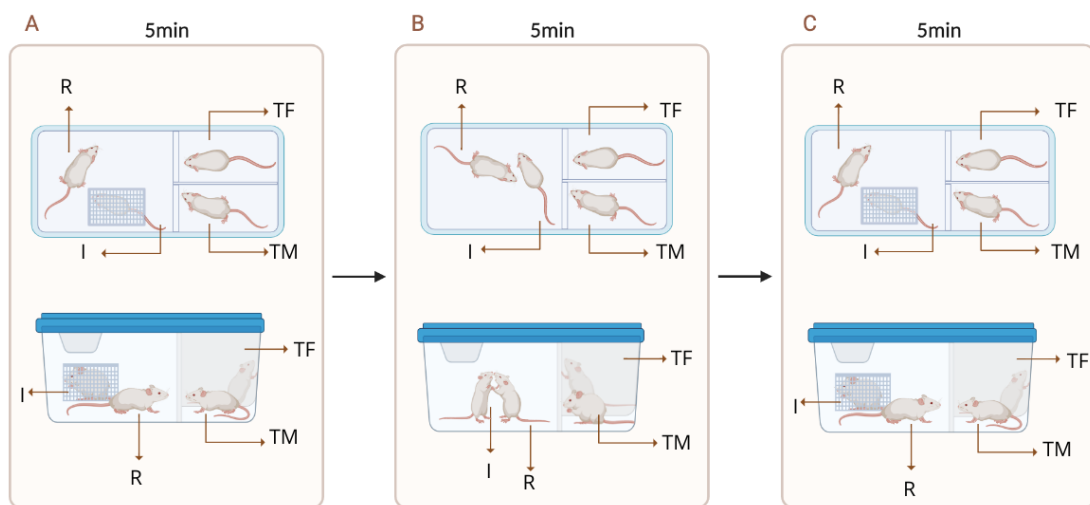
#### **4.2 Estresse de testemunha de derrota social (ETDS)**

O modelo de ETDS utilizado nesta pesquisa adota um protocolo similar ao de Golden et al. (2011). O protocolo foi realizado na caixa de alojamento do agressor, onde se introduz um acrílico transparente com duas divisões e uma grade que cobre a caixa. Inicialmente, todos os animais passam por 10 minutos de habituação à luz do ambiente (90 lux). Posteriormente, um animal intruso é colocado por 5 minutos em uma gaiola individual perfurada e levado, junto com duas testemunhas (um macho e uma fêmea), para ter uma interação auditiva, visual e olfativa com o residente. Em seguida, o animal intruso é retirado da gaiola e introduzido na caixa de alojamento do agressor por mais 5 minutos, onde ocorre uma confrontação física com o residente. Após isso, o intruso é recolocado na gaiola individual, dentro da caixa de alojamento do agressor, por mais 5 minutos (ver figura 2). As testemunhas permanecem sem contato físico com o residente durante todo o episódio, interagindo apenas de forma visual, auditiva e olfativa. No final do procedimento, o intruso e as testemunhas são

levados de volta para suas caixas-moradia. Esse procedimento é repetido diariamente por 10 dias consecutivos, cada dia os animais intrusos foram expostos a um residente que não era conhecido e que foi determinado por um cronograma de rotação.

No experimento 2, 29 dias após as 10 sessões de derrota, é realizada uma sessão de gatilho (ver Figura 8). Esta sessão consiste em expor novamente os camundongos para testemunharem mais uma sessão de derrota, seguindo o procedimento descrito anteriormente.

**Figura 2.** Representação do protocolo de ETDS. R, residente; I, intruso; TM, testemunha macho; TF, testemunha fêmea; F, camundongo familiar.



Fonte: Elaboração própria.

### 4.3 Interação não agressiva (TINA)

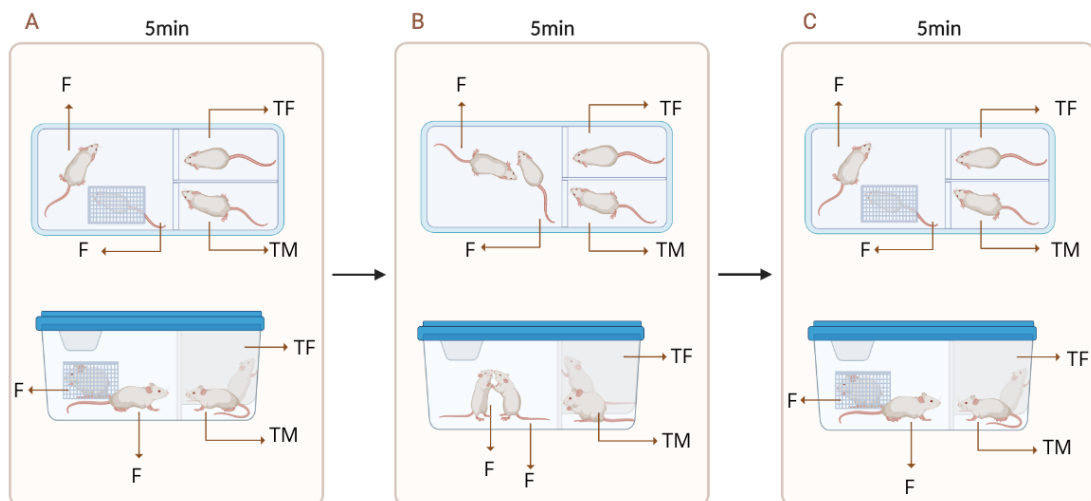
O procedimento utilizado para o grupo controle, interação não agressiva (TINA), foi semelhante ao realizado no ETDS, porém as testemunhas presenciaram uma interação entre dois animais familiares (que estavam alojados na mesma caixa moradia dentro do biotério) sem agressividade. Para isso, foi adaptada uma caixa com maravalha dos animais familiares, um acrílico transparente com duas divisões, e uma grade para cobrir a caixa. Inicialmente, todos os animais passaram por 10 minutos de habituação à luz do ambiente (90 lux); para os animais familiares, 5 desses minutos foram passados interagindo na caixa adaptada com maravalha para evitar possíveis confrontos durante o procedimento.

Posteriormente, um dos camundongos familiares (intruso) foi colocado por 5 minutos em uma gaiola individual perfurada e levado, junto com duas testemunhas (um macho e uma fêmea), para ter uma interação auditiva, visual e olfativa com um camundongo do grupo familiar (residente). Em seguida, o animal intruso foi retirado

da gaiola e introduzido na caixa por mais 5 minutos, onde ocorreu uma interação não agressiva com o residente. Após isso, o camundongo foi recolocado na gaiola individual, dentro da caixa adaptada, por mais 5 minutos (ver figura 3). As testemunhas permaneceram sem contato físico com nenhum dos animais durante todo o episódio, interagindo apenas de forma visual, auditiva e olfativa. No final do procedimento, todos os animais foram levados de volta para suas caixas-moradia. Esse procedimento foi repetido diariamente por 10 dias consecutivos, com os animais familiares seguindo um cronograma de rotação durante o protocolo.

No experimento 2, 29 dias após as 10 sessões de derrota, foi realizada uma sessão de gatilho (ver Figura 8). Esta sessão consistiu em expor novamente os camundongos para testemunharem mais uma sessão de interação não agressiva, seguindo o procedimento descrito anteriormente.

**Figura 3.** Representação do protocolo de TINA. TM, testemunha macho; TF, testemunha fêmea; F, camundongo familiar.



Fonte: Elaboração própria.

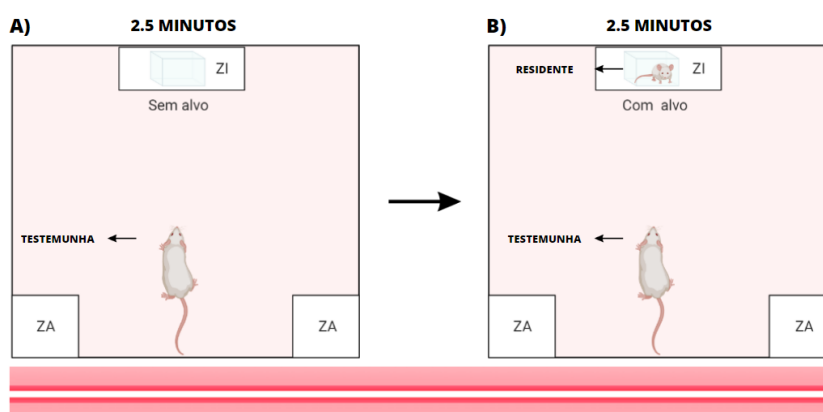
#### 4.4 Teste de interação social (TIS)

Vinte e quatro horas após o último episódio de estresse a última derrota no experimento 1 e o gatilho para o experimento 2, foi avaliado o comportamento de interação social nas testemunhas machos e fêmeas. O protocolo, baseado em Golden et al. (2011), foi realizado em uma arena composta por uma caixa opaca de acrílico de assoalho cinza (42 × 42 × 42 cm) com uma caixa de contenção de acrílico transparente (10 × 6 × 15 cm) fixada a uma das paredes, formando uma zona de interação ao seu redor, e duas zonas de afastamento demarcadas nos cantos opostos. Inicialmente, os camundongos foram colocados individualmente no extremo oposto da caixa de contenção para avaliar a exploração basal durante 150 segundos

(sem alvo). Após esse período, os animais foram retirados da arena e um residente agressivo foi colocado na caixa de contenção. Em seguida, os camundongos foram retornados à arena por mais 150 segundos para avaliar o comportamento de interação social na presença do agressor (com alvo) (ver Figura 4). Todo o procedimento foi registrado com uma câmera fixada ao teto sob iluminação de luz vermelha (5 lux) no período claro-escuro e registrada pelo programa ANY-Maze.

Os parâmetros comportamentais analisados incluíram o tempo de exploração das zonas de interação (ZI) e de afastamento (ZA) registrados na ausência e presença do alvo. O comportamento de evitação social foi expresso como uma proporção de interação social, comparando o tempo gasto nas zonas na presença e ausência do alvo. A razão de interação (RI) foi calculada como a razão entre o tempo gasto na zona de interação na fase com alvo pelo tempo gasto na zona de interação na fase sem alvo.

**Figura 4.** Representação do teste de interação social (TIS).



**Fonte:** Ícones adaptados de “Editable Icons - Mouse Housing & Equipment”. Fonte: Adaptado de BioRender.com, 2024.

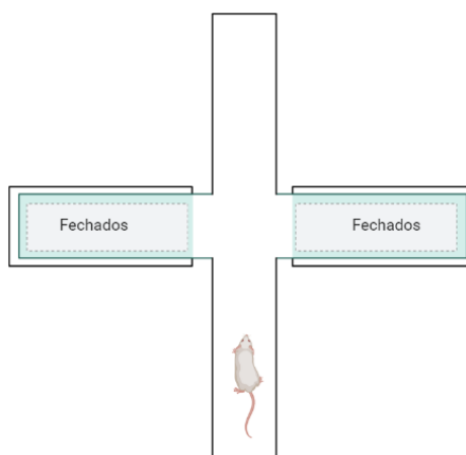
#### 4.5 Labirinto em cruz elevado (LCE)

A estrutura do labirinto em cruz elevado (LCE) segue o protocolo descrito por Lister (1987). O aparato consiste em dois braços abertos (30 × 5 × 0,25 cm) e dois braços fechados (30 × 5 × 15 cm), conectados por uma plataforma central comum (5 × 5 cm), sendo elevado a uma altura de 38,5 cm acima do solo. A superfície do labirinto é de madeira, e as paredes dos braços fechados são de vidro transparente (ver figura 5). Todos os experimentos foram realizados sob a iluminação de uma lâmpada de 60 W durante a fase clara do ciclo claro-escuro (50 lux no piso da área central do LCE).

Os comportamentos relacionados à ansiedade foram avaliados por meio do LCE apenas nas testemunhas machos e fêmeas dos experimentos 1 e 2, 24 horas após o TIS. Os animais foram colocados individualmente na plataforma central do aparato, voltados para um braço aberto. Cada sessão durou 5 minutos, e entre cada sujeito o labirinto foi limpo com álcool a 15%.

Os parâmetros comportamentais analisados incluíram as medidas espaço-temporais convencionais: frequências de entradas nos braços fechados (EBF) e abertos (EBA) (considerando entrada quando todas as quatro patas estavam em um braço) e o tempo gasto nos braços abertos (TBA) do labirinto. Esses dados foram usados para calcular a porcentagem de entradas nos braços abertos (%EBA)  $[(\text{entradas nos braços abertos}/\text{entradas totais}) \times 100]$  e a porcentagem de tempo nos braços abertos (%TBA)  $[(\text{tempo nos braços abertos}/300) \times 100]$ . A exposição ao LCE foi monitorada por meio de uma câmera montada verticalmente, conectada a um computador para análise e registro automático do comportamento pelo programa ANY-Maze.

**Figura 5.** Representação do labirinto em cruz elevado (LCE).



**Fonte:** adaptado de “Mouse Maze Tests”, por Biorender.com (2024).

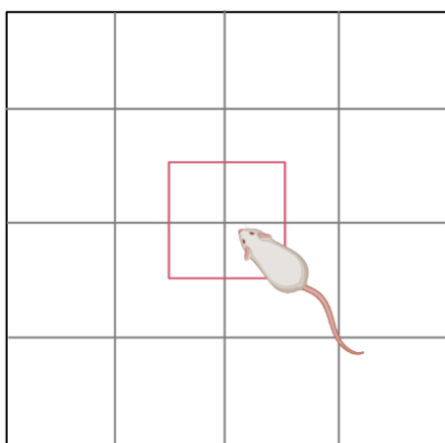
#### 4.6 Campo aberto (CA)

O teste de campo aberto (CA) permite uma avaliação rápida e eficaz dos comportamentos de exploração do ambiente, atividade locomotora geral e comportamentos relacionados à ansiedade em roedores (Hall, 1941). Neste estudo, foi seguido um protocolo semelhante ao descrito por Mikics *et al.* (2005). Foram avaliados comportamentos relacionados à ansiedade por meio do CA apenas nas

testemunhas machos e fêmeas dos experimentos 1 e 2; o teste foi realizado 2 horas após o LCE.

Os animais foram colocados individualmente em uma caixa quadrada de madeira laminada, medindo 40 × 40 cm e dividida em 16 quadrados menores, com um revestimento de plástico laminado e cercada por uma parede de 50 cm de altura (ver figura 6). A caixa foi iluminada por uma lâmpada de 60 W durante a fase clara do ciclo claro-escuro (50 lux na área central do piso). Cada camundongo foi colocado no centro da caixa por 5 minutos, com o tempo gasto no centro e o movimento entre os quadrados sendo registrados pelo programa ANY-Maze. Todas as sessões foram filmadas por uma câmera montada verticalmente e conectada a um monitor.

**Figura 6.** Representação do campo aberto (CA).



**Fonte:** Ícones adaptados de “Editable Icons - Mouse Housing & Equipment”. Fonte: Adaptado de BioRender.com, 2024.

## 4.7 Delineamento Experimental

### 4.7.1 Experimento 1: Efeitos do estresse de testemunho de derrota social (ETDS) em comportamentos relacionados à ansiedade em camundongos machos e fêmeas expostos aos 58-70 dias pós-natal (DPN).

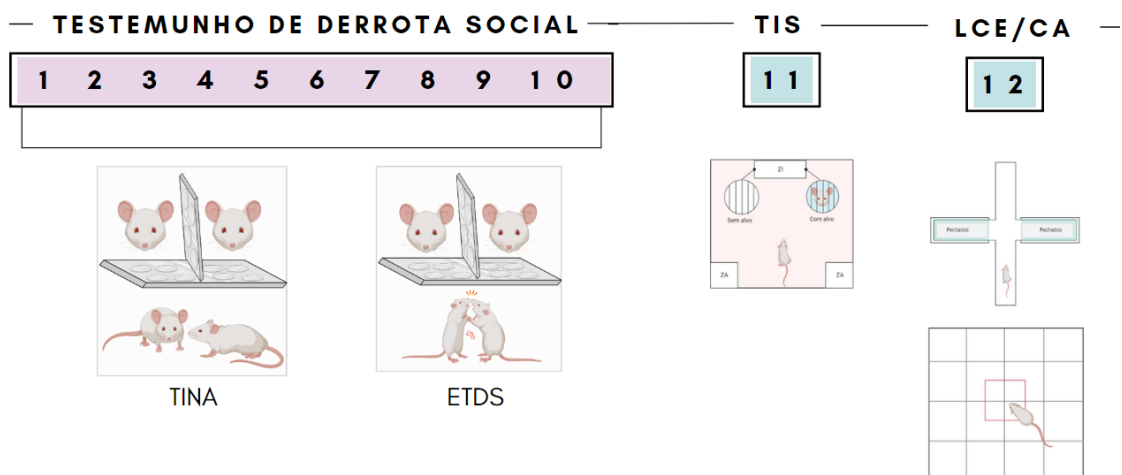
Aos 58-70 DPN, os animais foram submetidos a 10 dias de ETDS (item 4.2) ou TINA (item 4.3). Vinte e quatro horas após este período (dia 11), os animais foram avaliados no teste de interação social (TIS) (item 4.4), no dia 12 foi realizado o labirinto em cruz elevado (LCE) (item 4.5) e duas horas depois o teste de campo aberto (CA) (item 4.6). Para a realização deste experimento os animais foram distribuídos em 4 grupos (n ≈ 12/grupo), como descrito abaixo:

- Grupo 1: Camundongos fêmeas submetidos ao ETDS e testes comportamentais.

- Grupo 2: Camundongos machos submetidos ao ETDS e testes comportamentais.
- Grupo 3: Camundongos fêmeas submetidos ao TINA e testes comportamentais.

Grupo 4: Camundongos machos submetidos ao TINA e testes comportamentais.

**Figura 7.** Delineamento experimental do experimento 1. Os animais são expostos a 10 dias de estresse de testemunho de derrota social (ETDS) ou testemunho de interação não agressiva (TINA). No dia 11 passam pelo teste de interação social (TIS), e no dia 12, é realizado o labirinto em cruz elevado (LCE) e duas horas depois o teste de campo aberto (CA).



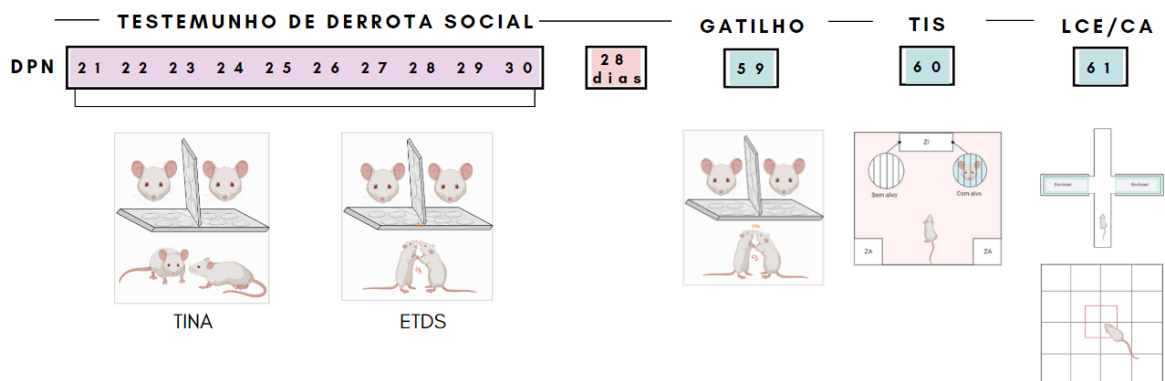
**Fonte:** Ícones adaptados de “Editable Icons - Mouse Housing & Equipment”. Fonte: Adaptado de BioRender.com, 2024.

#### 4.7.2 Experimento 2 - Efeitos tardios do estresse de testemunho de derrota social (ETDS) em comportamentos relacionados à ansiedade em camundongos machos e fêmeas expostos aos 21-31 dias pós-natal (DPN).

Aos 21-31 DPN, os animais foram submetidos a 10 dias de ETDS (item 4.2) ou TINA (item 4.3). Depois da última sessão de estresse os animais ficaram 29 dias no biotério sem ser expostos a nenhum protocolo experimental. No DPN 59, foram submetidos a mais uma sessão de ETDS ou TINA (gatilho) e vinte e quatro horas após este período (DPN 60), os animais foram avaliados no teste de interação social (TIS) (item 4.4), no DPN 61 foi realizado o labirinto em cruz elevado (LCE) (item 4.5) e duas horas depois o teste de campo aberto (CA) (item 4.6) (ver figura 8). Para a realização deste experimento os animais foram distribuídos em 4 grupos ( $n \approx 12/\text{grupo}$ ), como descrito abaixo:

- Grupo 1: Camundongos fêmeas submetidos ao ETDS e testes comportamentais.
- Grupo 2: Camundongos machos submetidos ao ETDS e testes comportamentais.
- Grupo 3: Camundongos fêmeas submetidos ao TINA e testes comportamentais.
- Grupo 4: Camundongos machos submetidos ao TINA e testes comportamentais

**Figura 8.** Delineamento experimental do experimento 2. Os animais são expostos a 10 dias de testemunho de derrota social (ETDS) ou testemunho de interação não agressiva (TINA). Permanecem no biotério por 28 dias, no DPN 59 são submetidos a mais uma sessão de ETDS ou TINA (gatilho), no DPN 60 passam pelo teste de interação social (TIS), e no DPN 61, é realizado o labirinto em cruz elevado (LCE) e duas horas depois o teste de campo aberto (CA).



**Fonte:** Ícones adaptados de “Editable Icons - Mouse Housing & Equipment”. Fonte: Adaptado de BioRender.com, 2024.

#### 4.8 Análise estatística.

A análise estatística foi feita utilizando-se o software estatístico IBM. SPSS Statistics (versão 28.0) (IBM Corp., 2021). Os gráficos foram criados no software GraphPad Prism 7 (GraphPad software Inc., La Jolla, CA-EUA). O nível de significância estatística foi estabelecido em  $\alpha = 0,05$  para todas as análises. Para todos os resultados foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk para verificar a distribuição dos dados e o teste de Levene, para avaliar a homogeneidade das variâncias entre grupos.

Para as medidas contempladas no labirinto em cruz elevado (LCE), campo aberto (CA), e razão de interação (RI), foi aplicado o teste t de Student para amostras independentes em casos de distribuição normal nos resultados. Quando as variâncias

não eram homogêneas, foi realizado um teste t com correção de Welch. Se os pressupostos de normalidade e homogeneidade das variâncias não eram atendidos, foi realizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney para amostras independentes.

Para o teste de interação social (TIS) foram considerados 2 fatores, condição (F1; TINA ou ETDS), e sessão (F2, sem alvo, com alvo) para à análise da zona de interação (ZI) e na zona de afastamento (ZA). A análise dos resultados foi feita mediante uma ANOVA de duas vias de medidas repetidas, em casos de significância, foi seguida de testes de comparações múltiplas/post hoc (teste de Sidak). Em casos onde os pressupostos de normalidade não foram cumpridos, foi realizada uma ANOVA não paramétrica de medidas repetidas com o teste de Friedman, em casos de significância, foram conduzidos testes post hoc: (i) teste de Wilcoxon Signed-Rank para analisar amostras pareadas (TINA sem alvo -TINA com alvo; ETDS sem alvo - ETDS com alvo), (ii) teste de Mann-Whitney para comparar combinações das amostras independentes (ETDS com alvo - TINA com alvo; ETDS sem alvo - TINA com alvo; ETDS sem alvo - TINA sem alvo; ETDS com alvo e TINA sem alvo).

#### **4.9 Ética**

Todos os protocolos experimentais utilizados neste trabalho foram conduzidos de acordo com os princípios éticos do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa local (CEUA/FCF/CAr: 23/2022).

### **5 RESULTADOS**

#### **5.1 Experimento 1:**

##### **5.1.1 Teste de interação social (TIS)**

###### **5.1.1.1 Machos**

###### **5.1.1.1.1 Zona de interação**

Foi realizada uma análise de variância de medidas repetidas de dois fatores, condição (F1; TINA ou ETDS) e sessão (F2, sem alvo, com alvo). Todos os dados tiveram uma distribuição normal no teste de Shapiro-Wilk e homogeneidade de variâncias no teste de Levene. O nível de significância foi estabelecido em  $\alpha = 0,05$ . Os resultados indicaram que não houve interação significativa entre a condição e a sessão ( $P = 0,6063$ ), a condição por si só não foi significativa ( $P = 0,7684$ ). No entanto, houve um efeito significativo da sessão ( $P = 0,0030$ ). O teste de múltiplas comparações de Sidak revelou uma diferença significativa entre "sem alvo" e "com alvo" para a condição TINA ( $P = 0,0242$ ), mas não para ETDS ( $P = 0,1143$ ). A Figura

9A mostra o efeito do ETDS sob o tempo na zona de interação para camundongos machos de 56-70 DPN.

#### 5.1.1.1.2 Zona de afastamento

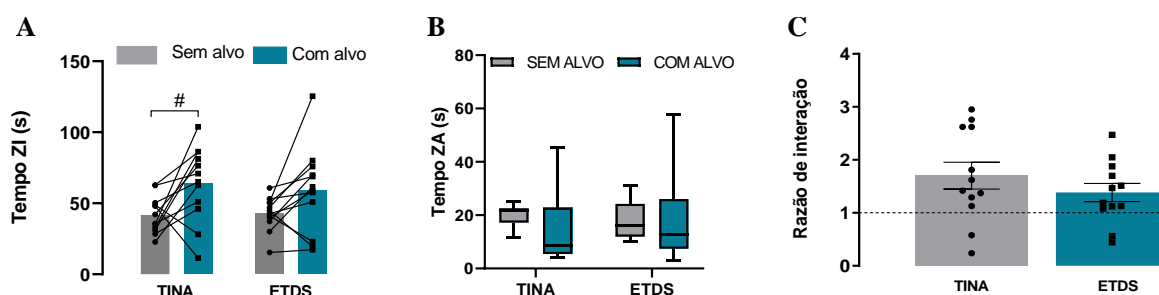
Foram considerados dois fatores para a análise do tempo gasto na zona de afastamento: condição (F1; TINA ou ETDS) e sessão (F2; sem alvo, com alvo). Os resultados do teste de Shapiro-Wilk indicam que os grupos TINA ( $p = 0.005$ ) e ETDS ( $p = 0.023$ ) com alvo não seguem uma distribuição normal, enquanto as variáveis TINA ( $p = 0,166$ ) e ETDS ( $p = 0,320$ ) sem alvo seguem uma distribuição normal. Portanto, foram aplicados testes não paramétricos para a análise estatística.

Foi realizada uma anova não paramétrica com o teste de Friedman. Os resultados indicam que não há diferença significativa entre os fatores sem alvo e com alvo para o grupo TINA e ETDS ( $\chi^2 (3) = 4.20, p = 0,241$ ). A Figura 9B mostra o efeito do ETDS sob o tempo na zona de afastamento para camundongos machos de 56-70 DPN.

#### 5.1.1.1.3 Razão de interação

A normalidade dos dados foi avaliada através do teste de Shapiro-Wilk, com os resultados indicando que ambos os grupos, TINA ( $p = 0.460$ ) e ETDS ( $p = 0.945$ ), seguem uma distribuição normal. A homogeneidade das variâncias foi verificada utilizando o teste de Levene, que mostrou que as variâncias dos dois grupos são homogêneas ( $p = 0,155$ ). Com base nisso, foi aplicado o teste t de Student, que não revelou diferença estatisticamente significativa entre as médias dos grupos TINA ( $M = 1,701$ ) e ETDS ( $M = 1,383$ ),  $t = 1,041, p = 0,3094$ . (Figura 9C).

**Figura 9.** Efeito do ETDS sob comportamentos de interação social no TIS em machos de 56-70 DPN. Tamanho das amostras: TINA ( $n = 12$ ), ETDS ( $n = 12$ ). # diferenças significativas na condição INA sem alvo comparada com INA com alvo na ZI. A) Tempo gasto na zona de interação (s). B) Tempo gasto na zona de afastamento (s). As caixas representam o intervalo interquartil (Q1 a Q3), e as linhas horizontais dentro das caixas representam a mediana, os bigodes se estendem aos valores mínimos e máximos. C) Razão de interação (Razão de Interação (RI)=tempo na zona de Interação sem alvo/tempo na zona de interação com alvo). As barras representam a média e pontos de dispersão de cada um dos grupos.



Fonte: Elaboração própria.

### **5.1.1.2 Fêmeas**

#### **5.1.1.2.1 Zona de interação**

Foi realizada uma análise de variância de medidas repetidas de dois fatores, condição (F1; TINA ou ETDS) e sessão (F2; sem alvo, com alvo). Todos os dados tiveram uma distribuição normal no teste de Shapiro-Wilk e homogeneidade de variâncias no teste de Levene. O nível de significância foi estabelecido em  $\alpha = 0,05$ . Os resultados da ANOVA de medidas repetidas de duas vias indicaram que não houve interação significativa entre F1 e F2 ( $P = 0,310$ ), o fator condição por si só não foi significativo ( $P = 0,617$ ). No entanto, houve um efeito significativo da sessão ( $P = 0,002$ ). O teste de múltiplas comparações de Sidak revelou uma diferença significativa entre "sem alvo" e "com alvo" para a condição ETDS ( $P = 0,027$ ), mas não para TINA ( $P = 0,299$ ). A Figura 10A mostra o efeito do ETDS sob o tempo na zona de interação para camundongos fêmeas de 56-70 DPN.

#### **5.1.1.2.2 Zona de afastamento**

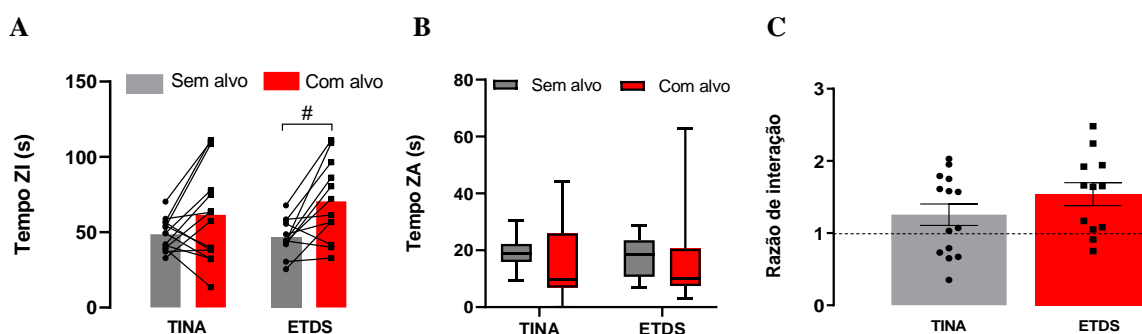
Foram considerados dois fatores para a análise do tempo gasto na zona de afastamento: condição (F1; TINA ou ETDS) e sessão (F2; sem alvo, com alvo). Os resultados do teste de Shapiro-Wilk indicam que os grupos TINA ( $p = 0.032$ ) e ETDS ( $p = 0.002$ ) com alvo não seguem uma distribuição normal, enquanto as variáveis TINA ( $p = 0.555$ ) e ETDS ( $p = 0.685$ ) sem alvo seguem uma distribuição normal. Portanto, foram aplicados testes não paramétricos para a análise estatística.

Foi realizada uma anova não paramétrica com o teste de Friedman. Os resultados não indicaram diferença significativa entre as condições sem alvo e com alvo no grupo TINA e no ETDS ( $\chi^2 (3) = 5.100$ ,  $p = 0.165$ ). A Figura 10B mostra o efeito do ETDS sob o tempo na zona de afastamento para camundongos fêmeas de 56-70 DPN.

#### **5.1.1.2.3 Razão de interação**

A normalidade dos dados foi avaliada através do teste de Shapiro-Wilk, com os resultados indicando que ambos os grupos, TINA ( $p = 0.196$ ) e ETDS ( $p = 0.639$ ), seguem uma distribuição normal. A homogeneidade das variâncias foi verificada utilizando o teste de Levene, que mostrou que as variâncias dos dois grupos são homogêneas ( $p = 0,660$ ). Com base nisso, foi aplicado o teste t de Student, que não revelou diferença estatisticamente significativa entre as médias dos grupos TINA ( $M = 1,255$ ) e ETDS ( $M = 1,541$ ),  $t = 1,311$ ,  $p = 0,202$ . (Figura 10C).

**Figura 10.** Efeito do ETDS sob comportamentos de interação social no TIS em fêmeas de 56-70 DPN. Tamanho das amostras: TINA (n = 14), ETDS (n = 12). # diferenças significativas na condição ETDS sem alvo compara com ETDS com alvo na ZI. A) Tempo gasto na zona de interação (s). B) Tempo gasto na zona de afastamento (s). As caixas representam o intervalo interquartil (Q1 a Q3), e as linhas horizontais dentro das caixas representam a mediana, os bigodes se estendem aos valores mínimos e máximos. C) Razão de interação (Razão de Interação (RI)=tempo na zona de Interação sem alvo/tempo na zona de interação com alvo). As barras representam a média e pontos de dispersão de cada um dos grupos ( $\pm$ EPM).



Fonte: Elaboração própria.

## 5.1.2 Labirinto em cruz elevado (LCE)

### 5.1.2.1 Machos

#### 5.1.2.1.1 Entradas em braços fechados

Inicialmente, foi avaliada a normalidade dos dados utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Os resultados indicaram que ambos os grupos, TINA ( $p = 0,0923$ ) e ETDS ( $p = 0,1087$ ), seguem uma distribuição normal, já que os valores de  $p$  foram superiores ao nível de significância de 0,05. A homoscedasticidade foi avaliada através do teste de Levene, que revelou que as variâncias dos dois grupos são homogêneas ( $p = 0,6372$ ), com um valor de  $p$  superior a 0,05. Foi realizado um teste  $t$  de amostras independentes, o qual indicou que não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias dos grupos TINA ( $M = 16,50$ ,  $DP = 6,86$ ) e ETDS ( $M = 14,25$ ,  $DP = 5,64$ ),  $t(22) = 0,8211$ ,  $p = 0,4204$ , IC 95% [-7,933 a 3,433]. Assim, o efeito do ETDS em camundongos machos de 56-70 dias pós-natal (DPN) no número de entradas nos braços fechados do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) (Figura 11A) não apresentou diferenças significativas.

#### 5.1.2.1.2 %Entradas em braços abertos

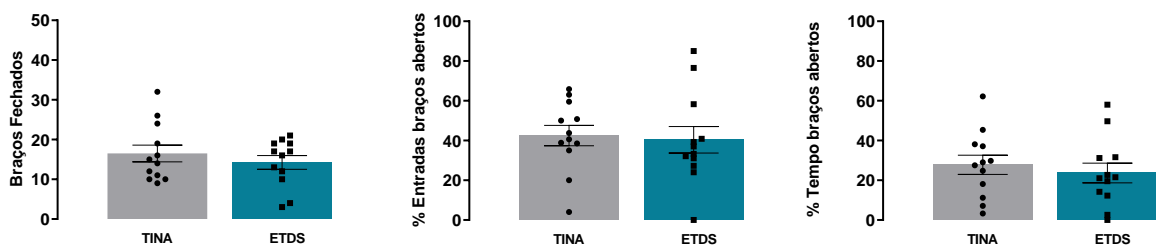
A normalidade dos dados foi avaliada utilizando-se o teste de Shapiro-Wilk. Os resultados indicaram que ambos os grupos, TINA ( $p = 0,4864$ ) e ETDS ( $p = 0,2659$ ), seguem uma distribuição normal. A homoscedasticidade foi avaliada através do teste de Levene, que revelou que as variâncias dos dois grupos são homogêneas

( $p = 0,6459$ ). Foi realizado um teste t de amostras independentes, o qual indicou que não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias dos grupos TINA ( $M = 42,50$ ,  $DP = 18,77$ ) e ETDS ( $M = 40,39$ ,  $DP = 22,55$ ),  $t(22) = 0,2503$ ,  $p = 0,8047$ , IC 95% [-17,09 a 12,87]. O efeito do ETDS em camundongos machos de 56-70 dias pós-natal (DPN) na porcentagem de entradas nos braços abertos no Labirinto em Cruz Elevado (LCE) (Figura 11B) não apresentou diferenças significativas.

#### 5.1.2.1.3 %Tempo braços abertos

A normalidade dos dados foi avaliada utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Os resultados indicaram que ambos os grupos, TINA ( $p = 0,9081$ ) e ETDS ( $p = 0,4389$ ), seguem uma distribuição normal, já que os valores de  $p$  foram superiores ao nível de significância de 0,05. A homoscedasticidade foi avaliada através do teste de Levene, que revelou que as variâncias dos dois grupos são homogêneas ( $p = 0,9356$ ), com um valor de  $p$  superior a 0,05. Foi realizado um teste t de amostras independentes, o qual indicou que não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias dos grupos TINA ( $M = 27,58$ ,  $DP = 15,83$ ) e ETDS ( $M = 24,68$ ,  $DP = 17,05$ ),  $t(22) = 0,5934$ ,  $p = 0,5590$ , IC 95% [-8,13 a 14,68]. Assim, o efeito do ETDS em camundongos machos de 56-70 dias pós-natal (DPN) na porcentagem de tempo no Labirinto em Cruz Elevado (LCE) (Figura 11C) não apresentou diferenças significativas.

**Figura 11.** Ausência de efeitos do ETDS sob comportamentos relacionados com ansiedade no labirinto em cruz elevado (LCE) em machos de 56-70 DPN. Tamanho das amostras: TINA ( $n = 12$ ), ETDS ( $n = 12$ ). As barras representam a média e pontos de dispersão de cada um dos grupos ( $\pm$ EPM). A) número de entradas nos braços fechados, B) porcentagem de entradas nos braços abertos, C) porcentagem de tempo nos braços abertos.



Fonte: Elaboração própria.

#### 5.1.2.2 Fêmeas

##### 5.1.2.2.1 Entradas em braços fechados

A normalidade dos dados foi verificada utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Os resultados mostraram que ambos os grupos, TINA ( $p = 0,2660$ ) e ETDS ( $p = 0,0872$ ), seguem uma distribuição normal. A homogeneidade das variâncias foi analisada pelo

teste de Levene, que indicou que as variâncias dos dois grupos não são homogêneas ( $p = 0,0021$ ), com um valor de  $p$  inferior a  $0,05$ . Devido à falta de homogeneidade das variâncias, foi realizado o teste  $t$  com correção de Welch, o qual revelou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos TINA ( $M = 16,36$ ,  $DP = 2,34$ ) e ETDS ( $M = 18,33$ ,  $DP = 6,21$ ),  $t = -1,0292$ ,  $p = 0,3210$ . Portanto, o efeito do ETDS em camundongos fêmeas de 56-70 DPN não mostrou diferenças significativas no número de entradas nos braços fechados do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) (Figura 12A).

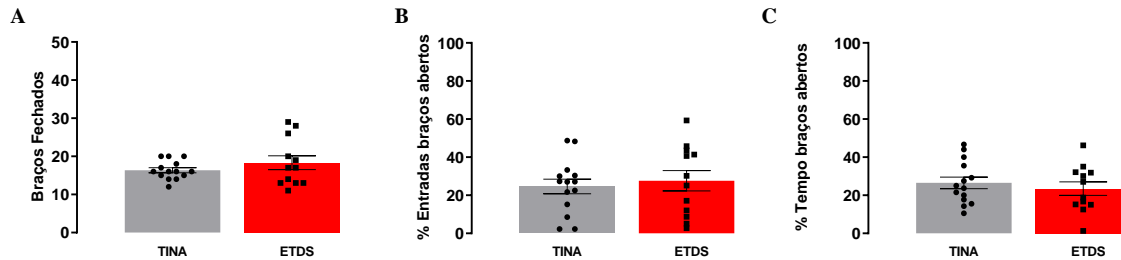
#### **5.1.2.2.2 % Entradas em braços abertos**

Foi avaliada a normalidade dos dados utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Os resultados indicaram que ambos os grupos, TINA ( $p = 0,3670$ ) e ETDS ( $p = 0,4684$ ), seguem uma distribuição normal. A homogeneidade das variâncias foi avaliada através do teste de Levene, que revelou que as variâncias dos dois grupos são homogêneas ( $p = 0,1438$ ), com um valor de  $p$  superior a  $0,05$ . Foi realizado um teste  $t$  de amostras independentes, o qual indicou que não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias dos grupos TINA ( $M = 24,61$ ,  $DP = 1,725$ ) e ETDS ( $M = 27,63$ ,  $DP = 1,862$ ),  $t = -0,4667$ ,  $p = 0,6449$ . Portanto, o efeito do ETDS em camundongos fêmeas de 56-70 DPN não mostrou diferenças significativas na porcentagem de entradas nos braços abertos do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) (Figura 12B).

#### **5.1.2.2.3 % tempo em braços abertos**

A normalidade dos dados foi avaliada utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Os resultados indicaram que ambos os grupos, TINA ( $p = 0,4995$ ) e ETDS ( $p = 0,8849$ ), seguem uma distribuição normal. A homogeneidade das variâncias foi avaliada através do teste de Levene, que revelou que as variâncias dos dois grupos são homogêneas ( $p = 0,6132$ ), com um valor de  $p$  superior a  $0,05$ . Foi realizado um teste  $t$  de amostras independentes, o qual indicou que não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias dos grupos TINA ( $M = 26,51$ ,  $DP = 1,240$ ) e ETDS ( $M = 23,48$ ,  $DP = 1,338$ ),  $t = 0,6518$ ,  $p = 0,5207$ . Assim, o efeito do ETDS em camundongos fêmeas de 56-70 DPN não mostrou diferenças significativas na porcentagem de tempo nos braços abertos do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) (Figura 12C).

**Figura 12.** Ausência de efeitos do ETDS sob comportamentos relacionados com ansiedade no labirinto em cruz elevado (LCE) em camundongos fêmeas de 56-70 DPN. Tamanho das amostras: TINA (n = 14), ETDS (n = 12). As barras representam a média e pontos de dispersão de cada um dos grupos ( $\pm$ EPM). A) número de entradas nos braços fechados, B) porcentagem de entradas nos braços abertos, C) porcentagem de tempo nos braços abertos.



**Fonte:** Elaboração própria.

### 5.1.3 Campo aberto (CA)

#### 5.1.3.1 Machos

##### 5.1.3.1.1 Tempo no centro

A normalidade dos dados foi verificada utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Os resultados mostraram que o grupo TINA não segue uma distribuição normal ( $p = 0,004$ ), enquanto o grupo ETDS segue uma distribuição normal ( $p = 0,596$ ). A homogeneidade das variâncias foi analisada pelo teste de Levene, que indicou que as variâncias dos dois grupos não são homogêneas ( $p = 0,0366$ ), com um valor de  $p$  inferior a 0,05. Devido à não normalidade dos dados do grupo TINA e à falta de homogeneidade das variâncias, foi aplicado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Os resultados não revelaram diferença estatisticamente significativa entre as medianas dos grupos TINA e ETDS, com  $W = 63000$  e  $p = 0,630$ . Portanto, o efeito do ETDS em camundongos machos de 56-70 dias DPN no tempo gasto no centro do campo aberto (CA) (Figura 13A) não apresentou diferenças significativas.

##### 5.1.3.1.2 Distância no centro

A normalidade dos dados foi avaliada utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Os resultados indicaram que ambos grupos, TINA ( $p = 0,199$ ) e ETDS ( $p = 0,356$ ), seguem uma distribuição normal. A homogeneidade das variâncias foi analisada pelo teste de Levene, que indicou que as variâncias dos dois grupos são homogêneas ( $p = 0,349$ ). Foi realizado um teste  $t$  de amostras independentes, o qual indicou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos TINA ( $M = 1,421$ ) e ETDS ( $M = 1,507$ ),  $t = 0,3270$ ,  $p = 0,746$ . O efeito do ETDS em camundongos machos de 56-70 dias DPN na distância no centro do campo aberto (CA) (Figura 13B) não apresentou diferenças significativas.

### **5.1.3.1.3 Tempo na periferia**

A normalidade dos dados foi verificada utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Os resultados mostraram que o grupo TINA não segue uma distribuição normal ( $p = 0,004$ ), enquanto o grupo ETDS segue uma distribuição normal ( $p = 0,596$ ). A homogeneidade das variâncias foi analisada pelo teste de Levene, que indicou que as variâncias dos dois grupos são homogêneas ( $p = 0,111$ ). Devido à não normalidade dos dados do grupo TINA, foi aplicado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Os resultados não revelaram diferença estatisticamente significativa entre as medianas dos grupos TINA e ETDS, com  $W = 81.000$  e  $p = 0,630$ . Portanto, o efeito do ETDS em camundongos machos de 56-70 dias DPN no tempo gasto na periferia no campo aberto (CA) (Figura 13C) não apresentou diferenças significativas.

### **5.1.3.1.4 Distância percorrida na periferia**

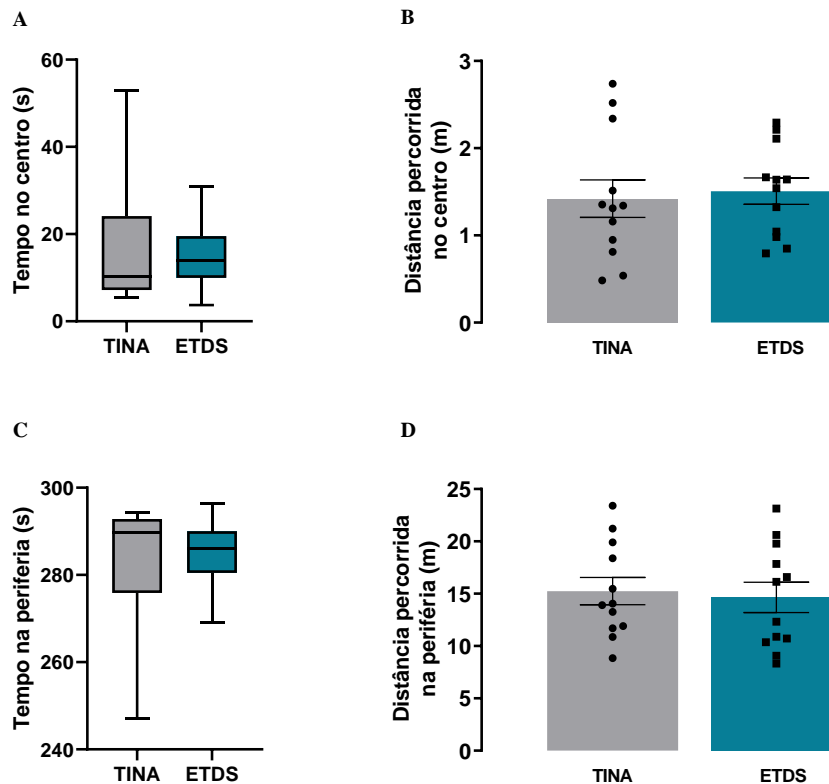
A normalidade dos dados foi avaliada através do teste de Shapiro-Wilk. Os resultados indicaram que ambos os grupos, TINA ( $p = 0,5577$ ) e ETDS ( $p = 0,3210$ ), seguem uma distribuição normal. A homogeneidade das variâncias foi verificada utilizando o teste de Levene, que mostrou que as variâncias dos dois grupos são homogêneas ( $p = 0,7453$ ). Foi aplicado o teste t de Student, que não revelou diferença estatisticamente significativa entre as médias dos grupos TINA ( $M = 15,24$ ,  $DP = 13,65$ ) e ETDS ( $M = 14,65$ ,  $DP = 7,01$ ),  $t = 0,3054$ ,  $p = 0,7629$ . Assim, o efeito do ETDS em camundongos machos de 56-70 dias DPN na distância percorrida na periferia no CA (Figura 13D) não apresentou diferenças significativas.

## **5.1.3.2 Fêmeas**

### **5.1.3.2.1 Tempo no centro**

A normalidade dos dados foi avaliada usando o teste de Shapiro-Wilk, e os resultados indicaram que ambos os grupos, TINA ( $p = 0,6680$ ) e ETDS ( $p = 0,7408$ ), apresentam distribuição normal. A homogeneidade das variâncias foi testada pelo teste de Levene, que mostrou que as variâncias dos dois grupos são homogêneas ( $p = 0,2667$ ). Aplicou-se o teste t de Student para comparar as médias, que não revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos TINA ( $M = 12,46$ ) e ETDS ( $M = 12,81$ ), com  $t = 0,1402$  e  $p = 0,8897$ . Assim, não houve diferenças significativas no tempo gasto no centro entre os camundongos fêmeas de 56-70 DPN expostos a ETDS (Figura 14A).

**Figura 13.** Ausência de efeitos do ETDS sob comportamentos relacionados com ansiedade no campo aberto (CA) em machos de 56-70 DPN. Tamanho das amostras: TINA (n = 12), ETDS (n = 12). A) Tempo no centro (s) B) Distância percorrida no centro (m), C) Tempo na periferia (s). As caixas representam o intervalo interquartil (Q1 a Q3), e as linhas horizontais dentro das caixas representam a mediana, os bigodes se estendem aos valores mínimos e máximos, D) Distância percorrida na periferia (m). As barras representam a média e pontos de dispersão de cada um dos grupos ( $\pm$ EPM).



**Fonte:** Elaboração própria.

#### 5.1.3.2.2 Distância no centro

A normalidade dos dados foi avaliada utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Os resultados indicaram que ambos grupos, TINA ( $p = 0,084$ ) e ETDS ( $p = 0,201$ ), seguem uma distribuição normal. A homogeneidade das variâncias foi analisada pelo teste de Levene, que indicou que as variâncias dos dois grupos são homogêneas ( $p = 0,754$ ). Foi realizado um teste t de amostras independentes, o qual indicou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos TINA ( $M = 1,343$ ) e ETDS ( $M = 1,333$ ),  $t = 0,029$ ,  $p = 0,846$ . O efeito do ETDS em camundongos fêmeas de 56-70 dias DPN na distância no centro do campo aberto (CA) (Figura 14B) não apresentou diferenças significativas.

#### 5.1.3.2.3 Tempo na periferia

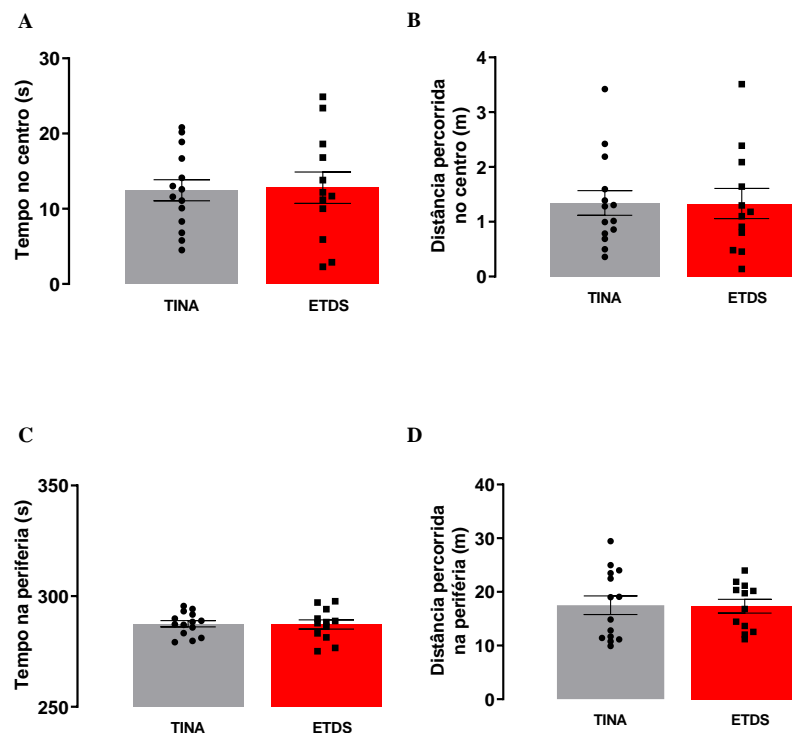
A normalidade dos dados foi avaliada usando o teste de Shapiro-Wilk, e os resultados indicaram que ambos os grupos, TINA ( $p = 0,670$ ) e ETDS ( $p = 0,735$ ), apresentam distribuição normal. A homogeneidade das variâncias foi testada pelo

teste de Levene, que mostrou que as variâncias dos dois grupos são homogêneas ( $p = 0,335$ ). Aplicou-se o teste t de Student para comparar as médias, que não revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos TINA ( $M = 287,5$ ) e ETDS ( $M = 287,1$ ), com  $t = 0,141$  e  $p = 0,889$ . Assim, não houve diferenças significativas no tempo gasto no centro entre os camundongos fêmeas de 56-70 DPN expostos a ETDS (Figura 14C).

#### 5.1.3.2.4 Distância percorrida na periferia

A normalidade dos dados foi avaliada através do teste de Shapiro-Wilk, com os resultados indicando que ambos os grupos, TINA ( $p = 0.1025$ ) e ETDS ( $p = 0.2557$ ), seguem uma distribuição normal. A homogeneidade das variâncias foi verificada utilizando o teste de Levene, que mostrou que as variâncias dos dois grupos são homogêneas ( $p = 0,2026$ ). Com base nisso, foi aplicado o teste t de Student, que não revelou diferença estatisticamente significativa entre as médias dos grupos TINA ( $M = 17,51$ ) e ETDS ( $M = 17,34$ ),  $t = 0,07761$ ,  $p = 0,9388$ . Dessa forma, o efeito do ETDS em camundongos fêmeas de 56-70 DPN não apresentou diferenças significativas na distância percorrida na periferia (Figura 14D).

**Figura 14.** Ausência de efeitos do ETDS sob comportamentos relacionados com ansiedade no campo aberto (CA) em fêmeas de 56-70 DPN. Tamanho das amostras: TINA ( $n = 14$ ), ETDS ( $n = 12$ ). As barras representam a média e pontos de dispersão de cada um dos grupos ( $\pm$ EPM). A) Tempo no centro (s) B) Distância percorrida no centro (m) C) Tempo na periferia (s) D) Distância percorrida na periferia (m).



Fonte: Elaboração própria.

## **5.2 Experimento 2.**

### **5.2.1 Teste de interação social (TIS)**

#### **5.2.1.1 Machos**

##### **5.2.1.1.1 Zona de interação**

Foram considerados dois fatores para a análise do tempo gasto na zona de afastamento: condição (F1; TINA ou ETDS) e sessão (F2; sem alvo, com alvo). Os resultados do teste de Shapiro-Wilk indicam que os grupos TINA sem alvo ( $p = 0,673$ ), ETDS sem alvo ( $p = 0,100$ ) e TINA com alvo ( $p = 0,578$ ) seguem uma distribuição normal, enquanto o grupo ETDS com alvo ( $p = 0,032$ ) não segue uma distribuição normal. Portanto, foram aplicados testes não paramétricos para a análise estatística.

Para a análise dos dados foi realizada uma ANOVA não paramétrica de medidas repetidas utilizando o teste de Friedman. Os resultados indicaram uma diferença significativa entre F1 e F2 ( $\chi^2(3)=19,300$ ,  $p<0,001$ ). Testes post-hoc foram conduzidos usando o teste de Wilcoxon Signed-Rank para comparações pareadas dentro dos grupos TINA e ETDS, revelando diferenças significativas entre TINA sem alvo e TINA com alvo ( $Z=-2,981$ ,  $p=0,003$ ), no entanto não mostrou diferença entre ETDS sem alvo e ETDS com alvo ( $Z=-3,059$ ,  $p=0,209$ ). Além disso, foi aplicado o teste de Mann-Whitney para comparações independentes entre os grupos. Os resultados não mostraram diferenças significativas entre ETDS sem alvo e TINA sem alvo ( $U=55$ ,  $p=0,3408$ ), ETDS com alvo e TINA com alvo ( $U=59$ ,  $p=0,4705$ ), ETDS sem alvo e TINA com alvo ( $U=43$ ,  $p=0,0999$ ), e ETDS com alvo e TINA sem alvo ( $U=75$ ,  $p=0,8852$ ). A figura 15A mostra o efeito do ETDS sob o tempo na zona de interação para camundongos machos de 21-31 DPN.

##### **5.2.1.1.2 Zona de afastamento**

Foram considerados dois fatores para a análise do tempo gasto na zona de afastamento: condição (F1; TINA ou ETDS) e sessão (F2; sem alvo, com alvo). Os resultados do teste de Shapiro-Wilk indicam que os grupos TINA sem alvo ( $p = 0,251$ ), ETDS sem alvo ( $p = 1,000$ ) e ETDS com alvo ( $p = 0,079$ ) seguem uma distribuição normal, enquanto o grupo e TINA com alvo ( $p = 0,048$ ) não segue uma distribuição normal. Portanto, foram aplicados testes não paramétricos para a análise estatística.

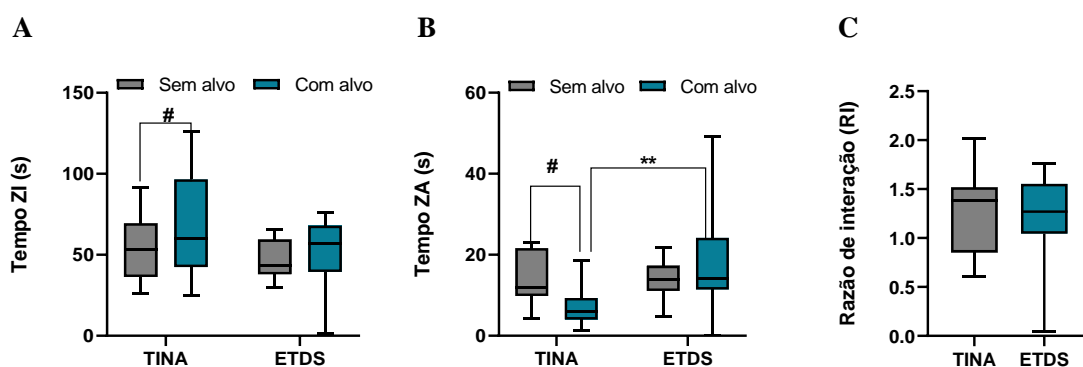
Foi realizada uma ANOVA não paramétrica de medidas repetidas utilizando o teste de Friedman para a análise dos dados. Os resultados indicaram uma diferença significativa entre F1 e F2 ( $\chi^2(3)= 11,218$ ,  $p=0,011$ ). Testes post-hoc foram conduzidos usando o teste de Wilcoxon Signed-Rank para comparações pareadas dentro dos

grupos TINA e ETDS, revelando diferenças significativas entre TINA sem alvo e TINA com alvo ( $Z=-2.904$ ,  $p=0,004$ ), no entanto não mostrou diferença entre ETDS sem alvo e ETDS com alvo ( $Z=-1.098$ ,  $p=0,272$ ). Para comparações independentes entre F1 e F2 foi aplicado o teste de Mann-Whitney. Os resultados mostraram diferenças significativas entre ETDS com alvo e TINA com alvo ( $U=4.0$ ,  $p=0,007$ ), ETDS sem alvo e TINA com alvo ( $U=2.0$ ,  $p=0,013$ ), e diferenças não significativas para ETDS sem alvo e TINA sem alvo ( $U=9.0$ ,  $p=0,954$ ), ETDS com alvo e TINA sem alvo ( $U=18.0$ ,  $p=0,248$ ). A figura 15B mostra o efeito do ETDS sob o tempo na zona de afastamento para camundongos machos de 21-31 DPN.

### 5.2.1.1.3 Razão de interação

A normalidade dos dados foi avaliada através do teste de Shapiro-Wilk, os resultados indicam que o grupo TINA ( $p = 0,650$ ) segue uma distribuição normal. Porém, o grupo ETDS ( $p = 0,029$ ) não tem distribuição normal. A homogeneidade das variâncias foi verificada utilizando o teste de Levene, que mostrou que as variâncias dos dois grupos são homogêneas ( $p = 0,760$ ). Com base nisso, foi aplicado o teste de Mann-Whitney para dados no paramétricos de amostras independentes. Os resultados não revelaram diferença estatisticamente significativa entre o grupo TINA e ETDS ( $W = 78000$ ,  $p=0,751$ ). (Figura 15C).

**Figura 15.** Efeito do ETDS sob comportamentos de interação social no TIS em machos de 21-31 DPN. Tamanho das amostras: TINA ( $n = 12$ ), ETDS ( $n = 12$ ). # diferenças significativas na condição INA sem alvo comparada com INA com alvo ZI e ZA, \*\*p diferenças significativas na condição ETDS com alvo comparada com INA com alvo na ZA. A). Tempo gasto na zona de interação (s). B) Tempo gasto na zona de afastamento (s). C) Razão de interação (Razão de Interação (RI)=tempo na zona de Interação sem alvo/tempo na zona de interação com alvo). As caixas representam o intervalo interquartil (Q1 a Q3), e as linhas horizontais dentro das caixas representam a mediana, os bigodes se estendem aos valores mínimos e máximos.



Fonte: Elaboração própria.

## **5.2.1.2 Fêmeas**

### **5.2.1.2.1 Zona de interação**

Foi realizada uma análise de variância de medidas repetidas de dois fatores, condição (F1; TINA ou ETDS) e sessão (F2, sem alvo, com alvo). Todos os dados tiveram uma distribuição normal no teste de Shapiro-Wilk e homogeneidade de variâncias no teste de Levene. Os resultados indicaram que não houve interação significativa entre F1 e F2 ( $P = 0,152$ ), o fator condição por si só não foi significativo ( $P = 0,807$ ), e também não houve um efeito significativo da sessão ( $P = 0,168$ ). A figura 16A mostra o efeito do ETDS sob o tempo na zona de interação para camundongos fêmeas de 21-31 DPN.

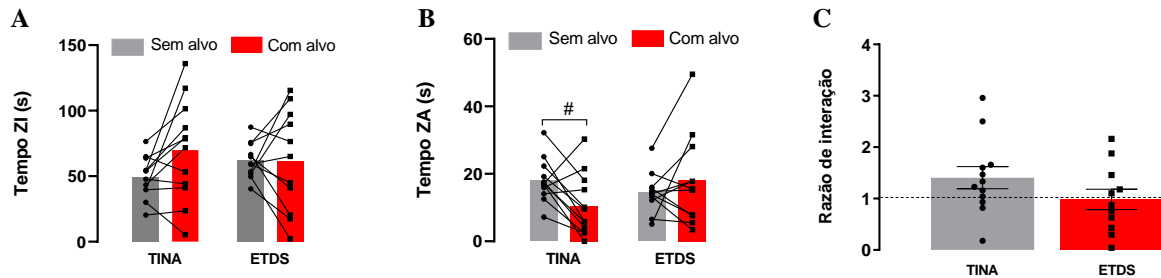
### **5.2.1.2.2 Zona de afastamento**

Foi realizada uma análise de variância de medidas repetidas de dois fatores, condição (F1; TINA ou ETDS) e sessão (F2, sem alvo, com alvo). Todos os dados tiveram uma distribuição normal no teste de Shapiro-Wilk e homogeneidade de variâncias no teste de Levene. Os resultados indicaram que houve interação significativa entre F1 e F2 ( $P = 0,021$ ), o fator condição por si só não foi significativo ( $P = 0,522$ ), do mesmo jeito que a sessão ( $P = 0,399$ ) também não teve significância. O teste de múltiplas comparações de Sidak revelou uma diferença significativa entre "sem alvo" e "com alvo" para a condição TINA ( $P = 0,048$ ), mas não para ETDS ( $P = 0,467$ ). A figura 16B mostra o efeito do ETDS sob o tempo na zona de interação para camundongos fêmeas de 21-31 DPN.

### **5.2.1.2.3 Razão de interação**

A normalidade dos dados foi avaliada através do teste de Shapiro-Wilk, os resultados indicam que ambos os grupos TINA ( $p = 0,650$ ) e ETDS ( $p = 0,029$ ) seguem uma distribuição normal. A homogeneidade das variâncias foi verificada utilizando o teste de Levene, que mostrou que as variâncias dos dois grupos são homogêneas ( $p = 0,979$ ). Com base nisso, foi aplicado um teste t de amostras independentes. Os resultados não revelaram diferença estatisticamente significativa entre o grupo TINA e ETDS ( $t = 1,447$ ,  $p = 0,163$ ). A Figura 16C mostra o efeito do ETDS sob a razão de interação para camundongos fêmeas de 21-31 DPN.

**Figura 16.** Efeito do ETDS sob comportamentos de interação social no TIS em fêmeas de 21-31 DPN. Tamanho das amostras: TINA (n = 12), ETDS (n = 11). # diferenças significativas na condição TINA sem alvo compara com TINA com alvo na ZA. A). Tempo gasto na zona de interação (s). B) Tempo gasto na zona de afastamento. C) Razão de interação (Razão de Interação (RI)=tempo na zona de Interação sem alvo/tempo na zona de interação com alvo). As barras representam a média e pontos de dispersão de cada um dos grupos ( $\pm$ EPM).



Fonte: Elaboração própria.

## 5.2.2.1 Machos

### 5.2.2.1.1 Entradas em braços fechados

A normalidade dos dados foi verificada utilizando o teste de Shapiro-Wilk, com os resultados indicando que ambos os grupos, TINA ( $p = 0.6781$ ) e ETDS ( $p = 0.7953$ ), seguem uma distribuição normal. A homogeneidade das variâncias foi analisada utilizando o teste de Levene, que mostrou que as variâncias dos dois grupos são homogêneas ( $p = 0,8237$ ). Foi aplicado o teste t de Student, que não revelou diferença estatisticamente significativa entre as médias dos grupos TINA ( $M = 16,55$ ) e ETDS ( $M = 19,45$ ),  $t = 0,9400$ ,  $p = 0,3584$ . A figura 17A mostra a ausência de efeitos do ETDS em camundongos machos de 21-31 DPN no número de entradas nos braços fechados do Labirinto em Cruz Elevado (LCE).

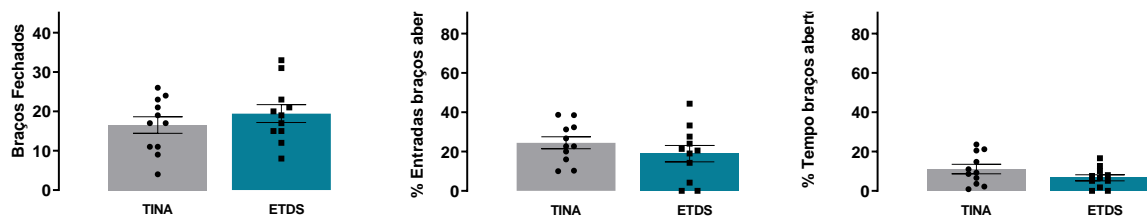
### 5.2.2.1.2 % Entradas em braços abertos

A normalidade dos dados foi verificada utilizando o teste de Shapiro-Wilk, com os resultados mostrando que ambos os grupos, TINA ( $p = 0.5429$ ) e ETDS ( $p = 0.9338$ ), seguem uma distribuição normal. A homogeneidade das variâncias foi analisada com o teste de Levene, que indicou que as variâncias dos dois grupos são homogêneas ( $p = 0.3348$ ). Aplicou-se o teste t de Student, que não revelou diferença estatisticamente significativa entre as médias dos grupos TINA ( $M = 24,48$ ) e ETDS ( $M = 18,97$ ),  $t = 1.065$ ,  $p = 0.2994$ . Portanto, o efeito do ETDS em camundongos machos de 21-31 DPN não mostrou diferenças significativas na porcentagem de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (figura 17B).

### 5.2.2.1.3 % Tempo em braços abertos

A normalidade dos dados foi avaliada utilizando o teste de Shapiro-Wilk, com os resultados indicando que ambos os grupos, TINA ( $p = 0.3927$ ) e ETDS ( $p = 0.7149$ ), seguem uma distribuição normal. A homogeneidade das variâncias foi verificada através do teste de Levene, que mostrou que as variâncias dos dois grupos são homogêneas ( $p = 0.1923$ ). Foi aplicado o teste t de Student, que não revelou diferença estatisticamente significativa entre as médias dos grupos TINA ( $M = 11,12$ ) e ETDS ( $M = 6,691$ ),  $t = 1,551$ ,  $p = 0,1366$ . Portanto, o efeito do ETDS em camundongos machos de 21-31 DPN não mostrou diferenças significativas na porcentagem de tempo nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (Figura 17C).

**Figura 17.** Ausência de efeitos do ETDS sob comportamentos relacionados com ansiedade no labirinto em cruz elevado (LCE) em camundongos machos de 21-31 DPN. Tamanho das amostras: TINA ( $n = 11$ ), ETDS ( $n = 11$ ). As barras representam a média e pontos de dispersão de cada um dos grupos ( $\pm$ EPM). A) número de entradas nos braços fechados, B) porcentagem de entradas nos braços abertos, C) porcentagem de tempo nos braços abertos.



Fonte: Elaboração própria.

## 5.2.2.2 Fêmeas

### 5.2.2.2.1 Entradas braços fechados

A normalidade dos dados verificada utilizando o teste de Shapiro-Wilk, com os resultados indicando que ambos os grupos, TINA ( $p = 0.3445$ ) e ETDS ( $p = 0.3055$ ), seguem uma distribuição normal. A homogeneidade das variâncias foi analisada utilizando o teste de Levene, que revelou que as variâncias dos dois grupos são homogêneas ( $p = 0.3536$ ). Foi aplicado o teste t de Student, que revelou uma diferença estatisticamente significativa entre as médias dos grupos TINA ( $M = 21,92$ ) e ETDS ( $M = 16,00$ ),  $t = 2,103$ ,  $p = 0,0471$ . Portanto, o efeito do ETDS em camundongos fêmeas de 21-31 DPN mostrou uma diferença significativa no número de entradas nos braços fechados do labirinto em cruz elevado (Figura 18A).

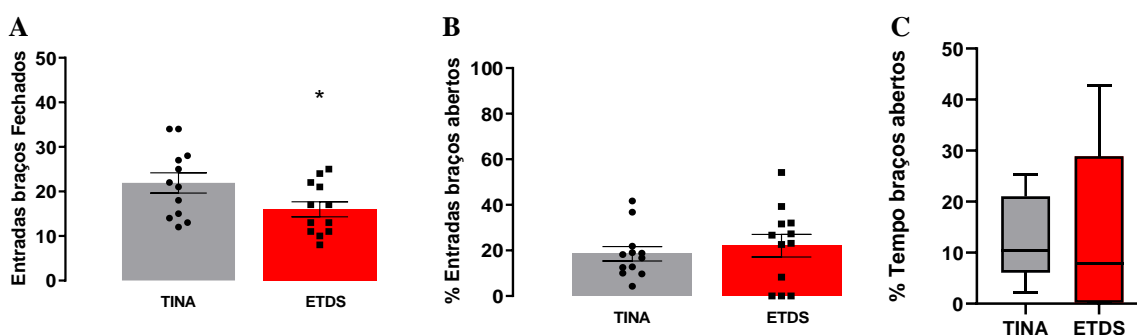
### 5.2.2.2.2 % entradas em braços abertos

A normalidade dos dados foi verificada utilizando o teste de Shapiro-Wilk, com os resultados indicando que ambos os grupos, TINA ( $p = 0.0852$ ) e ETDS ( $p = 0.3052$ ), seguem uma distribuição normal. A homogeneidade das variâncias foi analisada utilizando o teste de Levene, que revelou que as variâncias dos dois grupos são homogêneas ( $p = 0.1507$ ). Foi aplicado o teste t de Student, que não revelou diferença estatisticamente significativa entre as médias dos grupos TINA ( $M = 18,53$ ) e ETDS ( $M = 22,09$ ),  $t = 0,6076$ ,  $p = 0,5497$ . Portanto, o efeito do ETDS em camundongos fêmeas de 21-31 DPN não apresentou diferenças significativas na porcentagem de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (Figura 18B).

### 5.2.2.2.3 % tempo braços abertos

Foi avaliada a normalidade dos dados utilizando o teste de Shapiro-Wilk, os resultados indicam que o grupo TINA segue uma distribuição normal ( $p = 0.3051$ ), enquanto o grupo ETDS não segue uma distribuição normal ( $p = 0.0212$ ). A homogeneidade das variâncias foi verificada através do teste de Levene, que mostrou que as variâncias dos dois grupos não são homogêneas ( $p = 0.0394$ ). Devido à não normalidade dos dados do grupo TINA e à heterogeneidade das variâncias, foi aplicado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Os resultados revelaram que não há diferenças significativas entre TINA e ETDS,  $W = 72000$  e  $p = 0,735$ . Portanto, o efeito do ETDS em camundongos fêmeas de 21-31 DPN não apresentou diferenças significativas na porcentagem de tempo gasto nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (Figura 18B).

**Figura 18.** Efeito do ETDS sob comportamentos relacionados com ansiedade no labirinto em cruz elevado (LCE) em camundongos fêmeas de 21-31 DPN. \* $p = 0,0471$  em comparação com o grupo TINA. Tamanho das amostras: TINA ( $n = 12$ ), ETDS ( $n = 12$ ). A) número de entradas nos braços fechados, B) porcentagem de entradas nos braços abertos. As barras representam a média e pontos de dispersão de cada um dos grupos ( $\pm$ EPM). C) porcentagem de tempo nos braços abertos. As caixas representam o intervalo interquartil (Q1 a Q3), e as linhas horizontais dentro das caixas representam a mediana, os bigodes se estendem aos valores mínimos e máximos.



Fonte: Elaboração própria.

### **5.2.3 Campo aberto (CA)**

#### **5.2.3.1 Machos**

##### **5.2.3.1.1 Tempo no centro**

A normalidade dos dados foi verificada utilizando o teste de Shapiro-Wilk, com os resultados indicando que o grupo TINA ( $p = 0.915$ ), e o grupo ETDS ( $p = 0.536$ ) seguem uma distribuição normal. A homogeneidade das variâncias foi avaliada pelo teste de Levene, que mostrou que as variâncias dos dois grupos são homogêneas ( $p = 0.056$ ). Foi feito um teste t de amostras independentes. Os resultados revelaram uma diferença estatisticamente significativa entre as médias dos grupos TINA ( $M = 8,727$ ) e ETDS ( $M = 15,64$ ), com  $t = -2.2688$  e  $p = 0,012$ , indicando que a variação do tempo gasto no centro no campo aberto (CA) de camundongos machos de 21-31 DPN pode estar influenciada devido à exposição precoce ao ETDS (ver figura 18A).

##### **5.2.3.1.2 Distância no centro**

A normalidade dos dados foi avaliada utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Os resultados indicaram que ambos grupos, TINA ( $p = 0,429$ ) e ETDS ( $p = 0,529$ ), seguem uma distribuição normal. A homogeneidade das variâncias foi analisada pelo teste de Levene, que indicou que as variâncias dos dois grupos são homogêneas ( $p = 0,311$ ). Foi realizado um teste t de amostras independentes, o qual indicou uma tendência de significância entre os grupos TINA ( $M = 1,421$ ) e ETDS ( $M = 1,507$ ),  $t = 1,853$ ,  $p = 0,078$ . O efeito do ETDS em camundongos machos de 21-31 dias DPN na distância no centro do campo aberto (CA) é representado na figura 18B.

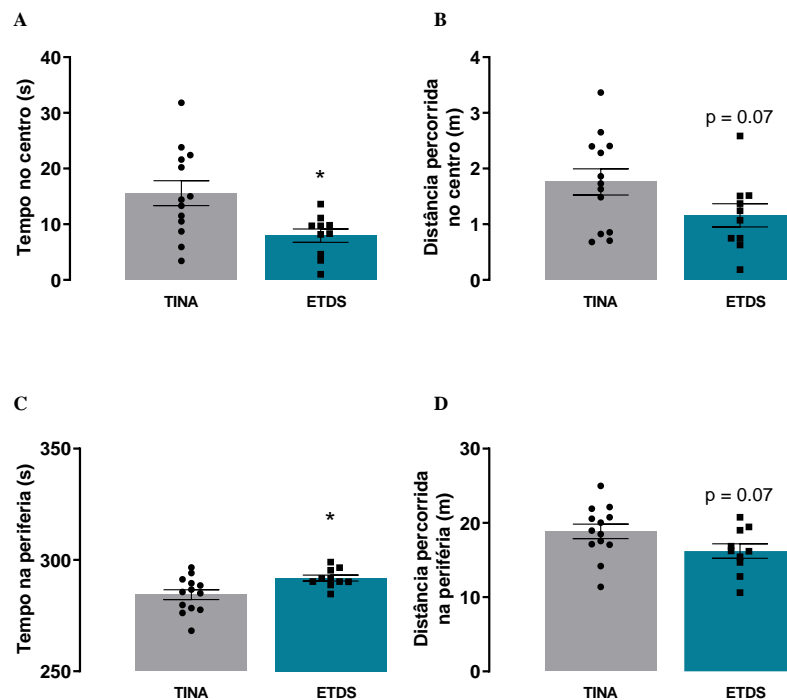
##### **5.2.3.1.3 Tempo na periferia**

A normalidade dos dados foi verificada utilizando o teste de Shapiro-Wilk, com os resultados indicando que o grupo TINA ( $p = 0.915$ ), e o grupo ETDS ( $p = 0.712$ ) seguem uma distribuição normal. A homogeneidade das variâncias foi avaliada pelo teste de Levene, que mostrou que as variâncias dos dois grupos não são homogêneas ( $p = 0,043$ ). Foi feito um teste t de amostras independentes com correção de Welch. Os resultados revelaram uma diferença estatisticamente significativa entre as médias dos grupos TINA ( $M = 284,42$ ) e ETDS ( $M = 291,87$ ), com  $t = -2.885$  e  $p = 0,010$ , indicando que a variação do tempo gasto na periferia no campo aberto (CA) de camundongos machos de 21-31 DPN pode estar influenciada devido à exposição precoce ao ETDS (ver figura 18C).

### 5.2.3.1.4 Distância percorrida na periferia

A normalidade dos dados foi verificada utilizando o teste de Shapiro-Wilk, com os resultados indicando que ambos os grupos, TINA ( $p = 0,9317$ ) e ETDS ( $p = 0,9273$ ), seguem uma distribuição normal. A homogeneidade das variâncias foi avaliada pelo teste de Levene, que mostrou que as variâncias dos dois grupos são homogêneas ( $p = 0,6851$ ). Foi aplicado o teste t de Student, os resultados indicam uma tendência de significância entre as médias dos grupos TINA ( $M = 18,86$ ) e ETDS ( $M = 16,20$ ),  $t = 1,882$ ,  $p = 0,0737$ . Isso pode sugerir um efeito do ETDS em camundongos machos de 21-31 DPN na distância percorrida na periferia no teste do campo aberto (CA) (ver

1 **Figura 18.** Efeito do ETDS sob comportamentos relacionados com ansiedade no campo aberto (CA) em camundongos machos de 21-31 DPN. \* $p = 0,012$ ,  $0,010$  significa significância estatística com o grupo TINA.  $p = 0,07$  representa tendência de significância em comparação com o grupo TINA. Tamanho das amostras: TINA ( $n = 13$ ), ETDS ( $n = 10$ ). As barras representam a média e pontos de dispersão de cada um dos grupos ( $\pm$ EPM). A) tempo no centro (s) B) distância percorrida no centro (m), C) tempo na periferia (s), D) distância percorrida na periferia (m).



Fonte: Elaboração própria.

### 5.2.3.2 Fêmeas

#### 5.2.3.2.1 Tempo no centro

A normalidade dos dados foi verificada utilizando o teste de Shapiro-Wilk, com os resultados indicando que o grupo TINA não segue uma distribuição normal ( $p = 0,021$ ), enquanto o grupo ETDS segue uma distribuição normal ( $p = 0,572$ ). A

homogeneidade das variâncias foi avaliada pelo teste de Levene, que mostrou que as variâncias dos dois grupos não são homogêneas ( $p = 0,0375$ ). Devido à não normalidade dos dados do grupo TINA e à heterogeneidade das variâncias, foi aplicado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Os resultados revelaram uma tendência de significância no tempo no centro no teste de campo aberto (CA) entre as medianas dos grupos TINA e ETDS, com  $W = 36,500$  e  $p = 0,074$  de camundongos fêmeas de 21-31 DPN expostos ao ETDS (Figura 19A).

#### **5.2.3.2.2 Distância no centro**

A normalidade dos dados foi avaliada utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Os resultados indicaram que ambos grupos, TINA ( $p = 0,508$ ) e ETDS ( $p = 0,363$ ), seguem uma distribuição normal. A homogeneidade das variâncias foi analisada pelo teste de Levene, que indicou que as variâncias dos dois grupos não são homogêneas ( $p = 0,015$ ). Devido à ausência de homogeneidade nas variâncias foi realizado um teste t de amostras independentes com correção de Welch, o qual indicou uma diferença significativa entre os grupos TINA ( $M = 1,117$ ) e ETDS ( $M = 1,819$ ),  $t = -2,660$ ,  $p = 0,016$ . O efeito do ETDS em camundongos fêmeas de 21-31 dias DPN na distância no centro do campo aberto (CA) é representado na figura 19B.

#### **5.2.3.2.3 Tempo na periferia**

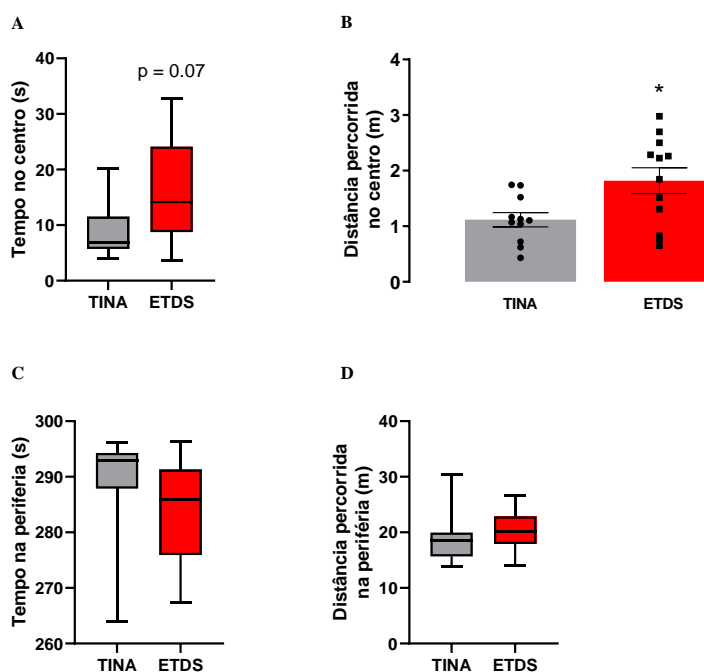
A normalidade dos dados foi verificada utilizando o teste de Shapiro-Wilk, com os resultados indicando que o grupo TINA não segue uma distribuição normal ( $p = 0,001$ ), enquanto o grupo ETDS segue uma distribuição normal ( $p = 0,572$ ). A homogeneidade das variâncias foi avaliada pelo teste de Levene, que mostrou que as variâncias dos dois grupos são homogêneas ( $p = 0,535$ ). Devido à não normalidade dos dados do grupo TINA, foi aplicado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Os resultados revelaram que não há diferença significativa no tempo na periferia no teste de campo aberto (CA) entre os grupos TINA e ETDS, com  $W = 95,500$  e  $p = 0,184$  de camundongos fêmeas de 21-31 DPN expostos ao ETDS (Figura 19C).

#### **5.2.3.2.4 Distância percorrida na periferia**

Foi verificada a normalidade dos dados utilizando o teste de Shapiro-Wilk, os resultados indicam que o grupo TINA não segue uma distribuição normal ( $p = 0,027$ ), enquanto o grupo ETDS segue uma distribuição normal ( $p = 0,991$ ). A homogeneidade das variâncias foi avaliada pelo teste de Levene, que mostrou que as variâncias dos dois grupos são homogêneas ( $p = 0,8324$ ). Devido à não normalidade dos dados do grupo TINA, foi aplicado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Os resultados não

revelaram diferença estatisticamente significativa entre as medianas dos grupos TINA e ETDS, com  $W = 49000$  e  $p = 0,316$  de camundongos fêmeas de 21-31 DPN expostos ao ETDS na distância percorrida na periferia do campo aberto (CA) (Figura 19D).

**Figura 19.** Efeito do ETDS sob comportamentos relacionados com ansiedade no campo aberto (CA) em fêmeas de -21-31 DPN. Tamanho das amostras: TINA ( $n = 13$ ), ETDS ( $n = 10$ ). \* $p = 0,016$  significa significância estatística com o grupo TINA.  $p = 0,07$  representa tendência de significância em comparação com o grupo TINA. A) Tempo no centro (s). B) Distância percorrida no centro (m). As barras representam a média e pontos de dispersão de cada um dos grupos ( $\pm$ EPM). C) Tempo na periferia. D) Distância percorrida na periferia (m). As caixas representam o intervalo interquartil (Q1 a Q3), e as linhas horizontais dentro das caixas representam a mediana, os bigodes se estendem aos valores mínimos e máximos.



Fonte: Elaboração própria.

## 6 DISCUSSÃO

Neste estudo, explorou-se as respostas comportamentais relacionadas à ansiedade em camundongos machos e fêmeas expostos ao modelo de estresse de testemunho de derrota social (ETDS) em fases de desenvolvimento precoce (21-31 dias pós-natal - DPN) e tardia (56-70 DPN). Para isso, foram conduzidos dois experimentos distintos para avaliar como essas fases de desenvolvimento influenciam as respostas a estressores sociais. No primeiro experimento, camundongos adultos jovens foram submetidos a 10 dias de ETDS ou a um protocolo de interação não agressiva (TINA) e posteriormente avaliados por meio de testes comportamentais, como o teste de interação social (TIS), labirinto em cruz elevado (LCE) e campo aberto

(CA). No segundo experimento, investigamos os efeitos tardios do ETDS precoce em camundongos expostos ao estresse entre 21-31 DPN, seguido por um período de recuperação de 29 dias, antes de serem submetidos a uma sessão de gatilho e aos mesmos testes comportamentais. A análise dos dados revelou diferenças dependentes da idade e do sexo nas respostas aos testes comportamentais, fornecendo insights sobre a resiliência e os mecanismos adaptativos dos camundongos em resposta ao estresse social.

A exposição ao modelo de estresse de testemunho de derrota social (ETDS) em camundongos machos e fêmeas de 56-70 DPN (experimento 1) mostrou diferenças dependentes do sexo nas medidas de interação social no TIS. Somente os machos do grupo controle mostraram maior interação social na presença de um alvo, enquanto apenas as fêmeas expostas ao ETDS demonstraram um aumento na interação social. Os dados são paralelos aos achados no estudo Navarrete *et al.* (2024), onde camundongos machos e fêmeas que foram expostos ao estresse de testemunho de derrota social, mostraram resultados diferenciais para cada sexo sob comportamentos sociais. As fêmeas mostraram maior busca de recompensa e motivação social após o ETDS em testes de autoadministração social, o que não ocorreu com os machos, que não tiveram diferenças significativas em nenhuma das condições avaliadas de caráter social.

Especificamente, os resultados desta pesquisa ressaltam que machos que não passaram pelo estresse (grupo controle/TINA) mostraram uma diferença significativa na zona de interação entre as sessões sem alvo e com alvo, indicando que os machos do grupo TINA gastam mais tempo na zona de interação social na presença de um animal desconhecido. Esses resultados podem ser explicados pelos comportamentos inatos de curiosidade e exploração que os roedores machos exibem em ambientes naturais, interagindo com novos animais para estabelecer hierarquias sociais, procurar parceiros reprodutivos, afirmar seu domínio social e obter suporte social (Bicks *et al.*, 2015; Casarrubea *et al.*, 2023). Essas interações são cruciais para a sobrevivência e coesão social; a expressão desses comportamentos pode variar em função da idade, fatores genéticos/ambientais e experiências de estresse (Carnevali *et al.*, 2020). Assim, os animais do grupo TINA que não passaram pelo ETDS parecem exibir um comportamento biologicamente relevante.

As fêmeas (56-70 DPN) mostraram resultados contraditórios com os machos no TIS, indicando que o grupo que foi exposto a testemunhar as derrotas (ETDS),

passou mais tempo na zona de interação quando o alvo estava presente (agressor desconhecido), isso em comparação com o grupo controle (TINA). Estudos recentes indicam que a exposição a estresse social pode induzir um estado de hipervigilância em fêmeas, representado por comportamentos de curiosidade e exploração para avaliar e se adaptar ao ambiente ameaçador (Iñiguez *et al.*, 2018; Warren *et al.*, 2013; Navarrete *et al.*, 2024). Nesse sentido, as fêmeas que experimentam estresse ao presenciar situações de derrota social podem ajustar seu comportamento para lidar com as ameaças percebidas. Esse ajuste, amplificado pelo contágio emocional dos machos derrotados, resulta em uma maior busca por recompensas sociais e maior motivação. Isso ocorre porque a percepção sensorial de uma ameaça sem perigo real subsequente cria um estado contínuo de antecipação ao perigo, levando a mecanismos de enfrentamento diferentes daqueles observados na derrota crônica em fêmeas e machos (Navarrete *et al.*, 2024; Keysers; Gazzola, 2021).

A ausência de diferenças significativas em outras medidas pode ser atribuída à complexidade do comportamento social e à especificidade da resposta ao estresse (Hariri; Holmes, 2015). O comportamento social é multifacetado e pode não ser completamente capturado por uma única medida (Joëls; Baram, 2009). As respostas ao estresse podem ser específicas a certas situações ou contextos, e as fêmeas podem ter desenvolvido mecanismos específicos de resiliência e adaptação que se manifestam mais claramente em determinadas condições experimentais (Kloet; Joëls; Holsboer, 2005). Além disso, a percepção do estresse varia entre indivíduos devido a fatores intrínsecos ao estímulo estressante (como duração e intensidade) e intrínsecos ao indivíduo (como idade, sexo, genética e experiências passadas) (Ellis; Jackson; Boyce, 2006; Novais *et al.*, 2017). Essa variabilidade individual pode explicar por que as outras medidas não apresentaram diferenças significativas, já que a mesma condição estressante pode ser percebida de maneiras diferentes por cada animal (Navarrete *et al.*, 2024). A resposta aos eventos estressantes é heterogênea e sustenta um amplo espectro de mudanças distintas entre os indivíduos expostos ao estresse. Vários fatores podem estar subjacentes a uma percepção diferente dos estressores e ao estabelecimento de estratégias de enfrentamento distintas, levando a diferenças individuais na suscetibilidade ou resistência ao estresse (Novais *et al.*, 2017).

Os resultados do experimento 1 mostraram que camundongos machos e fêmeas de 56-70 DPN expostos ao um protocolo estresse de testemunho de derrota

social (ETDS) por 10 dias não apresentaram diferenças significativas comparados com o grupo controle exposto a um protocolo de interação não agressiva (TINA) em nenhuma das medidas espaço-temporais convencionais do labirinto em cruz elevado (LCE), o mesmo ocorreu nas medidas analisadas no campo aberto (CA). A ausência de diferenças significativas nas medidas do LCE e do CA pode ser explicada por vários fatores. Primeiro, os camundongos de 56-70 DPN estão em uma fase de desenvolvimento onde o sistema neural é mais maduro e possivelmente mais resiliente aos efeitos do estresse. A plasticidade cerebral é menor comparada a camundongos mais jovens, o que pode reduzir a sensibilidade às mudanças comportamentais induzidas pelo estresse (Schneider, 2013; Premachandran *et al.*, 2020). Além disso, as medidas convencionais de tempo nos braços abertos e fechados do LCE e no centro e na periferia do CA podem não ser suficientemente sensíveis para detectar mudanças sutis na ansiedade. Análises mais detalhadas dos comportamentos, como micro-movimentos ou medidas fisiológicas adicionais, poderiam oferecer mais insights (File; Hyde, 1978; Choleris *et al.*, 2001). Essas medidas poderiam revelar mudanças que não são capturadas pelas abordagens tradicionais. Além disso, o protocolo de ETDS utilizado pode não ter sido suficientemente intenso ou prolongado para induzir alterações comportamentais detectáveis nessas medidas específicas, como sugerido por estudos anteriores que enfatizam a importância da intensidade e duração do estresse para a manifestação de comportamentos relacionados à ansiedade (Carnevali *et al.*, 2017; Willner, 1991).

O efeito do ETDS foi diferenciado dependendo da idade e do sexo dos animais. camundongos machos de 21-31 DPN do grupo controle (TINA) passaram mais tempo na zona de interação (ZI) quando o alvo estava presente, em comparação com eles mesmos na sessão sem alvo. Isso sugere que os machos que não passaram pelo estresse mostraram comportamentos inatos e espontâneos de caráter social que ocorrem naturalmente em seus habitats (Mineur; Belzung; Crusio, 2006). Além disso, o grupo TINA passou menos tempo na zona de afastamento (ZA) na presença do alvo, tanto em comparação com eles mesmos na condição sem alvo quanto em comparação com o grupo ETDS, que mostrou mais tempo gasto na ZA. Isso indica que o estresse social precoce aumenta a aversão social e a vigilância em machos. Esses achados apoiam os resultados de diversos estudos que observaram que machos submetidos a estresse social crônico demonstram maior vigilância e comportamento de esquiva em interações sociais (Golden *et al.*, 2011; Kovalenko *et*

*al.*, 2014). A falta de outras diferenças significativas pode ser atribuída ao fato de que o comportamento de vigilância social pode ser a resposta mais saliente ao estresse social em machos, com outros comportamentos sociais permanecendo inalterados (Kovalenko *et al.*, 2014).

Por outro lado, as fêmeas não mostraram diferenças significativas no TIS após o ETDS, mas as fêmeas do grupo controle (TINA) passaram menos tempo na ZA quando o alvo estava presente, sugerindo maior conforto social em condições sem estresse. Bangasser; Valentino (2014) enfatizaram que as diferenças sexuais em respostas ao estresse não são apenas hormonais, mas também refletem variações nos circuitos neurais envolvidos na regulação emocional e comportamental. Estas diferenças podem resultar em estratégias comportamentais distintas, com machos apresentando maior aversão social e fêmeas mostrando maior capacidade adaptativa em contextos sociais (Navarrete *et al.*, 2024). Nossos achados também vão ao encontro aos de Bartolomucci *et al.* (2009), que reportaram como o estresse social pode causar respostas diferentes em machos e fêmeas. A ausência de diferenças significativas em outros comportamentos sociais pode sugerir que as fêmeas possuem mecanismos compensatórios que mitigam os efeitos do estresse social em múltiplas dimensões de comportamento social (Nakatake, *et al.*, 2020).

Camundongos machos de 21-31 DPN não apresentaram diferenças significativas nas medidas do LCE, indicando uma possível resiliência ao estresse social em fases iniciais de desenvolvimento. Este resultado é consistente com os achados de Willner (1984), que também observou que a exposição a estresse crônico nem sempre resulta em comportamentos de ansiedade aumentada em machos. A ausência de diferenças significativas pode ser explicada pela capacidade dos machos de adaptarem-se rapidamente ao ambiente de teste ou pela natureza do estresse induzido, que pode não ter sido suficiente para provocar mudanças detectáveis em comportamento de ansiedade no LCE.

Por outro lado, camundongos fêmeas de 21-31 DPN expostas ao ETDS apresentaram um menor número de entradas em braços fechados, o que pode ser atribuído a um aumento na vigilância e cautela, refletindo um estado de alerta elevado. Patki *et al.* (2014) observaram que o estresse social pode levar a uma maior exploração seletiva em áreas seguras, enquanto Sial *et al.* (2016) demonstraram que o estresse vicário influencia a exploração de maneira diferenciada, não alterando a disposição de explorar áreas abertas, mas impactando a locomoção geral. Warren *et*

al. (2013) sugerem que comportamentos de enfrentamento e adaptação podem prevalecer em contextos de estresse de testemunho de social, o que pode explicar a falta de diferença na porcentagem de entradas nos braços abertos. Esses achados indicam que o ETDS tem um impacto seletivo e complexo no comportamento exploratório dos roedores, afetando mais fortemente a exploração de áreas consideradas seguras do que as ameaçadoras, gerando um possível prejuízo na locomoção dos animais.

No teste de campo aberto (CA), machos expostos ao ETDS de 21-31 dias pós-natal (DPN) exibiram maior tempo na periferia da arena e menor tempo no centro, refletindo uma resposta aumentada de ansiedade e comportamento de esquiva. Estes comportamentos são indicativos de uma estratégia conservadora frente a um ambiente potencialmente ameaçador. Diversos estudos encontraram que camundongos machos submetidos a estresse social crônico exibiram aumento na ansiedade, evidenciado por maior tempo gasto nas zonas periféricas do CA e maior vigilância (Golden *et al.*, 2011). Nossos resultados corroboram os encontrados por Kovalenko *et al.* (2019), que demonstraram que machos submetidos a um protocolo de estresse social apresentaram aumentos significativos em comportamentos de esquiva e relacionados com ansiedade.

Camundongos fêmeas, por outro lado, apresentaram um comportamento mais exploratório no CA, passando mais tempo e percorrendo uma maior distância no centro da arena após exposição ao ETDS. Este comportamento é consistente com as descobertas de Beery; Kaufer (2015), que indicam que fêmeas geralmente mostram maior resiliência e propensão à exploração em ambientes novos após experiências de estresse. Iñiguez *et al.* (2018) encontraram que fêmeas submetidas a um modelo de estresse de testemunho de derrota social exibiram maior exploração e menores níveis de ansiedade em comparação com machos. A resiliência das fêmeas pode estar relacionada a diferenças hormonais, como níveis elevados de estrogênio, que modulam a resposta ao estresse e promovem comportamentos de aproximação e exploração (Kokras; Dalla, 2014). A ausência de diferenças significativas em outras medidas do CA pode indicar que, embora a exploração aumentada seja notável, outros comportamentos de ansiedade não foram suficientemente afetados pelo ETDS para serem detectáveis.

Os resultados deste estudo contribuem significativamente para o entendimento das diferenças sexuais nas respostas ao estresse social, particularmente no contexto

do ETDS. A ausência de diferenças significativas nas medidas convencionais de ansiedade em camundongos mais velhos sugere uma possível resiliência ao estresse nesta fase de desenvolvimento (Seibenhener; Wooten, 2015). Por outro lado, as respostas diferenciadas de machos e fêmeas expostos ao ETDS precoce indicam que as experiências de estresse em fases críticas de desenvolvimento podem ter impactos duradouros e sexualmente dimórficos no comportamento social (Rosenfeld; Trainor, 2014; Carnevali *et al.*, 2020). Esses achados ressaltam a complexidade das respostas ao estresse social e a importância de considerar tanto a idade quanto o sexo ao investigar comportamentos relacionados à ansiedade.

Apesar das contribuições valiosas deste estudo, há limitações que devem ser consideradas. Primeiramente, as medidas comportamentais utilizadas podem não ser suficientemente sensíveis para detectar todas as nuances das respostas ao estresse no modelo de testemunho de derrota social, sugerindo a necessidade de análises mais detalhadas, como a avaliação de micro-movimentos ou padrões comportamentais mais complexos no labirinto em cruz elevado e o campo aberto (Gould *et al.*, 2018). Além disso, a inclusão de medidas neurológicas (imunohistoquímica para marcadores de neuroplasticidade e quantificação de neurônios em áreas específicas do cérebro) poderiam dar uma visão mais ampla dos possíveis efeitos do estresse comparando os resultados comportamentais e biológicos encontrados (Hariri; Holmes, 2015).

Adicionalmente, estudos longitudinais que acompanhem os efeitos do estresse social ao longo de diferentes fases de vida poderiam oferecer insights mais profundos sobre os mecanismos de resiliência e vulnerabilidade ao estresse social (Lyons *et al.*, 2023). Um fator importante que marcou os resultados desta pesquisa foi que a intensidade do estresse gerado pelo protocolo de ETDS pode não ter sido suficiente para induzir mudanças comportamentais detectáveis em algumas medidas relacionadas com ansiedade (LCE e CA), em comparação com modelos de estresse que parecem ser mais intensos, como o estresse físico resultante de derrota social ou o estresse crônico imprevisível ((Lehmann; Herkenham, 2011; Lotan *et al.*, 2018). Na atualidade, existem variações do modelo de ETDS que incluem alterações no protocolo: (i) dormindo com o agressor (Ródenas-González *et al.*, 2023), (ii) efeitos da familiaridade/contagio social (Sial *et al.*, 2021; Carnevali *et al.*, 2017), (iii) social buffering (Kikusui; Winslow; Mori, 2006; Li; Xu; Wang, 2018); que podem interferir na

intensidade do estresse percebido pelas testemunhas, resultando uma alternativa interessante para continuar o estudo dos efeitos ETDS.

## **7 CONCLUSÃO**

Este estudo destacou a complexidade das respostas ao estresse em camundongos, revelando como fatores como idade, sexo e intensidade do estressor influenciam esses comportamentos. Utilizando o modelo de estresse de testemunho de derrota social (ETDS), foi observado que camundongos jovens e adultos respondem de maneira diferente ao estresse, com machos demonstrando maior aversão social e comportamentos de esquiva, enquanto fêmeas exibem maior exploração e resiliência social. A eficácia do ETDS para estudar interações organismo-ambiente foi comprovada, embora as alterações comportamentais induzidas fossem menos intensas comparadas a outros modelos de estresse mais severos como estresse físico ou estresse imprevisível. Nossos resultados indicam que a intensidade do estressor é crucial para determinar as respostas comportamentais, com estressores menos intensos revelando diferenças sexuais mais marcantes, enquanto estressores mais intensos produzem fenótipos comportamentais mais homogêneos. Além disso, a inclusão de análises comportamentais mais detalhadas, medidas fisiológicas e neurológicas, poderia oferecer uma compreensão mais ampla dos efeitos do estresse. Em suma, as descobertas ressaltam a importância de considerar múltiplos fatores ao estudar o estresse, proporcionando insights valiosos para futuras pesquisas sobre o impacto do estresse social ao longo do desenvolvimento e entre os sexos, contribuindo para um entendimento mais abrangente das interações entre estresse, sexo, idade e ansiedade.

## REFERÊNCIAS

ADRIANI, W.; LAVIOLA, G. A unique hormonal and behavioral hyporesponsivity to both forced novelty and d-amphetamine in periadolescent mice.

**Neuropharmacology**, v. 39, n. 2, p. 334–346, 2000.

BABICOLA, L. *et al.* Long term effects of early life stress on HPA circuit in rodent models. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 521, 2021.

BANGASSER, D.; VALENTINO, R. Sex differences in stress-related psychiatric disorders: Neurobiological perspectives. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 35, n. 3, p. 303-319, 2014.

BALE, T.; EPPERSON, C. Sex differences and stress across the lifespan. **Nature Neuroscience**, v. 18, p. 1413-1420, 2015.

BARTOLOMUCCI, A. *et al.* Acute and Chronic Social Defeat: Stress Protocols and Behavioral Testing. **Neuromethods**, p. 261-275, 2009.

BEERY, A.; KAUFER, D. Stress, social behavior, and resilience: Insights from rodents. **Neurobiology of Stress**, v. 1, p. 116-127, 2015.

BICKS, L. *et al.* Prefrontal cortex and social cognition in mouse and man. **Frontiers in Psychology**, v. 6, p. 1805, 2015.

BIORENDER.COM. Editable Icons - Mouse Housing & Equipment. 2024a. Disponível em: <https://app.biorender.com/biorender-templates/figures/all/t-60d4939037fafb00a6888f04-editable-icons-mouse-housing->. Acesso em: 25 nov. 2024.

BIORENDER.COM. Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis. 2024b. Disponível em: <https://app.biorender.com/biorender-templates/figures/all/t-5dd99fd5e8baa5007f62ec3d-hypothalamic-pituitary-adrenal-axis>. Acesso em: 25 nov. 2024.

BIORENDER.COM. Mouse Maze Tests. 2024c. Disponível em: <https://app.biorender.com/biorender-templates/figures/all/t-5e5ad1d47701b800899607f1-mouse-maze-tests>. Acesso em: 25 nov. 2024.

BOYCE, W.; ELLIS, B. Biological sensitivity to context: I. An evolutionary–developmental theory of the origins and functions of stress reactivity. **Development and Psychopathology**, v. 17, p. 271-301, 2005.

GOULD, T.; DAO, D.; KOVACSICS, C. The open field test. Mood and anxiety related phenotypes in mice: Characterization using behavioral tests, **Neuromethods**, v. 42, p. 1-20. 2009

CARNEVALI, L. *et al.* The contagion of social defeat stress: Insights from rodent studies. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 111, n. January, p. 12– 18, 2020

CARNEVALI, L. *et al.* Social stress contagion in rats: Behavioural, autonomic and neuroendocrine correlates. **Psychoneuroendocrinology**, v. 82, p. 155-163, 2017.

CASARRUBEA, M. *et al.* The hole-board apparatus in the study of anxiety. **Physiology & Behavior**, v. 271, p. 114346. 2023

CHOLERIS, E. *et al.* A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 3, p. 235-260. 2001.

DOEWES, R.; GANGADHAR, L.; SUBBURAJ, S. An overview on stress neurobiology: Fundamental concepts and its consequences. **Neuroscience Informatics**, v. 1, n 3, p. 10001. 2021.

ELLIS, B.; JACKSON, J.; BOYCE, W. The stress response systems: Universality and adaptive individual differences. **Developmental Review**, v. 26, n. 2, p. 175-212, 2006.

FARIA, D.; LAVERDE, A.; NUNES-DE-SOUZA, R. The impacts of chronic stress on male and female mice behavior. **Neuroscience Research**, v. 50, p. 225-230, 2020.

FILE, S.; HYDE, J. Can social interaction be used to measure anxiety? **British Journal of Pharmacology**, v. 62, n. 1, p. 19-24, 1978.

FINNELL, E. *et al.* Essential role of ovarian hormones in susceptibility to the consequences of witnessing social defeat in female rats. **Biological psychiatry**, v. 84, n. 5, p. 372-382. 2018.

FONTES, M. *et al.* Neurogenic background for emotional stress-associated hypertension. **Current Hypertension Reports**, v. 25, n. 7, p. 107-116, 2023.

GLASER, R.; KIECOLT-GLASER, J. Stress-induced immune dysfunction: Implications for health. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, p. 243-251, 2005.

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

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat. **Journal of Comparative Psychology**, v. 18, p. 385-403, 1941.

HARIRI, A.; HOLMES, A. Finding translation in stress research. **Nature neuroscience**, 2015, vol. 18, no 10, p. 1347-1352.

HUHMANN, K. Social conflict models: Can they inform us about human psychopathology? **Hormones and Behavior**, v. 50, n. 4, p. 682-692, 2006.

IÑIGUEZ, S. *et al.* Vicarious Social Defeat Stress Induces Depression-Related Outcomes in Female Mice. **Biological Psychiatry**, v. 83, n. 1, p. 9-17, 2018.

INSTITUTE FOR HEALTH METRICS AND EVALUATION. GBD Results Tool. **Global Health Data Exchange**. Seattle: Institute for Health Metrics and Evaluation, 2019.

JOËLS, M.; BARAM, T. The neuro-symphony of stress. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, p. 459-466, 2009.

KEYSERS, C.; GAZZOLA, V. Emotional contagion: Improving survival by preparing for socially sensed threats. **Current Biology**, v. 31, n. 11, p. R728-R730, 2021.

KIKUSUI, T.; WINSLOW, J.; MORI, Y. Social buffering: relief from stress and anxiety. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 361, n. 1476, p. 2215-2228, 2006.

KLOET, E.; JOËLS, M.; HOLSBOER, F. Stress and the brain: From adaptation to disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 6, p. 463-475, 2005.

KOKRAS, N.; DALLA, C. Sex differences in animal models of psychiatric disorders. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, n. 20, p. 4595-4619, 2014.

KOVALENKO, I. *et al.* Extended effect of chronic social defeat stress in childhood on behaviors in adulthood. **PloS one**, v. 9, n. 3, p. e91762, 2014.

LAVIOLA, G. *et al.* Risk-taking behavior in adolescent mice: psychobiological determinants and early epigenetic influence. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 27, n. 1-2, p. 19-31, 2003.

LAZARUS, R.; FOLKMAN, S. Stress, Appraisal, and Coping. **New York: Springer**, 1984.

LEHMANN, M.; HERKENHAM, M. Environmental enrichment confers stress resiliency to social defeat through an infralimbic cortex-dependent neuroanatomical pathway. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 16, p. 6159-6173, 2011.

LI, M.; XU, H.; WANG, W. An improved model of physical and emotional social defeat: different effects on social behavior and body weight of adolescent mice by interaction with social support. **Frontiers in Psychiatry**, v. 9, p. 688, 2018.

LISTER, R. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 92, p. 180-185, 1987.

LOTAN, A. *et al.* Differential effects of chronic stress in young-adult and old female mice: cognitive-behavioral manifestations and neurobiological correlates. **Molecular Psychiatry**, v. 23, n. 6, p. 1432-1445, 2018.

LUINE, V. Animal Models in Neuroscience: A Focus on Stress. **The Palgrave Handbook of Occupational Stress**. p. 47-61. 2023

LYONS, D. *et al.* Ecological validity of social defeat stressors in mouse models of vulnerability and resilience. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, vol. 145, p. 105032. 2023.

MCEWEN, B. Protective and damaging effects of stress mediators. **New England Journal of Medicine**, v. 338, n. 3, p. 171-179, 1998.

MINEUR, Y.; BELZUNG, C.; CRUSIO, W. Effects of unpredictable chronic mild stress on anxiety and depression-like behavior in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 175, n. 1, p. 43-50, 2006.

MIKICS, É. *et al.* Behavioral specificity of non-genomic glucocorticoid effects in rats: Effects on risk assessment in the elevated plus-maze and the open-field. **Hormones and Behavior**, v. 48, p. 152-162, 2005.

MOBBS, D.; KIM, J. Neuroethological studies of fear, anxiety, and risky decision-making in rodents and humans. **Current opinion in behavioral sciences**, v. 5, p. 8-15. 2015.

NAKATAKE, Y. *et al.* The effects of emotional stress are not identical to those of physical stress in mouse model of social defeat stress. **Neuroscience research**, vol. 158, p. 56-63. 2020

NAVARRETE, J. *et al.* Individual differences in volitional social self-administration and motivation in male and female mice following social stress. **Biological psychiatry**, 2024.

NESTLER, E.; HYMAN, S. Animal models of neuropsychiatric disorders. **Nature neuroscience**, v. 13, n. 10, p. 1161-1169, 2010.

NOVAIS, A., *et al.* How age, sex and genotype shape the stress response. **Neurobiology of stress**, vol. 6, p. 44-56. 2017.

PALANZA, P. Animal models of anxiety and depression: How are females different? **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 25, p. 219-233, 2001.

PATKI, G.; SOLANKI, N.; SALIM, S. Witnessing traumatic events causes severe behavioral impairments in rats. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, vol. 17, no 12, p. 2017-2029. 2014.

PATKI, Gaurav, *et al.* Witnessing traumatic events and post-traumatic stress disorder: Insights from an animal model. **Neuroscience letters**, v. 600, p. 28-32. 2015.

PLANCHEZ, B; SURGET, A; BELZUNG, C. Animal models of major depression: drawbacks and challenges. **Journal of Neural Transmission**, v. 126, p. 1383-1408. 2019.

PREMACHANDRAN, H.; ZHAO, M.; ARRUDA-CARVALHO, M. Sex Differences in the Development of the Rodent Corticolimbic System. **Frontiers in Neuroscience**, v. 14, 2020.

RÓDENAS-GONZÁLEZ, F. *et al.* Vicarious social defeat increases conditioned rewarding effects of cocaine and ethanol intake in female mice. **Biomedicines**, v. 11, n. 502, 2023.

ROSENFELD, C.; TRAINOR, B. Environmental health factors and sexually dimorphic differences in behavioral disruptions. **Current Environmental Health Reports**, v. 1, p. 287-301, 2014.

SANTOS-COSTA, N, *et al.* Glutamatergic neurotransmission controls the functional lateralization of the mPFC in the modulation of anxiety induced by social defeat stress in male mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 2021, vol. 15, p. 695735. 2021.

SAPOLSKY, R. Stress and the brain: individual variability and the inverted-U. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 11, n. 1, p. 611-618, 2010.

SEIBENHENER, M. L.; WOOTEN, M. C. Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. **Journal of Visualized Experiments**, p. 52434, 2015.

SELYE, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. **Nature**, v. 138, p. 32, 1936.

SGOIFO, A.; CARNEVALI, L; GRIPPO, A. The socially stressed heart. Insights from studies in rodents. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 39, p. 51-60, 2014.

SIAL, Omar K., *et al.* Vicarious social defeat stress: Bridging the gap between physical and emotional stress. **Journal of neuroscience methods**, v. 258, p. 94-103. 2016

SIAL, O. *et al.* Exposure to vicarious social defeat stress and western-style diets during adolescence leads to physiological dysregulation, decreases in reward sensitivity, and reduced antidepressant efficacy in adulthood. **Frontiers in Neuroscience**, v. 15, 701919, 2021.

TAKAHASHI, A, *et al.* Aggression, social stress, and the immune system in humans and animal models. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 12, p. 338283. 2018

TIDEY, J.; MICZEK, K. Social defeat stress selectively alters mesocorticolimbic dopamine release: an in vivo microdialysis study. **Brain research**, v. 721, no 1-2, p. 140-149. 1996.

ULRICH-LAI, Y.; HERMAN, J. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 6, p. 397-409, 2009.

WARREN, B. *et al.* Neurobiological Sequelae of Witnessing Stressful Events in Adult Mice. **Biological Psychiatry**, v. 73, n. 1, p. 7–14. 2013.

WARREN, Brandon L., *et al.* Altered gene expression and spine density in nucleus accumbens of adolescent and adult male mice exposed to emotional and physical stress. **Developmental neuroscience**. v. 36, n. 3-4, p. 250-260. , 2014,

WARREN, B. *et al.* Can I Get a Witness? Using Vicarious Defeat Stress to Study Mood-Related Illnesses in Traditionally Understudied Populations. **Biological Psychiatry**, v. 88, n. 5, p. 381–391, 2020.

WILLNER, Paul. The validity of animal models of depression. **Psychopharmacology**, v. 83, p. 1-16, 1984.