

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

KATELLYN COSTA SILVA

**AVALIAÇÃO DO ESTRESSE PSICOSSOCIAL: IMPACTO DA NATUREZA DO
ESTRESSOR E DIFERENÇAS SEXUAIS NA RESPOSTA DE CORTICOSTERONA**

Araraquara

2026

KATELLYN COSTA SILVA

Avaliação do Estresse Psicossocial: Impacto da Natureza do Estressor e Diferenças Sexuais na Resposta de Corticosterona.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Farmacêutica.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza

Coorientador: Dr. Lucas Canto de Souza

Araraquara

2026

S586a Silva, Katellyn Costa.
Avaliação do estresse psicossocial: impacto da natureza do
estressor e diferenças sexuais na resposta de corticosterona /
Katellyn Costa Silva. – Araraquara, 2026.
52 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação – Farmácia) –
Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências
Farmacêuticas, Araraquara.

Orientador: Ricardo Luiz Nunes de Souza.
Coorientador: Lucas Canto de Souza.

1. Corticosterona. 2. Estresse por derrota social. 3. Estresse por
testemunho de derrota social. 4. Sexo – Diferenças. 5. Estresse
(Fisiologia). I. Souza, Ricardo Luiz Nunes de, orient. II. Souza,
Lucas Canto de, coorient. III. Título.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

O impacto esperado deste estudo se dá ao fornecer evidências sobre a dissociação funcional na regulação do eixo HHA frente a diferentes estressores (físicos/mistos vs. psicológicos) e demonstrar um dimorfismo sexual na reatividade neuroendócrina. Cultural e socialmente, a pesquisa ajuda a romper com o viés histórico na ciência ao incluir fêmeas nos ensaios, promovendo uma compreensão mais ampla de patologias relacionadas ao estresse que afetam as populações de forma desproporcional entre os sexos. Além disso, a elucidação de que estressores físicos e psicológicos desencadeiam respostas neuroendócrinas distintas inova ao direcionar a possibilidade de desenvolvimento de terapias mais específicas. Por fim, o trabalho dialoga com os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da ONU, destacando-se o ODS 3 (Saúde e Bem-Estar), ao buscar bases fisiológicas para mitigar transtornos psiquiátricos, e o ODS 5 (Igualdade de Gênero), garantindo que o conhecimento gerado atenda às necessidades biológicas de ambos os sexos.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

The expected impact of this study is achieved by providing evidence on the functional dissociation in HPA axis regulation in response to different stressors (physical/mixed vs. psychological) and demonstrating a sexual dimorphism in neuroendocrine reactivity. Culturally and socially, the research helps break the historical bias in science by including females in trials, promoting a broader understanding of stress-related pathologies that disproportionately affect populations across sexes. Furthermore, the elucidation that physical and psychological stressors trigger distinct neuroendocrine responses innovates by pointing toward the possibility of developing more specific therapies. Finally, the work aligns with the UN Sustainable Development Goals (SDGs), notably SDG 3 (Good Health and Well-being), by seeking physiological foundations to mitigate psychiatric disorders, and SDG 5 (Gender Equality), ensuring that the generated knowledge meets the biological needs of both sexes.

KATELLYN COSTA SILVA

**Avaliação do Estresse Psicossocial: Impacto da Natureza do Estressor e
Diferenças Sexuais na Resposta de Corticosterona**

Trabalho de conclusão de curso apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), UNESP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara, para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Data da defesa: 22/07/2026.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza
UNESP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

Prof. Dr. Lucas Gomes de Souza
UNESP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

Prof. Dr. Adrielly dos Santos
UNESP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

Gratidão, queridos pais, avós e demais ancestrais por terem tecido o meu caminho, pela imensidão dos seus sonhos que, de alguma forma são hoje a minha realidade. Dedico todo esforço realizado ao longo desse percurso àqueles que precisam construir do zero suas oportunidades. Que saibam que a conquista não é garantida, mas que nunca desistam de tentar alcançar seus sonhos e objetivos. Agarrem seus sonhos, pois o segredo é a persistência!

AGRADECIMENTOS

Deixo um agradecimento especial a todos os animais que foram fundamentais para este estudo; sem eles, nenhuma pergunta seria respondida. Honro, respeito e agradeço cada vida utilizada e desejo que tenham contribuído para um propósito maior de compreensão neurobiológica de patologias e promoção de saúde e bem-estar para seres humanos e animais.

A partir desse ponto, com muito amor, lanço luz sobre a tristeza das gerações passadas, sobre os nomes não ditos e sobre a enxada que cortou caminhos para tornar a nossa calçada mais fácil. A todas as memórias de limitação, semeio aqui uma nova esperança. Toda minha ancestralidade e guias se fizeram presentes para me tornar resiliente, com o sangue forte de um povo que resiste. Reconheço que cada conquista minha é a continuação de uma maratona iniciada por meus familiares, que deixaram a sua terra natal e enfrentaram a muita escassez para garantir nossa dignidade.

Agradeço carinhosamente a toda minha família, alicerce dos meus valores. Principalmente aos meus pais, Edite Maria da Costa e José Carlos Lima da Silva, que transformaram suas vidas em luta constante para que nada nos faltasse; e aos meus irmãos, Kamellyn Costa Silva e Francisco Kaslley Costa, por serem minha base e o motivo da minha persistência. Aos meus avós e tios, que batalharam na ausência de estrutura para fornecer um teto à nossa geração, sendo meus maiores exemplos de afeto e coragem. Registro também a influência da minha prima Thayna da Silva Sousa, por ter me apresentado a Universidade Pública e acreditado que eu ocuparia este lugar. Ao meu padraсто Maiktacio Fernandes Monteiro de Negreiros agradeço pelo suporte e incentivo para fazer o curso técnico de farmácia, foi um marco que me proporcionou identidade e oportunidade.

Registro nesse espaço a importância do papel dos movimentos sociais, instituições de democratização de ensino e cursinhos populares em ocupações de prédios e escolas públicas na grande São Paulo, que promoveram acesso à informação, ato de resistência e afirmação de direito. Aos professores que me deram luz e direção, aos que me doaram material de estudo e pessoas que me ajudaram no caminho. Também ao Instituto Eurofarma, Escola Técnica Sequencial, IOPEM e Cursinho da Poli pela bolsa de estudo. Sem essas vivências e oportunidades não alcançaria acesso a UNESP.

Reconheço também o papel do apoio da minha melhor amiga, Julia Cavalcante Alexandrino, no processo da minha conquista. E, com o coração cheio de saudade, dou ênfase ao meu grande amigo Gustavo Henrique Maximiano (*in memoriam*). Ele me recebeu em Araraquara, esteve na minha trajetória pela Unesp nos momentos mais difíceis e foi a pessoa que mais acreditou e me deu forças para não desistir. Gustavo, você sempre será lembrado em minhas recordações, pois sei o quanto queria estar aqui para acompanhar essa minha etapa.

Minha gratidão a todas as relações interpessoais que construí neste percurso; vocês tornaram a trajetória mais leve, me confortaram e estenderam a mão. Vocês são o registro vivo da minha história. Registro aqui as pessoas que caminharam lado a lado comigo: Stephany Ramires, Higor Souza, André Lucca Barbieri, Caio César Rosa, Ana Laura Ramos Dias, Mariana Thiele, Ana Claudia Dias Bragas, Natalia Uriel, Melissa Cavalcante, Abner Hussein, Gustavo Souza, Breno de Lima, Atila Parise, Thais Marques Silva e Karlla Boaventura.

Por me acolherem e me darem um lar, agradeço ao "Apê Top", à República Cobertura e à "Casinha KaJuIsa". Vocês me ensinaram sobre a vida, dividiram histórias e as melhores "focacas do bem". Às Repúblicas Diretoria, Várzea, Copacabana e Frapê, obrigada por me acolherem como parte da família e por tornarem minha estadia na "terrinha da laranja" tão especial e querida.

Agradeço imensamente à Faculdade de Ciências Farmacêuticas (professores, funcionários e técnicos), pelas oportunidades inimagináveis. À outros apoios essenciais como a Coordenadoria de Permanência Estudantil (COPE) e a Pró-reitoria de Extensão e Cultura (PROEC) que possibilitaram minha permanência e desenvolvimento na universidade. A Permanência Estudantil, o Unesp Presente e as Ações Afirmativas ressignificaram minha história. Fazer parte da Unesp mostrou que todo sacrifício valeu a pena, permitindo-me atuar em atividades de extensão, pesquisas e movimentos por equidade e inclusão. Essas portas abertas deram novo sentido à minha existência.

Em especial, agradeço aos professores Marcelo Tadeu Marin, Raquel Regina Duarte Moreira, André Gonzaga dos Santos, Patricia de Carvalho Mastroianni e outros docentes que foram muito mais que referências profissionais. Agradeço pela humanidade, sensibilidade e acolhimento nos meus momentos de maior fragilidade pessoal. O suporte de vocês foi o alicerce que me permitiu concluir este ciclo com integridade. À professora Raquel, minha gratidão se estende de forma singular, por ter se tornado uma grande amiga e uma aliada

indispensável nos movimentos de luta. Aos professores Paulo Ricardo Da Silva Sanches, Norival Alves Santos Filho, Leandro Martins, André Gonzaga dos Santos, Caio Perego e os mesmos citados nesse texto, agradeço pela oportunidade de vivências extensionistas que gerou uma enorme admiração pessoal e profissional.

Ao Laboratório de Neuropsicofarmacologia, não há palavras que mensurem minha gratidão. Mais do que um espaço de ciência, vocês me proporcionaram um ambiente seguro e de paz. O crescimento que tive em todas as esferas da vida, somado ao afeto recebido, me tornou uma pessoa melhor. Agradeço profundamente o esforço para garantir que eu sempre tivesse uma bolsa de pesquisa; foi esse suporte vital que me permitiu me manter durante os seis anos de graduação e viver o sonho de estar aqui. Vocês foram compreensivos, me ensinaram a não ter pressa e a respeitar o meu próprio tempo. Estar rodeada de pessoas tão grandiosas me inspira. Aos que mais me ensinaram e acreditaram em mim: Dra. Daniela Baptista de Souza, Dr. Lucas Canto de Souza, Prof. Dr. Gessynger Morais Silva, Me. Julian Humberto Avalo Zuluaga e meu orientador, Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza.

Por fim, agradeço a mim mesma. Por nunca desistir, por todas as noites não dormidas, pela malandragem e pela coragem de enfrentar o mundo. Agradeço por ter atravessado barreiras para conseguir estudar e acessar a universidade. Sei que este passo pode parecer pouco para o mundo, mas é o primeiro grande marco na minha história e significa muito para a trajetória da minha família.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brasil. Processo nº 2024/07540-5.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsas de pesquisa (processos 10796.9/2023, 6376.4/2022 e 3916.4/2021).

RESUMO

Modelos de estresse psicossocial, como a derrota social (EDS) e a testemunha de derrota social (ETDS), são paradigmas animais essenciais para investigar a neurobiologia dos transtornos de humor. No entanto, os efeitos hormonais subjacentes a esse fenômeno em relação ao sexo, tipo de estressor (físico/misto *vs.* psicológico) e duração (agudo *vs.* crônico) permanecem pouco claros, o que justifica o principal objetivo deste estudo. Para isso, camundongos *Swiss Webster* machos e fêmeas foram submetidos a protocolos de EDS ou ETDS agudo (1 dia) ou crônico (10 dias) para a análise dos níveis plasmáticos de corticosterona. Para avaliar a vulnerabilidade ao estresse crônico, o estudo também investigou um subgrupo dos animais cronicamente estressados e foi exposto a um novo estressor. Os níveis circulantes de corticosterona foram quantificados por ELISA. O EDS ativou potentemente o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), em contraste com o observado com o estressor de testemunha da derrota social (ETDS). Especificamente, a testemunha de derrota social, independentemente do sexo ou da frequência, não induziu alterações significativas nos níveis circulantes de corticosterona. Um dimorfismo sexual foi observado na resposta ao EDS, com machos exibindo uma significativa elevação de corticosterona em ambos os protocolos (agudo e crônico), enquanto em fêmeas o efeito observado foi de menor intensidade na exposição aguda, estando ausente no protocolo crônico. A exposição crônica ao EDS não alterou a reatividade a um novo estressor, enquanto o ETDS crônico seguido de um novo estressor revelou um efeito do sexo, com machos demonstrando maior reatividade (níveis mais elevados de corticosterona). Esses achados destacam que o tipo de estressor e o sexo são fatores determinantes para a resposta neuroendócrina, sugerindo mecanismos neuroendócrinos distintos para ameaças físicas e psicológicas.

Palavras-chave: níveis de corticosterona; EDS (estresse por derrota social); ETDS (estresse por testemunha de derrota social); diferenças sexuais.

ABSTRACT

Psychosocial stress models, such as social defeat stress (SDS) and witness social defeat stress (WSDS), are essential animal paradigms for investigating the neurobiology of emotional and affective disorders. Nevertheless, the influence of sex, type (physical vs. witnessed), and duration (acute vs. chronic) of stressors on the serum corticosterone (CORT) levels underlying this phenomenon remains unclear. To address this, male and female *Swiss Webster* mice were exposed to acute (1 day) or chronic (10 days) SDS or WSDS protocols. Additionally, to assess vulnerability to psychological stress, another group of chronically stressed animals of both sexes was exposed to a novel stressor (restraint stress) after the SDS or WSDS protocol. Serum CORT levels were quantified by ELISA. Results showed that SDS, but not WSDS, increased CORT levels, regardless of sex or stress duration. However, the response to SDS was sexually dimorphic; while males exhibited a significant increase in serum CORT in both protocols, females showed an attenuated response to acute stress exposure and no change in the chronic protocol. Regarding novel stressor reactivity, chronic exposure to SDS did not alter the restraint-stress CORT increase. However, chronic WSDS enhanced restraint-elicited CORT in males. These findings highlight that stressor type and sex are determining factors for the neuroendocrine response induced by SDS, suggesting distinct consequences for physical and psychological threats.

Keywords: corticosterone levels; psychosocial stress; sex differences; SDS; WSDS;

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação esquemática das diferenças do protocolo de estresse de derrota social (EDS) em machos e fêmeas

Figura 2 – Representação esquemática do protocolo de estresse de derrota social (EDS) e do protocolo de estresse de testemunha de derrota social (ETDS)

Figura 3 – Fotografia representativa do protocolo de estresse por restrição (Novo Estressor - NE)

Figura 4 – Representação esquemática do desenho experimental

Figura 5 – Níveis circulantes de corticosterona em camundongos após exposição aguda a diferentes estressores e modulação sexual

Figura 6 – Níveis circulantes de corticosterona em camundongos após exposição prolongada a diferentes estressores e modulação sexual

Figura 7 – Níveis circulantes de corticosterona (ng/mL) em machos e fêmeas submetidos previamente a diferentes protocolos de estresse crônico e posteriormente expostos a um novo estressor

Figura 8 – Resumo Gráfico

LISTA DE QUADROS

Quadro B1 – Resumo das respostas significativas de corticosterona por condição experimental e sexo.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Experimento 1 (Exposição Aguda).

Tabela 2 – Experimento 2 (Exposição Crônica).

Tabela 3 – Experimento 3 (Resposta a um Novo Estressor Pós Exposição Crônica).

Tabela 4 – Estatísticas descritivas para níveis plasmáticos de corticosterona no Experimento 1 (Estresse por EDS Agudo).

Tabela 5 – Estatísticas descritivas para níveis plasmáticos de corticosterona no Experimento 1 (Estresse ETDS Agudo).

Tabela 6 – Estatísticas descritivas para níveis plasmáticos de corticosterona no Experimento 2 (Estresse Crônico - Machos e Fêmeas).

Tabela 7 – Estatísticas descritivas para níveis plasmáticos de corticosterona no Experimento 3 (Reatividade ao Novo Estressor).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

ACTH – Hormônio Adrenocorticotrófico

ANOVA – Analysis of Variance (Análise de Variância)

C

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CORT – Corticosterona

CPF – Córtex Pré-Frontal

CPPA – Centro de Pesquisa e Produção de Animais

CRH – Hormônio Liberador de Corticotrofina

CV – Coeficiente de Variação

E

EDS – Estresse de Derrota Social

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática)

EPM – Erro Padrão da Média

ETDS – Estresse por Testemunho de Derrota Social

F

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

FCF – Faculdade de Ciências Farmacêuticas

FCFAR – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara

H

HHA – Hipotálamo-Hipófise-Adrenal

HPA – *hypothalamic-pituitary-adrenal*

I

IBTEC – Instituto de Biotecnologia

INA – Interação Não Agressiva

N

NE – Novo Estressor

P

PIBIC – Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica

S

SAM – Simpático-Adrenal-Medular

SD – Standard Deviation (Desvio Padrão)

SDS – Social Defeat Stress

SE – Standard Error (Erro Padrão)

T

TEPT – Transtorno de Estresse Pós-Traumático

TINA – Testemunho de Interação Não Agressiva

U

Unesp – Universidade Estadual Paulista

W

WSDS – Witness Social Defeat Stress

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 O Sistema de Defesa e a Regulação Neuroendócrina pelo Eixo HHA.....	13
1.2 Estresse e Saúde Mental	13
1.3 Fatores Modulatórios: Intensidade e Habituação.....	14
1.4 Diferenças Sexuais.....	14
1.5 Modelos Animais: Estresse Físico versus Psicológico	15
1.6 Justificativa e Objetivos.....	15
2 DESENVOLVIMENTO.....	17
2.1 MATERIAL E MÉTODOS	17
2.2 RESULTADOS	23
2.3 DISCUSSÃO	26
3 CONCLUSÃO.....	31
REFERÊNCIAS	32
APÊNDICE A – ANÁLISE COMPLEMENTAR E DISCUSSÃO SUPLEMENTAR	40
APÊNDICE B - TABELAS DE ESTATÍSTICA DESCRITIVA E RESUMO DOS EFEITOS	42
B.1 Dados Descritivos	42
B.2 Resumo Gráfico dos Efeitos.....	44

1 INTRODUÇÃO

1.1 O Sistema de Defesa e a Regulação Neuroendócrina pelo Eixo HHA

O sistema encefálico de defesa tem origem evolutiva e executa a função de proteção e preservação da vida, diante da exposição a estímulos aversivos, como o ataque de um predador, interações agonísticas ou exposição a novos ambientes. Essa exposição desencadeia respostas comportamentais e autônomas, denominadas reações de defesa (1).

O processamento dos estímulos aversivos ocorre por duas vias principais. A via rápida, ou subcortical, transmite informações sensoriais diretamente do tálamo para a amígdala, permitindo respostas de defesa imediatas (2). Em paralelo, a via lenta, ou cortical, processa as informações pelo córtex pré-frontal e pelo hipocampo, permitindo uma avaliação contextual do perigo e possibilitando uma resposta mais elaborada e ajustada (3).

A ativação do eixo simpático-adrenal-medular (SAM), mediada pela amígdala e pelo hipotálamo, ocorre quase instantaneamente (4), com as vias simpáticas estimulando as glândulas adrenais a liberar adrenalina e noradrenalina na corrente sanguínea (5). Isso prepara o organismo para a reação de "luta ou fuga" (5,6). Quando o estímulo aversivo persiste, o cérebro ativa o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA, ou do inglês HPA (*hypothalamic-pituitary-adrenal*)), promovendo uma resposta hormonal sustentada (6,7,8,4). O hipotálamo libera o hormônio liberador de corticotrofina (CRH), que estimula a hipófise anterior a secretar o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Este, por sua vez, estimula o córtex adrenal à síntese e liberação de glicocorticoides (cortisol em humanos e corticosterona em roedores) (9,10)

Os glicocorticoides regulam respostas metabólicas, imunológicas e inflamatórias, aumentando a disponibilidade de energia para enfrentar o estressor (11). Quando o estresse é agudo, o aumento dos glicocorticoides promove um *feedback* negativo que inibe o eixo HHA, levando à restauração do equilíbrio fisiológico (12). Entretanto, em situações de estresse crônico, a hiperativação do eixo HHA resulta em níveis excessivos de cortisol e alterações funcionais no hipocampo e no córtex pré-frontal, levando a prejuízos cognitivos e emocionais (13). O cortisol, o principal glicocorticoide produzido pelas glândulas adrenais, desempenha um papel central neste eixo e não se limita a atuar em órgãos periféricos, exercendo também profundos efeitos no sistema nervoso central, modulando diversas funções cognitivas e emocionais (14).

1.2 Estresse e Saúde Mental

Desde os estudos iniciais por Hans Selye, o estresse foi definido como uma resposta fisiológica do organismo frente a situações desafiadoras, ativando uma cascata de reações

hormonais que visam restabelecer o equilíbrio interno por uma variedade de mecanismos fisiológicos, comportamentais e imunológicos (SELYE, 1974, 1956; SZABO; TACHE; SOMOGYI, 2012). Os indivíduos expressam respostas defensivas diante de um estressor, as quais podem ser desencadeadas por estímulos tanto reais como potenciais (14). Neste cenário, o corpo assume funções metabólicas essenciais para desencadear respostas defensivas, como congelamento, luta ou fuga (18).

No campo da saúde mental, o impacto dessa resposta é significativo. Transtornos como depressão, ansiedade, transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) e outras condições neuropsiquiátricas estão intimamente ligados à exposição ao estresse crônico (19).

1.3 Fatores Modulatórios: Intensidade e Habituação

A literatura vem evidenciando áreas encefálicas que são afetadas pela vivência em estresse agudo e crônico (20). A intensidade do estresse é um fator determinante nos impactos fisiológicos e psicológicos, variando desde respostas adaptativas até o desencadeamento de patologias (20,21).

Um fenômeno crucial relacionado a essas alterações é a habituação, uma resposta adaptativa relacionada a qualquer diminuição na responsividade fisiológica e comportamental a um estímulo repetido (22,23). Em contrapartida, a exposição prolongada a tais estressores pode levar à sensibilização, um estado de hiperreatividade diante de novos estímulos estressores (24,25). O balanço entre habituação e sensibilização do eixo HHA determina se o indivíduo seguirá um fenótipo resiliente ou suscetível (24,25,26,27).

1.4 Diferenças Sexuais

A discrepância na prevalência de transtornos mentais entre os sexos tem sido objeto de pesquisa e tem sido proposto que fatores sociais, culturais e hormonais podem ser importantes influências para tais discrepâncias (28,29,30). Embora evidências apontem para uma maior prevalência em mulheres de distúrbios relacionados ao estresse, como ansiedade e depressão (31,32), a maioria dos estudos em animais tem sido conduzida em roedores machos (33).

Isso resulta em uma lacuna de conhecimento sobre os mecanismos subjacentes às diferenças de sexo nesses transtornos, acarretando a abordagem do efeito do estresse com indiferença ao sexo (34). Porém, o efeito do estresse depende de muitos fatores como o tipo e duração da exposição do estímulo estressor, a idade e o sexo do indivíduo estressado (35,26,36). Portanto, a inclusão de ambos os sexos em modelos pré-clínicos se mostra essencial para uma compreensão translacional mais apropriada.

1.5 Modelos Animais: Estresse Físico *versus* Psicológico

Para investigar os mecanismos neurobiológicos do estresse, diversos modelos animais foram desenvolvidos. O modelo de derrota social (EDS) destaca-se pela sua capacidade de induzir alterações comportamentais análogas à depressão e ansiedade e robusta ativação do eixo HHA (37,38).

No entanto, o EDS envolve conflito físico direto, introduzindo um potencial fator de confusão devido à ocorrência de lesão tecidual que pode mascarar os efeitos do estresse psicológico (39,40). Em resposta a essa limitação, desenvolveu-se o protocolo de estresse por testemunho de derrota social (ETDS), no qual os animais testemunham interações aversivas entre coespecíficos sem contato físico, visando isolar o componente psicológico do estresse superando as limitações de protocolos que mimetizam traumas físicos e psicológicos simultaneamente. (41). A existência de ambos os protocolos permite uma comparação direta para diferenciar os efeitos do estresse por testemunho de derrota social (ETDS) do estresse físico e psicossocial combinado vivenciado na derrota social (EDS) (42).

A elucidação desses mecanismos neurobiológicos é fundamental, visto que a própria compreensão da patogênese dos transtornos de humor e ansiedade foi transformada pela demonstração do impacto do estresse em sua etiologia (43,44).

1.6 Justificativa e Objetivos

Embora o estresse por testemunho de derrota social (ETDS) seja um modelo validado para induzir mudanças comportamentais, a caracterização de seus efeitos neuroendócrinos e o impacto distinto em comparação ao estresse de derrota social (EDS) permanecem pouco esclarecidos. Especificamente, embora estudos recentes tenham começado a avaliar os níveis de corticosterona no ETDS, ainda não está claro como a exposição ao ETDS modula o eixo HHA em comparação a EDS, a reatividade do eixo a um novo desafio estressor e se essa modulação apresenta diferenças entre machos e fêmeas. Essa lacuna de dados comparativos diretos deve-se, em grande parte, ao desafio metodológico de estabelecer protocolos eficazes de derrota social para encontros agressivos em fêmeas.

Neste estudo, hipotetizamos que a exposição crônica ao ETDS altera a responsividade neuroendócrina de maneira dependente do sexo, programando o eixo HHA de forma diferencial em relação à ameaça física experienciada. Para testar essa hipótese, investigamos os níveis circulantes de corticosterona em camundongos machos e fêmeas submetidos ao ETDS e comparamos seus efeitos com os do protocolo clássico de EDS, utilizando-o como referência para a ameaça com contato físico. Ambos os grupos foram submetidos posteriormente a um estressor de restrição aguda, visando elucidar os mecanismos biológicos

subjacentes à vulnerabilidade específica do sexo e à plasticidade do eixo HHA em resposta ao estresse psicossocial. Os objetivos específicos foram: avaliar (a) a influência de 1 (uma) sessão de estresse psicossocial sobre os níveis de corticosterona em camundongos machos e fêmeas; (b) Avaliar a influência de 10 sessões de estresse psicossocial sobre os níveis de corticosterona em camundongos machos e fêmeas; (c) Avaliar a influência do estresse psicossocial em combinação a um novo estímulo aversivo nos níveis de corticosterona em camundongos machos e fêmeas.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 MATERIAL E MÉTODOS

2.1.1 Animais

Foram utilizados 192 camundongos heterogênicos da linhagem Swiss-Webster (96 machos e 96 fêmeas). Todos os animais, provenientes do Centro de Pesquisa e Produção de Animais (CPPA) do Instituto de Biotecnologia da UNESP (IBTEC) de Botucatu, estavam com 60–65 dias pós natal no início dos experimentos e foram mantidos em condições controladas de temperatura (23 ± 2 °C) e ciclo de luz 12/12h (luzes acesas às 7:00 h), com água e ração *ad libitum*. Foram alocados em uma caixa-moradia com 4-6 animais por alojamento (dimensões: $32 \times 19 \times 19$ cm]. O estudo foi conduzido seguindo as diretrizes *ARRIVE guideline* 2.0 (<https://arriveguidelines.org/arrive-guidelines>) e realizado de acordo com os princípios do Guia Brasileiro de Cuidado e Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (DBCA), emitido pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA/MCTI). O DBCA baseou-se no guia do *NIH (National Research Council)* para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCF/UNESP (protocolo n.º 16/2023).

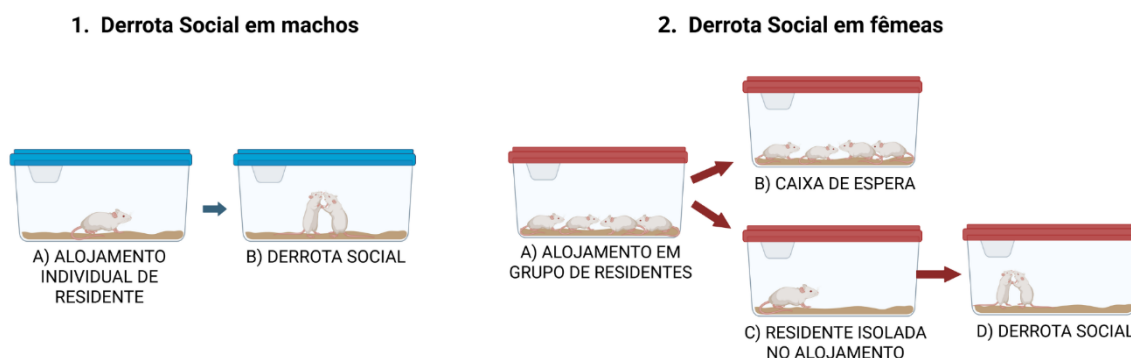
2.1.2 Protocolos de Estresse Social por Derrota (EDS) e Testemunho (ETDS)

Para induzir o comportamento agressivo, adotaram-se estratégias de alojamento distintas dependendo do sexo dos animais residentes. Conforme estabelecido na literatura, camundongos machos residentes foram alojados individualmente por um período mínimo de 4 semanas antes do início dos experimentos, uma vez que o isolamento é o modelo padrão para indução de territorialidade nesta espécie (45,46). Fêmeas residentes foram mantidas em grupos de 4 a 6 animais pelo mesmo período para intensificar o comportamento agressivo social (47), visto que observações em experimentos piloto do nosso grupo indicaram que o isolamento individual não é capaz de induzir territorialismo nas fêmeas. O procedimento ocorreu na caixa-moradia do animal residente ($20,7 \times 21,6 \times 31,6$ cm). Conforme descrito anteriormente (30), o aparato foi equipado com uma divisória removível de acrílico transparente em formato de "T" ($8 \times 8 \times 8$ cm), formando um compartimento para duas testemunhas que impede o contato físico, mas permite interação visual, auditiva e olfativa com o encontro agonístico. As testemunhas não tinham contato visual entre si.

Cada episódio de estresse durou 15 minutos e foi dividido em três fases de 5 minutos. Inicialmente, o animal intruso foi colocado em uma gaiola protetora ($15,5 \times 10,6 \times 4,8$ cm) dentro do território do residente. Simultaneamente, os animais testemunhas foram

posicionados no compartimento da divisória. O intruso (grupo EDS) foi então retirado da gaiola e exposto diretamente aos ataques do residente. Durante os 5 minutos de encontro agonístico físico, adotaram-se critérios éticos de interrupção padronizados (GOLDEN *et al.*, 2011): caso houvesse risco de lesão física grave ao animal intruso, o experimentador utilizava uma vara (10 cm x 2 cm) para separar o confronto. No entanto, essa intervenção foi infrequente, uma vez que, após a submissão inicial, o animal intruso adotava uma postura de rendição a cada nova tentativa de ataque do residente. Durante este período, os animais do grupo ETDS observaram o confronto de seu compartimento protegido. O intruso foi recolocado na gaiola protetora por mais 5 minutos. Os animais foram submetidos a este protocolo em uma única sessão (estresse agudo) ou diariamente por 10 dias consecutivos (estresse crônico). A fim de manter o caráter imprevisível do estressor crônico, as sessões foram conduzidas durante a fase clara do ciclo dos animais, em horários variados (entre 08:00h e 16:00h). Os grupos controle (Interação Não Agressiva - INA e Testemunha de INA - TINA) passaram por procedimento idêntico, porém a interação ocorreu entre coespecíficos familiares não agressores. Um grupo *Naïve* foi incluído para determinar os níveis basais de corticosterona e para controlar os efeitos não específicos da manipulação experimental

Figura 1 - Representação esquemática das diferenças do protocolo de estresse de derrota social (EDS) em machos e fêmeas.

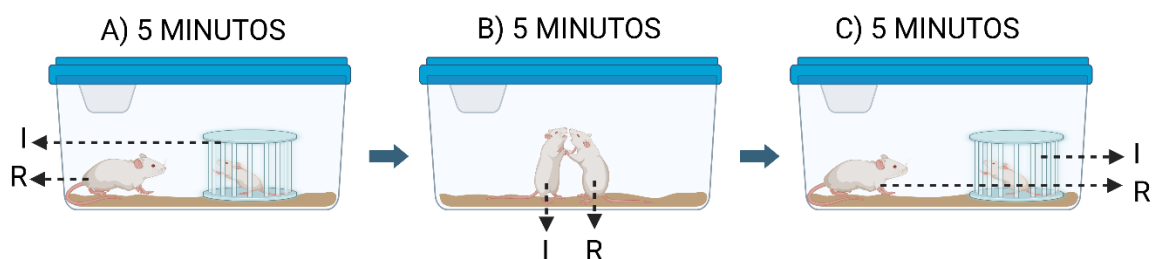


Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

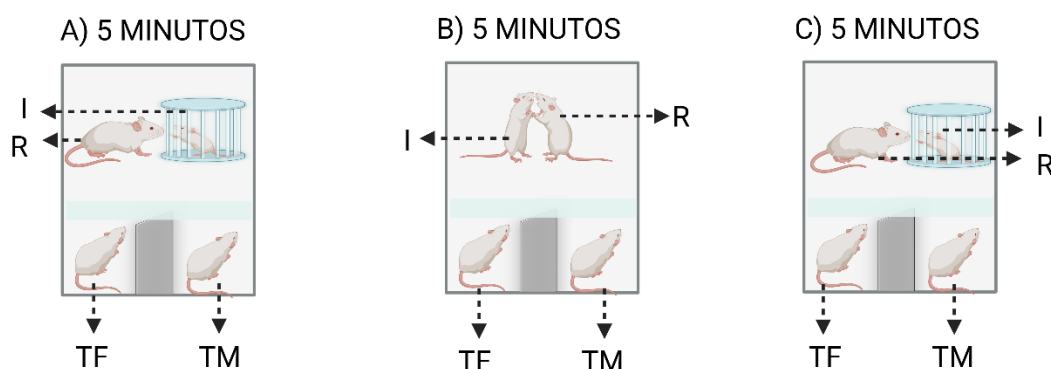
Legenda: (1) Protocolo para machos: Alojamento individual (A) para induzir agressividade territorial, seguido pela derrota social (B). (2) Protocolo para fêmeas: Alojamento em grupo (A) para intensificar a agressão social, realocação do grupo para uma caixa de espera (B) e isolamento de uma residente na caixa de moradia (C) seguido pela derrota social (D).

Figura 2 - Representação esquemática do protocolo de estresse de derrota social (EDS) e do protocolo de estresse de testemunha de derrota social (ETDS).

1. DERROTA SOCIAL



2. TESTEMUNHA DE DERROTA SOCIAL



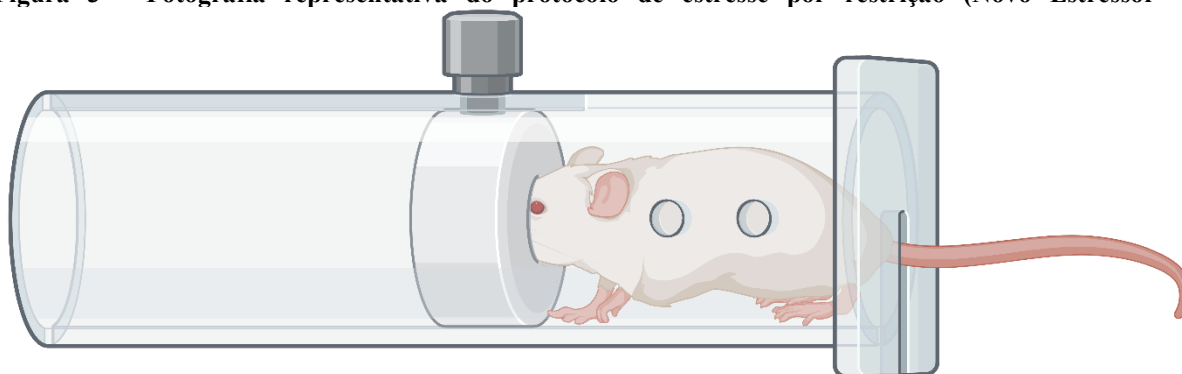
Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

Legenda: Representação esquemática do aparato utilizado para os protocolos de estresse psicossocial. Durante o procedimento, o intruso macho (I) interage com o residente macho (R), enquanto as testemunhas (TM, TF) observam de um compartimento, separadas por uma divisória. R, camundongo residente; I, camundongo intruso macho; TM, camundongo testemunha macho; TF, camundongo testemunha fêmea.

2.1.3 Novo Estressor (NE) – Estresse de Restrição

O aparato de restrição individual de movimentos consistiu em tubos plásticos (3 cm de diâmetro x 10 cm de comprimento), perfurados (25 orifícios com 0,7 cm de diâmetro) para ventilação, com uma extremidade ajustável para o fechamento após a entrada do animal e orifício para passagem da cauda. Os animais submetidos ao estresse crônico de derrota (EDS) ou de testemunho (ETDS) por 10 dias foram expostos a uma única sessão de 30 minutos de estresse agudo de Restrição. A padronização deste tempo de exposição (30 minutos) se fundamenta no pico de produção e liberação plasmática de corticosterona que ocorre 30 minutos após a exposição a um evento estressor. Essa dinâmica difere dos protocolos EDS e ETDS: para estes, a duração da sessão foi de 15 minutos, a coleta biológica foi realizada estritamente 15 minutos após o término da exposição (derrota ou testemunho), assegurando, assim, a mesma janela temporal de 30 minutos necessária para a captação do pico hormonal em ambos os protocolos.

Figura 3 - Fotografia representativa do protocolo de estresse por restrição (Novo Estressor -N



Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

Legenda: camundongo *Swiss Webster* em tubo de restrição

2.1.4 Processamento Amostral e Dosagem Hormonal

O momento da eutanásia seguiu o delineamento experimental: grupos de estresse psicossocial (EDS e ETDS) foram eutanasiados 15 minutos após o término da sessão; grupos do novo estressor (NE) imediatamente após os 30 minutos de restrição. Animais controle basal (*Naïve*) foram eutanasiados no mesmo período do dia diretamente de suas caixas-moradia. A eutanásia foi realizada por aprofundamento anestésico com uretana, no CAS: 51-79-6; *Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA* (1250mg/kg, *i.p.*, dissolvido em solução salina estéril a 0,9%), sendo administrado 10 ml/kg seguido de punção cardíaca e coleta de 1ml de sangue. O soro foi obtido por centrifugação (4000 rpm, 15 min, 6°C), sem anticoagulante (deixando o coágulo se formar por 40 min), e armazenado a -80°C. Os níveis de corticosterona foram quantificados por ensaio imunoenzimático competitivo ("*Cayman's Corticosterone ELISA Kit*"), seguindo as instruções do fabricante. A leitura da absorbância foi realizada a 412 nm e a concentração calculada por interpolação da curva padrão.

2.1.5 Procedimento Experimental

O momento da eutanásia foi ditado pelo delineamento experimental para capturar o pico da resposta de corticosterona, que ocorre tipicamente 30 minutos após o início do estressor (48). Para os Experimentos 1 e 2, os animais dos grupos de estresse psicossocial (EDS e ETDS) foram eutanasiados 15 minutos após a sessão de 15 minutos (totalizando 30 minutos desde o início do estresse). Para o Experimento 3, os animais dos grupos de estresse de restrição aguda (NE) foram eutanasiados imediatamente após a sessão de restrição de 30 minutos. Os animais do grupo controle não expostos ao novo estressor foram eutanasiados diretamente de suas caixas-moradia no mesmo horário do dia para garantir que não houvesse diferenças na atividade basal do eixo HHA. O delineamento experimental foi dividido em três experimentos (Fig. 4), visando avaliar os efeitos do estresse agudo (Experimento 1), estresse crônico

(Experimento 2) e reatividade a um novo estressor (Experimento 3), conforme detalhado nas Tabelas 1-3.

Tabela 1 - Experimento 1 (Exposição Aguda):

Grupo	Sexo	Tipo de Estressor Agudo	Descrição Detalhada
(I)	Macho	EDS	Exposição a uma sessão de Estresse de Derrota Social
(II)	Macho	INA	Exposição a uma sessão de Interação Não Agressiva
(III)	Fêmea	EDS	Exposição a uma sessão de Estresse de Derrota Social
(IV)	Fêmea	INA	Exposição a uma sessão de Interação Não Agressiva
(V)	Macho	ETDS	Exposição a uma sessão de Estresse de Testemunho de Derrota Social
(VI)	Macho	TINA	Exposição a uma sessão de Testemunho de Interação Não Agressiva
(VII)	Fêmea	ETDS	Exposição a uma sessão de Estresse de Testemunho de Derrota Social
(VIII)	Fêmea	TINA	Exposição a uma sessão de Testemunho de Interação Não Agressiva
(IX)	Macho	Controle (<i>Naïve</i>)	Somente manejo laboratorial
(X)	Fêmea	Controle (<i>Naïve</i>)	Somente manejo laboratorial

Fonte: Elaborado pela autora, 2026.

Tabela 2 - Experimento 2 (Exposição Crônica):

Grupo	Sexo	Tipo de Estressor Crônico	Descrição Detalhada
(I)	Macho	EDS	Exposição a dez sessões de Estresse de Derrota Social
(II)	Macho	INA	Exposição a dez sessões de Interação Não Agressiva
(III)	Fêmea	EDS	Exposição a dez sessões de Estresse de Derrota Social
(IV)	Fêmea	INA	Exposição a dez sessões de Interação Não Agressiva
(V)	Macho	ETDS	Exposição a dez sessões de Estresse de Testemunho de Derrota Social
(VI)	Macho	TINA	Exposição a dez sessões de Interação Não Agressiva
(VII)	Fêmea	ETDS	Exposição a dez sessões de Estresse de Testemunho de Derrota Social
(VIII)	Fêmea	TINA	Exposição a dez sessões de Testemunho de Interação Não Agressiva
(IX)	Macho	Controle (<i>Naïve</i>)	Somente manejo laboratorial
(X)	Fêmea	Controle (<i>Naïve</i>)	Somente manejo laboratorial

Fonte: Elaborado pela autora, 2026.

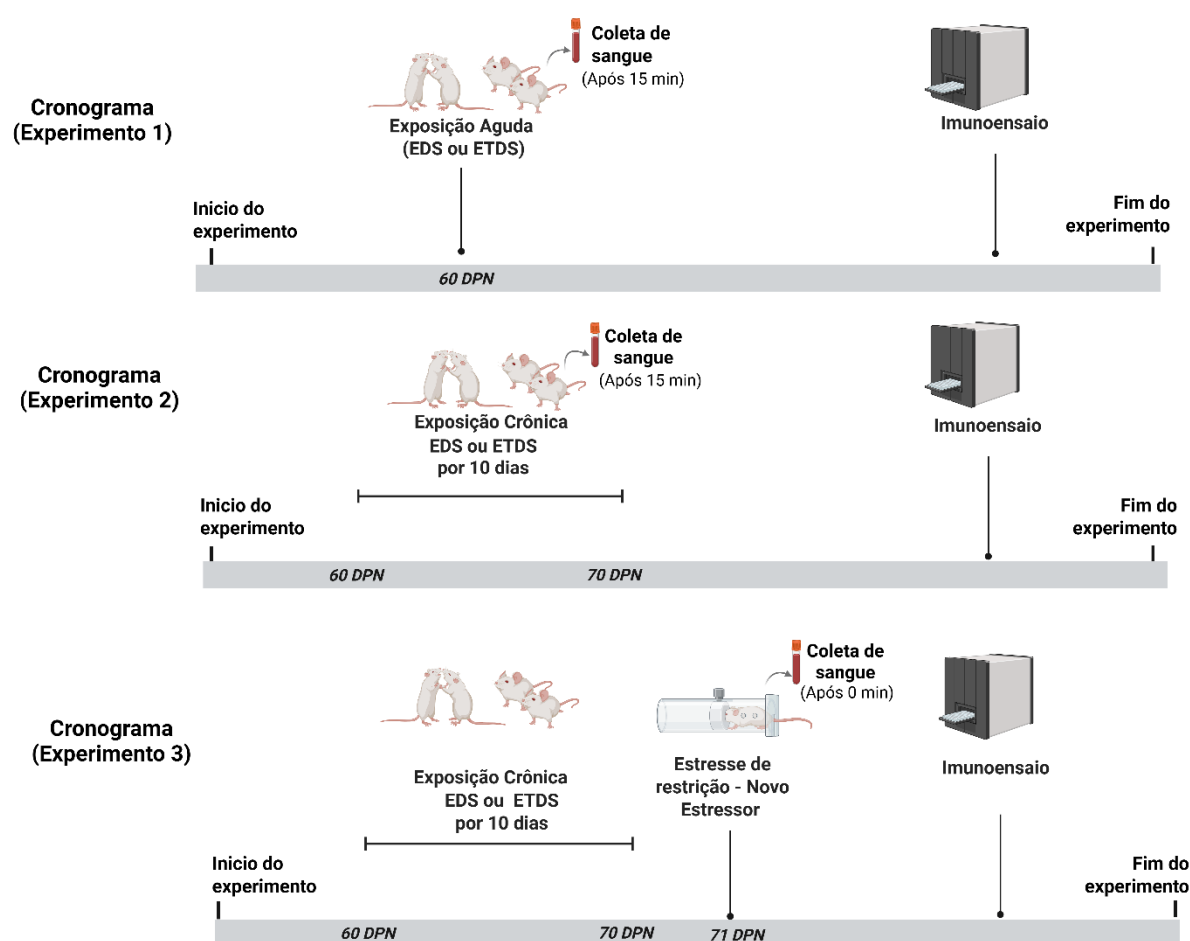
Tabela 3 - Experimento 3 (Resposta a um Novo Estressor Pós Exposição Crônica):

Grupo	Sexo	Condição Prolongada (10 sessões)	Estressor Adicional	Descrição Detalhada
(I)	Macho	EDS	NE (Novo Estressor)	Dez sessões de Estresse de Derrota Social e, após, exposição ao NE
(II)	Macho	INA	NE (Novo Estressor)	Dez sessões de Interação Não Agressiva e, após, exposição ao NE
(III)	Fêmea	EDS	NE (Novo Estressor)	Dez sessões de Estresse de Derrota Social e, após, exposição ao NE
(IV)	Fêmea	INA	NE (Novo Estressor)	Dez sessões de Interação Não Agressiva e, após, exposição ao NE
(V)	Macho	ETDS	NE (Novo Estressor)	Dez sessões de Estresse de Testemunho de Derrota Social e, após, exposição ao NE

			Estressor)	Social e, após, exposição ao NE
(VI)	Macho	TINA	NE (Novo Estressor)	Dez sessões de Testemunho de Interação Não Agressiva e, após, exposição ao NE
(VII)	Fêmea	ETDS	NE (Novo Estressor)	Dez sessões de Estresse de Testemunho de Derrota Social e, após, exposição ao NE
(VIII)	Fêmea	TINA	NE (Novo Estressor)	Dez sessões de Testemunho de Interação Não Agressiva e, após, exposição ao NE
(IX)	Macho	Controle (<i>Naïve</i>)	NE (Novo Estressor)	Somente manejo laboratorial e, após, exposição ao NE
(X)	Fêmea	Controle (<i>Naïve</i>)	NE (Novo Estressor)	Somente manejo laboratorial e, após, exposição ao NE

Fonte: Elaborado pela autora, 2026.

Figura 4 - Representação esquemática do desenho experimental.



Fonte: Elaborado pela autora, 2026.

Legenda: Delineamento experimental geral. O Experimento 1 avaliou os efeitos agudos (1 sessão) de EDS, INA, ETDS e TINA. O Experimento 2 avaliou os efeitos crônicos (10 sessões) dos mesmos protocolos. O Experimento 3 avaliou a reatividade do eixo HHA após a exposição a um novo estressor (NE) nos animais submetidos aos protocolos crônicos. Em todos os experimentos, foram utilizados grupos *Naïve* como controle basal e ambos os sexos foram avaliados. Ver Tabelas 1-3 para a distribuição detalhada dos grupos.

2.1.6 Análise Estatística

Os dados foram analisados utilizando os softwares JASP e *Statistica* (versão 7). Foram testados quanto à normalidade (teste de *Shapiro-Wilk*) e homogeneidade de variâncias (teste

de *Levene*) e analisados em três conjuntos separados correspondentes ao delineamento experimental.

Estresse por Derrota Social:

Experimentos 1 (exposição aguda) e 2 (exposição crônica): Devido a diferenças metodológicas existentes no protocolo de EDS nas fêmeas (realizado na ausência de testemunhas), as análises para machos e fêmeas foram conduzidas separadamente, as comparações entre sexos para o estresse por derrota social (EDS) são, portanto, qualitativas e não quantitativas. Machos (EDS): os grupos *Naïve* (M), INA (M) e EDS (M) foram comparados utilizando ANOVA de uma via (One-Way ANOVA). Fêmeas (EDS): os grupos *Naïve* (F), INA (F) e EDS (F) foram comparados utilizando ANOVA de uma via.

Experimento 3 (reatividade do eixo HHA): A mesma lógica foi aplicada aos grupos expostos ao novo estressor (NE). As análises para machos e fêmeas foram conduzidas separadamente. Machos (EDS + NE): os grupos *Naïve*+NE (M), NAI+NE (M) e EDS+NE (M) foram comparados via ANOVA de uma via. Fêmeas (EDS + NE): os grupos *Naïve*+NE (F), INA+NE (F) e EDS+NE (F) foram comparados via ANOVA de uma via.

Estresse por Testemunho de Derrota Social:

Experimentos 1 (exposição aguda) e 2 (exposição crônica): Para avaliar os efeitos do estresse de testemunha, os grupos *Naïve*, TINA e ETDS (ambos os sexos) foram analisados por meio de uma ANOVA de duas vias (Two-Way ANOVA) para avaliar diferenças entre sexos e interações. Os fatores foram 'Condição' (3 níveis: *Naïve*, TINA, ETDS) e 'Sexo' (2 níveis: Macho, Fêmea).

Experimento 3 (reatividade do eixo HHA): os grupos expostos ao novo estressor (*Naïve*+NE, TINA+NE e ETDS+NE) foram analisados por ANOVA de duas vias. Os fatores foram 'Condição Prolongada Prévia' (3 níveis: *Naïve*, TINA, ETDS) e 'Sexo' (2 níveis: Macho, Fêmea).

Em todos os casos, quando interações significativas ou efeitos principais foram encontrados, realizou-se o teste *post-hoc* de *Tukey*. Os tamanhos de efeito foram estimados usando o *eta* quadrado parcial (η^2p). O nível de significância foi estabelecido em $\alpha = 0,05$. Para manter o foco do artigo nos objetivos (SDS vs. WSDS), quaisquer achados significativos restritos aos grupos controle (*ex*: WNAI vs. *Naïve*) foram detalhados no Material Suplementar (SM1 e SM2).

2.2 RESULTADOS

2.2.1 O EDS agudo provoca aumento da liberação de corticosterona em machos e fêmeas, enquanto o EDS crônico ativou o eixo HHA somente em machos.

Em machos expostos ao EDS agudo (Experimento 1 - Fig. 5a), a ANOVA de um fator (condição: EDS, INA, *Naïve*) indicou um efeito significativo da condição [$F(2,15) = 14,51$, $p < 0,001$, $\eta^2p = 0,65$]. O teste *post-hoc* de *Tukey* revelou que o grupo EDS apresentou níveis de corticosterona significativamente mais altos em comparação com o grupo INA ($p = 0,0026$) e o grupo *Naïve* ($p = 0,0002$). Em fêmeas expostas ao EDS agudo (Experimento 1- Fig. 5b), a ANOVA de um fator (condição: EDS, INA, *Naïve*) indicou um efeito significativo da condição sobre os níveis de corticosterona [$F(2,15) = 29,86$, $p < 0,0001$, $\eta^2p = 0,79$]. O teste *post-hoc* de *Tukey* revelou que tanto o grupo EDS ($p < 0,0001$) quanto o grupo INA ($p < 0,0001$) apresentaram níveis de corticosterona significativamente mais elevados em comparação com o grupo *Naïve*.

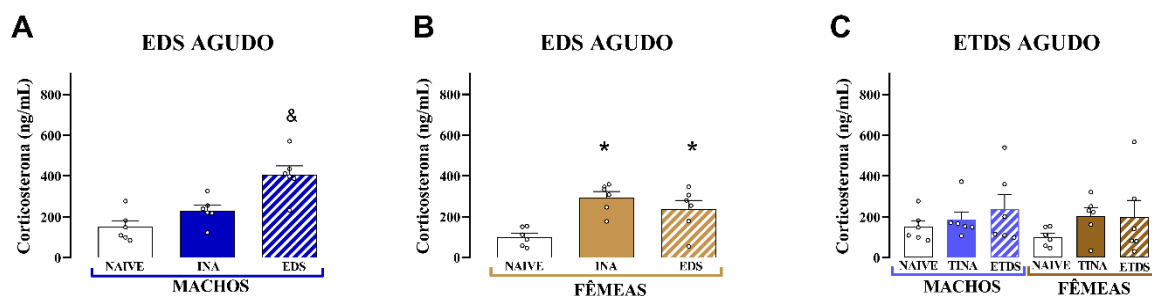
Em relação à exposição prolongada, em machos (Experimento 2 - Fig. 6a), a ANOVA demonstrou um efeito significativo da condição sobre os níveis de corticosterona [$F(2,15) = 46,95$, $p < 0,001$, $\eta^2p = 0,65$]. O teste *post hoc* de *Tukey* revelou que os camundongos expostos ao Estresse de Derrota Social (EDS) crônico apresentaram níveis de corticosterona significativamente mais elevados em comparação com o grupo INA ($p < 0,0001$) e *Naïve* ($p = 0,0002$). Já em fêmeas expostas ao estressor crônico (Experimento 2 - Fig. 6b), a ANOVA não indicou um efeito principal significativo da condição [$F(2,15) = 3,10$, $p = 0,075$, $\eta^2p = 0,29$], sugerindo um padrão distinto da resposta aguda.

2.2.2 Independentemente do sexo, o ETDS não recruta o eixo HHA

Para avaliar o ETDS agudo (Experimento 1 - Fig. 5c), uma ANOVA de dois fatores (Condição: ETDS, TINA, *Naïve*; Sexo: Macho, Fêmea) foi realizada. Esta análise não demonstrou efeito significativo do fator "sexo" [$F(1,30) = 0,29$, $p = 0,588$] nem do fator "condição" [$F(2,30) = 1,69$, $p = 0,203$] sobre os níveis de corticosterona. Adicionalmente, a interação entre "sexo" e "condição" também não foi significativa [$F(2,30) = 0,232$, $p = 0,794$].

Para avaliar o ETDS crônico (Experimento 2 - Fig. 6c), a ANOVA de dois fatores revelou um efeito principal significativo da "condição" [$F(2,30) = 3,42$, $p = 0,046$, $\eta^2p = 0,18$]. Não houve efeito de "sexo" [$F(1,30) = 0,24$, $p = 0,628$] nem interação [$F(2,30) = 1,02$, $p = 0,374$]. O teste *post-hoc* para o efeito de "condição" é detalhado no Material Suplementar (Fig. S1).

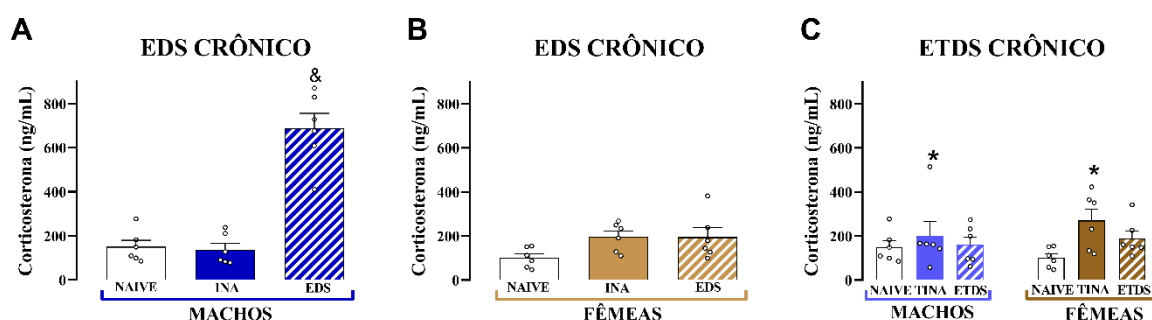
Figura 5 - Níveis circulantes de corticosterona em camundongos após exposição aguda a diferentes estressores e modulação sexual.



Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

Legenda: (A) Níveis de corticosterona em machos após estresse por derrota social agudo. & = $p < 0,0001$ vs INA e *Naive*. (B) Níveis de corticosterona em fêmeas após estresse por derrota social agudo. * = $p < 0,0001$ vs *Naive*. (C) Níveis de corticosterona em machos e fêmeas após estresse observacional agudo. Níveis circulantes de corticosterona (ng/mL). Barras representam o erro padrão da média (EPM). Pontos individuais representam os valores de cada animal.

Figura 6 - Níveis circulantes de corticosterona em camundongos após exposição prolongada a diferentes estressores e modulação sexual.



Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

Legenda: (A) Níveis de corticosterona em machos após estresse por derrota social crônico. & = $p < 0,001$ vs INA e *Naive*. (B) Níveis de corticosterona em fêmeas após estresse por derrota social crônico. (C) Níveis de corticosterona em machos e fêmeas após estresse de testemunho crônico. * Ver Material Suplementar S1 para análise *post-hoc*. Barras representam a média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Pontos individuais representam os valores de cada animal.

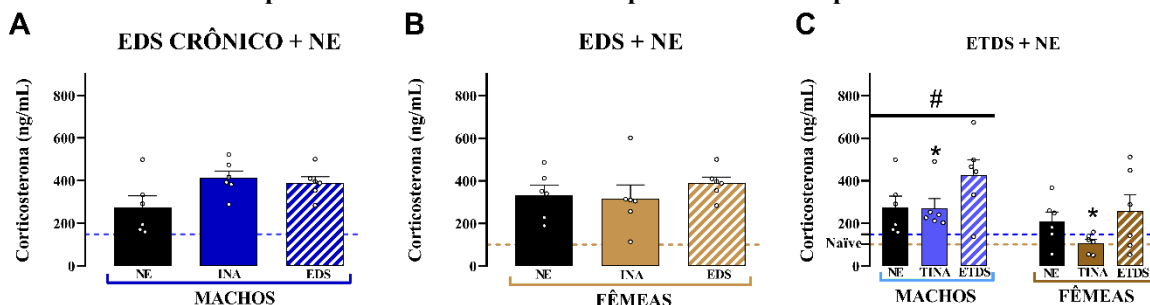
2.2.3 Reatividade a um Novo Estressor e Diferenças Sexuais Basais

Em machos expostos previamente ao estressor de derrota social e posteriormente a um novo estressor (Experimento 3 - Fig. 7a) a ANOVA indicou que o efeito da condição não foi estatisticamente significativo [$F(2,15) = 3,45$, $p = 0,059$, $\eta^2p = 0,65$]. Em fêmeas expostas previamente ao estressor de derrota social e posteriormente a um novo estressor (Experimento 3 - Fig. 7b) a ANOVA indicou que o efeito da condição não foi estatisticamente significativo [$F(2,15) = 1,64$, $p = 0,225$, $\eta^2p = 0,18$].

Na investigação da responsividade do eixo HHA após a exposição ao ETDS prolongada e subsequente exposição a um novo estressor (Experimento 3 - Fig. 7c), a ANOVA de dois fatores revelou um efeito principal significativo do fator "Sexo" sobre os níveis circulantes de corticosterona [$F(1,30) = 8,53$, $p = 0,007$, $\eta^2p = 0,18$] e um efeito significativo do fator "Condição" [$F(2,30) = 3,87$, $p = 0,032$, $\eta^2p = 0,16$]. Em contraste, a interação entre "Sexo" e "Condição" não foi estatisticamente significativa [$F(2,30) = 0,569$, p

= 0,572]. O teste *post-hoc* de *Tukey* para o efeito principal de "Condição" é detalhado no Material Suplementar (Fig. S1).

Figura 7 - Níveis circulantes de corticosterona (ng/mL) em machos e fêmeas submetidos previamente a diferentes protocolos de estresse crônico e posteriormente expostos a um novo estressor.



Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

Legenda: (A) Níveis de corticosterona em machos após estresse por derrota social crônico frente a um novo estressor. (B) Níveis de corticosterona em fêmeas após estresse por derrota social crônico frente a um novo estressor. (C) Níveis de corticosterona em machos e fêmeas após estresse de testemunha crônico frente a um novo estressor. #Indica efeito principal significativo de Sexo ($p = 0,007$); *Ver Material Suplementar S1 para análise *post-hoc* da Condição. Níveis circulantes de corticosterona (ng/mL) em camundongos machos e fêmeas. Barras representam o erro padrão da média (EPM). Pontos individuais representam os valores de cada animal.

2.3 DISCUSSÃO

O presente estudo fornece evidências de uma dissociação funcional na regulação do eixo HHA, dependente da natureza do estressor social. O principal achado consiste na identificação de um dimorfismo sexual na reatividade neuroendócrina a estressores psicossociais. Demonstramos que o estresse de derrota social (EDS), tanto em sua forma aguda quanto crônica, induz uma resposta mais pronunciada de corticosterona em camundongos machos, enquanto essa resposta encontra-se ausente ou atenuada em fêmeas. Além disso, observamos que o estresse de testemunha de derrota social (ETDS) não foi capaz de modular a atividade do eixo HHA em nenhum dos sexos, evidenciando que a ativação difere com base no tipo de estressor, a simples exposição a testemunhar um evento estressor/uma ameaça social não é endocrinamente equivalente a vivenciar a experiência física direta.

O impacto do estresse sobre os sistemas fisiológicos e comportamentais é determinado pelas características do estressor, como cronicidade, previsibilidade e gravidade (49,50). Embora nossos resultados não tenham mostrado uma liberação elevada de corticosterona (CORT) pós-ETDS, isso contrasta com a literatura recente que demonstra uma robusta ativação do eixo HHA após o ETDS. Por exemplo, demonstrou-se que o ETDS eleva os níveis de CORT não apenas em camundongos machos (51), mas também em ratas fêmeas, que podem exibir respostas neuroendócrinas pronunciadas e, por vezes, maiores que as dos machos após estresse de testemunha agudo e repetido (52,53). Essa discrepância destaca a variabilidade da resposta neuroendócrina a estressores psicológicos. Cabe ressaltar que foi utilizada uma linhagem específica (camundongos *Swiss Webster*) e uma versão adaptada do

protocolo de ETDS descrito anteriormente, corroborando a importância da espécie, linhagem e características específicas do estressor para os resultados fisiológicos. Por outro lado, nossos achados em machos expostos cronicamente ao EDS (apresentando um aumento significativo de CORT) alinham-se com a literatura, a qual demonstra que o EDS repetido induz hipertermia sustentada e elevação de corticosterona em camundongos machos NMRI e OF1 (37,48). Esses resultados confirmam o robusto impacto neuroendócrino do EDS (40,54) e o valida como um estressor misto, combinando componentes físicos e psicológicos, em contraste com a natureza psicológica do testemunho (ETDS).

Em relação às diferenças sexuais, as fêmeas submetidas ao EDS crônico não exibiram uma resposta significativa de corticosterona, achado que contrasta com a resposta aguda observada tanto no grupo EDS quanto no INA no Experimento 1. O aumento agudo de corticosterona observado é provavelmente modulado pela novidade e pelo manuseio dentro do próprio protocolo (ex: mudança de caixa-moradia e breves isolamentos em compartimentos). Este padrão temporal (resposta aguda robusta seguida de uma resposta crônica nula) sugere um processo de habituação ao estímulo quando repetido. À medida que o protocolo é repetido, o manuseio e as interações deixam de ser percebidos como um estressor capaz de sustentar a ativação do eixo HHA. Essa observação é consistente com a literatura que demonstra que as respostas fisiológicas (ex: níveis cardiovasculares e de corticosterona) frequentemente diminuem após a exposição repetida ao mesmo estressor (50,4,55,56). Embora as diferenças de protocolo exijam cautela, este resultado alinha-se ao conceito de 'Homeostase Reativa' (*reactive homeostasis*) de Romero (57). Neste contexto, o organismo mantém os parâmetros fisiológicos dentro de uma faixa preditiva, indicando que o estímulo repetido é insuficiente para induzir uma sobrecarga homeostática (*homeostatic overload*). Consequentemente, os dados sugerem que o eixo HHA das fêmeas se habitua ao estímulo de EDS, retornando aos níveis basais ao longo do tempo. Embora o sistema neuroendócrino possa se adaptar, os parâmetros cardiovasculares muitas vezes não o fazem; por exemplo, a literatura indica uma falta de habituação em medidas cardiovasculares, como frequência cardíaca e desequilíbrio autônomo, após sessões repetidas de estresse social e ETDS (58).

Nossos dados com corticosterona corroboram a hipótese de diferenças entre estressores com componentes físicos e ameaças psicológicas. A literatura, por exemplo, demonstra que estressores psicossociais e físicos exercem efeitos diferenciais em comportamentos sociais. Em camundongos C57BL/6J, o estresse físico induziu déficits mais severos em ansiedade e interação social do que o estresse emocional (59). Consequentemente, pesquisas como a de Nakatake e colaboradores (2020) indicam que, embora estressores

emocionais e físicos compartilhem características (e.g., ativação simpática e liberação de glicocorticoides), eles diferem em seus efeitos (e.g., impactos em longo prazo e mecanismos distintos: fadiga muscular; exaustão física). Nesse contexto, Finnell e colaboradores (2017) demonstraram que estressores produzem consequências duradouras distintas: o ETDS, por exemplo, é mais propenso a causar disfunção cardiovascular e anedonia comportamental, enquanto estressores físicos aumentam a sensibilidade a distúrbios inflamatórios. Por outro lado, estudos de Warren e colaboradores (2013, 2020) evidenciam que o estresse psicossocial por testemunho induz alterações comportamentais significativas na interação social, na preferência por sacarose e até nos níveis de corticosterona. Assim como os camundongos que passam pelo estressor físico, os camundongos submetidos ao estresse psicossocial no modelo de Warren exibiram uma série de comportamentos semelhantes à depressão e à ansiedade, tanto 24 horas quanto 1 mês após o estresse (51). Essas diferenças ressaltam que, apesar das semelhanças, os mecanismos subjacentes a cada tipo de estressor não são idênticos, resultando em respostas neurocomportamentais distintas.

Em contraste com o EDS, o ETDS falhou em induzir uma resposta de corticosterona em ambos os sexos, tanto na exposição aguda quanto na prolongada. Sugerimos que essa divergência (resposta robusta no EDS e ausência da resposta no ETDS) à discriminação do estímulo estressor para a ativação sustentada do eixo HHA, mediada pelo córtex pré-frontal (CPF) (HERMAN, 2013, 2016). Ressaltamos que a ausência de uma resposta robusta de corticosterona nem sempre significa ausência de impacto significativo do estresse, mas pode sugerir uma dissociação entre a resposta neuroendócrina clássica e outras manifestações de estresse, como as alterações comportamentais e neurais.

Nossos dados corroboram essa hipótese de dissociação de vias, onde o estresse com componentes físico e psicológico combinado do EDS é avaliado como uma ameaça grave, ativando tanto o eixo SAM quanto o eixo HHA, contrastando com o estímulo psicológico do testemunho (ETDS), que pode ter sido seletivamente suprimido pelo CPF não ativando o eixo HHA, mas suficiente para ativar o eixo SAM, para respostas autônomas (61). Além disso, alguns indivíduos podem ser mais resilientes ou desenvolver diferentes estratégias de enfrentamento e, mesmo na ausência da corticosterona, estressores psicológicos podem resultar em mudanças comportamentais (como em comportamentos semelhantes à ansiedade) e de plasticidade neural, como a hiperativação do BNST, amígdala e hipocampo (28,30,45). Assim, o dimorfismo sexual pode se manifestar em outros domínios da resposta ao estresse, em vez da corticosterona circulante. Por exemplo, Avalo-Zuluaga et al. (2025) relataram que machos e fêmeas exibem perfis de vulnerabilidade distintos na atividade comportamental (ex:

estado da pelagem, construção de ninho, exploração de objetos) e neurofuncional, com fêmeas apresentando menor ativação amigdalóide e maior interação com objetos novos.

Os resultados obtidos com a inclusão de um novo estressor corroboram as crescentes evidências na literatura sobre as diferenças sexuais na fisiologia da resposta ao estresse (62,63,64). A exposição crônica ao EDS não alterou a reatividade ao novo estressor (NE) em ambos os sexos, sugerindo que este paradigma não induziu a sensibilização cruzada (*cross-sensitization*) ou habituação do eixo HHA neste contexto. Em contraste, na análise do ETDS, observamos um efeito principal de sexo, com machos apresentando maiores níveis de corticosterona circulantes independente do estressor, podendo refletir uma diferença sexual na responsividade do eixo HHA, um fenômeno previamente descrito (64).

Para expandir a compreensão da influência do sexo nas respostas ao estresse, há uma busca por um modelo animal eficaz para estudo do estresse psicossocial em fêmeas. Em nosso estudo, o protocolo de EDS para fêmeas diferiu do protocolo para machos e foi realizado em uma coorte experimental distinta. Conforme detalhado na seção de métodos, essas variações metodológicas poderiam explicar a ausência de uma resposta fisiológica crônica nas fêmeas. É importante ressaltar que, embora as fêmeas tenham se habituado ao crônico, elas apresentaram reatividade preservada do eixo HHA diante de um novo estressor de contenção, desencadeando uma resposta comparável à do grupo controle.

Na literatura, observa-se uma discussão sobre a influência do ciclo estral e das flutuações dos hormônios ovarianos nas respostas ao estresse. Alguns autores apontam que o estrogênio pode atuar como um fator de vulnerabilidade, aumentando a sensibilidade ao estresse por meio da hiperativação do sistema do fator liberador de corticotrofina (CRF) (65). Por outro lado, há evidências de que os hormônios femininos exercem um efeito protetor cardiovascular (66). A função ovariana e as flutuações hormonais naturais inerentes ao ciclo estral atuam como um mecanismo fisiológico tamponante (*buffer*), que, sob a influência sistêmica do estrogênio e da progesterona, atenua a resposta simpática, reduzindo picos de pressão arterial e taquicardia induzidos pelo estresse (67,68). No presente protocolo, as fêmeas não apresentaram um aumento sustentado de corticosterona em resposta ao estressor social prolongado, o que poderia sugerir que as fêmeas recrutaram vias fisiológicas e comportamentais alternativas para modular o desgaste alostático crônico, onde a atividade ovariana e suas sinalizações hormonais modulou uma resposta adaptativa sistêmica, englobando vias de proteção cardiovascular, rotas mediadas por ocitocina e a modulação inibitória específica do sistema nervoso simpático, poupando a hiperativação contínua do eixo HHA. Em contrapartida, quando submetidas à natureza do estresse de restrição, a via clássica

do eixo HHA foi acionada para modular a secreção de corticosterona. Do ponto de vista metodológico, essa reatividade preservada frente ao novo estressor (restrição) é fundamental para sustentar que a não avaliação diária do ciclo estral não consistiu em um fator limitante para o estudo. O fato de o eixo HHA dessas fêmeas demonstrar funcionalidade e capacidade de responder ao estresse agudo comprova que as flutuações estrais não suprimiram indiscriminadamente a resposta endócrina, evidenciando que a atenuação observada é uma modulação específica à natureza do estressor (social/misto *vs.* físico).

Recentemente, um novo protocolo experimental de EDS em fêmeas foi proposto por (69). Em contraste com o modelo padronizado em nosso laboratório, no qual as intrusas retornam à caixa-moradia após o confronto, no paradigma descrito por esses autores, a fêmea intrusa pernoita com a agressora. Isso resulta na privação de interações sociais positivas associada à exposição sensorial contínua à ameaça, caracterizando uma quebra prolongada da estabilidade social. Ao combinar o EDS a essa mudança social abrupta, este modelo demonstrou induzir alterações significativas nos níveis de corticosterona e glutamato, além de desencadear comportamentos do tipo ansioso e depressivo. Portanto, essa dinâmica estabelece um paradigma translacional mais robusto, sendo uma abordagem metodológica valiosa a ser considerada em investigações futuras sobre as consequências emocionais do estresse em fêmeas.

Uma limitação do nosso delineamento de ETDS é que ambos os sexos testemunharam o mesmo estressor (uma derrota entre machos). É validado na literatura o comportamento de transferência social do estresse em animais que presenciam cronificação da dor, e respostas de dor mais acentuada em fêmeas (70,71). Tal avaliação não foi possível em nosso estudo devido à provável baixa relevância etológica do contexto, onde fêmeas observaram um conflito entre machos, em vez de um conflito entre fêmeas (72,73). Esse desenho experimental pode ter influenciado a resposta de transferência social do estresse, tornado a experiência menos crítica para a sobrevivência sob a perspectiva da fêmea (74), explicando assim a ausência de ativação do HHA (o achado nulo do ETDS).

3 CONCLUSÃO

Este estudo revela um dimorfismo sexual na resposta do eixo HHA ao estresse de derrota social, com machos exibindo uma elevada resposta de corticosterona que está ausente em fêmeas. Demonstramos também uma dissociação entre estressores físicos/mistos e psicológicos, onde o ETDS não foi suficiente para ativar o HHA em nenhum dos sexos. Futuros estudos são necessários para elucidar a hipótese de dissociação, medindo outros marcadores neuroendócrinos para determinar se o estímulo por testemunho ativa outra via de resposta ao estresse.

REFERÊNCIAS

- [1] GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. S. **Fundamentos da psicofarmacologia / Frederico Guilherme Graeff, Francisco Silveira Guimarães**. 3ª ed. ed. [s.l.] São Paulo, SP: Ateneu, 2021., 2021.
- [2] LEDOUX, J. E. **Emotion circuits in the brain. Annual Review of Neuroscience**, 2000.
- [3] MCNAUGHTON, N.; CORR, P. J. **A two-dimensional neuropsychology of defense: Fear/anxiety and defensive distance. Neuroscience and Biobehavioral Reviews** Elsevier Ltd, , 2004.
- [4] MCCARTY, R. The Fight-or-Flight Response: A Cornerstone of Stress Research. Em: **Stress: Concepts, Cognition, Emotion, and Behavior: Handbook of Stress**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 33–37.
- [5] BANDLER, R. et al. Central circuits mediating patterned autonomic activity during active vs. passive emotional coping. **Brain Research Bulletin**, v. 53, p. 95–104, set. 2000.
- [6] CANNON, W. B. **The Wisdom of the Body**. 2nd. ed. New York: W. W. Norton & Company (Nova York), 1939.
- [7] HERMAN, J. P.; CULLINAN, W. E. Neurocircuitry of stress: Central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. **Trends in Neurosciences**, v. 20, p. 78–84, fev. 1997.
- [8] ULRICH-LAI, Y. M.; HERMAN, J. P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. **Nature Reviews Neuroscience**, [S. l.], v. 10, n. 6, p. 397-409, June 2009. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrn2647>.
- [9] SAPOLSKY, R. M.; ROMERO, L. M.; MUNCK, A. U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. **Endocrine Reviews**, [S. l.], v. 21, n. 1, p. 55-89, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1210/edrv.21.1.0389>.
- [10] CHROUSOS, G. P. Stress and disorders of the stress system. **Nature Reviews Endocrinology**, [S. l.], v. 5, n. 7, p. 374-381, July 2009. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrendo.2009.106>.
- [11] HERMAN, J. P. et al. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical stress response. **Comprehensive Physiology**, [S. l.], v. 6, n. 2, p. 603-621, Apr. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1002/cphy.c150015>.
- [12] MCEWEN, B. S. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. **Physiological Reviews**, [S. l.], v. 87, n. 3, p. 873-904, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2006>.

- [13] LUPIEN, S. J.; MCEWEN, B. S.; GUNNAR, M. R.; HEIM, C. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. **Nature Reviews Neuroscience**, [S. l.], v. 10, n. 6, p. 434-445, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrn2639>.
- [14] SCHILTZ, L.; DIWO, R.; DE TYCHEY, C. L'élaboration de l'agressivité à l'adolescence: étude structurale comparée basée sur le test de Rorschach. **L'Encephale**, [S. l.], v. 41, n. 4, p. 295-301, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.encep.2014.10.006>.
- [15] SZABO, S.; TACHE, Y.; SOMOGYI, A. The legacy of Hans Selye and the origins of stress research: a retrospective 75 years after his landmark brief "letter" to the Editor of Nature. **Stress**, [S. l.], v. 15, p. 472-478, Sept. 2012. DOI: <https://doi.org/10.3109/10253890.2012.710919>.
- [16] SELYE, H. **Stress without distress**. 1st ed. Philadelphia: Lippincott, 1974. 171 p..
- [17] SELYE, H. **The stress of life**. New York, NY, US: New York, NY, US: McGraw-Hill, 1956.
- [18] MARGIS, R. et al. Relação entre estressores, estresse e ansiedade. **Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul**, [S. l.], v. 25, supl. 1, p. 65-74, abr. 2003. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-81082003000400008>.
- [19] YANG, L. et al. The effects of psychological stress on depression. **Current Neuropharmacology**, [S. l.], v. 13, n. 4, p. 494-504, Sept. 2015. DOI: <https://doi.org/10.2174/1570159x1304150831150507>.
- [20] GEE, D. G.; CASEY, B. J. The impact of developmental timing for stress and recovery. **Neurobiology of Stress**, [S. l.], v. 1, p. 184-194, Jan. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2015.02.001>.
- [21] PRYCE, C. R.; FUCHS, E. Chronic psychosocial stressors in adulthood: studies in mice, rats and tree shrews. **Neurobiology of Stress**, [S. l.], v. 6, p. 94-103, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2016.10.001>.
- [22] RANKIN, C. H. et al. Habituation revisited: an updated and revised description of the behavioral characteristics of habituation. **Neurobiology of Learning and Memory**, [S. l.], v. 92, n. 2, p. 135-138, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2008.09.012>.
- [23] THOMPSON, R. F.; SPENCER, W. A. Habituation: a model phenomenon for the study of neuronal substrates of behavior. **Psychological Review**, [S. l.], v. 73, n. 1, p. 16-43, Jan. 1966. DOI: <https://doi.org/10.1037/h0022681>.

- [24] BELDA, X. et al. Stress-induced sensitization: the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and beyond. **Stress**, [S. I.], v. 18, n. 3, p. 269-279, May 2015. DOI: <https://doi.org/10.3109/10253890.2015.1067678>.
- [25] BHATNAGAR, S.; DALLMAN, M. F. Neuroanatomical basis for facilitation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to a novel stressor after chronic stress. **Neuroscience**, [S. I.], v. 84, n. 4, p. 1025-1039, 1998. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(97\)00577-0](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(97)00577-0).
- [26] HODES, G. E. A primer on sex differences in the behavioral response to stress. **Current Opinion in Behavioral Sciences**, [S. I.], Oct. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2018.03.012>.
- [27] CATHOMAS, F. et al. Neurobiology of resilience: interface between mind and body. **Biological Psychiatry**, [S. I.], v. 86, n. 6, p. 410-420, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2019.04.011>.
- [28] AVALO-ZULUAGA, J. H. et al. Witness stress promotes age and sex-dependent behavioral and neurofunctional alterations in the amygdaloid complex and dorsal hippocampus in mice. **Physiology & Behavior**, [S. I.], v. 299, p. 114966, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2025.114966>.
- [29] SCHMIDT, M. V. et al. A novel chronic social stress paradigm in female mice. **Hormones and Behavior**, [S. I.], v. 57, n. 4-5, p. 415-420, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.01.010>.
- [30] CANTO-DE-SOUZA, L. et al. Sex differences in behavioral and neural responses induced by witnessing social defeat stress during adolescence or adulthood in mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [S. I.], v. 138, p. 111313, Apr. 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2025.111313>.
- [31] REMES, O. et al. A systematic review of reviews on the prevalence of anxiety disorders in adult populations. **Brain and Behavior**, [S. I.], v. 6, n. 7, p. e00497, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1002/brb3.497>.
- [32] TSANG, A. et al. Common chronic pain conditions in developed and developing countries: gender and age differences and comorbidity with depression-anxiety disorders. **The Journal of Pain**, [S. I.], v. 9, n. 10, p. 883-891, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2008.05.005>.
- [33] ZHAI, X. et al. Multiple integrated social stress induces depressive-like behavioral and neural adaptations in female C57BL/6J mice. **Neurobiology of Disease**, [S. I.], v. 190, p. 106374, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2023.106374>.
- [34] DONNER, N. C.; LOWRY, C. A. Sex differences in anxiety and emotional behavior. **Pflugers Archiv: European Journal of Physiology**, [S. I.], v.

- 465, n. 5, p. 601-626, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00424-013-1271-7>.
- [35] BABICOLA, L. et al. Long term effects of early life stress on HPA circuit in rodent models. **Molecular and Cellular Endocrinology**, [S. I.], v. 521, p. 111125, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.111125>.
 - [36] LUO, P. X. et al. Sex-specific effects of social defeat stress on miRNA expression in the anterior BNST. **Behavioural Brain Research**, [S. I.], v. 401, p. 113084, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.113084>.
 - [37] DÍEZ-SOLINSKA, A. et al. Chronic defeat stress induces monoamine level dysregulation in the prefrontal cortex but not in the hippocampus of OF1 male mice. **Behavioural Brain Research**, [S. I.], v. 467, p. 115023, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2024.115023>.
 - [38] GOLDEN, S. A. et al. A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice. **Nature Protocols**, [S. I.], v. 6, n. 8, p. 1183-1191, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.361>.
 - [39] DA COSTA, V. F. et al. Emotional- and cognitive-like responses induced by social defeat stress in male mice are modulated by the BNST, amygdala, and hippocampus. **Frontiers in Integrative Neuroscience**, [S. I.], v. 17, p. 1168640, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnint.2023.1168640>.
 - [40] 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**, [S. I.], v. 158, p. 56-63, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neures.2019.10.008>.
 - [41] IÑIGUEZ, S. D. et al. Vicarious social defeat stress induces depression-related outcomes in female mice. **Biological Psychiatry**, [S. I.], v. 83, n. 1, p. 9-17, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.07.014>.
 - [42] WARREN, B. L. et al. Can I get a witness? Using vicarious defeat stress to study mood-related illnesses in traditionally understudied populations. **Biological Psychiatry**, [S. I.], v. 88, n. 5, p. 381-391, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2020.02.004>.
 - [43] SHELIN, Y. I. 3D MRI studies of neuroanatomic changes in unipolar major depression: the role of stress and medical comorbidity. **Biological Psychiatry**, [S. I.], v. 48, n. 8, p. 791-800, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0006-3223\(00\)00994-x](https://doi.org/10.1016/s0006-3223(00)00994-x).
 - [44] DE KLOET, E. R. et al. Stress and the brain: from adaptation to disease. **Nature Reviews Neuroscience**, [S. I.], v. 6, n. 6, p. 463-475, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrn1683>.

- [45] FORERO-CASTILLO, F. et al. Evaluation of the role of CRFergic neurotransmission in anxiety and BNST neuronal activity in male and female mice exposed to psychosocial stress. **Physiology & Behavior**, [S. l.], v. 304, p. 115160, 2026. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2025.115160>.
- [46] VALZELLI, L. Psychopharmacology of aggression: an overview. **International Pharmacopsychiatry**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 39-48, 1981. DOI: <https://doi.org/10.1159/000468473>.
- [47] MICZEK, K. A. et al. Aggressive behavioral phenotypes in mice. **Behavioural Brain Research**, [S. l.], v. 125, n. 1-2, p. 167-181, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(01\)00298-4](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(01)00298-4).
- [48] KEENEY, A. et al. Differential effects of acute and chronic social defeat stress on hypothalamic-pituitary-adrenal axis function and hippocampal serotonin release in mice. **Journal of Neuroendocrinology**, [S. l.], v. 18, n. 5, p. 330-338, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2006.01422.x>.
- [49] CRESTANI, C. C. Emotional stress and cardiovascular complications in animal models: a review of the influence of stress type. **Frontiers in Physiology**, [S. l.], v. 7, p. 251, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00251>.
- [50] HERMAN, J. P. Neural control of chronic stress adaptation. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, [S. l.], v. 7, p. 61, 2013. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2013.00061>.
- [51] WARREN, B. L. et al. Neurobiological sequelae of witnessing stressful events in adult mice. **Biological Psychiatry**, [S. l.], v. 73, n. 1, p. 7-14, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2012.06.006>.
- [52] BARBETTI, M. et al. Not just a witness: highlighting the utility of witness social defeat stress for the examination of neuroimmune-cardiovascular interactions across diverse populations. **Neurobiology of Stress**, [S. l.], v. 38, p. 100751, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2025.100751>.
- [53] PATE, B. S. et al. Site-specific knockdown of microglia in the locus coeruleus regulates hypervigilant responses to social stress in female rats. **Brain, Behavior, and Immunity**, [S. l.], v. 109, p. 190-203, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2023.01.011>.
- [54] RODRIGUEZ, M. et al. Chronic social defeat stress in prairie voles (*Microtus ochrogaster*): a preclinical model for the study of depression-related phenotypes. **Journal of Affective Disorders**, [S. l.], v. 351, p. 833-842, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jad.2024.02.001>.

- [55] MCCARTY, R. Learning about stress: neural, endocrine and behavioral adaptations. **Stress**, [S. I.], v. 19, n. 5, p. 449-475, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1080/10253890.2016.1192120>.
- [56] SANTOS, C. E. et al. Spontaneous recovery, time course, and circadian influence on habituation of the cardiovascular responses to repeated restraint stress in rats. **Pflugers Archiv: European Journal of Physiology**, [S. I.], v. 472, n. 10, p. 1495-1506, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02451-9>.
- [57] ROMERO, L. M. et al. The Reactive Scope Model - a new model integrating homeostasis, allostasis, and stress. **Hormones and Behavior**, [S. I.], v. 55, n. 3, p. 375-389, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2008.12.009>.
- [58] FINNELL, J. E. et al. Physical versus psychological social stress in male rats reveals distinct cardiovascular, inflammatory and behavioral consequences. **PLoS ONE**, [S. I.], v. 12, n. 2, p. e0172868, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172868>.
- [59] 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**, [S. I.], v. 9, p. 688, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpsy.2018.00688>.
- [60] HERMAN, J. P. et al. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical stress response. **Comprehensive Physiology**, [S. I.], v. 6, n. 2, p. 603-621, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1002/cphy.c150015>.
- [61] CERQUEIRA, J. J. et al. The stressed prefrontal cortex. Left? Right!. **Brain, Behavior, and Immunity**, [S. I.], v. 22, n. 5, p. 630-638, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2008.01.005>.
- [62] TRAINOR, B. C. et al. Sex differences in hormonal responses to social conflict in the monogamous California mouse. **Hormones and Behavior**, [S. I.], v. 58, n. 3, p. 506-512, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.04.008>..
- [63] AOKI, M. et al. Sex differences in behavioral and corticosterone responses to mild stressors in ICR mice are altered by ovariectomy in peripubertal period. **Zoological Science**, [S. I.], v. 27, n. 10, p. 783-789, 2010. DOI: <https://doi.org/10.2108/zsj.27.783>.
- [64] BANGASSER, D. A.; VALENTINO, R. J. Sex differences in stress-related psychiatric disorders: neurobiological perspectives. **Frontiers in Neuroendocrinology**, [S. I.], v. 35, n. 3, p. 303-319, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2014.03.008>.

- [65] BANGASSER, D. A. et al. Sex differences in corticotropin-releasing factor receptor signaling and trafficking: potential role in female vulnerability to stress-related psychopathology. **Molecular Psychiatry**, [S. I.], v. 15, n. 9, p. 877-904, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1038/mp.2010.66>.
- [66] IORGA, A. et al. The protective role of estrogen and estrogen receptors in cardiovascular disease and the controversial use of estrogen therapy. **Biology of Sex Differences**, [S. I.], v. 8, n. 1, p. 33, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13293-017-0152-8>.
- [67] GERSH, F. et al. Estrogen and cardiovascular disease. **Progress in Cardiovascular Diseases**, [S. I.], v. 84, p. 60-67, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2024.01.015>.
- [68] GINGERICH, S.; KRUKOFF, T. L. Estrogen in the paraventricular nucleus attenuates L-glutamate-induced increases in mean arterial pressure through estrogen receptor beta and NO. **Hypertension**, [S. I.], v. 48, n. 6, p. 1130-1136, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000248754.67128.ff>.
- [69] PATEL, S. et al. Characterization of a novel female chronic social defeat stress (femCSDS) model utilizing persistently aggressive CD1 parous females. **Neuropsychopharmacology**, [S. I.], v. 51, n. 8, p. 1432-1441, 2026. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41386-026-02359-5>.
- [70] BAPTISTA-DE-SOUZA, D. et al. Behavioral, hormonal, and neural alterations induced by social contagion for pain in mice. **Neuropharmacology**, [S. I.], v. 203, p. 108878, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108878>.
- [71] BRAGA-DIAS, A. C. et al. Social isolation induces sex-differentiated sensory-emotional pain responses and oxytocinergic receptors alterations in mice. **European Journal of Pain**, [S. I.], v. 29, n. 8, p. e70106, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1002/ejp.70106>.
- [72] SCOTT, J. P. Agonistic behavior of mice and rats: a review. **American Zoologist**, [S. I.], v. 6, n. 4, p. 683-701, 1966. DOI: <https://doi.org/10.1093/icb/6.4.683>.
- [73] CROWCROFT, P. Territoriality in wild house mice, *Mus musculus* L. **Journal of Mammalogy**, [S. I.], v. 36, p. 299, maio 1955.
- [74] KUSKE, J. X.; TRAINOR, B. C. Mean girls: social stress models for female rodents. **Current Topics in Behavioral Neurosciences**, [S. I.], v. 54, p. 95-124, 2022. DOI: https://doi.org/10.1007/7854_2021_247.
- [75] OSTRANDER, M. M. et al. Chronic stress produces enduring decreases in novel stress-evoked c-fos mRNA expression in discrete brain regions

of the rat. **Stress**, [S. l.], v. 12, n. 6, p. 469-477, 2009. DOI:
<https://doi.org/10.3109/10253890802641966>.

- [76] SMITH, J. P. et al. Intensity of anxiety is modified via complex integrative stress circuitries. **Psychoneuroendocrinology**, v. 63, p. 351–361, jan. 2016.

APÊNDICE A – ANÁLISE COMPLEMENTAR E DISCUSSÃO SUPLEMENTAR

A.1 Resultados Suplementares: Achados nos Grupos de Controle (TINA)

Para investigar a modulação por sexo nos estressores crônicos sem a influência do EDS, foi realizada uma ANOVA de dois fatores [Fator 1: Condição (ETDS, TINA ou *Naïve*); Fator 2: Sexo (Fêmea ou Macho)]. Esta análise revelou um efeito significativo do fator "condição" sobre os níveis de corticosterona [$F(2,30) = 3,416$; $p = 0,046$; $\eta^2p = 0,18$]. No entanto, não foi observado um efeito significativo do fator "sexo" [$F(1,30) = 0,239$; $p = 0,628$], nem uma interação significativa entre "sexo" e "condição" [$F(2,30) = 1,016$; $p = 0,374$].

O teste *post-hoc* de *Tukey* indicou que houve uma diferença significativa apenas entre os grupos TINA e *Naïve* ($p = 0,0184$). Isso indica que a exposição prolongada à interação social não agressiva (TINA) foi suficiente para elevar os níveis de corticosterona significativamente em comparação com o grupo controle *Naïve*, independentemente do sexo (Figura A1).

A investigação da responsividade do eixo HPA após a exposição prolongada e subsequente exposição a um novo estressor (NE), com modulação por sexo, foi conduzida por ANOVA de dois fatores. Esta análise revelou efeitos significativos para ambos os fatores (Figura A2). Foi observado um efeito principal significativo do fator "Sexo" [$F(1,30) = 8,530$; $p = 0,007$; $\eta^2p = 0,180$] e do fator "Condição" [$F(2,30) = 3,873$; $p = 0,032$; $\eta^2p = 0,163$]. Em contraste, a interação entre os fatores não foi estatisticamente significativa [$F(2,30) = 0,569$; $p = 0,572$].

O teste *post-hoc* de *Tukey* revelou que os animais no grupo TINA+NE apresentaram níveis de corticosterona significativamente mais baixos que os do grupo ETDS+NE ($p = 0,013$). Nenhuma outra diferença significativa foi observada entre as condições restantes (ETDS vs *Naïve*, $p = 0,086$; TINA vs *Naïve*, $p = 0,341$).

A.2 Discussão Suplementar

Enquanto a exposição aguda a um novo estressor tipicamente ativa o eixo HHA (Herman et al., 2003), nossos dados sugerem que a exposição prévia e prolongada à condição TINA pode ter resultado em um processo de dessensibilização ou atenuação desta resposta. A literatura sugere que a exposição repetida a certos tipos de estímulos, especialmente quando não envolvem um desafio físico direto ou ameaça iminente, pode resultar em uma adaptação da resposta aguda da corticosterona (75).

Além disso, o ato de testemunhar eventos (mesmo que não agressivos, como no TINA) pode gerar respostas complexas na corticosterona, as quais nem sempre se traduzem em um aumento contínuo, dependendo da natureza do estímulo e da duração da exposição (51,76). É possível que o protocolo TINA, ao decorrer dos 10 dias, tenha gerado uma habituação ao ambiente experimental e à interação social neutra. Diante disso, sugerimos que a ausência de

agressão direta e a natureza prolongada da exposição podem ter reforçado a percepção de segurança ou previsibilidade, atenuando a reatividade do eixo HHA frente ao desafio subsequente.

APÊNDICE B - TABELAS DE ESTATÍSTICA DESCRITIVA E RESUMO DOS EFEITOS

B.1 Dados Descritivos

As tabelas a seguir apresentam os valores absolutos de Média, Desvio Padrão (SD), Erro Padrão da Média (SE) e Coeficiente de Variação (CV) para os níveis plasmáticos de corticosterona (ng/mL) em todos os experimentos realizados.

Tabela 4 - Estatísticas descritivas para níveis plasmáticos de corticosterona no Experimento 1 (Estresse por EDS Agudo).

Sexo	Condição	N	Média (ng/mL)	SD	SE	CV (%)
Macho	EDS	6	405,66	108,13	44,14	26,7
Macho	INA	6	230,29	66,00	26,94	28,7
Macho	Naïve	6	150,20	71,57	29,21	47,6
Fêmea	EDS	6	236,82	10,56	43,11	44,6
Fêmea	INA	6	295,02	69,99	28,57	23,7
Fêmea	Naïve	6	101,86	45,54	18,59	44,7

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Tabela 5 - Estatísticas descritivas para níveis plasmáticos de corticosterona no Experimento 1 (Estresse por ETDS Agudo).

Sexo	Condição	N	Média (ng/mL)	SD	SE	CV (%)
Macho	ETDS	6	237,48	178,00	72,66	75,0
Macho	TINA	6	186,55	94,01	38,38	50,4
Macho	Naïve	6	150,20	71,57	29,21	47,6
Fêmea	ETDS	6	198,61	201,37	82,21	101,4
Fêmea	TINA	6	203,93	97,57	39,83	47,8
Fêmea	Naïve	6	101,86	45,54	18,59	44,7

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Tabela 6 - Estatísticas descritivas para níveis plasmáticos de corticosterona no Experimento 2 (Estresse Crônico - Machos e Fêmeas).

Sexo	Condição	N	Média (ng/mL)	SD	SE	CV (%)
Macho	EDS	6	687,28	166,50	67,97	24,2
Macho	INA	6	137,81	69,87	28,52	50,7
Macho	ETDS	6	159,71	86,67	35,38	54,3
Macho	TINA	6	200,82	159,07	64,94	79,2
Macho	<i>Naïve</i>	6	150,20	71,57	29,21	47,6
Fêmea	ETDS	6	189,07	83,74	34,18	44,3
Fêmea	TINA	6	270,12	127,88	52,21	47,3
Fêmea	<i>Naïve</i>	6	101,86	45,54	18,59	44,7

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Tabela 7 - Estatísticas descritivas para níveis plasmáticos de corticosterona no Experimento 3 (Reatividade ao Novo Estressor).

Sexo	Condição Prévia	N	Média (ng/mL)	SD	SE	CV (%)
Macho	EDS	6	388,97	70,82	28,91	18,2
Macho	INA	6	412,77	80,78	32,97	19,6

Sexo	Condição Prévia	N	Média (ng/mL)	SD	SE	CV (%)
Macho	ETDS	6	425,50	179,05	73,09	42,1
Macho	TINA	6	271,19	109,27	44,61	40,3
Macho	<i>Naïve</i>	6	274,71	129,95	53,05	47,3
Fêmea	ETDS	6	256,97	191,19	78,05	74,4
Fêmea	TINA	6	106,71	45,33	18,50	42,5
Fêmea	<i>Naïve</i>	6	210,68	106,68	43,55	50,6

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

B2 - Resumo Gráfico dos Efeitos

O quadro abaixo sintetiza as condições experimentais que resultaram em elevação significativa dos níveis de corticosterona em relação aos seus respectivos controles basais.

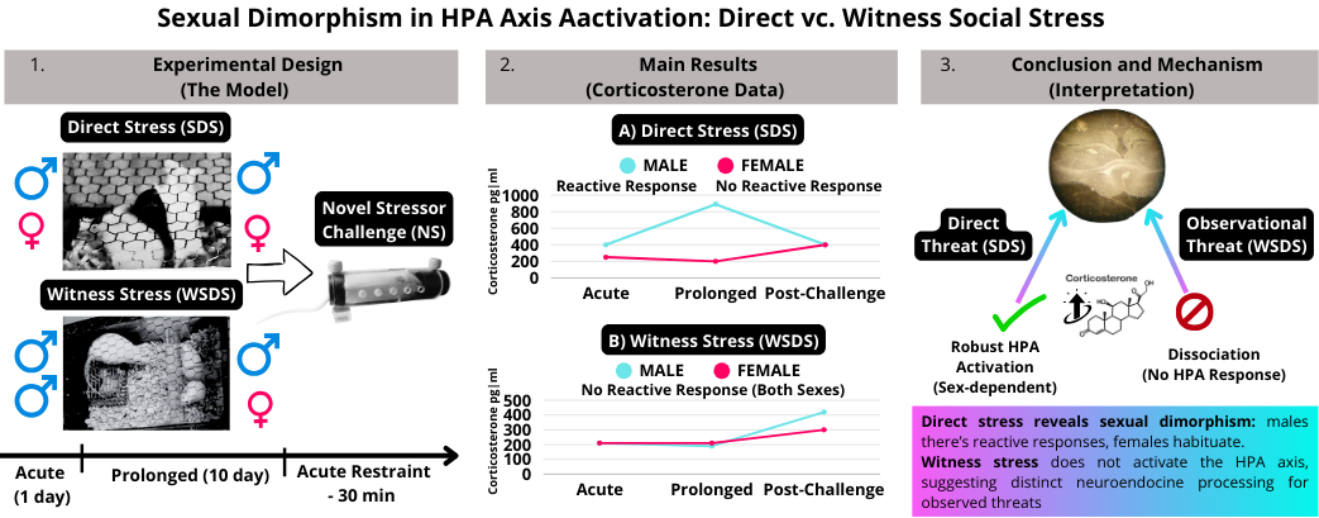
Quadro B1 - Resumo das respostas significativas de corticosterona por condição experimental e sexo.

Condição Experimental	Experimento 1 (Agudo)	Experimento 2 (Crônico)	Experimento 3 (Novo Estressor)
	Machos	Fêmeas	Machos
Intrusos (EDS)	X	X	X
Interação Não Agressiva (INA)		X	

Condição Experimental	Experimento 1 (Agudo)	Experimento 2 (Crônico)	Experimento 3 (Novo Estressor)
Testemunho de Derrota (ETDS)			
Testemunho de Interação (TINA)			
Naïve (Controle)			

Fonte: Elaborado pela autora (2025).
Legenda: (X) indica elevação significativa dos níveis de corticosterona em comparação ao nível basal ou ativação do eixo HHA frente ao desafio. Células vazias indicam ausência de resposta estatisticamente significativa ou habituação (no caso do EDS crônico em fêmeas).

Figura 8 - Resumo Gráfico.



Fonte: Elaborado pela autora (2025).
Legenda: Resumo de todo projeto em forma gráfica