



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



**Diferenças sexuais na mediação dos receptores CRFérgicos do
tipo 1 sobre efeitos comportamentais, hormonais e neurais
induzidos pelo estresse de derrota social crônico**

Discente: Daniel Enrique Gonzalez Escobar

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza

Araraquara

2026

DANIEL ENRIQUE GONZALEZ ESCOBAR

**DIFERENÇAS SEXUAIS NA MEDIAÇÃO DOS RECEPTORES CRFÉRGICOS DO
TIPO 1 SOBRE EFEITOS COMPORTAMENTAIS, HORMONAIS E NEURAIS
INDUZIDOS PELO ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL CRÔNICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP, Araraquara, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientador(a): Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza

Araraquara

2026

E74d

Escobar, Daniel Enrique Gonzalez.

Diferenças sexuais na mediação dos receptores CRFérgicos do tipo 1 sobre efeitos comportamentais, hormonais e neurais induzidos pelo estresse de derrota social crônico / Daniel Enrique Gonzalez Escobar. – Araraquara, 2026.
109 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Ricardo Luiz Nunes de Souza.

1. Ansiedade. 2. Acth. 3. Fator liberador de corticotrofina. 4. Estresse de derrota social crônico. 5. Diferenças sexuais. I. Souza, Ricardo Luiz Nunes de, orient. II. Título.

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas

UNESP - Campus de Araraquara

Vilma Bruna Mastelari Costa - CRB 8/10938

CAPES: 33004030078P6

Esta ficha não pode ser modificada



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Diferenças sexuais na mediação dos receptores CRFérgicos do tipo 1 sobre efeitos comportamentais, hormonais e neurais induzidos pelo estresse de derrota social crônico.

AUTOR: DANIEL ENRIQUE GONZALEZ ESCOBAR

ORIENTADOR: RICARDO LUIZ NUNES DE SOUZA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências, área: Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. RICARDO LUIZ NUNES DE SOUZA (Participação Presencial) Gabinete do Reitor e do Vice-reitor / UNESP / Reitoria
– RUNESP

Prof. Dr. RODRIGO MOLINI LEÃO (Participação Virtual)
Departamento de Farmacologia / Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

Prof. Dr. MARCELO TADEU MARIN (Participação Presencial)
Departamento de Fármacos e Medicamentos / UNESP / Câmpus de Araraquara - FCF

Araraquara, 06 de fevereiro de 2026.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 88887.939208/2024-00.

À FAPESP, pelo apoio financeiro, concedido por meio do Processo nº 2024/07023-0, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Primeiramente, queria agradecer as pessoas que confiaram em mim desde o começo deste caminho. Quero agradecer ao professor Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza, que me recebeu no laboratório de farmacologia de braços abertos, mesmo sem me conhecer. Quem desde o começo desta experiência esteve preocupado com o meu bem-estar e segurança aqui em Araraquara. Por ter me oferecido o mesmo trato e respeito que todos os seus alunos e por sempre ter algo novo para me ensinar. Ao professor Ricardo, lhe agradeço pela sua confiança, seu apoio e sabedoria. Quero agradecer ao professor Dr. Javier Leonardo Rico Rodriguez, professor da Faculdade de Psicologia da Fundação Universitária Konrad Lorenz, onde fiz a minha graduação. Agradeço ao professor Javier por ter me recebido no seu grupo de pesquisa em psicobiologia, por ter me acompanhado, orientado e motivado a perseguir a carreira acadêmica.

Agradeço ao pessoal que faz ou fez parte da equipe do laboratório de farmacologia da UNESP Araraquara, como o Dr. Lucas Canto de Souza, a Dra. Daniela Baptista de Souza, o Dr. Gessynger Moraes Silva e a todos aqueles que têm me orientado nos meus momentos de dúvida e me ajudado a construir o pesquisador que sou hoje e a pessoa que gostaria de ser amanhã. Aos meus colegas graduandos e pós-graduandos do laboratório de Farmacologia; como a Daphne, Mariana, Maria Vitoria, Katellyn, Rodrigo, Natália, Ana, Vitor e muitos mais, com quem tive a oportunidade de compartilhar conversas, risadas, ideias, conquistas e aprendizados. Desejo para eles sucesso nos seus projetos e ambições.

Agradeço muito ao grupo dos colombianos: Julián, Stephany, Silvia e Felipe. Estando todos tão longe de casa, agradeço ter tido a oportunidade de crescer e aprender com vocês; de compartilhar meus melhores e piores momentos. Agradeço por ter a oportunidade de considerá-los meus amigos e família. Levo vocês no meu coração. Agradeço ao Gustavo e à Fernanda, assim como a todos os alunos que me permitiram acompanhar o seu processo formativo. Espero me encontrar e trabalhar junto com todos.

A Beatriz, lhe agradeço pelo seu amor. Diante da imensidade do espaço e do tempo, é a minha maior alegria poder dividir um mundo com você. Finalmente, agradeço a minha mãe, Elsa Patrícia, pelo seu constante amor, paciência e apoio. Por ser a primeira pessoa em acreditar em mim e por ter trabalhado tanto para que eu tivesse a oportunidade de seguir os meus sonhos. Agradeço também ao meu irmão Juan Sebastián, o meu maior exemplo e inspiração. Por ter me ensinado a sentir orgulho de quem eu sou e por ter me mostrado a sempre colocar as necessidades dos outros antes das minhas próprias. Espero algum dia ser um pouco mais como eles.

RESUMO

A ansiedade consiste na preocupação orientada para estímulos aversivos não presentes no ambiente. Os transtornos de ansiedade apresentam alta prevalência global, acometendo percentual maior de mulheres do que de homens; são desencadeados por fatores fisiológicos, genéticos e sociais, como o estresse psicossocial. A resposta de estresse se baseia no funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-adrenais (HPA) e na neurotransmissão CRFérgica (i.e., mediada pelo fator liberador de corticotrofina), através dos seus receptores tipo 1 (CRFR1). O estresse de derrota social crônico (EDSC), é um modelo animal que permite estudar os efeitos do estresse sobre o comportamento defensivo de roedores e as suas bases neurais. O presente estudo investigou as diferenças sexuais na mediação dos receptores CRFérgicos do tipo 1, sobre o comportamento de tipo ansioso, os níveis de corticosterona e o padrão de ativação c-Fos do Córtex pré-frontal medial (CPFm) e do Nucleo leito da estria terminal (NLET), induzidos pelo EDSC. Utilizamos 223 camundongos Swiss-Webster adultos, 110 machos e 113 fêmeas. Após o EDSC, os animais foram avaliados no teste de interação social (TIS), seguido pelo labirinto em cruz elevado (LCE). Antes da exposição ao LCE, os animais receberam administração i.p. do antagonista dos receptores do tipo 1 do CRF (CP376395) nas doses de 20 ou 30 mg/kg. Após o LCE, céfalos e amostras sanguíneas foram coletados para quantificação da proteína c-Fos e dos níveis plasmáticos de corticosterona, respectivamente. Nossos resultados indicam que houve diferenças sexuais na interação social em resposta ao EDSC, nos comportamentos exploratórios relacionados à ansiedade e nos níveis de corticosterona e c-Fos, após a exposição ao EDSC e ao tratamento. No TIS, somente os machos apresentaram prejuízo na interação social. No LCE, o EDSC reduziu a exploração nos braços abertos em machos e fêmeas, porém, houve diferenças sexuais no efeito do fármaco. Nos machos, as doses de 20 e 30 mg/kg do CP376395 aumentaram a exploração dos animais expostos ao EDSC e à interação não agressiva (INA); no caso das fêmeas, apenas a dose de 30 mg/kg aumentou a exploração das previamente expostas ao EDSC. Ainda, o estresse reduziu os níveis plasmáticos de corticosterona das fêmeas, independentemente do tratamento. Quanto à quantificação da expressão da proteína c-Fos, o EDSC aumentou a sua expressão nos machos, efeito revertido pelas duas doses do CP376395. Nas fêmeas, observou-se padrão de ativação contrário ao dos machos, indicando desregulação do eixo HPA. Com isso, sugerimos o envolvimento da ativação do eixo HPA e da neurotransmissão CRFérgica na resposta comportamental, endócrina e neurofisiológica de machos e fêmeas submetidos ao EDSC, com maior suscetibilidade das fêmeas de apresentar desregulação da atividade neural em resposta ao EDSC.

Palavras-chave: Ansiedade; Fator liberador de corticotrofina; CP376395; c-Fos; CPFm; NLET; estresse de derrota social crônico; diferenças sexuais; camundongos.

ABSTRACT

Anxiety is characterized by an emotional response of anticipation towards the apparition of potential threats. Anxiety disorders are globally prevalent, with females exhibiting a higher incidence than males, presumably because of physiological, genetic, and social factors, such as psychosocial stress. The stress response is based on the activation of the HPA axis, CRF neurotransmission (i.e. mediated by corticotropin releasing factor), and its type 1 receptors (CRFR1) activity. Chronic Social Defeat Stress (CSDS) enables research on the effect of stress on rodent defensive behavior and its neural basis. In this study, we aim to investigate sex differences in the mediation of CRFergic type 1 receptors, on anxiety-like behavior, corticosterone expression and the c-Fos activity pattern of the medial prefrontal cortex (mPFC) and the bed nucleus of the stria terminalis (BNST), after CSDS exposure. 223 adult Swiss-Webster mice, 110 male and 113 female, underwent CSDS protocol. Stress was followed by the social interaction test (SIT) and the elevated plus maze (EPM). Before EPM testing, animals received an intraperitoneal injection of a CRF type 1 receptor antagonist (CP376395), at doses of 20 or 30 mg/kg. Following EPM testing, both encephalon and blood tissue were extracted for the quantification of c-Fos expression and plasma corticosterone levels, respectively. Results indicate the existence of sex differences in social interaction, anxiety-related exploratory behavior, corticosterone and c-Fos expression levels after CSDS and pharmacological treatment. Only males exhibited social avoidance during the SIT. CSDS induced anxiety-related reduction of open arms exploration in both males and females tested on the EPM; albeit with sex differences observed in the response to CP376395 treatment. While both drug doses increased open arm exploration in stressed and non-stressed males, only the 30 mg/kg dose was able to elevate exploration in CSDS females. Exposure to stress was able to decrease corticosterone production in females only, regardless of treatment. Regarding c-Fos expression analyses, males had an overall increase after CSDS exposure, effect reversed through pharmacological treatment. Females showed a c-Fos activation pattern opposite of what was seen in males, indicating HPA axis dysfunction. These results indicate that CSDS successfully modulated HPA axis activity and CRF neurotransmission, as evidenced by behavioral, endocrine and neurophysiological responses in both males and females, with higher female susceptibility for possible neural deregulation after CSDS exposure.

Keywords: Anxiety; corticotropin-releasing factor; CP376395; c-Fos; mPFC; BNST; chronic social defeat stress; sexual differences; mice.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Protocolo de interação não agressiva e estresse de derrota social crônico	23
Figura 2 – Protocolo de aplicação do teste de interação social (TIS)	25
Figura 3 – Labirinto em cruz elevado (LCE)	28
Figura 4 – Ilustrações do córtex pré-frontal medial e do núcleo Leito da estria terminal	30
Figura 5 – Protocolo experimental.	32
Figura 6 – Resultados do teste de interação social	37
Figura 7 – Fenotipagem da razão de interação de machos e fêmeas	38
Figura 8 – Análise das medias do TIS dos machos, separando sujeitos por fenotipagem	40
Figura 9 – Análise da atividade locomotora no LCE.	41
Figura 10 – Análise da porcentagem de entradas e tempo nos braços abertos do LCE	43
Figura 11 – Mensuração dos níveis de corticosterona	44
Figura 12 – Quantificação da expressão geral da c-Fos no CPFm	46
Figura 13 – Quantificação da expressão geral da c-Fos no NLET	47
Figura 14 – Quantificação da expressão da c-Fos no Cg1	49
Figura 15 – Quantificação da expressão da c-Fos no PrL	51
Figura 16 – Quantificação da expressão da c-Fos no IL	53
Figura 17 – Quantificação da expressão da c-Fos no NLETd	55
Figura 18 – Quantificação da expressão da c-Fos no NLETv	57
Figura 19 – Análise das medidas complementares do LCE (Apêndice A)	102
Figura 20 – Quantificação da c-Fos entre as subregiões do CPFm e NLET (Apêndice B)	105

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Distribuição dos grupos experimentais de machos e fêmeas.	31
Quadro 2 – Distribuição dos grupos experimentais dos machos, segundo a coleta de sangue e encéfalos.	33
Quadro 3 – Distribuição de grupos experimentais das fêmeas, segundo a coleta de sangue e encéfalos.	33
Quadro 4 – Distribuição dos grupos experimentais de machos e fêmeas, para análise das medidas complementares do LCE (Apêndice A)	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Definições operacionais das medidas espaço-temporais registradas no LCE 27

Tabela 2 – Definições operacionais das medidas complementares do LCE 100

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AMPC	Monofosfato de adenosina cíclico
BA	Braços abertos do LCE.
BF	Braços fechados do LCE.
Cg1	Córtex cingulado 1
CORT-AChE	Conjugado de corticosterona e acetilcolinesterase
CPFm	Córtex pré-frontal medial
CREB	Proteína de vinculação de elementos responsivos do AMPC
CRF	Fator liberador de corticotrofina
CRFR1	Receptores tipo 1 do fator liberador de corticotrofina
CRFR2	Receptores tipo 2 do fator liberador de corticotrofina
DPN	Dias pós-Nascimento
EBF	Entradas nos braços fechados
EDSC	Estresse de derrota social crônico
GR	Receptores de glicocorticoides
HPA	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, do inglês <i>Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis</i>
IEGs	Genes de resposta imediata, do inglês <i>immediate early genes</i>
INA	Interação não agressiva
IL	Córtex infralímbico
LCE	Labirinto em cruz elevado
NLET	Núcleo Leito da Estria Terminal
NLETd	Núcleo Leito da Estria Terminal dorsal
NLETv	Núcleo Leito da Estria Terminal ventral
PACAP	Poli-peptídeo ativador do adenilato ciclase hipofisário, do inglês <i>Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide</i>
PBS	Salina tamponada com fosfato
PFA	Paraformaldeído
PVN	Núcleo paraventricular do hipotálamo
PrL	Córtex pré-límbico
RI	Razão de interação
TIS	Teste de interação social
ZI	Zona de interação
ZA	Zona de Afastamento
%EBA	Porcentagem de entradas nos braços abertos
%TBA	Porcentagem de tempo gasto nos braços abertos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVO	21
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3	MATERIAL E METODOS	22
3.1	SUJEITOS	22
3.2	TRATAMENTO FARMACOLÓGICO	22
3.3	ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL CRÔNICO	23
3.3.1	Estresse de derrota social crônico em fêmeas	24
3.4	TESTE DE INTERAÇÃO SOCIAL (TIS)	26
3.5	LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE)	28
3.6	MENSURAÇÃO DE CORTICOSTERONA	30
3.7	IMUNOFLUORESCÊNCIA	31
3.8	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	33
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
4	RESULTADOS	37
4.1	TESTE DE INTERAÇÃO SOCIAL (TIS)	37
4.1.1	Tempo na Zona de Interação (ZI)	37
4.1.2	Tempo na Zona de Afastamento (ZA)	37
4.1.3	Razão de Interação (RI)	38
4.1.3.1	<i>Análise do TIS por fenotipagem</i>	41
4.2	LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE)	42
4.2.1	Entradas nos Braços Fechados (EBF)	42
4.2.2	Porcentagem de Entradas nos Braços Abertos (%EBA)	43
4.2.3	Porcentagem de Tempo gasto nos Braços Abertos (%TBA)	44
4.3	QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE CORTICOSTERONA	46
4.4	QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DA C-FOS	47
4.4.1	Expressão geral da proteína c-Fos no CPFm	47
4.4.1.1	<i>Expressão da proteína c-Fos nas subregiões do CPFm</i>	48
<u>4.4.1.1.1</u>	<u>Expressão da proteína c-Fos no Cg1</u>	48
<u>4.4.1.1.2</u>	<u>Expressão da proteína c-Fos no PrL</u>	50
<u>4.4.1.1.3</u>	<u>Expressão da proteína c-Fos no IL</u>	52
4.4.2	Expressão geral da proteína c-Fos no NLET	54
4.4.2.1	<i>Expressão da proteína c-Fos nas subregiões do NLET</i>	56
<u>4.4.2.1.1</u>	<u>Expressão da proteína c-Fos no NLETd</u>	56
<u>4.4.2.1.2</u>	<u>Expressão da proteína c-Fos no NLETv</u>	57
5	DISCUSSÃO	60
	CONCLUSÕES	81
	PERSPECTIVAS	83
	REFERÊNCIAS	84
	APÊNDICES	101
	APÊNDICE A – MEDIDAS COMPLEMENTARES DO LCE	101
	APÊNDICE B – COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO C-FOS ENTRE SUBREGIÕES DO CPFm E DO NLET	106
	ANEXOS	109
	ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO PELA COMISSÃO ÉTICA DE USO DE ANIMAIS DA UNESP ARARAQUARA	109

1. INTRODUÇÃO

A ansiedade, fenômeno que tem sido historicamente caracterizado como patologia, tem a sua origem no termo latino *angor*, que denota a sua propriedade de “constringir” ou perturbar a saúde e tranquilidade humanas, estando relacionada também à experimentação de pânico ou medo sem causa aparente (Crocq, 2015). Na atualidade, a ansiedade é definida como uma resposta emocional de preocupação ou de antecipação, orientada para estímulos ameaçadores futuros, não presentes no ambiente e que não representam um perigo imediato para o sujeito; consiste em resposta caracterizada por estados de vigilância e tensão aumentados (American Psychiatric Association, 2014; Measelle; Ostlund, 2018).

A ansiedade fisiológica é considerada normal e adaptativa, estando presente em diversas espécies, pois tem a função de garantir a sobrevivência dos animais ao promover comportamento de evitação de ambientes potencialmente aversivos (Perusini; Fanselow, 2015). Assim, a resposta de ansiedade constitui mudanças no comportamento exploratório, bem como maior expressão de comportamentos de evitação e fuga (Perusini; Fanselow, 2015; Padurariu et al., 2017). Entretanto, a ansiedade patológica, foco da presente pesquisa, é caracterizada por sinais e sintomas comportamentais, fisiológicos, cognitivos e emocionais, como a evitação de estímulos percebidos como aversivos e da interação social, além do padecimento de sintomas como a fadiga, náusea, irritabilidade, problemas de concentração e memória (Chand; Marwaha, 2023; National Institute of Mental Health, 2023).

A análise das bases evolutivas da ansiedade permite entender que a função última dos sintomas já mencionados, além de outros, como o aumento da frequência cardíaca e o aumento do foco atencional orientado para sinais relacionados à presença de ameaças, é aumentar a capacidade dos animais de detectar perigos no ambiente. Essa melhora na detecção de ameaças visa preparar o sujeito para um possível enfrentamento, por meio da organização e refinamento de mecanismos fisiológicos, comportamentais e cognitivos voltados à sobrevivência e à reprodução do animal (Bateson; Brilot; Nettle, 2011).

Por outro lado, a resposta de ansiedade, como definida pelo pesquisador Michael Fanselow, deve ser diferenciada, no contínuo de iminência de predação, de outras respostas de defesa, como o medo e o pânico. Enquanto a resposta de medo se dá em contextos de confronto iminente com uma ameaça, caracterizando-se pela resposta comportamental de congelamento, a resposta de pânico ocorre no confronto direto com a ameaça, sendo composta pelos

comportamentos de fuga ou luta; a ansiedade trata-se especificamente dos comportamentos de antecipação e evitação de possíveis confrontos com as ameaças (Fanselow, 1994; Perusini; Fanselow, 2015).

A apresentação desses fenômenos relacionados à ansiedade baseia-se em mecanismos como o descrito na teoria de detecção de sinais, segundo a qual um estímulo presente no ambiente deve ter intensidade mínima para ser considerado como uma potencial ameaça que desencadeie a resposta de ansiedade do sujeito, de evitar o confronto com o dito estímulo. A intensidade necessária para desencadear a resposta pode variar dependendo das propriedades do ambiente e do sujeito, sendo que animais humanos e não humanos expostos a ambientes de alto risco expressam a resposta de ansiedade com maior rapidez, intensidade e frequência do que animais que crescem em entornos seguros (Nesse, 2001; Nesse, 2005; Bateson; Brilot; Nettle, 2011).

Com base nessas definições, a ansiedade só pode ser classificada como patologia ou transtorno quando não se expressa de maneira proporcional às circunstâncias do ambiente, deteriorando a qualidade de vida. Essa qualidade de vida é definida como o nível de satisfação ou o bem-estar percebidos por uma pessoa nos contextos em que ela se desenvolve. Assim, tem-se reportado que a ansiedade patológica pode afetar negativamente o desempenho acadêmico, o envolvimento em contextos sociais e a qualidade da interação de uma pessoa no seu ambiente familiar (Quinn; Fanselow, 2006, Measelle; Ostlund, 2018; Nechita; Nechita; Motorga, 2018; Rodrigues, 2021).

De acordo com revisões recentes sobre a prevalência de doenças relacionadas à ansiedade, aproximadamente 359 milhões de casos relacionados ao padecimento patológico da ansiedade foram reportados no mundo, tendo também dados que apresentam prevalência global da ansiedade de 35,12% durante a pandemia da COVID-19 (Delpino et al., 2022; Wu et al., 2025). Adicionalmente, é sabido que a ansiedade apresenta alta prevalência em um amplo conjunto de populações específicas, como faixas etárias, pessoas que padecem alguns tipos de doenças respiratórias e neurológicas, funcionários da área de saúde, estudantes universitários e a população global afetada pela COVID-19 (Morin et al., 2020; Zhang et al., 2023; Ignacio et al., 2024; Laura et al., 2024; Ruiz-Villa et al., 2024; Zhu et al., 2022).

Com respeito à América Latina, foram reportados níveis de prevalência da ansiedade de 6,6 % no caso da Colômbia e 12,4% no Brasil, porcentagem que pode ascender até o 75,6% na sua população estudantil, sendo que o Brasil está entre os países com maior aumento na

prevalência desta doença no mundo, em comparação com décadas anteriores (Global Burden of Disease Collaborative Network, 2023; Laura et al., 2024 Wu et al., 2025). O alto nível de prevalência desta doença apresenta a necessidade de estudar a sua neurobiologia, assim como de desenvolver novas estratégias para o seu tratamento.

Na maioria dos estudos anteriormente citados, o sexo dos sujeitos foi um dos fatores mais determinantes na aparição de diferenças na prevalência da ansiedade, existindo maior tendência nas mulheres de apresentar ansiedade do que nos homens, com porcentagens de prevalência na população de 11,6% e 6,3%, respectivamente (Javaid et al., 2023; Yeretizian et al., 2023).

Existem também diferenças nos sinais e sintomas relacionados à ansiedade, que são experimentados por homens e mulheres. Enquanto há maior prejuízo na interação social nos homens, há maior prejuízo relacionado aos sintomas somáticos e autônomos nas mulheres, como fadiga e tensão muscular (Vesga-Lopez et al., 2008; Altemus; Sarvaiya; Epperson, 2014). Este dimorfismo sexual pode ser explicado por fatores fisiológicos, como as diferenças na conectividade de estruturas encefálicas como a amígdala, na composição da microbiota humana e no efeito da secreção de hormônios sexuais sobre o desenvolvimento e a comunicação de estruturas encefálicas responsáveis pela resposta de ansiedade (Chaudhary et al., 2023; Kim et al., 2023; Moisan, 2022); pelas diferenças na composição dos cromossomos sexuais sobre o funcionamento do sistema imune e na expressão genética no hipocampo (Green; Flash; Reiss, 2019; Mehta; Wang; Redei, 2013), bem como, por fatores de natureza social, econômica e cultural como as diferenças no estado socioeconômico da população (Farhane-Medina et al., 2022; Nunes et al., 2022). No contexto atual, existe tendência cada vez maior de investigar as diferenças sexuais no estudo da neurobiologia de transtornos como a ansiedade, assim como no desenvolvimento de fármacos para seu tratamento.

Um dos fatores de risco mais analisados no estudo do desenvolvimento da ansiedade é o estresse (Gilbar et al., 2022). O estresse é definido como a resposta comportamental e autônoma do organismo ante estímulos estressores que perturbem o seu estado base, tendo o objetivo de reestabelecer esse estado inicial do animal. Os estímulos estressores podem ser internos ou externos e de natureza física ou psicológica (Selye, 1936; Fulfort; Harbuz, 2005; Russell; Lightman, 2019).

Doenças relacionadas ao estresse apresentam prevalência de 36,5% na população global (Nochaiwong et al., 2021). O uso de modelos animais possibilita o estudo dos efeitos deste tipo

de estresse sobre o comportamento psicopatológico relacionado à ansiedade (Bourin, 2015). Neste sentido, a resposta de estresse pode ser induzida por estímulos físicos como a restrição forçada do movimento (Rodríguez-Palma et al., 2023), e por estímulos de natureza social, relacionados à interação direta com outros seres vivos da mesma espécie (Juth; Dickerson, 2020). Porém, os mecanismos neuroquímicos locais envolvidos no controle das respostas relacionadas à ansiedade ainda não são completamente compreendidos.

A resposta de estresse é regulada por meio de distintos processos fisiológicos, como ativação do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (eixo HPA, do inglês *Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis*) e da neurotransmissão de glicocorticoides em estruturas como o córtex pré-frontal medial (CPFm) e o núcleo leito da estria terminal (NLET) (Bale; Vale, 2004; Russell; Lightman, 2019; Mcklveen et al., 2019; Su et al., 2023). Como já mencionado, o eixo HPA regula a resposta neuroendócrina e comportamental a estímulos estressores que alterem o estado basal dos animais, através da comunicação entre o hipotálamo, a glândula pituitária ou hipófise e as glândulas adrenais.

Neste sistema, o hipotálamo compreende o controle neural da produção endócrina da glândula hipófise, por meio da expressão de fatores de liberação e inibição, como o fator liberador de corticotrofina (CRF, do inglês *corticotropin-releasing factor*), que é produzido nas células parvocelulares do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN, do inglês *paraventricular nucleus*) (Harris, 1948; Fulfort; Harbuz, 2005). Assim, no contexto da resposta de estresse, o aumento a produção do CRF no PVN leva ao aumento na produção da pro-opiomelanocortina e do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH, do inglês *adrenocorticotrophic hormone*), após estimulação dos corticotrofos da hipófise anterior ou adenoipófise pelo CRF. Finalmente, o ACTH é transportado no sangue até atingir a área fasciculata do córtex das glândulas adrenais, que produzem e liberam na corrente sanguínea glicocorticoides como o cortisol e a corticosterona (James; Few, 1985; Lightman; Young, 1988; Fulfort; Harbuz, 2005).

A liberação de glicocorticoides, induzida pela ativação do eixo HPA, modula e acompanha a resposta autônoma orientada à adaptação do animal ao estímulo que induz a resposta de estresse, que inclui aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial, redirecionamento do fluxo sanguíneo da pele e do trato digestório para os músculos esqueléticos, e maior atividade sensorial (Keller et al., 2006; Crestani, 2016; Herman et al., 2016).

O funcionamento do eixo é regulado pela ativação de receptores de glicocorticoides (GR) no sistema nervoso central, que agem como circuito fechado de retroalimentação negativa e reduzem a produção de glicocorticoides. Além disso, a neurotransmissão da proteína de ligação do CRF também auxilia na regulação do sistema, ligando-se a peptídeos como o CRF e reduzindo a sua biodisponibilidade no sistema nervoso central. Porém, a ativação prolongada do eixo HPA pode conduzir a atrasos nesse processo de retroalimentação, levando à conservação de altos níveis de glicocorticoides ou hipercortisolemia, o qual está relacionado com alterações patológicas e comportamentais (McEwen; Stellar, 1993; Fulford; Harbuz, 2005; Keller et al., 2006; Sterlemann et al., 2008; Hartmann et al., 2012; Deussing; Chen, 2018).

Existem outros neuropeptídeos que estimulam a ativação do eixo HPA e coordenam a resposta neurológica de estresse além do CRF: A urocortina 1, urocortina 2, urocortina 3 e a já mencionada proteína de ligação do CRF (Deussing; Chen, 2018). Quanto ao CRF, que é o peptídeo com maior afinidade pelos seus receptores em comparação aos anteriormente mencionados, é sintetizado tanto pelo PVN quanto pelo locus coeruleus, núcleo accumbens, bulbo olfatório e hipocampo; além disso, existem neurônios de CRF em áreas alvo de pesquisa sobre as bases biológicas da resposta de estresse e ansiedade, como a amígdala, o CPFm e o NLET (Keller et al., 2006; Miguel; Gomes; Nunes-De-Souza, 2014; Cipriano; Gomes; Nunes-De-Souza, 2016; Faria et al., 2016; Deussing; Chen, 2018).

Até o momento, dois receptores do CRF foram identificados no sistema nervoso central, os receptores tipo 1 (CRFR1) e tipo 2 (CRFR2). Ambos os receptores são da classe B de receptores vinculados à proteína Gs, a qual age pela expressão da adenilil ciclase, acumulação de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) e fosforilação da proteína de vinculação de elementos responsivos do AMPc (CREB, do inglês *cAMP responsive element-binding protein*) (Bale; Vale, 2004; Hauger et al., 2006; Keller et al., 2006; Miguel; Gomes; Nunes-De-Souza, 2014). Enquanto o CRF e a urocortina 1 apresentam afinidade pelo CRFR1, a urocortina 2 e principalmente a urocortina 3 apresentam afinidade pelo CRFR2 (Li et al., 2002; Bale; Vale, 2004; Dedic; Chen; Deussing, 2018; Deussing; Chen, 2018).

Mesmo que o CRFR1 e o CRFR2 sejam 70% idênticos, o CRF apresenta maior afinidade pelo CRFR1; além disso, o CRFR1 é distribuído em áreas do encéfalo fundamentais na resposta de estresse e do funcionamento do eixo HPA, como a hipófise anterior, o bulbo olfatório, o córtex, o NLET, a área cinzenta periaquedutal, a área tegmental ventral, a amígdala, o hipocampo, os núcleos da base, e o tálamo (Bale; Vale, 2004; Keller et al., 2006; Deussing;

Chen, 2018). Por outro lado, o CRFR2 é expresso no tecido muscular esquelético, em cardiomiócitos, no pâncreas, no hipotálamo ventromedial, e nos núcleos da rafe. Em comparação ao CRFR1, o CRFR2 apresenta menor expressão no PVN e no NLET, assim como expressão mínima na hipófise (Chalmers; Lovenberg; De Souza, 1995; Lovenberg et al., 1995; Huising et al., 2011; Kuperman et al., 2011; Kaur et al., 2017).

Estudos que compararam a ação do antagonismo do CRFR1 e do CRFR2 em modelos experimentais de comportamento relacionado à ansiedade, em roedores, acharam maior efetividade do bloqueio do CRFR1 na reversão de comportamento do tipo ansioso em protocolos de medo e estresse, sendo que o antagonismo do CRFR2 não produziu resultados consistentes nestes modelos (Radulovic et al., 1999; Kishimoto et al., 2000; Takahashi et al., 2001; Takahashi, 2001). Esses fatores, relacionados à distribuição e funcionalidade dos receptores, tornam ao CRFR1 no alvo de maior interesse na pesquisa das bases biológicas da resposta de estresse e no tratamento de processos fisiológicos e comportamentais relacionados à ansiedade, com base também nos estudos que ressaltaram a efetividade do seu antagonismo na reversão destes processos (Rassnick et al., 1993; Mensaghi et al., 1994; Zorrilla et al., 2002).

Atualmente, o estresse de derrota social constitui um dos principais modelos utilizados no estudo dos efeitos do estresse psicossocial no comportamento de animais não humanos. Neste procedimento, um animal denominado intruso é colocado na caixa moradia de um animal residente agressivo, que confronta o intruso com mordidas no dorso, na cauda e nas patas, resultando na submissão ou derrota do intruso. A derrota social pode ser aplicada tanto para o estudo dos efeitos do estresse agudo, efetuando um único ensaio do modelo (Miyanishi et al., 2023), como para investigações das consequências do estresse crônico, realizando-se até 10 sessões diárias do protocolo (Rodríguez et al., 2024). Este modelo tem permitido o estudo do efeito do estresse psicossocial sobre variáveis como a resiliência ao estresse social (Reguilón et al., 2022), o estudo dos efeitos ansiolíticos e ansiogênicos da administração de fármacos sobre o comportamento de modelos animais (Fusse et al., 2024), e sobre a relação entre comportamentos relacionados à ansiedade e o funcionamento de estruturas neuronais como o CPFm e o NLET (Faria; Laverde; Nunes-De-Souza, 2020; Victoriano et al., 2020; Santos-Costa et al., 2021; Da Costa et al., 2023).

Recentemente, têm sido desenvolvidos estudos sobre as diferenças sexuais na resposta ao estresse e à ansiedade. Um dos estudos avaliou o efeito de protocolos agudos e crônicos de estresse de restrição sobre o comportamento e os níveis de corticosterona de camundongos

C57BL/6J machos e fêmeas. Os achados indicam que comportamentos do tipo ansioso seriam encontrados unicamente nos machos testados no teste de campo aberto, enquanto foi observado aumento dos níveis de corticosterona tanto nos machos quanto nas fêmeas expostos ao estresse agudo (Nalepa et al., 2025).

Outros têm se focado na aplicação do modelo de derrota social para o estudo das diferenças sexuais, utilizando roedores fêmeas de diferentes espécies (Harris et al., 2018; Van Doeselaar et al., 2020; Pan et al., 2023). Tais estudos demonstraram alterações diferenciais em resposta ao estresse, como as relacionadas às mudanças no comportamento de ingesta e de interação social, apresentando maiores níveis de interação, após a derrota, unicamente nos camundongos fêmeas (Smith et al., 2023). Além disso, o estresse psicossocial pode reduzir o controle inibitório de comportamentos impulsivos e diminuir a neurotransmissão dopaminérgica no córtex pré-frontal de fêmeas adultas (Pantoja-Urbán et al., 2024). Adicionalmente, camundongos C57BL/6J fêmeas submetidas ao estresse de derrota social apresentaram comportamento de anedonia relacionado à depressão (Ito et al., 2024).

Entre as estruturas encefálicas envolvidas na resposta ao estresse de derrota social encontra-se o córtex pré-frontal medial (Fulfort; Harbuz, 2005; Cerqueira; Almeida; Sousa, 2008; Mcklveen et al., 2019). Pesquisas recentes têm avaliado os efeitos da ativação desta área na resposta de camundongos expostos ao estresse psicossocial, encontrando a existência do papel diferencial dos córtices pré-frontal medial direito e esquerdo na incrementação e atenuação das respostas ao estresse e da ansiedade, respectivamente; com foco na expressão de receptores NMDA de glutamato, da neurotransmissão noradrenérgica e da região pré-límbica do CPFm (Saito et al., 2024; Santos-Costa et al., 2021; Santos-Costa et al., 2016).

Do mesmo modo, tem sido observado o papel do NLET na modulação desta resposta emocional, pois a exposição de camundongos à derrota social permitiu observar ativação crônica de neurônios glutamatérgicos nesta área, além de sugerir existência de vias neurais entre o CPFm e o NLET, em que este último seria responsável pela expressão de comportamento de tipo ansioso de animais submetidos à estimulação direta do hemisfério direito do CPFm (Santos-Costa et al., 2021; Da Costa et al., 2023). O NLET também é modulado pela neurotransmissão do CRF, hormônio responsável pela produção de cortisol em humanos e corticosterona em camundongos, os quais participam da resposta emocional de ansiedade (O'Connor; Thayer; Vedhara, 2021). Neste contexto, foi observado que o bloqueio da proteína de ligação do CRF atenuou a evitação social em ratos expostos ao estresse de derrota social

(Vasconcelos et al., 2019). Além disso, a administração direta no NLET, do antagonista do CRFR1 CP376395, reverteu o efeito ansiogênico da derrota social de camundongos machos (Faria; Laverde; Nunes-De-Souza, 2020).

Assim, uma das ferramentas que permitem a medição das mudanças no nível de ativação destas estruturas encefálicas, em resposta a diversas condições experimentais, é a quantificação da expressão da proteína c-Fos. Esta proteína, localizada no núcleo de células principalmente do sistema nervoso central, constitui um dos genes de resposta imediata (IEGs, do inglês *immediate early genes*) mais estudados na literatura (Herrera; Robertson, 1996).

Os IEGs, como a c-Fos, tem a capacidade de ser expressos e reagir a estímulos do ambiente externo do animal, por meio de mecanismos como a ativação de receptores NMDA de glutamato, produzindo respostas rápidas e de curta duração que podem mudar a composição de outros genes dentro da célula e produzir alterações fenotípicas nela a longo prazo (Sheng; Greenberg, 1990; Herrera; Robertson, 1996).

Enquanto historicamente a expressão de c-Fos foi utilizada exclusivamente no estudo de modelos farmacológicos das bases neurais da epilepsia (Morgan et al., 1987), outros pesquisadores começaram a utilizar a proteína na investigação de como diversos agentes farmacológicos podem ativar áreas específicas do encéfalo e como essas estruturas criam vias de comunicação entre si (Dragunow; Faull, 1989). Tal é o caso das pesquisas sobre as bases neurobiológicas do estresse, que, após aplicação de protocolos experimentais de estresse por restrição e de derrota social aguda e crônica, acharam atividade relacionada à expressão da c-Fos em áreas do cérebro reativas ao CRF, como o PVN e o já mencionado NLET. Além disso, a administração direta do CRF no cérebro de roedores pode induzir o aumento na produção de c-Fos no tecido neural, efeito revertido pela administração de antagonistas do CRF (Arnold et al., 1992; Harbuz et al., 1993; Herrera; Robertson, 1996; Matsuda et al., 1996; Martinez; Phillips; Herbert, 1998).

Com isso, a quantificação dos níveis de expressão da c-Fos oferece a oportunidade de estudar o potencial efeito de mudanças na neurotransmissão CRFérgica, induzidas pelo estresse psicossocial crônico, sobre a atividade de áreas como o CPFm e o NLET de camundongos machos e fêmeas. Em consonância com esses achados neurais, estudos que analisaram os níveis de corticosterona mostraram que o estresse de derrota social crônico induz maiores níveis da substância no plasma sanguíneo dos animais. Este efeito é observado tanto em animais machos

como em fêmeas, independentemente do possível efeito do ciclo estral nas respostas ao estresse das fêmeas (Norman et al., 2015; Yohn et al., 2019; Newman et al., 2019).

Com base no papel da neurotransmissão CRFérgica sobre o funcionamento do CPFm e NLET na resposta ao estresse de derrota social, a presente pesquisa tem como hipótese que a modulação do sistema CRF, por meio da administração de agonistas e antagonista, altere os comportamentos de ansiedade, a expressão da proteína c-Fos no cérebro e dos níveis plasmáticos de corticosterona em camundongos machos e fêmeas submetidos ao estresse de derrota social, existindo diferenças sexuais nestes processos.

Assim, a alta prevalência global e regional de transtornos relacionados à ansiedade ressalta a relevância do seu estudo, além da necessidade de pesquisar como a resposta de estresse pode predispor à manifestação destas doenças. Além disso, torna-se relevante estudar o perfil comportamental e neuroendócrino da ansiedade em modelos animais, para aprofundar nossa compreensão das suas bases biológicas.

Uma das principais contribuições desta pesquisa para a ciência é a possibilidade de comparação entre sexos. Especificamente, a investigação dos efeitos do estresse psicossocial crônico sobre o comportamento, os níveis de ativação de áreas do cérebro e a expressão de glicocorticoides em fêmeas. O estudo neste sexo é importante, visto que, em humanos, as mulheres apresentam quase o dobro dos casos de ansiedade em comparação aos homens no contexto clínico, mas têm sido negligenciadas em pesquisas prévias, que privilegiam estudos em machos (Faria; Laverde; Nunes-De-Souza, 2020; Santos-Costa et al., 2021; Da Costa et al., 2023; Fusse et al., 2024). Deste modo, investigar a relação entre a neurotransmissão CRFérgica e a atividade da proteína c-Fos de áreas como o CPFm e o NLET, bem como os níveis de corticosterona, no contexto da resposta de estresse crônico frente a um estressor psicossocial, torna-se de interesse à ciência, em especial como esta relação ocorre com base nos diferentes perfis comportamentais agressivo e territorialista entre roedores do mesmo sexo.

Por outro lado, o presente trabalho contribui com a experimentação de potenciais novos fármacos para o tratamento farmacológico da ansiedade. Neste sentido, existem evidências que demonstraram ser o CP376395, antagonista seletivo dos receptores tipo 1 do CRF, capaz de atenuar o comportamento de tipo ansioso em roedores machos, em protocolos de administração intracerebral (Cipriano; Gomes; Nunes-De-Souza, 2016; Faria; Laverde; Nunes-De-Souza, 2020). Assim, o presente trabalho contribui para o estudo desses efeitos em protocolo de administração intraperitoneal, via sistêmica mais próxima da administração oral no contexto

clínico, além de investigar a eficácia deste fármaco em camundongos fêmeas, questão que tem sido pouco abordada em estudos prévios.

2. OBJETIVO

O objetivo geral desse estudo foi investigar as diferenças sexuais nos efeitos do antagonismo seletivo do CRFR1 no padrão de ativação do CPFm e do NLET, bem como nos comportamentos relacionados à ansiedade e os níveis de corticosterona em camundongos submetidos ao estresse de derrota social crônico.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- a) Analisar o efeito da administração sistêmica do antagonista de CRFR1 (CP376395) sobre o comportamento relacionado à ansiedade, no teste de interação social e no labirinto em cruz elevado, de camundongos submetidos ao estresse de derrota social crônico;
- b) Examinar o padrão de ativação do CPFm e do NLET, por meio da quantificação da proteína c-Fos, em camundongos submetidos ao estresse de derrota social crônico e tratados com antagonista do CRFR1;
- c) Avaliar os níveis de corticosterona no plasma sanguíneo dos animais expostos ao estresse crônico de derrota social e tratados com CP376395.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 SUJEITOS

Foram utilizados 223 camundongos, 110 machos e 113 fêmeas da linhagem Swiss-Webster (25-35g). Todos os animais foram adquiridos com 30 dias pós-natal (DPN) do “Centro de Pesquisa e Produção de Animais – CPPA” da Universidade Estadual Paulista (Botucatu/SP), com o início do protocolo experimental aos 60 DPN. Os animais foram transferidos e mantidos no biotério do Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (FCFAR-UNESP), sob regime controlado de temperatura (23 ± 2 °C), luz (ciclo claro/escuro de 12h, com início às 07:00 h), alojados em grupos de 3 sujeitos em caixas de polietileno ($12,5 \times 18,5 \times 9$ cm), e com livre acesso a comida e água, exceto durante os breves períodos experimentais. Todos os experimentos ocorreram durante a fase clara do dia, os testes comportamentais foram realizados aproximadamente duas horas após início da fase clara.

Os animais residentes machos foram alojados individualmente em caixas de polisulfona ($20,7 \times 21,6 \times 31,6$ cm), em condições ambientais semelhantes às já mencionadas, enquanto os camundongos residentes fêmeas foram alojadas em grupos de até 6 animais por caixa ($24 \times 25,1 \times 38,6$ cm). As diferenças no alojamento de residentes machos e fêmeas baseia-se no desenho do protocolo de estresse de derrota social crônico para cada sexo, pois ao contrário do discutido por Bartolomucci et al. (2009), foi observado pelo nosso grupo que residentes fêmeas alojadas em grupo apresentam comportamento agressivo mais intenso em comparação às residentes alojadas individualmente. Os procedimentos e protocolos experimentais foram avaliados e aprovados pela comissão ética de uso de animais da UNESP Araraquara (CEUA/FCF/CAR: 6923361128; ver Anexo A).

Dos 110 machos, 55 foram expostos ao estresse de derrota social crônico e 55 à interação não agressiva. No caso das 113 fêmeas, 56 foram submetidas ao estresse de derrota social e 57 à interação não agressiva. A distribuição desses sujeitos, de acordo com o tratamento e a coleta do tecido sanguíneo e encefálico, é descrita a seguir (seção 3.8).

3.2 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO

O composto CP376395 [cloridrato de N -(1-etilpropil) -3,6-dimetil-2-(2,4,6-trimetilfenoxi) -4-piridinamina] (TOCRIS; CAS No: 1013933-37-3) foi desenvolvido e estudado pela sua efetividade em antagonizar os receptores tipo 1 do CRF, diminuindo a

ativação do eixo HPA e bloqueando a expressão de adenilil ciclase nos neurônios CRFérgicos (Chen et al., 2008).

O CP376395 está envolvido na atenuação das respostas emocionais, comportamentais e fisiológicas ao estresse (Barretto-De-Souza et al., 2022; Oliveira et al., 2021). O efeito ansiolítico da administração intracerebral do antagonista foi observado em estruturas como a amígdala, CPFm e o NLET, aumentando o comportamento exploratório de camundongos expostos ao estresse de derrota social (Cipriano; Gomes; Nunes-De-Souza, 2016; Miguel; Gomes; Nunes-De-Souza, 2014; Faria; Laverde; Nunes-De-Souza, 2020). No presente estudo, o CP376395 foi dissolvido em substância salina (NaCl 0,9%) para sua administração intraperitoneal (i.p.). Além disso, a salina foi utilizada como substância controle à administração do fármaco. Conforme estudos prévios, o composto CP376395 foi administrado nas doses de 20 e 30 mg/kg, e no volume de 0,1 ml a cada 10 gramas de peso dos animais, uma hora antes do teste do labirinto em cruz elevado (Nipper et al., 2024; Newman et al., 2018; Fulenwider et al., 2021; Hwa et al., 2016).

Após os testes comportamentais, todos os sujeitos foram anestesiados com uretana (0,25 mg/kg), administrada no volume de 0,1 ml a cada 10 gramas de peso do animal. Em seguida, foi realizada punção intracardiaca para coleta do sangue ou a perfusão transcardiaca para coleta do cérebro dos sujeitos, visando à análise dos níveis de expressão de c-Fos. A uretana foi utilizada devido ao seu efeito anestésico sem alterações significativas no funcionamento do sistema circulatório e respiratório, bem como à ausência de efeito da substância no funcionamento do sistema nervoso central e em processos neuroquímicos e endócrinos (Maggi; Meli, 1986; Koblin, 2002).

3.3 ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL CRÔNICO (EDSC)

O protocolo de EDSC para os camundongos machos foi realizado conforme estudo prévio de nosso laboratório (Da Costa et al., 2023). Já para as fêmeas, foi aplicado conforme estudo piloto realizado no laboratório de farmacologia da FCF da UNESP Araraquara, conforme descrito a seguir (seção 3.3.1). Em ambos os sexos, o protocolo foi conduzido em três sessões. Na primeira, um animal denominado “intruso” foi colocado dentro de uma gaiola metálica perfurada (15,5 × 10,6 × 4,8 cm) e introduzido na caixa-moradia (20,7 × 21,6 × 31,6 cm) de um animal “residente” agressivo, por um período de cinco minutos. O objetivo desta primeira fase foi permitir interação sensorial indireta (visual, auditiva e olfativa) entre os animais, sem que houvesse confronto direto. Após esta fase, o intruso foi retirado da gaiola e

recolocado dentro da caixa do residente por mais 5 minutos para que ocorresse a interação agressiva, denominada como derrota social. Esta é caracterizada pela ocorrência da postura de submissão por parte do intruso; essa postura é marcada pelo levantamento das patas dianteiras em direção ao residente, retraindo a cabeça e ficando apoiado sobre as suas patas traseiras por pelo menos 3 segundos (Miczek; Yap; Covington III, 2008; Santos-Costa et al., 2021; Da Costa et al., 2023). O intruso não era retirado da caixa do residente assim que fizesse a postura de submissão. Porém, o contato entre os animais era interrompido se o intruso realizava a postura de submissão pelo menos 3 vezes, isto com o objetivo de evitar agressão excessiva por parte do residente. Finalmente, na terceira fase, o animal intruso foi recolocado na gaiola da primeira fase e permaneceu na caixa do residente por mais 5 minutos. Ao final do protocolo, os intrusos foram transportados para as suas caixas-moradia. Este processo de três fases foi repetido cada dia por um período de 10 dias consecutivos, com o objetivo de induzir estado de estresse crônico nos sujeitos experimentais, sendo igual para os animais intrusos machos e fêmeas (Figura 1).

3.3.1 Estresse de Derrota Social Crônico em Fêmeas

Além de outros modelos elaborados para a aplicação do protocolo de derrota social em animais fêmeas, que precisam da presença de camundongos machos como agressores (Takahashi et al., 2017), e com base em estudos que sugerem a existência de comportamento agressivo em animais fêmeas, que funciona por vias neurobiológicas diferentes à agressão nos machos (Hyde; Ebert, 1976; Kuchiiwa; Kuchiiwa, 2016), o nosso grupo de pesquisa conduziu um estudo piloto em que camundongos fêmeas intrusas foram submetidas à derrota social usando outra fêmea como residente. Para isso, nos embasamos em estudos prévios que observaram a tendência de roedores fêmeas de agredir outras fêmeas em situações de competição por acesso a comida (Fredericson, 1952). Além disso, tem se observado que fêmeas apresentam comportamento agressivo contra outras fêmeas de menor idade e peso, especialmente em ambientes familiares para as agressoras (Drickamer; Vandenberg, 1973; Ayer; Whitsett, 1980; Albert et al., 1988; Been; Gibbons; Meisel, 2019).

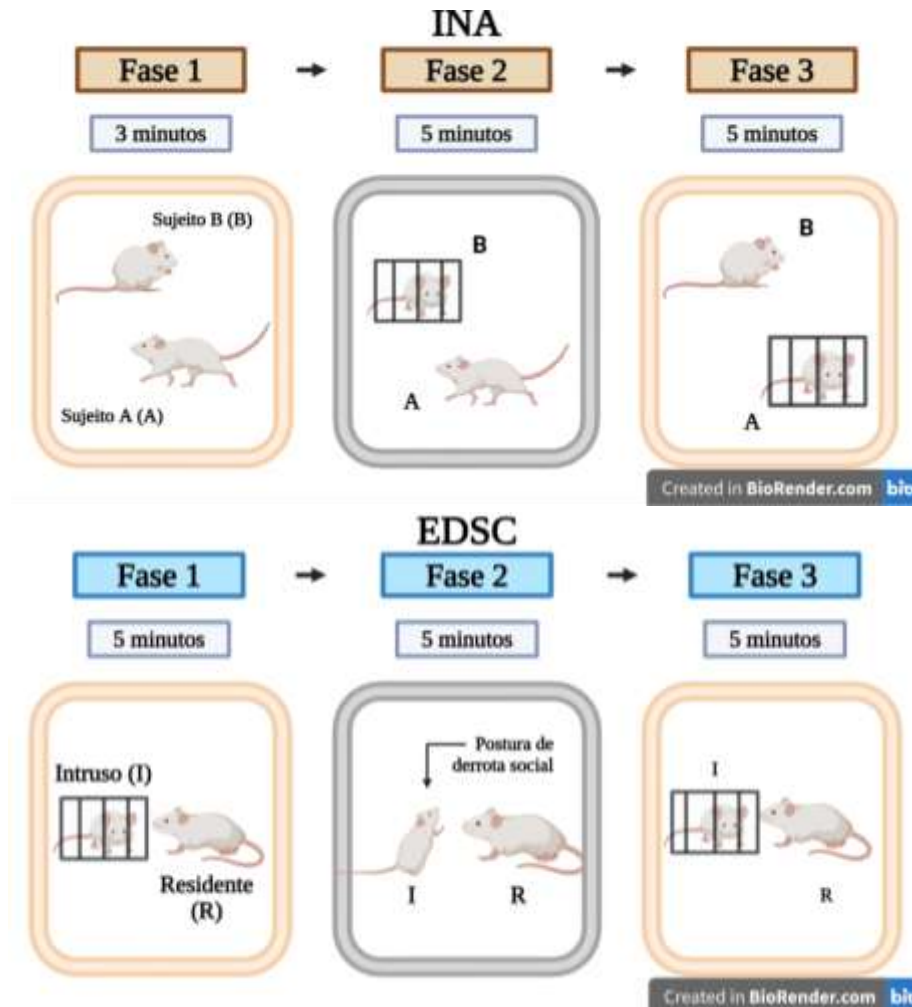
Após um período de habituação na sala experimental, cinco das seis residentes foram retiradas da caixa-moradia e introduzidas em uma caixa de reserva. Em seguida, a fêmea intrusa era colocada na caixa-moradia para execução das fases da derrota social já descritas. Na segunda fase da derrota, observou-se que as fêmeas apresentavam a postura de submissão já vista nos machos. Ao final do protocolo, a residente era colocada na caixa de reserva, para uma nova residente ser introduzida na caixa da derrota e repetir o processo com uma intrusa

diferente. Os resultados do piloto apresentaram padrão comportamental semelhante ao observado em machos testados no labirinto em cruz elevado, com redução da exploração dos braços abertos nos derrotados.

Assim, o protocolo de derrota social executado neste estudo foi idêntico para machos e fêmeas, exceto no alojamento dos residentes de cada sexo. Os residentes machos foram isolados enquanto as residentes fêmeas foram alojadas em grupos de entre 4 e 6 animais por caixa. Finalmente, não foi realizada análise de tecido para determinação da fase do ciclo estral das fêmeas, pois já foi demonstrada a ausência de efeito da variação das fases do ciclo no modelo de derrota social e da interação social das fêmeas (Harris et al., 2018).

Para ambos os sexos, como controle do EDSC, foi realizado o protocolo de interação não-agressiva (INA). A INA consistiu em três fases similares às já descritas para o protocolo de EDSC. Assim, dois animais da mesma caixa-moradia eram colocados em uma caixa idêntica às caixas dos residentes. Na primeira fase da INA, os animais interagiram diretamente sem mostrar comportamento agressivo por 3 minutos, esta fase tem menor duração que a segunda fase do protocolo de EDSC para reduzir o risco de apresentar agressão espontânea entre os animais da INA. Logo na segunda fase, um dos sujeitos era colocado na gaiola metálica e inserido de novo na caixa por 5 minutos. Finalmente, na última fase, o animal era retirado da gaiola e colocado na caixa enquanto o outro era colocado dentro da gaiola e dentro da caixa, por mais cinco minutos. Todos os procedimentos de EDSC e INA de machos e fêmeas foram realizados em sala experimental, com luz vermelha e iluminação de 5 lux, como descrito em estudos prévios (Da Costa et al., 2023). Tanto o EDSC quanto a INA foram realizadas em momentos diferentes da fase clara do dia, durante os dez dias do protocolo desta pesquisa, para evitar a habituação dos sujeitos ao horário de realização do experimento.

Figura 1 - Protocolo de Interação Não Agressiva (INA) e Estresse de Derrota Social Crônico (EDSC).
INA: Na primeira fase, dois animais da mesma caixa-mordida eram colocados em uma caixa-mordida idêntica às caixas dos residentes por três minutos. Na segunda fase, um dos sujeitos (B) foi colocado em uma gaiola metálica e reinserido na caixa por cinco minutos. Na terceira fase, o animal B era retirado da gaiola e colocado na caixa e o outro (A) era colocado na gaiola por cinco minutos. **EDSC:** Na primeira fase, de cinco minutos, um animal intruso (I) é colocado dentro de uma gaiola perfurada e introduzido na caixa de alojamento de um camundongo residente (R). Na segunda fase, o I é retirado da gaiola e colocado na caixa do R para que ocorra a interação agressiva por um período de 5 minutos, marcado pela ocorrência da “postura de derrota” pelo I. Finalmente, na terceira fase, o I é reintroduzido na gaiola como na primeira fase, por mais 5 minutos. Os protocolos foram repetidos durante 10 dias consecutivos, sendo iguais para animais machos e fêmeas.



Fonte: Elaboração própria, 2025.

3.4 TESTE DE INTERAÇÃO SOCIAL (TIS)

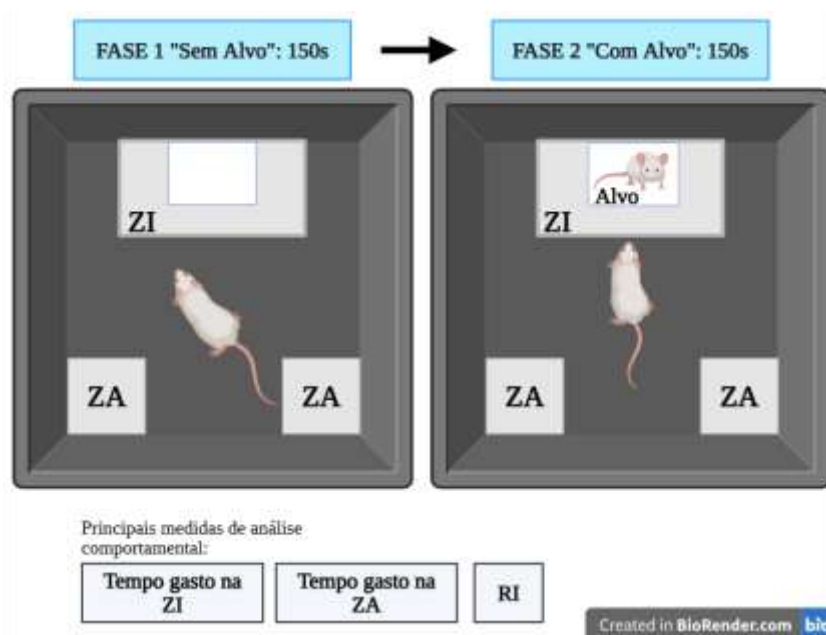
Conforme estudos prévios (Golden et al., 2011; Da Costa et al., 2023), 24 horas após o último dia de derrota, todos os animais intrusos foram avaliados no TIS. O teste foi realizado numa arena de piso em acrílico cinza opaco ($42 \times 42 \times 42$ cm); uma caixa de contenção ($10 \times 6 \times 15$ cm) foi colocada no centro de uma das paredes da arena, definindo a área ao redor da caixa de contenção como zona de interação (ZI, 14×24 cm). A arena possui nos cantos opostos à ZI as zonas de afastamento (ZA, 9×9 cm).

O TIS compreende duas fases no seu desenvolvimento: no início da primeira fase, o animal intruso foi colocado do lado oposto da ZI e permitiu-se ao animal explorar a arena por 150 segundos, com o objetivo de avaliar o tempo (em segundos) de exploração inicial das ZI e ZA. Na segunda fase, o intruso foi retirado da arena e um camundongo residente não familiar, que não interagiu com o intruso durante os 10 dias do EDSC (denominado como “alvo”), foi

colocado dentro da caixa de contenção da ZI. Na sequência, o intruso foi recolocado na arena, avaliando o tempo de exploração nas duas zonas por outros 150 segundos (Figura 2).

Neste teste comportamental, foram coletados o tempo gasto em segundos na ZI, o tempo gasto em segundos na ZA e a razão da interação social (RI), que foi calculada pela divisão do tempo gasto na ZI com o alvo pelo tempo de exploração da ZI sem o alvo. Valor de RI igual a 1 significa que o sujeito passou a mesma quantidade de tempo na ZI nas duas fases do teste. Valores da RI maiores que 1, indicam que o sujeito investiu mais tempo na ZI na presença do alvo, categorizando o sujeito como “resiliente”, pois o EDSC não teria afetado o seu comportamento de interação social. Por outro lado, animais com RI menor que 1 foram denominados “susceptíveis”, pois passaram mais tempo na ZI na ausência do alvo, implicando que o EDSC teria produzido um prejuízo na interação social dos sujeitos (Golden et al., 2011).

Figura 2 - Protocolo de aplicação do Teste de Interação Social (TIS). Na primeira fase, o animal intruso (I) é colocado na arena com zonas de interação (ZI) e afastamento (ZA), podendo explorar as duas zonas por 150 segundos. Na segunda fase, o intruso é retirado, enquanto um animal residente desconhecido “alvo” é colocado em uma caixa dentro da ZI. Finalmente, o intruso é colocado de volta na arena para fazer a exploração das zonas por mais 150 segundos. As principais medidas coletadas do TIS são o tempo gasto (em segundos) na ZI e ZA e a razão de interação (RI), que é calculada dividindo o tempo de exploração nas zonas de interação nas duas fases (ZI com alvo/ZI sem alvo).



Fonte: Elaboração própria, 2025.

3.5 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE)

O LCE consiste em evocar respostas defensivas relacionadas à ansiedade por meio da exposição de roedores a um ambiente não familiar. O teste se baseia na tendência observada no comportamento exploratório dos roedores de evitar espaços abertos, pois apresenta conflito de aproximação-evitação na exploração dos espaços protegidos e não protegidos do labirinto. O LCE tem sido utilizado para avaliação de comportamentos de tipo ansioso, atividade locomotora geral dos animais e tomada de decisões (Cruz; Frei; Graeff, 1994; Garcia; Cardenas; Morato, 2005; Garcia et al., 2005; Martinez; Garcia; Morato, 2005; Martinez et al., 2007).

O labirinto é farmacologicamente validado, por meio da avaliação do efeito da administração de substâncias ansiogênicas e ansiolíticas sobre o comportamento animal (Carobrez; Bertoglio, 2005; Lister, 1987; Cruz; Frei; Graeff, 1994; Garcia et al., 2005; Pinheiro et al., 2007), sendo utilizado também no estudo das consequências comportamentais e fisiológicas da exposição ao estresse crônico (Estanislau; Morato, 2005; Calpe-López et al., 2023; Martínez-Caballero et al., 2024).

O LCE consiste em dois braços abertos, também denominados áreas não protegidas ($30 \times 5 \times 0,25$ cm) e dois braços com paredes ou fechados ($30 \times 5 \times 15$ cm), unidos por uma plataforma central (5×5 cm). Tanto os braços fechados como a área central do LCE são denominados áreas protegidas. Os braços e a plataforma central do LCE são feitos em madeira e as paredes dos braços fechados de vidro claro ou transparente. O conjunto é elevado a 38,5 cm do solo da sala experimental. Cada animal recebeu administração de uma dose de CP376395 ou salina e, após 1 hora, foi transportado individualmente até a sala do teste.

No começo do teste, cada sujeito foi colocado na plataforma central do LCE com a cabeça orientada para um dos braços abertos, permitindo aos animais explorarem o aparato por um período de 5 minutos (Figura 3). As medidas comportamentais espaço-temporais registradas foram o número de entradas nos braços fechados (EBF), como medida para a análise da atividade locomotora do animal no labirinto e as medidas relacionadas à ansiedade: a porcentagem de entradas [(número de entradas ao braço aberto/ entradas totais) $\times$ 100] (%EBA) e de tempo [Tempo nos braços abertos/300] $\times$ 100] nos braços abertos (%TBA).

As medidas foram registradas com base em estudos prévios de análise fatorial, por análise de componentes principais. Os estudos determinaram às EBF como medida que responde a um fator de atividade locomotora, de modo que maior EBF significaria maior atividade locomotora no animal (Cruz; Frei; Graeff, 1994). A medida foi empregada para

monitorar o possível efeito do EDSC ou do tratamento farmacológico, sobre a locomoção ou mobilidade dos animais. A %EBA e %TBA foram categorizadas dentro de outro fator, que é interpretado como fator de ansiedade; de maneira que menor %TBA e %EBA correspondem a maior estado relacionado à ansiedade nos animais (Lister, 1987; Rodgers; Johnson, 1995). A definição operacional das medidas espaço-temporais coletadas no LCE é apresentada na Tabela 1.

Adicionalmente, foram consideradas medidas complementares no LCE, tanto sua definição operacional quanto sua análise, as quais estão descritas no Apêndice A (Figura 19).

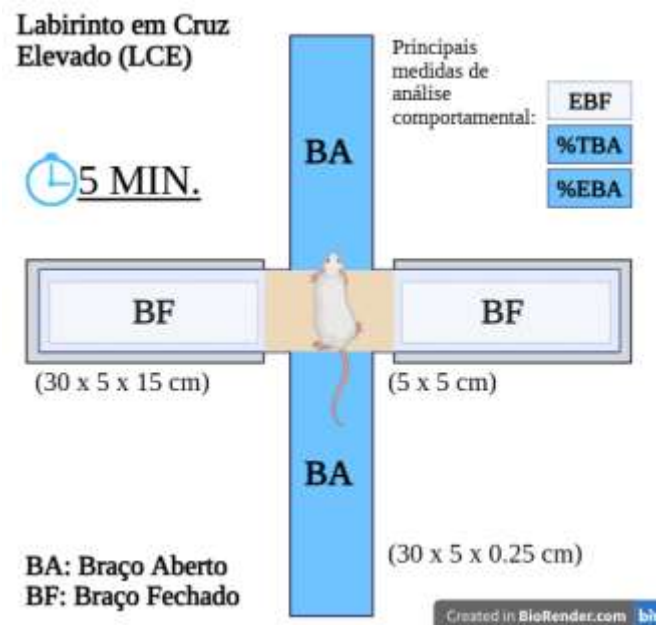
Tabela 1 - Tabela que apresenta as medidas espaço-temporais que foram registradas no LCE no presente estudo. Entradas nos Braços Fechados (EBF), porcentagem de Entradas nos Braços Abertos (%EBA) e porcentagem de Tempo gasto dos Braços Abertos (%TBA). Definições baseadas em análises fatoriais prévios (Rodgers; Johnson, 1995).

Medidas espaço-temporais do Labirinto em Cruz Elevado	
Comportamento	Definição Operacional
Entradas nos Braços Fechados (EBF)	Uma entrada nos braços fechados é marcada como o cruzamento das quatro patas do camundongo desde a área central do labirinto para um dos braços fechados ou protegidos do aparelho. O comportamento só acaba quando as quatro patas do sujeito cruzam de volta desde o braço fechado para a área central. É registrado o número total de entradas aos braços fechados durante os cinco minutos do teste.
Porcentagem de Entradas nos Braços Abertos (%EBA)	Uma entrada nos braços abertos é marcada como o cruzamento das quatro patas do camundongo desde a área central do labirinto para um dos braços abertos ou desprotegidos do aparelho. O comportamento acaba quando as quatro patas do sujeito cruzam de volta desde o braço aberto para a área central. É registrado o número total de entradas aos braços abertos do LCE durante os cinco minutos do teste, para posterior cálculo da porcentagem. A %EBA é calculada como $[(\text{número de entradas ao braço aberto} / \text{entradas totais}) \times 100]$.
Porcentagem de Tempo gasto nos Braços Abertos (%TBA)	Quantidade de tempo, em segundos, que o sujeito passa dentro de qualquer dos braços abertos ou desprotegidos no labirinto, isso é, com as quatro patas dentro da área designada aos braços abertos. O comportamento começa quando as quatro patas do animal cruzam da área central do LCE, para um dos braços abertos e conclui quando as quatro patas do sujeito cruzam de volta para a área central. A %TBA é calculada como $[\text{Tempo nos braços abertos} / 300] \times 100$.

Fonte: Elaboração própria, 2025.

Nos testes comportamentais descritos acima, as sessões experimentais foram gravadas por meio de sistema de filmagem, para posterior análise comportamental utilizando os softwares ANY-maze (Stoelting Co., Wood Dale-IL, EUA) e X-Plo-Rat 2005 (Tejada; Chaim; Morato, 2018).

Figura 3 - Labirinto em Cruz Elevado (LCE). Consta de dois braços fechados (BF), dois braços abertos (BA) e uma plataforma central. O animal é colocado na área central, com a sua cabeça orientada para um dos braços abertos, podendo explorar o labirinto por 5 minutos. As medidas utilizadas no teste foram o número de entradas nos braços fechados e as porcentagens de entradas e de tempo gasto nos BA. No protocolo experimental, os animais foram submetidos ao LCE uma hora após a administração i.p. do CP376395, nas doses de 20 e 30 mg/kg ou salina.



Fonte: Elaboração própria, 2025.

3.6 MENSURAÇÃO DE CORTICOSTERONA

A coleta de sangue foi feita por meio do procedimento de punção intracardíaca. Usa-se esta técnica para obtenção de volume suficiente do tecido para as análises endócrinas, com menor risco de perda da amostra durante os procedimentos de coleta e centrifugação (Donovan; Brown, 2005). O sangue coletado foi armazenado em recipientes individuais, 30 minutos após a sua extração, foi centrifugado por 15 minutos em 4000 rpm. Posteriormente, o tecido sanguíneo foi coletado e mantido em -80°C até que os níveis de corticosterona fossem analisados e quantificados pelo Kit ELISA. A coleta do tecido sanguíneo realizou-se às 09:00, no último dia do protocolo experimental.

O ensaio ELISA utilizado baseia-se na competição entre a corticosterona da amostra sanguínea dos sujeitos e um conjugado de corticosterona e acetilcolinesterase (CORT-AChE) para se vincular a um antissoro de corticosterona. Assim, quanto maior a quantidade de corticosterona nas amostras dos sujeitos, menor a quantidade de CORT-AChE que conseguirá se vincular ao antissoro.

O resultado dessa competição vincula-se aos anticorpos IgG anti-coelho de camundongo, fixos por meio de proteínas bloqueadoras, em cada um dos 96 poços da placa fornecida no kit. Posteriormente, foi acrescentado o reagente do Ellman, que reage com a AChE da CORT-AChE para produzir uma solução de cor amarela de absorvência de 412 nm. Quanto maior a quantidade de corticosterona no ensaio, menor a intensidade da cor da reação. O resultado foi finalmente analisado no espectrofotômetro, para quantificação dos níveis de corticosterona das amostras (Item No. 501320. Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA).

3.7 IMUNOFLUORESCÊNCIA

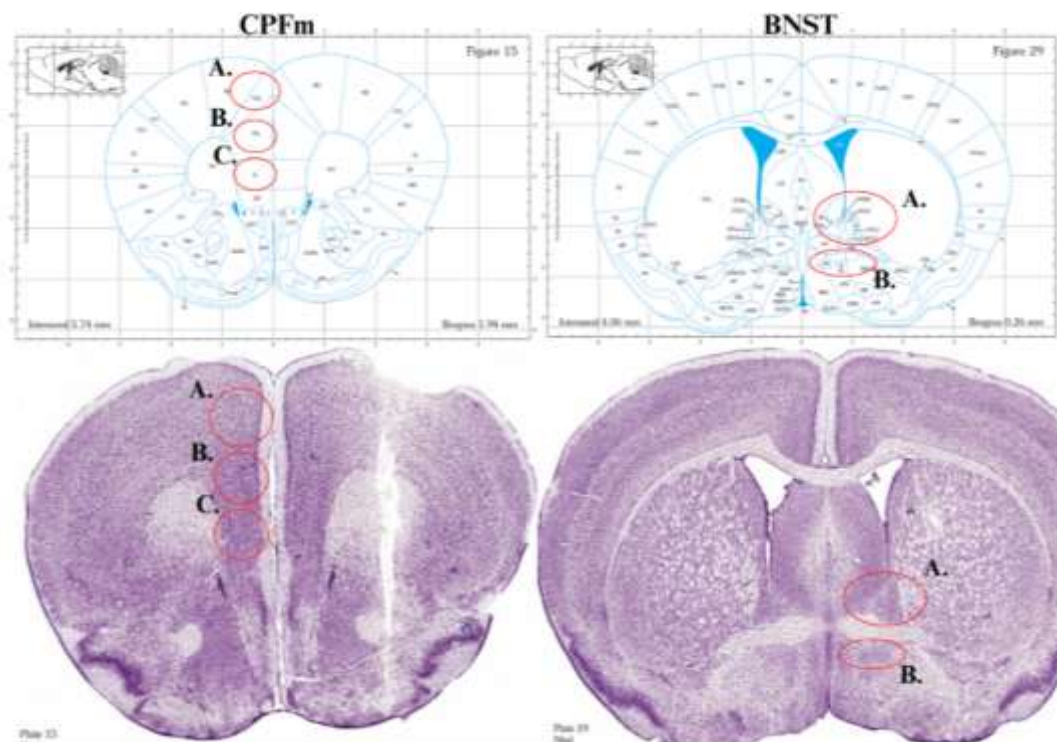
Aproximadamente 90 minutos após o LCE, os camundongos foram anestesiados com uretana na dose de 0,25 mg/kg e perfundidos com solução salina tamponada com fosfato (PBS), seguida por paraformaldeído 4% (PFA). Os encéfalos removidos foram pós-fixados em PFA por uma hora e transferidos para solução de sacarose 30% em PBS, para finalmente serem armazenados a 4°C. O PFA 4% é utilizado pela sua capacidade de endurecer o tecido por meio na formação de pontes de metileno entre as proteínas do cérebro dos animais, o qual diminui a autólise dos tecidos e facilita o processo de seccionamento dos encéfalos no criostato, processo que é intensificado pelo uso da sacarose 30% (Kiernan, 2000). Após dois dias, os encéfalos foram fatiados no criostato, em secções coronais de 35-40 µm de espessura para a obtenção de fatias do CPFm e do NLET (Figura 4), que foram logo armazenadas em duplicata em placas de 24 poços em solução anticongelante (etilenoglicol 30 ml; sacarose 30 g/100ml PBS), para posteriormente serem congeladas e mantidas a -80 °C.

Após descongeladas, as fatias coronais foram lavadas 3 vezes, de 10 minutos cada, com PBS e, em seguida, incubadas com solução bloqueadora - veículo (soro de cabra 10%; Triton X-100 0,3% dissolvidos em PBS) por uma hora, à temperatura ambiente. Após o bloqueio, as fatias foram incubadas com o anticorpo primário (1:1000; anti-c-Fos, Cat. No. EPR15905; Abcam.) em solução veículo por 24 horas, a 4°C. Após a primeira incubação, as fatias foram lavadas com PBS por 6 vezes de 5 minutos e incubadas com o anticorpo secundário (1:1000; Alexa Fluor 488; ab175473; Abcam), que foi diluído em solução veículo e incubado por 24 horas a 4°C. Em seguida, as fatias foram lavadas com PBS por 3 vezes de 5 minutos e montadas em lâminas silanizadas, destinando uma lâmina exclusivamente para fatias do CPFm e uma lâmina exclusivamente para fatias do NLET, para cada sujeito. Finalmente foram seladas com Fluoromount-G com DAPI (Invitrogen; 00-4959-52) e lamínula.

A imunomarcaco da proteína c-Fos foi capturada usando uma câmera microscópica Axiocam 503 colorida (Zeiss), acoplada ao microscópio Axio Imager 2, com sistema para observao de luz visível (iluminador halógeno, 127V, 100W) e marcao epifluorescente (iluminador HXP 120V, filtros com transmitância 430-750 nm, 530-850 nm e 615-800 nm; Carl Zeiss microscopy, LLC, Thornwood-NY, USA) e visualizadas por meio do software Zen Pro 2.0 (Carl Zeiss microscopy, LLC, Thornwood-NY, USA).

Foram tomadas fotos de até 3 fatias por lâmina. Para cada fatia, foram tomadas fotos de cada subárea relevante em ambos os hemisférios (Figura 4). Para o CPFm, foram tomadas fotos do córtex cingulado 1 (Cg1), córtex pré-límbico (PrL) e córtex infralímbico (IL); para o NLET, foram coletadas fotos do NLET dorsal (NLETd) e ventral (NLETv) (Franklin & Paxinos, 2007). A quantificao da fluorescência foi realizada para cada fatia, por meio do cálculo da média do número de células c-Fos positivas das 3 fatias nas áreas de interesse, utilizando o software ImageJ 1.54r (National Institutes of Health, Bethesda-MD, USA).

Figura 4 - Imagens referentes a fatias coronais do Córtex Pré-Frontal medial (CPFm) e do Núcleo Leito da Estria Terminal (NLET), com as subáreas que foram consideradas na quantificao da expressão da proteína c-Fos. CPFm. **A)** Córtex Cingulado 1 (Cg1). **B)** Córtex Pré-Límbico (PrL). **C)** Córtex Infralímbico (IL). NLET. **A)** NLET Dorsal (NLETd). **B)** NLET Ventral (NLETv) (Franklin & Paxinos, 2007).



Fonte: Elaborao própria, 2025.

3.8 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

No presente estudo, conforme representado no Quadro 1, os sujeitos foram distribuídos em 6 grupos de animais machos e 6 grupos de animais fêmeas: Intrusos da interação não agressiva tratados com solução salina (Grupo 1 de machos e fêmeas), com CP376395 na dose de 20 mg/kg (Grupo 2 de machos e fêmeas), com CP376395 na dose de 30 mg/kg (Grupo 3 de machos e fêmeas). Intrusos da derrota social tratados com solução salina (Grupo 4 de machos e fêmeas), com CP376395 na dose de 20 mg/kg (Grupo 5 de machos e fêmeas) e com CP376395 na dose de 30 mg/kg (Grupo 6 de machos e fêmeas).

Parte dos sujeitos experimentais, tanto machos quanto fêmeas, foi submetida à perfusão para retirada de encéfalos e análise da quantificação da expressão da c-Fos no CPFm e no NLET; enquanto outros foram submetidos à punção intracardiaca, para coleta de tecido sanguíneo para quantificação dos níveis plasmáticos de corticosterona. Todos os procedimentos experimentais aconteceram após que os animais concluíram o LCE.

Quadro 1- Distribuição de grupos experimentais de machos e fêmeas no estudo.

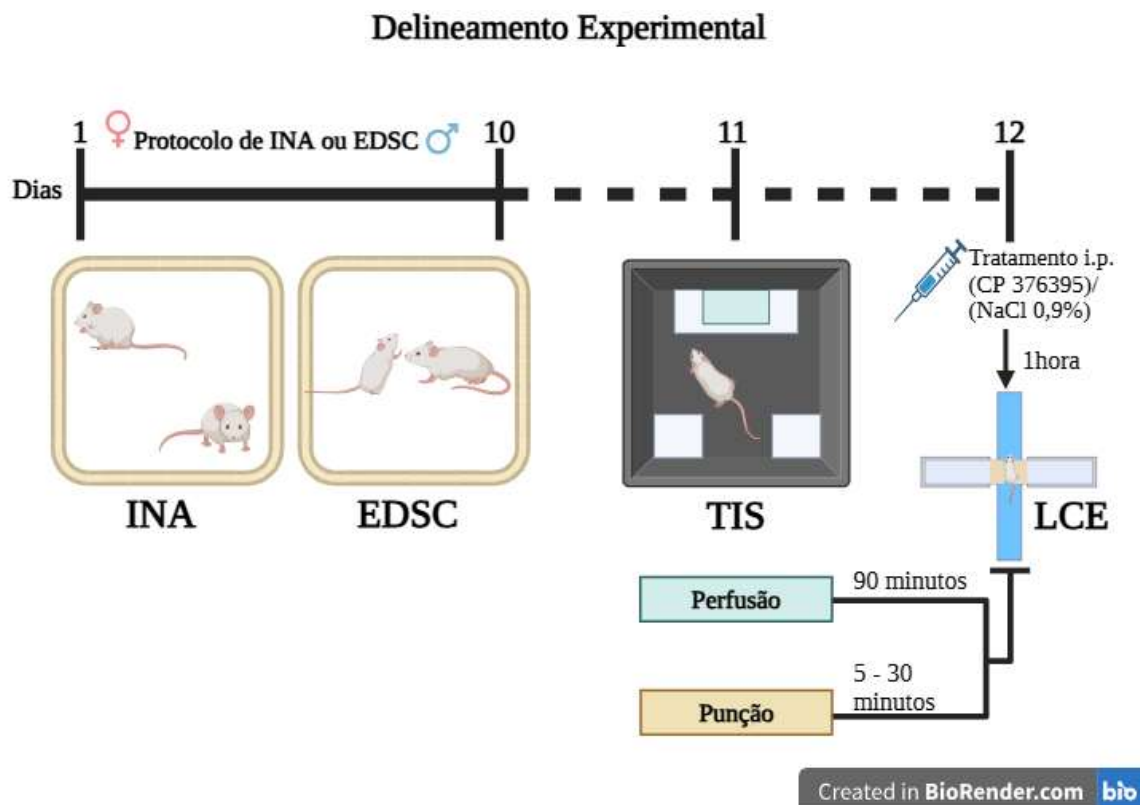
Machos n= 110	Fêmeas n= 113
Grupo 1: INA Salina (NaCl 0,9%) n= 20	Grupo 1: INA Salina (NaCl 0,9%) n= 22
Grupo 2: INA CP376395 dose 20 mg/kg n= 18	Grupo 2: INA CP376395 dose 20 mg/kg n= 22
Grupo 3: INA CP376395 dose 30 mg/kg n= 17	Grupo 3: INA CP376395 dose 30 mg/kg n= 13
Grupo 4: EDSC Salina (NaCl 0,9%) n= 22	Grupo 4: EDSC Salina (NaCl 0,9%) n= 20
Grupo 5: EDSC CP376395 dose 20 mg/kg n= 19	Grupo 5: EDSC CP376395 dose 20 mg/kg n= 23
Grupo 6: EDSC CP376395 dose 30 mg/kg n= 14	Grupo 6: EDSC CP376395 dose 30 mg/kg n= 13

Fonte: Elaboração própria, 2025.

De acordo com o protocolo delineado para o presente estudo, todos os sujeitos foram submetidos a 10 dias de sessões de EDSC, nos grupos experimentais, ou de INA, nos grupos controle. Vinte e quatro horas após o último dia da derrota, todos os animais passaram pelo TIS (dia 11) para avaliação do comportamento de interação social. No dia seguinte (dia 12), os camundongos machos e fêmeas foram tratados por via intraperitoneal (i.p.) com salina (NaCl 0,9%) ou com o antagonista do receptor tipo 1 do CRF (CP 376395), nas doses de 20 e 30 mg/kg, respectivamente (Fulenwider et al., 2021; Hwa et al., 2016).

Uma hora após administração das substâncias, os sujeitos foram submetidos ao LCE, para registro e avaliação de comportamentos relacionados à atividade locomotora e à ansiedade. Os sujeitos destinados à quantificação da c-Fos foram perfundidos 90 minutos após exposição ao LCE, para posterior retirada de encéfalos, com base em estudos prévios que relatam que a proteína da c-Fos atinge seu maior nível de expressão entre 20 e 90 minutos após protocolo experimental (Perrin-Terrin et al., 2016); enquanto os animais destinados a mensuração dos níveis de corticosterona passaram pela punção intracardíaca entre 5 e 30 minutos após o LCE, com base em estudo prévio que observou maiores níveis de corticosterona 5 minutos após estresse (Amaral; Gomes; Nunes-De-Souza, 2010), para posterior centrifugação e quantificação plasmática dos níveis do corticosterona por meio do kit ELISA (Figura 5).

Figura 5 - Protocolo experimental. Os sujeitos foram submetidos a 10 dias de estresse de derrota social crônico (EDSC) ou interação não agressiva (INA). No dia 11, os animais passaram pelo teste de interação social (TIS) e no dia 12, os animais receberam administração i.p. do fármaco CP376395, nas doses de 20 e 30 mg/kg, ou salina. 1 hora depois da administração, os animais passaram pelo labirinto em cruz elevado (LCE). Enquanto alguns sujeitos foram perfundidos 90 minutos após a conclusão do LCE para remoção de encéfalos, outros foram submetidos à punção intracardíaca para coleta do sangue para mensuração dos níveis plasmáticos de corticosterona.



Fonte: Elaboração própria, 2025.

A distribuição dos animais em grupos, de acordo com a coleta do tecido sanguíneo e encefálico para quantificação da expressão da corticosterona e da c-Fos, é descrita para os machos (Quadro 2) e fêmeas (Quadro 3).

Quadro 2- Distribuição de grupos experimentais dos machos, de acordo à coleta de sangue, para análise de da expressão de corticosterona; ou de encéfalos, para análise da expressão da c-Fos.

Machos c-Fos, n = 29	Machos Corticosterona, n = 35
Grupo 1: INA Salina (NaCl 0,9%) n = 4	Grupo 1: INA Salina (NaCl 0,9%) n = 7
Grupo 2: INA CP376395 dose 20 mg/kg n = 4	Grupo 2: INA CP376395 dose 20 mg/kg n = 5
Grupo 3: INA CP376395 dose 30 mg/kg n = 4	Grupo 3: INA CP376395 dose 30 mg/kg n = 6
Grupo 4: EDSC Salina (NaCl 0,9%) n = 6	Grupo 4: EDSC Salina (NaCl 0,9%) n = 5
Grupo 5: EDSC CP376395 dose 20 mg/kg n = 6	Grupo 5: EDSC CP376395 dose 20 mg/kg n = 6
Grupo 6: EDSC CP376395 dose 30 mg/kg n = 5	Grupo 6: EDSC CP376395 dose 30 mg/kg n = 6

Fonte: Elaboração própria, 2025.

Quadro 3- Distribuição de grupos experimentais das fêmeas, de acordo à coleta de sangue, para análise de da expressão de corticosterona; ou de encéfalos, para análise da expressão da c-Fos.

Fêmeas c-Fos n= 24	Fêmeas Corticosterona n= 33
Grupo 1: INA Salina (NaCl 0,9%) n= 4	Grupo 1: INA Salina (NaCl 0,9%) n= 6
Grupo 2: INA CP376395 dose 20 mg/kg n= 4	Grupo 2: INA CP376395 dose 20 mg/kg n= 5
Grupo 3: INA CP376395 dose 30 mg/kg n= 4	Grupo 3: INA CP376395 dose 30 mg/kg n= 5
Grupo 4: EDSC Salina (NaCl 0,9%) n= 4	Grupo 4: EDSC Salina (NaCl 0,9%) n= 6
Grupo 5: EDSC CP376395 dose 20 mg/kg n= 4	Grupo 5: EDSC CP376395 dose 20 mg/kg n= 5
Grupo 6: EDSC CP376395 dose 30 mg/kg n= 4	Grupo 6: EDSC CP376395 dose 30 mg/kg n= 6

Fonte: Elaboração própria, 2025.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Sobre os dados referentes ao TIS de machos e fêmeas, o tempo gasto na ZI e o tempo gasto na ZA (em segundos) foram submetidos à análise de variância ANOVA bifatorial para medidas repetidas (fator 1: presença ou não do alvo; fator 2: condição INA ou EDSC). Para a análise da RI, foi realizado o teste t de Student para comparação da razão de interação dos animais submetidos à INA ou à EDSC. Adicionalmente, os animais expostos ao EDSC foram separados em grupos de animais de fenótipo resiliente ou suscetível de acordo com o seu RI, sendo realizada ANOVA de uma via para comparação da interação entre os fenótipos e os animais controle (fator 1: Fenótipo controle, resiliente ou suscetível).

Os resultados do LCE e dos níveis plasmáticos de corticosterona de machos e fêmeas, foram submetidos à análise de variância ANOVA bifatorial (fator 1: condição INA ou EDSC; fator 2: tratamento salina (NaCl 0,9%), CP376395 na dose de 20 mg/kg e CP376395 na dose de 30 mg/kg).

No caso das análises da c-Fos de machos e fêmeas, foi realizada ANOVA de três vias para avaliar a atividade geral do CFPm e do NLET (Fator 1: Hemisfério esquerdo ou direito; fator 2: Condição INA ou EDSC; fator 3: tratamento salina (NaCl 0,9%), CP376395 na dose de 20 mg/kg e CP376395 na dose de 30 mg/kg). Por último, esta ANOVA foi repetida para a análise do padrão de ativação para c-Fos das subregiões do CPFm (Cg1, PrL e IL) e do NLET (Dorsal e ventral) (Fator 1: Hemisfério esquerdo ou direito; fator 2: Condição INA ou EDSC; fator 3: tratamento salina (NaCl 0,9%), CP376395 na dose de 20 mg/kg e CP376395 na dose de 30 mg/kg). Em todos os casos, foi calculado o tamanho do efeito correspondente para cada teste (η^2p = Eta quadrado parcial; r_B = Correlação bisserial de postos) (Lakens, 2013; Tomczak; Tomczak, 2014).

Nos testes estatísticos mencionados acima, valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Nos casos de significância das ANOVA, as análises foram seguidas pelo teste de comparações múltiplas de Duncan. Além disso, foi realizada avaliação da normalidade por meio do teste de Shapiro-Wilk e da homoscedasticidade dos dados por meio do teste de Levene, quando aplicável. Em caso de apresentarem distribuição normal e homoscedasticidade, os dados foram analisados com os testes paramétricos já mencionados; caso contrário, foram aplicados os testes não paramétricos ou heteroscedásticos correspondentes, como o teste U de Mann-Whitney, o teste t heteroscedástico ou a ANOVA não paramétrica (Marôco, 2014).

4. RESULTADOS

Como anteriormente mencionado, foram utilizados 223 sujeitos, 110 machos e 113 fêmeas. Nos machos, 55 foram expostos à INA, dos quais: 20 receberam salina, 18 foram tratados com CP376395 na dose de 20 mg/kg e 17 foram tratados com a dose de 30 mg/kg. Além disso, 55 machos foram submetidos ao EDSC, sendo que: 22 receberam salina, 19 foram tratados com CP376395 na dose de 20 mg/kg e 14 foram tratados com o CP376395 na dose de 30 mg/kg. No caso das fêmeas, 57 foram expostas à INA, tendo 22 animais tratados com salina, 22 com o CP376395 na dose de 20 mg/kg e 13 com a dose de 30 mg/kg; nas 56 fêmeas expostas ao EDSC, 20 receberam salina, 23 foram tratadas com CP376395 na dose de 20 mg/kg e 13 com a dose de 30 mg/kg.

4.1 TESTE DE INTERAÇÃO SOCIAL (TIS)

4.1.1 Tempo na Zona de Interação (ZI)

De acordo ao protocolo experimental, nenhum tratamento farmacológico foi administrado antes da realização do TIS. No caso dos machos, os dados apresentaram distribuição não normal (grupo de animais na fase sem Alvo: $p = 0,04$; grupo na fase com alvo: $p = 0,002$), de modo que foi feita a ANOVA não paramétrica. A ANOVA de medidas repetidas indicou efeito do fator condição com tamanho de efeito elevado ($F_{(1,108)} = 67,971$, $p = 0,001$, $\eta^2p = 0,39$), com ausência de efeito do alvo ($F_{(1,108)} = -0,001$, $p = 1,00$, $\eta^2p = -0,001$) e da interação entre condição e alvo ($F_{(1,108)} = 0,040$, $p = 0,84$, $\eta^2p = 0,003$). O teste *post hoc* do fator condição indicou que os machos expostos ao EDSC passaram menos tempo na ZI em comparação aos machos expostos à INA, independentemente da presença ou ausência do alvo na ZI ($p = 0,001$) (Figura 6A).

No caso das fêmeas, os dados não apresentaram distribuição normal (grupo de animais na fase sem Alvo: $p = 0,04$; grupo na fase com alvo: $p = 0,04$). A ANOVA de medidas repetidas não indicou efeito da condição ($F_{(1,111)} = 2,641$, $p = 0,10$, $\eta^2p = 0,02$), da presença ou ausência do alvo ($F_{(1,111)} = 0,001$, $p = 0,99$, $\eta^2p = 0,001$), nem da interação entre os fatores ($F_{(1,111)} = 1,514$, $p = 0,22$, $\eta^2p = 0,01$) (Figura 6B).

4.1.2 Tempo na Zona de Afastamento (ZA)

Nos machos, os dados não apresentaram distribuição normal (grupo de animais na fase sem Alvo: $p = 0,001$; grupo na fase com alvo: $p = 0,001$). A ANOVA de medidas repetidas indicou efeito do fator condição, com tamanho de efeito médio ($F_{(1,108)} = 12,035$, $p = 0,007$, η^2p

= 0,10) mas não do fator alvo ($F_{(1,108)} = -0,001$, $p = 1,00$, $\eta^2p = -0,001$), nem da interação entre os fatores ($F_{(1,108)} = 0,002$, $p = 0,96$, $\eta^2p = 0,001$). O teste de Duncan para o fator condição mostrou que os machos EDSC passaram mais tempo na ZA em comparação aos machos INA ($P = 0,008$) (Figura 6C).

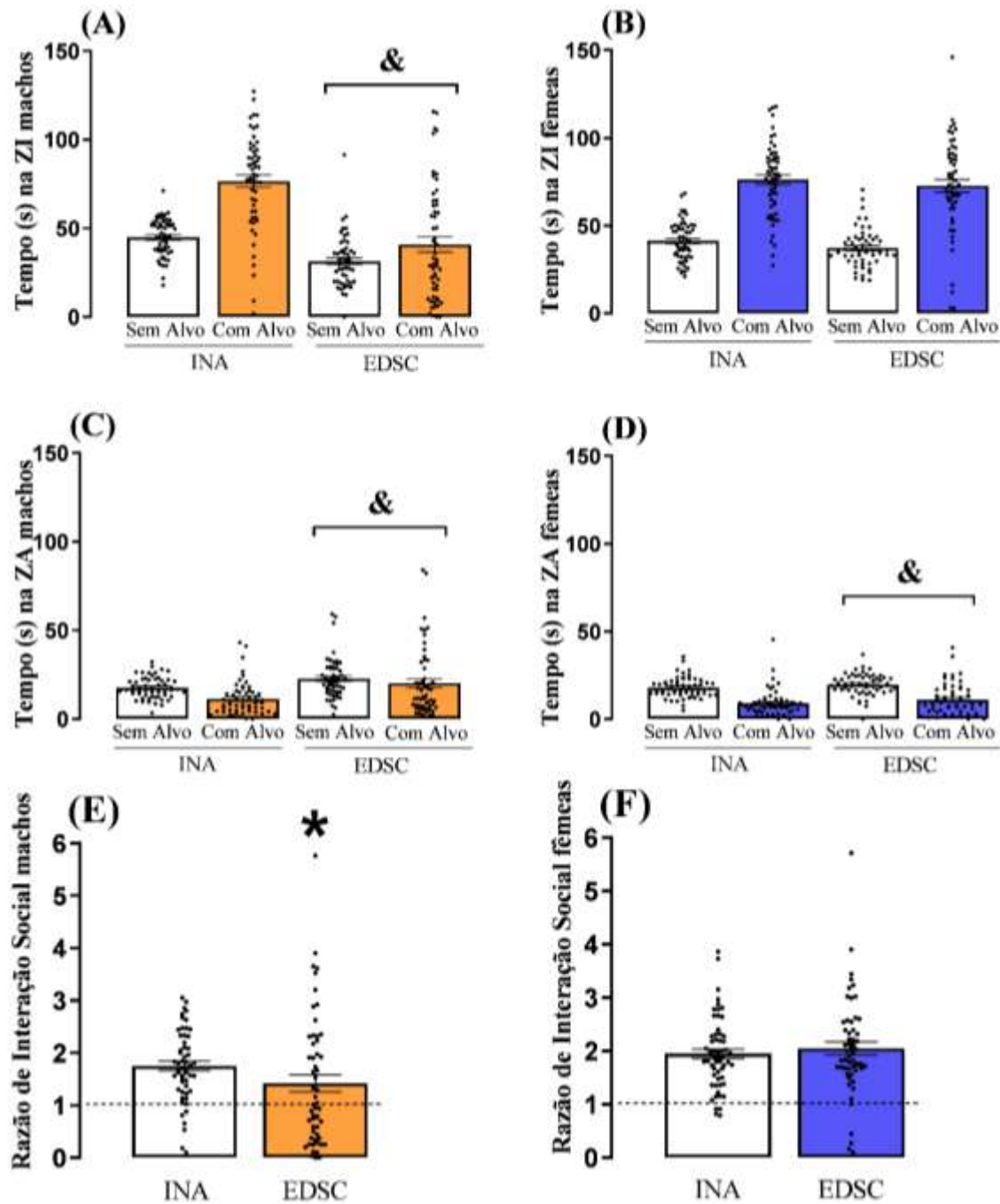
No caso das fêmeas, o tempo gasto na ZA na fase sem alvo apresentou distribuição normal ($p = 0,49$), enquanto na fase com alvo não teve distribuição normal ($p = 0,001$), de modo que se optou por realizar o teste não paramétrico. A ANOVA de medidas repetidas indicou efeito unicamente no fator condição, com tamanho do efeito pequeno ($F_{(1,111)} = 4,478$, $p = 0,03$, $\eta^2p = 0,04$), com ausência de efeito no fator alvo ($F_{(1,111)} = 0,001$, $p = 0,99$, $\eta^2p = 0,001$) e na interação entre os fatores ($F_{(1,111)} = 0,546$, $p = 0,46$, $\eta^2p = 0,004$). O *post hoc* de Duncan, para o fator condição, apresentou leve aumento do tempo gasto na ZA nas fêmeas expostas ao EDSC, quando comparadas às expostas à INA ($p = 0,03$) (Figura 6D).

4.1.3 Razão de Interação (RI)

A RI nos machos apresentou distribuição não normal ($p = 0,001$), de modo que foi aplicado o teste *U* de Mann-Whitney. No teste, os machos submetidos ao EDSC tiveram RI significativamente menor quando comparados aos machos da INA, com tamanho de efeito pequeno ($U = 1087,500$, $z = 2,54$, $p = 0,01$, $r_B = 0,281$) (Figura 6E).

Nas fêmeas, os dados não apresentaram distribuição normal ($p = 0,001$). O teste *U* de Mann-Whitney indicou ausência de efeito da condição INA ou EDSC sobre a RI das fêmeas ($U = 1484,500$, $z = -0,64$, $r_B = -0,070$) (Figura 6F).

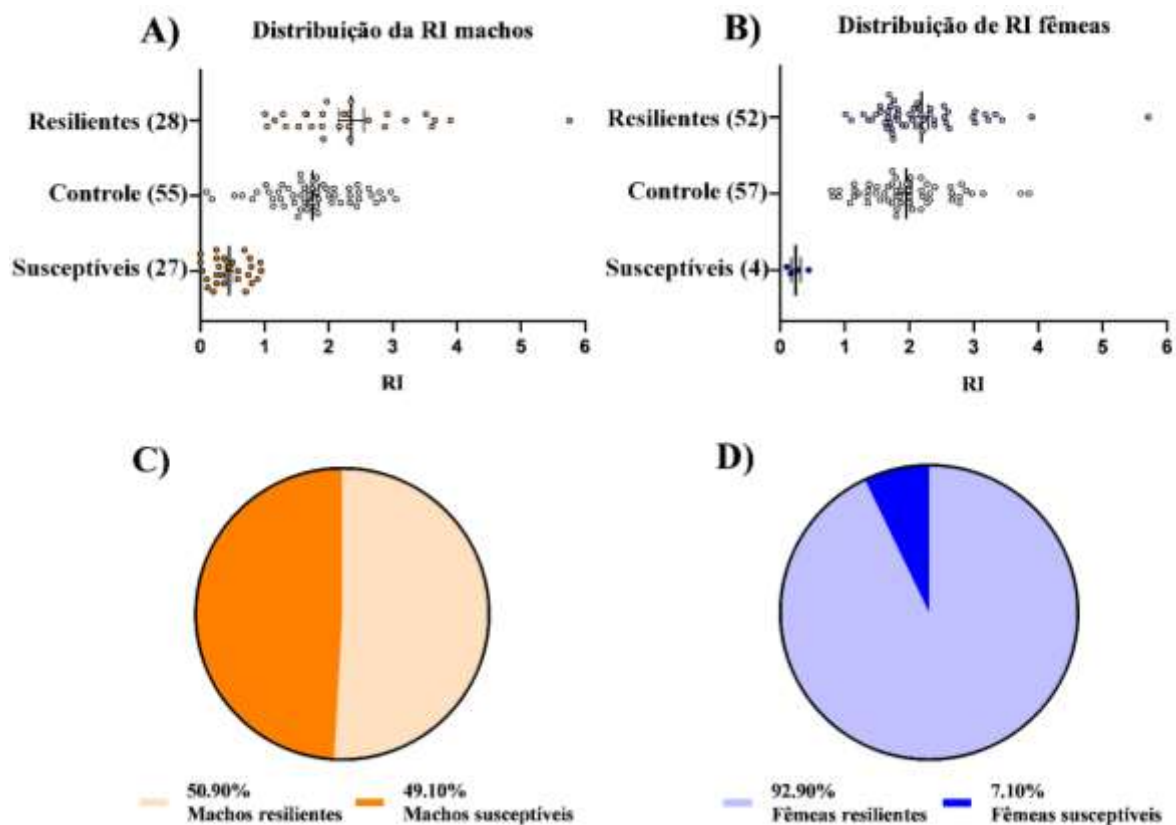
Figura 6 - A-F. Teste de Interação Social (TIS). Apresenta-se o Tempo gasto (s) na ZI, na ZA e a razão de interação social de machos e fêmeas submetidos ao estresse de derrota social crônico (EDSC) ou a interação não agressiva (INA). **(A)** Machos EDSC ($n = 55$) passaram menos tempo na ZI do que os INA ($n = 55$). **(B)** Ausência de efeito na ZI das Fêmeas. **(C)** Machos EDSC ($n = 55$) gastaram mais tempo na ZA do que os INA ($n = 55$). **(D)** As fêmeas EDSC ($n = 56$) passaram levemente mais tempo da ZA quando comparadas às fêmeas INA ($n = 57$). **(E)** Machos EDSC ($n = 55$) tiveram RI significativamente menor do que os machos INA ($n = 55$). **(F)** Nas fêmeas, não houve efeito da condição INA ($n = 57$) ou EDSC ($n = 56$) na RI dos animais. As barras representam a média $\pm$ EPM. $\&p<0,05$ comparando o tempo gasto da ZI, ZA ou RI entre animais EDSC e INA, independentemente do alvo; $*p<0,05$ em comparação à RI dos machos INA. INA, interação não agressiva; EDSC, estresse de derrota social; sem alvo, fase 1 do TIS; com alvo, fase 2 do TIS.



Fonte: Elaboração própria, 2025.

Como mencionado na metodologia, foi realizada a fenotipagem dos animais expostos ao EDSC, separando os animais em resilientes e suscetíveis de acordo com o seu escore de RI (Resiliente = $RI > 1$; Suscetível = $RI < 1$). Assim, dos 55 machos expostos ao EDSC, 28 foram resilientes e 27 foram suscetíveis (Figura 7A); enquanto das 56 fêmeas, 52 foram resilientes e 4 foram suscetíveis (Figura 7B). De modo que, na amostra de machos expostos ao EDSC, observou-se que 50,9% dos machos foram resilientes e 49,1% foram suscetíveis (Figura 7C). Nas fêmeas, 92,9% foram resilientes e 7,1% foram suscetíveis ao estresse (Figura 7D).

Figura 7 - A-D. Fenotipagem dos scores da RI de machos e fêmeas expostos ao EDSC ou INA. **A)** Distribuição da RI dos machos em fenótipos controle (n = 55), resilientes (n = 28) e suscetíveis (n = 27). **B)** Distribuição da RI das fêmeas em fenótipos controle (n = 57), resilientes (n = 52) e suscetíveis (n = 4). **C)** Nos machos, 50,9% dos expostos ao EDSC foram resilientes ao estresse, enquanto 49,1% foram suscetíveis. **D)** Nas fêmeas, 92,9% das expostas ao EDSC foram resilientes ao estresse enquanto 7,1% foram suscetíveis.



Fonte: Elaboração própria, 2025.

4.1.3.1 Análises do TIS por fenotipagem

Quando repetidas as análises do tempo gasto na ZI, na ZA e da RI do TIS, agora separando aos sujeitos expostos ao EDSC de acordo a se eram resilientes ou suscetíveis ao estresse psicossocial, observam-se os seguintes resultados: nos machos, a ANOVA de medidas repetidas da ZI indicou efeito na interação entre os fatores fenótipo e alvo, com tamanho de efeito elevado ($F_{(2,107)} = 21,522$, $p = 0,001$, $\eta^2p = 0,28$) no fator fenótipo, com tamanho de efeito elevado ($F_{(2,107)} = 43,966$, $p = 0,001$, $\eta^2p = 0,45$) mas não no fator alvo ($F_{(1,107)} = 0,001$, $p = 0,97$, $\eta^2p = 0,009$). O *post hoc* da interação entre os fatores apresenta que tanto resilientes ($p = 0,004$) quanto suscetíveis ($p = 0,003$) apresentaram tempo na ZI menor que o dos animais-controle; sendo que não houve diferença entre o tempo na ZI na fase sem alvo de resilientes e suscetíveis ($p = 0,33$).

Além disso, o *post hoc* mostra que os resilientes apresentaram significativamente maior tempo na ZI na fase com alvo, do que na sua fase sem alvo ($p = 0,005$) e os suscetíveis passaram menor tempo na ZI na fase com alvo do que na sua fase sem alvo ($p = 0,005$), sendo o tempo na fase com alvo da ZA diferente entre resilientes e suscetíveis ($p = 0,003$). Por último, os animais resilientes apresentaram tempo na ZI na fase com alvo semelhante aos controles na mesma fase ($p = 0,07$), de modo que unicamente os machos suscetíveis tiveram tempo na ZI, na fase com alvo, significativamente menor que os controles na fase com alvo ($p = 0,004$) (Figura 8A).

No tempo gasto na ZA dos camundongos machos, houve resultados parecidos, sendo que existiu efeito na interação entre os fatores fenótipo e alvo, com tamanho de efeito médio ($F_{(2,107)} = 4,284$, $p = 0,01$, $\eta^2p = 0,07$) no fator fenótipo, tamanho de efeito médio ($F_{(2,107)} = 7,277$, $p = 0,001$, $\eta^2p = 0,12$) mas não no fator alvo ($F_{(1,107)} = 0,001$, $p = 0,97$, $\eta^2p = 0,01$). Segundo o *post hoc* de Duncan, resilientes e suscetíveis passaram tempo semelhante na ZA, na fase sem alvo ($p = 0,48$). Porém, enquanto os resilientes passaram tempo na ZA significativamente menor na fase com alvo, do que na fase sem alvo ($p = 0,03$); os suscetíveis passaram tempo na ZA significativamente maior na fase com alvo, do que na fase sem alvo ($p = 0,03$).

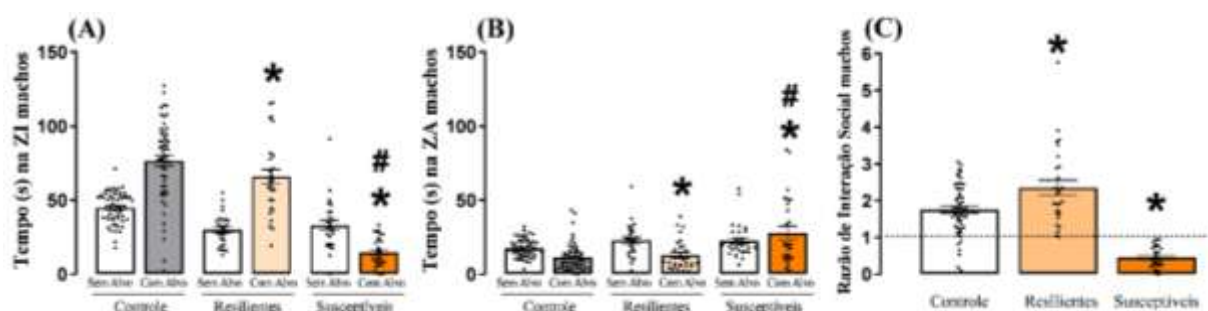
Adicionalmente, os machos resilientes não tiveram diferenças no tempo gasto na ZA na fase com alvo com os controle na mesma fase ($p = 0,65$), sendo que os suscetíveis passaram tempo na ZA significativamente maior na fase com alvo, quando comparados aos controle na

presença do alvo ($p = 0,003$), existindo também diferença no tempo gasto na ZA, na fase com alvo, entre resilientes e suscetíveis ($p = 0,003$) (Figura 8B).

Por último, a ANOVA de uma via indicou, para análise da RI por fenótipos, diferenças significativas, com tamanho do efeito muito elevado ($F_{(2,107)} = 58,548$, $p = 0,001$, $\eta^2p = 0,52$). O teste de Duncan mostrou que os resilientes tiveram RI maior ($p = 0,009$), enquanto os suscetíveis tiveram RI menor do que o controle ($p = 0,001$), sendo que a RI dos suscetíveis também foi significativamente menor quando comparada aos resilientes ($p = 0,005$) (Figura 8C).

As análises apresentadas acima não foram realizadas nas fêmeas, com base no baixo n de fêmeas suscetíveis ($n = 4$).

Figura 8 - A-C. Análise do tempo gasto na ZI, na ZA e da RI do TIS dos machos, separando os animais expostos ao EDSC em animais resilientes e suscetíveis de acordo com o seu score de RI. **A)** Os machos resilientes ($n = 28$) passaram maior tempo na ZI na fase com alvo do que na sua fase sem alvo, enquanto os suscetíveis ($n = 27$) passaram menos tempo na ZI na fase com alvo do que na fase sem alvo; além disso, os suscetíveis passaram menor tempo na ZI na fase com alvo do que os controle na fase com alvo ($n = 55$). **B)** Os machos resilientes ($n = 28$) passaram menos tempo na ZA na fase com alvo do que na fase sem alvo, os suscetíveis ($n = 27$) tiveram tempo maior na ZA na fase com alvo do que na fase sem alvo, os suscetíveis passaram maior tempo na ZA na fase com alvo do que os controle na fase com alvo ($n = 55$). **C)** Na análise da RI, os resilientes tiveram RI maior ($n = 28$) e os suscetíveis menor ($n = 27$) que os controles ($n = 55$), sendo a RI dos suscetíveis menor que a dos resilientes. As barras representam a média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$, comparando fase sem alvo e fase com alvo do TIS, símbolo utilizado também nas comparações da RI da figura 9C. # $p < 0,05$ comparando o tempo gasto na ZI e ZA na fase com alvo entre os fenótipos controle, resiliente e suscetível. Controle, animais expostos à INA; Resilientes, animais expostos ao EDSC com RI > 1 ; suscetíveis, animais com RI < 1 . Sem alvo, fase 1 do TIS; com alvo, fase 2 do TIS.



Fonte: Elaboração própria, 2025.

4.2 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE)

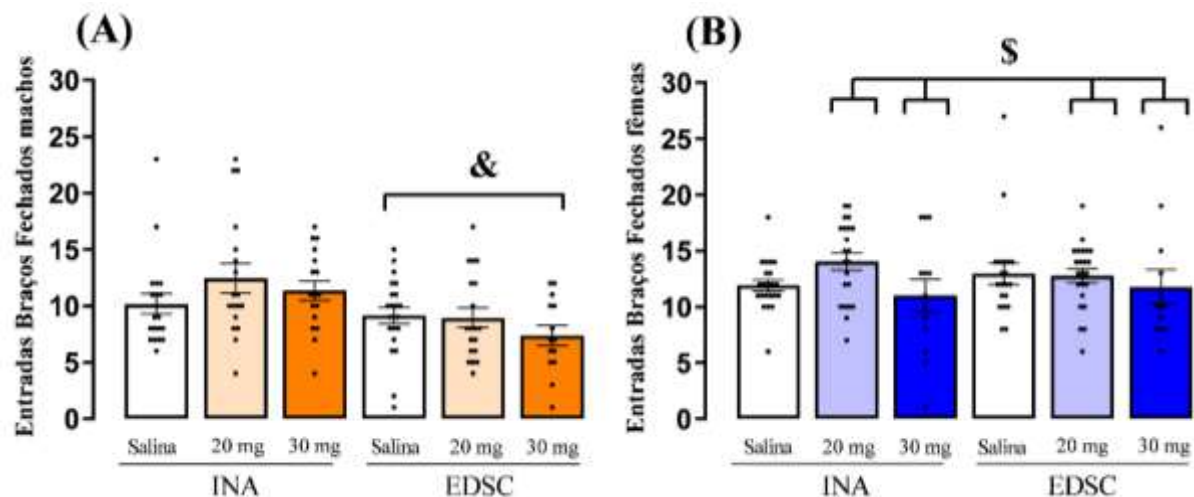
4.2.1 Entradas nos Braços Fechados (EBF)

Nos machos, os dados apresentaram distribuição não normal ($p = 0,004$). A ANOVA bifatorial indicou efeito do fator condição, com tamanho de efeito médio ($F_{(1,104)} = 11,318$, $p = 0,001$, $\eta^2p = 0,10$) mas não do fator tratamento ($F_{(2,104)} = 0,311$, $p = 0,73$, $\eta^2p = 0,005$), nem da

interação entre os fatores ($F_{(2,104)} = 2,414$, $p = 0,09$, $\eta^2p = 0,04$). O *post hoc* do fator condição apresenta que os machos submetidos ao EDSC tiveram diminuição das EBF, ou seja, da sua atividade locomotora quando comparados aos animais expostos à INA ($p = 0,002$), independentemente do tratamento (Figura 9A).

Nas fêmeas, os dados não apresentaram distribuição normal ($p = 0,001$). A ANOVA não mostrou efeito no fator condição ($F_{(1,107)} = 0,128$, $p = 0,72$, $\eta^2p = 0,001$), nem da interação entre os fatores ($F_{(2,107)} = 0,479$, $p = 0,62$, $\eta^2p = 0,008$); porém, apresentou efeito no fator tratamento, com tamanho de efeito médio ($F_{(2,107)} = 4,160$, $p = 0,01$, $\eta^2p = 0,07$). O *post hoc* do fator tratamento indica que as fêmeas tratadas com o CP376395 na dose de 30 mg/kg tiveram diminuição da sua atividade locomotora quando comparadas às que receberam a dose de 20 mg/kg ($p = 0,006$), sendo as EBF semelhantes entre a dose de 20 mg/kg e os tratados com salina ($p = 0,10$) e entre as do grupo de 30 mg/kg e as salina ($p = 0,20$), tudo independente da condição (Figura 9B).

Figura 9 - **A-B**. Labirinto em Cruz Elevado, análise das Entradas aos Braços Fechados (EBF) como análise da atividade locomotora de camundongos machos e fêmeas expostos ao EDSC ou à INA. **A)** Os machos expostos ao EDSC ($n = 55$) tiveram menor EBF que os machos expostos à INA ($n = 55$), independentemente do tratamento administrado. **B)** As fêmeas tratadas com CP376395, na dose de 30 mg/kg ($n = 26$), apresentaram menor atividade locomotora quando comparadas às tratadas com a dose de 20 mg/kg ($n = 45$), independentemente da condição. As barras representam a média $\pm$ EPM. & $p < 0,05$ comparando EBF de animais expostos ao EDSC ou à INA. \$ $p < 0,05$ comparando animais tratados com CP376395 na dose de 20 mg/kg ou na dose de 30 mg/kg. INA, Interação Não agressiva; EDSC, Estresse de Derrota Social Crônico.



Fonte: Elaboração própria, 2025.

4.2.2 Porcentagem de Entradas nos Braços Abertos (%EBA)

Os machos apresentaram distribuição normal na %EBA ($p = 0,06$). Porém não apresentaram homoscedasticidade ($p = 0,008$). A ANOVA indicou efeito do fator condição,

com tamanho de efeito pequeno ($F_{(1,104)} = 5,029$, $p = 0,02$, $\eta^2p = 0,04$) do fator tratamento, tamanho de efeito médio ($F_{(2,104)} = 4,292$, $p = 0,01$, $\eta^2p = 0,07$) mas não da interação entre os fatores ($F_{(2,104)} = 2,567$, $p = 0,08$, $\eta^2p = 0,04$). O *post hoc* do fator condição mostrou diminuição significativa da %EBA dos machos expostos ao EDSC, quando comparada aos expostos à INA, independentemente do tratamento ($p = 0,01$). Por outro lado, o *post hoc* do fator tratamento indicou que os animais tratados com o CP376395 na dose de 20 mg/kg ($p = 0,008$) e os tratados com o CP376395 na dose de 30 mg/kg ($p = 0,03$) tiveram maior %EBA que os machos tratados com salina, independentemente da condição (Figura 10A).

As fêmeas apresentaram distribuição não normal na %EBA ($p = 0,02$). A ANOVA mostrou efeito na interação entre os fatores condição e tratamento, com tamanho de efeito médio ($F_{(2,107)} = 3,195$, $p = 0,04$, $\eta^2p = 0,06$) e no fator condição, tamanho de efeito médio ($F_{(1,107)} = 4,421$, $p = 0,03$, $\eta^2p = 0,03$), tendo ausência de efeito do fator tratamento ($F_{(2,107)} = 0,975$, $p = 0,38$, $\eta^2p = 0,01$). O *post hoc* da interação entre os fatores indicou que as fêmeas expostas ao EDSC e tratadas com salina tiveram diminuição significativa da %EBA em comparação às expostas à INA e tratadas com salina ($p = 0,009$); além disso, as fêmeas do EDSC tratadas com CP376395 na dose de 30mg/kg apresentaram %EBA significativamente maior quando comparadas às expostas ao EDSC e tratadas com salina ($p = 0,01$) (Figura 10B).

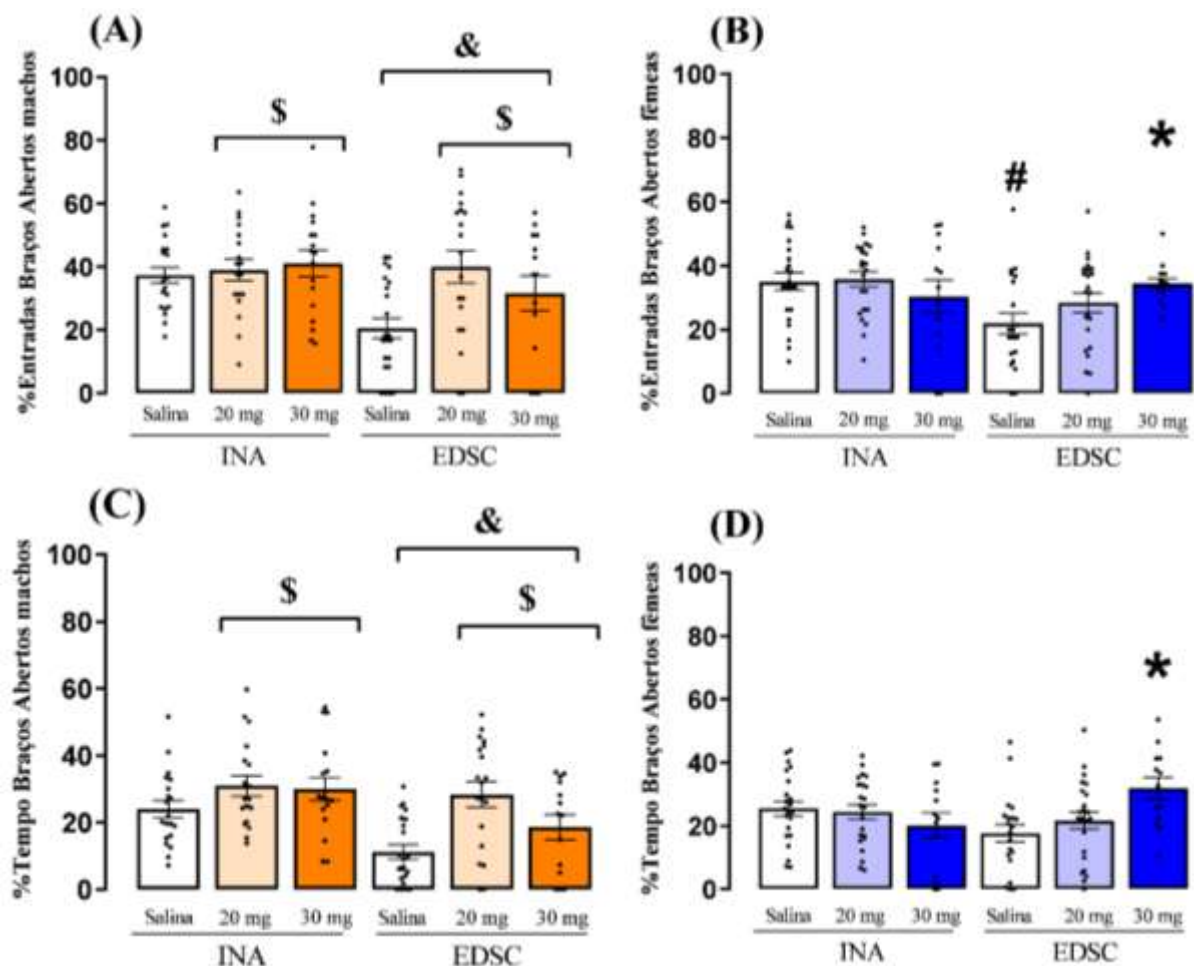
4.2.3 Porcentagem de Tempo gasto nos Braços Abertos (%TBA)

Os machos tiveram distribuição não normal na %TBA ($p = 0,01$). A ANOVA indicou efeito no fator condição, tamanho de efeito médio ($F_{(1,104)} = 10,682$, $p = 0,001$, $\eta^2p = 0,09$), no fator tratamento, tamanho de efeito médio ($F_{(2,104)} = 8,268$, $p = 0,004$, $\eta^2p = 0,14$), mas não na interação entre os fatores ($F_{(2,104)} = 2,123$, $p = 0,12$, $\eta^2p = 0,04$). O *post hoc* do fator condição indicou que os machos expostos ao EDSC diminuíram significativamente sua %TBA em comparação aos INA ($p = 0,009$), independentemente do tratamento. Adicionalmente, o *post hoc* do fator tratamento mostra que os machos tratados com CP376395 na dose de 20 mg/kg ($p = 0,002$) e os tratados na dose de 30 mg/kg ($p = 0,008$) tiveram maior %TBA que os tratados com salina, independentemente da condição (Figura 10C).

As fêmeas apresentaram distribuição normal na %TBA ($p = 0,11$), além de homoscedasticidade ($p = 0,84$). A ANOVA indicou efeito da interação entre os fatores condição e tratamento, com tamanho de efeito médio ($F_{(2,107)} = 5,253$, $p = 0,006$, $\eta^2p = 0,08$) mas não do fator condição ($F_{(1,107)} = 0,026$, $p = 0,87$, $\eta^2p = 0,002$), nem do fator tratamento ($F_{(2,107)} = 1,074$, $p = 0,34$, $\eta^2p = 0,01$). O *post hoc* da interação entre os fatores indicou que as fêmeas EDSC que

receberam o CP376395 na dose de 30 mg/kg tiveram maior %TBA que as fêmeas EDSC que foram tratadas com salina ($p=0,001$) e o CP376395 na dose de 20 mg/kg ($p=0,02$) (Figura 10D).

Figura 10 - **A-D**. Labirinto em Cruz Elevado (LCE) de camundongos machos e fêmeas expostos ao EDSC ou à INA. **A)** Machos expostos ao EDSC ($n = 55$) tiveram menor %EBA que machos expostos à INA ($n = 55$), independentemente do tratamento; enquanto os machos tratados com CP376395 na dose de 20 mg/kg ($n = 37$) e na dose de 30 mg/kg ($n = 31$) apresentaram maior %EBA que os animais tratados com salina ($n = 42$), independentemente da condição. **B)** As fêmeas EDSC tratadas com salina ($n = 20$) tiveram %EBA significativamente menor que as fêmeas INA tratadas com salina ($n = 22$), efeito revertido pelo CP376395 na dose de 30 mg/kg ($n = 13$). **C)** Machos expostos ao EDSC ($n = 55$) apresentaram %TBA menor que os machos INA ($n = 55$), independentemente do tratamento. Além disso, os machos tratados com CP376395 nas doses de 20 ($n = 37$) e 30 mg/kg ($n = 31$) tiveram %TBA maior que os machos tratados com salina ($n = 42$), independentemente da condição. **D)** Fêmeas expostas ao EDSC e tratadas com CP376395 na dose de 30 mg/kg ($n = 13$) apresentaram %TBA significativamente maior que as expostas ao EDSC e tratadas com salina ($n = 20$). As barras representam a média $\pm$ EPM. & $p<0,05$ comparando %EBA ou %TBA de animais expostos ao EDSC ou à INA. \$ $p<0,05$ comparando animais tratados com CP376395 nas doses de 20 mg/kg, 30 mg/kg ou salina. # $p<0,05$ comparando animais expostos ao EDSC tratados com salina e os expostos à INA tratados com salina. * $p<0,05$ comparando animais EDSC tratados com CP376395 na dose de 30 mg/kg e tratados com salina. INA, Interação Não agressiva; EDSC, Estresse de Derrota Social Crônico.



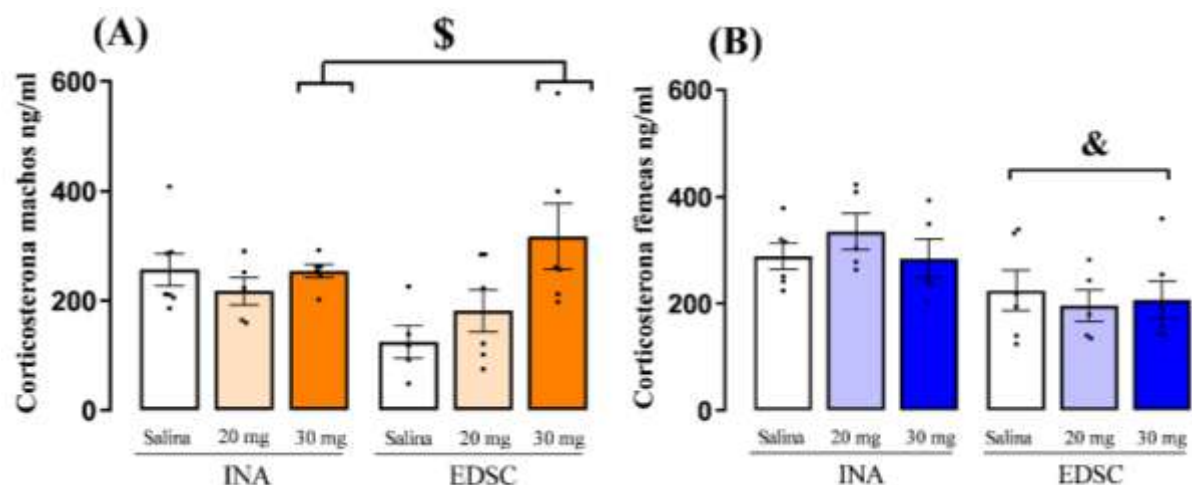
Fonte: Elaboração própria, 2025.

4.3 QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMATICOS DE CORTICOSTERONA

Nos machos, os dados não apresentaram distribuição normal ($p = 0,009$). A ANOVA indicou efeito para o fator tratamento, com tamanho de efeito médio ($F_{(2,29)} = 3,415$, $p = 0,04$, $\eta^2p = 0,19$), mas não para o fator condição ($F_{(1,29)} = 2,829$, $p = 0,10$, $\eta^2p = 0,08$), nem para a interação entre condição e tratamento ($F_{(2,29)} = 1,942$, $p = 0,16$, $\eta^2p = 0,12$). O *post hoc* do fator tratamento indicou que os machos tratados com o CP376395 na dose de 30 mg/kg tiveram maiores níveis plasmáticos de corticosterona que os tratados com salina ($p = 0,05$), independentemente da condição (Figura 11A).

As fêmeas apresentaram distribuição normal ($p = 0,19$); além de homoscedasticidade ($p = 0,81$). A ANOVA bifatorial indicou efeito do fator condição, com tamanho de efeito elevado ($F_{(1,27)} = 11,805$, $p = 0,001$, $\eta^2p = 0,30$) mas não do fator tratamento ($F_{(2,27)} = 0,166$, $p = 0,84$, $\eta^2p = 0,01$), nem da interação entre os fatores ($F_{(2,27)} = 0,709$, $p = 0,50$, $\eta^2p = 0,04$). O *post hoc* do fator condição apresenta que as fêmeas tiveram níveis de expressão de corticosterona significativamente menores que as fêmeas expostas à INA ($p = 0,002$), independentemente do tratamento administrado (Figura 11B).

Figura 11 - Mensuração dos níveis plasmáticos de corticosterona de camundongos machos e fêmeas, expostos ao EDSC e à INA e tratados com salina ou CP376395 nas doses de 20 e 30 mg/kg. **A)** Machos tratados com CP376395 na dose de 30 mg/kg ($n = 12$) tiveram maiores níveis plasmáticos de corticosterona quando comparados aos machos tratados com salina ($n = 12$). **B)** Fêmeas submetidas ao EDSC ($n = 17$) apresentaram níveis plasmáticos de corticosterona significativamente menores que as fêmeas submetidas à INA ($n = 16$). As barras representam a média $\pm$ EPM. $\&p < 0,05$, comparando níveis de corticosterona de animais expostos ao EDSC ou à INA. $\$p < 0,05$ comparando os níveis de corticosterona de animais tratados com CP376395 na dose de 30 mg/kg ou salina. INA, Interação Não agressiva; EDSC, Estresse de Derrota Social Crônico.



Fonte: Elaboração própria, 2025.

4.4 QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DA C-FOS

4.4.1 Expressão geral da proteína c-Fos no CPFm

Nos machos, houve distribuição normal ($p = 0,10$), bem como homoscedasticidade ($p = 0,15$) na expressão geral da c-Fos no CPFm, medida como a média da contagem de células com imunorreatividade positiva para c-Fos desta área do encéfalo. A ANOVA indicou ausência de efeito do fator hemisfério ($F_{(1,42)} = 0,601$, $p = 0,44$, $\eta^2p = 0,01$) e da interação fator hemisfério com os fatores já mencionados ($F_{(2,42)} = 1,850$, $p = 0,17$, $\eta^2p = 0,08$). Diante da falta de diferenças significativas na expressão geral de c-Fos entre o hemisfério direito e esquerdo dos encéfalos dos machos, se apresentaram os resultados destas análises considerando unicamente os fatores condição e tratamento. Isto será aplicado em todas as análises que apresentem ausência do fator hemisfério.

A ANOVA indicou efeito da interação entre os fatores de condição e tratamento, com tamanho de efeito médio ($F_{(2,42)} = 4,192$, $p = 0,02$, $\eta^2p = 0,16$), assim como dos fatores individuais de condição, tamanho de efeito elevado ($F_{(1,42)} = 18,415$, $p < 0,05$, $\eta^2p = 0,30$) e tratamento, com tamanho de efeito muito elevado ($F_{(2,42)} = 24,379$, $p = 0,001$, $\eta^2p = 0,54$).

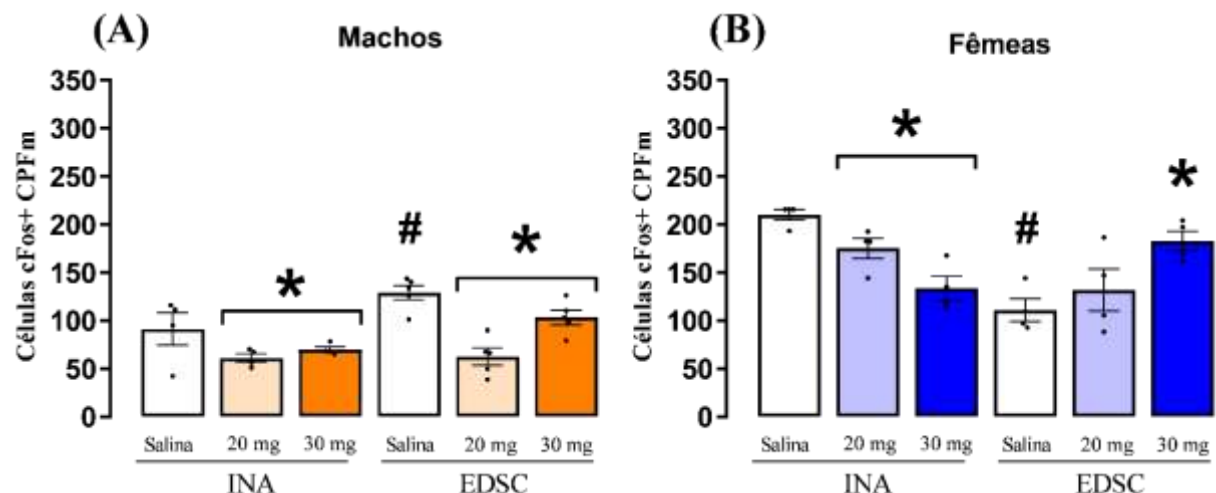
O *post hoc* de Duncan da interação entre os fatores de condição e tratamento indicaram aumento no número de células c-Fos positivas dos machos submetidos ao EDSC e tratados com salina, em comparação aos machos INA tratados com salina ($p = 0,001$). Além disso, o tratamento sistêmico com CP376395 nas doses de 20 mg/kg ($p = 0,006$) e de 30 mg/kg ($p = 0,03$) diminuíram a expressão c-Fos dos machos INA, em comparação com os machos INA tratados com salina. Do mesmo modo, as doses de 20 mg/kg ($p = 0,001$) e 30 mg/kg ($p = 0,01$) diminuíram a expressão da c-Fos dos machos EDSC, em comparação com os machos EDSC tratados com salina (Figura 12A).

No caso das fêmeas, houve distribuição não normal ($p = 0,02$). Novamente, não houve efeito da interação entre o fator hemisfério, condição e tratamento ($F_{(2,36)} = 0,719$, $p = 0,50$, $\eta^2p = 0,09$) nem efeito individual do fator hemisfério ($F_{(1,14)} = 1,310$, $p = 0,28$, $\eta^2p = 0,07$), definindo a ausência de diferenças significativas na expressão geral de c-Fos entre os hemisférios direito e esquerdo dos encéfalos das fêmeas.

A ANOVA indicou efeito da interação entre os fatores de condição e tratamento, com tamanho do efeito muito elevado ($F_{(2,36)} = 30,877$, $p = 0,001$, $\eta^2p = 0,63$), assim como efeito do

fator condição, tamanho de efeito elevado ($F_{(1,36)} = 15,109$, $p < 0,05$, $\eta^2p = 0,29$). O *post hoc* indicou que o EDSC diminuiu a expressão de c-Fos nas fêmeas tratadas com salina, em comparação às fêmeas INA tratadas com salina ($p = 0,001$). Adicionalmente, houve menor expressão de c-Fos nas fêmeas INA tratadas com CP376395 nas doses de 20 mg/kg ($p = 0,004$) e 30 mg/kg ($p = 0,001$) em comparação com as tratadas com salina. Por outro lado, o CP376395 de 30 mg/kg ($p = 0,001$) aumentou a expressão de c-Fos das fêmeas EDSC em comparação com as fêmeas EDSC tratadas com salina (Figura 12B).

Figura 12 – Quantificação da expressão geral da c-Fos no CPFm, por meio da contagem do número de células positivas para c-Fos. A) os machos EDSC tratados com salina ($n = 5$) tiveram níveis de c-Fos significativamente maiores que os machos INA tratados com salina ($n = 4$), efeito revertido pelo CP376395 na dose de 20 mg/kg ($n = 5$) e 30 mg/kg ($n = 5$). Por outro lado, os machos INA tratados com o fármaco na dose de 20 mg/kg ($n = 4$) e 30 mg/kg ($n = 4$) apresentaram menor expressão de c-Fos em comparação com os machos INA salina. B) Fêmeas submetidas ao EDSC e tratadas com salina ($n = 4$) tiveram menor expressão de c-Fos em comparação com as fêmeas expostas à INA e tratadas com salina ($n = 4$), efeito revertido pelo CP376395 na dose de 30 mg/kg ($n = 4$). Adicionalmente, as fêmeas expostas à INA e tratadas com CP376395 nas doses de 20 mg/kg ($n = 4$) e 30 mg/kg ($n = 4$) tiveram menor expressão de c-Fos que as fêmeas INA salina ($n = 4$). As barras representam a média $\pm$ EPM. # $p < 0,05$, comparando níveis de expressão da proteína c-Fos entre animais expostos ao EDSC e à INA e tratados com salina. * $p < 0,05$ comparando a expressão de c-Fos de animais tratados com CP376395 nas doses de 20 e 30 mg/kg em comparação com salina. INA, Interação Não agressiva; EDSC, Estresse de Derrota Social Crônico.



Fonte: Elaboração própria, 2025.

4.4.1.1 Expressão da proteína c-Fos nas subregiões do CPFm

4.4.1.1.1 Expressão da proteína c-Fos no Cg1

Na análise do Cg1 dos machos, houve distribuição normal ($p = 0,27$) e heteroscedasticidade ($p = 0,004$). Não houve efeito do fator hemisfério ($F_{(1,42)} = 1,219$, $p = 0,27$, $\eta^2p = 0,03$) nem da interação entre os três fatores ($F_{(2,42)} = 2,382$, $p = 0,10$, $\eta^2p = 0,10$).

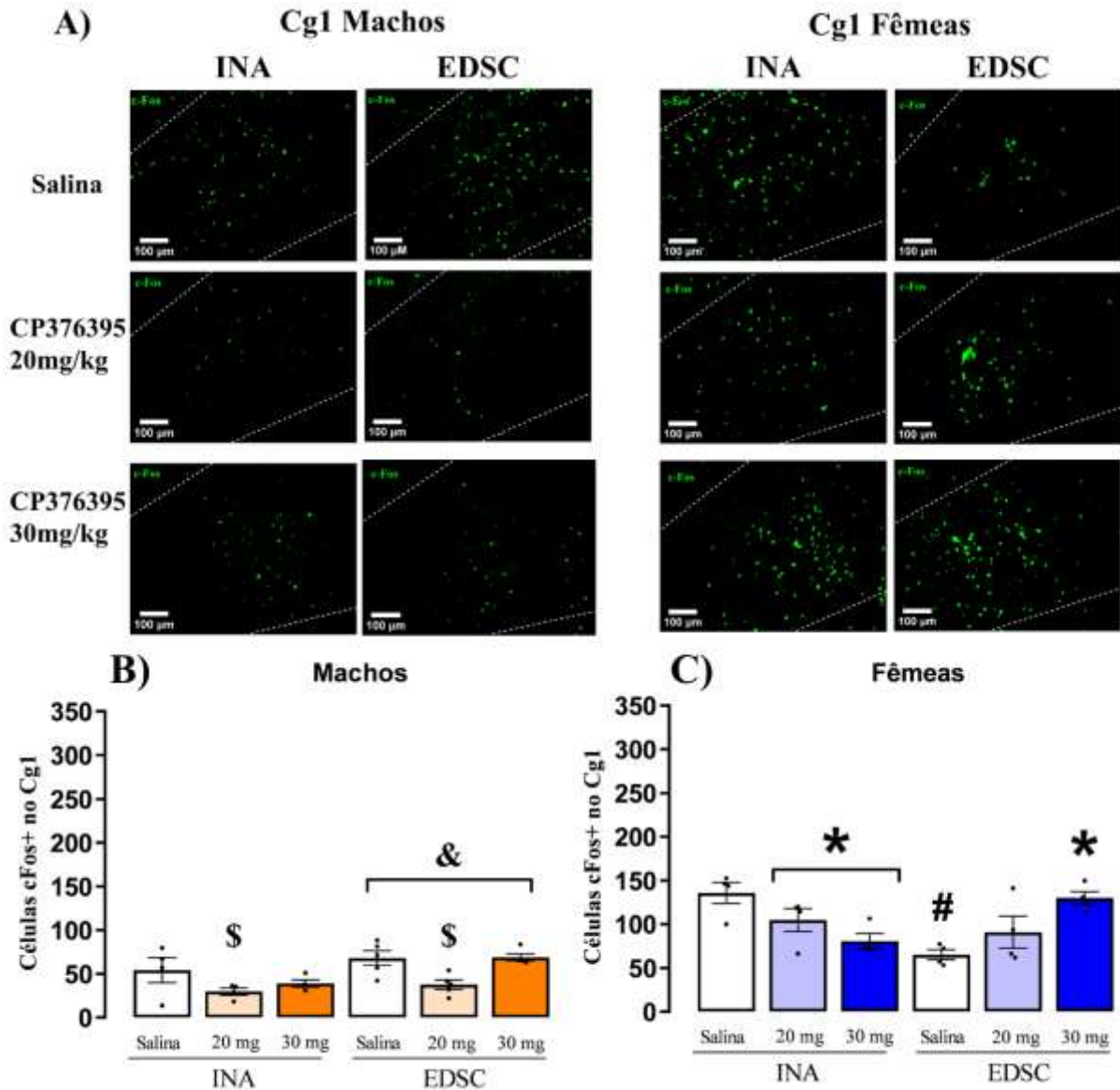
A ANOVA indicou efeito do fator condição, com tamanho do efeito médio ($F_{(1,42)} = 14,174$, $p < 0,05$, $\eta^2p = 0,25$) e no fator tratamento, com tamanho do efeito elevado ($F_{(2,42)} =$

13,840, $p < 0,05$, $\eta^2p = 0,40$). O *post hoc* revelou que a expressão da c-Fos no Cg1 dos machos submetidos ao EDSC foi significativamente maior em comparação à c-Fos dos machos submetidos à INA ($p < 0,05$), independentemente do tratamento e do hemisfério. Além disso, os machos tratados com o CP376395 na dose de 20 mg/kg apresentaram menor expressão de c-Fos que os machos tratados com salina ($p < 0,05$) e que os machos tratados com o CP376395 na dose de 30 mg/kg ($p < 0,05$), independentemente da condição e do hemisfério (Figura 14B).

No caso das fêmeas, houve distribuição normal ($p = 0,41$) e homoscedasticidade ($p = 0,71$). Não se registrou efeito do fator hemisfério ($F_{(1,36)} = 0,228$, $p = 0,64$, $\eta^2p = 0,006$) nem da interação entre os três fatores ($F_{(2,36)} = 1,504$, $p = 0,24$, $\eta^2p = 0,08$).

A ANOVA indicou efeito unicamente da interação entre os fatores condição e tratamento, com tamanho do efeito muito elevado ($F_{(2,36)} = 21,210$, $p < 0,05$, $\eta^2p = 0,54$). O *post hoc* mostrou que o Cg1 das fêmeas submetidas ao EDSC e tratadas com salina apresentou menores níveis de c-Fos em comparação às fêmeas submetidas à INA e tratadas com salina ($p < 0,05$), efeito revertido unicamente pelo CP376395 na dose de 30 mg/kg ($p < 0,05$). Por outro lado, as fêmeas submetidas à INA e tratadas com o CP376395 nas doses de 20 mg/kg ($p = 0,03$) e 30 mg/kg ($p < 0,05$) tiveram menores níveis de c-Fos no Cg1 quando comparadas às fêmeas INA tratadas com salina, independentemente do hemisfério (Figura 14C).

Figura 14 – Quantificação da expressão da proteína c-Fos no CPFm, na subregião Cg1, por meio da contagem do número de células positivas para c-Fos. A) Fotomicrografias que ilustram a marcação de células imunorreativas à c-Fos no Cg1 de camundongos machos e fêmeas expostos ao EDSC e ao CP376395 nas doses de 20 e 30 mg/kg, com aumento de 20 vezes (barra de escala = 100 μ m). B) Machos EDSC ($n = 15$) tiveram maior expressão de c-Fos no Cg1 que os machos INA ($n = 12$), independentemente do tratamento. Os machos CP376395, com a dose de 20 mg/kg ($n = 9$), tiveram menos c-Fos que os machos tratados com salina ($n = 9$) ou com a dose de 30 mg/kg ($n = 9$), independentemente da condição. C) Nas fêmeas, as expostas ao EDSC e tratadas com salina ($n = 4$) tiveram menor expressão de c-Fos no Cg1 que as fêmeas INA salina ($n = 4$), efeito revertido pelo CP376395 na dose de 30 mg/kg ($n = 4$). As fêmeas INA tratadas com as doses de 20 mg/kg ($n =$) e 30 mg/kg ($n = 4$) tiveram menor expressão de c-Fos que as fêmeas INA salina ($n = 4$). As barras representam a média $\pm$ EPM. & $p < 0,05$ comparando níveis de expressão da c-Fos de animais expostos ao EDSC ou à INA. \$ $p < 0,05$ comparando animais tratados com CP376395 nas doses de 20 mg/kg, 30 mg/kg ou salina. # $p < 0,05$ comparando níveis de expressão da proteína c-Fos entre animais expostos ao EDSC e à INA e tratados com salina. * $p < 0,05$ comparando a expressão de c-Fos de animais tratados com CP376395 nas doses de 20 e 30 mg/kg quando comparados com salina. INA, Interação Não agressiva; EDSC, Estresse de Derrota Social Crônico.



Fonte: Elaboração própria, 2025.

4.4.1.1.2 Expressão da proteína c-Fos no PrL

Nos machos, houve distribuição normal ($p = 0,50$) e homoscedasticidade ($p = 0,39$). A ANOVA indicou efeito da interação entre os fatores condição e tratamento, com tamanho do efeito elevado ($F_{(2,42)} = 7,909$, $p = 0,001$, $\eta^2 p = 0,27$), indicou também interação entre os fatores hemisfério e condição, com tamanho de efeito médio ($F_{(1,42)} = 10,460$, $p = 0,002$, $\eta^2 p = 0,20$). Além disso, houve efeito do fator condição, com tamanho de efeito médio ($F_{(1,42)} = 9,506$, $p = 0,004$, $\eta^2 p = 0,18$) e do fator tratamento, com tamanho de efeito muito elevado ($F_{(2,42)} = 22,329$, $p = 0,001$, $\eta^2 p = 0,51$).

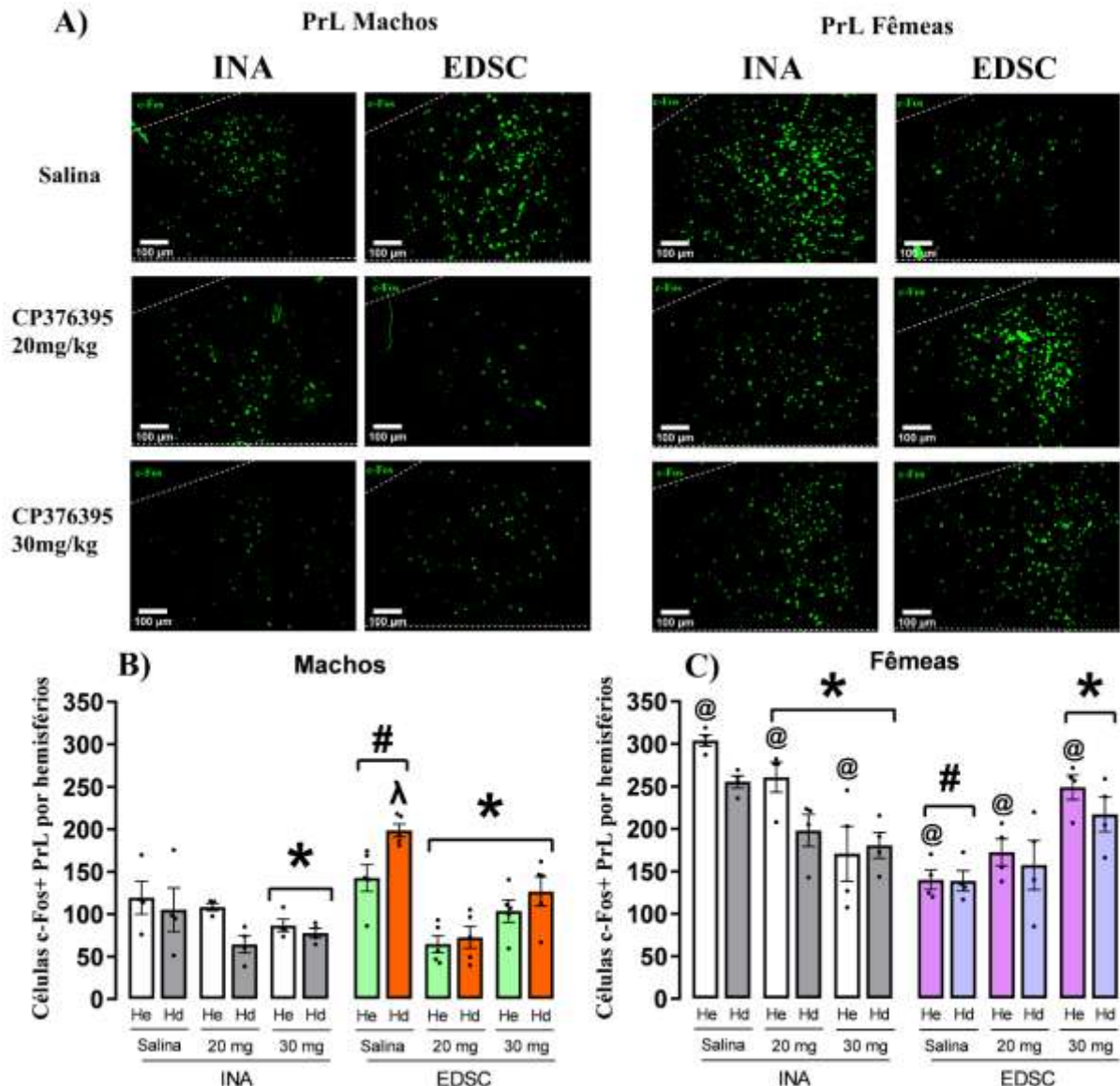
O *post hoc* da interação entre a condição e o tratamento revelou que os animais expostos ao EDSC e tratados com salina apresentaram maiores níveis de c-Fos que os machos INA tratados com salina ($p < 0,05$), efeito revertido pelo CP376395 nas doses de 20 mg/kg ($p < 0,05$)

e de 30 mg/kg ($p < 0,05$). Os machos submetidos à INA e tratados com o CP376395 na dose de 30 mg/kg apresentaram menores níveis de c-Fos no PrL quando comparados com os machos INA tratados com salina ($p = 0,04$). O *post hoc* da interação entre o fator hemisfério e condição indicou que o hemisfério direito dos camundongos machos submetidos ao EDSC teve maiores níveis de c-Fos em comparação ao hemisfério esquerdo dos animais na mesma condição ($p = 0,02$). Adicionalmente, o hemisfério direito dos machos EDSC também teve maior expressão de c-Fos que os hemisférios direito ($p < 0,05$) e esquerdo ($p = 0,01$) dos machos submetidos à INA (Figura 15B).

No caso das fêmeas, houve distribuição normal nos dados referentes à expressão da c-Fos no PrL ($p = 0,23$). Porém, não houve homoscedasticidade ($p = 0,01$). A ANOVA indicou efeito da interação dos fatores condição e tratamento, com tamanho do efeito muito elevado ($F_{(2,36)} = 30,521$, $p = 0,001$, $\eta^2p = 0,63$). Houve também efeito do fator hemisfério, com tamanho de efeito médio ($F_{(1,36)} = 5,0389$, $p = 0,03$, $\eta^2p = 0,12$) e do fator condição, com tamanho do efeito elevado ($F_{(1,36)} = 22,712$, $p < 0,05$, $\eta^2p = 0,39$).

O *post hoc* da interação entre condição e tratamento indicou que as fêmeas submetidas ao EDSC e tratadas com salina tiveram menores níveis de c-Fos quando comparadas às fêmeas INA tratadas com salina ($p < 0,05$), efeito revertido unicamente pelo CP376395 na dose de 30 mg/kg ($p < 0,05$). Além disso, as fêmeas submetidas à INA e tratadas com o CP376395 nas doses de 20 mg/kg ($p = 0,02$) e 30 mg/kg ($p < 0,05$) apresentaram menor expressão de c-Fos que as fêmeas INA tratadas com salina. Por outro lado, o *post hoc* do fator hemisfério mostrou que o hemisfério esquerdo das fêmeas teve maior expressão de c-Fos quando comparado ao hemisfério direito, independente da condição ou do tratamento (Figura 15C).

Figura 15 – Quantificação da expressão da proteína c-Fos no CPFm, na subregião PrL, separada por hemisférios, por meio da contagem do número de células positivas para c-Fos. A) Fotomicrografias que ilustram a marcação de células imunorreativas à c-Fos no PrL de camundongos machos e fêmeas expostos ao EDSC e ao CP376395 nas doses de 20 e 30 mg/kg, com aumento de 20 vezes (barra de escala = 100 μ m). B) No PrL dos machos, os EDSC salina ($n = 10$) mostraram menor expressão de c-Fos que os INA salina ($n = 8$), efeito revertido pelo CP376395 nas doses de 20 mg/kg ($n = 10$) e 30 mg/kg ($n = 10$). Os INA tratados com a dose de 30 mg/kg ($n = 8$) diminuíram a c-Fos em comparação aos INA salina. Além disso, o hemisfério direito dos machos EDSC ($n = 15$) teve maior expressão de c-Fos que o hemisfério esquerdo ($n = 15$) e maior que os hemisférios direito ($n = 12$) e esquerdo ($n = 12$) dos INA, independentemente do tratamento. Nas fêmeas, as EDSC salina ($n = 8$) tiveram maior c-Fos que as INA salina ($n = 8$), efeito revertido pela dose de 30 mg/kg ($n = 8$); as doses de 20 ($n = 8$) e 30 mg/kg ($n = 8$) reduziram a c-Fos em comparação das INA salina. O hemisfério esquerdo ($n = 24$) teve maior expressão de c-Fos do que o direito ($n = 24$), independentemente da condição ou do tratamento. As barras representam a média $\pm$ EPM. # $p < 0,05$ comparando níveis de expressão da proteína c-Fos entre animais expostos ao EDSC e à INA e tratados com salina. * $p < 0,05$ comparando a expressão de c-Fos de animais tratados com CP376395 nas doses de 20 e 30 mg/kg quando comparados com salina. $\lambda p < 0,05$ comparando a expressão de c-Fos entre o hemisfério direito dos machos EDSC com o hemisfério esquerdo da mesma condição e com os hemisférios direito e esquerdo dos INA. @ $p < 0,05$ comparando a expressão de c-Fos entre o hemisfério esquerdo e direito de animais expostos ao EDSC ou à INA. Hd, hemisfério direito; He, hemisfério esquerdo; INA, Interação Não agressiva; EDSC, Estresse de Derrota Social Crônico.



Fonte: Elaboração própria, 2025.

4.4.1.1.3 Expressão da proteína c-Fos no IL

Na análise dos machos, encontrou-se distribuição normal ($p = 0,08$) e homoscedasticidade ($p = 0,08$). Como no Cg1, não houve efeito do fator hemisfério ($F_{(1,42)} = 0,441$, $p = 0,51$, $\eta^2 p = 0,01$), nem da interação entre os três fatores ($F_{(2,42)} = 0,324$, $p = 0,72$, $\eta^2 p = 0,01$).

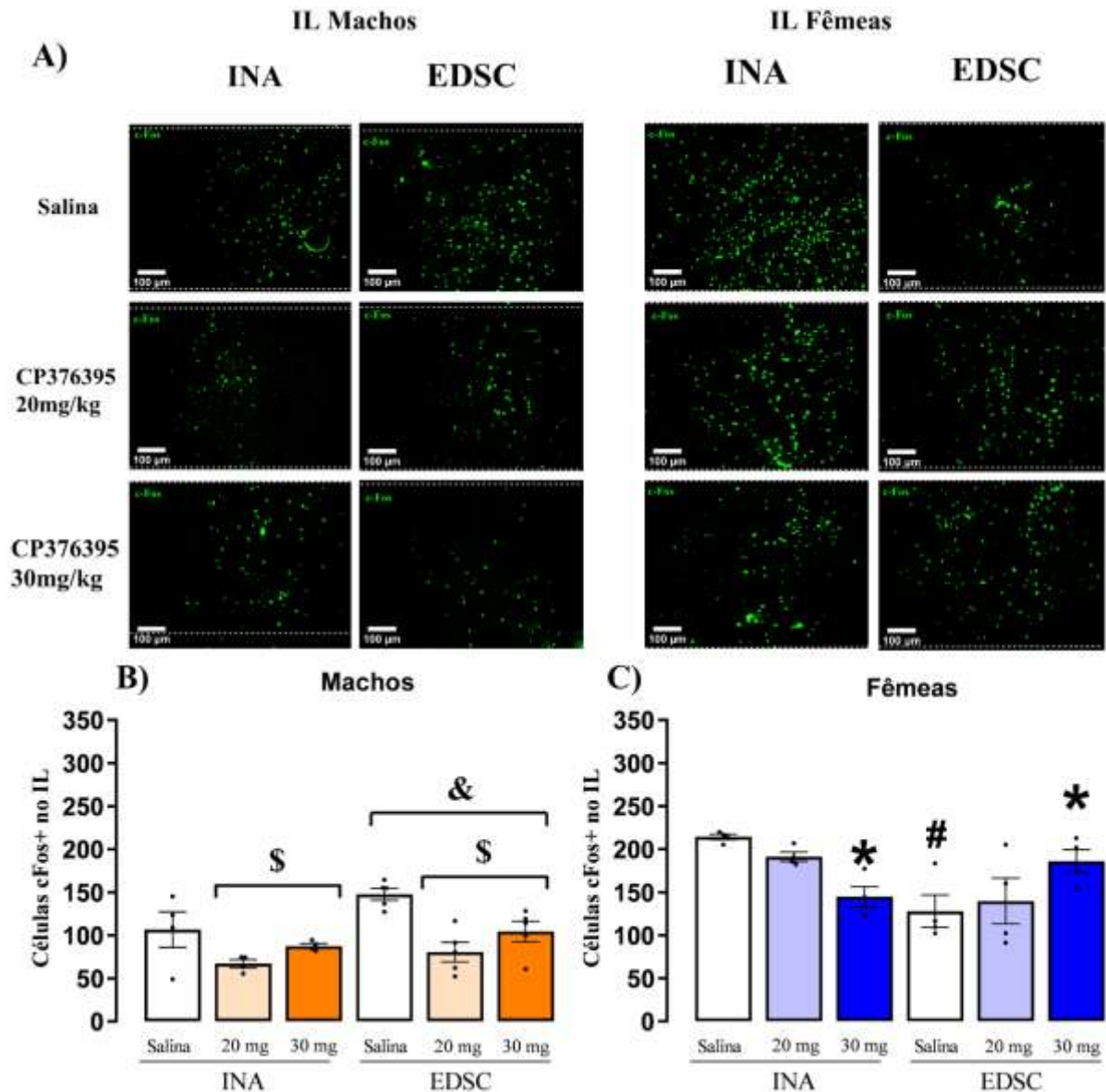
A ANOVA mostrou efeitos unicamente no fator condição, com tamanho de efeito médio ($F_{(1,42)} = 10,473$, $p = 0,002$, $\eta^2 p = 0,20$) e no fator tratamento, com tamanho de efeito elevado ($F_{(2,42)} = 17,725$, $p = 0,003$, $\eta^2 p = 0,46$). Sem efeito da interação de nenhum dos fatores. O *post hoc* do fator condição indicou que o IL dos machos expostos ao EDSC teve maior c-Fos em comparação aos machos submetidos à INA ($p = 0,002$), independentemente do tratamento administrado. O *post hoc* do fator tratamento indicou que os machos tratados com o CP376395

na dose de 20 mg/kg ($p < 0,05$) e na dose de 30 mg/kg ($p = 0,001$) tiveram menor expressão de c-Fos em comparação aos machos tratados com salina, independentemente da condição (Figura 16B).

No caso das fêmeas, houve distribuição não normal ($p = 0,003$). Não se encontrou efeito nem do fator hemisfério ($F_{(1,36)} = 0,981$, $p = 0,33$, $\eta^2p = 0,03$) nem da interação entre o fator hemisfério, condição e tratamento ($F_{(2,36)} = 0,171$, $p = 0,84$, $\eta^2p = 0,01$).

A ANOVA indicou efeito da interação entre os fatores condição e tratamento, com tamanho de efeito elevado ($F_{(2,36)} = 11,255$, $p < 0,05$, $\eta^2p = 0,38$) e efeito no fator condição, com tamanho de efeito médio ($F_{(1,36)} = 7,368$, $p = 0,01$, $\eta^2p = 0,17$). O *post hoc* indicou que as fêmeas expostas ao EDSC tratadas com salina tiveram menores níveis de c-Fos no IL, em comparação às fêmeas expostas à INA e tratadas com salina ($p < 0,05$), efeito revertido pelo CP376395 na dose de 30 mg/kg ($p = 0,01$). Do mesmo modo, a dose de 30 mg/kg do CP376395 diminuiu a expressão de c-Fos das fêmeas INA quando comparada às fêmeas expostas à INA tratadas com salina ($p = 0,001$) (Figura 16C).

Figura 16 – Quantificação da expressão da proteína c-Fos do CPFm, na subregião IL, por meio da contagem do número de células positivas para c-Fos. A) Fotomicrografias que ilustram a marcação de células imunorreativas à c-Fos no IL de camundongos machos e fêmeas expostos ao EDSC e ao CP376395 nas doses de 20 e 30 mg/kg, com aumento de 20 vezes (barra de escala = 100µm). B) No IL, os machos EDSC ($n = 15$) tiveram maior c-Fos que os INA ($n = 12$). Os machos tratados com a dose de 20 ($n = 9$) e 30 mg/kg ($n = 9$) reduziram sua c-Fos em comparação aos salina ($n = 9$), independentemente da condição. C) Nas fêmeas, as EDSC salina ($n = 4$) mostraram menor c-Fos que as INA salina ($n = 4$), efeito revertido pela dose de 30 mg/kg ($n = 4$). Nas INA, a dose de 30 mg/kg ($n = 4$) diminuiu a c-Fos em comparação às INA salina. As barras representam a média $\pm$ EPM. & $p < 0,05$ comparando níveis de expressão da c-Fos de animais expostos ao EDSC ou à INA. \$ $p < 0,05$ comparando animais tratados com CP376395 nas doses de 20 mg/kg, 30 mg/kg ou salina. # $p < 0,05$ comparando níveis de expressão da proteína c-Fos entre animais expostos ao EDSC e à INA e tratados com salina. * $p < 0,05$ comparando a expressão de c-Fos de animais tratados com CP376395 nas doses de 20 e 30 mg/kg quando comparados com salina. INA, Interação Não agressiva; EDSC, Estresse de Derrota Social Crônico.



Fonte: Elaboração própria, 2025.

4.4.2 Expressão geral da proteína c-Fos no NLET

Nos machos, houve distribuição normal ($p = 0,75$) e homoscedasticidade na amostra ($p = 0,09$) de expressão c-Fos geral do NLET. A ANOVA não revelou efeito do fator hemisfério ($F_{(1,44)} = 0,014$, $p = 0,90$, $\eta^2 p < 0,05$) nem da interação deste com os outros fatores ($F_{(2,44)} = 0,467$, $p = 0,63$, $\eta^2 p = 0,02$).

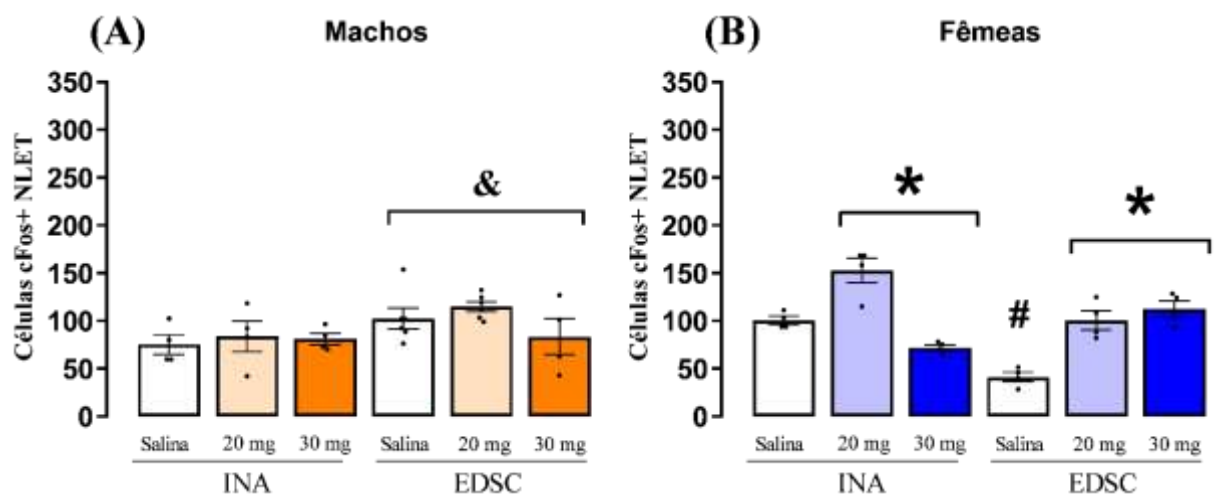
A ANOVA indicou efeito unicamente do fator condição, com tamanho de efeito médio ($F_{(1,44)} = 8,357$, $p = 0,006$, $\eta^2 p = 0,16$), sem efeito do fator tratamento ($F_{(2,44)} = 2,024$, $p = 0,14$, $\eta^2 p = 0,08$). O *post hoc* de Duncan mostrou que os machos submetidos ao EDSC apresentaram

maior expressão geral de c-Fos no NLET em comparação aos machos da INA ($p = 0,002$) (Figura 13A).

Nas fêmeas, os dados preliminares apresentaram distribuição normal ($p = 0,30$), bem como homoscedasticidade ($p = 0,15$). A ANOVA indicou ausência de efeito do fator hemisfério ($F_{(1,36)} = 0,070$, $p = 0,79$, $\eta^2p = 0,002$) nem da interação entre os três fatores ($F_{(2,36)} = 0,015$, $p = 0,98$, $\eta^2p < 0,05$).

Houve efeito da interação entre os fatores condição e tratamento, com tamanho do efeito muito elevado ($F_{(2,36)} = 39,778$, $p = 0,001$, $\eta^2p = 0,69$), além do fator condição, como tamanho de efeito elevado ($F_{(1,36)} = 21,413$, $p = 0,004$, $\eta^2p = 0,37$) e tratamento, com tamanho do efeito muito elevado ($F_{(2,36)} = 40,938$, $p = 0,001$, $\eta^2p = 0,69$). O *post hoc* indicou menor expressão de c-Fos nas fêmeas EDSC tratadas com salina em comparação com as fêmeas INA tratadas com salina ($p < 0,05$), efeito revertido pelo CP376395 nas doses de 20 mg/kg ($p < 0,05$) e 30 mg/kg ($p < 0,05$). Por outro lado, as fêmeas INA tratadas com CP376395 na dose de 20 mg/kg apresentaram maior c-Fos que as fêmeas INA salina ($p < 0,05$); enquanto as tratadas com CP376395 na dose de 30 mg/kg tiveram menor expressão de c-Fos que as fêmeas INA salina ($p = 0,002$) (Figura 13B).

Figura 13 - Quantificação da expressão geral da proteína c-Fos no NLET, por meio da contagem do número de células positivas para c-Fos. A) Camundongos machos expostos ao EDSC ($n = 16$) tiveram maior expressão de c-Fos em comparação aos machos expostos à INA ($n = 12$), independente do tratamento e do hemisfério do encéfalo dos animais. B) Houve diminuição da expressão da proteína c-Fos nas fêmeas expostas ao EDSC e tratadas com salina ($n = 4$) em comparação às fêmeas INA salina ($n = 4$), efeito revertido pelo CP376395 nas doses de 20 mg/kg ($n = 4$) e 30 mg/kg ($n = 4$). Além disso, a dose de 20 mg/kg aumentou a expressão de c-Fos das fêmeas INA ($n = 4$) em comparação às tratadas com salina ($n = 4$); enquanto a dose de 30 mg/kg diminuiu a c-Fos nas fêmeas INA ($n = 4$) quando comparadas às fêmeas INA salina ($n = 4$). As barras representam a média $\pm$ EPM. & $p < 0,05$, comparando níveis de expressão da c-Fos de animais expostos ao EDSC ou à INA. # $p < 0,05$ comparando níveis de expressão da proteína c-Fos entre animais expostos ao EDSC e à INA e tratados com salina. * $p < 0,05$ comparando a expressão de c-Fos de animais tratados com CP376395 nas doses de 20 e 30 mg/kg quando comparados com salina. INA, Interação Não agressiva; EDSC, Estresse de Derrota Social Crônico.



Fonte: Elaboração própria, 2025.

4.4.2.1 Expressão da proteína c-Fos nas subregiões do NLET

4.4.2.1.1 Expressão da proteína c-Fos no NLETd

Nos machos, houve distribuição normal ($p = 0,46$) assim como homoscedasticidade ($p = 0,07$). Houve ausência de efeito do fator hemisfério ($F_{(1,44)} = 0,564$, $p = 0,46$, $\eta^2p = 0,01$) e da interação entre os três fatores ($F_{(2,44)} = 1,557$, $p = 0,22$, $\eta^2p = 0,07$).

A ANOVA indicou efeito unicamente do fator condição, com tamanho de efeito médio ($F_{(1,44)} = 5,500$, $p = 0,02$, $\eta^2p = 0,11$). O *post hoc* indicou que os machos expostos ao EDSC tiveram maiores níveis de c-Fos no NLETd em comparação aos machos submetidos à INA ($p = 0,01$), independentemente do tratamento e do hemisfério analisado (Figura 17B).

Nos dados das fêmeas, houve distribuição normal ($p = 0,13$) e homoscedasticidade ($p = 0,07$). Porém, não houve efeito do fator hemisfério ($F_{(1,36)} = 0,187$, $p = 0,67$, $\eta^2p = 0,005$), nem da interação entre os três fatores ($F_{(2,36)} = 0,103$, $p = 0,90$, $\eta^2p = 0,006$).

A ANOVA indicou efeito na interação entre os fatores condição e tratamento, com tamanho de efeito muito elevado ($F_{(2,36)} = 30,940$, $p = 0,001$, $\eta^2p = 0,63$), assim como efeito nos fatores condição, tamanho de efeito elevado ($F_{(1,36)} = 12,819$, $p = 0,001$, $\eta^2p = 0,26$) e tratamento, com tamanho de efeito muito elevado ($F_{(2,36)} = 23,042$, $p = 0,001$, $\eta^2p = 0,56$).

O *post hoc* indicou que as fêmeas submetidas ao EDSC tratadas com salina tiveram menor expressão de c-Fos no NLETd em comparação às fêmeas submetidas à INA e tratadas com salina ($p < 0,05$), efeito revertido pelo CP376395 na dose de 20 mg/kg ($p < 0,05$) e na dose de 30 mg/kg ($p < 0,05$). Além disso, as fêmeas submetidas à INA e tratadas com CP376395 na dose de 20 mg/kg tiveram maiores níveis de c-Fos que as fêmeas INA salina ($p = 0,003$); enquanto as fêmeas INA tratadas com o CP376395 na dose de 30 mg/kg apresentaram menores níveis de c-Fos que as fêmeas INA tratadas com salina ($p < 0,05$) (Figura 17C).

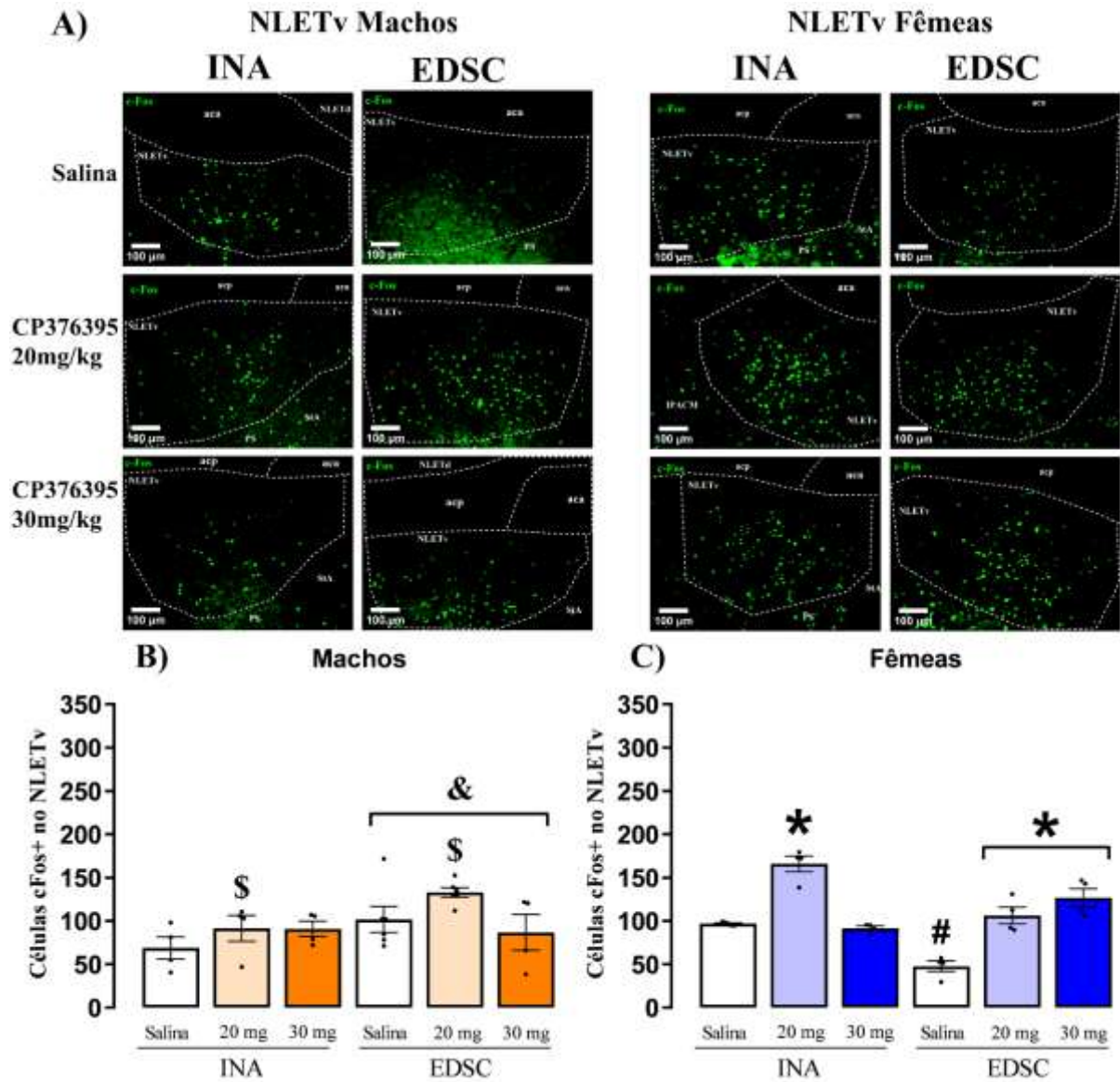
Figura 17 - Quantificação da expressão da proteína c-Fos no NLET, na subregião NLETd, por meio da contagem do número de células positivas para c-Fos. A) Fotomicrografias que ilustram a marcação de células imunorreativas à c-Fos no NLETd de camundongos machos e fêmeas expostos ao EDSC e ao CP376395 nas doses de 20 e 30 mg/kg, com aumento de 20 vezes (barra de escala = 100µm). B) Machos expostos ao EDSC ($n = 16$) apresentaram maior expressão de c-Fos no NLETd em comparação aos machos submetidos à INA ($n = 12$), independentemente do hemisfério e do tratamento. C) Nas fêmeas, as EDSC salina ($n = 4$) tiveram menor c-Fos que as INA salina ($n = 4$), efeito revertido pelo CP376395 nas doses de 20 mg/kg ($n = 4$) e 30 mg/kg ($n = 4$). As fêmeas INA tratadas com a dose de 20 mg/kg ($n = 4$) e 30 mg/kg ($n = 4$) tiveram maior e menor c-Fos que as INA salina, respectivamente. As barras representam a média $\pm$ EPM. $\&p < 0,05$ comparando níveis de expressão da c-Fos de animais expostos ao EDSC ou à INA. $\#p < 0,05$ comparando níveis de expressão da proteína c-Fos entre

0,003), independentemente do tratamento. Por outro lado, os machos tratados com o CP376395 na dose de 20 mg/kg tiveram maiores níveis de c-Fos que os machos tratados com salina ($p = 0,01$) e com o fármaco na dose de 30 mg/kg ($p = 0,01$), independentemente da condição à qual foram expostos (Figura 18B).

No caso das fêmeas, houve distribuição normal ($p = 0,14$), porém não houve homoscedasticidade ($p = 0,04$). Adicionalmente, não houve efeito do fator hemisfério ($F_{(1,36)} = 0,130$, $p = 0,72$, $\eta^2p = 0,003$) nem da interação entre os três fatores ($F_{(2,36)} = 0,027$, $p = 0,97$, $\eta^2p = 0,001$).

A ANOVA indicou efeito da interação entre os fatores condição e tratamento, com tamanho de efeito muito elevado ($F_{(2,36)} = 29,818$, $p = 0,001$, $\eta^2p = 0,62$), do fator condição, com tamanho de efeito médio ($F_{(1,36)} = 10,787$, $p = 0,002$, $\eta^2p = 0,23$) e do fator tratamento, com tamanho de efeito muito elevado ($F_{(2,36)} = 34,966$, $p = 0,001$, $\eta^2p = 0,66$). O *post hoc* indicou que as fêmeas expostas ao EDSC e tratadas com salina tiveram menor expressão de c-Fos no NLETv em comparação com as fêmeas submetidas à INA e tratadas com salina ($p < 0,05$), efeito revertido pelo CP376395 nas doses de 20 mg/kg ($p < 0,05$) e 30 mg/kg ($p < 0,05$). As fêmeas submetidas à INA e tratadas com a dose de 20 mg/kg tiveram maior expressão de c-Fos que as fêmeas INA tratadas com salina ($p < 0,05$) e com a dose de 30 mg/kg do CP376395 ($p = 0,05$) (Figura 18C).

Figura 18 - Quantificação da expressão da proteína c-Fos no NLET, na subregião NLETv, por meio da contagem do número de células positivas para c-Fos. A) Fotomicrografias que ilustram a marcação de células imunorreativas à c-Fos no NLETv de camundongos machos e fêmeas expostos ao EDSC e ao CP376395 nas doses de 20 e 30 mg/kg, com aumento de 20 vezes (barra de escala = 100 μ m). B) No NLETv, os machos EDSC ($n = 16$) tiveram maiores níveis de c-Fos que os INA ($n = 12$), independentemente do tratamento. Os machos tratados com a dose de 20 mg/kg ($n = 10$) tiveram maior c-Fos que os tratados com salina, independentemente da condição. C) Nas fêmeas, as EDSC salina ($n = 4$) tiveram menor expressão de c-Fos que as INA salina ($n = 4$). Efeito revertido pelo CP376395 nas doses de 20 mg/kg ($n = 4$) e 30 mg/kg ($n = 4$). As fêmeas INA tratadas com a dose de 20 mg/kg ($n = 4$) tiveram maior c-Fos que as fêmeas INA salina. As barras representam a média $\pm$ EPM. & $p < 0,05$ comparando níveis de expressão da c-Fos de animais expostos ao EDSC ou à INA. \$ $p < 0,05$ comparando animais tratados com CP376395 nas doses de 20 mg/kg, 30 mg/kg ou salina. # $p < 0,05$ comparando níveis de expressão da proteína c-Fos entre animais expostos ao EDSC e à INA e tratados com salina. * $p < 0,05$ comparando a expressão de c-Fos de animais tratados com CP376395 nas doses de 20 e 30 mg/kg quando comparados com salina. INA, Interação Não agressiva; EDSC, Estresse de Derrota Social Crônico.



Fonte: Elaboração própria, 2025.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo indicou que a exposição crônica ao EDSC induziu déficit no comportamento social em camundongos machos avaliados no TIS; efeito observado na diminuição do tempo gasto na ZI, no aumento do tempo gasto na ZA e na diminuição da RI dos machos expostos ao estresse, corroborando resultados de estudos prévios que avaliaram o efeito do EDSC sobre camundongos machos (Santos-Costa et al., 2021; Da Costa et al., 2023; Chen et al., 2024).

O efeito do estresse de produzir comportamento de evitação social dos machos poderia ocorrer por causa de fatores como o aumento na neuroinflamação no sistema nervoso central e redução das sinapses estabelecidas por micróglia de camundongos suscetíveis ao EDSC (González Ibañez et al., 2023).

Por outro lado, tem-se estudado o papel da interação entre o núcleo accumbens e o córtex pré-frontal ventromedial no comportamento social relacionado ao estabelecimento de hierarquias sociais entre camundongos, modulando a aprendizagem destas hierarquias durante seções do teste de competição social em tubo. Neste modelo, um camundongo enfrenta um animal dominante, observando-se ativação dessas áreas durante ensaios do TIS realizados após a exposição dos animais ao EDSC, sendo que a ativação desse circuito neural estaria relacionada ao aumento da interação com o alvo do TIS, principalmente em machos resilientes ao EDSC (Fetcho et al., 2023). Assim, é possível observar o papel fundamental do CPFm na modulação do comportamento de interação social de camundongos machos, quando expostos ao estresse psicossocial crônico.

No caso das fêmeas, o estudo de Smith et al., (2023) relatou que a ausência de efeito do estresse na interação social poderia ser explicada pela expressão diferencial de RNAm do GR *nr3c1*. Neste sentido, os autores sugerem que a maior expressão desse receptor no hipocampo das fêmeas, em comparação com os machos, pode estar associada à resiliência à exposição ao estresse crônico por causa de processos de regulação da resposta de estresse de maior intensidade nas fêmeas. Assim, os resultados observados nas fêmeas do presente estudo podem se dever à expressão de receptores de glicocorticoides no encéfalo, que facilitam a adaptação da resposta de estresse das fêmeas e a resiliência comportamental a estímulos psicossociais estressores.

Porém, também existem estudos que indicam que a exposição ao estresse induz evitação social nas fêmeas, produzindo perfil comportamental semelhante ao observado nos machos. Tais pesquisas apresentam alternativas ao uso do EDSC como modelo de estresse psicossocial em fêmeas, como a utilização de elementos de modelos como o estresse de instabilidade social e o estresse por aglomeração, formulando modelo de estresse psicossocial crônico em que uma fêmea experimental C57BL/6 é inserida em uma caixa habitada por grupos de até 9 fêmeas da linhagem CD-1 por 15 dias consecutivos (Furman; Tsoory; Chen, 2022); ou o modelo de estresse social múltiplo integrado, que envolve elementos de isolamento social, estresse por aglomeração, estresse de testemunho de derrota social e estresse por competição em tubo, para induzir respostas de estresse em camundongos fêmeas C57BL/6J (Zhai et al., 2024).

É importante ressaltar que as diferenças observadas na literatura quanto aos resultados nos TIS das fêmeas podem resultar de diferenças no tipo de modelo animal utilizado e nas características dos protocolos de estresse aplicados. Porém, o maior déficit na interação entre os machos em comparação com as fêmeas do presente trabalho corrobora os achados de estudos epidemiológicos com seres humanos (Vesga-Lopez et al., 2008; Altemus; Sarvaiya; Epperson, 2014).

A posterior fenotipagem dos camundongos machos expostos ao EDSC, em animais resilientes e suscetíveis de acordo com os escores da RI, mostrou que 50,9% dos expostos ao EDSC apresentaram resiliência ao estresse; enquanto 49,1% apresentaram suscetibilidade ao estresse. Nas fêmeas, 92,9% apresentaram resiliência ao estresse, enquanto 7,1% apresentaram suscetibilidade. Os resultados do presente estudo, nos machos, são semelhantes aos publicados por Vassilev et al., (2021), que mostraram que camundongos machos adolescentes expostos à derrota social tiveram 55,26% de resiliência e 44,74% de suscetibilidade ao estresse; enquanto machos adultos apresentaram 34,48% de resiliência e 65,52% de suscetibilidade. No caso das fêmeas, Pantoja-Urbán et al., (2024) indicaram que 85% das fêmeas expostas à derrota social foram resilientes ao estresse, enquanto 15% foram suscetíveis.

Com base nos estudos anteriores (Vassilev et al., 2021; Pantoja-Urbán et al., 2024), foi possível identificar que o protocolo de EDSC utilizado neste estudo foi efetivo em produzir fenótipos comportamentais de resiliência e suscetibilidade ao TIS análogos aos observados na literatura. De modo que o EDSC produziu machos resilientes e suscetíveis ao estresse em partes quase iguais; enquanto nas fêmeas, a maioria das expostas ao EDSC se mostrou resiliente ao estresse psicossocial crônico, não apresentando um prejuízo significativo no seu

comportamento de interação social. Isso apoia a noção anteriormente apresentada, vinculada à relação entre os nossos achados no TIS dos camundongos swiss-webster machos e a maior prevalência de mudanças comportamentais relacionadas à interação social de machos humanos que padecem de ansiedade generalizada (Vesga-Lopez et al., 2008; Altemus; Sarvaiya; Epperson, 2014).

A análise estatística das medidas comportamentais do TIS, separando os machos expostos ao EDSC em resilientes e suscetíveis, mostrou que os animais suscetíveis apresentaram comportamento relacionado à evitação social, isto é, tempo menor na ZI e maior ZA na presença do alvo. Além disso, tiveram menor RI que os animais controle e resilientes. Por outro lado, os animais resilientes ao estresse não apresentaram tais alterações na interação social, apresentando comportamento semelhante ao controle, além de maior RI quando comparados ao controle e aos suscetíveis.

A resiliência ao estresse pode ser sustentada pela já mencionada ativação da via CPFm-núcleo accumbens em confrontos com figuras dominantes da hierarquia social (Fetcho et al., 2023). Por outro lado, nossos resultados corroboram estudos prévios que apresentaram 47,1% de camundongos C57BL/6 machos suscetíveis ao estresse; os autores sugeriram relação entre o aumento da ativação da habênula lateral, em conjunto com a diminuição da expressão dos receptores GABA-B nesta área encefálica, e a suscetibilidade de camundongos machos expostos ao estresse (Li et al., 2021).

Outros autores têm descrito influência inversamente proporcional da expressão de receptores purinérgicos como connexina 43 e o P2X7 nos astrócitos presentes no CPFm após exposição ao EDSC, de modo que quanto maior for a expressão desses canais, menor será a interação social dos camundongos estressados, resultando no fenótipo suscetível observado na literatura e no presente estudo (Nishioka et al., 2024). Por último, foi vinculada a suscetibilidade ao estresse no TIS com redução da expressão de receptores de glicocorticoides nos astrócitos do CPFm, resultando na diminuição da liberação de ATP no córtex dos animais (Lu et al., 2021).

Adicionalmente, tem sido observado aumento da expressão de outros receptores purinérgicos, como o P2X2, no CPFm de animais expostos ao EDSC. O funcionamento desses receptores na inibição de interneurônios GABAérgicos em resposta ao estresse já foi relacionado ao aumento da ativação de projeções neurais que comunicam ao CPFm com a habênula lateral, estrutura fundamental nas respostas comportamentais de tipo ansioso de

modelos animais expostos a estímulos aversivos como o estresse crônico (Tian et al., 2024; Tong et al., 2024). Nesse sentido, também foi observado que a redução ou eliminação desses receptores promoveu maior resiliência ao estresse psicossocial (Kuang et al., 2022).

Dessa forma, os nossos resultados contribuem para a compreensão dos efeitos do EDSC sobre a resposta do tipo ansioso dos animais, além de apoiar o corpo de trabalhos publicados que descrevem as suas bases neurobiológicas.

Essas pesquisas propõem que a resposta crônica de estresse leva à diminuição de receptores de glicocorticoides no CPFm, fenômeno que é acompanhado pela redução da neurotransmissão de ATP (Lu et al., 2021). Sugerimos que essa escassez de ATP, provocada pelo EDSC, estimularia o processo de superregulação responsável pelo aumento da quantidade de receptores P2X2 no CPFm. Esse receptor, como outros da família P2X, tem sido envolvido com a modulação da expressão de glutamato nesta área encefálica, comprovando a relação entre a neurotransmissão purinérgica e a resposta do CPFm ao EDSC (Duan et al., 2003; Parpura; Scemes; Spray, 2004). Esse mecanismo neurobiológico, induzido pelo EDSC, seria finalmente responsável pela atenuação da inibição da via sináptica entre o CPFm e a habênula lateral, já observada por outros autores (Li et al., 2021; Tian et al., 2024; Tong et al., 2024). Ou seja, o EDSC estimularia diversos processos neurais que levariam a hiperativação da habênula lateral. Assim, a habênula lateral, excitada pelo mecanismo descrito acima, seria a base da realização dos comportamentos de evitação social observados no TIS (Lu et al., 2021; Tian et al., 2024; Tong et al., 2024).

No presente estudo, o EDSC de 10 dias diminuiu a atividade locomotora dos camundongos machos no LCE, tanto dos tratados com salina quanto dos tratados com CP376395 nas doses de 20 e 30 mg/kg. A influência do EDSC na diminuição da locomoção dos animais já tem sido descrita em estudos prévios (Ota; Suchecki; Meerlo, 2018). De modo que não consideramos os nossos achados como inesperados, nem geram preocupação sobre a validade das medidas relacionadas ao comportamento do tipo ansioso do labirinto. Esta diminuição na locomoção dos animais pelo EDSC pode ser explicada por fatores como o aumento da inflamação no sistema nervoso central e o aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias, o aumento da liberação de glicocorticoides no encéfalo e a redução da ativação das vias dopaminérgicas entre a área tegmental ventral e a substância negra (Pistovcakova et al., 2005; He et al., 2021; Ajayi et al., 2022).

A própria neurotransmissão CRFérgica também tem sido envolvida com mudanças na locomoção de animais estressados. Na pesquisa focada no estudo da função dos receptores NPSR na substância negra e no globo pálido, a administração intracerebral de neuropeptídeo S aumentou a locomoção no teste do campo aberto, efeito que foi revertido pela administração intraperitoneal da Antalarmina, antagonista do CRFR1, na dose de 30 mg/kg (Li et al., 2015). Destaca-se, então, que os resultados do presente estudo corroboram pesquisas sobre o efeito do EDSC na atividade locomotora de camundongos machos, que relatam influência de fatores como a neurotransmissão CRFérgica, dopaminérgica e a ativação de áreas além das compreendidas no eixo HPA, como a área tegmental ventral e a substância negra.

Observamos que o EDSC diminuiu a porcentagem de entradas e a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos no labirinto, indicando efeito do estresse de induzir perfil comportamental de tipo ansioso nos camundongos machos, como estabelecido em estudos que classificam esses comportamentos como relacionados à ansiedade (Lister et al., 1987; Rodgers; Johnson, 1995).

Já foi descrito o efeito de protocolos de EDSC com duração semelhante ao do presente estudo (entre 10 e até 30 dias) na redução da exploração dos braços abertos no labirinto (Macedo et al., 2018). O estudo sugere que a ativação agravada do eixo HPA seria responsável pela expressão destes comportamentos, baseando-se no aumento dos níveis plasmáticos de corticosterona durante o estresse (Macedo et al., 2018).

Além disso, outros estudos indicam o prejuízo do EDSC sobre comportamentos relacionados à ansiedade, como a maior latência de retirada da área central, o aumento do tempo gasto nos braços fechados e a redução do tempo gasto nos braços abertos do LCE. Observa-se também um impacto no comportamento relacionado a processos de consolidação da memória e aprendizagem, evidenciado pela maior latência de contato com a plataforma do teste aquático do Morris (Jianhua et al., 2017). Com isso, os nossos resultados vão ao encontro dos já publicados sobre o potencial ansiogênico do EDSC em camundongos machos.

Por outro lado, os resultados do presente estudo indicam que a administração sistêmica do CP376395 aumentou a exploração dos braços abertos tanto dos machos expostos ao EDSC quanto dos expostos à INA. Corroboramos os achados do estudo prévio do nosso laboratório que demonstrou que o CP376395, quando administrado no NLET, reverteu o efeito ansiogênico induzido pelo estresse de derrota social. De acordo com os autores, o EDSC induz aumento na neurotransmissão de óxido nítrico no CPFm direito, que se comunica com o NLET, aumentando

a ativação dos receptores tipo 1 do CRF e diminuindo a exploração do labirinto, sendo que a administração intracerebral do CP376395 neutralizou o efeito do estresse (Faria; Laverde; Nunes-De-Souza, 2020).

Como mencionado anteriormente, foi observado aumento da exploração do LCE nos animais não expostos ao EDSC, após administração do CP376395. Estudos com resultados semelhantes aos nossos indicaram aumento da exploração dos braços abertos do LCE, por machos não submetidos ao EDSC, quando o CP376395 era administrado diretamente na amígdala (Cipriano; Gomes; Nunes-De-Souza, 2016); no CPFm (Miguel; Gomes; Nunes-De-Souza, 2014), no córtex insular anterior (Lopes et al., 2024) e no hipocampo ventral (Bertagna et al., 2021). Pelo contrário, o antagonismo seletivo dos receptores tipo 1 do CRF não modulou o comportamento de tipo ansioso no LCE de camundongos machos não expostos ao EDSC, quando realizado na matéria cinzenta periaquedutal dorsal (Miguel; Nunes-De-Souza, 2011) nem no NLET (Faria et al., 2016). Isso permite evidenciar o papel fundamental dos receptores tipo 1 do CRF na modulação do comportamento de tipo ansioso de animais machos frente à exposição a estímulos ansiogênicos como o LCE, sendo que esse efeito varia dependendo da área encefálica estimulada pelos CRFR1. Sugere-se a ação destes receptores, através da estimulação da proteína Gs e consequente ativação da via adenilil ciclase-AMPC; para fosforilação da CREB (Miguel; Gomes; Nunes-De-Souza, 2014).

Por último, enquanto estudos focados na administração direta do CP376395 em áreas estratégicas do encéfalo obtiveram resultados diferenciais, os nossos conseguiram manter o efeito do fármaco de aumentar a exploração do LCE tanto de camundongos expostos ao EDSC quanto os expostos à INA; de modo que possíveis alterações na biodisponibilidade do CP376395 no sistema nervoso central, causadas pelo passo da via de administração intracerebral dos estudos prévios para a via intraperitoneal do presente estudo, não alteraram os efeitos conhecidos da administração do fármaco.

No caso dos resultados obtidos da exposição das fêmeas ao LCE, o EDSC reduziu a porcentagem de entradas nos braços abertos das fêmeas, efeito revertido pelo CP376395 na dose de 30 mg/kg. Com relação à porcentagem de tempo nos braços abertos, observou-se que o fármaco, na dose de 30 mg/kg, aumentou o tempo de exploração unicamente das fêmeas previamente expostas ao EDSC e tratadas com salina. Assim, destaca-se que o modelo de EDSC utilizado no presente estudo foi efetivo em induzir comportamentos de tipo ansioso nas fêmeas. Além disso, o efeito do tratamento foi diferente daquele visto nos machos, ao aumentar a

exploração do labirinto unicamente nas fêmeas previamente submetidas ao EDSC, em vez de aumentar a exploração tanto dos animais EDSC quanto dos INA, como observado nos machos.

Como nos resultados do TIS, não há consenso na literatura atual sobre o efeito do estresse de derrota social sobre os comportamentos relacionados à ansiedade do LCE das fêmeas. Existem diversos estudos que obtiveram resultados semelhantes aos nossos, como o estudo do Harris et al., (2018) que aplicou modelo de EDSC de 10 dias, em que as fêmeas C57BL/6J receberam aplicação de urina de camundongos CD-1 machos para induzir ataques de residentes CD-1 machos durante as sessões de derrota social. O estudo do Canto de Souza et al., (2025), que aplicou modelo de derrota social em que se avaliou o comportamento de animais que testemunharam a interação agressiva. Assim como o do Zhai et al., (2025), que desenhou um protocolo de estresse que integrou elementos de protocolos de competição em tubo, de testemunho da derrota social, de estresse por isolamento e de estresse por aglomeração, baseado em colocar o sujeito experimental em uma caixa de alojamento com superlotação de camundongos da mesma linhagem.

Porém, também há estudos que não acharam efeito do EDSC nem do estresse de testemunho sobre o comportamento no LCE de fêmeas. Um dos estudos utilizou um modelo de EDSC em que um camundongo C57BL/6J macho era inserido na caixa-moradia de um residente CD-1 macho. Quando começavam as interações agressivas, o intruso macho era trocado por um intruso C57BL/6J fêmea, para fazer com que o residente macho agredisse à fêmea (Pantoja-Urbán et al., 2024). No outro estudo, ratos Sprague-Dawley fêmeas adultas foram submetidas a protocolo de estresse de testemunho da derrota social por 5 dias, em que os animais assistiam à interação agressiva de animais machos; apresentando ausência de efeito do estresse sobre o comportamento das fêmeas no LCE (Smiley et al., 2023).

Apesar dos resultados contraditórios nas pesquisas consultadas, nosso estudo parece indicar efetividade de modelo de EDSC desenvolvido no nosso laboratório, baseado na interação agressiva entre residentes e intrusos fêmeas, em induzir comportamentos de tipo ansioso; sendo um modelo promissor para futuras pesquisas focadas no estudo dos efeitos do estresse psicossocial em fêmeas e das diferenças sexuais das respostas comportamentais a este tipo de estresse.

Outro resultado interessante do nosso estudo foi a administração da dose de 30 mg/kg do CP376395, que reverteu o prejuízo na exploração observado em camundongos fêmeas expostas ao EDSC, sem efeito na exploração das fêmeas expostas à INA. Até o momento da

elaboração do presente trabalho, os estudos que utilizaram o CP376395 se focaram exclusivamente no seu potencial na modulação do consumo de álcool reforçado pelo estresse (Newman et al., 2018; Potretzke; Robins; Ryabinin, 2020; Nipper et al., 2024).

Porém, um estudo avaliou o papel ansiogênico da administração direta de esteroides anabólicos androgênicos no NLET dorsal, efeito revertido pela administração intra-NLET dorsal da Antalarmina. Os resultados do presente estudo corroboram com dados da literatura (Oberlander; Henderson, 2012), pois demonstra que o CP376395 é efetivo na atenuação de respostas comportamentais relacionadas à ansiedade no LCE, em camundongos fêmeas expostas a estímulos estressores crônicos. Além disso, sugere possível papel da neurotransmissão CRFérgica no aumento da comunicação entre a amígdala central e o NLET, assim como no aumento da neurotransmissão GABAérgica nesta via neural após exposição ao estressor. Isto indica papel da ativação do NLETd na resposta comportamental de tipo ansioso das fêmeas (Oberlander; Henderson, 2012).

Com base em evidências anteriores, ressaltamos o papel central do NLET da modulação do comportamento de tipo ansioso das fêmeas, o qual parece ser semelhante ao observado previamente nos machos, onde a administração intra-NLET do CP376395 reverteu o efeito ansiogênico provocado pela administração intracerebral do doador de óxido nítrico NOC-9, sem alterar o comportamento de machos tratados com veículo (Faria et al., 2016).

Sobre a análise do tecido sanguíneo, observou-se aparente modulação dos níveis plasmáticos de corticosterona nos animais. Os machos, submetidos ao EDSC e à INA, tratados com CP376395 na dose de 30 mg/kg, tiveram níveis de corticosterona maiores que os tratados com salina. Nas fêmeas, o EDSC diminuiu os níveis de corticosterona tanto das tratadas com salina quanto das tratadas com CP376395. Estes resultados parecem contradizer diversos estudos, que apresentaram aumento dos níveis de corticosterona após exposição dos roedores aos protocolos de estresse como a derrota social aguda e crônica, ao estresse de restrição e ao LCE (Rodgers et al., 1999; Keeney; Hogg; Marsden, 2001; Albrechet-Souza et al., 2007; Bowers et al., 2008; Sterlemann et al., 2008).

Existem também pesquisas que atribuem a diminuição dos níveis plasmáticos de corticosterona ao processo de recuperação dos níveis basais deste glicocorticoide. Quando medidos após a conclusão dos protocolos de estresse, o qual corresponderia ao processo de retroalimentação negativa da expressão de glicocorticoides, mediada pelos GR. Esses estudos mostraram o padrão já mencionado de maior corticosterona, quando medida durante os

protocolos de estresse e imediatamente após sua conclusão, como no caso do EDSC. Porém, quando o plasma sanguíneo era coletado em períodos de 90 minutos, 7 dias ou até 10 dias após a conclusão dos protocolos de estresse, os autores acharam níveis de corticosterona iguais entre animais machos estressados e não estressados (Hartmann et al., 2012; Macedo et al., 2018; Evertse et al., 2024; Nalepa et al., 2025).

Já nas fêmeas, os níveis plasmáticos de corticosterona são levemente menores em animais previamente estressados em comparação ao grupo controle, assim como observado no presente estudo (Nalepa et al., 2025). Dessa forma, sugere-se que o EDSC promove alteração no funcionamento do eixo HPA, haja vista a diminuição da corticosterona plasmática nas fêmeas observadas dois dias após o último episódio de derrota. Propõe-se que o EDSC aumentou os níveis de corticosterona durante o protocolo experimental, chegando posteriormente à fase de recuperação dos seus níveis basais, pela estimulação dos GR no sistema nervoso central. O estudo de Sullivan e Gratton (1999), sugere que essa diminuição nos níveis de corticosterona seria uma consequência esperada do estresse crônico, pois o EDSC levaria à deterioração do controle do CPFm sobre o eixo HPA (Cerqueira; Almeida; Sousa, 2008).

Finalmente, a dose de 30 mg/kg do CP376395 aumentou os níveis plasmáticos de corticosterona, em comparação com os machos tratados com salina. Estudos prévios apresentam efeito da administração de antagonistas seletivos dos receptores tipo 1 de CRF na reversão do aumento nos níveis plasmáticos de corticosterona, quando produzido por estressores como convulsões induzidas por choques elétricos ou pela administração sistêmica de lipopolissacarídeos (Mokhtarpour et al., 2016; Sun et al., 2023).

Assim, afirma-se influência de estímulos estressores no funcionamento do eixo HPA e nos níveis de corticosterona, por meio do aumento na expressão do CRFR1 em estruturas como o hipocampo; além do papel destes receptores na modulação do comportamento de modelos animais, através de mecanismos como a regulação de proteínas como a nectina3 e a calbindina no hipocampo (Mokhtarpour et al., 2016; Sun et al., 2023).

Enquanto os resultados do presente estudo também apresentam modulação do antagonismo dos receptores tipo 1 de CRF sobre os níveis de corticosterona, o momento da coleta do sangue dos sujeitos não permite observar resultados mais aproximados aos observados na literatura. Sugere-se em futuras pesquisas realizar a administração i.p. do CP376395, a exposição ao LCE e a coleta do sangue no último dia do EDSC; isso com o objetivo de avaliar

as mudanças nos níveis de corticosterona, na relação entre comportamentos de tipo ansioso e o antagonismo do CRFR1, antes do processo de recuperação dos níveis basais do glicocorticoide.

Por último, a quantificação da expressão geral da proteína c-Fos do CPFm e do NLET, dos encéfalos de camundongos machos e fêmeas, foi analisada após coleta semelhante a já descrita para a coleta do sangue, sendo que os sujeitos foram anestesiados e submetidos à perfusão transcardíaca e retirada de encéfalo, 90 minutos após administração intraperitoneal de salina ou CP376395 nas doses de 20 e 30 mg/kg e exposição ao LCE. Os resultados da análise geral da expressão de c-Fos destas regiões do encéfalo apresentaram diferenças sexuais na maneira como o estresse psicossocial crônico, assim como o antagonismo seletivo e sistêmico dos CRFR1, modulam a atividade encefálica dos camundongos.

No caso do CPFm, observou-se que a exposição de 10 dias à derrota social elevou o número de células imunorreativas para c-Fos nos camundongos machos, efeito revertido pelas doses de 20 mg/kg e 30 mg/kg do CP376395. Adicionalmente, foi observado que as duas doses do fármaco diminuíram a expressão de c-Fos dos machos expostos à INA, em comparação aos INA tratados com salina; efeito semelhante ao observado na porcentagem de entradas e tempo gasto nos braços abertos do LCE dos machos. Por outro lado, o EDSC também induziu aumento da expressão geral de c-Fos no NLET, sem efeito do tratamento em nenhum dos grupos INA ou EDSC dos machos.

O resultado observado nos machos, referente ao efeito do EDSC de aumentar a c-Fos no CPFm e no NLET, sugere o papel destas estruturas como suporte neurobiológico do comportamento do tipo ansioso observado no LCE. Assim, o já mencionado aumento da expressão da c-Fos pode se relacionar à diminuição da exploração dos braços abertos do LCE. Esse dado apoia o apresentado por pesquisas prévias, que sugerem que a porcentagem de entradas e tempo nos braços abertos do LCE constituiriam comportamento de tipo ansioso pela sua relação com a ativação do eixo HPA, e apoia a pesquisa que coloca a ativação do CPFm como moduladora da atividade do eixo HPA, em resposta a situações ansiogênicas (Lister et al., 1987; Rodgers; Johnson, 1995; Cerqueira; Almeida; Sousa, 2008; Macedo et al., 2018).

O resultado desta pesquisa também está em concordância com o que já foi descrito em estudos prévios, em que o estresse de derrota social estimula a expressão da c-Fos e da Δ Fos β no cérebro de roedores tanto em protocolos de derrota aguda quanto em protocolos de derrota crônica (Martinez; Phillips; Herbert, 1998; Da Costa et al., 2023). Diante dessas evidências, o presente trabalho confirma a capacidade do EDSC de modular o padrão de ativação do encéfalo

dos machos, além de apresentar que a ativação previamente observada no CPFm e no NLET, em protocolos de derrota social aguda, persiste no modelo crônico de 10 dias de derrota social (Martinez; Phillips; Herbert, 1998; Martinez; Calvo-Torrent; Herbert, 2002; Numa et al., 2019; Faria; Laverde; Nunes-De-Souza, 2020; Da Costa et al., 2023).

Como indicado anteriormente, o estresse de derrota social aumenta a expressão da c-Fos a curto prazo no CPFm dos camundongos intrusos (Numa et al., 2019). Porém, foi observado que a exposição crônica dos animais a este tipo de estresse psicossocial pode levar ao desenvolvimento de fenômenos deletérios, como a diminuição da densidade dendrítica do córtex pré-frontal medial um mês após o EDSC de 10 dias, o qual foi posteriormente relacionado ao aumento da densidade dendrítica da amígdala basolateral (Colyn et al., 2019); o EDSC também foi relacionado com diminuição da mielinização do CPFm e com a indução de comportamento do tipo depressivo em camundongos (Lehmann et al., 2017).

Adicionalmente, foi observado potencial do EDSC de reduzir a ativação própria dos neurônios do CPF ventromedial, assim como de alterar a comunicação bidirecional entre o CPFm e a amígdala, levando à hiperativação observada no córtex dos camundongos deste trabalho (Kumar et al., 2014; Abe et al., 2019). É possível afirmar que o EDSC pode induzir o aumento da ativação de c-Fos no CPFm, processo que está relacionado com alta variedade de eventos neurofisiológicos e neuroanatômicos dentro do próprio córtex e na sua comunicação com outras estruturas encefálicas, levando à desregulação da atividade do CPFm e seu papel na coordenação da resposta de estresse dos animais, que estaria relacionado ao comportamento do tipo ansioso observado no TIS e no LCE no presente estudo.

Enquanto o NLET, estudos prévios, assim como o presente trabalho, corroboram o efeito do EDSC de aumentar a sua atividade, mensurada na forma da expressão da c-Fos, sendo a neurotransmissão CRFérgica das principais envolvidas nesta ativação (Arnold et al., 1992; Herrera; Robertson, 1996; Martinez; Phillips; Herbert, 1998). A ativação do NLET, induzida pela experiência direta dos intrusos machos no EDSC, parece ser de maior intensidade que a experiência baseada na interação indireta do estresse de testemunho da derrota social; pois estudo prévio do laboratório de farmacologia da UNESP Araraquara, que avaliou o padrão de ativação das testemunhas da derrota social, não obteve efeito deste tipo de estresse psicossocial na atividade neural do NLET (Forero-Castillo et al., 2025).

Por outro lado, sugere-se que a ativação do NLET está mais relacionada com a expressão de comportamento defensivo em situações imediatas, como a exposição ao LCE; não estando

tão vinculada ao processamento da influência de estressores prévios como o EDSC sobre o comportamento futuro, sendo essa função de estruturas como o CPFm. Isto se observa no aumento da expressão da c-Fos em todos os grupos de machos expostos à derrota social, além do mostrado por estudo prévio que apresenta que a inibição do NLET, por meio do uso de um agonista do ácido Gamma-aminobutírico, atenua comportamento defensivo unicamente quando administrado prévio ao teste comportamental e não prévio à derrota social (Markham, Norvelle; Huhman, 2009). Assim, sugere-se que o NLET possa ser responsável pela expressão imediata de comportamento de tipo ansioso, sendo sua atividade de maior relevância em situações de confronto direto com ameaças e não pela observação de interações agonísticas.

O presente estudo indica papel fundamental da neurotransmissão CRFérgica na ativação do cérebro dos camundongos machos expostos ao EDSC. A administração intraperitoneal do antagonista seletivo dos receptores tipo 1 do CRF, o CP376395, reverteu o efeito da derrota social na expressão de c-Fos. Já foi descrito em estudos prévios que a administração intracerebroventricular de CRF induz aumento da c-Fos, efeito revertido em estruturas do sistema límbico como a amígdala, PVN e NLET, após administração de antagonistas do CRF, como o fator liberador de corticotrofina alfa-hélice e o D-Phe CRF ((12-41)) (Arnold et al., 1992; Herrera; Robertson, 1996; Jasnow; Davis; Huhman, 2004).

Porém, o nosso estudo sugere maior envolvimento da neurotransmissão CRFérgica do CPFm em comparação ao NLET, pois só a primeira estrutura mostrou mudanças na expressão da c-Fos induzidas pelo antagonista. Se assim, a ativação e a expressão de c-Fos no NLET poderiam ser resultado da ação de outros neurotransmissores, além do CRF. Esse pode ser o caso na neurotransmissão ocitocinérgica, pois o estudo Cui et al., (2025) achou padrão de ativação de c-Fos no NLET, exclusivamente de neurônios ocitocinérgicos, semelhante ao padrão observado nos machos do presente estudo. De maneira que a neurotransmissão de neuropeptídeos além do CRF, como a ocitocina, poderia ser responsável pelo padrão observado nos resultados dos camundongos machos do presente estudo.

A atenuação da expressão de c-Fos observada nos machos expostos ao EDSC e tratados com as duas doses do CP376395 também foi observada nos machos expostos à INA, sendo que esse fenômeno foi observado no CPFm, mas não no NLET, onde o tratamento não modulou a expressão de c-Fos de nenhum grupo.

Os nossos resultados, baseados na administração intraperitoneal do fármaco, reproduziram o padrão comportamental no LCE achado nos estudos prévios do nosso

laboratório. Assim, a administração sistêmica do CP376395 modulou a expressão da c-Fos do CPFm de machos não expostos à derrota, de forma semelhante ao comportamento no LCE de machos não expostos à derrota e que receberam administração intra-CPFm do fármaco (Miguel; Gomes; Nunes-De-Souza, 2014). Do mesmo modo, o padrão de ativação do NLET do presente estudo, que apresenta a ausência de efeito do fármaco no comportamento dos machos INA, é semelhante ao estudo prévio que realizou a administração intra-NLET do CP376395 e que também não observou mudanças comportamentais nos machos não expostos à derrota (Faria et al., 2016).

Os resultados do presente trabalho oferecem uma base neurobiológica às diferenças achadas nestes e entre outros estudos prévios, por meio do suporte à noção do funcionamento diferencial entre estruturas encefálicas responsáveis pela resposta de estresse dos animais, com foco na prevalência do CPFm sobre os comportamentos expressados pelos sujeitos, pela correspondência observada entre o comportamento no LCE e a expressão de c-Fos dos machos expostos à INA e ao EDSC.

Quanto aos resultados da microscopia de imunofluorescência para análise de imunorreatividade relacionada à c-Fos das fêmeas expostas ao EDSC e ao tratamento sistêmico com o CP376395, observou-se padrão de ativação diferente ao visto nos machos. No CPFm, a exposição de 10 dias à derrota social diminuiu a expressão geral de c-Fos das fêmeas tratadas com salina em comparação as fêmeas INA salina, efeito revertido pelo tratamento sistêmico com o CP376395 na dose de 30 mg/kg; além disso, as doses de 20 mg/kg e 30 mg/kg do fármaco diminuíram a expressão de c-Fos das fêmeas INA em comparação às INA tratadas com salina.

No caso do padrão de ativação do NLET, o EDSC também diminuiu a expressão de c-Fos das fêmeas tratadas com salina, efeito revertido pelas doses de 20 e 30 mg/kg do CP376395. De forma inesperada, o CP376395 na dose de 20 mg/kg aumentou a expressão de c-Fos das fêmeas INA quando comparadas às INA tratadas com salina; enquanto a dose de 30 mg/kg do fármaco reduziu a expressão da c-Fos nas fêmeas INA, em comparação às fêmeas do grupo INA salina.

Enquanto o nosso resultado das fêmeas parece contradizer o estabelecido na literatura, que indica efeito da derrota social de aumentar na expressão da c-Fos em áreas cerebrais envolvidas na expressão de comportamento defensivo como o NLET (Davis; Marler, 2004), outro estudo sugere papel da ativação de áreas não consideradas neste estudo, como o

hipocampo, na expressão de comportamento de tipo ansioso, sendo que o bloqueio dessa atividade levou à atenuação do comportamento defensivo (Mcquade et al., 2006).

Um último estudo apresentou que estímulos além do confronto social, como o desafio imune da infecção com lipopolissacarídeo, podem induzir efeitos nas estruturas cerebrais responsáveis pela resposta de estresse e pela ativação do eixo HPA, levando ao aumento na expressão da c-Fos no PVN de camundongos adultos (Girard-Joyal et al., 2015). Dessa forma, estas pesquisas apresentam que a resposta esperada do CPFm e no NLET, após exposição ao EDSC e ao LCE, deveria estar relacionada ao aumento na expressão da proteína da c-Fos em resposta à situação ansiogênica, como observado nos camundongos machos.

Porém, existem estudos que corroboram os nossos achados nas fêmeas, estes estudos apresentam que a exposição ao estresse de derrota social crônico pode induzir atenuação ao longo prazo do padrão de ativação da c-Fos do CPFm e do NLET, assim como da matéria cinzenta periaquedutal, hipocampo e do núcleo accumbens (Okamura et al., 2022). Este fenômeno sugere capacidade do EDSC de produzir mudanças nos mecanismos neurais de adaptação ao estresse psicossocial; pois a diminuição da atividade do córtex pré-frontal medial já tem sido relacionada à redução da sua própria densidade dendrítica, assim como à sobreexpressão da atividade da amígdala, estrutura fundamental envolvida na produção do comportamento do tipo ansioso, em roedores e humanos (Gee; Casey, 2015; Abe et al., 2019; Colyn et al., 2019).

Do mesmo modo, o EDSC pode induzir à atenuação da expressão da c-Fos no NLET das fêmeas, padrão que é observado em pesquisa que relaciona a atenuação da c-Fos do NLET com a diminuição da neurotransmissão ocitocinérgica nesta estrutura (Cui et al., 2025). Esse padrão se repete no estudo que indica diminuição na expressão genética do NLET após a derrota social, apresentando potencial do estresse psicossocial de modular as características fisiológicas e estruturais do NLET a longo prazo (Luo et al., 2021). Em síntese, a intensidade do EDSC parece influir na indução de um processo de desregulação do CPFm e do NLET, na forma da redução da sua expressão de c-Fos.

Esta desregulação estaria relacionada à perda da capacidade de adaptação das fêmeas a estímulos aversivos futuros, como o observado no comportamento de tipo ansioso no LCE. Além disso, a desregulação vincula-se a outros efeitos negativos do estresse, como o deterioro da integridade sináptica do CPFm e do NLET, bem como o prejuízo na sua capacidade de serem ativadas por situações ameaçantes futuras. Alguns autores têm relacionado esses fenômenos

com o desenvolvimento do fenótipo neurobiológico relacionado à depressão nos roedores (Okamura et al., 2022).

Sugere-se que as diferenças no padrão de ativação neural do CPFm e do NLET observadas nas fêmeas, em comparação aos machos, estão vinculadas a um processo de desregulação provocado pelo EDSC. Com essa explicação, a atenuação nos níveis de expressão da c-Fos observados nas fêmeas pode ser vinculada ao comportamento de tipo ansioso observado no LCE, por meio da hiperativação da amígdala em resposta à atenuação do CPFm (Colyn et al., 2019). Por outro lado, apresenta-se o potencial farmacológico do tratamento intraperitoneal com o CP376595, sendo que a dose de 30 mg/kg teve o maior impacto na reversão do comportamento do tipo ansioso no LCE e na reversão das mudanças na expressão da c-Fos do CPFm e do NLET, das fêmeas expostas ao EDSC.

O efeito do fármaco, nos níveis de c-Fos dos animais INA, pode ser atribuído à capacidade do fármaco de atenuar a ativação induzida pelo valor aversivo do LCE. No entanto, ainda não está claro o motivo pelo qual a dose de 20 mg/kg do fármaco aumentou a expressão de c-Fos do NLET das fêmeas INA, enquanto a dose de 30 mg/kg levou as fêmeas tratadas com essa dose à expressão de níveis de c-Fos semelhantes às expostas ao EDSC e tratadas com salina.

Assim, estudos posteriores são necessários para avaliar os potenciais efeitos destas doses em outras áreas do encéfalo das fêmeas, ou em outros testes comportamentais que avaliem comportamento do tipo ansioso.

Da mesma maneira, o resultado obtido da mensuração dos níveis plasmáticos de corticosterona das fêmeas pode ser relacionado ao processo de desregulação do CPFm e do NLET, por causa do estresse crônico. Devido à semelhança entre a diminuição nos níveis do glicocorticoide e do padrão de expressão da c-Fos no cérebro das fêmeas.

A análise das subregiões do CPFm e NLET de machos e fêmeas, oferece outro resultado de interesse. As três subregiões do CPFm dos machos apresentaram padrão de ativação similar ao observado na análise expressão geral da área. O EDSC aumentou a c-Fos e o CP376395 diminuiu a sua expressão tanto nos animais EDSC quanto nos INA, sendo que o efeito do fármaco foi observado no Cg1 unicamente nos machos tratados com a dose de 20 mg/kg. Porém, houve diferenças entre as atividades do PrL esquerdo e direito. O hemisfério direito dos

machos EDSC apresentou maior expressão de c-Fos que o hemisfério esquerdo dos mesmos animais e maior que ambos os hemisférios dos machos INA.

Os nossos resultados são compatíveis com os achados de Santos Costa et al., (2021), os quais descreveram indução de evitação social e comportamento do tipo ansioso pelo EDSC de 10 dias. Além disso, a quantificação da Δ FosB e da dupla marcação da Δ FosB + CaMKII indicou aumento bilateral na atividade do Cg1 e do IL. No PrL, houve aumento destes marcadores unicamente no hemisfério direito dos machos EDSC. Os autores determinaram papel diferencial entre os hemisférios do CPFm. Assim, o hemisfério direito seria responsável pelo perfil ansioso induzido nos animais enquanto o esquerdo estaria envolvido na inibição desta resposta, com o PrL agindo como via de comunicação entre os hemisférios. Este processo seria mediado pela modulação da neurotransmissão glutamatérgica no PrL direito, como observado pelo aumento da marcação do CaMKII (Mcklveen; Myers; Herman, 2015).

Essa noção é suportada pelo trabalho de Cerqueira, Almeida e Sousa (2008), onde se propõe que o CPFm coordena a ativação comportamental e endócrina do eixo HPA, em resposta a estímulos estressores agudos e crônicos; o papel excitatório do CPFm seria desenvolvido pelo seu hemisfério direito, sendo o esquerdo responsável pela sua inibição (Sullivan; Gratton, 2002; Sullivan, 2004). Os nossos resultados também apoiam esta ideia, pois a administração sistêmica de um antagonista seletivo dos CRFR1 no cérebro dos animais levou à diminuição da expressão de c-Fos e do comportamento do tipo ansioso. De modo que a neurotransmissão CRFérgica estaria diretamente envolvida na modulação da atividade do CPFm, e o seu bloqueio sistêmico apresentaria resultados semelhantes aos obtidos pela inibição farmacológica, assim como pela lesão bilateral do CPFm e unilateral do seu hemisfério direito (Sullivan; Gratton, 1999; Sullivan, 2004; Cerqueira; Almeida; Sousa, 2008; Santos Costa et al., 2021).

Por outro lado, o estudo de Cerqueira, Almeida e Sousa (2008) também postula diferenças entre o funcionamento do Cg1 e do IL. O primeiro estaria envolvido na atenuação da resposta de estresse enquanto o último seria responsável pela sua ativação, estimulando a atividade do eixo HPA. Os nossos resultados corroboram essa declaração, a expressão de c-Fos do IL foi maior em comparação com o Cg1 (ver Figura 20, Apêndice B,). Isso confirma o papel principal do córtex pré-frontal ventromedial (IL) na ativação da resposta ao estresse crônico nos machos. Sugerimos que se possa observar inversão desse padrão de ativação a longo prazo. O Cg1 apresentaria maior expressão de c-Fos que o IL, pois o Córtex pré-frontal dorsomedial

(Cg1) passaria a inibir a reação inicial do ventromedial ao LCE (Cerqueira; Almeida; Sousa, 2008).

Sobre o efeito do estresse crônico nas subregiões do CPFm, o estudo de Garrett e Wellman (2009), apresenta que o estresse de restrição crônico levou à diminuição da densidade dendrítica de neurônios piramidais no Cg1 de ratos Sprague-Dawley machos, com efeito oposto nas fêmeas. Adicionalmente, estudo feito com participantes humanos mostrou que homens com menor ativação do CPFm dorsal e maior ativação do CPFm ventral tiveram melhor resposta a estímulos estressores, sendo que foi encontrado o padrão inverso nas mulheres (Goldfarb; Seo; Sinha, 2019). Esses achados apoiam os nossos resultados nas subregiões do CPFm, que apresentaram aumento na expressão da c-Fos pelo EDSC e diminuição dessa ativação após tratamento nos machos, enquanto houve redução da c-Fos em resposta ao EDSC e aumento pelo tratamento nas fêmeas. Com base na existência de diferenças morfológicas e funcionais na resposta do CPFm de machos e fêmeas ao estresse crônico.

O EDSC parece desencadear outros efeitos nas subregiões do CPFm dos machos. O Cg1 apresenta perfil de maior susceptibilidade ao estresse crônico, pois foi observada redução na qualidade da sua comunicação com o hipocampo, além de diminuição da neurotransmissão dopaminérgica, podendo produzir efeitos deletérios em processos de memória dos machos (Lee et al., 2011). A expressão de c-Fos do PrL e do IL ao estresse é modulada pela dopamina e noradrenalina, pois a interrupção da neurotransmissão destas catecolaminas diminui a c-Fos de roedores expostos ao estresse, sendo que a interrupção da segunda leva também à redução da expressão de c-Fos no NLETv (Spencer; Day, 2004). A revisão revela a existência de diferenças na função e nas áreas que se comunicam com cada subregião do CPFm. Com isso, a expressão de c-Fos nesta área cerebral dependeria da neurotransmissão de outras substâncias, além da CRFérgica, na resposta de estresse crônico.

Por último, um estudo prévio aplicou um protocolo experimental de estresse crônico, de maior duração e intensidade que o do presente trabalho: aplicando estresse de nado forçado em água fria e quente, por exposição à sala fria, estresse por agitação, por hipóxia e exposição ao campo aberto; por período de 14 dias. Esse protocolo levou à hipoativação do IL por meio da inibição de GR e da ativação de neurônios GABAérgicos nesta área, levando a um perfil de ativação oposto ao nosso (Mcklveen et al., 2016). Dessa maneira, quando exposto ao protocolo de estresse de maior intensidade do que o empregado nesta pesquisa, o IL dos roedores machos apresentou perfil de hipoativação semelhante ao observado nas fêmeas, mostrando o potencial

do estresse crônico de desregular o CPFm e aportando evidência da maior susceptibilidade ao EDSC das fêmeas deste trabalho.

No NLET dos machos, observou-se que o EDSC aumentou a expressão da c-Fos no NLETd e no NLETv, sendo que a dose de 20 mg/kg do CP376395 modulou a sua expressão unicamente no NLETv, aumentando os níveis de c-Fos em machos INA e EDSC. O padrão de ativação idêntico no NLET dorsal e ventral, em resposta ao EDSC, corrobora o proposto em estudos anteriores, que atribuem a estas áreas o papel de zona de integração dos sinais inibitórios do CPFm e do hipocampo. O NLETd e o NLETv, agrupados como NLET anterior, integrariam estes sinais para controlar a atividade do eixo HPA por meio da inibição do PVN, sendo que no estresse crônico a desregulação deste sistema levaria à hiperativação deste núcleo do hipotálamo (Radley, 2012).

O estudo de King et al., (2017), descreveu um possível mecanismo neurobiológico pelo qual a atividade do NLETd leva à expressão de comportamento do tipo ansioso em machos. Segundo os autores, a exposição ao estresse crônico variado induz a produção do polipeptídeo ativador do adenilato ciclase hipofisário (PACAP, do inglês *Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide*) no NLETd de ratos Sprague-Dawley machos. O PACAP contribuiria para a modulação da atividade do eixo HPA, pois os autores demonstraram que a administração intra-NLETd do PACAP induziu aumento na produção de corticosterona nos animais que passaram pelo estresse crônico variado (Hammack et al., 2009; King et al., 2017).

Outro estudo sobre a relação entre o CPFm e o NLETv apresentou que lesões bilaterais no primeiro levaram à redução da expressão da c-Fos no segundo, após exposição ao estresse de restrição ou por exposição a éter (Figueiredo et al., 2003). Isso ressalta o papel da região ventral do NLET na resposta neural a estímulos estressores diversos. Também vale a pena destacar a estreita sincronização entre o padrão de ativação das duas áreas avaliadas neste trabalho, que apresentam relação diretamente proporcional na sua expressão de c-Fos; assim, quando o EDSC aumenta a c-Fos do CPFm, há aumento também da c-Fos no NLET dos machos e quando o EDSC diminui a c-Fos no CPFm das fêmeas, observa-se redução no seu NLET.

Enquanto o efeito do tratamento farmacológico, a dose de 20 mg/kg aumentou a expressão de c-Fos dos machos EDSC e INA no NLETv. Tem sido reportado que o NLET é a área cerebral com maior produção de CRF, além do hipotálamo (Van De Poll; Cras; Ellender, 2023). Essa forte expressão CRFérgica forma conexões entre o NLET e outras regiões do encéfalo, como a amígdala central, os núcleos de rafe, a matéria cinzenta periaquedutal e outras;

estando também vinculada com vias de neurotransmissão de serotonina, do neuropeptídeo Y e da neurotensina (Kash; Winder, 2006; Marcinkiewicz et al., 2016; Van De Poll; Cras; Ellender, 2023).

Adicionalmente, tanto o NLETd quanto o NLETv apresentam neurotransmissão principalmente GABAérgica, com menor número de células glutamatérgicas, principalmente localizadas no NLETv (Poulin et al., 2009; Daniel; Guo; Rainnie, 2017; Van De Poll; Cras; Ellender, 2023). Com isso, sugerimos que o aumento na c-Fos no NLETv após o bloqueio dos CRFR1 pode ser resultado da alteração das vias sinápticas que atravessam esta região, podendo ser responsáveis pelo aumento da expressão de c-Fos no NLETv. Porém, são necessárias novas pesquisas que avaliem o funcionamento desses neuropeptídeos após o antagonismo dos CRFR1.

Por outro lado, o antagonismo nos neurônios GABAérgicos poderia diminuir o seu efeito inibitório dentro desta área, estimulando maior atividade dos neurônios glutamatérgicos no NLETv, sendo registrado como o aumento na c-Fos observado nos nossos resultados. Com essa afirmação, do estudo de Kim et al., (2013) e de Daniel e Rainnie (2016), propõe-se a existência de um circuito ansiolítico dentro do NLET, envolvendo áreas dentro do NLETd; assim como um circuito ansiogênico, protagonizado pelo núcleo oval do NLETd, sendo que a ativação de um diminui a atividade do outro (Daniel; Rainnie, 2016). Finalmente, sugerimos que o antagonismo dos CRFR1 inibe a ação das áreas ansiogênicas dentro do NLET, potenciando a expressão de c-Fos de possíveis núcleos com função ansiolítica dentro do NLETv.

No caso das fêmeas, houve padrão de ativação semelhante entre as subregiões do CPFm. O EDSC diminuiu os níveis da c-Fos, efeito revertido pela dose de 30 mg/kg do fármaco. As duas doses do CP376395 diminuíram a c-Fos nas fêmeas INA. Contudo, no PrL houve maior imunorreatividade relacionada à c-Fos no hemisfério esquerdo do que no direito, independentemente da condição ou tratamento aplicados. Mantendo a nossa conclusão sobre o efeito do EDSC de desregular o funcionamento do CPFm, o estudo de Bollinger, Bergeon Burns e Wellman (2016) sugere que o estresse de restrição cônica e agudo diminui a ativação de micróglias no PrL de ratos Sprague-Dawley fêmeas.

Outro estudo aplicou modelo de estresse variado crônico, observando diminuição da densidade de espinhas dendríticas de neurônios piramidais no PrL, assim como comportamento relacionado à perda de memória de trabalho no labirinto em T em ambos os sexos (Anderson

et al., 2020). É possível observar o efeito do estresse crônico variado e do EDSC de alterar elementos estruturais e funcionais do CPFm, levando à perda da sua capacidade de regular o eixo HPA em resposta ao estresse, como observado no nosso trabalho. Ressaltamos a maior atividade do PrL esquerdo como prova disto, pois apresenta o padrão contrário ao esperado em animais expostos ao EDSC (Cerqueira; Almeida; Sousa, 2008; Santos Costa et al., 2021). O estudo de Shepard, Page e Coutellier (2016) oferece um possível mecanismo responsável pelo observado nos nossos achados. Revelaram que o estresse crônico aumentava a expressão de neurônios GABAérgicos de parvalbumina, que inibem a neurotransmissão GABAérgica do PrL e do IL, levando à diminuição da atividade destas áreas, como observado no nosso estudo.

É interessante também observar que, ainda neste contexto, a administração sistêmica do CP376395 reverteu esse efeito do estresse, mantendo padrão semelhante ao observado nas fêmeas não expostas ao EDSC, como já foi reportado nos machos desta pesquisa e em estudos prévios do nosso grupo (Faria; Laverde; Nunes-De-Souza, 2020).

Nas duas subregiões do NLET, o EDSC reduziu a expressão de c-Fos das fêmeas tratadas com salina. Nosso resultado das fêmeas é semelhante ao descrito em ratos machos por Figueiredo et al., (2003), pois a diminuição do padrão de ativação de c-Fos após o EDSC, observada no CPFm, veio acompanhada pela diminuição na atividade das subregiões do NLET. Além de ter ausência de diferenças entre a relação estreita entre o CPFm e o NLET no contexto da resposta de estresse crônico, esses resultados apoiam o argumento da desregulação no funcionamento do cérebro das fêmeas após o EDSC: o efeito do EDSC na atividade do c-Fos do NLET seria comparável ao efeito da lesão bilateral do CPFm (Figueiredo et al., 2003).

Isso reafirma a noção da maior suscetibilidade das fêmeas ao EDSC, que teriam maior dificuldade de se adaptar ao EDSC, mostrando perfil psicobiológico do tipo ansioso e possivelmente depressivo (Okamura et al., 2022). Contudo, são necessários novos estudos que investiguem os efeitos deste modelo de EDSC em testes para a avaliação do comportamento do tipo depressivo.

Sobre o tratamento farmacológico, a dose de 20 mg/kg do fármaco reverteu o efeito do estresse no NLETd e no NLETv, aumentando também a c-Fos das fêmeas INA. De forma interessante, a dose de 30 mg/kg reduziu a c-Fos das fêmeas INA unicamente no NLETd. Contrário ao apresentado nos machos, sugerimos que o fármaco consegue reverter o efeito do estresse ao evitar a estimulação CRFérgica excessiva das vias inibitórias CPFm e no NLET (Poulin et al., 2009; Mcklveen et al., 2016; Daniel; Guo; Rainnie, 2017; Van De Poll; Cras;

Ellender, 2023). Porém, o motivo pelo qual a dose de 30 mg/kg sobre as fêmeas INA ainda não fica esclarecido, sendo necessários novos estudos que avaliem os efeitos desta e outras doses do CP376395 no funcionamento do cérebro das fêmeas.

CONCLUSÕES

Em suma, observam-se diferenças sexuais no comportamento, nos níveis de corticosterona e no padrão de ativação de c-Fos no CPFm e NLET dos animais. O EDSC induziu maior prejuízo na interação social nos machos, que apresentaram maiores índices de evitação social em comparação às fêmeas. Porém, o EDSC produziu comportamento do tipo ansioso tanto em machos como em fêmeas no LCE. Nos machos, as doses de 20 e 30 mg/kg do CP376395 aumentaram a exploração, de sujeitos EDSC e INA, nos braços abertos do LCE. No caso das fêmeas, observou-se efeito unicamente da dose de 30 mg/kg de reverter o comportamento de tipo ansioso das EDSC. Os resultados obtidos reproduzem dados prévios do grupo e reafirmam o papel fundamental do CRFR1 na modulação da resposta comportamental frente ao estresse crônico.

Enquanto nas fêmeas houve diminuição dos níveis de corticosterona, sem efeito do tratamento, nos machos, a dose de 30 mg/kg do CP376395 aumentou a corticosterona quando comparada aos tratados com salina. Isso permite apreciar diferenças no papel do EDSC e do funcionamento dos CRFR1 na regulação do eixo HPA, porém, o momento de coleta do tecido sanguíneo dificultou a análise destas mudanças.

Sobre a análise da expressão da c-Fos dos machos, o EDSC incrementou a sua expressão no CPFm. As duas doses do CP376395 diminuíram a atividade da c-Fos dos machos EDSC e INA. No NLET, apreciou-se unicamente aumento da expressão de c-Fos dos animais EDSC, sem efeito do tratamento. Conclui-se que existem diferenças no funcionamento das áreas cerebrais estudadas em sujeitos expostos ao estresse psicossocial e ao antagonismo do CRFR1. Ressalta-se o papel do CPFm, como regulador da resposta neurofisiológica e comportamental de estresse dos animais, sendo resultados que corroboram os achados prévios do nosso grupo de pesquisa.

Nas fêmeas, o efeito do EDSC foi o oposto ao dos machos, diminuindo os níveis de c-Fos no CPFm e no NLET. Unicamente a dose maior do fármaco (30 mg/kg) reverteu esse efeito em ambas as estruturas. Estes resultados indicam estado de desregulação neural em resposta à intensidade do EDSC, levando ao perfil comportamental observado no LCE e à diminuição dos níveis de corticosterona. Propõe-se então que essa maior susceptibilidade ao EDSC pode estar relacionada com processos de perda de mielinização e densidade dendrítica, assim como aparição de perfil depressivo nos animais. O nosso estudo oferece possíveis explicações à maior

susceptibilidade à ansiedade observada no sexo feminino no contexto clínico, sendo necessário que pesquisas futuras avaliem a influência da derrota social a longo prazo.

Enquanto a expressão de c-Fos nas subregiões do CPFm e do NLET de machos e fêmeas foi semelhante ao visto na análise da expressão geral, destacamos o papel do PrL direito no controle lateral da atividade do CPFm dos machos e do PrL esquerdo nas fêmeas. É importante ressaltar o papel de estruturas como o PrL, IL na estreita relação entre o padrão de ativação c-Fos entre o CPFm e o NLET; e do NLETv, no controle CRFérgico do eixo HPA, sendo a estrutura do NLET que respondeu tanto ao EDSC quanto ao tratamento farmacológico em machos e fêmeas. O presente trabalho permitiu avaliar a interação entre áreas-chave nos processos adaptativos dos animais, na resposta psicobiológica à exposição ao estresse psicossocial crônico e ao antagonismo sistêmico do CRF1R, assim como as diferenças sexuais neste processo.

A principal limitação no presente estudo apresenta-se na mensuração dos níveis de corticosterona, pois não foi possível observar a sua resposta inicial à exposição ao tratamento farmacológico ou ao LCE, nem se a exposição prévia ao EDSC modulava a expressão do hormônio. São necessárias pesquisas futuras, que aprofundem a nossa compreensão dos mecanismos neuroendócrinos responsáveis pela resposta de estresse crônico e da modulação farmacológica do CRF em machos e fêmeas.

PERSPECTIVAS

Com base nos resultados e limitações obtidos na mensuração dos níveis plasmáticos de corticosterona dos animais submetidos ao EDSC e testados no LCE, sugere-se realizar coletas de sangue em outros momentos do protocolo, com o objetivo de apreciar melhor as mudanças nos níveis de corticosterona em resposta ao EDSC, ao LCE e ao tratamento farmacológico.

Os resultados da microscopia de imunofluorescência das fêmeas abrem a porta para futuras análises sobre os efeitos a longo prazo do EDSC, por meio de análises que avaliem a integridade neural de áreas como o CPFm e o NLET, mas também de áreas como a amígdala, PVN e matéria cinzenta periaquedutal. Isso com o objetivo de aprofundar nossa compreensão sobre o processo de desregulação induzida pelo estresse observado no presente estudo. Adicionalmente, sugere-se que futuras pesquisas avaliem como a neurotransmissão de neuromoduladores, além do CRF, influem nos processos reguladores do NLET.

Por último, seria de interesse avaliar o desempenho de fêmeas expostas ao EDSC em testes comportamentais que avaliem comportamento relacionado à depressão, para observar como o EDSC influi em outros modelos experimentais de psicopatologias de alta relevância na atualidade.

REFERÊNCIAS

- ABE, R. et al. Social defeat stress causes selective attenuation of neuronal activity in the ventromedial prefrontal cortex. **Scientific Reports**, v. 9, n. 9447, 1 jul. 2019.
- AJAYI, A. M. et al. Repeated social defeat stress exacerbates lipopolysaccharide-induced behavioural deficits in mice: ameliorative role of *Chrysophyllum albidum* fruit extract through anti-neuroinflammation, antioxidant and neurochemical balance. **Metabolic Brain Disease**, v. 37, n. 1, p. 2467-2481. 22 jul. 2022.
- ALBRECHET-SOUZA, L. et al. Increases in plasma corticosterone and stretched-attend postures in rats naïve and previously exposed to the elevated plus-maze are sensitive to the anxiolytic-like effects of midazolam. **Hormones and Behavior**, v. 52, n. 2007, p. 267-273. 10 mai. 2007.
- AMARAL, V. C. S; GOMES, K. S; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Increased corticosterone levels in mice subjected to the rat exposure test. **Hormones and Behavior**, v. 57, n. 1, p. 128-133. 3 Oct. 2010.
- AMERICAM PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- ANDERSON, R. M. et al. Evidence for similar prefrontal structural and functional alterations in male and female rats following chronic stress or glucocorticoid exposure. **Cerebral Cortex**, v. 30, n. 1, p. 353–370, 1 jan. 2020.
- ALBERT, D. J. et al. Activation of aggression in female rats by normal males and by castrated males with testosterone implants. **Physiology & Behavior**, v. 44, n. 1, p. 9–13, jan. 1988.
- ALTEMUS, M.; SARVAIYA, N.; EPPERSON, C. N. Sex differences in anxiety and depression clinical perspectives. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 35, n. 3, p. 320–330, ago. 2014.
- ARNOLD, F. J. et al. Expression of c-fos in regions of the basal limbic forebrain following intra-cerebroventricular corticotropin-releasing factor in unstressed or stressed male rats. **Neuroscience**, v. 51, n. 2, p. 377–390, 1 nov. 1992.
- AYER, M. L.; WHITSETT, J. M. Aggressive behaviour of female prairie deer mice in laboratory populations. **Animal Behaviour**, v. 28, n. 3, p. 763–771, ago. 1980.
- BALE, T. L.; VALE, W. W. Crf and crf receptors: role in stress responsivity and other behaviors. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 44, n. 1, p. 525–557, 10 fev. 2004.
- BARRETTO-DE-SOUZA, L. et al. Role of CRF1 and CRF2 receptors in the lateral hypothalamus in cardiovascular and anxiogenic responses evoked by restraint stress in rats: evaluation of acute and chronic exposure. **Neuropharmacology**, v. 212, p. 109061–109061, 1 jul. 2022.

BARTOLOMUCCI, A. et al. Effects of housing social context on emotional behaviour and physiological responses in female mice. **Scand. J. Lab. Anim. Sci.**, v. 36, n. 1, p. 87–95, 24 nov. 2009.

BATESON, M; BRILOT, B; NETTLE, D. Anxiety: an evolutionary approach. **The Canadian Journal of Psychiatry**, v. 56, n. 12, p. 707–715, dez. 2011.

BEEN, L. E.; GIBBONS, A. B.; MEISEL, R. L. Towards a neurobiology of female aggression. **Neuropharmacology**, v. 156, p. 107451, 15 set. 2019.

BERTAGNA, N. B. et al. Involvement of the ventral, but not dorsal, hippocampus in anxiety-like behaviors in mice exposed to the elevated plus maze: participation of CRF1 receptor and PKA pathway. **Pharmacological Reports**, v. 73, n. 1, p. 57–72, 11 nov. 2020.

BOLLINGER, J. L.; BERGEON BURNS, C. M.; WELLMAN, C. L. Differential effects of stress on microglial cell activation in male and female medial prefrontal cortex. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 52, p. 88–97, 1 fev. 2016.

BOURIN, M. Animal models for screening anxiolytic-like drugs: a perspective. **Anxiety**, v. 17, n. 3, p. 295–303, set. 2015.

BOWERS, S. L. et al. Stressor-specific alterations in corticosterone and immune responses in mice. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 22, n. 2008, p. 105–113. Jan. 2008.

CALPE-LÓPEZ, C. et al. Resilience to the short- and long-term behavioral effects of intermittent repeated social defeat in adolescent male mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 227–228, p. 173574, 1 jun. 2023.

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**, v. 138, n. 1, p. 111313, 2 abr. 2025.

CARNEVALI, L. et al. The contagion of social defeat stress: insights from rodent studies. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 111, p. 12–18, abr. 2020.

CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 8, p. 1193–1205, jan. 2005.

CERQUEIRA, J. J.; ALMEIDA, O. F. X.; SOUSA, N. The stressed prefrontal cortex. Left? Right! **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 22, n. 5, p. 630–638, 1 jul. 2008.

CHALMERS, D. T.; LOVENBERG, T. W.; DE SOUZA, E. B. Localization of novel corticotropin-releasing factor receptor (CRF2) mRNA expression to specific subcortical nuclei in rat brain: comparison with CRF1 receptor mRNA expression. **Journal of Neuroscience**, v. 15, n. 10, p. 6340–6350, 1 out. 1995.

CHAND, S. P.; MARWAHA, R. **Anxiety**, StatPearls Publishing. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470361/>. Acesso em: 1 set. 2023.

CHAUDHARY, S. et al. Sex differences in the effects of trait anxiety and age on resting-state functional connectivities of the amygdala. **Journal of Affective Disorders Reports**, v. 14, p. 100646, 1 dez. 2023.

CHEN, Y. L. et al. 2-Aryloxy-4-alkylaminopyridines: discovery of novel corticotropin-releasing factor 1 antagonists. **J Med Chem**, v. 51, n. 5, p. 1385–1392, 21 fev. 2008.

CHEN, C.W. et al. Ramelteon protects against social defeat stress-associated abnormal behaviors. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 241, n. 1, p. 173794, 2 Jun. 2024.

CIPRIANO, A. C.; GOMES, K. S.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. CRF receptor type 1 (but not type 2) located within the amygdala plays a role in the modulation of anxiety in mice exposed to the elevated plus maze. **Hormones and Behavior**, v. 81, p. 59–67, 1 maio 2016.

COLYN, L. et al. Chronic social defeat stress induces sustained synaptic structural changes in the prefrontal cortex and amygdala. **Behavioural Brain Research**, v. 373, p. 112079, 5 nov. 2019.

CRESTANI, C. C. Emotional stress and cardiovascular complications in animal models: a review of the influence of stress type. **Frontiers in Physiology**, v. 7, 24 jun. 2016.

CROCQ, M. A history of anxiety: from Hippocrates to DSM. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 17, n. 3, p. 319–325, set. 2015.

CRUZ, A. P. M; FREI, F; GRAEFF, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 49, n. 1, p. 171-176. 1 Oct. 1994.

CUI, Y. X. et al. Sex-dependent effects of adolescent chronic social defeat and social accompanying on emotional and social behaviors and the numbers of OT/Fos and AVP/Fos dual-labelled cells in brain regions of the mandarin vole (*Microtus mandarinus*). **Physiology & Behavior**, v. 299, p. 114997, 1 out. 2025.

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**, v. 17, 12 jun. 2023.

DANIEL, S. E.; GUO, J.; RAINNIE, D. G. A comparative analysis of the physiological properties of neurons in the anterolateral bed nucleus of the stria terminalis in the *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, and *Macaca mulatta*. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 525, n. 9, p. 2235–2248, 15 jun. 2017.

DANIEL, S. E.; RAINNIE, D. G. Stress modulation of opposing circuits in the bed nucleus of the stria terminalis. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 1, p. 103–125, 1 jan. 2016.

DAVIS, E. S.; MARLER, C. A. C-FOS changes following an aggressive encounter in female California mice: a synthesis of behavior, hormone changes and neural activity. **Neuroscience**, v. 127, n. 3, p. 611–624, 1 jan. 2004.

DEDIC, N.; CHEN, A.; DEUSSING, J. M. The CRF family of neuropeptides and their receptors - mediators of the central stress response. **Current Molecular Pharmacology**, v. 11, n. 1, 3 jan. 2018.

DELPINO, F. M. et al. Prevalence of anxiety during the COVID-19 pandemic: a systematic review and meta-analysis of over 2 million people. **Journal of Affective Disorders**, v. 318, p. 272–282, dez. 2022.

DEUSSING, J. M.; CHEN, A. The corticotropin-releasing factor family: physiology of the stress response. **Physiological Reviews**, v. 98, n. 4, p. 2225–2286, 15 ago. 2018.

DONOVAN, J.; BROWN, P. Blood collection. **Current protocols in neuroscience**, v. 33, n. 1, 1 nov. 2005.

DRAGUNOW, M.; FAULL, R. The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 29, n. 3, p. 261–265, 1 set. 1989.

DRICKAMER, L. C.; VANDENBERGH, J. G. Predictors of social dominance in the adult female golden hamster (*Mesocricetus auratus*). **Animal Behaviour**, v. 21, n. 3, p. 564–570, 1 ago. 1973.

DUAN, S. et al. P2X7 receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes. **The Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 4, p. 1320–1328, 15 fev. 2003.

ESTANISLAU, C.; MORATO, S. Prenatal stress produces more behavioral alterations than maternal separation in the elevated plus-maze and in the elevated T-maze. **Behavioral Brain Research**, v. 163, n. 1, p. 70–77, 6 Jun. 2005.

EVERTSE, D. et al. Transient impact of chronic social stress on effort-based reward motivation in non-food restricted mice: involvement of corticosterone. **Neurobiology of Stress**, v. 33, n. 2024, p. 100690, 1 nov. 2024.

FANSELOW, M. S. Neural organization of the defensive behavior system responsible for fear. **Psychonomic Bulletin & Review**, v. 1, n. 4, p. 429–438, dez. 1994.

FARHANE-MEDINA, N. Z. et al. Factors associated with gender and sex differences in anxiety prevalence and comorbidity: A systematic review. **Science Progress**, v. 105, n. 4, p. 003685042211354, out. 2022.

FARIA, M. P. et al. Anxiety-like responses induced by nitric oxide within the BNST in mice: role of CRF1 and NMDA receptors. **Hormones and Behavior**, v. 79, p. 74–83, mar. 2016.

FARIA, M. P.; LAVERDE, C. F.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Anxiogenesis induced by social defeat in male mice: role of nitric oxide, NMDA, and CRF1 receptors in the medial prefrontal cortex and BNST. **Neuropharmacology**, v. 166, p. 107973, abr. 2020.

FETCHO, R. N. et al. Regulation of social interaction in mice by a frontostriatal circuit modulated by established hierarchical relationships. **Nature Communications**, v. 14, n. 1, p. 2487, 29 abr. 2023.

FIGUEIREDO, H. F. et al. The medial prefrontal cortex differentially regulates stress-induced c-fos expression in the forebrain depending on type of stressor. **European Journal of Neuroscience**, v. 18, n. 8, p. 2357–2364, 1 out. 2003.

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**, p. 115160, 5 nov. 2025.

FRANKLIN, K. B. J; PAXINOS, G. **The mouse brain in stereotaxic coordinates**. 3 ed. Amsterdam: Elsevier, 2007.

FREDERICSON, E. Aggressiveness in female mice. **Journal of Comparative Psychology**, v. 45, n. 3, p. 254-257. Jun. 1952.

FULENWIDER, H D. et al. Social housing leads to increased ethanol intake in male mice housed in environmentally enriched cages. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 15, p. 695409, 2021.

FULFORD, A. J.; HARBUZ, M. S. An introduction to the HPA axis. **Handbook of Stress and the Brain - Part 1: The Neurobiology of Stress**, v. 15, p. 43–65, 2005.

FUSSE, E. J. et al. Anxiogenic doses of rapamycin prevent URB597-induced anti-stress effects in socially defeated mice. **Neuroscience Letters**, v. 818, p. 137519, 1 jan. 2024.

FURMAN, O.; TSOORY, M.; CHEN, A. Differential chronic social stress models in male and female mice. **European Journal of Neuroscience**, v. 55, n. 9-10, p. 2777–2793, 15 set. 2021.

GARCIA, A. M. B; CARDENAS, F. P; MORATO, S. Effect of different illumination levels on rat behavior in the elevated plus-maze. **Physiology & Behavior**, v. 85, n. 1, p. 265-270. 4 Abr. 2005.

GARCIA, A. M. B et al. Effects of apomorphine on rat behavior in the elevated plus-maze. **Physiology & Behavior**, v. 85, n. 1, p. 440-447. 15 Abr. 2005.

GARRETT, J. E.; WELLMAN, C. L. Chronic stress effects on dendritic morphology in medial prefrontal cortex: sex differences and estrogen dependence. **Neuroscience**, v. 162, n. 1, p. 195–207, 4 ago. 2009.

GEE, D. G.; CASEY, B. J. The impact of developmental timing for stress and recovery. **Neurobiology of Stress**, v. 1, p. 184–194, 1 jan. 2015.

GILBAR, O. et al. Risk factors for depression and anxiety during COVID-19 in Israel: a two-wave study before and during the pandemic. **Stress and Health**, v. 38, n. 4, p. 736-745, 15 jan. 2022.

GIRARD-JOYAL, O. et al. Age and sex differences in c-Fos expression and serum corticosterone concentration following LPS treatment. **Neuroscience**, v. 305, p. 293–301, 1 out. 2015.

GLOBAL BURDEN OF DISEASE COLLABORATIVE NETWORK. **Global Burden of Disease Study 2023 (GBD 2023) Results**. Seattle, United States: Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME), 2024. Disponível em: <https://vizhub.healthdata.org/gbd-results/>. Acesso em: 18 out. 2025.

GOLDEN, S. A. et al. A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice. **Nature Protocols**, v. 6, n. 8, p. 1183–1191, 21 jul. 2011.

GOLDFARB, E. V.; SEO, D.; SINHA, R. Sex differences in neural stress responses and correlation with subjective stress and stress regulation. **Neurobiology of Stress**, v. 11, p. 100177, nov. 2019.

GONZÁLEZ IBÁÑEZ, F. et al. Ketogenic diet changes microglial morphology and the hippocampal lipidomic profile differently in stress susceptible versus resistant male mice upon repeated social defeat. **Brain Behavior and Immunity**, v. 114, p. 383–406, 7 set. 2023.

GREEN, T.; FLASH, S.; REISS, A. L. Sex differences in psychiatric disorders: what we can learn from sex chromosome aneuploidies. **Neuropsychopharmacology**, v. 44, n. 1, p. 9–21, 1 jan. 2019.

HAMMACK, S. E. et al. Chronic stress increases pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression in the bed nucleus of the stria terminalis (BNST): roles for PACAP in anxiety-like behavior. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, n. 6, p. 833–843, jul. 2009.

HARBUZ, M. S. et al. Stress-induced activation of CRF and c-fos mRNAs in the paraventricular nucleus are not affected by serotonin depletion. **Brain Research**, v. 609, n. 1-2, p. 167–173, 23 abr. 1993.

HARRIS, G. W. Neural control of the pituitary gland. **Physiological Reviews**, v. 28, n. 2, p. 139-179. Abr. 1948.

HARRIS, A. Z. et al. A novel method for chronic social defeat stress in female mice. **Neuropsychopharmacology**, v. 43, n. 6, p. 1276–1283, 1 maio 2018.

HARTMANN, J. et al. The involvement of FK506-binding protein 51 (FKBP5) in the behavioral and neuroendocrine effects of chronic social defeat stress. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 332–339, 1 jan. 2012.

HAUGER, R. et al. Corticotropin Releasing Factor (CRF) receptor signaling in the central nervous system: new molecular targets. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 5, n. 4, p. 453–479, 1 ago. 2006.

HE, F. et al. Dopaminergic projection from ventral tegmental area to substantia nigra pars reticulata mediates chronic social defeat stress-induced hypolocomotion. **Molecular Neurobiology**, v. 58, n. 1, p. 5635–5648, 21 ago. 2021.

HERMAN, J. P. et al. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical stress response. **Comprehensive Physiology**, v. 6, n. 2, p. 603–621, 15 abr. 2016.

HERRERA, D. G.; ROBERTSON, H. A. Activation of c-fos in the brain. **Progress in Neurobiology**, v. 50, n. 2-3, p. 83–107, 1 out. 1996.

HUISING, M. O. et al. Glucocorticoids differentially regulate the expression of CRFR1 and CRFR2 α in MIN6 insulinoma cells and rodent islets. **Endocrinology**, v. 152, n. 1, p. 138–150, 1 jan. 2011.

HWA, L. S. et al. Dissociation of μ -opioid receptor and CRF-R1 antagonist effects on escalated ethanol consumption and mPFC serotonin in C57BL/6J mice. **Addiction Biology**, v. 21, n. 1, p. 111–124, 28 set. 2016.

HYDE, J. S.; EBERT, P. D. Correlated response in selection for aggressiveness in female mice. I. Male aggressiveness. **Behavior Genetics**, v. 6, n. 4, p. 421–427, 1 out. 1976.

IGNACIO, K. H. D. et al. Prevalence of depression and anxiety symptoms after stroke in young adults: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Stroke & Cerebrovascular Diseases**, v. 33, n. 7, p. 107732, 1 abr. 2024.

ITO, M. et al. Chronic non-discriminatory social defeat stress during the perinatal period induces depressive-like outcomes in female mice. **Brain Research**, v. 1825, p. 148734, 1 fev. 2024.

JASNOW, A. M.; DAVIS, M.; HUHMANN, K. L. Involvement of central amygdalar and bed nucleus of the stria terminalis corticotropin-releasing factor in behavioral responses to social defeat. **Behavioral Neuroscience**, v. 118, n. 5, p. 1052–1061, 2004.

JAVAID, S. F. et al. Epidemiology of anxiety disorders: global burden and sociodemographic associations. **Middle East Current Psychiatry**, v. 30, n. 1, 26 maio 2023.

JAMES, V. H. T.; FEW, J. D. Adrenocorticosteroids: chemistry, synthesis and disturbances in disease. **Clinics in Endocrinology and Metabolism**, v. 14, n. 4, p. 867-892. Nov. 1985.

JIANHUA, F. et al. Chronic social defeat stress leads to changes of behaviour and memory-associated proteins of young mice. **Behavioural Brain Research**, v. 316, n. 1, p. 136–144, jan. 2017.

JUTH, V.; DICKERSON, S. Social stress. **Springer eBooks**, p. 2098–2099, 1 jan. 2020.

KASH, T. L.; WINDER, D. G. Neuropeptide Y and corticotropin-releasing factor bi-directionally modulate inhibitory synaptic transmission in the bed nucleus of the stria terminalis. **Neuropharmacology**, v. 51, n. 5, p. 1013–1022, 1 out. 2006.

KAUR, H. et al. Single-cell profiling reveals heterogeneity and functional patterning of GPCR expression in the vascular system. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 15700–15700, 16 jun. 2017.

KELLER, P. A. et al. The role of the HPA axis in psychiatric disorders and CRF antagonists as potential treatments. **Arch. Pharm (Weinheim)**, v. 339, n. 7, p. 346–355, jul. 2006.

KEENEY, A. J; HOGG, S; MARSDEN, C. A. Alterations in core body temperature, locomotor activity, and corticosterone following acute and repeated social defeat of male NMRI mice. **Physiology & Behavior**, v. 74, n. 2001, p. 177-184. 11 mai. 2001.

KIERNAN, J. A. Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: what they are and what they do. **Microscopy Today**, v. 8, n. 1, p. 8-13, 1 jan. 2000.

KIM, S.-Y. et al. Diverging neural pathways assemble a behavioural state from separable features in anxiety. **Nature**, v. 496, n. 7444, p. 219-223, 20 mar. 2013.

KIM, S.Y. et al. Association between gut microbiota and anxiety symptoms: a large population-based study examining sex differences. **Journal of Affective Disorders**, v. 333, p. 21-29, n. 2023, abr. 2023.

KING, S. B. et al. The effects of prior stress on anxiety-like responding to intra-BNST pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in male and female rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 42, n. 8, p. 1679-1687, 20 jan. 2017.

KISHIMOTO, T. et al. Deletion of Crhr2 reveals an anxiolytic role for corticotropin-releasing hormone receptor-2. **Nature Genetics**, v. 24, n. 4, p. 415-419, 1 abr. 2000.

KOBLIN, D. D. Urethane: help or hindrance? **Anesthesia & Analgesia**, v. 94, n. 2, p. 241-242, fev. 2002.

KUANG, X. J. et al. P2X2 receptors in pyramidal neurons are critical for regulating vulnerability to chronic stress. **Theranostics**, v. 12, n. 8, p. 3703-3718, 1 mai. 2022.

KUCHIIWA, T.; KUCHIIWA, S. Evaluation of aggressiveness of female mice using a semi-automated apparatus for measurement of aggressive biting behavior toward an inanimate object. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 257, p. 179-184, 15 jan. 2016.

KUMAR, S. et al. Prefrontal cortex reactivity underlies trait vulnerability to chronic social defeat stress. **Nature Communications**, v. 5, n. 4537, 29 jul. 2014.

KUPERMAN, Y. et al. Expression and regulation of corticotropin-releasing factor receptor type 2 β in developing and mature mouse skeletal muscle. **Molecular Endocrinology**, v. 25, n. 1, p. 157-169, 1 jan. 2011.

LAURA, C. et al. Prevalence and risk factors for anxiety, stress and depression among higher education students in Portugal and Brazil. **Journal of Affective Disorders Reports**, v. 17, p. 100825, 11 ago. 2024.

LAKENS, D. Calculating and reporting effect sizes to facilitate cumulative science: a practical primer for t-tests and ANOVAs. **Frontiers in Psychology**, v. 4, n. 863, 26 nov. 2013.

LEE, Y. A. et al. Dorsal-ventral distinction of chronic stress-induced electrophysiological alterations in the rat medial prefrontal cortex. **Neuroscience**, v. 183, p. 108-120, 2 jun. 2011.

LEHMANN, M. L. et al. Chronic social defeat reduces myelination in the mouse medial prefrontal cortex. **Scientific Reports**, v. 7, n. 46548, 18 abr. 2017.

LI, C. et al. Urocortin III-immunoreactive projections in rat brain: partial overlap with sites of type 2 corticotrophin-releasing factor receptor expression. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 3, p. 991–1001, 1 fev. 2002.

LI, M. S. et al. Neuropeptide S increases locomotion activity through corticotropin-releasing factor receptor 1 in substantia nigra of mice. **Peptides**, v. 71, n. 1, p. 196–201, 31 jul. 2015.

LI, Z. L. et al. GABA(B) receptors within the lateral habenula modulate stress resilience and vulnerability in mice. **Physiology & Behavior**, v. 230, n. 1, p. 113311, 4 jan. 2021.

LIGHTMAN, S. L.; YOUNG, W. S. Corticotrophin-releasing factor, vasopressin and pro-opiomelanocortin mRNA responses to stress and opiates in the rat. **The Journal of Physiology**, v. 403, n. 1, p. 511–523, 1 set. 1988.

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, n. 2, jun. 1987.

LOPES, L. M. et al. Pharmacological manipulation of corticotropin-releasing factor receptors in the anterior and posterior subregions of the insular cortex differently affects anxiety-like behaviors in the elevated plus maze in rats. **BioMed Research International**, v. 2024, n. 1, p. 1–9, 31 jan. 2024.

LOVENBERG, T. W. et al. CRF2 alpha and CRF2 beta receptor mRNAs are differentially distributed between the rat central nervous system and peripheral tissues. **Endocrinology**, v. 136, n. 9, p. 4139–4142, 1 set. 1995.

LU, C. L. et al. Glucocorticoid receptor-dependent astrocytes mediate stress vulnerability. **Biological Psychiatry**, v. 92, n. 1, p. 204–215, 1 ago. 2021.

LUO, P. X. et al. Sex-specific effects of social defeat stress on miRNA expression in the anterior BNST. **Behavioural Brain Research**, v. 401, p. 113084, mar. 2021.

MACEDO, G. C. et al. Consequences of continuous social defeat stress on anxiety- and depressive-like behaviors and ethanol reward in mice. **Hormones and Behavior**, v. 97, n. 1, p. 154–161, jan. 2018.

MAGGI, C. A.; MELI, A. Suitability of urethane anesthesia for physiopharmacological investigations in various systems Part 1: General considerations. **Experientia**, v. 42, n. 2, p. 109–114, 15 fev. 1986.

MARCINKIEWCZ, C. A. et al. Serotonin engages an anxiety and fear-promoting circuit in the extended amygdala. **Nature**, v. 537, n. 7618, p. 97–101, 24 ago. 2016.

MARKHAM, C. M.; NORVELLE, A.; HUHMAN, K. L. Role of the bed nucleus of the stria terminalis in the acquisition and expression of conditioned defeat in Syrian hamsters. **Behavioural Brain Research**, v. 198, n. 1, p. 69–73, 2 mar. 2009.

MARÔCO, J. **Análise Estatística com o SPSS Statistics**. 6. ed. Portugal Pêro Pinheiro: ReportNumber: análise e gestão de informação, LDA., 2014.

MARTINEZ, M.; PHILLIPS, P. J.; HERBERT, J. Adaptation in patterns of c-fos expression in the brain associated with exposure to either single or repeated social stress in male rats. **Eur J Neurosci**, v. 10, n. 1, p. 20–33, 1 jan. 1998.

MARTINEZ, M.; CALVO-TORRENT, A.; HERBERT, J. Mapping brain response to social stress in rodents with c-fos expression: a review. **Stress**, v. 5, n. 1, p. 3–13, jan. 2002.

MARTINEZ, R; GARCIA, A. M. B; MORATO, S. Papel da luminosidade do biotério no comportamento do rato no labirinto em cruz elevado. **Estudos em Psicologia**, v. 10, n. 2, p. 239-245. Ago. 2005.

MARTINEZ, R. C. R et al. Thermal stress decreases general motor activity of rats in the elevated plus-maze but does not alter aversion to the open arms. **Behavioral Brain Research**, v. 182, n. 1, p. 135-139. 22 Ago. 2007.

MARTÍNEZ-CABALLERO, M. A. et al. Behavioural traits related with resilience or vulnerability to the development of cocaine-induced conditioned place preference after exposure of female mice to vicarious social defeat. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 130, p. 110912, 1 mar. 2024.

MATSUDA, S. et al. Persistent c-fos expression in the brains of mice with chronic social stress. **Neuroscience Research**, v. 26, n. 2, p. 157–170, 1 out. 1996.

MCEWEN, B. S.; STELLAR, E. Stress and the individual mechanisms leading to disease. **Archives of Internal Medicine**, v. 153, n. 18, p. 2093, 27 set. 1993.

MCKLVEEN, J. M. et al. Chronic stress increases prefrontal inhibition: a mechanism for stress-induced prefrontal dysfunction. **Biological Psychiatry**, v. 80, n. 10, p. 754–764, 15 nov. 2016.

MCKLVEEN, J. M. et al. “Braking” the prefrontal cortex: the role of glucocorticoids and interneurons in stress adaptation and pathology. **Biological Psychiatry**, v. 86, n. 9, p. 669–681, 1 nov. 2019.

MCKLVEEN, J. M.; MYERS, B.; HERMAN, J. P. The medial prefrontal cortex: coordinator of autonomic, neuroendocrine and behavioural responses to stress. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 27, n. 6, p. 446–456, 4 mar. 2015.

MCQUADE, J. M. S. et al. Deficient hippocampal c-fos expression results in reduced anxiety and altered response to chronic stress in female mice. **Neuroscience Letters**, v. 403, n. 1-2, p. 125–130, 31 jul. 2006.

MEASELLE, J; OSTLUND, B. D. **Anxiety**. In The SAGE encyclopedia of lifespan human development, v. 5, p. 134-137. SAGE Publications, Inc. 2018.

- MEHTA, N. S.; WANG, L.; REDEI, E. E. Sex differences in depressive, anxious behaviors and hippocampal transcript levels in a genetic rat model. **Genes, Brain and Behavior**, v. 12, n. 7, p. 695-704, ago. 2013.
- MENZAGHI, F et al. Characterization of a novel and potent corticotropin-releasing factor antagonist in rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 269, n. 2, p. 564-572, 1 maio 1994.
- MICZEK, K. A.; THOMPSON, M.; SHUSTER, L. Opioid-like analgesia in defeated mice. **Science**, v. 215, n. 4539, p. 1520-1522, 19 mar. 1982.
- MICZEK, K. A.; YAP, J. J; COVINGTON III, H. E. Social stress, therapeutics and drug abuse: preclinical models of escalated and depressed intake. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 120, n. 2, p. 102-128, nov. 2008.
- MIGUEL, T. T.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Anxiogenic and antinociceptive effects induced by corticotropin-releasing factor (CRF) injections into the periaqueductal gray are modulated by CRF1 receptor in mice. **Hormones and Behavior**, v. 60, n. 3, p. 292-300, ago. 2011.
- MIGUEL, T. T.; GOMES, K. S.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Tonic modulation of anxiety-like behavior by corticotropin-releasing factor (CRF) type 1 receptor (CRF1) within the medial prefrontal cortex (mPFC) in male mice: role of protein kinase A (PKA). **Hormones and Behavior**, v. 66, n. 2, p. 247-256, 1 jul. 2014.
- MIYANISHI, K et al. Microglia modulate sleep/wakefulness under baseline conditions and under acute social defeat stress in adult mice. **Neuroscience Research**, v. 202, p. 8-19, may. 2024.
- MOISAN, M. P. Stress, adolescence, and sex dimorphism. **Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research**, v. 27, p. 100418, 1 dez. 2022.
- MOKHTARPOUR, M. et al. Lateral hypothalamus orexinergic system modulates the stress effect on pentylenetetrazol induced seizures through corticotropin releasing hormone receptor type 1. **Neuropharmacology**, v. 110, n. 2016, p. 15-24, nov. 2016.
- MORGAN, J. I. et al. Mapping patterns of c- fos expression in the central nervous system after seizure. **Science**, v. 237, n. 4811, p. 192-197, 10 jul. 1987.
- MORIN, H. et al. Depression and anxiety symptoms during and after pediatric asthma hospitalization. **Hospital Pediatrics**, v. 11, n. 11, p. 1272-1280, 20 out. 2021.
- NALEPA, I. F. et al. Sex differences in the murine HPA axis after acute and repeated restraint stress. **Stress**, v. 28, n. 1, p. 2447079, dez. 2025.
- NATIONAL INSTITUTE OF MENTAL HEALTH. **Anxiety Disorders**. Disponível em: <<https://www.nimh.nih.gov/health/topics/anxiety-disorders>>. Acesso em: 1 mai. 2024.
- NECHITA, D.; NECHITA, F.; MOTORGA, R. A review of the influence the anxiety exerts on human life. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**, v. 59, n. 4, p. 1045-1051, 2018.

- NESSE, R. M. The smoke detector principle. natural selection and the regulation of defensive responses. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 935, n. 1, p. 75–85, 25 jan. 2001.
- NESSE, R. M. Natural selection and the regulation of defenses: a signal detection analysis of the smoke detector principle. **Evolution and Human Behavior**, v. 26, n. 1, p. 88–105, jan. 2005.
- NEWMAN, E. L. et al. Fighting females: neural and behavioral consequences of social defeat stress in female mice. **Biological Psychiatry**, v. 86, n. 9, p. 657–668, nov. 2019.
- NEWMAN, E. L. et al. Persistent escalation of alcohol consumption by mice exposed to brief episodes of social defeat stress: suppression by CRF-R1 antagonism. **Psychopharmacology**, v. 235, n. 6, p. 1807–1820, 25 abr. 2018.
- NIPPER, M. A. et al. Stress-enhanced ethanol drinking does not increase sensitivity to the effects of a CRF-R1 antagonist on ethanol intake in male and female mice. **Alcohol**, v. 120, p. 73–83, 4 jan. 2024.
- NISHIOKA, Y. et al. Altered expression of astrocytic ATP channels and ectonucleotidases in the cerebral cortex and hippocampus of chronic social defeat stress-susceptible BALB/c mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 47, n. 6, p. 1172–1178, 13 jun. 2024.
- NOCHAIWONG, S. et al. Global prevalence of mental health issues among the general population during the coronavirus disease-2019 pandemic: a systematic review and meta-analysis. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 13 maio 2021.
- NORMAN, K. J. et al. Social stress and escalated drug self-administration in mice I. **Alcohol and corticosterone**. v. 232, n. 6, p. 991–1001, 23 set. 2015.
- NUMA, C. et al. Social defeat stress-specific increase in c-Fos expression in the extended amygdala in mice: Involvement of dopamine D1 receptor in the medial prefrontal cortex. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 13 nov. 2019.
- NUNES, J. C. et al. General anxiety disorder-7 questionnaire as a marker of low socioeconomic status and inequity. **Journal of Affective Disorders**, v. 317, p. 287–297, nov. 2022.
- O'CONNOR, D. B.; THAYER, J. F.; VEDHARA, K. Stress and health: a Review of psychobiological processes. **Annual Review of Psychology**, v. 72, n. 1, p. 663–688, 4 set. 2021.
- OKAMURA, H. et al. Long-term effects of repeated social defeat stress on brain activity during social interaction in BALB/c mice. **eNeuro**, v. 9, n. 3, p. ENEURO.0068-22.2022, 1 mai. 2022.
- OLIVEIRA, L. A. et al. Both CRF1 and CRF2 receptors in the bed nucleus of stria terminalis are involved in baroreflex impairment evoked by chronic stress in rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 105, p. 110009, 1 mar. 2021.

OBERLANDER, J. G.; HENDERSON, L. P. Corticotropin-releasing factor modulation of forebrain GABAergic transmission has a pivotal role in the expression of anabolic steroid-induced anxiety in the female mouse. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 6, p. 1483–1499, 1 fev. 2012.

OTA, S. M.; SUCHECKI, D.; MEERLO, P. Chronic social defeat stress suppresses locomotor activity but does not affect the free-running circadian period of the activity rhythm in mice. **Neurobiology of Sleep and Circadian Rhythms**, v. 5, n. 1, p. 1–7, 19 mar. 2018.

PADURARIU, M. et al. Describing some behavioural animal models of anxiety and their mechanistics with special reference to oxidative stress and oxytocin relevance. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, v. 5, n. 2, p. 98–104, 1 dez. 2017.

PAN, Y. et al. Chronic social defeat alters behaviors and neuronal activation in the brain of female Mongolian gerbils. **Behavioural Brain Research**, v. 448, p. 114456, 25 jun. 2023.

PANTOJA-URBÁN, A. H. et al. Gains and losses: resilience to social defeat stress in adolescent female mice. **Biological Psychiatry**, v. 95, n. 1, p. 37–47, 1 jan. 2024.

PARPURA, V.; SCEMES, E.; SPRAY, D. C. Mechanisms of glutamate release from astrocytes: gap junction “hemichannels”, purinergic receptors and exocytotic release. **Neurochemistry International**, v. 45, n. 2-3, p. 259–264, jul. 2004.

PERRIN-TERRIN, A.-S. et al. The c-FOS protein immunohistological detection: a useful tool as a marker of central pathways involved in specific physiological responses in vivo and ex vivo. **Journal of Visualized Experiments : JoVE**, n. 110, p. 53613, 25 abr. 2016.

PERUSINI, J. N.; FANSELOW, M. S. Neurobehavioral perspectives on the distinction between fear and anxiety. **Learning & Memory**, v. 22, n. 9, p. 417–425, 18 ago. 2015.

PINHEIRO, S. H et al. Elevated mazes as animal models of anxiety: effects of serotonergic agents. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 79, n. 1, p. 71-85. 23 Mar. 2007.

PISTOVCAKOVA, J. et al. Felbamate reduces hormone release and locomotor hypoactivity induced by repeated stress of social defeat in mice. **European Neuropsychopharmacology**, v. 15, n. 2, p. 153–158, mar. 2005.

POTRETZKE, S.; ROBINS, M. T.; RYABININ, A. E. Differential sensitivity of alcohol drinking and partner preference to a CRFR1 antagonist in prairie voles and mice. **Hormones and Behavior**, v. 120, n. 1, p. 104676, abr. 2020.

POULIN, J. F. et al. Neuroanatomical characterization of endogenous opioids in the bed nucleus of the stria terminalis. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 33, n. 8, p. 1356–1365, 13 nov. 2009.

QUINN, J. J.; FANSELOW, M. S. Defenses and memories: functional neural circuitry of fear and conditional responding. **American Psychological Association eBooks**, p. 55–74, 10 jul. 2007.

RADULOVIC, J. et al. Modulation of learning and anxiety by Corticotropin-Releasing Factor (CRF) and stress: differential roles of CRF receptors 1 and 2. **The Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 12, p. 5016–5025, 15 jun. 1999.

RADLEY, J. J. Toward a limbic cortical inhibitory network: implications for hypothalamic-pituitary-adrenal responses following chronic stress. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 6, 28 mar. 2012.

RASSNICK, S. et al. Microinjection of a corticotropin-releasing factor antagonist into the central nucleus of the amygdala reverses anxiogenic-like effects of ethanol withdrawal. **Brain Research**, v. 605, n. 1, p. 25–32, mar. 1993.

REGUILÓN, M. D. et al. Resilience to social defeat stress in adolescent male mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 119, p. 110591, 20 dez. 2022.

RODGERS, R. J; JOHNSON, N. J. T. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 52, n. 2, p. 297-303. 10 Mar. 1995.

RODGERS, R. J. et al. Corticosterone response to the plus-maze: high correlation with risk assessment in rats and mice. **Physiology & Behavior**, v. 69, n. 1999, p. 47-53, 14 jul. 1999.

RODRIGUES, C. et al. Quality of life among adults with repaired tetralogy of fallot: a literature review. **Revista Portuguesa de Cardiologia (English Edition)**, v. 40, n. 12, p. 969–974, dez. 2021.

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**, v. 351, p. 833-842, 15 abr. 2024.

RODRÍGUEZ-PALMA, E. J. et al. Spinal alarmin HMGB1 and the activation of TLR4 lead to chronic stress-induced nociceptive hypersensitivity in rodents. **European Journal of Pharmacology**, v. 952, p. 175804, 1 ago. 2023.

RUIZ-VILLA, J. O. et al. Prevalence of anxiety symptoms among health workers in Colombia during the COVID-19 pandemic. **Revista Colombiana De Psiquiatria**. v. 53, n. 3, p. 302-309, 31 jan. 2023.

RUSSELL, G.; LIGHTMAN, S. The human stress response. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 15, n. 9, p. 525–534, 27 jun. 2019.

SAITO, A. et al. Social defeat stress enhances the rewarding effects of cocaine through $\alpha 1A$ adrenoceptors in the medial prefrontal cortex of mice. **Neuropharmacology**, v. 242, p. 109757, 1 jan. 2024.

SANTOS-COSTA, N. et al. Functional lateralization of the medial prefrontal cortex in the modulation of anxiety in mice: left or right? **Neuropharmacology**, v. 108, p. 82–90, 1 set. 2016.

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**, v. 15, 23 ago. 2021.

SELYE, H. A. A syndrome produced by diverse nocuous agents. **Nature**, v. 138, n. 32, 4 jul. 1936.

SHENG, M.; GREENBERG, M. E. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. **Neuron**, v. 4, n. 4, p. 477–485, 1 abr. 1990.

SHEPARD, R.; PAGE, C. E.; COUTELLIER, L. Sensitivity of the prefrontal GABAergic system to chronic stress in male and female mice: relevance for sex differences in stress-related disorders. **Neuroscience**, v. 332, p. 1–12, 22 set. 2016.

SMITH, A. et al. Metabolic, neuroendocrine and behavioral effects of social defeat in male and female mice using the chronic non-discriminatory social defeat stress model. **Hormones and Behavior**, v. 155, n. 1, p. 105412, 24 ago. 2023.

SMILEY, C. E. et al. Estrogen receptor beta in the central amygdala regulates the deleterious behavioral and neuronal consequences of repeated social stress in female rats. **Neurobiology of Stress**, v. 23, n. 1, p. 100531, mar. 2023.

SPENCER, S. J.; DAY, T. A. Role of catecholaminergic inputs to the medial prefrontal cortex in local and subcortical expression of Fos after psychological stress. **Journal of Neuroscience Research**, v. 78, n. 2, p. 279–288, 7 set. 2004.

SU, Y. et al. Dexmedetomidine improves the acute stress reactivity of male rat through interventions of serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 and nNOS in the bed nucleus of the stria terminalis. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 638, p. 155–162, 1 jan. 2023.

SUN, J. et al. CRHR1 antagonist alleviates LPS-induced depression-like behaviour in mice. **BMC Psychiatry**, v. 23, n. 17, p. 1–11, 9 jan. 2023.

SULLIVAN, R. M.; GRATTON, A. Lateralized effects of medial prefrontal cortex lesions on neuroendocrine and autonomic stress responses in rats. **The Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 7, p. 2834–2840, 1 abr. 1999.

SULLIVAN, R. M.; GRATTON, A. Prefrontal cortical regulation of hypothalamic–pituitary–adrenal function in the rat and implications for psychopathology: side matters. **Psychoneuroendocrinology**, v. 27, n. 1–2, p. 99–114, jan. 2002.

SULLIVAN, R. M. Hemispheric asymmetry in stress processing in rat prefrontal cortex and the role of mesocortical dopamine. **Stress**, v. 7, n. 2, p. 131–143, jun. 2004.

STERLEMANN, V. et al. Long-term behavioral and neuroendocrine alterations following chronic social stress in mice: implications for stress-related disorders. **Hormones and Behavior**, v. 53, n. 2, p. 386–394, fev. 2008.

TAKAHASHI, L. K. Role of CRF 1 and CRF 2 receptors in fear and anxiety. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 7-8, p. 627–636, 1 dez. 2001.

TAKAHASHI, L. K. et al. Antagonism of CRF2 receptors produces anxiolytic behavior in animal models of anxiety. **Brain Research**, v. 902, n. 2, p. 135–142, 1 jun. 2001.

TAKAHASHI, A. et al. Establishment of a repeated social defeat stress model in female mice. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 9 out. 2017.

TEJADA, J.; CHAIM, K. T.; MORATO, S. X-PloRat: a software for scoring animal behavior in enclosed spaces. **Psicologia: Teoria E Pesquisa**, v. 33, p. 1-4, 8 jan. 2018.

TIAN, Y. et al. A prefrontal-habenular circuitry regulates social fear behaviour. **Brain**, v. 147, n. 12, p. 4185–4199, 4 jul. 2024.

TOMCZAK, M.; TOMCZAK, E. The need to report effect size estimates revisited. An overview of some recommended measures of effect size. **TRENDS in Sport Sciences**, v. 1, n. 21, p. 19–25, 15 fev. 2014.

TONG, X. et al. Elevated dorsal medial prefrontal cortex to lateral habenula pathway activity mediates chronic stress-induced depressive and anxiety-like behaviors. **Neuropsychopharmacology**, v. 49, n. 1, p. 1402-1411. 13 mar. 2024.

VAN DE POLL; CRAS, Y.; ELLENDER, T. J. The neurophysiological basis of stress and anxiety - comparing neuronal diversity in the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) across species. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 17, 29 ago. 2023.

VAN DOESELAR, L. et al. Chronic social defeat stress in female mice leads to sex-specific behavioral and neuroendocrine effects. **Stress**, v. 24, n. 2, p. 168–180, 26 dez. 2020.

VASCONCELOS, M. et al. Recovery of stress-impaired social behavior by an antagonist of the CRF binding protein, CRF6–33, in the bed nucleus of the stria terminalis of male rats. **Behavioural Brain Research**, v. 357-358, p. 104–110, 1 jan. 2019.

VASSILEV, P. et al. Unique effects of social defeat stress in adolescent male mice on the netrin-1/DCC pathway, prefrontal cortex dopamine and cognition. **eNeuro**, v. 8, n. 2, p. 1-13, 22 fev. 2021.

VESGA-LÓPEZ, O. et al. Gender differences in generalized anxiety disorder: results from the national epidemiologic survey on alcohol and related conditions (NESARC). **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 69, n. 10, p. 1606–1616, 31 out. 2008.

VICTORIANO, G. et al. Inhibition of the left medial prefrontal cortex (mPFC) prolongs the social defeat-induced anxiogenesis in mice: attenuation by NMDA receptor blockade in the right mPFC. **Behavioural Brain Research**, v. 378, p. 112312, jan. 2020.

WU, Y. et al. Trends in the epidemiology of anxiety disorders from 1990 to 2021: a global, regional, and national analysis with a focus on the sociodemographic index. **Journal of Affective Disorders**, v. 373, p. 166–174, 26 dez. 2025.

YERETZIAN, S. T. et al. Sex differences in the prevalence and factors associated with anxiety disorders in Canada: a population-based study. **Journal of Psychiatric Research**, v. 164, p. 125–132, 1 ago. 2023.

YOHN, C. N. et al. Chronic non-discriminatory social defeat is an effective chronic stress paradigm for both male and female mice. **Neuropsychopharmacology**, v. 44, n. 13, p. 2220–2229, 7 set. 2019.

ZHANG, P. et al. A network analysis of anxiety and depression symptoms in Chinese disabled elderly. **Journal of Affective Disorders**, v. 333, p. 535–542, 1 abr. 2023.

ZHAI, X. et al. Multiple integrated social stress induces depressive-like behavioral and neural adaptations in female C57BL/6J mice. **Neurobiology of Disease**, v. 190, p. 106374–106374, 13 dez. 2024.

ZHAI, X. et al. A multiple integrated social stress model for psychiatric disorders in female C57BL/6J mice. **Journal of Visualized Experiments**, v. 221, n. 1, p. e67117. 15 jul. 2025.

ZHU, C. et al. Depression and anxiety during the COVID-19 pandemic: epidemiology, mechanism, and treatment. **Neuroscience Bulletin**, v. 39, n. 4, p. 675–684, 21 nov. 2022.

ZORRILLA, E. P. et al. Effects of antalarmin, a CRF type 1 receptor antagonist, on anxiety-like behavior and motor activation in the rat. **Brain Research**, v. 952, n. 2, p. 188–199, out. 2002.

APÊNDICES

APÊNDICE A – ANÁLISE DAS MEDIDAS COMPLEMENTARES DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

Como mencionado na metodologia, foi realizada análise das medidas complementares no LCE. Para isso, foram selecionadas gravações audiovisuais de um subconjunto da amostra total utilizada no estudo. A distribuição de camundongos machos e fêmeas utilizados para esta análise é apresentada no Quadro 4.

Quadro 4 – Distribuição de grupos experimentais de machos e fêmeas, para análise das medidas complementares do LCE.

Machos n = 47	Fêmeas n = 35
Grupo 1: INA Salina (NaCl 0,9%) n = 10	Grupo 1: INA Salina (NaCl 0,9%) n = 6
Grupo 2: INA CP376395 dose 20 mg/kg n = 7	Grupo 2: INA CP376395 dose 20 mg/kg n = 5
Grupo 3: INA CP376395 dose 30 mg/kg n = 6	Grupo 3: INA CP376395 dose 30 mg/kg n = 6
Grupo 4: EDSC Salina (NaCl 0,9%) n = 11	Grupo 4: EDSC Salina (NaCl 0,9%) n = 7
Grupo 5: EDSC CP376395 dose 20 mg/kg n = 7	Grupo 5: EDSC CP376395 dose 20 mg/kg n = 6
Grupo 6: EDSC CP376395 dose 30 mg/kg n = 6	Grupo 6: EDSC CP376395 dose 30 mg/kg n = 6

Fonte: Elaboração própria, 2025

As medidas analisadas foram definidas com base no estudo de Rodgers e Johnson (1995). As medidas consideradas foram o tempo gasto em segundos nos braços fechados do LCE (TBF), a porcentagem de mergulhos nas áreas protegidas do LCE [(número de mergulhos protegidos / mergulhos totais) x 100] (%MP), a porcentagem de esticadas protegidas [(número de esticadas protegidas / esticadas totais) x 100] (%EP) e mergulhos totais no labirinto (MT). Esses comportamentos, a exceção do MT, foram considerados para a análise ao serem pertencentes ao fator de ansiedade definido no estudo de Rodgers e Johnson (1995). Assim, procurou-se avaliar se as medidas complementares mencionadas acima robustecem os nossos achados principais no LCE. O MT, ao pertencer ao fator de exploração do LCE, foi considerado pelo seu potencial em auxiliar à análise do comportamento exploratório dos animais no labirinto (Cruz; Frei; Graeff, 1994; Rodgers; Johnson, 1995).

A definição operacional das medidas complementares do LCE é apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 - Tabela que apresenta as medidas complementares que foram registradas no LCE no presente estudo. Tempo nos Braços Fechados (TBF), porcentagem de Mergulhos Protegidos (%MP), porcentagem de Esticadas Protegidas (%EP) e o número de Mergulhos Totais (MT). Definições baseadas em análises fatoriais prévios (Cruz; Frei; Graeff, 1994; Rodgers; Johnson, 1995).

Medidas complementares do Labirinto em Cruz Elevado	
Comportamento	Definição Operacional
Tempo nos Braços Fechados (EBF)	Quantidade de tempo, em segundos, que o sujeito passa dentro de qualquer dos braços fechados do labirinto. O comportamento começa quando as quatro patas do animal cruzam da área central para os braços fechados e conclui quando as quatro patas do sujeito cruzam de volta para o centro.
Porcentagem de Mergulhos Protegidos (%MP)	Comportamento que inicia quando o animal leva sua cabeça e ombros sobre os lados do labirinto, estando o corpo do animal localizado dentro de algum dos braços fechados ou na área central do aparelho. O comportamento termina quando a cabeça do sujeito volta para a posição inicial. A %MP é calculada como $[(\text{número de mergulhos protegidos} \div \text{mergulhos totais}) \times 100]$.
Porcentagem de Esticadas Protegidas (%EP)	Uma esticada protegida é registrada quando, estando dentro de uma das áreas protegidas do labirinto, o animal se estica ou alonga para a sua frente sem apresentar deslocamento nessa direção. O comportamento conclui quando o animal volta para a sua posição inicial. Este comportamento consiste no esticamento do animal sem deslocamento nenhum. A %EP é calculada como $[(\text{número de esticadas protegidas} \div \text{esticadas totais}) \times 100]$.
Mergulhos totais (MT)	Comportamento que inicia quando o animal leva sua cabeça e ombros sobre os lados do labirinto, sem importar se o animal está localizado nas áreas protegidas ou desprotegidas do LCE. O comportamento termina quando a cabeça do sujeito volta para a posição inicial. O comportamento é registrado como a contagem do número total de MT realizadas durante o teste.

Fonte: Elaboração própria, 2025.

Foram realizadas as mesmas análises estatísticas do estudo principal. A análise do TBF dos machos apresentou distribuição normal ($p = 0,77$) e homoscedasticidade ($p = 0,21$). A ANOVA indicou efeito unicamente do fator condição, com tamanho de efeito médio ($F_{(1,41)} = 10,619$, $p = 0,002$, $\eta^2 p = 0,20$). O *post hoc* de Duncan revelou que os machos submetidos ao EDSC tiveram maior TBF que os machos da INA ($p = 0,001$) (Figura 19A). Nas fêmeas, houve distribuição não normal ($p = 0,02$). A ANOVA indicou efeito da interação entre os fatores condição e tratamento, com tamanho de efeito elevado ($F_{(2,29)} = 5,627$, $p = 0,009$, $\eta^2 p = 0,28$). O *post hoc* indicou que as fêmeas EDSC salina passaram menor TBF que as fêmeas salina ($p = 0,01$), efeito revertido pelo CP376395 nas doses de 20 mg/kg ($p = 0,01$) e 30 mg/kg ($p = 0,002$) (Figura 19B).

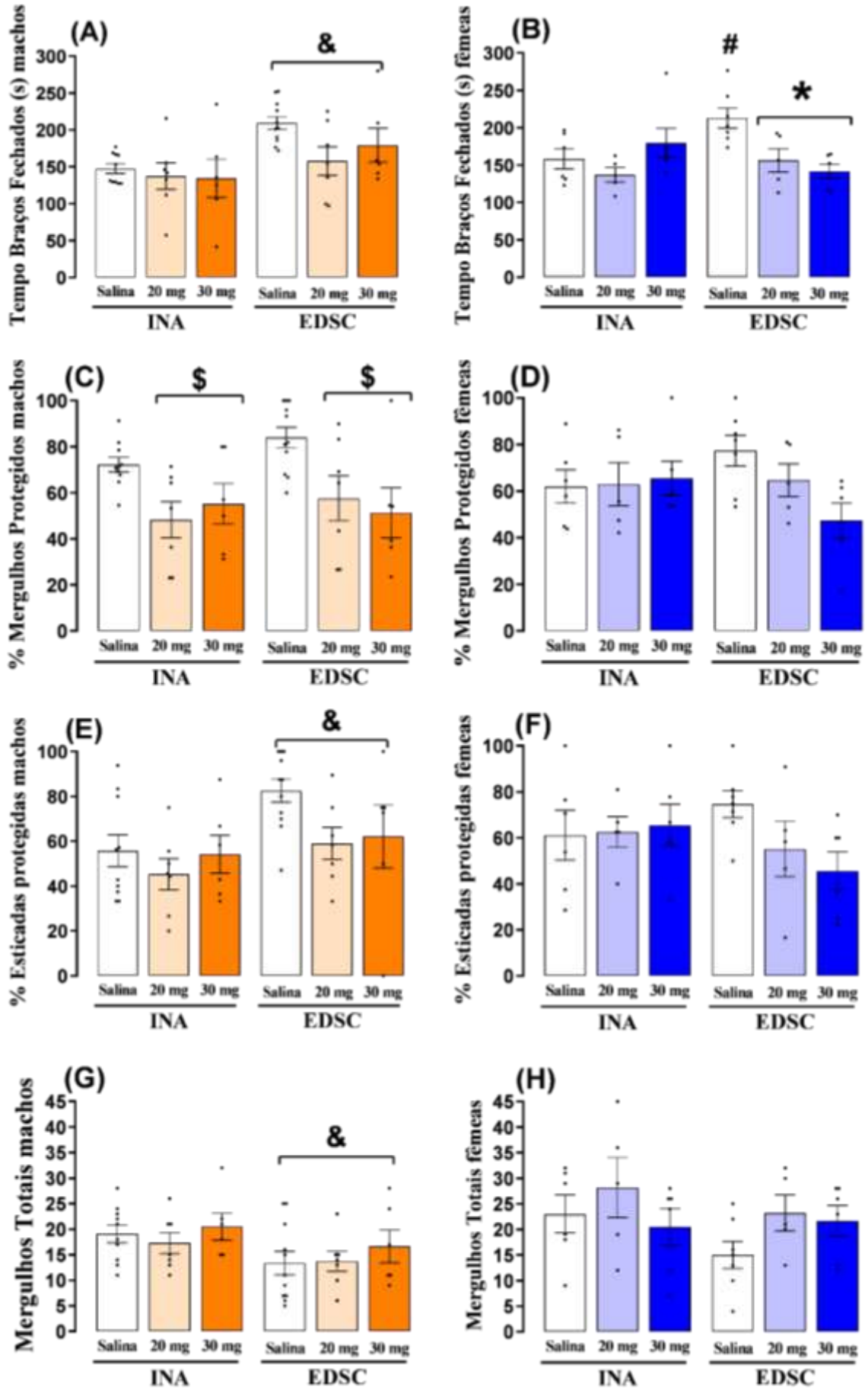
Na %MP dos machos houve distribuição não normal ($p = 0,04$). A ANOVA indicou efeito do fator tratamento, com tamanho de efeito elevado ($F_{(2,41)} = 9,729$, $p < 0,05$, $\eta^2 p = 0,32$).

O *post hoc* mostrou que os machos tratados com o fármaco na dose de 20 mg/kg ($p = 0,001$) e 30 mg/kg ($p = 0,001$) tiveram menor %MP em comparação os machos salina, independente da condição (Figura 19 C). Nas fêmeas, houve distribuição normal ($p = 0,36$) e homoscedasticidade ($p = 0,96$). A ANOVA indicou ausência nos fatores de condição e tratamento e na interação entre os fatores (Figura 19D).

Na %EP, os machos tiveram distribuição normal ($p = 0,22$) e homoscedasticidade ($p = 0,52$). A ANOVA indicou efeito do fator condição, com tamanho de efeito médio ($F_{(1,41)} = 6,021$, $p = 0,02$, $\eta^2p = 0,13$). O *post hoc* indicou que os machos EDSC tiveram maior %EP que os INA ($p = 0,006$), independentemente do tratamento (Figura 19E). Nas fêmeas, houve distribuição normal ($p = 0,43$) e homoscedasticidade ($p = 0,46$). Porém, a ANOVA indicou ausência de efeito dos fatores (Figura 19F).

Finalmente, no MT, os machos apresentaram distribuição normal ($p = 0,33$) e homoscedasticidade ($p = 0,42$). A ANOVA indicou efeito do fator condição, com tamanho de efeito médio ($F_{(1,41)} = 5,200$, $p = 0,03$, $\eta^2p = 0,11$). O *post hoc* indicou que os machos EDSC tiveram menor MT que os INA ($p = 0,02$) (Figura 19G). Nas fêmeas, houve distribuição normal ($p = 0,63$) e homoscedasticidade ($p = 0,45$). Não houve efeito significativos nos fatores da ANOVA (Figura 19H).

Figura 19 – Análise das medidas complementares do LCE. A) Os machos EDSC ($n = 24$) tiveram maior TBF que os INA ($n = 23$), independente do tratamento. B) As fêmeas EDSC salina ($n = 7$) tiveram maior TBF que as INA salina ($n = 6$), efeito revertido pelo CP376395 nas doses de 20 mg/kg ($n = 5$) e 30 mg/kg ($n = 6$). C) Os machos tratados com o fármaco na dose de 20 mg/kg ($n = 14$) e 30 mg/kg ($n = 12$) tiveram menor %MP que os machos salina ($n = 21$), independente da condição. D) Ausência de efeito na %MP das fêmeas. E) Os machos EDSC ($n = 24$) tiveram maior %EP que os INA ($n = 23$). F) Ausência de efeito na %EP das fêmeas. G) Os machos EDSC ($n = 24$) tiveram menor MT que os INA ($N = 23$). H) Ausência de efeito da condição e do tratamento no MT das fêmeas. As barras representam a média $\pm$ EPM. & $p < 0,05$ comparando comportamento de animais expostos ao EDSC ou à INA. \$ $p < 0,05$ comparando animais tratados com CP376395 nas doses de 20 mg/kg, 30 mg/kg ou salina. # $p < 0,05$ comparando animais expostos ao EDSC tratados com salina e os expostos à INA tratados com salina. * $p < 0,05$ comparando animais EDSC tratados com CP376395 nas doses de 20 e 30 mg/kg e tratados com salina. INA, Interação Não agressiva; EDSC, Estresse de Derrota Social Crônico.



Fonte: Elaboração própria, 2025.

Nos machos, o EDSC aumentou o TBF e a %EP, além de diminuir o MT. As duas doses do fármaco diminuíram a %MP dos machos EDSC e INA. Nas fêmeas, o EDSC aumentou o TBF, efeito revertido pelo fármaco, sendo a única medida complementar com efeito do estresse crônico e do antagonismo dos CRFR1. Os nossos achados indicam perfil comportamental do tipo ansioso nos animais expostos ao EDSC, pois corroboram o apresentado por Cruz, Frei e Graeff (1994) e por Rodgers e Johnson (1995).

Segundo as análises dos autores, animais que diminuem sua exploração dos braços abertos do LCE aumentam o tempo que passam nos braços fechados e no centro do labirinto. Além disso, o aumento da %EP indicaria maior receio dos animais de ingressar nas áreas desprotegidas do LCE e a diminuição do MT indicaria efeito do EDSC de reduzir o comportamento exploratório dos animais. Com isso, as medidas complementares no LCE são um recurso útil para robustecer as observações sobre o papel ansiogênico do EDSC em camundongos machos e fêmeas (Cruz; Frei; Graeff, 1994; Rodgers; Johnson, 1995; Calpe-López et al., 2023).

Por outro lado, as medidas complementares apoiam a ideia de que o EDSC e o CP376395 alteram a neurotransmissão CRFérgica no encéfalo e na resposta comportamental de machos e fêmeas. Os nossos achados no %EP e %MP dos machos corroboram estudo prévio do grupo, que administrou CRF e CP376595 por via direta na amígdala de camundongos machos. Os autores apresentam que o CRF induz aumento da %EP, enquanto o fármaco induz a redução das duas medidas (Cipriano; Gomes; Nunes-De-Souza, 2016). Isso permite observar que as medidas complementares do LCE são sensíveis aos efeitos do tratamento farmacológico, além de fortalecer a noção da existência de diferenças sexuais no comportamento de animais expostos ao EDSC.

APÊNDICE B – COMPARAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DA C-FOS ENTRE AS SUBREGIÕES DO CPFm E DO NLET DE CAMUNDONGOS MACHOS E FEMEAS.

Como parte da análise no padrão de ativação da proteína c-Fos das subregiões do CPFm e do NLET de machos e fêmeas, foi realizada comparação estatística entre estas subregiões, sem levar em consideração os tratamentos administrados. Assim, foi feita comparação entre a expressão de c-Fos entre o Cg1, PrL e IL e entre o NLETd e NLETv, de machos e fêmeas expostos ao EDSC ou INA.

Além da avaliação da distribuição e homoscedasticidade dos dados, foi realizada ANOVA de duas vias (fator 1: Área Cg1, PrL ou IL e NLETd ou NLETv; fator 2: condição INA ou EDSC).

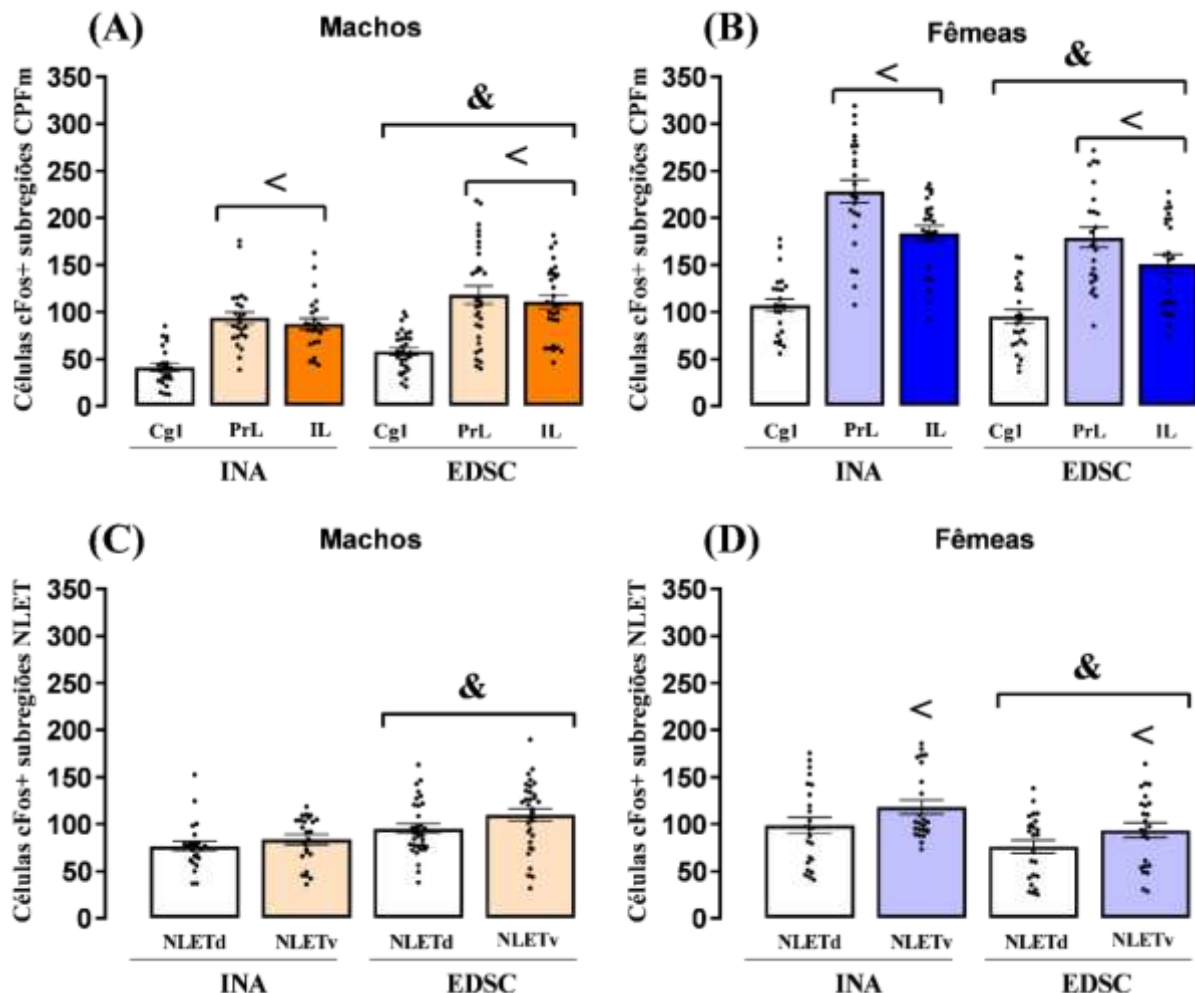
Na análise das subregiões do CPFm, os machos apresentaram distribuição não normal ($p < 0,05$). A ANOVA indicou efeito do fator área, com tamanho de efeito elevado ($F_{(2,156)} = 53,617$, $p < 0,05$, $\eta^2p = 0,41$) e do fator condição, tamanho de efeito médio ($F_{(1,156)} = 12,224$, $p = 0,001$, $\eta^2p = 0,07$). O *post hoc* do fator área indicou que o Cg1 dos machos apresentou menor expressão de c-Fos que o PrL ($p < 0,05$) e o IL ($p < 0,05$), independentemente da condição. O *post hoc* do fator condição indicou que o CPFm dos machos EDSC teve maior c-Fos que os INA ($p < 0,05$), independente da área avaliada (Figura 20A).

No caso das fêmeas, também não houve distribuição normal ($p = 0,01$). A ANOVA indicou efeito do fator área, tamanho de efeito elevado ($F_{(2,138)} = 62,177$, $p < 0,05$, $\eta^2p = 0,47$) e do fator condição, tamanho de efeito médio ($F_{(1,138)} = 13,675$, $p < 0,05$, $\eta^2p = 0,09$). O *post hoc* da área apresentou que o PrL teve maior expressão que o Cg1 ($p < 0,05$) e o IL ($p = 0,001$). O *post hoc* da condição revelou que as fêmeas EDSC tiveram menor expressão de c-Fos que as INA ($p < 0,05$) (Figura 20B).

Na análise das subregiões do NLET, os machos apresentaram distribuição normal ($p = 0,14$) e homoscedasticidade ($p = 0,06$). A ANOVA indicou efeito unicamente do fator condição, tamanho de efeito médio ($F_{(1,108)} = 14,947$, $p < 0,05$, $\eta^2p = 0,12$). O *post hoc* revelou maior expressão de c-Fos nos machos EDSC em comparação aos INA ($p < 0,05$) (Figura 20C). As fêmeas apresentaram distribuição não normal ($p = 0,02$). A ANOVA indicou efeito no fator área, tamanho de efeito médio ($F_{(1,92)} = 4,750$, $p = 0,03$, $\eta^2p = 0,05$) e no fator condição, tamanho de efeito médio ($F_{(1,92)} = 5,983$, $p = 0,02$, $\eta^2p = 0,06$). O *post hoc* da área indicou que o NLETv

das fêmeas teve maior c-Fos que o NLETd ($p = 0,03$). O *post hoc* do fator condição indicou que as fêmeas EDSC tiveram menor c-Fos que as INA ($p = 0,02$) (Figura 20D).

Figura 20 – Quantificação da proteína c-Fos nas subregiões do CPFm e do NLET, de camundongos machos e fêmeas submetidos ao EDSC ou à INA. A) No CPFm, o Cg1 ($n = 54$) dos machos teve menor expressão de c-Fos que o PrL ($n = 54$) e o IL ($n = 54$). Os machos EDSC ($n = 90$) apresentaram maior expressão de c-Fos no CPFm que os INA ($n = 72$). B) As fêmeas também apresentam PrL ($n = 48$) e IL ($n = 48$) com maior marcação que o Cg1 ($n = 48$). Porém, as três subregiões têm menor expressão de c-Fos nas fêmeas EDSC ($n = 72$) do que nas INA ($n = 72$). C) No NLET, os machos EDSC ($n = 64$) tiveram maior marcação de c-Fos que os INA ($n = 48$), sem diferenças entre o NLETd e o NLETv. D) Nas fêmeas, o NLETv ($n = 48$) teve maior marcação de c-Fos do que o NLETd ($n = 48$). As fêmeas EDSC ($n = 48$) apresentaram menor expressão de c-Fos que as INA ($n = 48$). As barras representam a média $\pm$ EPM. $\&p < 0,05$ comparando a expressão de c-Fos de animais expostos ao EDSC ou à INA. $<p < 0,05$ comparando a marcação de c-Fos entre as subregiões do CPFm e do NLET. Cg1, Córtex cingulado 1. PrL, Córtex Pré-límbico. IL, Córtex Infralímbico. NLETd, Núcleo Leito da Estria Terminal dorsal. NLETv, Núcleo Leito da Estria Terminal ventral. INA, Interação Não agressiva; EDSC, Estresse de Derrota Social Crônico.



Fonte: Elaboração própria, 2025.

Os nossos achados evidenciam existência de diferenças na expressão de c-Fos entre as subregiões do CPFm e do NLET. No CPFm, o PrL e o IL apresentam maior marcação que o Cg1 tanto em machos quanto em fêmeas. No caso do NLET, o NLETv teve maior marcação

unicamente nas fêmeas. Os nossos dados corroboram o apresentado por estudos anteriores, que propuseram diferenças entre o funcionamento das subregiões do CPFm, sendo as áreas ventromediais as mais ativas na resposta de estresse crônico (Cerqueira; Almeida; Sousa, 2008). Isso se relaciona com o apresentado por outros autores, que defendem que o NLETv é a subregião do NLET mais envolvida na resposta de estresse, ao ter vias de comunicação intensas com o CPFm ventromedial (Figueiredo et al., 2003). O nosso estudo fornece a oportunidade de observar as diferenças sexuais no funcionamento destas áreas encefálicas em resposta ao estresse psicossocial crônico.

ANEXOS

ANEXO A - PARECER DE APROVAÇÃO DO ESTUDO PELA COMISSÃO ÉTICA DE USO DE ANIMAIS DA UNESP ARARAQUARA.



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **"Investigação das diferenças sexuais na neurotransmissão CRFérgica do Córtex Pré-frontal medial e do BNST sobre a ansiedade e os níveis de corticosterona em camundongos expostos ao estresse de derrota social"**, registrada com o Protocolo CEUA/FCF/CAr: 6923361128, sob a responsabilidade do pesquisador Daniel Enrique Gonzalez Escobar, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovada "ad referendum" pelo Coordenador da COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP no dia 18 de setembro de 2024.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Março de 2026
Espécie/linhagem/raça	Camundongo heterogênico Suíço- Webster
Nº de animais	336
Peso/Idade	30/40g/ 60 dias e 40-50g/ 84 dias
Sexo	168 machos e 168 fêmeas
Origem	Centro de Pesquisa e Produção de Animais (CPPA).
Registro CIAEP	02.00082.2019

Araraquara, 18 de setembro de 2024.

Prof. Dr. Paulo Ricardo da Silva Sanches
Coordenador da CEUA

Declaração de Isenção de responsabilidade

As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade do(s) autor(es) e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.