

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA
FILHO"**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas Campus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Felipe Forero Castillo

**Avaliação do papel da neurotransmissão CRFérgica sobre a ansiedade e
na atividade neuronal do BNST em camundongos machos e fêmeas expostos
ao estresse psicossocial.**

Araraquara, SP

2024

FELIPE FORERO CASTILLO

Avaliação do papel da neurotransmissão CRFérgica sobre a ansiedade e na atividade neuronal do BNST em camundongos machos e fêmeas expostos ao estresse psicossocial.

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

Área de Concentração: Ciências Farmacêuticas

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

Araraquara, SP

2024

C352a Castillo, Felipe Forero.
Avaliação do papel da neurotransmissão CRFérgica sobre a
ansiedade e na atividade neuronal do BNST em camundongos machos
e fêmeas expostos ao estresse psicossocial / Felipe Forero Castillo. –
Araraquara, 2024.
65 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e
Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Ricardo Luiz Nunes de Souza.

1. BNST. 2. Estresse de testemunho derrota social. 3. Estresse
crônico. 4. Camundongos. 5. Ansiedade I. Souza, Ricardo Luiz Nunes de,
orient. II. Título.

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara
Kazumi Tomoyose - CRB 8/10904

CAPES: 33004030078P6
Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Avaliação do papel da neurotransmissão CRFérgica sobre a ansiedade e na atividade neuronal do BNST em camundongos machos e fêmeas expostos ao estresse psicossocial

AUTOR: FELIPE FORERO CASTILLO

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)
Departamento de Farmacos e Medicamentos / Faculdade de Ciencias Farmaceuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Profa. Dra. RAQUEL VECCHIO FORNARI (Participação Virtual)
Centro de Matemática, Computação e Cognição / Universidade Federal do ABC (UFABC)

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

Araraquara, 19 de dezembro de 2024

Agradecimentos

Quero aproveitar este espaço para agradecer às pessoas que influenciaram minha vida acadêmica, especialmente aquelas que, com suas ações, contribuíram para que esta etapa da minha vida concluísse da forma como está acontecendo.

Inicialmente, gostaria de dedicar palavras de gratidão ao Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza, que me acolheu em seu laboratório e, com isso, me permitiu trabalhar junto a pessoas maravilhosas e conhecer o trabalho de quem se dedica à ciência. Espero que meu trabalho e seus resultados possam honrar a oportunidade que ele me ofereceu, assim como suas expectativas sobre o meu desempenho. Da mesma forma, gostaria de estender esse agradecimento ao Dr. Lucas Canto de Souza e à Dra. Daniela Baptista de Souza, que sempre estiveram presentes quando precisei de ajuda e me ofereceram soluções quando enfrentei problemas.

Quero agradecer ao Prof. Dr. Javier Leonardo Rico por me colocar em contato com o laboratório de neuro psicofarmacologia da UNESP e confiar que eu poderia fazer um bom trabalho, mesmo sem nos conhecermos.

Agradeço aos colombianos, que têm sido um grande apoio fora do meu país. Devo muito a eles, pois têm sido como uma família para mim, mesmo estando tão longe de casa. Espero que possamos continuar em contato, mesmo que estejamos longe, cada um perseguindo seus objetivos.

Sinto muita gratidão por aquelas pessoas que estão na Colômbia e me apoiam há tanto tempo. Agradeço ao Prof. Airton Ícaro Cantura Gonzaga, que me ensinou português sem esperar nada em troca, me ofereceu sua amizade e me mostrou que ensinar é uma forma de cuidar do outro. Agradeço ao Prof. Dr. Leonardo Augusto Ortega, com quem tenho trabalhado na produção de artigos; sinto muita gratidão porque ele me mostrou o caminho para começar a construir um nome no contexto científico.

Por último, e mais importante, agradeço à minha família, que me apoiou durante todo esse processo. Sinto muita tranquilidade ao pensar que há pessoas que acreditam em mim, mesmo quando eu não consigo acreditar, que torcem para que eu tenha sucesso em meus objetivos e, caso as coisas não sejam como eu espero, estão me esperando para me encorajar. O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 88882.180428/2007-01.

Resumo

Recentemente, devido à exposição direta ou indireta a contextos altamente estressantes, tem se observado um aumento exponencial nos casos de ansiedade em todo mundo. Este transtorno emocional pode desencadear diversas outras patologias com diferentes níveis de gravidade, tornando-se uma importante questão de saúde pública. Tal fato resultou em significativo aumento no número de estudos dos transtornos de ansiedade. Entretanto, devido ao uso preponderante de animais machos na neurociência básica, não se tem gerado conhecimento robusto que esclareça os mecanismos neurobiológicos de transtornos emocionais, levando-se em conta potenciais diferenças sexuais. Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que o bloqueio de receptores do tipo 1 para o hormônio (ou fator) liberador de corticotrofina (CRF) no núcleo intersticial da estria terminal (BNST, do inglês *bed nucleus of the stria terminalis*) atenua a ansiedade de camundongos machos expostos ao estresse de derrota social. Neste sentido, o presente estudo avaliou o papel da neurotransmissão CRFérgica no BNST sobre a ansiedade induzida pelo estresse psicossocial (i.e., estresse de testemunho de derrota social) em camundongos fêmeas e machos. Para isso, camundongos Swiss-Webster fêmeas e machos (60 dias de idade) foram submetidos a 10 sessões de derrota social ou a interações não agressivas com coespecíficos. Posteriormente, foram avaliados no teste de interação social para analisar a resposta de evitação diante do camundongo agressor e, 24 horas depois, no labirinto em cruz elevado (LCE) para avaliação das respostas relacionadas à ansiedade. Antes do teste no LCE, os animais receberam uma injeção intraperitoneal do antagonista de CRF1 (CP 376395) na dose de 20 mg/kg. Ao final da exposição ao LCE, os animais foram perfundidos para a extração dos encéfalos e dissecação do BNST, onde foram quantificados os padrões de ativação por meio da proteína c-Fos através de imunofluorescência. Os resultados indicam diferença significativa nas respostas de ansiedade no LCE unicamente nas fêmeas que foram expostas ao testemunho de derrota social, em comparação ao controle, assim como efeito ansiolítico nas fêmeas que receberam o tratamento com CP 376395. Adicionalmente, foi identificado também aumento na expressão da proteína c-Fos na porção ventral do BNST indicando diferença significativa quando comparada com os animais tratados sistemicamente com CP 376395.

Palavras-Chave: BNST; Estresse de Testemunho Derrota Social; Estresse Crônico, Camundongos; Ansiedade

Abstract

Recently, due to direct or indirect exposure to highly stressful contexts, an exponential increase in anxiety cases has been observed worldwide. This emotional disorder can trigger various other pathologies with differing levels of severity, making it a significant public health concern. This has led to a substantial rise in the number of studies on anxiety disorders. However, due to the predominant use of male animals in basic neuroscience research, robust knowledge clarifying the neurobiological mechanisms of emotional disorders, considering potential sex differences, has not been generated. Recently, our research group demonstrated that blocking type 1 corticotropin-releasing hormone (CRF) receptors in the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) reduces anxiety in male mice exposed to social defeat stress. The present study evaluated the role of CRFergic neurotransmission in the BNST on anxiety induced by psychosocial stress (i.e., social defeat witness stress) in female and male mice. To this end, 60-day-old female and male Swiss-Webster mice were subjected to 10 sessions of social defeat or non-aggressive interactions with conspecifics. Subsequently, they were assessed using the social interaction test to analyze avoidance behavior toward the aggressor mouse, followed 24 hours later by the elevated plus maze (EPM) to evaluate anxiety-related responses. Before the EPM test, the animals received an intraperitoneal injection of the CRF1 antagonist (CP 376395) at a dose of 20 mg/kg. At the end of the EPM exposure, the animals were perfused to extract their brains and dissect the BNST, where activation patterns were quantified using c-Fos protein through immunofluorescence. The results indicate a significant difference in anxiety responses in the EPM exclusively in females exposed to social defeat witness stress compared to controls, as well as an anxiolytic effect in females treated with CP 376395. Additionally, an effect on c-Fos expression was identified, characterized by an increase in c-Fos expression in the ventral portion of the BNST and a significant difference compared to animals systemically treated with CP 376395.

Keywords: BNST; Witnessed Social Defeat Stress; Chronic Stress; Mice; Anxiety.

Lista de figuras

Figura 1- Figura esquemática do Protocolo de Estresse de testemunha de derrota social (ETDS)....	9
Figura 2- Figura esquemática da Testemunha de interação não agressiva (TINA)	10
Figura 3- Representação esquemática do Teste da interação social (TIS)	12
Figura 4- Representação do labirinto em cruz elevado.....	13
Figura 5- Representação esquemática do Delineamento Experimental.....	15
Figura 6-Teste da interação social (TIS) das fêmeas.....	17
Figura 7- Tempo na zona de interação (ZI) baseado nos fenótipos das fêmeas.....	18
Figura 8- Tempo na zona de afastamento (ZA) baseado nos fenótipos das fêmeas.....	19
Figura 9- Teste da interação social (TIS) das fêmeas.....	20
Figura 10- Labirinto em cruz elevado.....	23
Figura 11- Fotomicrografias representativa da marcação neuronal para c-Fos fêmeas.....	23
Figura 12- Fotomicrografias representativa da marcação neuronal para c-Fos machos.....	24

Lista de abreviaturas

CRF: Fator Liberador de corticotropina
CRF1: Receptor do tipo 1 do Fator Liberador de corticotropina
BNST: Bed nucleus of the stria terminalis (núcleo leito da estria terminal)
LCE: Labirinto em cruz elevado
TIS: Teste de interação social
ZI: Zona de interação
ZA: Zona de afastamento
%TBA: Porcentagem do tempo nos braços abertos
%EBA: Porcentagem de entrada nos braços abertos
EBF: Entrada nos braços abertos
HPA: Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal
PVN: Núcleo paraventricular do hipotálamo
CORT: Cortisol
ACTH: hormônio adrenocorticotrópico
ETDS: Estresse de testemunha de derrota social
TINA: Teste de interação não agressiva

SUMARIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. MATERIAL E MÉTODOS	16
2.1 Sujeitos	16
2.2 Estresse de testemunha de derrota social (ETDS)	16
2.3 Teste de Testemunha de Interação não-agressiva	17
2.4 Teste da interação social (TIS)	19
2.5 Teste Labirinto em Cruz Elevado	20
2.5 Tratamento Farmacológico	21
2.6 Imunofluorescência	22
2.7 Delineamentos Experimentais	23
2.8 Ética	24
2.9 Estatística	24
3. RESULTADOS	25
5. DISCUSSÃO	37
6. CONCLUSÕES	44
7. PERSPECTIVAS	45
REFERÊNCIAS	46

1. INTRODUÇÃO

A ansiedade, em um sentido adaptativo, é uma emoção que gera respostas comportamentais e neuroendócrinas nos organismos em resposta a estímulos no ambiente que podem preceder uma ameaça, isto com o fim de fazer frente ao possível perigo (Mobbs *et al.*, 2009; Morris, 2019). Em humanos, pode-se identificar a ansiedade por meio de comportamentos de evitação, manifestações de preocupação e desconforto, além de um estado de alerta (Reiss *et al.*, 1986; Sarason, 1988; Jansson-Fröjmark *et al.*, 2011). Ainda assim, quando estas respostas aumentam em frequência, em intensidade e geram comportamentos mal adaptativos, pode-se interpretar como um transtorno de ansiedade (Andrade; Gorenstein, 1998).

Os transtornos de ansiedade são dos distúrbios psicológicos mais prevalentes no mundo (Bandelow *et al.*, 2017) e estão associados a uma série de outras condições: distúrbios cardíacos, problemas gastrointestinais, enxaqueca, hipertensão, alergias (Rodgers *et al.*, 1994; Härter *et al.*, 2003), obesidade (Suzuki *et al.*, 2020) e comportamentos suicidas (Kanwar *et al.*, 2013; Stanley, 2018). Além disso, estima-se que, no primeiro ano da pandemia COVID-19, a prevalência global da ansiedade aumentou cerca de 25% (Santomauro *et al.*, 2021; OMS, 2022).

É importante ressaltar que, ainda que estes transtornos ocorram com mais frequência nas mulheres, tanto o curso clínico como a resposta ao tratamento diferem entre sexos (Pigott, 2003; Kinrys; Wygant, 2005; Saunders *et al.*, 2012; McLean *et al.*, 2011; Altemus; Sarvaiya; Neill Epperson, 2014). Ainda são incipientes os achados que descrevem possíveis diferenças na modulação da ansiedade em estudos da neurociência básica, ocasionando um desconhecimento da especificidade de fármacos com potencial para tratar a ansiedade na população feminina. Esta falta de estudos focados em estudar os efeitos na população feminina apresenta-se mesmo quando se tem demonstrado que a incidência superior nas mulheres do padecimento de transtornos de ansiedade pode ser devida a fatores contextuais (Hettema *et al.*, 2005), genéticos (Kendler *et al.*, 2003) e dimorfismo sexual nos sistemas que modulam as respostas relacionadas à ansiedade (Donner; Lowry, 2013), que podem ter sido pouco estudados pela comunidade científica.

Um dos principais fatores associados ao desencadeamento de transtornos de ansiedade é o estresse (Chrousos, 2000). A ocorrência de transtornos de ansiedade como consequência de exposições crônicas ao estresse pode ser encontrada na vida cotidiana (Almeida, 2005). Essas

exposições ao estresse, especialmente as de origem social, podem ser experimentadas diretamente ou através da observação e desencadear padrões de ansiedade (Nakatake, 2020; Cisler, 2011).

Neste sentido, um dos modelos animais mais utilizados é o paradigma residente/intruso entre camundongos, descrito inicialmente por Miczek e colaboradores (Miczek *et al.*, 1982). O paradigma residente-intruso consiste em introduzir um camundongo (intruso) na gaiola de outro camundongo (residente). Essa interação geralmente provoca que o camundongo residente ataque o intruso, permitindo estudar respostas ao estresse social, comportamentos de derrota e mecanismos de analgesia induzida pelo estresse. Nesse paradigma, o intruso sofre agressões do residente, o que pode levar a uma postura de derrota e à ativação de respostas fisiológicas e comportamentais específicas relacionadas ao estresse (Berton *et al.*, 2006; Krishnan *et al.*, 2007).

Entretanto, os modelos que envolvem agressão entre dois animais são bastante limitados, inicialmente, porque o paradigma por si só não é capaz de discriminar entre os efeitos das lesões nas medidas comportamentais e fisiológicas (Sial *et al.*, 2016; Hodes *et al.*, 2014), e porque se limita aos estudos com machos, já que, comumente, as fêmeas não lutam entre si em uma situação de residente-intruso (Bjorkqvist, 2001).

Ainda assim, a distinção comportamental frente a situações de estresse de origem social deste tipo foi demonstrada num estudo com camundongos fêmeas da linhagem Californiana, conhecidos por apresentarem comportamentos agressivos para cuidar o território (Silva *et al.*, 2010). Nesse estudo, os autores demonstraram que, ante situações de derrota social crônica, camundongos machos e fêmeas exibiram comportamentos distintos, no qual apenas nas fêmeas houve redução da interação social (Trainor *et al.*, 2011), pelo qual é relevante o estudo da relação do estresse do tipo psicossocial nas respostas de ansiedade em sujeitos experimentais fêmeas.

Com o propósito de atingir este objetivo, um dos modelos utilizados em nosso laboratório é o de testemunha da derrota social. Tem sido demonstrado que roedores, ao observarem outros coespecíficos sendo expostos a estímulos aversivos, apresentam respostas relacionadas ao estresse crônico (Pijlman, 2003; Warren *et al.*, 2013). Além disso, esses autores demonstraram que camundongos machos adultos que presenciaram a derrota de um animal familiar apresentaram sinais de evitação social quando expostos a um novo camundongo, semelhante aos

comportamentos dos camundongos que foram diretamente derrotados. Esse comportamento de evitação social persistiu até um mês após a exposição.

Outros estudos (Yoshioka *et al.*, 2022; Carnevali, 2020) sugeriram que camundongos que presenciaram a derrota social podem ter uma sensibilidade duradoura a estímulos relacionados ao trauma, além de outros efeitos negativos, como menor ganho de peso, comportamento passivo em testes de estresse, níveis elevados de corticosterona e anedonia, todos semelhantes aos efeitos observados nos camundongos que foram diretamente derrotados (Warren *et al.*, 2013; Yoshioka *et al.*, 2022; Carnevali, 2020; Nemeroff *et al.*, 2006; Patki *et al.*, 2015). Isso sugere que, em roedores, a testemunha da derrota social é um estressor poderoso com efeitos a longo prazo em vários níveis.

Ainda assim, as exposições a estressores psicossociais podem gerar diferentes efeitos baseados nos fenótipos de cada sujeito. Os fenótipos na resposta do estresse referem-se aos padrões complexos de respostas fisiológicas e comportamentais que os indivíduos desenvolvem ao enfrentar situações estressantes (Wu *et al.*, 2013; Lutter *et al.*, 2008). Essas respostas variam consideravelmente entre os indivíduos, refletindo diferenças na suscetibilidade e na resiliência frente ao estresse (Reul *et al.*, 2015). A suscetibilidade é caracterizada por alterações comportamentais, como a evitação social, a anedonia, as alterações metabólicas e a ansiedade, enquanto a resiliência é definida pela ausência dessas alterações, apesar da exposição ao estresse (Franklin; Saab; Mansuy, 2012; Pfau; Russo, 2015). Esses traços interagem de maneira dinâmica e variam conforme o contexto, a intensidade e a duração do estresse, assim como a resposta adaptativa de cada indivíduo (Golden *et al.*, 2011).

Situações estressantes como as descritas anteriormente têm por característica ativar o eixo hipotálamo-hipófise (ou pituitária)-adrenal (HPA). A ativação do eixo HPA começa no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), que libera o hormônio liberador de corticotropina (CRF) (Duval *et al.*, 2010). O CRF percorre até a hipófise anterior, onde estimula a produção de proopiomelanocortina (POMC), que se decompõe para liberar o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (Chrousos, 2009). O ACTH é transportado pelo sangue até as glândulas adrenais, situadas acima dos rins. O ACTH estimula as células da zona fasciculada onde se liberam os glicocorticoides (principalmente cortisol em humanos) (Smith, 2022; Aguilera *et al.*, 1996). Os glicocorticoides ajudam o corpo a se adaptar ao estresse promovendo a liberação de glicose e a

gliconeogênese, aumentando a atividade do sistema nervoso simpático, elevando a frequência cardíaca, a pressão arterial e a respiração, e suprimindo processos anabólicos como a função imunológica, a reprodução, a digestão e o crescimento (Sheng *et al.*, 2021).

Ainda que estas respostas possam ser adaptativas, como foi mencionado anteriormente, a exposição a estressores crônicos pode alterar as funções do eixo HPA, o que aumenta o risco de diversas patologias crônicas (Jurueña *et al.*, 2020). Por último, é apresentado o “feedback negativo”, mediado pelos receptores de glicocorticoides e mineralocorticoides, que inibe a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) (Harris *et al.*, 2013). No hipocampo, o cortisol reduz a excitação neuronal e suprime a liberação do hormônio liberador de corticotropina (CRH) pelo hipotálamo. No nível hipotalâmico, diminui diretamente a secreção de CRH e vasopressina, moléculas essenciais para estimular a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela hipófise. Além disso, na hipófise, o cortisol atua reduzindo a síntese e a liberação de ACTH (Chen, Tang e Yang, 2008; Myers, McKlveen e Herman, 2012; Aguilera, 2007).

As respostas ao estresse podem ser reguladas por diferentes áreas encefálicas pertencentes ao sistema límbico, como amígdala, hipocampo e córtex pré-frontal (McEwen, 2000). Uma das estruturas límbicas que regula o eixo HPA é o núcleo do leito da estria terminal (BNST) (Lezak *et al.*, 2014). O BNST está localizado no prosencéfalo rostral, ventral e adjacente ao septo, conectado com o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN). O BNST pode ser dividido aproximadamente nas porções anterior e posterior (Avery *et al.*, 2014).

Estudos em roedores demonstraram que o BNST é essencial para o medo contextual e para os transtornos desencadeados pela resposta ao estresse, assim como para a modulação da ansiedade e a dependência de drogas (Faria, Laverde e Nunes-Desouza, 2020; Davis *et al.*, 2010; Luo *et al.*, 2021). Além disso, alguns estudos sugerem que sua estimulação elétrica pode diminuir os comportamentos semelhantes ao estresse (Luyck *et al.*, 2017; Raymaekers, 2017; Luyten *et al.*, 2016), enquanto as lesões podem reduzir a secreção de ACTH induzida pelo estresse (Crane, Buller e Day, 2003).

Por outro lado, há evidências de que o BNST é uma região sexualmente dimórfica, a ponto de apresentar volume geral maior em machos em comparação com fêmeas, tanto em roedores quanto em humanos (Allen *et al.*, 1989; Hines *et al.*, 1985). Entretanto, também tem sido sugerido que as zonas anterior e posterior são maiores em fêmeas de ratos em comparação aos machos (Del Abril *et al.*, 1987). O BNST também apresenta dimorfismo sexual em termos de sua neuroquímica. Por exemplo, em ratos, a distribuição de neurotransmissores como a vasopressina mostra diferenças significativas entre machos e fêmeas na sua região posterior (Malsbury e McKay, 1987). Da mesma forma, o BNST participa da expressão comportamental e neuroendócrina da reprodução, como demonstrado pela redução do comportamento copulatório em machos (Emery e Sachs, 1976; Powers *et al.*, 1987) e aumento da ovulação (Velasco e Taleisnik, 1969), respectivamente, em estudos com lesões e estimulação química de ratos.

Dentre as neurotransmissões diretamente relacionadas às respostas de estresse, destaca-se a CRFérgica, a qual tem o neuropeptídeo CRF como neurotransmissor. O CRF tem ação sobre dois tipos de receptores acoplados à proteína G: CRF1, que apresenta alta afinidade pelo CRF e está amplamente distribuído em várias áreas cerebrais, como o hipotálamo, a amígdala e o VTA; e CRF2, que tem menor afinidade e uma distribuição mais limitada (Dautzenberg e Hauger, 2002).

Pesquisas evidenciaram que o CRF no núcleo accumbens diminui a sensibilidade ao esforço em ratos (Bryce e Floresco, 2019), enquanto na região pré-frontal medial afeta negativamente a memória de trabalho (Hupalo *et al.*, 2019). Modelos em ratos submetidos ao estresse destacam a importância do CRF na fisiopatologia de transtornos relacionados ao estresse crônico, como a depressão e a ansiedade (Heinrichs, 1995).

Essa participação da neurotransmissão CRFérgica na modulação das respostas relacionadas ao estresse (para revisão, ver De Kloet, Joëls e Holsboer, 2005) também foi demonstrada previamente em um estudo em que camundongos nocaute para o subtipo 1 para receptores CRFérgicos apresentaram redução da ansiedade (Smith *et al.*, 1998; Timpl *et al.*, 1998).

Além disso, a transmissão no sistema CRFérgico também apresenta divergências sexuais ante estímulos contextuais, o que se traduz em diferenças comportamentais (Vantrease, 2022; Palanza, 2001). Especificamente, Bangasser *et al.* (2010) propõem que exista maior acoplamento CRFr-Gs no tecido cortical de ratos fêmeas ante ambientes não estressantes, e uma diferença na associação de CRFr-b-arrestin2 ante uma situação estressante. Nesse estudo, foi demonstrado aumento na associação CRFr-b-arrestin2 somente em ratos machos e não em fêmeas.

Situações estressantes como as descritas anteriormente têm por característica ativar o eixo hipotálamo-hipófise (ou pituitária)-adrenal (HPA). A ativação do eixo HPA começa no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), que libera o hormônio liberador de corticotropina (CRF) (Duval *et al.*, 2010). O CRF percorre até a hipófise anterior, onde estimula a produção de proopiomelanocortina (POMC), que se decompõe para liberar o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (Chrousos, 2009). O ACTH é transportado pelo sangue até as glândulas adrenais, situadas acima dos rins. O ACTH estimula as células da zona fasciculada onde se liberam os glicocorticoides (principalmente cortisol em humanos) (Smith, 2022; Aguilera *et al.*, 1996). Os glicocorticoides ajudam o corpo a se adaptar ao estresse promovendo a liberação de glicose e a gliconeogênese, aumentando a atividade do sistema nervoso simpático, elevando a frequência cardíaca, a pressão arterial e a respiração, e suprimindo processos anabólicos como a função imunológica, a reprodução, a digestão e o crescimento (Sheng *et al.*, 2021). Ainda que estas respostas possam ser adaptativas, como foi mencionado anteriormente, a exposição a estressores crônicos pode alterar as funções do eixo HPA, o que aumenta o risco de diversas patologias crônicas (Jurruena *et al.*, 2020).

Por último, é apresentado o “feedback negativo”, onde, mediado pelos receptores de glicocorticoides e mineralocorticoides, inibe a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) (Harris *et al.*, 2013). No hipocampo, o cortisol reduz a excitação neuronal e suprime a liberação do hormônio liberador de corticotropina (CRH) pelo hipotálamo. No nível hipotalâmico, diminui diretamente a secreção de CRH e vasopressina, moléculas essenciais para estimular a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela hipófise. Além disso, na hipófise, o cortisol atua reduzindo a síntese e a liberação de ACTH (Chen, Tang e Yang, 2008; Myers, McKlveen e Herman, 2012; Aguilera, 2007).

As respostas ao estresse podem ser reguladas por diferentes áreas encefálicas pertencentes ao sistema límbico, como amígdala, hipocampo e córtex pré-frontal (McEwen, 2000). Uma das estruturas límbicas que regula o eixo HPA é o núcleo do leito da estria terminal (BNST) (Lezak *et al.*, 2014). O BNST está localizado no prosencéfalo rostral, ventral e adjacente ao septo, conectado com o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN). O BNST pode ser dividido aproximadamente nas porções anterior e posterior (Avery *et al.*, 2014).

Estudos em roedores demonstraram que o BNST é essencial para o medo contextual e para os transtornos desencadeados pela resposta ao estresse, assim como para a modulação da ansiedade e a dependência de drogas (Faria, Laverde e Nunes-Desouza, 2020; Davis *et al.*, 2010; Luo *et al.*, 2021). Além disso, alguns estudos sugerem que sua estimulação elétrica pode diminuir os comportamentos semelhantes ao estresse (Luyck *et al.*, 2017; Raymaekers, 2017; Luyten *et al.*, 2016), enquanto as lesões podem reduzir a secreção de ACTH induzida pelo estresse (Crane, Buller e Day, 2003).

Por outro lado, há evidências de que o BNST é uma região sexualmente dimórfica, a ponto de apresentar volume geral maior em machos em comparação com fêmeas, tanto em roedores quanto em humanos (Allen *et al.*, 1989; Hines *et al.*, 1985). Entretanto, também tem sido sugerido que as zonas anterior e posterior são maiores em fêmeas de ratos em comparação aos machos (Del Abril *et al.*, 1987). O BNST também apresenta dimorfismo sexual em termos de sua neuroquímica. Por exemplo, em ratos, a distribuição de neurotransmissores como a vasopressina mostra diferenças significativas entre machos e fêmeas na sua região posterior (Malsbury e McKay, 1987).

Dentre as neurotransmissões diretamente relacionadas às respostas de estresse, destaca-se a CRFérgica, a qual tem o neuropeptídeo CRF como neurotransmissor. O CRF tem ação sobre dois tipos de receptores acoplados à proteína G: CRF1, que apresenta alta afinidade pelo CRF e está amplamente distribuído em várias áreas cerebrais, como o hipotálamo, a amígdala e o VTA; e CRF2, que tem menor afinidade e uma distribuição mais limitada (Dautzenberg e Hauger, 2002). Pesquisas evidenciaram que o CRF no núcleo accumbens diminui a sensibilidade ao esforço em ratos (Bryce e Floresco, 2019), enquanto na região pré-frontal medial afeta

negativamente a memória de trabalho (Hupalo *et al.*, 2019). Modelos em ratos submetidos ao estresse destacam a importância do CRF na fisiopatologia de transtornos relacionados ao estresse crônico, como a depressão e a ansiedade (Heinrichs, 1995).

A administração sistêmica dos antagonistas CRF1 pode induzir diminuição dos comportamentos relacionados à dependência em modelos animais (Gehlert *et al.*, 2005; Richardson *et al.*, 2008; Sabino *et al.*, 2006), especificamente em roedores, o que permite uma perspectiva translacional do seu potencial uso clínico. Ainda, foi demonstrado em diferentes trabalhos que as administrações sistêmicas do antagonista seletivo do receptor de CRF1 produzem efeito ansiolítico em camundongos submetidos a estresse (Griebel *et al.*, 2002; Spierling e Zorrilla, 2017; Holsboer e Ising, 2008).

Dentre os antagonistas, o CP-376395 apresenta capacidade de atenuar as respostas relacionadas ao aumento de ansiedade em roedores quando administrado sistemicamente (Nipper, 2024). A duração do efeito do CP-376395 em roedores não foi completamente caracterizada, mas estudos anteriores indicaram que seus efeitos comportamentais se iniciam 30 minutos após a administração e duram até 4 horas após injeções intraperitoneais em camundongos C57BL/6J (Giardino *et al.*, 2012; Fulenwider *et al.*, 2021).

A proteína c-Fos é um marcador molecular amplamente utilizado em neurociência para identificar a ativação neuronal em estruturas encefálicas (Liu *et al.*, 2025; Scharfman, 2025). Sua expressão aumenta rapidamente em resposta a estímulos neuronais específicos, atingindo seu pico entre 30 e 90 minutos após o estímulo, o que permite estudar a atividade cerebral de forma temporal e precisa (Perrin-Terrin *et al.*, 2022; Bullitt, 1990). Sua expressão indica a ativação recente de neurônios, tornando-a útil para mapear circuitos neuronais, validar efeitos farmacológicos e associar respostas comportamentais à atividade cerebral (Kovács, 1998; Aguilar-Delgadillo *et al.*, 2024; Cai, 2023; Xiao *et al.*, 2024; Aparicio, 2022).

Neste sentido, considerando as evidências apontando que a neurotransmissão CRFérgica presente no BNST está envolvida na ansiedade promovida pelo estresse de derrota social, bem como da divergência entre sexos na transmissão mediada por esse neuropeptídeo, o presente estudo tem por hipótese que este mecanismo também module o aumento da ansiedade nos camundongos. Assim, espera-se que os camundongos fêmeas do grupo salina (controle) tenham

um perfil ansiogênico mais elevado frente à situação de estresse psicossocial e que tal diferença seja atenuada pelo tratamento com o antagonista CRF1. Nesta mesma linha de raciocínio, esperamos que o bloqueio dos receptores CRF1 leve a níveis mais baixos da expressão de c-Fos no BNST tanto em fêmeas como em machos.

1.2 OBJETIVO

Avaliar os efeitos do tratamento sistêmico com antagonista de receptores CRF1 sobre a ansiedade e os níveis de marcação de proteína c-Fos no BNST em camundongos machos e fêmeas expostos ao estresse de testemunho da derrota social (ETDS).

1.2.1 Objetivos específicos:

1.2.1.1 Investigar o efeito do antagonista CRF1 (CP376395) sobre a ansiedade em camundongos fêmeas e machos submetidos ao ETDS.

1.2.1.2 Verificar o padrão de ativação do BNST (através da mensuração da proteína c-Fos) em animais que receberam o tratamento com antagonista CRF1 e foram submetidos ao ETDS.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Sujeitos

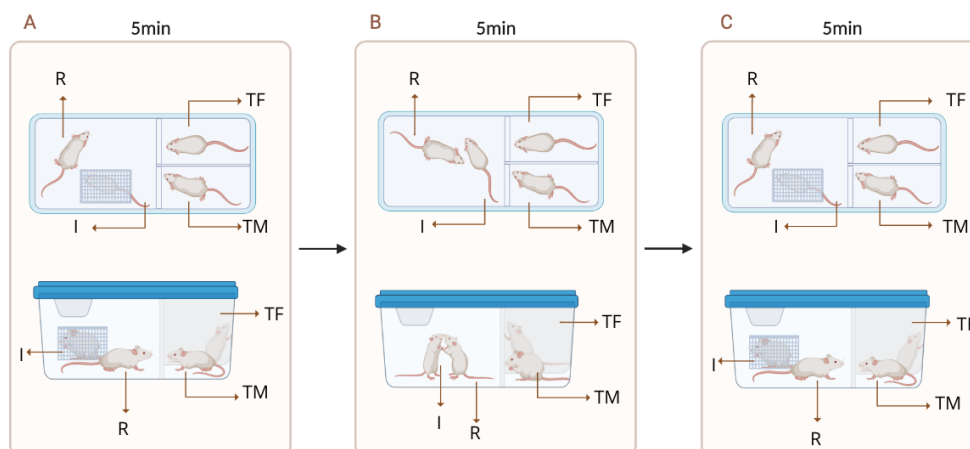
Camundongos (98 machos e 49 fêmeas) da linhagem Swiss-Webster (60 dias pós nascimento – 60 DPN) foram adquiridos do “Centro de Pesquisa e Produção de Animais – CPPA” da Universidade Estadual Paulista (Botucatu/SP). Todos os animais foram transferidos e mantidos no biotério do Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (FCFAR-UNESP). Os camundongos foram mantidos em um ciclo claro/escuro de 12 horas, com as luzes acendendo às 07:00 horas, em um ambiente com temperatura controlada (23 ± 1 °C). Eles foram alojados em grupos de quatro animais em caixas de polipropileno. Comida e água foram disponibilizadas *ad libitum*, exceto durante breves períodos de teste. Todos os animais eram ingênuos no início dos experimentos. Os camundongos agressores (residentes) foram alojados individualmente em gaiolas de $28 \times 17 \times 12$ cm, sob condições ambientais semelhantes (ciclo claro/escuro e temperatura controlada) e foram reutilizados de acordo com um cronograma de rotação estabelecido pelo experimentador. Todos os procedimentos e protocolos experimentais foram conduzidos de acordo com os princípios éticos do Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA): número do protocolo CEUA/FCF/CAR: 24/2023.

2.2 Estresse de testemunha de derrota social (ETDS)

Foi utilizado um protocolo adaptado daquele descrito por Golden *et al.* (2011), em que o animal intruso foi colocado por 5 minutos em uma gaiola individual perfurada ($8 \times 5 \times 8$ cm) e levado, junto com dois animais testemunha, para a caixa de alojamento do agressor (residente) ($28 \times 17 \times 12$ cm). Posteriormente, o animal intruso foi retirado da gaiola perfurada e introduzido na caixa de alojamento do agressor por mais 5 minutos para a confrontação agonística. Finalmente, o intruso foi colocado de volta na gaiola individual, dentro da caixa de alojamento do agressor, por mais 5 minutos. Durante todo o evento, as testemunhas permaneceram sem contato físico com o residente. A fim de que os animais testemunhassem a derrota social sem terem contato direto com o agressor ou entre elas, a caixa do residente foi dividida em três partes por meio de paredes móveis de acrílico. As duas testemunhas estiveram confinadas nos cantos da caixa em gaiolas ($8 \times 8 \times 8$ cm) com paredes perfuradas, pelo que a

testemunha poderia ter contato apenas auditivo, olfativo e visual, porém sem contato físico com o agressor ou o intruso (Figura 1). Ao final da exposição, o intruso e as testemunhas retornaram às suas respectivas caixas-moradia. Este procedimento foi repetido por 10 dias consecutivos. A cada dia, os animais intrusos foram expostos a um residente desconhecido, determinado por um cronograma de rotação.

Figura 1- Figura esquemática do protocolo de estresse de testemunha de derrota social (ETDS). O animal intruso (I) é colocado dentro de uma gaiola na caixa moradia do residente (R) por 5 minutos (A). Posteriormente, o intruso é retirado da gaiola e colocado em contato direto com o residente por 5 minutos (B). Por último, o intruso foi deixado dentro da gaiola novamente por mais 5 minutos (C). Enquanto se realiza o protocolo, nos cantos da caixa moradia do residente há duas divisões de acrílico transparente onde as duas testemunhas (TM), testemunha macho; (TF), testemunha fêmea longo dos 15 minutos.



Fonte: Elaboração própria

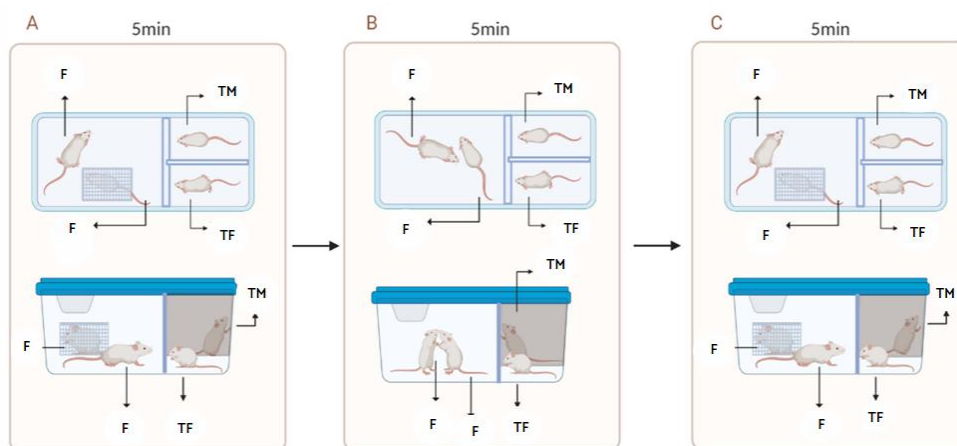
2.3 Teste de Testemunha de Interação não-agressiva

O grupo controle consistiu em animais que passaram pela testemunha da interação não-agressiva (TINA), isto é, o intruso foi exposto a um camundongo não agressor e familiar, enquanto era observado por outras duas testemunhas (segundo o mesmo protocolo mencionado para a derrota social, porém sem a confrontação agressiva). Para isso, foi adaptada uma caixa com maravalha dos animais familiares, uma proteção em acrílico transparente com duas divisões, e uma grade para cobrir a caixa. Inicialmente, todos os animais passaram por 10 minutos de habituação à luz vermelha para os animais familiares, 5 desses minutos foram

passados interagindo na caixa adaptada com maravalha para evitar possíveis confrontos durante o procedimento.

Posteriormente, um dos camundongos familiares (intruso) foi colocado por 5 minutos em uma gaiola individual perfurada e levado com duas testemunhas (um macho e uma fêmea), para ter uma interação auditiva, visual e olfativa com um camundongo do grupo familiar (residente). Em seguida, o animal intruso foi retirado da gaiola e introduzido na caixa por mais 5 minutos, onde ocorreu uma interação não agressiva com o residente. Após isso, o camundongo foi recolocado na gaiola individual, dentro da caixa adaptada, por mais 5 minutos. As testemunhas permaneceram sem contato físico com nenhum dos animais durante todo o episódio, interagindo apenas de forma visual, auditiva e olfativa. Ao final do procedimento, todos os animais foram levados de volta para suas caixas-moradia. Esse procedimento foi repetido diariamente por 10 dias consecutivos, com os animais familiares, seguindo um cronograma de rotação durante o protocolo (Figura 2).

Figura 2- Figura esquemática da Testemunha de interação não agressiva (TINA) Os animais familiares (F) são colocados numa caixa adaptada, onde um deles é deixado por 5 minutos em uma gaiola (A). Posteriormente, o camundongo que está na gaiola é colocado em contato direto com o outro familiar por 5 minutos (B). Por último, o camundongo familiar foi deixado dentro da gaiola novamente por mais 5 minutos (C). Enquanto se realiza o protocolo, nos cantos da caixa moradia do residente há duas divisões de acrílico transparente onde as duas testemunhas (TM), testemunha macho; (TF), testemunha fêmea longo dos 15 minutos.



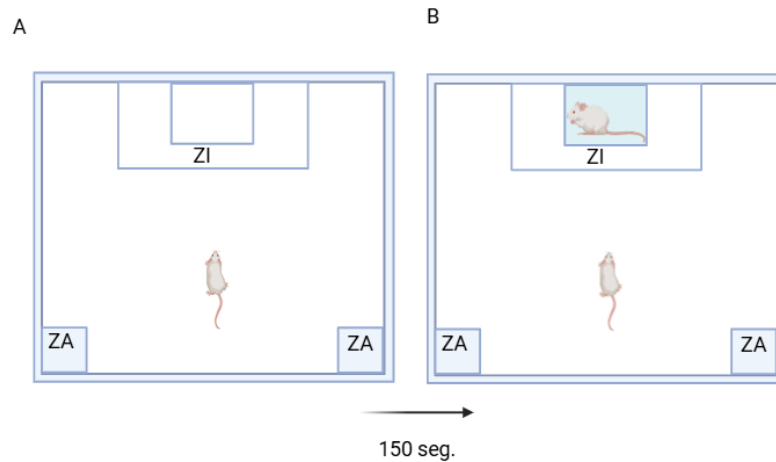
Fonte: Elaboração própria

2.4 Teste da interação social (TIS)

O TIS foi realizado 24 horas após a última sessão da derrota ou não agressiva, numa caixa (arena) de piso em acrílico cinza opaco ($42 \times 42 \times 42$ cm) com uma caixa de contenção ($8 \times 8 \times 8$ cm) centrada numa parede da zona e duas zonas nos cantos do lado oposto. A zona central da parede foi a zona de interação, onde posteriormente era colocado o residente agressivo não-familiar, enquanto as duas no canto foram as zonas de afastamento. Inicialmente, os camundongos testemunhas foram colocados por 150 segundos no lado oposto da caixa de contenção sem a presença do residente para avaliar a exploração inicial. Após esse tempo, cada animal testemunha foi removido da caixa e um residente foi colocado na caixa de contenção. A testemunha foi individualmente colocada de volta na arena por mais 150 segundos para avaliar o comportamento de interação social (Figura 3). A fim de avaliar a interação das testemunhas com o residente, foi registrado o tempo em segundos em que o animal permanecia numa das zonas da caixa. Os comportamentos dos animais submetidos a este protocolo foram filmados por meio de uma câmera conectada a um computador e os comportamentos foram analisados através do programa ANY-Maze.

Os parâmetros comportamentais analisados incluíram o tempo em segundos de exploração das zonas de interação (ZI) e de afastamento (ZA) registrados na ausência e presença do alvo. O comportamento de evitação social foi expresso como uma proporção de interação social, comparando o tempo gasto nas zonas na presença e ausência do alvo. A razão de interação (RI) foi calculada como a razão entre o tempo gasto na zona de interação na fase com alvo pelo tempo gasto na zona de interação na fase sem alvo. (Figura 3)

Figura 3- Representação esquemática do Teste da interação social (TIS). A testemunha foi colocada na arena de interação social por 150 s na ausência de um coespecífico residente (A). A testemunha retorna para a arena na presença de um residente na zona de interação. (T), testemunha; (R), residente; (ZI), zona de interação; (ZA), zona de afastamento (B).



Fonte: Elaboração própria

2.5 Teste Labirinto em Cruz Elevado

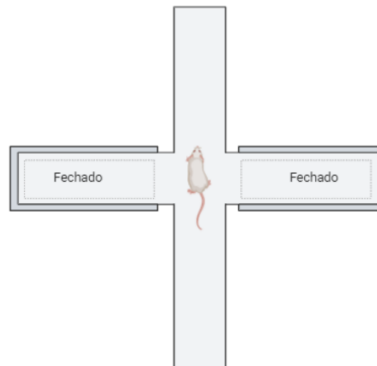
O Labirinto em Cruz Elevado (LCE) é um aparato utilizado para avaliar as respostas de ansiedade ante situações aversivas (Handley; Mithani, 1984; Lister, 1987). Por estar focado na aversão natural dos roedores por espaços abertos, este modelo baseia-se na livre exploração de roedores contra um ambiente novo, neste caso, dois pares de zonas distintas: um par de braços potencialmente aversivos (braços abertos) perpendicularmente disposto a um par de braços seguros (braços fechados), de modo a formar uma plataforma central de conexão dos quatro braços (Celis; Martinez; Conde, 2010).

Neste sentido, os ratos e camundongos expostos ao LCE tendem a evitar os braços abertos e a permanecer mais nos braços fechados (Cruz *et al.*, 1994). O nível de ansiedade é medido pela evitação de braços abertos, enquanto a atividade geral é avaliada pela frequência de entradas nos braços fechados, com o critério de entrada no braço definido como todas as quatro patas em um braço do labirinto (Rodgers; Cole, 1993; Gomes *et al.*, 2005). Assim, estes dados foram utilizados para calcular a porcentagem de entradas nos braços abertos $[(\text{aberto} / \text{total}) \times 100]$ e a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos do labirinto $[(\text{tempo no braço aberto} / 300) \times 100]$. O desenho básico do LCE para camundongo é muito similar ao originalmente

apresentado em Lister (1987). É composto por paredes de vidro transparente; dois braços abertos ($30 \times 5 \times 0,25$ cm) e dois braços fechados ($30 \times 5 \times 15$ cm) conectados através de uma plataforma central comum (5×5 cm), a uma altura de 38,5 cm acima do nível do chão.

Sessenta minutos após a injeção do antagonista (CP376395) ou salina, cada camundongo foi transportado para a sala do labirinto com o uso de uma gaiola ($28 \times 17 \times 12$ cm). Posteriormente, os animais foram colocados no centro do LCE, com a cabeça voltada para um dos braços abertos e exploraram a plataforma por 5 minutos. Isso permite o registro de medidas relacionadas à ansiedade, conferidas pelo número de entradas e pelo tempo que os animais passam nos braços abertos, e a medida relacionada à locomoção, avaliada pelo número de entradas nos braços fechados do aparato. A exposição ao LCE foi monitorada por meio de uma câmera montada verticalmente conectada a um computador para análise e registro automático do comportamento pelo programa ANY-Maze (Figura 4).

Figura 4- Representação do labirinto em cruz elevado



Fonte: Elaboração própria

2.5 Tratamento Farmacológico

O fármaco utilizado foi o CP 376395 [cloridrato de N-(1-etilpropil)-3,6-dimetil-2-(2,4,6-trimetilfenoxi)-4-piridinamina] da marca Tocris, CAS No: 1013933-37-3, um antagonista seletivo do receptor CRF1 que tem demonstrado atenuar a ativação induzida por CRF do eixo HPA após administração (Chen *et al.*, 2008). Este fármaco foi dissolvido em salina (NaCl 0,9%) e foi administrado por via intraperitoneal na dose de 20 mg/kg, com volume de 0,1 ml para cada 10 g de animal. Esta dose foi selecionada com base em estudos prévios (Fulenwider *et*

al., 2021; Giardino, 2013; Hwa *et al.*, 2016; Lowery-Gionta *et al.*, 2012). A duração do efeito do CP-376395 em roedores não foi completamente caracterizada, mas estudos anteriores indicaram que seus efeitos comportamentais começam a ser notados 30 minutos após a administração e duram até 4 horas após injeções intraperitoneais em camundongos C57BL/6J (Giardino *et al.*, 2012; Fulenwider *et al.*, 2021).

2.6 Imunofluorescência

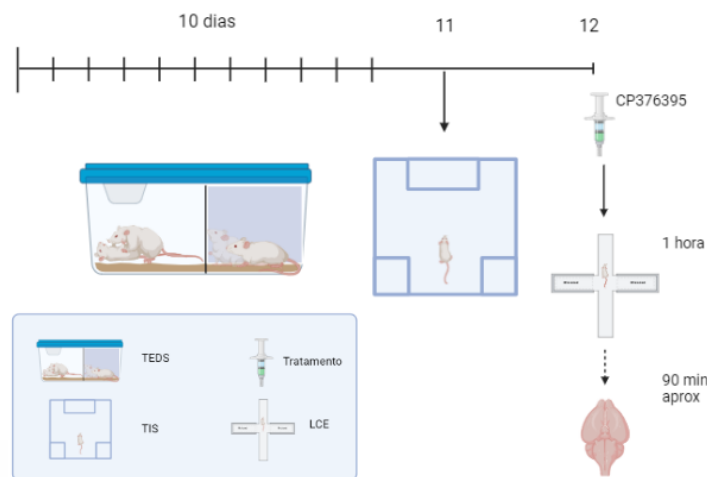
Após as análises comportamentais, os camundongos foram anestesiados e perfundidos com solução salina tamponada com fosfato (PBS), seguido por paraformaldeído 4% (PFA 4%). Os encéfalos removidos foram pós-fixados em PFA 4% por 1 hora e transferidos para solução de sacarose 30% em PBS a 4°C. Após 2 dias, os encéfalos foram congelados e mantidos a -80°C até serem fatiados no criostato em seções coronais de 35 µm de espessura para a obtenção de cortes do BNST dos bregmas 0,38, 0,26, 0,14 e 0,02, baseado no atlas (Franklin e Paxinos, 2008). As fatias coronais foram lavadas 5 vezes com PBS e, em seguida, incubadas com solução bloqueadora - veículo (soro de cabra 10%; Triton X-100 0,3% dissolvidos em PBS) por 1 hora à temperatura ambiente. Após o bloqueio, as fatias foram incubadas com o anticorpo primário (anti-cFos, Cat. No. EPR15905; Abcam) em solução veículo por 24 horas a 4°C. Após essa incubação, as fatias foram lavadas com PBS por 5 vezes e incubadas com um anticorpo secundário (Alexa Fluor 488; ab175473) diluído em solução veículo, por 3 horas à temperatura ambiente. Em seguida, as fatias foram lavadas com PBS por 5 vezes e montadas em lâminas gelatinizadas, sendo seladas com lamínula.

A imunomarcção foi capturada usando uma câmera microscópica AxioCam 503 colorida (Zeiss), acoplada ao microscópio Axio Imager 2 com sistema para observação de luz visível (iluminador halógeno, 127V, 100W) e marcação epifluorescente (iluminador HXP 120V, filtros com transmitância 430-750 nm, 530-850 nm e 615-800 nm). A quantificação da fluorescência foi realizada no software ImageJ (NIH), utilizando a técnica “Corrected total cell fluorescence”. Esta técnica permite a quantificação da fluorescência de uma área definida, entretanto, a fluorescência emitida pelo fundo é removida do valor final, baseado na descrição feita por Fresca *et al.*, (2023), e assim, os valores obtidos foram uma média de 3-4 cortes de cada sujeito experimental/área.

2.7 Delineamentos Experimentais

Quarenta e nove camundongos de cada sexo foram submetidos a 10 sessões de testemunha do estresse de derrota social ou interação não agressiva. No 11º dia foram expostos à interação social (TIS) e, após 24 horas (no 12º dia), ao labirinto em cruz elevado (LCE). Sessenta minutos antes da exposição ao LCE, os animais receberam injeção intraperitoneal de salina (NaCl a 0,9%, grupo controle) ou do antagonista CRF1 (CP 376395) na dose de 20 mg/kg (Fulenwider *et al.*, 2021) e foram expostos ao teste do LCE, onde exploraram o aparato por 5 minutos, momento em que foram registradas as medidas de ansiedade. Noventa minutos após a exposição ao LCE, todos os animais foram submetidos à perfusão para remoção dos encéfalos e análise da imunofluorescência para c-Fos (Figura 5).

Figura 5- Representação esquemática do Delineamento Experimental. Os sujeitos passam por 10 dias de (ETDS) ou (TINA). No dia 11, foi feito o (TIS). Adicionalmente, 24 horas depois, no dia 12, é feita administração do antagonista ou salina. 1 hora depois os camundongos são levados ao (LCE). Por último, aprox. 90 minutos depois é feita a extração do encéfalo para imunofluorescência.



Fonte: Elaboração própria

2.8 Ética

Todos os procedimentos e protocolos experimentais foram conduzidos de acordo com os princípios éticos do Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA): número do protocolo CEUA/FCF/CAR: 24/2023.

2.9 Estatística

Em relação ao TIS, foi calculada a razão de interação baseado no trabalho do Golden (2011). Para análise estatística dos dados, foi realizada uma análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas de dois fatores, condição (Fator 1; TINA ou ETDS) e sessão (Fator 2; sem alvo, com alvo). Adicionalmente, foram identificados os fenótipos resilientes e suscetíveis nos animais que foram expostos ao ETDS como foi descrito em GOLDEN (2011), onde o fenótipo dos camundongos foi identificado por meio da razão de interação social (RI), que compara o tempo que o camundongo passa na zona de interação com um agressor, tanto na presença quanto na ausência dele. O RI é calculado dividindo o tempo que o camundongo passa na zona de interação quando o agressor está presente, pelo tempo que passa na mesma zona quando o agressor está ausente. Um RI próximo de 1 indica um fenótipo suscetível, pois o camundongo não demonstra preferência por interagir com o agressor. Por outro lado, um RI superior a 1 sugere um fenótipo resiliente, já que o camundongo interage mais com o agressor, mostrando uma resposta mais adaptativa ao estresse social. Posteriormente, para avaliar o efeito da condição na interação social, os dados foram submetidos a ANOVA de um fator. Os valores de tempo na zona de afastamentos e interação foram analisados por meio da ANOVA bifatorial (fator 1: fenótipo TINA, resiliente e suscetível; fator 2: Presença do alvo ou ausência do alvo). Os resultados do LCE foram submetidos à ANOVA bifatorial (fator 1: condição TINA ou ETDS; fator 2: tratamento). Nos casos de significância, as análises foram seguidas pelo teste de comparações múltiplas de Duncan. O valor de p menor ou igual a 0,05 foi considerado como significativo.

3. RESULTADOS

3.1 Teste de interação social (TIS)

Para o presente estudo foram utilizados um total de 98 camundongos como animal experimental (49 fêmeas e 49 machos). Das fêmeas 25 foram TINA e 24 foram ETDS, dos quais os 17 foram identificados como resilientes e 7 como susceptíveis (resilientes 70,9% e 29,1% susceptíveis). Nos machos 23 foram TINA e 26 foram ETDS, dos quais os 25 foram identificados como resilientes e 1 como suscetível (resilientes 96,1% e 3,9% suscetível). Já que o número de animais suscetível é só 1 poderia alterar a validade da análise estatística, foi optado por unicamente analisar os dados dos machos apenas em fatores TINA e ETDS.

3.1.1 Fêmeas

3.1.1.1 Zona de Interação (ZI)

A ANOVA de medidas repetidas de dois fatores nas fêmeas não indicou uma interação entre condição (TINA/ ETDS), presença do alvo (Sem alvo/Com alvo) $F_{(1,47)} = 0,513$, $p = 0,477$. A análise de variância mostrou um efeito significativo da presença do alvo no tempo na ZI $F_{(1,47)} = 14,251$, $p=0,01$. Adicionalmente, a ANOVA mostrou uma diferença significativa baseada na condição independentemente da presença do alvo $F_{(1,47)} = 5,736$, $p=0,020$. Esses resultados indicam que a condição não exerceu um efeito significativo sobre o tempo na zona de interação. O post hoc indicou uma diferença significativa no tempo na zona de interação com a presença do alvo e sem o alvo de ($p=0,01$); os animais da condição ETDS passaram mais tempo na zona de interação independentemente da presença do alvo ($p = 0,020$) (Figura 6a).

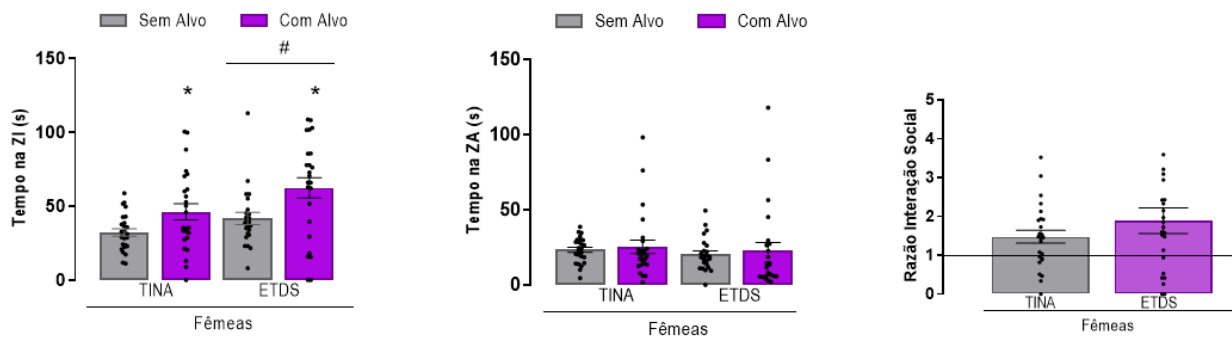
3.1.1.2 Zona de Afastamento (ZA)

Em relação ao tempo na ZA a ANOVA nas fêmeas não indicou uma interação entre condição (TINA/ ETDS), presença do alvo (Sem alvo/Com alvo) $F_{(1,47)} = 0,001$, $p = 0,972$). A análise de variância não mostrou um efeito significativo da presença do alvo no tempo no ZA $F_{(1,47)} = 0,356$, $p = 0,553$ nem da condição $F_{(1,47)} = 0,351$ $p = 0,553$. Esses resultados indicam que a condição não teve um efeito significativo sobre o tempo na zona de afastamento (Figura 6b).

3.1.1.2 Razão de interação (RI)

A análise revelou que não houve efeito significativo da condição sobre a razão de interação, $F_{(1,47)} = 1,646$, $p = 0,205$, indicando que existe uma diferença estatisticamente significativa na interação social pela condição (Figura 6c).

Figura 6-Efeito do ETDS em camundongos fêmeas avaliadas no teste de interação social. As barras representam a média e pontos de dispersão ($\pm$ EPM) de fêmeas TINA ($n = 24$) e ETDS ($n = 25$) do tempo (s) na zona de interação (a) e na zona de afastamento (b) em função da ausência ou presença do alvo, e a razão da interação social (c). * $p < 0,05$ versus sem alvo; # $p < 0,05$ versus TINA. ZI, zona de interação; ZA, zona de afastamento; TINA, testemunho da interação não agressiva; ETDS, estresse de testemunho da derrota social



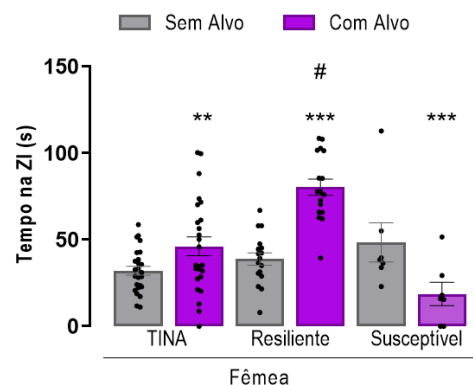
Fonte: Elaboração própria

3.1.1.4 Zona de Interação por fenótipos (ZI)

Foi realizada uma ANOVA fatorial 2×3 com (fator 1: fenótipo TINA, resiliente e suscetível; fator 2: Presença do alvo ou ausência do alvo) para avaliar o tempo na zona de interação como variável dependente, baseado no (Golden, 2011). Os resultados indicaram uma diferença significativa no tempo na zona de interação nos fenótipos independentemente da presença do alvo [$F_{(2,29)} = 12,947$, $p > 0,01$]. Por outro lado, a presença do alvo por si só, não apresentou diferença significativa ($F_{(2,29)} = 3,282$, $p = 0,07$). Por último, a análise mostrou interação entre o fenótipo e a presença do alvo [$F_{(2,29)} = 15,498$, $p > 0,01$]. O post hoc indicou diferença entre fenótipos independente da presença do alvo, onde o fenótipo resiliente passa mais tempo na zona de interação quando comparado com o fenótipo TINA ($p > 0,01$) e comparado com o suscetível ($p > 0,01$). Em relação a interação da presença do alvo e o fenótipo, o *post hoc* indicou, inicialmente, que não se apresentou diferença significativa nos tempos na zona de

interação sem alvo. O fenótipo TINA não apresenta diferenças dependentes da presença do alvo ($p = 0,107$). O fenótipo resiliente apresenta diferenças dependentes da presença do alvo ($p > 0,01$), indicando que na presença do alvo os resilientes passam mais tempo na zona de interação. O fenótipo suscetível apresenta diferenças dependentes da presença do alvo ($p > 0,01$), mostrando que na presença do alvo os animais passam menos na zona de interação. Por outro lado, na presença do alvo, os animais resilientes ao estresse passam mais tempo na zona de interação quando comparados com os TINA ($p > 0,01$) e quando comparados com os suscetíveis ($p > 0,01$) (Figura 7).

Figura 7- Efeito do ETDS em camundongos fêmeas avaliadas no teste de interação social baseado nos fenótipos. As barras representam a média e pontos de dispersão ($\pm$ EPM) de fêmeas TINA ($n = 24$), Resiliente ($n = 18$) e suscetível ($n = 7$). O **indica a diferença no tempo na zona de interação do fenótipo TINA independentemente da presença do alvo $p > 0,01$, além disso, mostra a diferença do fenótipo TINA no tempo na ZI com presença do alvo quando comparado com os outros fenótipos $p > 0,01$. O *** indica a diferença no tempo na ZI do fenótipo resiliente independentemente da presença do alvo $p > 0,01$ e a diferença do fenótipo resiliente no tempo na ZI com presença do alvo quando comparado com os outros fenótipos $p > 0,01$. Em suma o # mostra a interação presença do alvo e fenótipo. Por último, O *** indica a diferença no tempo na zona de interação do fenótipo suscetível independentemente da presença do alvo $p > 0,01$, adicionalmente, mostra a diferença do fenótipo suscetível no tempo na ZI com presença do alvo quando comparado com os outros fenótipos $p > 0,01$



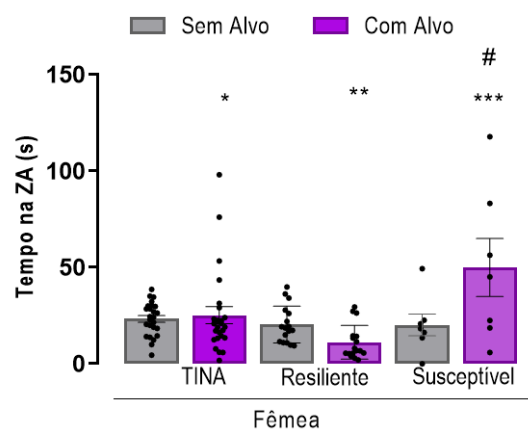
Fonte: Elaboração própria

3.1.1.5 Zona de Afastamento por fenótipos (ZA)

Os resultados indicaram uma diferença significativa no tempo na zona de afastamento dependente do fenótipo ($F_{(2,29)} = 6,682$, $p = 0,001$), contudo, sem revelar significância quando foram os tempos na zona de afastamento ($F_{(2,29)} = 3,619$, $p = 0,060$). Adicionalmente, a análise revelou uma interação na presença do alvo e o fenótipo ($F_{(2,29)} = 6,476$, $p = 0,002$). O teste post hoc indicou inicialmente que, independentemente da presença do alvo, os animais suscetíveis

passaram mais tempo na ZA que os resilientes ($p > 0,01$) e que os TINA ($p = 0,028$). Adicionalmente, o post hoc em relação na interação mostrou, inicialmente, que não se apresentou diferença significativa nos tempos na zona de afastamento sem alvo. O fenótipo TINA não apresenta diferenças dependentes da presença do alvo ($p = 0,777$). O fenótipo resiliente não apresenta diferenças dependentes da presença do alvo ($p = 0,210$). O fenótipo suscetível apresenta diferenças dependentes da presença do alvo ($p > 0,01$), mostrando que na presença do alvo os animais passam mais na zona de afastamento. Adicionalmente, na presença do alvo, os animais suscetíveis passam mais tempo na zona de afastamento quando comparados com os TINA ($p > 0,01$) e os suscetíveis ($p > 0,01$) (Figura 8).

Figura 8- Efeito do ETDS em camundongos fêmeas avaliadas no teste de interação social baseado nos fenótipos. As barras representam a média e pontos de dispersão ($\pm$ EPM) de fêmeas TINA ($n = 24$), Resiliente ($n = 18$) e suscetível ($n = 7$). O *indica a diferença no tempo na ZA do fenótipo TINA independentemente da presença do alvo $p > 0,01$. O **indica a diferença no tempo na ZA do fenótipo Resiliente independentemente da presença do alvo $p > 0,01$, adicionalmente, mostra a diferença do fenótipo Resiliente no tempo na ZA com presença do alvo quando comparado com os outros fenótipos $p > 0,01$. Por último, O *** indica a diferença no tempo na ZA do fenótipo suscetível independentemente da presença do alvo $p > 0,01$, adicionalmente, mostra a diferença do fenótipo suscetível no tempo na ZA com presença do alvo quando comparado com os outros fenótipos $p > 0,01$, além disso, mostra-se um maior tempo do suscetível no ZA na presença do alvo quando comparado com o tempo sem o alvo. Por último, o # mostra a interação presença do alvo e fenótipo no ZA.



Fonte: Elaboração própria

3.1.2 Machos

3.1.2.1 Zona de Interação (ZI)

A ANOVA nos machos não indicou uma interação entre condição (TINA/ ETDS), presença do alvo (Sem alvo/Com alvo) ($F_{(1,47)} = 1,266$, $p = 0.266$). A análise de variância mostrou um efeito significativo da presença do alvo no tempo no ZI ($F_{(1,47)} = 96,441$, $p > 0,01$). Adicionalmente, a ANOVA mostrou uma diferença significativa baseada na condição, independentemente da presença do alvo ($F_{(1,47)} = 6,381$, $p = 0,014$). Esses resultados indicam que a condição não teve um efeito significativo sobre o tempo na zona de interação. O post hoc indicou uma diferença significativa no tempo na zona de interação com a presença do alvo e sem o alvo de ($p > 0,01$); os animais da condição ETDS passaram mais tempo na zona de interação independentemente da presença do alvo ($p = 0,015$) (Figura 9a).

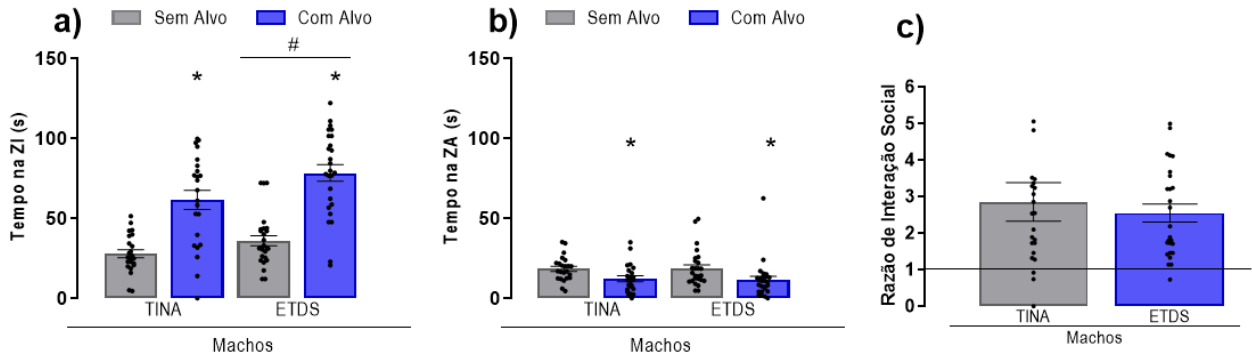
3.1.2.2 Zona de Afastamento (ZA)

Por outro lado, a ANOVA nos machos não indicou uma interação entre condição (TINA/ ETDS), presença do alvo (Sem alvo/Com alvo) ($F_{(1,47)} = 0,120$, $p = 0.750$). A análise de variância mostrou um efeito significativo da presença do alvo no tempo no ZA ($F_{(1,47)} = 17,573$, $p > 0,01$). Esses resultados indicam que a condição teve um efeito significativo sobre o tempo na zona de afastamento. O post hoc indicou uma diferença significativa no tempo na zona de afastamento com a presença do alvo e sem o alvo de ($p > 0,01$) indicando um tempo menor na zona de afastamento na presença do alvo (Figura 9b).

3.1.2.1 Razão de interação (RI)

Por último, a ANOVA de uma via mostrou que não houve efeito significativo da condição sobre a razão de interação ($F_{(1,47)} = 0,799$, $p = 0,375$), indicando que inexistia diferença estatisticamente significativa na interação social pela condição (Figura 9c).

Figura 9- Efeito do ETDS em camundongos machos avaliadas no teste de interação social. As barras representam a média e pontos de dispersão ($\pm$ EPM) de fêmeas TINA (n= 24) e ETDS (n= 25) do tempo (s) na zona de interação (a) e na zona de afastamento (b) em função da ausência ou presença do alvo, e a razão da interação social (c). * $p < 0,05$ versus sem alvo; # $p < 0,05$ versus TINA. ZI, zona de interação; ZA, zona de afastamento; TINA, testemunho da interação não agressiva; ETDS, estresse de testemunho da derrota social



Fonte: Elaboração própria

3.2 Labirinto em cruz elevado

Foi realizada uma ANOVA de duas vias para avaliar o efeito da condição (TINA/ETDS) e do tratamento (CP 376395/salina) sobre o número de entradas nos braços fechados (EBF), % entrada no braço aberto (%EBA) e % tempo no braço aberto (%TBA) no labirinto em cruz elevado (LCE).

3.2.1 Fêmeas

A ANOVA de duas vias apontou que não houve uma interação entre condição e o tratamento sobre as entradas nos braços fechados ($F_{(1,45)} = 0,108$, $p = 0,743$). Em suma, o tratamento, por si só, não mostrou um efeito significativo ($F_{(1,45)} = 2,554$, $p = 0,116$). Do mesmo jeito, não houve um efeito significativo do fator condição ($F_{(1,45)} = 0,329$, $p = 0,568$) (Figura 10a). Por outro lado, os resultados indicaram que a condição não exerceu um efeito significativo na %EBA por si só ($F_{(1,45)} = 1,390$, $p = 0,244$). No entanto, o tratamento mostrou um efeito significativo ($F_{(1,45)} = 7,224$, $p = 0,010$). Não foi encontrada uma interação significativa entre a condição e o tratamento ($F_{(1,45)} = 1,058$, $p = 0,309$). A análise post-hoc de Duncan indicou que o tratamento com o antagonista do CRF1 (20 mg/kg) aumentou significativamente o percentual de

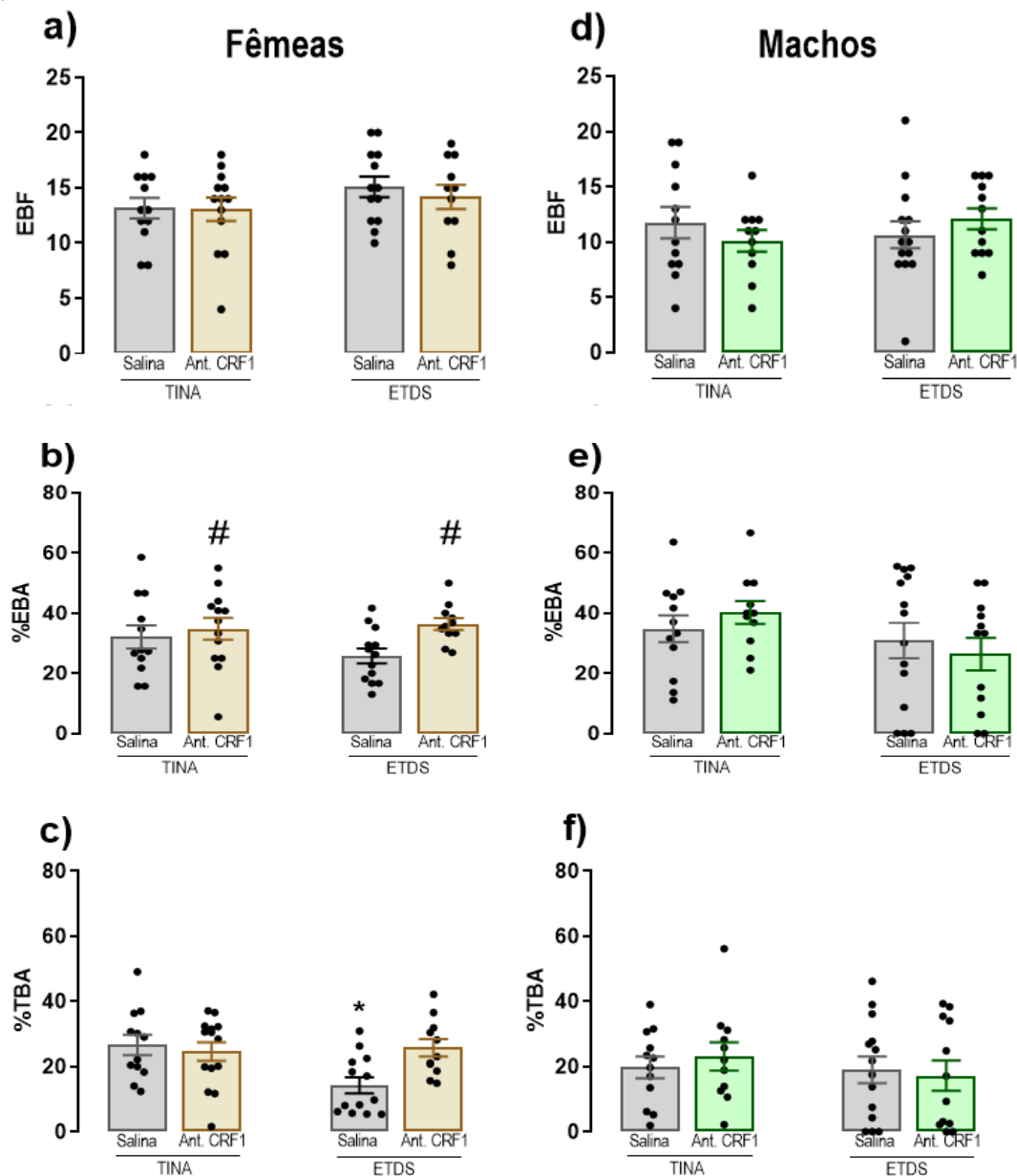
entradas nos braços abertos em comparação com os animais tratados com salina ($p = 0,008$), sugerindo um efeito ansiolítico do tratamento em geral, independentemente da condição (Figura 10b). Por último, na porcentagem de tempo no braço aberto, observou-se um efeito significativo da condição ($F_{(1,45)} = 5,911$, $p = 0,019$), do tratamento ($F_{(1,45)} = 4,432$, $p = 0,0408$) e da interação entre condição e tratamento ($F_{(1,45)} = 4,8407$, $p = 0,0329$). A análise post hoc revelou diferenças significativas na %TBA entre as diferentes condições e tratamentos. O grupo ETDS que recebeu salina foi diferente do grupo TINA salina ($p = 0,003$), do grupo TINA com o tratamento de 20 mg/kg de CP 376395 ($p = 0,003$) e do ETDS com o tratamento de 20 mg/kg de CP 376395 ($p = 0,004$). Estes resultados indicam que os animais que passaram por ETDS e receberam salina tiveram uma porcentagem menor de tempo gasto nos braços abertos. Em suma, o análise post hoc mostrou que a condição, independentemente do tratamento, apresentou diferenças significativas ($p = 0,012$), mostrando que os animais que passaram por ETDS tiveram uma porcentagem menor de tempo nos braços abertos. Por último, o tratamento por si provocou diminuição nos comportamentos ansiosos ($p = 0,032$) (Figura 10c).

3.2.2 Machos

A ANOVA revelou que não houve diferenças significativas no EBF em função da condição de estresse ($F_{(1,45)} = 0,140$, $p = 0,709$). Da mesma forma, o tratamento com antagonista CRF1 também não mostrou um efeito significativo sobre o número de entradas nos braços fechados ($F_{(1,45)} = 0,0086$, $p = 0,926$), indicando que a administração de 20 mg/kg do antagonista de CRF1 não modifica o comportamento de locomoção nos animais. Por último, a interação entre a condição de estresse e o tratamento não foi significativa ($F_{(1,45)} = 1,721$, $p = 0,1961$), sugerindo que nem o tratamento nem a condição gerou efeitos na locomoção (figura 10d). Do mesmo jeito, a análise revelou que não houve diferenças significativas na %EBA em função da condição de estresse ($F_{(1,45)} = 2,982$, $p = 0,090$). Da mesma forma, o tratamento com antagonista CRF1 também não mostrou um efeito significativo sobre o número de entradas nos braços abertos ($F_{(1,45)} = 0,008$, $p = 0,927$), indicando que a administração de 20 mg/kg do antagonista de CRF1 não modifica o comportamento de relacionado a ansiedade nos animais. Por último, a interação entre a condição de estresse e o tratamento não foi significativa ($F_{(1,45)} = 0,930$, $p = 0,339$), sugerindo que nem o tratamento nem a condição gerou efeitos na porcentagem de entradas nos braços abertos (Figura 10e). Por último, não se observou diferenças na %TBA, uma vez que a

análise não revelou efeitos significativos da condição ($F_{(1,45)} = 0,630$, $p = 0,431$), do tratamento ($F_{(1,45)} = 0,035$, $p = 0,851$), nem da interação entre a condição e o tratamento ($F_{(1,45)} = 0,392$, $p = 0,534$) (Figura 10f).

Figura 10- Efeito do ETDS e da injeção i.p. do antagonista CP376395 em camundongos machos e fêmeas avaliados no LCE (n=11-14/grupo). As barras representam a média e pontos de dispersão ($\pm$ EPM) (n=11-14/grupo). a) no braço fechado das fêmeas b) o # $p \leq 0,05$ indica a diferença unicamente do efeito do antagonista independentemente da condição, mostrando uma maior porcentagem de entradas no braço aberto pelo efeito do antagonista nas fêmeas. c) * $p \leq 0,05$ indica a diferença unicamente do efeito do antagonista independentemente da condição. O * indica as diferenças significativas no %TBA entre as diferentes condições e tratamentos nas fêmeas. a) no braço fechado nos machos b) porcentagem de entradas no braço aberto dos machos e c) porcentagem de tempo no braço aberto dos machos.



Fonte: Elaboração própria

3.3 Padrão de ativação das porções dorsal e ventral do BNST

3.3.1 Fêmeas

3.3.1.1 Porção Dorsal do BNST

A ANOVA de três fatores para medidas repetidas não indicou interação entre condição (TINA e ETDS), tratamento (salina e 20 mg/kg) nem hemisférios (lado esquerdo e direito) ($F_{(1,14)} = 0,149$, $p = 0,704$). A análise não indicou uma diferença significativa da condição ($F_{(1,14)} = 1,148$, $p = 0,301$), nem um efeito dos hemisférios ($F_{(1,14)} = 0,295$, $p = 0,595$). Não se apresentou uma interação entre os hemisférios e a condição ($F_{(1,14)} = 0,574$, $p = 0,461$), nem entre os hemisférios e o tratamento ($F_{(1,14)} = 0,004$, $p = 0,950$). Contudo, o fator tratamento mostrou diferenças significativas ($F_{(1,14)} = 17,013$, $p = 0,010$). Por último, não se apresentou uma interação entre a condição e o tratamento ($F_{(1,14)} = 0,004$, $p = 0,645$). A análise post hoc utilizando o Duncan mostrou uma diferença significativa do grupo que recebeu o tratamento salina, indicando maior expressão da proteína c-Fos, quando comparado com o grupo que recebeu tratamento de 20 mg/kg do antagonista de CRF1 ($p = 0,001$) (Figura 11b).

3.3.1.2 Porção Ventral do BNST

A ANOVA de três fatores para medidas repetidas não indicou interação entre condição (TINA e ETDS), tratamento (salina e 20 mg/kg) nem hemisférios (lado esquerdo e direito) ($F_{(1,14)} = 0,521$, $p = 0,482$). A análise não indicou uma diferença significativa da condição ($F_{(1,14)} = 1,148$, $p = 0,301$), nem um efeito dos hemisférios ($F_{(1,14)} = 1,306$, $p = 0,272$). Não se apresentou uma interação entre os hemisférios e a condição ($F_{(1,14)} = 1,231$, $p = 0,285$), nem entre os hemisférios e o tratamento ($F_{(1,14)} = 0,656$, $p = 0,816$). Contudo, o fator tratamento mostrou diferenças significativas ($F_{(1,14)} = 7,807$, $p = 0,014$), igual maneira houve uma interação entre a condição e o tratamento ($F_{(1,14)} = 5,820$, $p = 0,029$). A análise post hoc utilizando o Duncan mostrou uma diferença significativa do grupo ETDS que recebeu o tratamento salina, mostrando uma maior expressão da proteína c-Fos, quando comparado com o grupo TINA que recebeu tratamento de 20 mg/kg do antagonista de CRF1 ($p = 0,020$). Do mesmo jeito, o teste de Duncan mostrou uma diferença significativa do grupo TINA que recebeu o tratamento salina, revelando

maior expressão da proteína c-Fos, quando comparado com o grupo TINA que recebeu salina ($p = 0,273$). Por último, foi diferente do grupo ETDS que recebeu tratamento de 20 mg/kg do antagonista de CRF1 ($p = 0,003$) (Figura 11c).

3.3.2 Machos

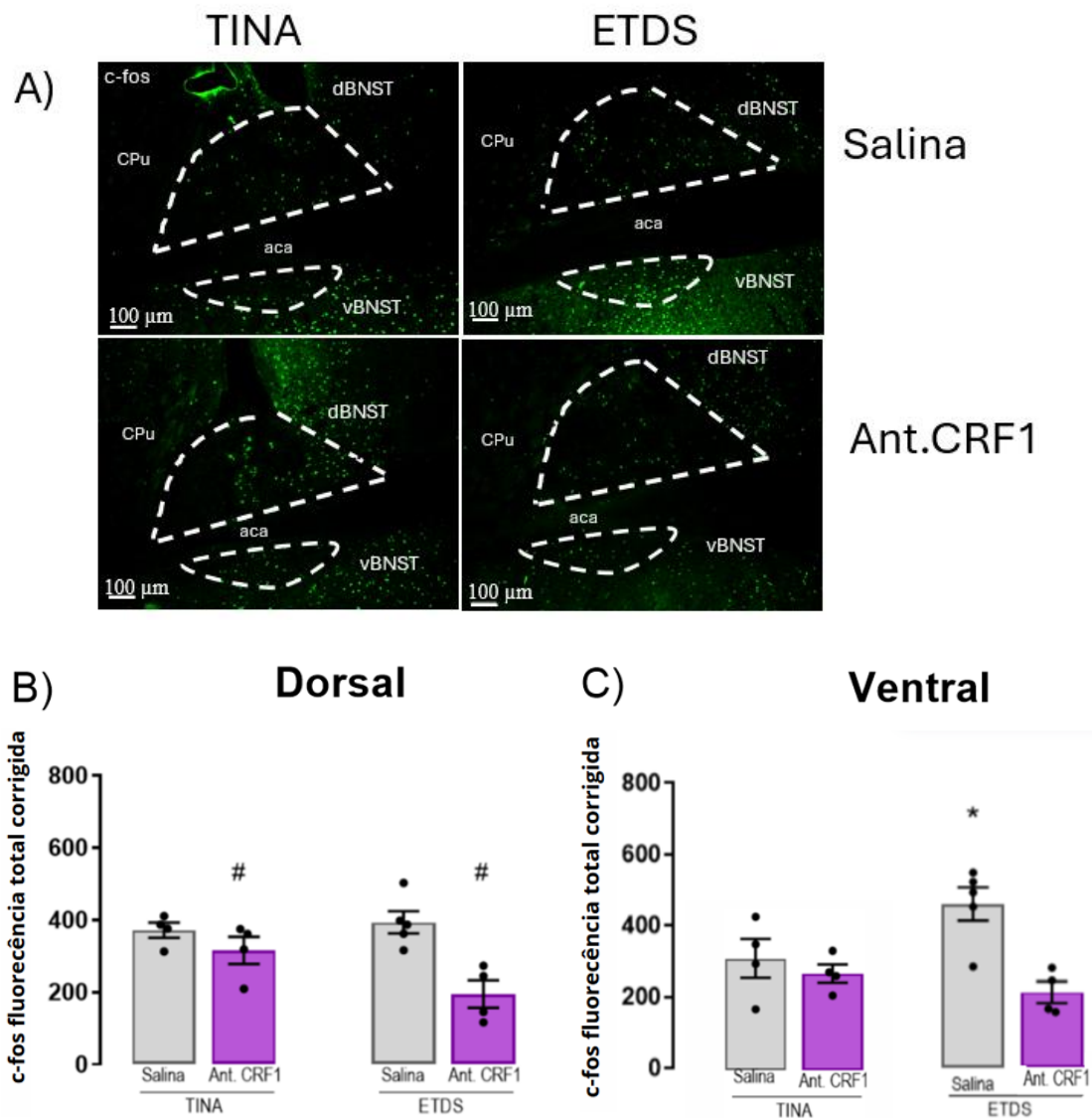
3.3.2.1 Porção Dorsal do BNST

A ANOVA de três fatores para medidas repetidas não indicou interação entre condição (TINA e ETDS), tratamento (salina e 20 mg/kg) nem hemisférios (lado esquerdo e direito) ($F_{(1,13)} = 2,387$ $p = 0,815$). A análise não indicou uma diferença significativa da condição ($F_{(1,13)} = 0,056$, $p = 0,146$), nem um efeito dos hemisférios ($F_{(1,13)} = 0,006$, $p = 0,935$) e tampouco o fator tratamento mostrou diferenças significativas ($F_{(1,13)} = 2,912$, $p = 0,111$). Não se apresentou uma interação entre os hemisférios e a condição ($F_{(1,13)} = 0,179$, $p = 0,679$), nem entre os hemisférios e o tratamento ($F_{(1,13)} = 0,068$, $p = 0,939$). Por último, não se apresentou uma interação entre a condição e o tratamento ($F_{(1,13)} = 0,255$ $p = 0,621$) (Figura 11b).

3.3.2.2 Porção Ventral do BNST

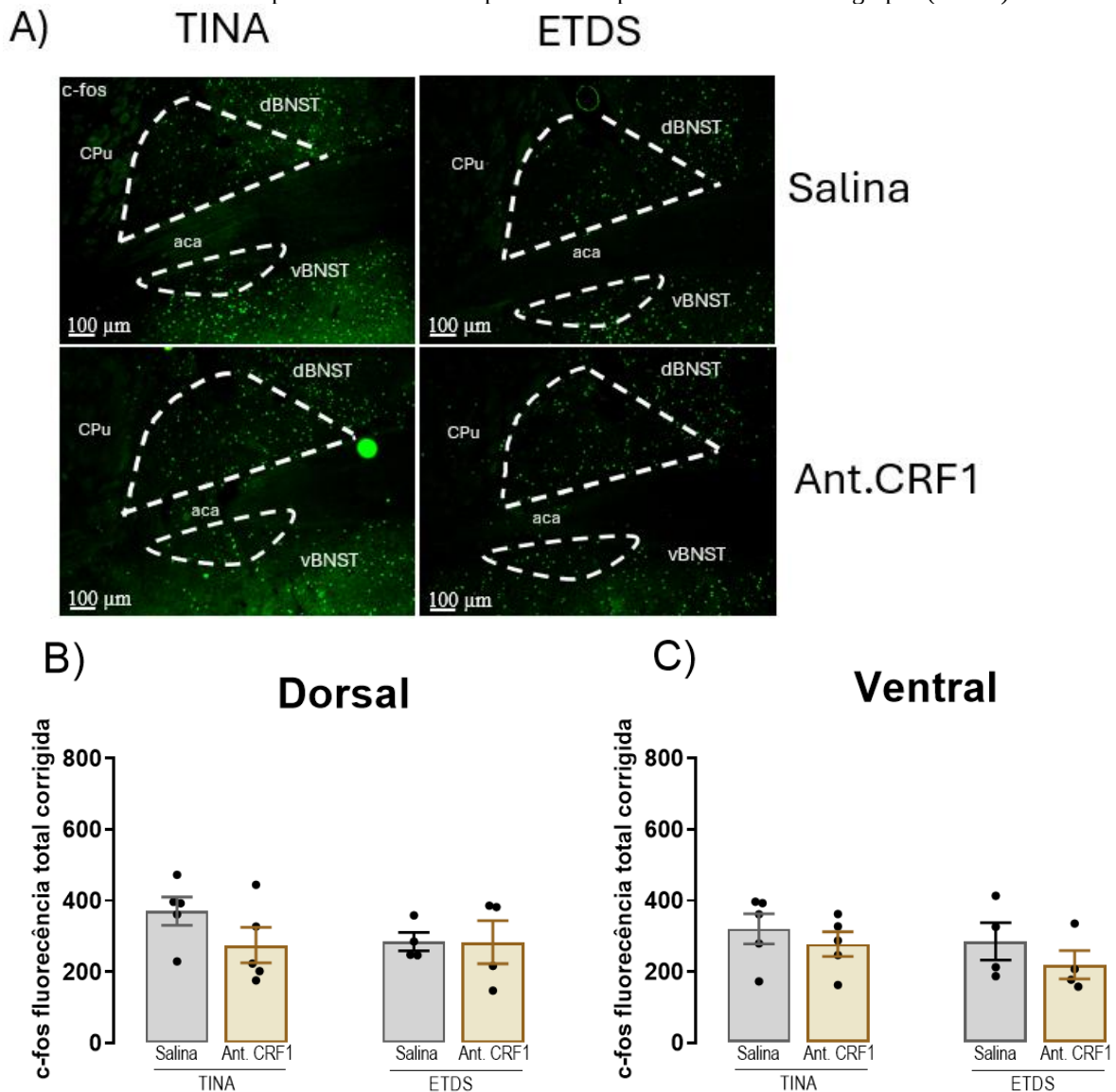
A ANOVA de três fatores para medidas repetidas não indicou interação entre condição (TINA e ETDS), tratamento (salina e 20 mg/kg) nem hemisférios (lado esquerdo e direito) ($F_{(1,13)} = 0,255$ $p = 0,621$). A análise não indicou uma diferença significativa da condição ($F_{(1,13)} = 0,056$, $p = 0,146$), nem um efeito dos hemisférios ($F_{(1,13)} = 0,561$, $p = 0,467$) e tampouco o fator tratamento mostrou diferenças significativas ($F_{(1,13)} = 1,691$, $p = 0,216$). Não se apresentou uma interação entre os hemisférios e a condição ($F_{(1,13)} = 0,029$, $p = 0,865$), nem entre os hemisférios e o tratamento ($F_{(1,13)} = 0,658$, $p = 0,431$). Por último, não se apresentou uma interação entre a condição e o tratamento ($F_{(1,13)} = 1,691$ $p = 0,261$) (Figura 11c).

Figura 11- A) Fotomicrografias, ampliadas 20 vezes (barra de escala = 100 μ m) que ilustram de maneira representativa a marcação neuronal positiva para c-Fos no BNST ventral (vBNST) e BNST dorsal (dBNST) direto em camundongos fêmeas submetidos ao ETDS e tratados com antagonista do receptor do tipo 1 do CRF CP376395. B) Impacto do Estresse de Testemunha de Derrota Social (ETDS) e o tratamento com CP376395 na Fluorescência Celular Total Corrigida (CTCF) no dBNST em camundongos fêmeas. Tamanho das amostras: TINA/salina=4, TINA/ CP376396=4, ETDS/salina=5, ETDS/ CP376396=5. # $p \leq 0.05$ diferença na Fluorescência Celular Total Corrigida (CTCF) dependente do tratamento com CP376396. As barras representam a média e pontos de dispersão de cada um dos grupos ($\pm$ EPM). Fonte: Elaboração própria C) Impacto do Estresse de Testemunha de Derrota Social (ETDS) e o tratamento com CP376395 na Fluorescência Celular Total Corrigida (CTCF) no vBNST em camundongos fêmeas. Tamanho das amostras: TINA/salina=4, TINA/ CP376396=4, ETDS/salina=5, ETDS/ CP376396=5. * $p \leq 0.05$ diferença na Fluorescência Celular Total Corrigida (CTCF) dependente do tratamento e a condição. As barras representam a média e pontos de dispersão de cada um dos grupos ($\pm$ EPM)



Fonte: Elaboração própria

Figura 12- A) Fotomicrografias, ampliadas 20 vezes (barra de escala = 100 μ m) que ilustram de maneira representativa a marcação neuronal positiva para c-fos no BNST ventral (vBNST) e BNST dorsal (dBNST) direito em camundongos **machos** submetidos ao ETDS e tratados com antagonista do receptor do tipo 1 do CRF CP376395. B) Impacto do Estresse de Testemunha de Derrota Social (ETDS) e o tratamento com CP376395 na Fluorescência Celular Total Corrigida (CTCF) no dBNST em camundongos machos. Tamanho das amostras: TINA/salina=5, TINA/ CP376396=5, ETDS/salina=4, ETDS/ CP376396=4. As barras representam a média e pontos de dispersão de cada um dos grupos ($\pm$ EPM). Fonte: Elaboração própria C) Impacto do Estresse de Testemunha de Derrota Social (ETDS) e o tratamento com CP376395 na Fluorescência Celular Total Corrigida (CTCF) no vBNST em camundongos fêmeas. Tamanho das amostras: TINA/salina=5, TINA/ CP376396=5, ETDS/salina=4, ETDS/ CP376396=4. As barras representam a média e pontos de dispersão de cada um dos grupos ($\pm$ EPM).



Fonte: Elaboração própria.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que o estresse de testemunho da derrota social induz comportamentos relacionados a ansiedade dependente do sexo, identificados pela diminuição da exploração dos braços abertos do LCE. Os efeitos da exposição a estresse crônico foram revertidos com a administração sistêmica do antagonista de CRF1. Consequentemente, o mesmo tratamento reverteu o aumento da expressão de c-Fos induzida pelo estresse na porção ventral do BNST.

Inicialmente, nossos resultados não indicam diferenças significativas no comportamento social entre machos e fêmeas, independentemente da condição experimental. Ainda assim, seguindo os critérios estabelecidos na literatura (Golden, 2011), quando as fêmeas foram classificadas de acordo com o seu perfil fenotípico (i.e., resilientes e suscetíveis), as suscetíveis apresentaram tempo menor na zona de interação quando comparados com os grupos resiliente e TINA. Estes resultados sugerem que o ETDS gerou um comportamento de evitação social observado somente nas fêmeas. Esta conclusão torna-se mais evidente quando observamos nas análises relacionadas às respostas de ansiedade avaliadas no LCE em que a condição de testemunha da derrota social foi capaz de induzir aumento de respostas relacionadas à ansiedade apenas nas fêmeas. Além disso, a administração sistêmica do antagonista dos receptores do tipo 1 do fator liberador de corticotropina (CP 376395) reverteu estes efeitos. Consequentemente, foi observada maior expressão da proteína c-Fos nas fêmeas na porção ventral do BNST quando comparada com os animais que foram tratados com o antagonista ou passaram pela interação não agressiva. Adicionalmente, foi observado menor expressão da proteína c-Fos na porção dorsal nas fêmeas que foram tratadas com o antagonista CRF1 (CP 376395).

A análise dos dados mostrou um efeito significativo da presença do alvo no tempo na ZI, indicando que, independentemente da condição, a presença do alvo afeta significativamente o tempo que os camundongos passam na zona de interação. Os camundongos passam mais tempo

na ZI quando o alvo está presente, sugerindo que o estresse crônico por testemunhar a derrota social não diminui o comportamento social em um sentido geral. Esses achados contrastam com alguns estudos que relataram que o estresse crônico pode reduzir o comportamento social em roedores. Por exemplo, Yoshioka *et al.* (2022) demonstraram que camundongos machos C57BL/6J, adultos, que testemunharam derrotas sociais apresentaram evitação social. De forma semelhante, Iniguez *et al.* (2018) reportaram diminuição na interação social em camundongos fêmeas adultas C57BL/6 que testemunharam a derrota de um coespecífico macho.

Uma possível explicação para essa discrepância, quando comparado com outros estudos, poderia ser a natureza do paradigma de estresse utilizado. O estresse de testemunha de derrota social, embora seja um modelo válido de estresse crônico, pode não induzir o mesmo nível de alteração emocional na variação do modelo que foi usada. Outros modelos que implicam uma exposição maior a estímulos aversivos podem gerar comportamentos de ansiedade mais robustos. Neste sentido, um exemplo pode ser observado em Warren *et al.* (2013), que avaliaram o efeito da exposição a testemunha de derrota social na interação social, além de outros comportamentos de ansiedade. No trabalho de Warren *et al.* (2013), o camundongo testemunha, que está separado por um divisor perfurado, presencia o confronto sem ser agredido diretamente, mas após cada sessão de derrota, o camundongo testemunha é alojado com o agressor durante 24 horas, separado por um divisor, e esse processo se repete por 10 dias consecutivos. Esta exposição crônica gerou uma diminuição da interação social que perdurou até um mês após a última exposição ao estresse crônico. Neste sentido, sugerimos que a variação do protocolo do ETDS apresentada em nosso estudo pode não ter sido suficientemente intensa para gerar comportamentos relacionados à ansiedade nos machos, comparada com outras que implicam uma exposição prolongada da testemunha a estímulos estressores como os residentes. Contudo, nossos resultados estão em linha com outros estudos que sugerem que o estresse social não altera o comportamento social dos roedores machos (Franklin *et al.*, 2011; Ognibene *et al.*, 2008).

Por outro lado, se nos basearmos no estudo reportado por Golden (2011), a classificação dos animais fêmeas em fenótipos parece propor uma perspectiva diferente da interpretação dos

efeitos do estresse crônico no contexto da interação social nas fêmeas. Da mesma forma que é apresentado pela literatura, os animais expostos ao estresse crônico e que mostraram fenótipo suscetível apresentaram menor interação comparado com os resilientes (Beery; Kaufel, 2014). Um dado interessante é o fato de que os camundongos fêmeas apresentaram interação maior até que os controles. Provavelmente, isso pode ser explicado pela inoculação do estresse. A inoculação do estresse é um fenômeno no qual os sujeitos expostos a estressores moderados podem responder mais favoravelmente aos eventos estressores, relacionados a uma maior resiliência (Lyons; Parker, 2007). Se assim, a exposição ao estresse por testemunha da derrota parece se configurar numa forma de estresse moderado, permitindo a geração de resiliência em alguns camundongos nos contextos de interação social com animais residentes.

Em relação ao LCE, a análise de dados sugere que nem as fêmeas e nem os machos apresentam uma diferença significativa nas entradas nos braços fechados, independente da condição ou tratamento. Adicionalmente, em relação a %EBA, a análise de dados mostrou efeito significativo do tratamento sobre a porcentagem de entradas nos braços abertos nas fêmeas, onde as fêmeas tratadas com CP376395 apresentaram aumento em relação ao grupo salina. Além disso, na %TBA observou-se tanto o efeito do estresse como do tratamento. Ou seja, as fêmeas expostas ao ETDS e tratadas com o antagonista CRF1 apresentaram aumento significativo no %TBA em comparação com as tratadas com solução salina, indicando que o antagonista CRF1 atenuou a ansiedade induzida pelo estresse crônico. Esse aumento na porcentagem de tempo e na porcentagem de entradas no braço aberto sugere uma redução no comportamento ansioso, o que está em linha com estudos anteriores (Fulenwider *et al.*, 2021; Koob, 2010; Mantsch *et al.*, 2016), nos quais o antagonista reduziu a ingestão de álcool induzida pela ansiedade, embora no referido trabalho o estudo tenha sido realizado apenas em machos.

Por outro lado, nos machos, a exposição ao ETDS não apontou diferenças significativas com o grupo salina, indicando que os efeitos do estresse crônico são variáveis nos machos. Esses resultados contrastam com os de Warren *et al.* (2013), que observaram diminuição no tempo e no número de entradas nos braços abertos em machos expostos ao estresse crônico, neste caso, por derrota social direta. Assim, nossos resultados são sugestivos de que testemunhar a derrota, conforme proposto em nosso protocolo, pode não gerar comportamentos ansiosos nos camundongos machos. Ainda neste contexto, o antagonista do CRF1 não apresentou impacto

significativo nos comportamentos relacionados à ansiedade, independentemente da condição experimental. Tanto na %TBA quanto na %EBA, não foram observadas diferenças significativas entre os animais tratados com salina e aqueles tratados com o antagonista CRF1, sugerindo que nem o tratamento farmacológico nem a exposição ao ETDS crônico afetou significativamente a ansiedade avaliada no LCE.

Esses achados parecem divergir daqueles obtidos por Nipper *et al.* (2024), em que foi observada uma redução significativa na ingestão de etanol produzida por exposição ao estresse crônico em camundongos tratados com a dose de 20 mg/kg do CP 376395, sugerindo um efeito do antagonista em reduzir os efeitos do estresse crônico por isolamento em machos e em fêmeas. A variabilidade nos efeitos dos antagonistas do CRF1, observada neste estudo e em outros contextos (Spierling; Zorrilla, 2017), levanta questões sobre as variáveis que podem influenciar nas respostas relacionadas ao estresse, como o tipo, a dose de fármaco, o sexo e o fenótipo dos sujeitos, que podem exercer efeitos diferentes aos esperados. Por exemplo, Walker *et al.* (2009) sugeriram que os antagonistas de CRF1 exacerbam as respostas de sobressalto acústico potencializadas pelo medo em ratos. Futuros estudos poderiam estudar os efeitos na administração do antagonista CP 376395 em animais expostos a diferentes variações do modelo de testemunha de derrota social para analisar os efeitos do estresse crônico de tipo psicossocial nos diferentes fenótipos em machos e fêmeas.

É importante ressaltar o fato de que, ainda que os animais tenham sido distribuídos por fenótipos para o teste de interação não agressiva (TIS), os animais que foram resilientes e suscetíveis foram distribuídos aleatoriamente na administração do fármaco e posterior medição no LCE. Diferentes estudos têm mostrado que, nos modelos de estresse por derrota social, os fenótipos suscetíveis e resilientes apresentam respostas diferenciadas em diversos testes comportamentais. No teste de interação social, os camundongos suscetíveis exibem uma marcante evitação social, enquanto os resilientes não apresentam esse déficit, evidenciando resistência ao estresse nesse domínio. No labirinto em cruz elevado, ambos os fenótipos mostram um aumento no comportamento de ansiedade, indicando uma maior reatividade ansiosa generalizada. De forma semelhante, tanto os suscetíveis quanto os resilientes apresentam um aumento na polidipsia induzida por estresse e na liberação de corticosterona no teste de natação forçada, refletindo uma ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal em resposta ao estresse

(Krishnan *et al.*, 2007; Lutter *et al.*, 2008; Lutter *et al.*, 2008b; Golden, 2011). Futuros estudos poderiam avaliar as possíveis diferenças comportamentais baseadas nos fenótipos nos animais que recebam o tratamento com o antagonista do fator liberador de corticotropina CP 376395.

Nossos resultados da imunofluorescência apontam para diferença significativa na expressão de c-Fos unicamente nas fêmeas na porção ventral do BNST, quando comparada com os animais que foram tratados com o antagonista ou passaram pela interação não agressiva. Do mesmo jeito, foi observado menor expressão da proteína c-Fos na porção dorsal nas fêmeas que foram tratadas com o CP 376395, um efeito que se mostra relevante, porque sugere mudanças na ativação das porções do BNST como resultado da exposição ao estresse crônico.

O estudo diferencial das áreas do BNST é de especial importância, já que o vBNST e o dBNST diferenciam-se em suas conexões neuroquímicas e funções específicas. O vBNST, composto predominantemente por neurônios GABAérgicos, contém também algumas células glutamatérgicas e recebe projeções noradrenérgicas significativas dos grupos A1 e A2 do núcleo do trato solitário, além de projeções serotoninérgicas do núcleo dorsal da rafe (Boucher *et al.*, 2021; Phelix *et al.*, 1992; Meloni *et al.*, 2006). Adicionalmente, o vBNST está mais associado com respostas relacionadas à ansiedade (Dong *et al.*, 2001; Mahler; Aston-Jones, 2012). Por outro lado, o dBNST está caracterizado por receber profusas entradas dopaminérgicas da área tegmental ventral (VTA) e da matéria cinzenta periaquedutal (Kim *et al.*, 2013), e sua ativação está associada a comportamentos de busca e aprendizagem pavloviana (Giardino *et al.*, 2018; Marino *et al.*, 2020). Nossos resultados vão em linha com diferentes estudos em que foi demonstrado aumento na expressão da proteína c-Fos como resultado da exposição aguda a um estressor. Por exemplo, Butler *et al.* (2016) sugeriram que um estressor agudo pode impactar de maneira diferente os neurônios CRFérgicos em várias sub-regiões do BNST. Estes autores demonstraram que a exposição ao odor de predador levou ao aumento significativo na porcentagem de neurônios CRF positivos para c-Fos no vBNST, mas não no BNST dorsolateral (dlBNST) ou no dorsomedial (dmBNST) de ratos machos. Adicionalmente, a exposição ao LCE, como outro estressor agudo, levou ao aumento geral na densidade de c-Fos em todas as sub-regiões do BNST, sendo significativo na porcentagem de neurônios CRF positivos para c-Fos no vBNST e no dmBNST, mas não no dlBNST. Esses resultados sugerem que diferentes estressores

agudos poderiam ativar diferencialmente os neurônios CRF em várias sub-regiões do BNST (Butler *et al.*, 2016).

Além disso, nossos resultados indicam que, assim como um estressor agudo, o estresse crônico pode afetar a expressão de c-Fos. Ainda assim, outros estudos sugerem que este aumento pode se apresentar antes da exposição ao estressor agudo. Por exemplo, Ventura *et al.* (2012) usaram o estresse crônico imprevisível (ECI) para investigar as mudanças relacionadas ao CRF nos subnúcleos do dmBNST e BNST fusiforme (fuBNST) em ratos. Utilizando o ECI, esses autores identificaram que esta exposição ao estresse aumenta a ativação de c-Fos no fuBNST, mas esses efeitos se apresentaram também em um estado basal anterior à exposição de um estressor agudo, como, neste caso, sobressalto acústico. De modo semelhante, o efeito do estresse crônico sobre a ativação do BNST já tem sido demonstrado no nosso laboratório, onde animais expostos ao protocolo de estresse por derrota social apresentaram aumento na expressão de Δ FosB no BNST (Da Costa *et al.*, 2023).

Em síntese, baseado nos nossos resultados, foi observada uma diferença sexual nas respostas de ansiedade desencadeado pela exposição ao estresse crônico, conforme apresentado em nossa hipótese. Ainda assim, diferente do esperado, no nosso estudo, o efeito ansiogênico do ETDS foi observado somente nas fêmeas, contudo, vale destacar que este efeito foi atenuado pelo tratamento com o antagonista de CRF1 CP376395. Ainda, nossos resultados não evidenciaram que o ETDS afeta a resposta emocional de camundongos machos expostos ao LCE, dificultando a análise do potencial efeito ansiolítico do tratamento com o antagonista CRF1 e tampouco o efeito na ativação neuronal das diferentes subáreas do BNST.

Nesse sentido, as diferenças nos sistemas de CRF poderiam fundamentar as razões para esse resultado. Estudos que avaliam o efeito de estressores crônicos concluíram que existem diferenças nas respostas entre machos e fêmeas (Borrow *et al.*, 2018). Um exemplo pode ser visto em Palanza (2001), que avaliou o efeito das diferenças nas características de alojamento entre machos e fêmeas. O estudo concluiu que as fêmeas alojadas individualmente exibiram comportamentos indicativos de maior ansiedade e redução na exploração quando foram testadas no campo aberto. Essas fêmeas mostraram maior latência para entrar em uma nova área, níveis

mais altos de avaliação de risco, menos tempo dedicado à exploração e menor atividade locomotora em comparação com as fêmeas alojadas em grupo. Em contraste, os machos alojados individualmente mostraram maior propensão a explorar novas áreas e mais tempo dedicado à exploração em comparação com os machos alojados em grupo. É provável que as diferenças nas respostas ao estresse se apresentem devido ao fato de que as fêmeas tendem a ter níveis mais altos de corticosterona no plasma em comparação aos machos, e a ativação do eixo HPA induzida pelo estresse é maior em fêmeas do que em machos (Atkinson; Waddell, 1997). Além disso, as fêmeas têm maior sensibilidade ao CRF em regiões cerebrais-chave, como o locus coeruleus, o que pode contribuir para um estado de aumento da vigilância e maior predisposição a transtornos relacionados ao estresse, como aqueles relacionados à ansiedade (Nolen-Hoeksema *et al.*, 1999; Bates *et al.*, 2023).

As fêmeas, ao contrário dos machos, têm maior densidade e distribuição diferente dos receptores CRF1 em várias regiões cerebrais associadas à ansiedade, como a amígdala e o BNST (Sterrenburg *et al.*, 2012). Da mesma forma, foi demonstrado que, em fêmeas adultas, a ligação do CRF aos receptores de tipo 1 é significativamente maior nos núcleos basolateral e posterior da amígdala em comparação com os machos (Weathington; Hamki; Cooke, 2014). Além disso, as fêmeas também mostram diferenças na sinalização dos receptores CRF1. Por exemplo, os receptores CRF1 em fêmeas tendem a estar mais acoplados a proteínas Gs em comparação com os machos, o que aumenta a ativação de cascatas intracelulares que promovem respostas de ansiedade (Bangasser *et al.*, 2010). Essa maior sensibilidade pode fazer com que as fêmeas sejam mais suscetíveis ao desenvolvimento de comportamentos ansiosos sob estresse crônico e, por sua vez, sejam mais suscetíveis aos efeitos dos antagonistas de CRF1 (Bangasser, 2013).

6. CONCLUSÕES

O presente estudo indica que há diferenças dependentes do sexo nas respostas comportamentais relacionadas à ansiedade frente a exposição a estresse crônico, assim como diferenças na ativação do BNST como resultado deste. Concluimos que as fêmeas, mas não os machos, são mais sensíveis ao ETDS, caracterizado pelo comportamento do tipo ansiogênico no LCE. Além disso, nossos dados indicam que os receptores de CRF1 da porção ventral do BNST estejam modulando este comportamento. Assim, os dados mostraram que a exposição ao nosso modelo foi capaz de aumentar a ansiedade em camundongos fêmeas expostas ao LCE, evidenciada sobretudo pela diminuição da exploração dos braços abertos do aparato. O tratamento com antagonista CRF1 (CP 376395) foi capaz de atenuar o efeito ansiogênico exercido pela testemunha da derrota social, aumentando as porcentagens de entradas e de tempo nos braços abertos, um efeito observado somente em fêmeas. Adicionalmente, foi demonstrado que a neurotransmissão CRFérgica desempenha um papel crítico na modulação da ansiedade induzida pelo estresse social neste sexo. Essas conclusões destacam a importância do sexo na resposta ao estresse social e ao tratamento, sugerindo que os efeitos da administração sistêmica do antagonista CP 376395 podem variar conforme o sexo e o contexto experimental. De igual maneira, demonstra que a exposição ao estresse crônico poderia modular a ativação do BNST de modo distinto e dependente do sexo.

7. PERSPECTIVAS

Os resultados deste estudo ressaltam a relevância do sexo como um fator crítico na resposta ao ETDS e ao tratamento com antagonistas de CRF1. A diferença notável na resposta ansiosa entre machos e fêmeas, assim como a eficácia seletiva do antagonista de CRF1 em fêmeas, sugerem que estudos futuros devem considerar o sexo como fator-chave nos efeitos do estresse e dos fármacos relacionados, assim como na interpretação dos resultados. Essa abordagem pode contribuir para o desenvolvimento de tratamentos eficazes para distúrbios relacionados ao estresse, considerando as diferenças biológicas entre os sexos. Além disso, dado que o ETDS não mostrou um impacto significativo no comportamento social neste estudo, seria valioso explorar outros paradigmas de estresse que poderiam afetar de maneira mais notável a interação social. Isso permitiria identificar condições específicas sob as quais o estresse tem um efeito mais pronunciado, o que poderia ser relevante para entender melhor as manifestações de distúrbios de ansiedade social.

O antagonista de CRF1 utilizado mostrou um claro efeito ansiolítico nas fêmeas sem afetar a locomoção, destacando seu potencial como tratamento farmacológico para transtornos de ansiedade. Estudos futuros poderiam explorar os efeitos a longo prazo deste tratamento ou investigar se estes efeitos mudam de acordo com os fenótipos. Além disso, seria interessante investigar se esses efeitos se reproduzem em outros modelos de estresse ou em estudos clínicos, especialmente em mulheres, dada a sua maior vulnerabilidade ao estresse crônico apresentado neste estudo.

REFERÊNCIAS

- AGUILAR-DELGADILLO, A. *et al.* Stress-induced c-fos expression in the medial prefrontal cortex differentially affects the main residing cell phenotypes. **Heliyon**, 2024, v. 10, n. 20.
- AGUILERA, G. *et al.* Regulation of adrenal steroidogenesis during chronic stress. **Endocrine Research**, v. 22, n. 4, p. 433-443, 1996.
- ALLEN, L. S. *et al.* Two sexually dimorphic cell groups in the human brain. **Journal of Neuroscience**, v. 9, n. 2, p. 497-506, 1989.
- ALMEIDA, D. M. Resilience and vulnerability to daily stressors assessed via diary methods. **Current Directions in Psychological Science**, v. 14, n. 2, p. 64-68, 2005.
- ALMEIDA, S. S. de; DE OLIVEIRA, L. M.; GRAEFF, F. G. Early life protein malnutrition changes exploration of the elevated plus-maze and reactivity to anxiolytics. **Psychopharmacology**, v. 103, p. 513-518, 1991.
- 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, 2014.
- ANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. **Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 327, n. 1, p. 1-5, 1984.
- ANDRADE, L. H. S. G.; GORENSTEIN, C. Aspectos gerais das escalas de avaliação de ansiedade. **Revista de Psiquiatria Clínica (São Paulo)**, p. 285-90, 1998.
- ANDRADE, T. G. C. S. *et al.* Anxiolytic-like effects of median raphe nucleus lesion in the elevated T-maze. **Behavioural Brain Research**, v. 153, n. 1, p. 55-60, 2004.
- ATKINSON, H. C.; WADDELL, B. J. Circadian variation in basal plasma corticosterone and adrenocorticotropin in the rat: sexual dimorphism and changes across the estrous cycle. **Endocrinology**, v. 138, n. 9, p. 3842-3848, 1997.
- AUDI, E. A.; DE OLIVEIRA, R. M. W.; GRAEFF, F. G. Microinjection of propranolol into the dorsal periaqueductal gray causes an anxiolytic effect in the elevated plus-maze antagonized by ritanserin. **Psychopharmacology**, v. 105, p. 553-557, 1991.
- AVERY, S. N.; CLAUSS, J. A.; BLACKFORD, J. U. The human BNST: functional role in anxiety and addiction. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 1, p. 126-141, 2016.
- BANDELOW, B.; MICHAELIS, S.; WEDEKIND, D. Treatment of anxiety disorders. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 19, n. 2, p. 93-107. 2017.
- BANGASSER, D. A. *et al.* Sex differences in corticotropin-releasing factor receptor signaling and trafficking: potential role in female vulnerability to stress-related psychopathology. **Molecular Psychiatry**, v. 15, n. 9, p. 896-904, 2010.
- BANGASSER, D. A. Sex differences in stress-related receptors: "micro" differences with "macro" implications for mood and anxiety disorders. **Biology of Sex Differences**, v. 4, p. 1-13, 2013.

- BANGASSER, D. A.; VALENTINO, R. J. Sex differences in molecular and cellular substrates of stress. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 32, p. 709-723, 2012.
- BATES, M. L. S. *et al.* Sex-specific alterations in corticotropin-releasing factor regulation of coerulear-cortical network activity. **Neuropharmacology**, v. 223, p. 109317, 2023.
- BEERY, A. K.; KAUFER, D. Stress, social behavior, and resilience: insights from rodents. **Neurobiology of Stress**, v. 1, p. 116-127, 2015.
- BERTON, O. *et al.* Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. **Science**, v. 311, n. 5762, p. 864-868, 2006.
- BJÖRKQVIST, K. Social defeat as a stressor in humans. **Physiology & Behavior**, v. 73, n. 3, p. 435-442, 2001.
- BORROW, A. P. *et al.* Chronic variable stress induces sex-specific alterations in social behavior and neuropeptide expression in the mouse. **Endocrinology**, v. 159, n. 7, p. 2803-2814, 2018.
- BOUCHER, M. N. *et al.* Activation of lateral parabrachial nucleus (LPBn) PACAP-expressing projection neurons to the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) enhances anxiety-like behavior. **Journal of Molecular Neuroscience**, p. 1-8, 2022.
- BRYCE, C. A.; FLORESCO, S. B. Perturbations in effort-related decision-making driven by acute stress and corticotropin-releasing factor. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 8, p. 2147-2159, 2016.
- BUTLER, R. K. *et al.* Activation of corticotropin releasing factor-containing neurons in the rat central amygdala and bed nucleus of the stria terminalis following exposure to two different anxiogenic stressors. **Behavioural Brain Research**, v. 304, p. 92-101, 2016.
- CARNEVALI, L. *et al.* The contagion of social defeat stress: Insights from rodent studies. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 111, p. 12-18, 2020.
- CELIS, C. A.; MARTÍNEZ, D. P.; CONDE, C. A. La primera entrada en el laberinto en cruz elevado como predictor del nivel de ansiedad. **Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud**, v. 42, n. 3, p. 220-228, 2010.
- CHEN, J.-X.; TANG, Y.-T.; YANG, J.-X. Changes of glucocorticoid receptor and levels of CRF mRNA, POMC mRNA in brain of chronic immobilization stress rats. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 28, p. 237-244, 2008.
- CHROUSOS, G. P. Stress and disorders of the stress system. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 5, n. 7, p. 374-381, 2009.
- CIPPITELLI, A. *et al.* Pharmacological blockade of corticotropin-releasing hormone receptor 1 (CRH1R) reduces voluntary consumption of high alcohol concentrations in non-dependent Wistar rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 100, n. 3, p. 522-529, 2012.
- DONG, H.-W.; SWANSON, L. W. Organization of axonal projections from the anterolateral area of the bed nuclei of the stria terminalis. **Journal of Comparative Neurology**, v. 468, n. 2, p. 277-298, 2004.

- DONG, Hong-Wei; SWANSON, Larry W. Organization of axonal projections from the anterolateral area of the bed nuclei of the stria terminalis. **Journal of Comparative Neurology**, v. 468, n. 2, p. 277-298, 2004.
- DONNER, N. C.; LOWRY, C. A. Sex differences in anxiety and emotional behavior. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 465, p. 601-626, 2013.
- DUVAL, F.; GONZÁLEZ, F.; RABIA, H. Neurobiología del estrés. **Revista chilena de neuro-psiquiatría**, v. 48, n. 4, p. 307-318, 2010.
- DUVAL, H. *et al.* Reperfusion stress induced during intermittent selective clamping accelerates rat liver regeneration through JNK pathway. **Journal of Hepatology**, v. 52, n. 4, p. 560-569, 2010.
- EMERY, D. E.; SACHS, B. D. Copulatory behavior in male rats with lesions in the bed nucleus of the stria terminalis. **Physiology & Behavior**, v. 17, n. 5, p. 803-806, 1976.
- FARIA, M. P. O bloqueio dos receptores NMDA ou CRF1 no núcleo intersticial da estria terminal impede a ansiogênese induzida pela ativação nitrérgica do córtex pré-frontal medial e derrota social em camundongos. 2019.
- 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, 2020.
- FRANKLIN, T. B. *et al.* Influence of early stress on social abilities and serotonergic functions across generations in mice. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. e21842, 2011.
- FRANKLIN, T. B.; SAAB, B. J.; MANSUY, I. M. Neural mechanisms of stress resilience and vulnerability. **Neuron**, v. 75, n. 5, p. 747-761, 2012.
- FRESCAS, D.; VALENTI, L.; ACCILI, D. Nuclear trapping of the forkhead transcription factor FoxO1 via Sirt-dependent deacetylation promotes expression of glucogenetic genes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 21, p. 20589-20595, 2005.
- FRIEDMANN, B.; KINDERMANN, W. Energy metabolism and regulatory hormones in women and men during endurance exercise. **European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology**, v. 59, n. 1, p. 1-9, 1989.
- 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.
- FUNABASHI, T. *et al.* Exposure to bisphenol A during gestation and lactation causes loss of sex difference in corticotropin-releasing hormone-immunoreactive neurons in the bed nucleus of the stria terminalis of rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 29, n. 4, p. 475-485, 2004.
- GEHLERT, D. R. *et al.* Stress and central Urocortin increase anxiety-like behavior in the social interaction test via the CRF1 receptor. **European Journal of Pharmacology**, v. 509, n. 2-3, p. 145-153, 2005.

GIARDINO, W. J. *et al.* Control of chronic excessive alcohol drinking by genetic manipulation of the Edinger-Westphal nucleus urocortin-1 neuropeptide system. **Translational Psychiatry**, v. 7, n. 1, p. e1021-e1021, 2017.

GIARDINO, W. J. *et al.* Dissociation of corticotropin-releasing factor receptor subtype involvement in sensitivity to locomotor effects of methamphetamine and cocaine. **Psychopharmacology**, v. 219, p. 1055-1063, 2012.

GIARDINO, W. J. *et al.* Parallel circuits from the bed nuclei of stria terminalis to the lateral hypothalamus drive opposing emotional states. **Nature Neuroscience**, v. 21, n. 8, p. 1084-1095, 2018.

GIARDINO, W. J.; RYABININ, A. E. CRF1 receptor signaling regulates food and fluid intake in the drinking-in-the-dark model of binge alcohol consumption. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 37, n. 7, p. 1161-1170, 2013.

GILPIN, N. W.; RICHARDSON, H. N.; KOOB, G. F. Effects of CRF1-receptor and opioid-receptor antagonists on dependence-induced increases in alcohol drinking by alcohol-preferring (P) rats. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 32, n. 9, p. 1535-1542, 2008.

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

GOMES *et al.* Fos-like immunoreactivity in central nervous system of mice simultaneously exposed to the elevated plus-maze and nociception. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, p. 385-391, 2005.

GRIEBEL, G. *et al.* 4-(2-Chloro-4-methoxy-5-methylphenyl)-N-[(1S)-2-cyclopropyl-1-(3-fluoro-4-methylphenyl) ethyl] 5-methyl-N-(2-propynyl)-1,3-thiazol-2-amine hydrochloride (SSR125543A), a potent and selective corticotropin-releasing factor1 receptor antagonist. II. Characterization in rodent models of stress-related disorders. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 301, n. 1, p. 333-345, 2002.

HAN, X.; DEBOLD, J. F.; MICZEK, K. A. Prevention and reversal of social stress-escalated cocaine self-administration in mice by intra-VTA CRFR1 antagonism. **Psychopharmacology**, v. 234, p. 2813-2821, 2017.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 327, p. 1-5, 1984.

HARIRI, A. R.; HOLMES, A. Finding translation in stress research. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 10, p. 1347-1352, 2015..

HÄRTER, M. C.; CONWAY, K. P.; MERIKANGAS, K. R. Associations between anxiety disorders and physical illness. **Euro. Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience**, v. 253, n. 6, p. 313-320, 2003.

HEINRICHS, S. C. *et al.* The role of CRF in behavioral aspects of stress. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 771, p. 92-104, 1995.

HEINSBROEK, R. P. W. *et al.* Sex-and time-dependent changes in neurochemical and hormonal variables induced by predictable and unpredictable footshock. **Physiology & Behavior**, v. 49, n. 6, p. 1251-1256, 1991.

HERMAN, J. P. *et al.* Neural regulation of the stress response: glucocorticoid feedback mechanisms. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 2012, v. 45, p. 292-298.

HETTEMA, J. M. *et al.* The structure of genetic and environmental risk factors for anxiety disorders in men and women. **Archives of General Psychiatry**, v. 62, n. 2, p. 182-189, 2005.

HINES, M. *et al.* Sexually dimorphic regions in the medial preoptic area and the bed nucleus of the stria terminalis of the guinea pig brain: a description and an investigation of their relationship to gonadal steroids in adulthood. **Journal of Neuroscience**, v. 5, n. 1, p. 40-47, 1985.

HODES, G. E. *et al.* Individual differences in the peripheral immune system promote resilience versus susceptibility to social stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 45, p. 16136-16141, 2014.

HOLSBOER, F.; ISING, M. Stress hormone regulation: biological role and translation into therapy. **Annual Review of Psychology**, v. 61, n. 1, p. 81-109, 2010.

HUPALO, S. *et al.* Corticotropin-Releasing Factor (CRF) circuit modulation of cognition and motivation. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 103, p. 50-59, 2019.

HWA, L. S. *et al.* Dissociation of μ -opioid receptor and CRF-R 1 antagonist effects on escalated ethanol consumption and mPFC serotonin in C 57 BL/6 J mice. **Addiction Biology**, v. 21, n. 1, p. 111-124, 2016.

IÑIGUEZ, S. D. *et al.* Vicarious social defeat stress induces depression-related outcomes in female mice. **Biological Psychiatry**, v. 83, n. 1, p. 9-17, 2018.

JANSSON-FRÖJMARK, M. *et al.* Psychometric properties of an insomnia-specific measure of worry: the anxiety and preoccupation about sleep questionnaire. **Cognitive Behaviour Therapy**, v. 40, n. 1, p. 65-76, 2011.

JURUENA, M. F. *et al.* The role of early life stress in HPA axis and anxiety. **Anxiety Disorders: Rethinking and Understanding Recent Discoveries**, p. 141-153, 2020.

KANWAR, A. *et al.* The association between anxiety disorders and suicidal behaviors: A systematic review and meta-analysis. **Depression and Anxiety**, v. 30, n. 10, p. 917-929, 2013.

KENDLER, K. S. *et al.* The structure of genetic and environmental risk factors for common psychiatric and substance use disorders in men and women. **Archives of General Psychiatry**, v. 60, n. 9, p. 929-937, 2003.

KINRYS, G.; WYGANT, L. E. Anxiety disorders in women: does gender matter to treatment? **Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 27, p. s43-s50, 2005.

KIRSCHBAUM, C.; WÜST, S.; HELLHAMMER, D. Consistent sex differences in cortisol responses to psychological stress. **Psychosomatic Medicine**, v. 54, n. 6, p. 648-657, 1992.

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, 2000.

KOMPAGNE, H. *et al.* Chronic mild stress generates clear depressive but ambiguous anxiety-like behaviour in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 193, n. 2, p. 311-314, 2008.

KOOB, G. F. The role of CRF and CRF-related peptides in the dark side of addiction. **Brain Research**, v. 1314, p. 3-14, 2010.

KOVÁCS, K. J. Invited review c-Fos as a transcription factor: a stressful (re) view from a functional map. **Neurochemistry International**, 1998, v. 33, n. 4, p. 287-297.

KRISHNAN, V. *et al.* Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. **Cell**, v. 131, n. 2, p. 391-404, 2007.

LEZAK, K. R. *et al.* Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) increases corticosterone in male and female rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 45, p. 11-20, 2014.

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

LIU, X. *et al.* A neural circuit from paraventricular nucleus of the thalamus to the nucleus accumbens mediates inflammatory pain in mice. **Brain and Behavior**, 2025, v. 15, n. 1, p. e70218.

LOCCI, A. *et al.* Sex differences in CRF1, CRF, and CRFBP expression in C57BL/6J mouse brain across the lifespan and in response to acute stress. **Journal of Neurochemistry**, v. 158, n. 4, p. 943-959, 2021.

LOWERY, E. G.; THIELE, T. E. Pre-clinical evidence that corticotropin-releasing factor (CRF) receptor antagonists are promising targets for pharmacological treatment of alcoholism. **CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)**, v. 9, n. 1, p. 77-86, 2010.

LOWERY-GIONTA, E. G. *et al.* Corticotropin releasing factor signaling in the central amygdala is recruited during binge-like ethanol consumption in C57BL/6J mice. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 10, p. 3405-3413, 2012.

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, 2021.

LUTTER, M. *et al.* Orexin signaling mediates the antidepressant-like effect of calorie restriction. **Journal of Neuroscience**, 2008, v. 28, n. 12, p. 3071-3075.

LUTTER, M. *et al.* The orexigenic hormone ghrelin defends against depressive symptoms of chronic stress. **Nature Neuroscience**, 2008, v. 11, n. 7, p. 752-753.

LUYCK, K. *et al.* Distinct activity patterns of the human bed nucleus of the stria terminalis and amygdala during fear learning. **Neuropsychology Review**, v. 29, p. 181-185, 2019.

LYONS, D. M.; PARKER, K. J. Stress inoculation-induced indications of resilience in monkeys. **Journal of Traumatic Stress: Official Publication of The International Society for Traumatic Stress Studies**, v. 20, n. 4, p. 423-433, 2007.

- LYONS, D. M.; PARKER, K. J.; SCHATZBERG, A. F. Animal models of early life stress: implications for understanding resilience. **Developmental Psychobiology**, v. 52, n. 5, p. 402-410, 2010.
- MAHLER, S. V.; ASTON-JONES, G. S. Fos activation of selective afferents to ventral tegmental area during cue-induced reinstatement of cocaine seeking in rats. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 38, p. 13309-13325, 2012.
- MALSBURY, C. W.; MCKAY, K. A sex difference in the pattern of substance P-like immunoreactivity in the bed nucleus of the stria terminalis. **Brain Research**, v. 420, n. 2, p. 365-370, 1987.
- MANSFIELD, J. H. *et al.* Sexual dimorphism in the accessory olfactory bulb and vomeronasal organ of the gray short-tailed opossum, *Monodelphis domestica*. In: **Chemical Signals in Vertebrates 10**, Boston, MA: Springer US, 2005. p. 283-290.
- MANTSCH, J. R. *et al.* Stress-induced reinstatement of drug seeking: 20 years of progress. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 1, p. 335-356, 2016.
- MARINO, R. A. M. *et al.* Binge ethanol drinking associated with sex-dependent plasticity of neurons in the insula that project to the bed nucleus of the stria terminalis. **Neuropharmacology**, v. 196, p. 108695, 2021.
- MATROV, D. *et al.* Activating effects of chronic variable stress in rats with different exploratory activity: association with dopamine D1 receptor function in nucleus accumbens. **Neuropsychobiology**, v. 64, n. 2, p. 110-122, 2011.
- MCEWEN, B. S. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. **Brain Research**, v. 886, n. 1-2, p. 172-189, 2000.
- MCLEAN, P. *et al.* Gender differences in anxiety disorders: prevalence, course of illness, comorbidity and burden of illness. **Journal of Psychiatric Research**, v. 45, n. 8, p. 1027-1035, 2011.
- MELONI, E. G. *et al.* Behavioral and anatomical interactions between dopamine and corticotropin-releasing factor in the rat. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 14, p. 3855-3863, 2006.
- MICZEK, K. A.; THOMPSON, M. F.; SHUSTER, L. Opioid-like analgesia in defeated mice. **Science**, v. 215, n. 4539, p. 1520-1522, 1982.
- MOBBS, D. *et al.* From threat to fear: the neural organization of defensive fear systems in humans. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 39, p. 12236-12243, 2009.
- MORRIS, D. W. Adaptive affect: the nature of anxiety and depression. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, p. 3323-3326, 2019.
- NAKATAKE, Y. *et al.* The effects of emotional stress are not identical to those of physical stress in mouse model of social defeat stress. **Neuroscience Research**, v. 158, p. 56-63, 2020.
- NAVARRETE, J. *et al.* Individual differences in volitional social self-administration and motivation in male and female mice following social stress. **Biological Psychiatry**, 2024.

NEMEROFF, C. B. *et al.* Posttraumatic stress disorder: a state-of-the-science review. **Journal of Psychiatric Research**, v. 40, n. 1, p. 1-21, 2006.

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**, 2024.

NOLEN-HOEKSEMA, S.; LARSON, J.; GRAYSON, C. Explaining the gender difference in depressive symptoms. **Journal of Personality and Social Psychology**, v. 77, n. 5, p. 1061, 1999.

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

OGLE, T. F.; KITAY, J. I. Ovarian and adrenal steroids during pregnancy and the oestrous cycle in the rat. **Journal of Endocrinology**, v. 74, n. 1, p. 89-98, 1977.

OGNIBENE, E. *et al.* The effect of early maternal separation on brain-derived neurotrophic factor and monoamine levels in adult heterozygous reeler mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 32, n. 5, p. 1269-1276, 2008

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Estatísticas Mundiais de Saúde referentes a 2020. Genebra, 20 de maio de 2022. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/noticias/20-5-2022-oms-divulga-novas-estatisticas-mundiais-saude>. Acesso em: 12 fev. 2025.

PALANZA, P. Animal models of anxiety and depression: how are females different? **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 3, p. 219-233, 2001.

PATKI, G., *et al.* High aggression in rats is associated with elevated stress, anxiety-like behavior, and altered catecholamine content in the brain. **Neuroscience Letters**, v. 584, p. 308-313, 2015.

PELLOW, S.; FILE, S. E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 24, n. 3, p. 525-529, 1986.

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**, 2016, no 110, p. 53613.

PFAU, M. L.; RUSSO, S. J. Peripheral and central mechanisms of stress resilience. **Neurobiology of Stress**, 2015, vol. 1, p. 66-79.

PHLIX, C. F.; LIPOSITS, Z.; PAULL, W. K. Monoamine innervation of bed nucleus of stria terminalis: an electron microscopic investigation. **Brain Research Bulletin**, v. 28, n. 6, p. 949-965, 1992.

RODGERS, R. J.; COLE, J. C. Anxiety enhancement in the murine elevated plus maze by immediate prior exposure to social stressors. **Physiology & Behavior**, v. 53, n. 2, p. 383-388, 1993.

- PIGOTT, T. A. Anxiety disorders in women. **Psychiatric Clinics**, v. 26, n. 3, p. 621-672, 2003.
- PIJLMAN, F. T. A.; WOLTERINK, G.; VAN REE, J. M. Physical and emotional stress have differential effects on preference for saccharine and open field behaviour in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 139, n. 1-2, p. 131-138, 2003.
- 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, p. 104676, 2020.
- POWERS, J. B.; NEWMAN, S. W.; BERGONDY, M. L. MPOA and BNST lesions in male Syrian hamsters: differential effects on copulatory and chemoinvestigatory behaviors. **Behavioural Brain Research**, v. 23, n. 3, p. 181-195, 1987.
- RADULOVIC, J., *et al.* Modulation of learning and anxiety by corticotropin-releasing factor (CRF) and stress: differential roles of CRF receptors 1 and 2. **Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 12, p. 5016-5025, 1999.
- RAYMAEKERS, S., VANSTEELANDT, K., LUYTEN, L., BERVOETS, C., DEMYTTENAERE, K., GABRIËLS, L., *et al.* Long-term electrical stimulation of bed nucleus of stria terminalis for obsessive-compulsive disorder. **Molecular Psychiatry**, v. 22, p. 931–934, 2017. doi: 10.1038/mp.2016.124.
- REISS, S., *et al.* Anxiety sensitivity, anxiety frequency and the prediction of fearfulness. **Behaviour Research and Therapy**, v. 24, n. 1, p. 1-8, 1986.
- REIS-SILVA, L. L., *et al.* CRF1 and CRF2 receptors in the lateral hypothalamus differently modulate the baroreflex function in unanesthetized rats. **Brain Research**, v. 1751, p. 147195, 2021.
- REUL, J. M. H. M., *et al.* Glucocorticoids, epigenetic control and stress resilience. **Neurobiology of Stress**, v. 1, p. 44-59, 2015.
- REUL, J. M. H.; HOLSBOER, F. Corticotropin-releasing factor receptors 1 and 2 in anxiety and depression. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 2, n. 1, p. 23-33, 2002.
- RICHARDSON, H. N., *et al.* MPZP: a novel small molecule corticotropin-releasing factor type 1 receptor (CRF1) antagonist. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 88, n. 4, p. 497-510, 2008.
- RODGERS, R. J.; COLE, J. C. Anxiolytic-like effect of (S)-WAY 100135, a 5-HT_{1A} receptor antagonist, in the murine elevated plus-maze test. **European Journal of Pharmacology**, v. 261, n. 3, p. 321-325, 1994.
- SABINO, V., *et al.* Dissociation between opioid and CRF 1 antagonist sensitive drinking in Sardinian alcohol-preferring rats. **Psychopharmacology**, v. 189, p. 175-186, 2006.

- SANTOMAURO, D. F., *et al.* Global prevalence and burden of depressive and anxiety disorders in 204 countries and territories in 2020 due to the COVID-19 pandemic. **The Lancet**, v. 398, n. 10312, p. 1700-1712, 2021.
- SARASON, I. G. Anxiety, self-preoccupation and attention. **Anxiety Research**, v. 1, n. 1, p. 3-7, 1988.
- SAUNDERS, E. F. H., *et al.* Clinical features of bipolar disorder comorbid with anxiety disorders differ between men and women. **Depression and Anxiety**, v. 29, n. 8, p. 739-746, 2012.
- SCHARFMAN, H. E. Towards an Understanding of the Dentate Gyrus Hilus. **Hippocampus**, v. 35, n. 1, p. e23677, 2025.
- SHENG, J. A., *et al.* Androgens and their role in regulating sex differences in the hypothalamic/pituitary/adrenal axis stress response and stress-related behaviors. **Androgens: Clinical Research and Therapeutics**, v. 2, n. 1, p. 261-274, 2021.
- SHENG, J. A., *et al.* The hypothalamic-pituitary-adrenal axis: development, programming actions of hormones, and maternal-fetal interactions. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 14, p. 601939, 2021.
- ALMEIDA, D. M. Resilience and vulnerability to daily stressors assessed via diary methods. **Current Directions in Psychological Science**, v. 14, n. 2, p. 64-68, 2005.
- SILVA, A. L., *et al.* Effects of photoperiod and experience on aggressive behavior in female California mice. **Behavioural Brain Research**, v. 208, n. 2, p. 528-534, 2010.
- SIMMS, Jeffrey A. *et al.* Intermittent access ethanol consumption dysregulates CRF function in the hypothalamus and is attenuated by the CRF-R1 antagonist, CP-376395. **Addiction biology**, v. 19, n. 4, p. 606-611, 2014.
- SMITH, G. W., *et al.* Corticotropin releasing factor receptor 1-deficient mice display decreased anxiety, impaired stress response, and aberrant neuroendocrine development. **Neuron**, v. 20, n. 6, p. 1093–1102, 1998.
- SMITH, S. M.; VALE, W. W. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, 2022.
- SONINO, N.; FAVA, G. A. Psychiatric disorders associated with Cushing's syndrome: epidemiology, pathophysiology and treatment. **CNS Drugs**, v. 15, p. 361-373, 2001.
- SPIERLING, S. R.; ZORRILLA, E. P. Don't stress about CRF: assessing the translational failures of CRF 1 antagonists. **Psychopharmacology**, v. 234, p. 1467-1481, 2017.
- STANLEY, I. H., *et al.* Anxiety sensitivity and suicidal ideation/suicide risk: A meta-analysis. **Journal of Consulting and Clinical Psychology**, v. 86, n. 11, p. 946–960, 2018.

- STERRENBURG, L., *et al.* Sex-dependent and differential responses to acute restraint stress of corticotropin-releasing factor-producing neurons in the rat paraventricular nucleus, central amygdala, and bed nucleus of the stria terminalis. **Journal of Neuroscience Research**, v. 90, n. 1, p. 179-192, 2012.
- SUZUKI, Y., *et al.* The association between obesity and hyperactivity/anxiety among elementary school students in Japan. **International Journal of Behavioral Medicine**, v. 27, n. 1, p. 79–86, 2020.
- TAKAHASHI, L. K. Role of CRF1 and CRF2 receptors in fear and anxiety. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 7-8, p. 627-636, 2001.
- TIMPL, P., *et al.* Impaired stress response and reduced anxiety in mice lacking a functional corticotropin-releasing hormone receptor 1. **Nature Genetics**.
- TODOROVIC, C., *et al.* The role of CRF receptors in anxiety and depression: implications of the novel CRF1 agonist cortagine. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 8, p. 1323-1333, 2005.
- TRAINOR, B. C., *et al.* Sex differences in social interaction behavior following social defeat stress in the monogamous California mouse (*Peromyscus californicus*). **PloS One**, v. 6, n. 2, p. e17405, 2011.
- TRAUSTADOTTIR, T.; BOSCH, P. R.; MATT, K. S. Gender differences in cardiovascular and hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to psychological stress in healthy older adult men and women. **Stress**, v. 6, n. 2, p. 133-140, 2003.
- TSANKOVA, N. M., *et al.* Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. **Nature Neuroscience**, v. 9, n. 4, p. 519-525, 2006.
- VANTREASE, J. E., *et al.* Sex differences in the activity of basolateral amygdalar neurons that project to the bed nucleus of the stria terminalis and their role in anticipatory anxiety. **Journal of Neuroscience**, v. 42, n. 22, p. 4488-4504, 2022.
- VELASCO, M. E.; TALEISNIK, S. Release of gonadotropins induced by amygdaloid stimulation in the rat. **Endocrinology**, v. 84, n. 1, p. 132-139, 1969.
- VENTURA-SILVA, A. P., *et al.* Stress shifts the response of the bed nucleus of the stria terminalis to an anxiogenic mode. **European Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 10, p. 3396-3406, 2012.
- VIAU, V.; MEANEY, M. J. Variations in the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress during the estrous cycle in the rat. **Endocrinology**, v. 129, n. 5, p. 2503-2511, 1991.
- WALKER, D. L.; MILES, L. A.; DAVIS, M. Selective participation of the bed nucleus of the stria terminalis and CRF in sustained anxiety-like versus phasic fear-like responses. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 33, n. 8, p. 1291-1308, 2009.
- WARREN, B. L., *et al.* Neurobiological sequelae of witnessing stressful events in adult mice. **Biological Psychiatry**, v. 73, n. 1, p. 7-14, 2013.

WEATHINGTON, J. M.; HAMKI, A.; COOKE, B. M. Sex-and region-specific pubertal maturation of the corticotropin-releasing factor receptor system in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 522, n. 6, p. 1284-1298, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. COVID-19 pandemic triggers 25% increase in prevalence of anxiety and depression worldwide. v. 19, 2022.

WU, G., *et al.* Understanding resilience. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, 2013, vol. 7, p. 10.

XIAO, S., *et al.* Brain-wide mapping of c-Fos expression in nitroglycerin-induced models of migraine. **The Journal of Headache and Pain**, 2024, vol. 25, no 1, p. 136.

YOSHIOKA, T., *et al.* Repeated psychological stress, chronic vicarious social defeat stress, evokes irritable bowel syndrome-like symptoms in mice. **Frontiers in Neuroscience**, v. 16, p. 993132, 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, 2002.