



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



MARIANA THIELE

**PAPEL DA NEUROTRANSMISSÃO ENDOCANABINOIDE E DO
HIPOCAMPO SOBRE A MEMÓRIA E ANSIEDADE DE CAMUNDONGOS
MACHOS E FÊMEAS SUBMETIDOS AO ESTRESSE PSICOSSOCIAL**

Araraquara
2025

MARIANA THIELE

**PAPEL DA NEUROTRANSMISSÃO ENDOCANABINOIDE E DO
HIPOCAMPO SOBRE A MEMÓRIA E ANSIEDADE DE CAMUNDONGOS
MACHOS E FÊMEAS SUBMETIDOS AO ESTRESSE PSICOSSOCIAL**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, para obtenção do título de Mestra em Ciências.

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

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

Araraquara
2025

T431p Thiele, Mariana.
Papel da neurotransmissão endocanabinoide e do hipocampo sobre a memória e ansiedade de camundongos machos e fêmeas submetidos ao estresse psicossocial / Mariana Thiele. – Araraquara, 2025.
83 f. : il.

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

Orientador: Ricardo Luiz Nunes de Souza.

1. Endocanabinoides. 2. Estresse de derrota social. 3. Estresse psicossocial. 4. Memória. 5. Hipocampo. 6. Camundongos. 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: Papel da neurotransmissão endocanabinóide e do hipocampo sobre a memória e ansiedade de camundongos machos e fêmeas submetidos ao estresse psicossocial

AUTORA: MARIANA THIELE

ORIENTADOR: RICARDO LUIZ NUNES DE SOUZA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra 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 Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Prof. Dr. DIEGO CARDOZO MASCARENHAS (Participação Virtual)
Departamento de Farmacologia e Terapêutica / Universidade Estadual de Maringá (UEM)

Dra. CRISTIANE BUSNARDO SANTIAGO (Participação Virtual)
Jovem Pesquisadora no Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Araraquara, 15 de agosto de 2025

À minha família.
A conquista é *nossa*.

AGRADECIMENTOS

Nada mais justo do que começar esta seção agradecendo minha família. Aos meus pais, Maurício e Luciana Helena, obrigada por todo o direcionamento, apoio e carinho ao longo desses anos. Agradeço também por me ensinarem a perseverar. Vocês sempre foram, e continuarão sendo, essenciais na minha trajetória. Aos meus irmãos, Camila, João Victor e João Pedro, obrigada por me acompanharem em todos os momentos e por incentivarem as minhas escolhas. A vida, com certeza, é muito mais divertida e alegre com vocês. Aos meus avós, Arthur Carlos e Regina Maria, e ao meu tio, Luiz Eduardo, agradeço por se fazerem presentes com tanto amor, mesmo à distância.

As minhas amigadas me proporcionam muito apoio e carinho e, por isso, agradeço a todos os que participaram do meu mestrado: aos que estão perto e conheci durante meu período de UNESP, e aos que estão um pouco mais longe e me acompanham desde antes da graduação. Em especial, agradeço à minha amiga – e agora Mestra – Maiara Alane: obrigada por viver intensamente a pós-graduação comigo todos os dias.

A todos os alunos e pesquisadores do laboratório de Farmacologia da FCFAr, meu agradecimento por toda a ajuda, pelas conversas e risadas. Ao longo dos últimos anos, compartilhamos muitos momentos, dentro e fora da universidade, que tornaram a trajetória mais leve. Obrigada aos mestres Felipe Forero Castillo e Julian Humberto Avalo Zuluaga e às alunas de graduação Edesilma Ferreira de Jesus e Katellyn Costa Silva pela contribuição na coleta dos dados.

Gratidão, principalmente, ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza, pela oportunidade, e aos pós-doutorandos que contribuíram com o presente estudo, Dr. Lucas Canto de Souza, Dra. Daniela Baptista de Souza e Dr. Gessynger Morais Silva. Agradeço imensamente por me orientarem e inspirarem, vocês ensinam diariamente como construir um ambiente de pesquisa profissional, acolhedor e amigável.

Por fim, meu agradecimento à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, sobretudo, à Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Campus de Araraquara e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Obrigada a todos os funcionários envolvidos nesta instituição, em especial, aos porteiros Paulo e Leandro que sempre me auxiliaram e alegraram os meus dias de trabalho. Agradeço também à secretária do departamento, Tirene Pavanelli, pelas ajudas diárias.

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

RESUMO

O estresse é um fator de risco para o desenvolvimento de transtornos neuropsiquiátricos, definido como uma condição que perturba o equilíbrio psicofisiológico de um indivíduo. O estresse também pode afetar a funcionalidade do hipocampo e seu papel mnemônico, podendo prejudicar o aprendizado. A modulação da memória emocional, por sua vez, está relacionada com o sistema endocanabinoide (eCB), sendo a enzima hidrolase de amida de ácido graxo (FAAH) importante para a formação, manutenção e extinção de memórias traumáticas. Os inibidores da FAAH podem ser uma opção promissora no tratamento para transtornos neuropsiquiátricos, especialmente por sua ação em processos mnemônicos. Ressalta-se que os efeitos da FAAH podem ser dependentes do sexo do indivíduo. Assim, o presente estudo objetiva investigar o papel da neurotransmissão eCB e do hipocampo dorsal e ventral em camundongos machos e fêmeas submetidos ao modelo de estresse de derrota social (EDS). Camundongos machos e fêmeas foram submetidos ao protocolo crônico de EDS e, posteriormente, foram avaliados no teste de interação social, do labirinto em cruz elevado, teste de campo aberto e teste de reconhecimento de objetos. O estudo buscou esclarecer se o aumento de eCB por meio de inibidor de FAAH (PF-3845), via intraperitoneal (IP), resulta na atenuação de comportamentos relacionados à ansiedade e prejuízo cognitivo induzidos pelo EDS. Os resultados obtidos indicam que o EDS não teve efeito ansiogênico nos animais machos e não foi efetivo para induzir prejuízo mnemônico em ambos os sexos. Porém, o EDS desencadeou comportamento do tipo ansioso em camundongos fêmeas, sendo que o PF-3845 não foi eficaz em reverter os efeitos do estresse. A imunomarcagem por fluorescência indica que o EDS reduz a expressão da proteína cFos na região do giro denteado (DG) do hipocampo dorsal (dHPC) em fêmeas, além de revelar lateralidade funcional na região CA1 do dHPC nos animais machos submetidos ao EDS.

Palavras-chave: endocanabinoide; estresse de derrota social; estresse psicossocial; memória; hipocampo; camundongos.

ABSTRACT

Defined as a condition that disrupts an individual's psychophysiological balance, stress is a risk factor for the development of neuropsychiatric diseases. Stress can also affect the functionality of the hippocampus and its mnemonic role, potentially impairing learning. Modulation of emotional memory, in turn, is related to the endocannabinoid (eCB) system, with the enzyme fatty acid amide hydrolase (FAAH) being essential for the formation, maintenance, and extinction of traumatic memories. FAAH inhibitors may be a promising treatment option for neuropsychiatric diseases, especially due to their action on mnemonic processes. It is noteworthy that the effects of FAAH may be dependent on the individual's sex. Therefore, the present study aimed at investigating the role of eCB neurotransmission and the dorsal and ventral hippocampus in male and female mice subjected to social defeat stress (SDS) models. Male and female mice underwent the EDS protocol and were subsequently evaluated in the social interaction test, elevated plus maze, open field test, and object recognition test. The study sought to clarify whether increasing eCB levels through a FAAH inhibitor (PF-3845), via intraperitoneal (IP), results in the attenuation of anxiety-related behaviors and cognitive impairment induced by EDS. The results indicate that EDS had no anxiogenic effect in male mice and was not effective in inducing mnemonic impairment in either sex. However, EDS triggered anxiety-like behavior in female mice, and PF-3845 was not effective in reversing the effects of stress. Fluorescence immunostaining indicates that EDS reduces cFos protein expression in the dentate gyrus (DG) of the dorsal hippocampus (dHPC) in females, in addition to revealing functional laterality in the CA1 region of the dHPC in male mice subjected to EDS.

Keywords: endocannabinoid; social defeat stress; psychosocial stress; memory; hippocampus; mice.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema representativo do estresse de derrota social de machos.....	29
Figura 2 - Esquema representativo do estresse de derrota social de fêmeas.....	30
Figura 3 - Esquema representativo do TIS.....	32
Figura 4 - Esquema representativo do TCA.....	33
Figura 5 - Esquema representativo do TRO	34
Figura 6 - Esquema representativo do LCE.....	35
Figura 7 - Imagem representativa da imunomarcção na região dHPC e vHPC.....	37
Figura 8 - Esquema representativo do experimento 1 do protocolo de estudo	38
Figura 9 - Esquema representativo do experimento 2 do protocolo de estudo	39
Figura 10 - Efeito do estresse crônico sobre o ganho de peso em camundongos machos submetidos ao protocolo de estresse de derrota social.....	41
Figura 11 - Efeito do estresse crônico sobre o comportamento de evitação social em camundongos machos submetidos ao protocolo de estresse de derrota social	43
Figura 12 - Efeito do estresse crônico sobre o comportamento de exploração em camundongos machos submetidos ao protocolo de estresse de derrota social	44
Figura 13 - Efeito do tratamento sobre a memória em camundongos machos submetidos ao protocolo de estresse de derrota social.....	45
Figura 14 - Efeito do tratamento sobre a expressão da proteína cFos no hipocampo dorsal de camundongos machos submetidos ao protocolo de estresse de derrota social	46
Figura 15 - Efeito do estresse crônico sobre o ganho de peso em camundongos fêmeas submetidos ao protocolo de estresse de derrota social.....	47
Figura 16 - Efeito do estresse crônico sobre o comportamento de evitação social em camundongos fêmeas submetidos ao protocolo de estresse de derrota social	48
Figura 17 - Efeito do estresse crônico sobre o comportamento de exploração em camundongos fêmeas submetidos ao protocolo de estresse de derrota social	49
Figura 18 - Efeito do tratamento sobre a memória em camundongos fêmeas submetidos ao protocolo de estresse de derrota social.....	50
Figura 19 - Efeito do tratamento sobre a expressão da proteína cFos no hipocampo dorsal de camundongos fêmeas submetidos ao protocolo de estresse de derrota social	51
Figura 20 - Efeito do estresse crônico sobre o ganho de peso em camundongos machos submetidos ao protocolo de estresse de derrota social.....	52
Figura 21 - Efeito do estresse crônico sobre o comportamento de evitação social em camundongos machos submetidos ao protocolo de estresse de derrota social	54
Figura 22 - Efeito do tratamento sobre o comportamento do tipo ansioso em camundongos machos submetidos ao protocolo de estresse de derrota social.....	55
Figura 23 - Efeito do tratamento sobre a expressão da proteína cFos no hipocampo dorsal de camundongos machos submetidos ao protocolo de estresse de derrota social	57
Figura 24 - Efeito do estresse crônico sobre o ganho de peso em camundongos fêmeas submetidos ao protocolo de estresse de derrota social.....	58
Figura 25 - Efeito do estresse crônico sobre o comportamento de evitação social em camundongos fêmeas submetidos ao protocolo de estresse de derrota social	59
Figura 26 - Efeito do tratamento sobre o comportamento do tipo ansioso em camundongos fêmeas submetidos ao protocolo de estresse de derrota social.....	60
Figura 27 - Efeito do tratamento sobre a expressão da proteína cFos no hipocampo dorsal de camundongos fêmeas submetidos ao protocolo de estresse de derrota social	62

LISTA DE ABREVIATURAS

AChE	Inibidores de acetilcolinesterase
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AEA	Anandamida
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BNST	Núcleo do leito da estria terminal
BuChE	Butirilcolinesterase
CA	Cornus Ammonis
CB1R	Receptores canabinoides do tipo 1
CB2R	Receptores canabinoides do tipo 2
CORT	Corticosterona
CPF	Córtex pré-frontal
CRF	Fator de liberação de corticotrofina
DG	Giro Dentado
eCBome	Sistema endocanabinoidoma
ECS	Sistema Endocanabinoide
EDS	Estresse de derrota social
EDSf	Estresse de derrota social com fêmeas
EDSm	Estresse de derrota social com machos
FAAH	Enzima amida hidrolase de ácido graxo
FCFAr	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara
dHPC	Hipocampo dorsal
HPA	Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal
ID	Índice de discriminação
IEG	Genes de expressão imediata e precoce
INA	Interação não-agressiva
IP	Intraperitoneal
IRSN	Inibidores de recaptção de serotonina e norepinefrina
ISRS	Inibidores seletivos da recaptção de serotonina
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
LDP	Depressão de longo prazo
LTM	Memória de longa duração
LTP	Potenciação de longa duração

MAGL	Lipase de monoacilglicerol
PVN	Núcleo paraventricular do hipotálamo
RI	Razão de interação social
Sb	Subículo
STM	Memória de curta-duração
TCA	Teste do campo aberto
THC	Δ 9-tetrahydrocannabinol
TIS	Teste de interação social
TRO	Teste de Reconhecimento de Objetos
vHPC	Hipocampo ventral

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	12
1.1.	<i>Estresse e transtornos psiquiátricos</i>	12
1.2.	<i>Memória.....</i>	14
1.3.	<i>Ansiedade.....</i>	16
1.4.	<i>Hipocampo.....</i>	17
1.5.	<i>Atuais tratamentos farmacológicos</i>	19
1.5.1.	<i>Tratamento para transtornos de ansiedade.....</i>	19
1.5.2.	<i>Tratamento para quadros de demência.....</i>	20
1.6.	<i>Sistema endocanabinoide.....</i>	22
1.7.	<i>Estudos com fêmeas</i>	24
1.8.	<i>Estresse de derrota social</i>	25
1.9.	<i>Testes comportamentais</i>	25
1.10.	<i>Imunohistoquímica.....</i>	26
1.11.	<i>Hipótese.....</i>	26
2.	OBJETIVOS	27
2.1.	<i>Objetivos específicos.....</i>	27
3.	MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1.	<i>Animais.....</i>	28
3.2.	<i>Fármacos e Soluções</i>	28
3.3.	<i>Estresse de Derrota Social (EDS): EDS para machos (EDSm) e EDS para fêmeas (EDSf).....</i>	29
3.4.	<i>Ganho de peso</i>	31
3.5.	<i>Teste de interação Social (TIS).....</i>	31
3.6.	<i>Teste de Campo Aberto (TCA).....</i>	32
3.7.	<i>Teste de Reconhecimento de Objetos (TRO)</i>	33
3.8.	<i>Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE).....</i>	34
3.9.	<i>Imunofluorescência.....</i>	35
3.10.	<i>Delineamento Experimental.....</i>	37
3.10.1.	<i>Experimento 1 – Efeitos do tratamento com inibidor da FAAH sobre respostas relacionadas à memória de curta duração e padrão de ativação do hipocampo dorsal de camundongos machos e fêmeas submetidos ao EDS.....</i>	37

3.10.2. <i>Experimento 2 - Efeitos do tratamento com inibidor da FAAH sobre respostas relacionadas à ansiedade e padrão de ativação do hipocampo dorsal em camundongos machos e fêmeas ao EDS</i>	39
3.11. Análise estatística	40
4. RESULTADOS	41
4.1. Experimento 1 – Efeitos do tratamento com inibidor da FAAH sobre respostas relacionadas à memória de curta duração e padrão de ativação do hipocampo dorsal de camundongos machos e fêmeas submetidos ao EDS	41
• <i>Resultados dos camundongos machos</i>	41
4.1.1. <i>Ganho de peso</i>	41
4.1.2. <i>Teste de Interação Social</i>	41
4.1.3. <i>Teste do Campo Aberto</i>	43
4.1.4. <i>Teste do Reconhecimento de Objetos</i>	44
4.1.5. <i>Ativação neuronal da proteína cFos</i>	45
• <i>Resultados dos camundongos fêmeas</i>	46
4.1.6. <i>Ganho de peso</i>	46
4.1.7. <i>Teste de Interação Social</i>	47
4.1.8. <i>Teste do Campo Aberto</i>	48
4.1.9. <i>Teste do Reconhecimento de Objetos</i>	49
4.1.10. <i>Ativação neuronal da proteína cFos</i>	50
4.2. Experimento 2 – Efeitos do tratamento com inibidor da FAAH sobre respostas relacionadas à ansiedade e padrão de ativação do hipocampo dorsal de camundongos machos e fêmeas submetidos ao EDS	51
• <i>Resultados dos camundongos machos</i>	52
4.2.1. <i>Ganho de peso</i>	52
4.2.2. <i>Teste de Interação Social</i>	52
4.2.3. <i>Teste do Labirinto em Cruz Elevado</i>	54
4.2.4. <i>Ativação neuronal da proteína cFos</i>	56
• <i>Resultados dos camundongos fêmeas</i>	57
4.2.5. <i>Ganho de peso</i>	57
4.2.6. <i>Teste de Interação Social</i>	58
4.2.7. <i>Teste do Labirinto em Cruz Elevado</i>	59
4.2.8. <i>Ativação neuronal da proteína cFos</i>	61
5. DISCUSSÃO	62
6. CONCLUSÕES	70
REFERÊNCIAS	71

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Estresse e transtornos psiquiátricos

A demência é um dos transtornos neurológicos com deterioração da função cognitiva, afetando principalmente a memória. No presente estudo, a abordagem dessa patologia deve-se ao seu papel representativo do impacto social dos transtornos de memória, evidenciando a importância de se investigar os mecanismos mnemônicos. Ademais, a demência é um exemplo relevante de transtorno em que o estresse crônico pode contribuir para o seu desenvolvimento (Juszczuk *et al.*, 2021). Segundo o “Relatório global sobre o estado da resposta da saúde pública à demência”, em 2019, havia mais de 55 milhões de pessoas vivendo com algum tipo de demência, sendo a Doença de Alzheimer a mais comum. Com 1,6 milhões de óbitos em 2019, dentre os quais as mulheres representam em torno de 65% dos casos, a demência tornou-se a sétima causa de mortes no mundo (World Health Organization, 2021). Assim como na demência, eventos estressores são um fator de risco para o desenvolvimento da ansiedade patológica. Em 2019, cerca de 301 milhões de pessoas apresentaram algum tipo de transtorno de ansiedade, segundo a Organização Mundial de Saúde, sendo considerado o transtorno mental mais comum.

A literatura sobre o estresse comumente engloba os trabalhos de Hans Selye, o qual definiu o estresse biológico como “uma resposta inespecífica do corpo a uma demanda” (Selye, 1956). Já os eventos estressores são definidos como aqueles capazes de desencadear a resposta de estresse (Szabo; Tache; Somogyi, 2012), colocando a sobrevivência do indivíduo em risco ou sendo percebidos como capazes de colocar em risco (Van De Kar; Blair, 1999). O objetivo do estresse, então, é ser uma resposta para aumentar as chances de sobrevivência perante os estressores, ocorrendo de forma precisa com a ativação de diversos mecanismos neuroendócrinos (Van De Kar; Blair, 1999). Quando o indivíduo é exposto de forma contínua a um estressor, a resposta de estresse é desencadeada por três estágios: reação de alarme, estágio de resistência e estágio de exaustão. O primeiro estágio é o momento de mobilização das respostas defensivas do organismo, enquanto o segundo estágio abrange o período em que o organismo se adaptou ao estressor em questão, conseguindo resistir a ele. Por fim, no terceiro estágio, o corpo já não é mais capaz de manter as respostas adaptativas, permanecendo neste estágio até o evento estressor terminar (Selye, 1936). Quando a exposição ao evento estressor é curta,

tem-se o estresse agudo, já o estresse crônico ocorre devido a exposição prolongada ao estressor e coloca o corpo em estado de exaustão ao ponto que o organismo não consegue se adaptar e resulta em mudanças mal adaptadas. Com essa classificação, é possível compreender a definição de eustresse e distresse por Selye: eustresse é visto como o estresse positivo para o organismo, o qual motiva e melhora o desempenho do indivíduo, enquanto o distresse é o estresse negativo, o qual sobrecarrega o organismo de forma que pode ocorrer o desenvolvimento de patologias. Ao encontro dos conceitos de Selye, a Lei (ou Curva) de Yerkes-Dodson evidencia o limite do efeito benéfico da resposta de estresse. Esse modelo apresenta a performance do sujeito em função da intensidade da resposta de estresse, sendo que a partir do ponto ótimo da curva, o desempenho começa a decair em decorrência do estresse intenso (Diamond *et al.*, 2007). Portanto, os efeitos da resposta de estresse dependem tanto da intensidade quanto da duração do evento estressor.

As estruturas núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), a glândula pituitária (também denominada glândula hipófise) e a glândula adrenal são os principais agentes da resposta de estresse, e suas interações formam o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) no sistema neuroendócrino (Smith; Vale, 2006). A partir de processamentos neurais externos ao eixo HPA, devido a estímulos estressores, neurônios parvocelulares do PVN liberam o fator de liberação de corticotrofina (CRF), estimulando a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela glândula pituitária (Spencer; Deak, 2017). O ACTH, por sua vez, dá início a uma cascata de reações enzimáticas na glândula adrenal que resultam na conversão do colesterol em glicocorticoide. O cortisol é o principal hormônio glicocorticoide em humanos, porém, em roedores, o principal hormônio glicocorticoide é a corticosterona, sendo que diferença entre as moléculas se dá no cortisol com a presença de uma hidroxila no C11 (Spencer; Deak, 2017). Assim, como o presente estudo foi realizado com camundongos, a corticosterona (CORT) será utilizada como referência para os devidos contextos.

Devido a suas funções em resposta a eventos estressores, a CORT é conhecida como o hormônio do estresse, proporcionando a glicogenólise e gliconeogênese, bem como diminuindo a inflamação e aumentando a vasoconstrição e o débito cardíaco (Cannon, 1935; Knezevic *et al.*, 2023; O'connor; Thayer; Vedhara, 2025), visando aumentar a probabilidade de sobrevivência. Dentre suas características, é importante ressaltar que a CORT não fica armazenada em estoques, sua produção ocorre conforme necessidade do organismo. Assim, de forma geral, quando a CORT atinge níveis

suficientes no organismo, ocorre a retroalimentação negativa para glândula pituitária e PVN, a fim de inibir a liberação de CRF e ACTH (Smith; Vale, 2006; Spencer; Deak, 2017). Apesar da retroalimentação negativa pela CORT ser a mais conhecida, há diversas estruturas cerebrais e mecanismos envolvidos na regulação do eixo HPA, os quais podem ser encontrados de forma mais detalhada na revisão de Smith e Vale (2006). Dentre as estruturas, o hipocampo parece estar fortemente relacionado com a retroalimentação do eixo HPA, inibindo a produção de CRF pelo PVN (Knezevic *et al.*, 2023; Smith; Vale, 2006).

O estresse crônico pode afetar a regulação do eixo HPA ao ativá-lo com maior frequência, ocasionando uma liberação prolongada de CORT (Knezevic *et al.*, 2023). Além disso, o tempo prolongado de estresse desencadeia um processo constante de inflamação no organismo, resultando na dessensibilização do eixo HPA aos glicocorticoides e comprometendo a regulação pela retroalimentação negativa (Knezevic *et al.*, 2023). A resposta do estresse é complexa e, quando desregulada, pode resultar em transtornos psiquiátricos, uma vez que a capacidade de lidar com eventos estressores está prejudicada. Considerando as diferentes consequências psicofisiológicas do estresse, é possível categorizar os indivíduos em resilientes e suscetíveis. O conceito de resiliência é variado e permite importantes discussões a respeito (Southwick *et al.*, 2014). Dentre as diversas definições, destaca-se a descrição de Ann Masten (2014): “resiliência é a capacidade de um sistema dinâmico e maleável de resistir a desafios à sua estabilidade, viabilidade ou desenvolvimento” (Masten, 2014). A suscetibilidade (ou vulnerabilidade), por sua vez, é entendida como a falta ou prejudicada habilidade de se adaptar a eventos estressores, vivenciando, por algum motivo, o evento de forma mais intensa, o que comumente acarreta consequências patológicas ao organismo (Russo *et al.*, 2012).

1.2.Memória

A memória é definida como a capacidade de armazenar e recuperar informações (Zlotnik; Vansintjan, 2019). Segundo a 11ª Revisão da Classificação Internacional de Doenças para Estatísticas de Morbidade (World Health Organization, 2022), dentre os diversos domínios em que pode ocorrer o prejuízo neurocognitivo da demência, o comprometimento da memória se destaca por estar presente na maioria dos quadros desta patologia. Por ser uma doença progressiva e não reversível, o paciente pode perder sua autonomia, tendo a sua qualidade de vida prejudicada, situação fácil de ser percebida pela

dificuldade dos pacientes com a memória recente, a qual tende a ser a primeira afetada (Reis; Marques; Marques, 2022).

A memória pode ser classificada de acordo com a sua duração em memória de curta-duração (STM, do inglês *short-term memory*), que retém informações por segundos a minutos, e memória de longa duração (LTM, do inglês *long-term memory*), que pode persistir por toda a vida (Danieli; Guyon; Bethus, 2023). A STM é responsável por reter temporariamente informações necessárias para a realização de tarefas imediatas. Um conceito intimamente relacionado é o de memória de trabalho, que envolve não apenas o armazenamento temporário (um componente da STM), mas também a manipulação ativa dessa informação (Baddeley, 2012). A sustentação das informações na STM depende da ativação contínua de circuitos neuronais, sem envolver alterações estruturais duradouras nas sinapses. Assim, para que uma informação seja armazenada de forma estável como LTM, é necessário que ocorra o processo de consolidação, que pode ser facilitado por repetições (Yang *et al.*, 2025). Caso a ativação dos circuitos da STM cesse antes da consolidação, a informação enfraquece com o tempo (decaimento temporal) ou é perdida devido à interferência de novos estímulos, resultando no esquecimento. Tal contexto evidencia a STM como uma etapa temporária entre a percepção sensorial e o armazenamento duradouro na LTM (Jonides *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2025).

A LTM, por sua vez, ainda é subdividida em memórias declarativas e memórias não-declarativas. As primeiras são dependentes do uso da linguagem, enquanto as últimas são independentes. O hipocampo está intimamente relacionado com as memórias LTM do tipo declarativas. Por fim, as memórias declarativas podem ser episódicas (armazena as experiências como sequências em uma estrutura espaço-temporal) ou semânticas (conceitos abstratos com seus significados) (Danieli; Guyon; Bethus, 2023).

O processo de formação de memórias, então, engloba quatro fenômenos: codificação, consolidação, evocação e reconsolidação (Zaki; Cai, 2024). A codificação é o processo de registro no cérebro das informações que chegam pelos estímulos sensoriais provindos do mundo externo. Em sequência, a consolidação, por meio da síntese de novas proteínas, torna as informações estáveis, sendo que os períodos de descanso parecem ser essenciais para tal objetivo. A consolidação é então a etapa de mudanças permanentes para reter as informações no cérebro, tendo uma forte relação com a plasticidade neuronal, uma vez que a plasticidade permite o fortalecimento de conexões entre os neurônios, resultando em adaptações nas sinapses (Ortega-De San Luis; Ryan, 2022; Zaki; Cai, 2024). A potenciação de longa duração (LTP, do inglês *long-term potentiation*) é um dos

principais processos de plasticidade neuronal relacionados à LTM, o qual ocorre por uma modificação duradoura na força sináptica por estimulação elétrica, enquanto a depressão de longo prazo (LTD, do inglês *long-term depression*) é a diminuição na eficácia sináptica após estimulação de baixa frequência (Kim; Kim, 2023; Ortega-De San Luis; Ryan, 2022). Durante a evocação, ocorre a reativação do padrão neuronal ativado originalmente quando a informação foi adquirida, permitindo a recuperação da memória (Ortega-De San Luis; Ryan, 2022; Zaki; Cai, 2024). Por fim, há o fenômeno de reconsolidação, já que as memórias estão sendo constantemente atualizadas. Tal processo ocorre após a etapa de evocação, em um período em que as memórias estão maleáveis e passíveis de mudanças caso necessário (Zaki; Cai, 2024).

1.3. Ansiedade

A ansiedade é uma resposta natural do corpo de aumento da vigilância pela antecipação de um perigo, sendo descrita como um sentimento desagradável que ocorre em conjunto com tensão e preocupação (Calhoon; Tye, 2015; Castillo *et al.*, 2000). A ansiedade, assim como a resposta de estresse, visa a sobrevivência do indivíduo e, para tanto, ocorre alterações fisiológicas, como aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial (Calhoon; Tye, 2015). A ansiedade patológica, porém, consiste na exacerbação disfuncional da resposta natural de ansiedade com a sensação de incontabilidade, resultando na superestimação do potencial perigo, situação que pode prejudicar a qualidade de vida do indivíduo, resultando nos transtornos de ansiedade (American Psychiatric Association, 2013; Calhoon; Tye, 2015).

A ansiedade é baseada no dilema de uma situação que não apresenta uma ameaça evidente e tão pouco proporciona total segurança. O indivíduo, portanto, precisará decidir qual o comportamento mais adequado à situação, analisando os potenciais riscos e potenciais recompensas (Calhoon; Tye, 2015). Quando há exposição repetida a um estressor, como em cenários de estresse crônico, a via neural da ansiedade pode se tornar a resposta padrão em situações de conflito (Calhoon; Tye, 2015), devido a intensificação da via por conta da frequência com que é ativada. A avaliação do potencial perigo envolve um circuito neuronal formado pelas regiões do núcleo do leito da estria terminal (BNST, do inglês *bed nucleus of the stria terminalis*), hipocampo ventral, córtex pré-frontal (CPF) e amígdala. A amígdala designa a valência emocional para as experiências e, então, o fluxo das projeções segue para o BNST, hipocampo ventral e, por fim, CPF (Calhoon; Tye, 2015).

Dentre os mecanismos envolvidos no desencadeamento da ansiedade, o neurotransmissor GABA desempenha um importante papel. Na membrana plasmática dos neurônios, está localizado o receptor GABA-A, no qual o GABA se liga, permitindo o influxo de íons de cloreto na célula por meio de canais iônicos. Em situações fisiológicas normais, uma vez que há o aumento de Cl⁻ no interior da célula, ocorre a hiperpolarização do neurônio, aumentando o limiar de excitabilidade e equilibrando a atividade neuronal (Vitorazzo *et al.*, 2021). Sendo assim, em momentos de ansiedade e estresse, o sistema GABAérgico pode ser afetado e sua desregulação pode ocasionar a hiperativação neuronal, elevando noradrenalina e alterando a sinalização serotoninérgica, o que se manifesta em sintomas de ansiedade.

1.4. Hipocampo

O hipocampo é uma estrutura do sistema límbico que está relacionado a diversos mecanismos fisiológicos, sendo o foco deste estudo as suas relações com a memória e ansiedade. A sua relação com os processos de memória ganhou destaque com a divulgação da história do paciente H.M., o qual apresentava um grave quadro de epilepsia e foi submetido a uma cirurgia para retirar bilateralmente algumas regiões cerebrais como forma de tratar seu transtorno, incluindo o hipocampo. Em virtude disso, o paciente perdeu a capacidade de criar memórias de longo prazo, porém, as memórias de habilidades e de curto prazo não sofreram prejuízo, na verdade, apresentaram até melhorias (Scoville; Milner, 1957).

As informações do meio externo são internalizadas como estímulos sensoriais pelos sentidos e percorrem por diversas regiões encefálicas, nas quais ocorre um crescente aumento de complexidade da informação. Ou seja, inicialmente, há o processamento de aspectos de baixo complexidade das entradas sensoriais e, posteriormente, ao longo dos estágios de processamento, aumenta-se os aspectos abstratos (Danieli; Guyon; Bethus, 2023). Quando chega no hipocampo, a informação já está bem integrada, permitindo o processamento de alta complexidade, acrescentando principalmente aspectos de navegação espacial, e o armazenamento como memória. O hipocampo, por sua vez, é constituído pelas regiões Cornus Ammonis (CA) com suas sub-regiões (CA1, CA2 e CA3), Giro Dentado (DG) e o Subículo (Sb). A estrutura do hipocampo, bem como suas projeções neuronais, é organizada em uma sequência que se inicia pelo DG, passando pelo CA3, CA1 e, então, pelo subículo. Em suma, o DG é responsável pela separação de padrões das informações recebidas, o CA3 relaciona-se com a ligação estrutural das

características, o CA1 atua sobretudo fortemente na recuperação de memórias e transmissão das projeções para outras áreas encefálicas, bem como faz o subículo (Danieli; Guyon; Bethus, 2023). Nos roedores, a partir de um corte coronal, o hipocampo é dividido em dorsal (dHPC) e ventral (vHPC), sendo que tais áreas aparentam ter funções distintas na memória: a região dorsal está relacionada principalmente com a memória espacial, enquanto a região ventral está relacionada principalmente com aspectos afetivos (Danieli; Guyon; Bethus, 2023) e apresenta maior relação com os transtornos de ansiedade pelas ligações com o córtex pré-frontal (Kenwood; Kalin; Barbas, 2022).

As estruturas do sistema límbico encefálico atuam fortemente nas respostas comportamentais e emocionais. Esta região, principalmente o hipocampo, possui uma vasta concentração de receptores de glicocorticoides e receptores de mineralocorticoides em seus neurônios (Knezevic *et al.*, 2023), justificando seu importante papel na resposta do estresse. O excesso de glicocorticoides desencadeado pelo estresse crônico é uma das principais hipóteses sobre as consequências do estresse no hipocampo, como a atrofia dessa estrutura (Kim; Kim, 2023; Knezevic *et al.*, 2023). Tal informação corrobora os estudos evidenciando que o estresse pode afetar a funcionalidade mnemônica do hipocampo, sendo visto uma correlação do prejuízo de memória com o aumento de CORT principalmente no hipocampo dorsal, bem como pode aumentar os comportamentos relacionados à ansiedade (Kim; Pellman; Kim, 2015; Shi *et al.*, 2023; Da Costa, 2022; Zaki; Cai, 2024).

A emoção é uma variável importante na resposta comportamental e no aprendizado do animal. Um exemplo de tal situação é quando o sujeito entende que seu comportamento não influenciará o estímulo aversivo que está sofrendo e consequentemente seu aprendizado de atividades subsequentes não será adequado (Kim; Kim, 2023). Intimamente envolvida no processamento de informações em conjunto com o hipocampo, a amígdala desempenha um papel fundamental na regulação emocional do organismo (Roesler *et al.*, 2021). Ao atribuir a valência emocional das experiências, a amígdala contribui para determinar a relevância das informações e, por conseguinte, na consolidação das memórias (Roesler *et al.*, 2021). O circuito amígdala-hipocampo proporciona então a relação de evocação de memórias relacionadas com o medo, sendo que um funcionamento anormal desse circuito pode facilitar a consolidação de memórias aversivas (Joca; Padovan; Guimarães, 2003).

Dentre os mecanismos que correlacionam a memória com o estresse, o processo de neurogênese se destaca por sua importância na aquisição e consolidação de novas

informações (Joca; Padovan; Guimarães, 2003). O DG é uma das principais regiões cerebrais que realizam a neurogênese, o qual é um processo de maturação de neurônios ao longo da vida, permitindo que novos neurônios integrem os circuitos hipocampais e, conseqüentemente, aumentando a plasticidade da região (Kim; Kim, 2023; Van Praag *et al.*, 2002). Em situações aversivas, pode ocorrer inibição da neurogênese, efeito associado à diminuição do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), neurotrofina que desempenha importante papel na plasticidade sináptica e neurogênese. Tal situação afeta o desempenho futuro do indivíduo perante eventos estressores subseqüentes, uma vez que as respostas adaptativas do primeiro momento podem não ser consolidadas corretamente (Joca; Padovan; Guimarães, 2003). Além do prejuízo mnemônico, a diminuição da neurogênese também está relacionada com o aumento de comportamento do tipo ansioso (Shi *et al.*, 2023).

1.5. Atuais tratamentos farmacológicos

1.5.1. Tratamento para transtornos de ansiedade

O Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais – 5ª edição utiliza de um capítulo para relatar sobre os diversos transtornos de ansiedade, tendo cada transtorno um tratamento ideal. Neste presente estudo, será abordado os principais tratamentos de forma geral sem aprofundar para qual subtipo de transtorno é o mais indicado.

As barreiras para um tratamento efetivo são diversas e, entre outros fatores, englobam o acesso ao diagnóstico correto e ao tratamento, adesão à farmacoterapia e interações medicamentosas. Entretanto, a própria eficácia do medicamento deve ser considerada como uma barreira importante para a recuperação dos pacientes dada a individualidade da população (Basile; Newton-John; Wootton, 2024). Apesar dos avanços científicos nos tratamentos de transtornos de ansiedade, apenas 60-85% dos pacientes respondem ao tratamento, sendo que apenas em torno de 50% destes indivíduos conseguem alcançar a recuperação (Garakani *et al.*, 2020).

Das classes utilizadas para tratamento de transtornos de ansiedade, destacam-se os inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ISRS) e os inibidores de recaptção de serotonina e norepinefrina (IRSN), os quais são utilizados como tratamento de primeira linha e possuem relativamente poucos efeitos adversos, porém, os ISRS podem apresentar uma prolongada latência de ação (Garakani *et al.*, 2020; Medeiros *et al.*, 2024). Devido aos efeitos colaterais de disfunção sexual e aumento do nervosismo, pode ser necessário o acréscimo de outros fármacos para tratamentos paralelos (Garakani *et al.*, 2020). Com

relação aos mecanismos de ação, os ISRS irão impedir de forma seletiva a recaptação de serotonina na fenda sináptica, aumentando a quantidade disponível de serotonina na fenda e permitindo que a neurotransmissão serotoninérgica se potencialize. A inibição ocorre por meio do bloqueio dos transportadores de serotonina, e os exemplos da classe são a Sertralina e a Fluoxetina. Os IRSN possuem o mesmo princípio e, além do aumento da quantidade de serotonina, também promovem o aumento de norepinefrina por meio do bloqueio dos transportadores de norepinefrina, sendo a Venlafaxina um dos medicamentos mais conhecido da classe (Vitorazzo *et al.*, 2021).

Apesar da eficácia ser semelhante aos ISRS, a classe de antidepressivos tricíclicos possuem efeitos colaterais mais preocupantes, uma vez que não possuem inibição seletiva e, por conta disso, além de bloquearem os transportadores de serotonina e norepinefrina, também bloqueiam receptores adrenérgicos, histaminérgicos e colinérgicos. Ademais, essa classe também possui uma estreita faixa terapêutica. Os antidepressivos tricíclicos, portanto, são utilizados em casos específicos e pode-se citar a amitriptilina como exemplo (Medeiros *et al.*, 2024; Melaragno, 2021). Os benzodiazepínicos também são frequentemente prescritos, já que potencializam o efeito inibitório do GABA por aumentar a frequência da abertura de canais iônicos, porém, são mais indicados para o uso a curto prazo, uma vez que possui o risco de dependência e tolerância (Medeiros *et al.*, 2024; Melaragno, 2021; Vitorazzo *et al.*, 2021). Desta classe, tem-se o Clonazepam e Lorazepam como medicamentos mais utilizados.

Por fim, a Buspirona, pertencente a classe de azapironas, é um agonista parcial de 5-HT_{1A} e o único medicamento comercializado desta classe no Brasil atualmente. Apesar de ser bem tolerado e não apresentar dependência, sua eficácia ainda é menor do que a de benzodiazepínicos e é necessário dividir a dose em, pelo menos, duas vezes ao dia devido à sua farmacocinética, situação que pode dificultar a adesão à farmacoterapia (Medeiros *et al.*, 2024; Melaragno, 2021; Vitorazzo *et al.*, 2021).

1.5.2. Tratamento para quadros de demência

A doença de Alzheimer, por ser a forma mais comum de demência, será utilizada como referência dos tratamentos a seguir para os transtornos neurodegenerativos com foco no prejuízo cognitivo. Apesar da alta incidência e de sua importância social, a demência ainda não possui tratamentos com a finalidade de cura, possivelmente devido à complexidade dos transtornos. Ainda assim, dentro das farmacoterapias utilizadas

atualmente destacam-se os inibidores de acetilcolinesterase (AChE), uma vez que a diminuição de acetilcolina no cérebro pode comprometer a função cognitiva (Miculas *et al.*, 2023). Dessa forma, justamente por sua eficácia no controle do prejuízo cognitivo, os inibidores de AChE são escolha padrão de tratamento e possuem como os principais exemplos os medicamentos Rivastigmina, Galantamina e Donepezila (Reis; Marques; Marques, 2022). Tal classe medicamentosa atua por meio da diminuição do processo de envelhecimento celular, aumentando os níveis de acetilcolina na tentativa de equilibrar a neurotransmissão (Majidazar *et al.*, 2022; Miculas *et al.*, 2023; Reis; Marques; Marques, 2022). Tanto Donepezila e a Rivastigmina são fármacos seletivos para o sistema nervoso central e possuem efeitos adversos leves, sendo a posologia do primeiro de dose única no dia, enquanto o segundo é necessário ser administrado duas a três vezes no dia (Reis; Marques; Marques, 2022). A Galantamina, entretanto, não é seletiva e atua tanto na AChE quanto na butirilcolinesterase (BuChE), sendo também administrado de duas a três vezes no dia (Reis; Marques; Marques, 2022). Por outra via, tem-se o medicamento Memantina também utilizado como tratamento da doença de Alzheimer, o qual é antagonista dos receptores NMDA e atua reduzindo a atividade excessiva do glutamato (Varadharajan *et al.*, 2023). O Memantina é mais eficaz para quadros da doença moderada ou grave, diferente dos inibidores de AChE que são mais direcionados para os quadros leves a moderados. Importante característica da Memantina é a sua meia-vida plasmática muito longa (Reis; Marques; Marques, 2022).

Ambas as classes citadas começaram a ser comercializadas no início dos anos 2000 e permanecem ainda como tratamento padrão, ou seja, apesar dos avanços tecnológicos e científicos dos últimos 20 anos, o tratamento para demência não evoluiu muito. As inovações nos tratamentos aconteceram a partir de 2021 com a comercialização nos Estados Unidos de terapias baseadas em anticorpo monoclonal. O primeiro medicamento a ser comercializado e principal exemplo desta classe é Aducanumabe, sendo administrado uma vez a cada 4 semanas e atua diminuindo o acúmulo da proteína beta-amiloide ($A\beta$), que está relacionado com a neurodegeneração da doença (Varadharajan *et al.*, 2023). O tratamento com os anticorpos monoclonais é indicado para quadros leves e requerem acompanhamento médico a fim de evitar alguns efeitos adversos, como edema e hemorragia (Varadharajan *et al.*, 2023).

1.6. Sistema endocanabinoide

A *Cannabis sativa* é cultivada há milhares de anos e, atualmente, mais de 500 substâncias já foram isoladas dela. A primeira substância a ser isolada foi o canabinol em 1899, e, dentre as diversas classes das substâncias, destaca-se a dos canabinoides, a qual possui mais de 120 compostos, sendo o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) o mais conhecido. A identificação do THC, na década de 1940, deu início às pesquisas que resultaram na descoberta do sistema endocanabinoide (eCB), o qual está envolvido em diversos mecanismos do organismo, abrangendo desde o apetite até a memória (Maccarrone *et al.*, 2023; Rezende *et al.*, 2023). Tal sistema engloba os receptores canabinoides, os compostos canabinoides endógenos (chamados de endocanabinoides) e as enzimas que são responsáveis pela síntese e degradação dos endocanabinoides. Com a estrutura química do THC bem definida na década de 1960, foi possível a realização de estudos com análogos sintéticos da molécula, permitindo a descoberta dos mais relevantes receptores, os receptores canabinoides do tipo 1 (CB1R) e do tipo 2 (CB2R), os quais são receptores acoplados à proteína G e possuem uma similaridade entre eles de aproximadamente 44% da sequência de aminoácidos em seus sítios de ligação (Maccarrone *et al.*, 2023; Rezende *et al.*, 2023). Posteriormente, com o avanço das pesquisas, identificou-se os principais e mais estudados endocanabinoides ligantes do CB1R e do CB2R, o N-araquidonoiletanolamida, conhecido como anandamida (AEA), e o 2-araquidonoilglicerol (2-AG) (Maccarrone *et al.*, 2023; Rezende *et al.*, 2023). A metabolização dos endocanabinoides é realizada por duas principais enzimas, sendo a AEA metabolizada pela enzima amida hidrolase de ácido graxo (FAAH) e o 2-AG pela lipase de monoacilglicerol (MAGL) (Maccarrone *et al.*, 2023; Rezende *et al.*, 2023).

O AEA e 2-AG são, respectivamente, pertencentes às famílias *N*-aciletanolaminas e 2-monoacilgliceróis. O fato de haver outras moléculas congêneres de AEA e 2-AG que estão envolvidas com o eCB, ainda que não tenham a mesma afinidade pelos CB1R e CB2R, evidenciou o grande sistema de sinalização em que o eCB está envolvido. Da mesma forma, há ainda diversos outros canabinoides, como o canabinol e canabidivarina, que também não modulam os receptores endocanabinoides da mesma forma que o THC, AEA e 2-AG, fato que apoia a ideia de inserir o ECS em um sistema maior. Sendo assim, surgiu-se recentemente o sistema endocanabinoidoma (eCBome), referindo-se a tal amplo sistema de sinalização com importantes regulações do organismo (Maccarrone *et al.*, 2023). No presente estudo, o foco são as moléculas do eCB propriamente dito, portanto,

para mais detalhes do eCBome, há a revisão de Maccarrone e colaboradores de 2023.

O avanço das pesquisas evidencia a relação do eCB com transtornos neuropsiquiátricos, como transtornos de ansiedade e doença de Alzheimer (Maccarrone *et al.*, 2023; Rezende *et al.*, 2023). Ainda que não esteja bem esclarecido o mecanismo, sabe-se que o sistema eCB modula o eixo HPA por meio do CB1R, assim como a ativação deste receptor resulta no prejuízo da memória (Rezende *et al.*, 2023). Assim, em situações de estresse crônico, o sistema eCB parece não ser mais capaz de suprimir a resposta de estresse, ressaltando mais uma vez a presença dos componentes endocanabinoides no sistema nervoso central (Rezende *et al.*, 2023). A FAAH, por sua vez, aparenta apresentar uma relação importante com a resposta de estresse, sendo que, 24h após a exposição ao evento o estressor, os níveis de FAAH aumentam. Tal cenário é uma das justificativas da diminuição de AEA no hipocampo após um evento estressor (Morena *et al.*, 2016). Em situações de estresse crônico, o aumento da FAAH no hipocampo está possivelmente interligado à exposição sustentada à corticosterona (Morena *et al.*, 2016; Ren *et al.*, 2020). Ademais, a FAAH é possivelmente um fator essencial para a formação, manutenção e extinção de memórias traumáticas. Portanto, de maneira resumida, o evento estressor ativa o eixo HPA, desencadeando aumento de corticosterona e, conseqüentemente, eleva os níveis de FAAH, reduzindo então a disponibilidade de AEA no organismo. A baixa quantidade de AEA parece estar relacionada com as respostas ao estresse, ocasionando comportamentos do tipo ansioso e aumento do medo (Mayo *et al.*, 2022), retendo memórias traumáticas como resultado desse processo.

Assim, devido ao vasto papel fisiológico, o sistema eCB se tornou um importante alvo de estudo terapêutico para diversas patologias. O primeiro e mais notável medicamento relacionado a esse sistema disponibilizado no mercado foi Rimonabanto, um antagonista do CB1R, o qual era indicado para o tratamento da síndrome metabólica, já que a ativação do CB1R também resultava no aumento da ingestão de alimentos. Porém, o medicamento teve efeitos colaterais como náuseas e vômitos, bem como efeitos mais preocupantes como depressão, idealização suicida e transtornos de ansiedade, resultante de sua característica lipofílica que o permitia atravessar a barreira hematoencefálica. Portanto, a empresa responsável, a Sanofi, retirou o Rimonabanto do mercado dois anos após o início de uso comercial (Maccarrone *et al.*, 2023; Rezende *et al.*, 2023). Inibidores das enzimas que degradam os compostos endocanabinoides é uma via alternativa de tratamento que tem recebido grande destaque. O URB597 é um dos principais inibidores da FAAH, sendo seletivo e apresentando efeitos ansiolíticos,

antidepressivos e pró-neurogênicos, além da importante característica de não ser uma droga recompensadora (Lowe *et al.*, 2021; Piomelli; Tagne, 2025). Visando melhorias na molécula de URB597, surgiu então o URB937, o qual se apresenta como o primeiro inibidor FAAH atuando unicamente de forma periférica (Piomelli; Tagne, 2025). Posteriormente, com o aumento da atenção para os inibidores da FAAH, criou-se o PF-3845, inibindo covalentemente a enzima. O PF-3845 resulta na diminuição dos efeitos ansiogênicos do estresse, bem como na consolidação das memórias de extinção de medo (Piomelli; Tagne, 2025).

Apesar da evidente importância em investigar os mecanismos envolvendo o sistema eCB e transtornos neurológicos, há pouco conhecimento científico do assunto em fêmeas (Mizuno *et al.*, 2022). O fato de ser descrito na literatura diferenças fisiológicas entre homens e mulheres em transtornos neuropsiquiátricos, como em transtorno de estresse pós-traumático, transtornos de ansiedade e depressão (Bowers; Ressler, 2016; Diamond *et al.*, 2007; Matsuda *et al.*, 2015), corrobora a ideia de que há diferenças relacionadas aos sexos nos mecanismos endocanabinoides (Mizuno *et al.*, 2022). Tal situação já tem sido vista pela relevante interação dos hormônios sexuais com o eCB (Forner-Piquer *et al.*, 2024), ressaltando a necessidade de estudos que pontuem dimorfismos sexuais.

1.7. Estudos com fêmeas

Apesar da prevalência feminina ser maior em vários transtornos neuropsiquiátricos, ainda se percebe a normalidade sendo caracterizada com base no organismo masculino, situação que dificulta o avanço de melhorias na saúde das mulheres. Exemplo dessa problemática é a divergência da eficácia dos tratamentos entre os sexos (Beery; Zucker, 2011; Lopez; Bagot, 2021). Durante muito tempo, prevaleceu a equivocada ideia de que, devido aos ciclos hormonais, o organismo feminino era muito variável e atrapalharia a homogeneidade das pesquisas, resultando em estudos apenas com homens/machos e estendendo tais resultados para as mulheres/fêmeas, assumindo-se que os organismos masculinos e femininos funcionam da mesma forma. Atualmente, há medidas governamentais em diversos países que exigem a inclusão feminina nas pesquisas (Beery; Zucker, 2011; Lopez; Bagot, 2021). Ainda assim, em campos como neurociência, farmacologia e fisiologia, ocorre a predominância de estudos utilizando unicamente machos. Além da questão de estudo com sexo único, é necessário apontar o uso de modelos projetados em machos para estudos com fêmeas, visto que é evidente a

existência de diferenças fisiológicas e comportamentais entre os sexos. Dessa forma, os modelos podem não funcionar como o esperado (Beery; Zucker, 2011; Lopez; Bagot, 2021).

1.8. Estresse de derrota social

A utilização do protocolo de estresse de derrota social (EDS) apresenta-se como um modelo já bem estabelecido e adequado para desencadear resposta de estresse crônico, memórias traumáticas e alterações comportamentais em machos, ainda que com pequenas alterações no método (Czéh *et al.*, 2007; Da Costa *et al.*, 2023; Golden *et al.*, 2011; Santos-Costa *et al.*, 2021). O estudo de da Costa e colaboradores (2023), por exemplo, evidenciou que exposições repetidas ao EDS podem resultar em aumento de comportamentos relacionados à ansiedade, evitação social e defesa. Ademais, o estudo também relatou que este protocolo de estresse promoveu diminuição no padrão de ativação no hipocampo dorsal e um aumento da ativação no hipocampo ventral. O modelo clássico de EDS, entretanto, aparenta não ser aplicável para fêmeas, devido a uma possível falta de agressividade entre os animais, tanto em cenários fêmea-fêmea quanto macho-fêmea (Lopez; Bagot, 2021). Para resolver tal questão, variações do EDS foram criadas especialmente para estudos com fêmeas: aplicação de urina de camundongo machos em fêmeas de diferente linhagem para agressão macho-fêmea, lesão no hipotálamo para induzir agressão entre fêmeas, alterações quimiogénéticas para induzir agressão patológica em machos e exposição simultânea de machos e fêmeas com um agressor macho. Entretanto, as adaptações do EDS para modelos femininos não retratam o comportamento natural das fêmeas (Lopez; Bagot, 2021). Por outro lado, há evidências de que o agrupamento social pós desmame de camundongos fêmeas pode aumentar a reatividade social, resultando em comportamentos agressivos (Miczek *et al.*, 2001).

1.9. Testes comportamentais

Os testes comportamentais são ferramentas importantes para avaliar as possíveis mudanças nas habilidades cognitivas e no comportamento animal (Ghafarimoghadam *et al.*, 2022). O Teste de Interação Social surgiu com o objetivo de usar unicamente o comportamento natural do animal para avaliar sua sociabilidade e foi descrito por File e Hyde em 1978 (File; Hyde, 1978; File; Seth, 2003), funcionando então como uma ferramenta de controle para averiguar o efeito do modelo de estresse no animal. O Labirinto em Cruz Elevado (LCE) é um teste comportamental bem estabelecido na

literatura e amplamente utilizado para avaliar comportamentos relacionados à ansiedade, baseado no conflito entre o comportamento exploratório e a aversão natural a espaços abertos (Rodgers; Dalvi, 1997). Também comumente usado, o teste de Campo Aberto (TCA) é empregado para a avaliação comportamental, tendo como foco justamente a análise do comportamento exploratório do animal, bem como de sua atividade locomotora (Da Costa *et al.*, 2023). Por fim, descrito em 1988 por Ennaceur e Delacour, o teste de Reconhecimento de Objetos (TRO) tornou-se uma ferramenta de amplo uso para estudos de memória e aprendizado em camundongos, uma vez que promove a análise da capacidade do animal de reconhecer um estímulo previamente apresentado a partir do comportamento exploratório espontâneo (Cohen; Stackman, 2015; Lueptow, 2017).

1.10. Imunohistoquímica

As técnicas de imunofluorescência para marcadores de ativação neuronal permitem análise neurofuncional de diferentes regiões encefálicas, permitindo uma análise mais completa dos efeitos do protocolo juntamente com os dados obtidos pelos testes comportamentais. Para o estudo da função neuronal pela imunohistoquímica, os genes de expressão imediata e precoce (IEG) são frequentemente empregados. Dentre os IEGs, o gene *c-fos* sintetiza a proteína c-Fos, um fator de transcrição de amplo uso na neurociência. A transcrição desta proteína é induzida após estímulos diversos e seu auge de expressão ocorre em torno de 90 minutos após o estímulo, o que a torna adequada para analisar e mensurar o efeito de estresses após testes comportamentais (Corbett *et al.*, 2017; Lara Aparicio *et al.*, 2022; Santos-Costa *et al.*, 2021).

1.11. Hipótese

A hipótese deste estudo é que o tratamento com o inibidor da FAAH (PF-3845) atenuará de maneira distinta em camundongos machos e fêmeas o comportamento do tipo ansioso e o prejuízo na memória de curto prazo induzidos pelo estresse de derrota social, assim como as alterações no padrão de ativação neuronal do hipocampo dorsal.

2. OBJETIVOS

Investigar os efeitos da acentuação da neurotransmissão endocanabinoide sobre respostas relacionadas à ansiedade e memória de curta-duração.

2.1. Objetivos específicos

- Investigar os efeitos do tratamento agudo com o inibidor seletivo da FAAH (PF-3845), via IP, nos comportamentos relacionados à ansiedade e memória de curta-duração (cognição) em camundongos machos submetidos ao estresse de derrota social (EDS).
- Investigar os efeitos do tratamento agudo com o PF-3845, via IP, nos comportamentos relacionados à ansiedade e memória de curta-duração (cognição) em camundongos fêmeas submetidas ao EDS.
- Investigar o padrão de ativação neuronal do hipocampo dorsal e ventral em camundongos machos e fêmeas submetidos ao EDS e tratados com PF-3845, via IP.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Para a realização deste estudo, 230 camundongos heterogênicos da linhagem Swiss Webster adultos, sendo 125 machos e 105 fêmeas, provindos do Centro de Pesquisa e Produção de Animais - CPPA da Universidade Estadual Paulista – UNESP-Botucatu foram matidos em condições controladas de temperatura (23 ± 2 °C) e ciclo de luz 12/12h (luzes acesas às 7:00 horas) com água e ração *ad libitum* no biotério do laboratório de Neuropsicofarmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCFAR) da UNESP-Araraquara. O estudo passou pela aprovação do comitê de ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp Araraquara, obtendo o protocolo CEUA/FCF/CAR n°27/2023, e foi conduzido em conformidade com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Durante a realização do protocolo dos experimentos com animais machos, observou-se uma vulnerabilidade atípica em alguns lotes, resultando no óbito de animais durante a aplicação do protocolo de EDS. Ao total dos dois experimentos, houve a perda de 19 animais, número equivalente a 28,8% dos animais machos destinados ao EDS. Por eventualidades, ocorreu também o óbito de 2 animais fêmeas. Dessa forma, os dados da presente dissertação são referentes a 209 animais, sendo 106 machos e 103 fêmeas. Por experimento, tem-se 116 animais no experimento 1 (62 machos e 54 fêmeas) e 102 no experimento 2 (44 machos e 49 fêmeas).

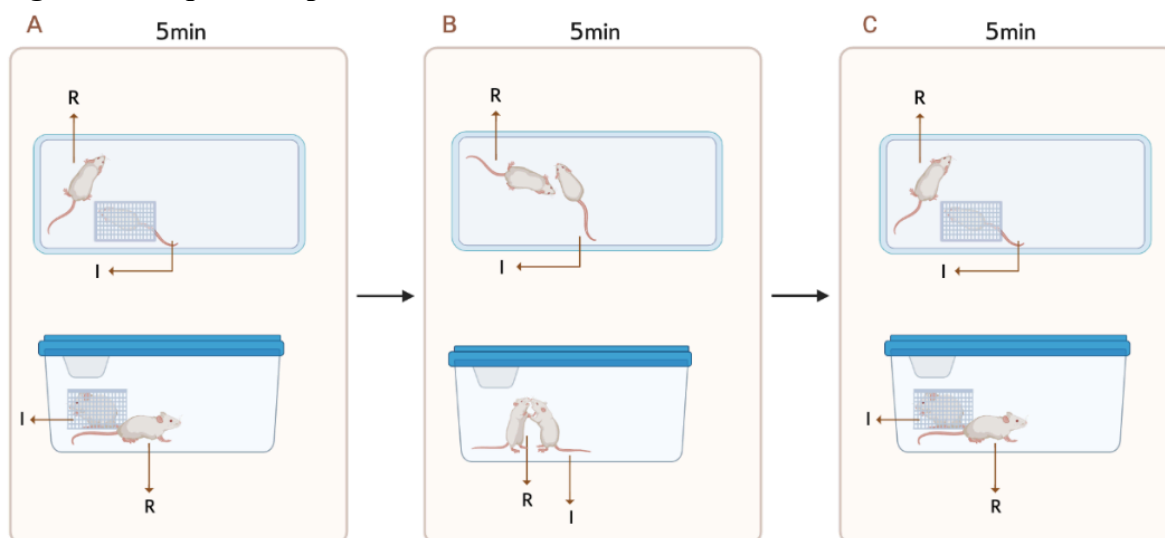
3.2. Fármacos e Soluções

O tratamento foi realizado com o fármaco PF-3845, o qual é um inibidor da FAAH (Tocris, Ellisville, MO, EUA), na dose de 5 mg/kg (Ahn et al., 2009). O fármaco foi diluído em solução composta por 1% DMSO, 1% Tween80 e 98% salina (NaCl 0,9%) (Bedse; Hill; Patel, 2020; Sakin *et al.*, 2015; Sciolino; Zhou; Hohmann, 2011). A mesma concentração dos diluentes foi utilizada para tratamento do grupo controle (veículo). O tratamento foi realizado 2 horas pré-testes comportamentais (TRO e LCE) por via intraperitoneal (IP).

3.3. Estresse de Derrota Social (EDS): EDS para machos (EDSm) e EDS para fêmeas (EDSf)

Baseado no modelo intruso-residente (Golden *et al.*, 2011; Martinez; Calvo-Torrent; Pico-Alfonso, 1998; Miczek; Thompson; Shuster, 1982), o EDSm consiste principalmente no conflito do animal experimental, denominado intruso, com um animal co-específico não familiar dominante, denominado residente. Os residentes são previamente isolados socialmente por, pelo menos, 4 semanas, a fim de estimular o comportamento territorial e agressivo. O estresse é ocasionado pela exposição do animal intruso à caixa-moradia ($28 \times 17 \times 12$ cm) do animal residente, resultando em um conflito agonístico entre ambos e, conseqüentemente, na pose de derrota social pelo intruso perante o residente. O episódio de derrota tem duração de 15 minutos e é subdividida em 3 etapas de 5 minutos, alternando entre estresse físico e estresse psicológico para o camundongo intruso: durante os 5 minutos iniciais, o intruso é inserido em uma gaiola protetora de metal ($10 \times 6 \times 15$ cm) dentro da caixa-moradia do residente, enquanto o residente está livre para exploração (momento A). Posteriormente, o intruso é retirado da gaiola protetora e exposto aos ataques do residente, ocorrendo o conflito agonístico entre os animais (momento B). Por fim, nos últimos 5 minutos, o intruso é reinsertado na gaiola protetora dentro da caixa-moradia do residente (momento C). A representação do episódio de EDSm pode ser visto na Figura 1.

Figura 1 - Esquema representativo do estresse de derrota social de machos

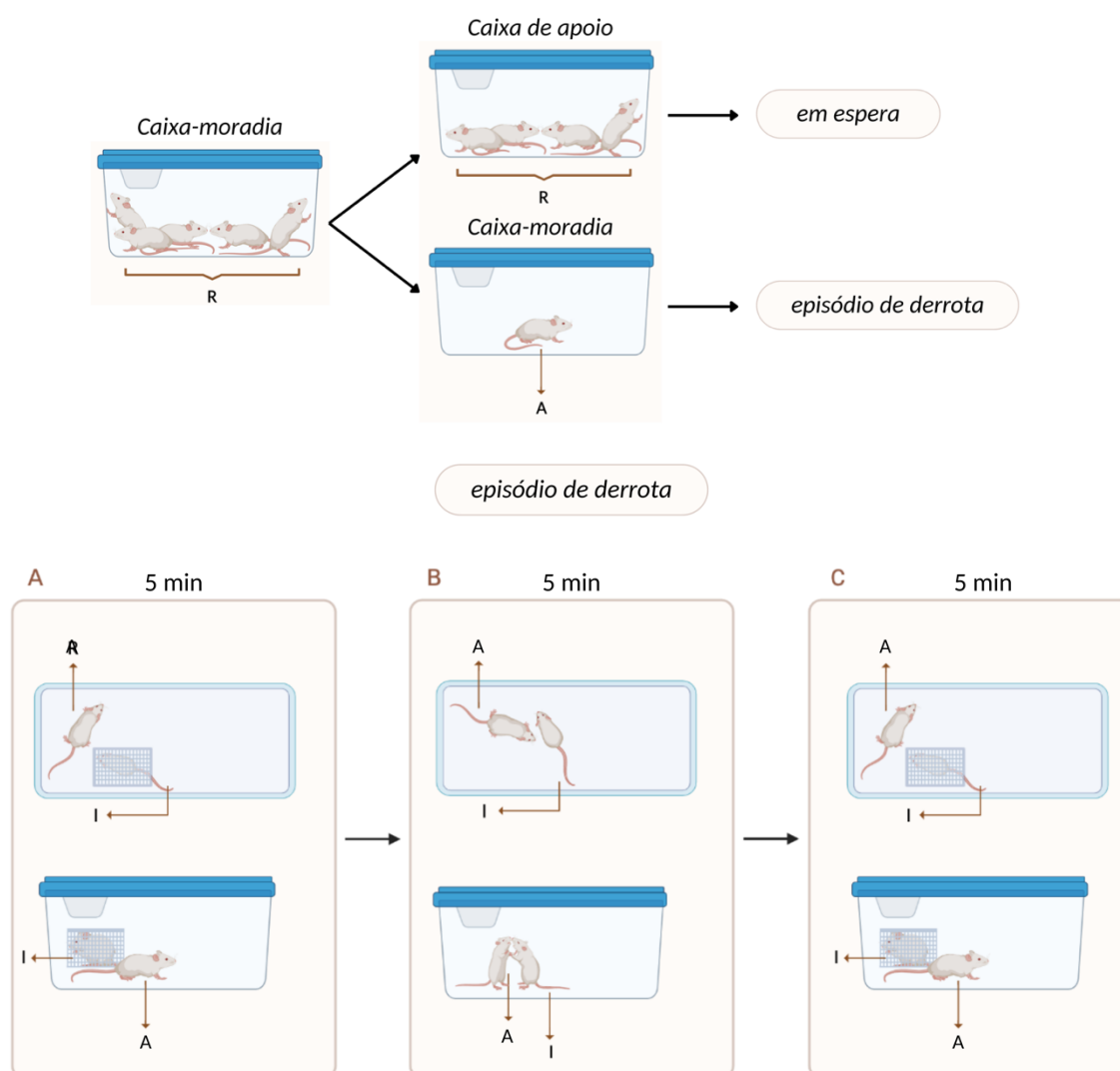


Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Legenda: Está representado o estresse psicológico (A e C) intercalado com o estresse físico (B) no protocolo de EDSm. R: Camundongo residente. I: Camundongo intruso. Imagem criada com BioRender.

Baseado no modelo intruso-residente, bem como nos dados de Miczeck (2001) e em dados do nosso grupo de pesquisa (artigo em construção), o EDSf difere do EDSm somente pela alocação das residentes fêmeas em suas caixas-moradia. Enquanto os residentes machos são previamente isolados socialmente, as residentes fêmeas vivem previamente em grupos de 4-6 animais, por, pelo menos, 4 semanas, a fim de despertar o comportamento territorial defensivo. O episódio de derrota do EDSf ocorre também na caixa-moradia das residentes ($38 \times 25 \times 24$ cm) e, para tanto, durante o episódio, os demais camundongos fêmeas da caixa-moradia da residente são realocados para outra caixa (denominada caixa de apoio), proporcionando o conflito agonístico entre apenas dois animais, a residente (agressora) e a intrusa. O episódio de derrota das fêmeas segue os mesmos 3 momentos de 5 minutos descritos no episódio de derrota dos machos, assim como está representado na Figura 2.

Figura 2 - Esquema representativo do estresse de derrota social de fêmeas



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Legenda: Está representado o preparo dos animais residentes para o episódio de EDS e o estresse psicológico (A e C) intercalado com o estresse físico (B) no protocolo de EDSf. A: Camundongo agressora; I: Camundongo intruso; R: Camundongos residentes. Imagem criada com BioRender.

Importante ressaltar que os animais residentes do EDSm e EDSf são avaliados quanto a sua agressividade antes do início do protocolo experimental, e que os episódios de derrota social ocorreram sob luz vermelha. Ao total, foram 10 episódios de derrota social, sendo um por dia e, portanto, 10 dias de protocolo de EDS para ambos os sexos. Com relação ao grupo controle, tanto de EDSm quanto EDSf, os animais também são submetidos aos 3 momentos (A, B e C) de 5 minutos, porém, é utilizado animais familiares entre si e, portanto, ocorre apenas uma interação não-agressiva (INA) na segunda etapa (momento B).

3.4. Ganho de peso

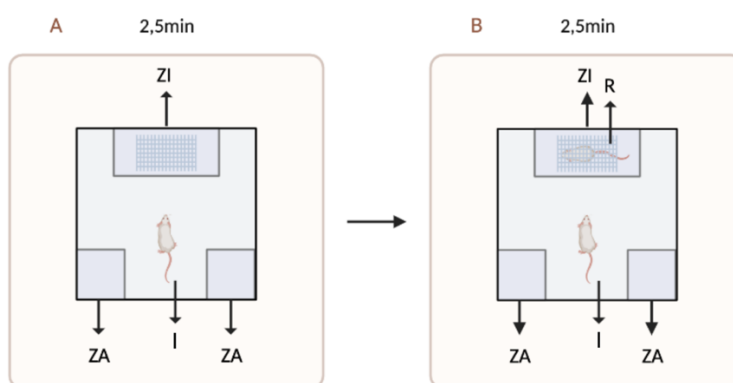
Minutos antes de iniciar o protocolo de estresse crônico, todos os animais foram pesados para obter o valor do peso inicial (P1). Ao final do protocolo de estresse, minutos antes de iniciar o TIS, os animais foram novamente pesados para coletar o valor do peso final (P2). Para a análise estatística, foi realizado o cálculo $[100*(P2-P1)]/P1$ para verificar o ganho de peso em porcentagem. Todos os valores referentes ao peso do animal foram utilizados em gramas (g).

3.5. Teste de interação Social (TIS)

O protocolo de TIS utilizado é baseado nos trabalhos de Golden e colaboradores (2011) e da Costa e colaboradores (2023) (Da Costa *et al.*, 2023; Golden *et al.*, 2011). Para este teste comportamental, os animais experimentais foram inseridos em uma arena de interação social. A arena consiste em uma caixa opaca de acrílico de paredes e assoalho cinza ($42 \times 42 \times 15$ cm). Em uma das paredes, há uma caixa de contenção de acrílico ($10 \times 6 \times 15$ cm) centralizada. A arena é dividida três zonas: (i) uma zona de interação (ZI) com área de 14×24 cm, sendo que a caixa de contenção fica inserida dentro desta zona; (ii) duas zonas de afastamento (ZA) nos cantos da arena na parede oposta à caixa de contenção, cada ZA tem área de 9×9 cm. O teste inicia-se com a avaliação da exploração basal por 150 segundos (momento A da figura 3) e, para tanto, os sujeitos experimentais foram individualmente colocados rentes e no centro da parede oposta à caixa de contenção vazia. Em seguida, o camundongo foi retirado da arena e um residente agressor (macho ou fêmea) não conhecido foi colocado dentro da caixa de contenção. A caixa de contenção

vazia foi denominada sem alvo, e quando na presença do residente, com alvo. Na sequência, como demonstrado na Figura 3, no momento B, o sujeito foi colocado novamente na arena por mais 150 segundos para avaliação do comportamento de interação social. As 2 sessões foram realizadas sob luz vermelha e filmadas por meio de uma câmera para posterior análise do comportamento por meio do programa X-PloRat. A medida de interação social foi calculada como a razão entre o tempo gasto na ZI com o alvo pelo tempo gasto na ZI sem o alvo.

Figura 3 - Esquema representativo do TIS



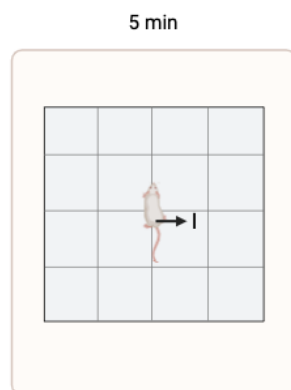
Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Legenda: R: Camundongo residente. I: Camundongo intruso. ZA: Zona de afastamento. ZI: Zona de interação. Imagem criada com BioRender.

3.6. Teste de Campo Aberto (TCA)

Desde sua criação por Calvin Hall em 1934 (Hall, 1934), surgiram diversas variações do TCA, sendo que o presente estudo utilizou o modelo descrito previamente (da Costa *et al.*, 2023). O animal foi colocado no centro de um aparato quadrado ($42 \times 42 \times 30$ cm), o qual delimita o campo aberto, por 5 minutos, podendo explorar o local livremente, como representado na Figura 4. O aparato utilizado foi o mesmo utilizado no teste de reconhecimento de objetos (seção 3.7). Neste sentido, o TCA foi realizado concomitantemente ao período de habituação do teste de reconhecimento de objetos. A sessão do teste foi gravada para posterior análise de medidas comportamentais pelo programa AnyMaze.

Figura 4 - Esquema representativo do TCA



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

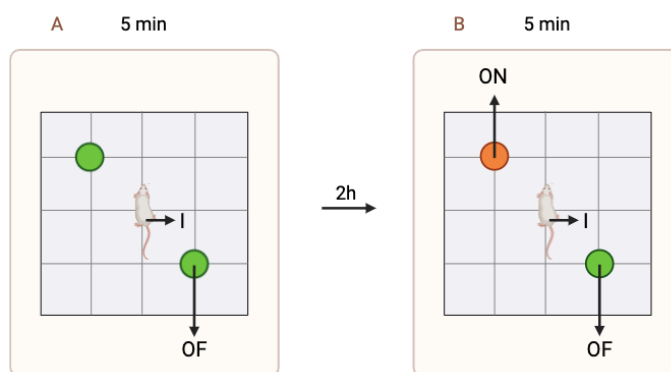
Legenda: I: Camundongo intruso. Imagem criada com BioRender.

3.7. Teste de Reconhecimento de Objetos (TRO)

O TRO é uma tarefa cognitiva baseada no comportamento espontâneo exploratório de roedores em relação a objetos (Ennaceur; Delacour, 1988). O TRO consiste em três etapas: habituação, treino ou familiarização, e teste. No presente estudo, utilizou-se o protocolo para avaliar a memória de curto-prazo e foi realizado assim como descrito previamente (da Costa *et al.*, 2023; Canto-de-Souza *et al.*, 2017). Neste sentido, 24 horas antes do treino, os animais foram colocados individualmente e de maneira randomizada no centro de um aparato com base quadrada ($42 \times 42 \times 30$ cm) por 10 minutos para a etapa de habituação (momento A da Figura 5). No dia do treino, os camundongos foram colocados individualmente no centro da arena na presença de dois objetos similares (denominados objetos familiares com tamanho, textura e pesos idênticos), onde permaneceram por 5 minutos para a exploração dos objetos. Em seguida, os animais receberam o tratamento farmacológico e, após duas horas, na sessão teste, foram colocados na mesma arena, no entanto, um dos objetos anteriores foi substituído por um novo, momento B. O tempo para a exploração dos objetos durante o teste foi de 5 minutos. O tempo de exploração dos objetos familiar (tF) e novo (tN) foi registrado durante o teste e o índice de discriminação (ID) foi calculado de acordo com a fórmula: $(tN-tF)/(tF+tN)$. De acordo com estudos prévios (Ennaceur; Delacour, 1988; Canto-de-Souza *et al.*, 2017) e do nosso grupo de pesquisa (da Costa *et al.*, 2023), animais controle exploram mais o objeto novo em relação ao familiar, quando comparados a animais estressados ou tratados com fármacos que prejudicam a memória de curto-prazo. Ambas as etapas do TRO foram gravadas por meio de uma câmera para posterior análise do comportamento pelo programa XPlorRat. Para manter a confiabilidade dos resultados do

TRO, utilizou-se como critério de exclusão o tempo mínimo de 10 segundos de exploração dos objetos na fase de treino e/ou a exploração mínima de 2 segundos dos objetos na fase teste. Nos casos em que o animal não atingiu os critérios mínimos, entendeu-se que o tempo de exploração não foi o suficiente para que pudéssemos inferir sobre a sua capacidade mnemônica. Em casos assim, os resultados desses animais foram excluídos da análise final do TRO.

Figura 5 - Esquema representativo do TRO



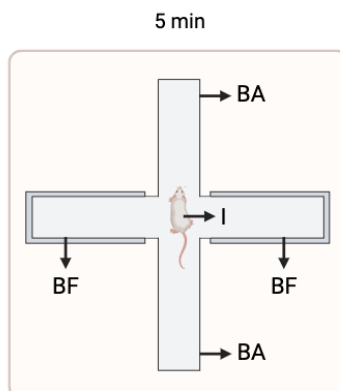
Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Legenda: I: Camundongo intruso; OF: Objeto familiar; ON: Objeto novo. Imagem criada com BioRender.

3.8. Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O LCE para camundongos é similar ao descrito por Lister (Lister, 1987), e foi o mesmo já utilizado em nosso laboratório (Miguel; Nunes-de-Souza, 2011; Morais-Silva *et al.*, 2021; Santos-Costa *et al.*, 2021). Resumidamente, cada animal foi colocado sobre a plataforma central do LCE, com a cabeça voltada para um dos braços abertos e pôde explorar o aparato por um período de 5 minutos, quando foram registrados os índices convencionais de ansiedade (entradas e tempo gasto nos braços abertos do aparato) e locomoção (frequência de entradas nos braços fechados). Definiu-se como entrada nos braços abertos e fechados o momento em que o animal esteve posicionado com as 4 patas no braço em questão. O teste foi gravado e analisado por meio do programa XPloRat, e está representado na Figura 6.

Figura 6 - Esquema representativo do LCE



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Legenda: BA: Braço Aberto; BF: Braço Fechado. Imagem criada com BioRender.

3.9. Imunofluorescência

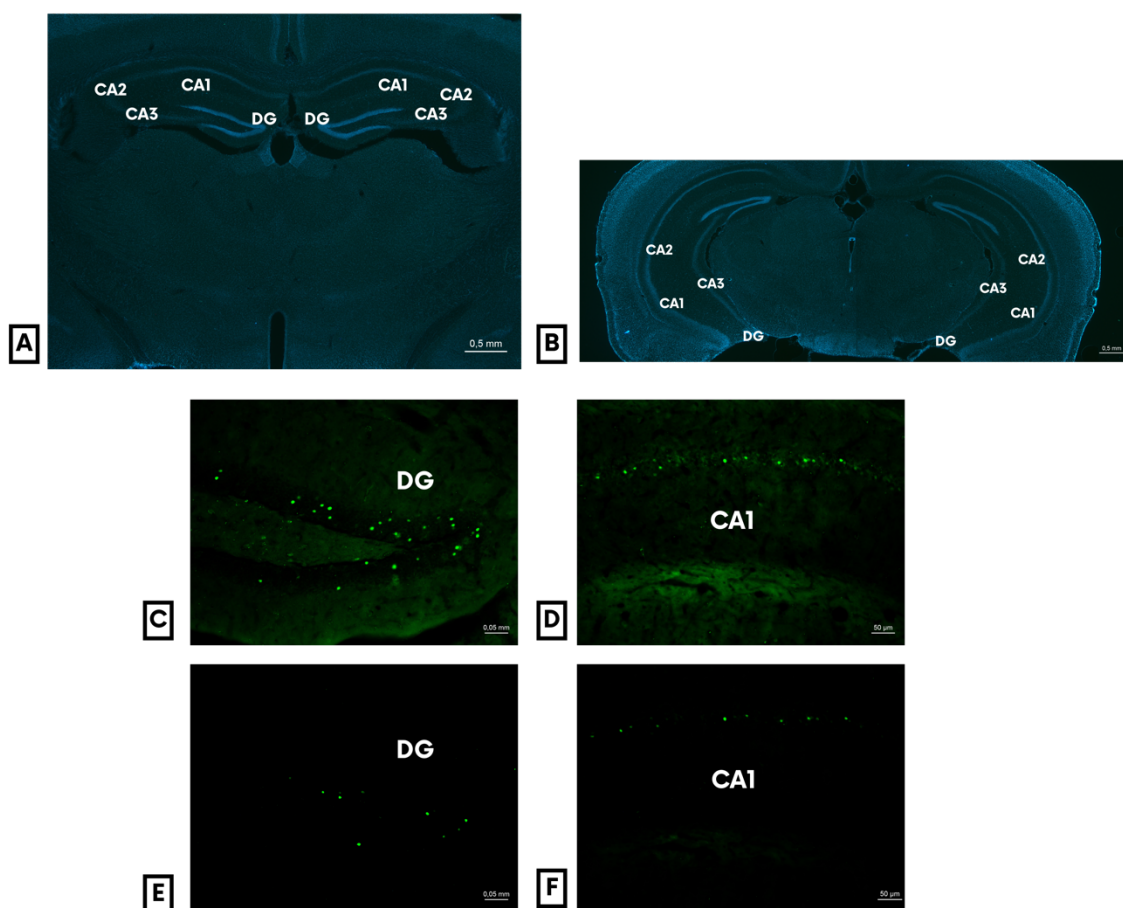
A proteína cFos foi utilizada como biomarcador de atividade neuronal, uma vez que a excitação neuronal leva a uma indução rápida e transitória de cFos (Morgan *et al.*, 1987). Sendo assim, considerando que o período de maior concentração da proteína ocorre 90 minutos após o último estímulo (Bullitt, 1990), o protocolo de perfusão nos animais foi realizado 90 minutos após o último teste comportamental (TRO/LCE) de cada experimento. O protocolo de perfusão consistiu em anestésiar (IP) os animais com uretana 25% na dose de 0,1mL/10g. Em seguida, os animais foram perfundidos (12 ml/min) com solução tampão fosfato de sódio (PBS) seguida de paraformaldeído 4% (PFA4%). Ao final do processo de perfusão, os encéfalos foram pós-fixados em PFA 4% por 1h e, em seguida, transferidos para solução de sacarose 30% em PBS a 4°C e posteriormente armazenados no freezer -80°C.

A fim de preparar os encéfalos para realizar o processo imuno-histoquímico, utilizando o criostato, os encéfalos foram fatiados em secções coronais (35 µm), selecionando os cortes das regiões do hipocampo dorsal e ventral. Para tanto, utilizou-se como referência a faixa de Bregma -0,94 a -2,46 para o hipocampo dorsal e a faixa de Bregma -2,54 a -3,52 para o hipocampo ventral. A fim de analisarmos a diferença funcional entre os hemisférios, foi realizada a marcação com uma agulha no hemisfério direito. Para a realização da etapa imuno-histoquímica foi utilizado como referência a média do grupo no ID (experimento 1) e na %TBA (experimento 2) para, então, selecionar os 6 animais com o comportamento mais semelhante à média do grupo. Tal seleção foi realizada em todos os 16 grupos do estudo, e com os cortes dos encéfalos desses animais foi realizada a imuno-histoquímica e, posteriormente, a quantificação da proteína cFos.

As fatias, então, foram lavadas 3 vezes por 10 minutos com tampão fosfato (PB) e, em seguida, incubadas com solução bloqueadora por 1h em temperatura ambiente. Na sequência, as fatias foram incubadas com os anticorpos primários anti-cFos (ab134122; 1:1000) por, pelo menos, 16h a 4°C. Posteriormente, no dia seguinte, as fatias foram lavadas com PB 6 vezes por 5 minutos e incubadas com o anticorpo secundário Alexa Fluor 488 (ab150077; 1:1000) por 2h à temperatura ambiente. Por fim, o material foi lavado novamente com PB 6 vezes por 5 minutos, sendo posteriormente montado e selado em lâminas gelatinizadas usando Fluoroshield Mounting Medium+DAPI (Sigma-Aldrich) e lamínula. A imunomarcacão foi capturada por uma câmara microscópica AxioCam 503 colorida (Zeiss), acoplada ao microscópio Axio Imager, nas regiões hipocâmpais DG e CA1 (dorsal e ventral bilateralmente). A quantificação de células positivas para cFos, por sua vez, foi realizada por meio do software ImageJ (NIH) (Baptista-de-Souza *et al.*, 2020; Canto-de-Souza *et al.*, 2025a, 2025b). Na Figura 7A, está uma fotomicrografia representativa da região dHPC, bem como das sub-regiões utilizadas: CA1 (Figura 7C) e DG (Figura 7D). Ainda, tem-se as fotomicrografias representativas da redução do background utilizada para realizar a quantificação da proteína cFos (em verde) em cada sub-região (Figura 7E e 7F).

Durante essa etapa do estudo, enfrentaram-se dificuldades na obtenção de cortes adequados dos encéfalos na região do vHPC. Ainda assim, com os cortes disponíveis, realizou-se o processo imuno-histoquímico, bem como a captura da imunomarcacão dessa região (Figura 7B), porém, o N experimental dos grupos estava abaixo do ideal, impossibilitando a realização da análise dos dados referentes ao vHPC. Dessa forma, os resultados apresentados na seção 4 são referentes apenas ao dHPC.

Figura 7 - Imagem representativa da imunomarcação na região dHPC e vHPC



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Legenda: Imagem A: Fotomicrografia ampliada em 2,5x de um corte coronal do encéfalo de um camundongo macho na região do dHPC. DAPI foi utilizado para marcação nuclear. Bregma -1,70 dHPC: Hipocampo dorsal. Imagem B: Fotomicrografia ampliada em 2,5x de um corte coronal do encéfalo de um camundongo macho na região do vHPC. DAPI foi utilizado para marcação nuclear. Bregma -2,92. Imagem C: Fotomicrografia ampliada em 20x representativa da marcação da proteína cFos (verde), utilizada como referência anatômica da região DG do dHPC. Imagem D: Fotomicrografia ampliada em 20x representativa da marcação da proteína cFos (verde), utilizada como referência anatômica da região CA1 do dHPC. Imagem E: Fotomicrografia representativa da redução do background utilizada para a quantificação da expressão de proteínas cFos na região DG. Imagem F: Fotomicrografia representativa da redução do background utilizada para a quantificação da expressão de proteínas cFos na região CA1.

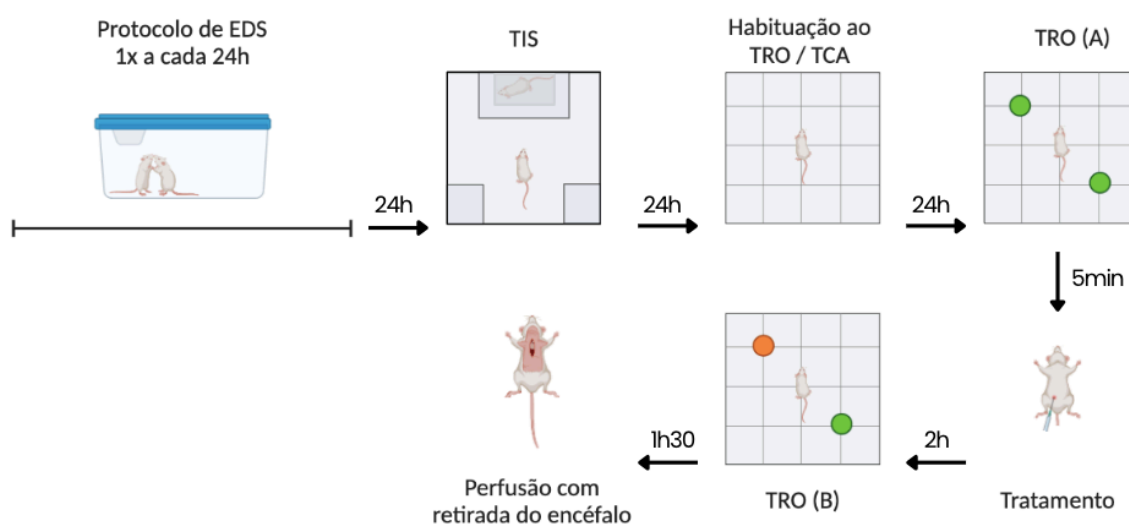
3.10. Delineamento Experimental

3.10.1. Experimento 1 – Efeitos do tratamento com inibidor da FAAH sobre respostas relacionadas à memória de curta duração e padrão de ativação do hipocampo dorsal de camundongos machos e fêmeas submetidos ao EDS

O experimento 1 consistiu em 10 episódios de EDS, sendo um episódio por dia com intervalo de 24 horas entre cada episódio. Após 24 horas do último episódio, o indivíduo foi submetido ao TIS, e após 24h novamente, no 12º dia de protocolo, o

indivíduo passou pela habituação da arena usada no TRO, concomitantemente ao TCA. Após 24h, no último dia do protocolo, os animais foram submetidos à etapa de familiarização dos objetos no TRO e, na sequência, foram tratados com solução veículo ou PF-3845, a depender do grupo. Duas horas após, os animais foram submetidos à etapa de teste do TRO. Noventa minutos após o teste, os animais foram anestesiados e perfundidos para a retirada do encéfalo para posterior realização do processo de imunofluorescência. O delineamento do experimento está representado na Figura 8.

Figura 8 - Esquema representativo do experimento 1 do protocolo de estudo



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Legenda: EDS: Estresse de derrota social. TIS: Teste de interação social. TRO: Teste de Reconhecimento de Objeto. TCA: Teste do Campo Aberto. Imagem criada com BioRender.

O protocolo experimental consistiu em 8 grupos, sendo:

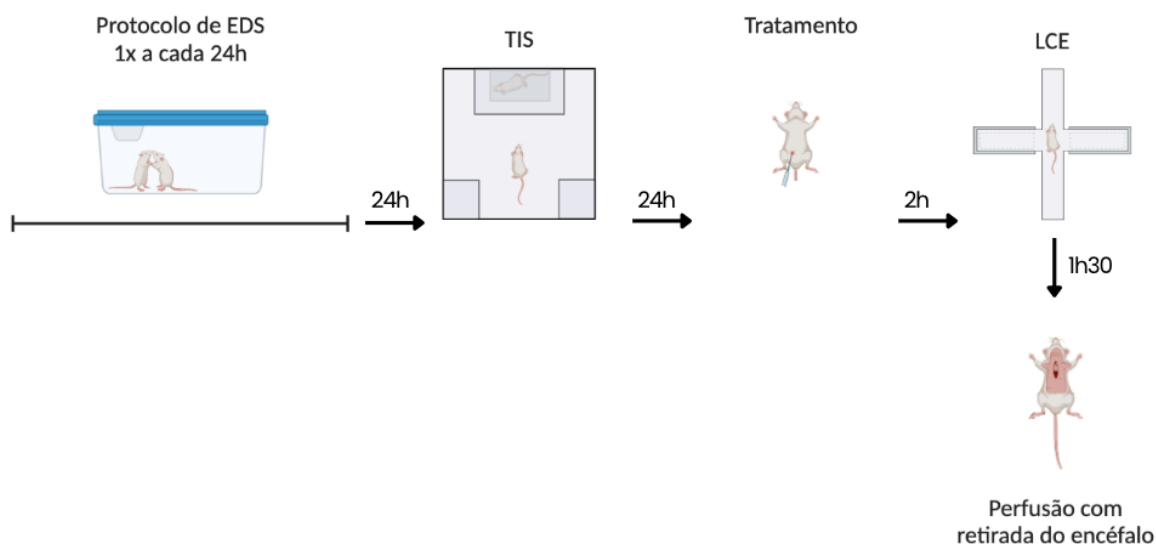
- (i) Machos submetidos ao protocolo de EDS, subdivididos em:
 - i.a.: Intrusos do EDS tratados com veículo;
 - i.b.: Intrusos do EDS tratados com PF-3845.
 - i.c.: "Intrusos" da INA tratados com veículo (grupo controle);
 - i.d.: "Intrusos" da INA tratados com PF-3845 (grupo controle);

- (ii) Fêmeas submetidas ao protocolo de EDS, subdivididas em:
 - ii.a.: Intrusas do EDS tratados com veículo;
 - ii.b.: Intrusas do EDS tratados com PF-3845.
 - ii.c.: "Intrusas" da INA tratados com veículo (grupo controle);
 - ii.d.: "Intrusas" da INA tratados com PF-3845 (grupo controle);

3.10.2. Experimento 2 - Efeitos do tratamento com inibidor da FAAH sobre respostas relacionadas à ansiedade e padrão de ativação do hipocampo dorsal em camundongos machos e fêmeas ao EDS.

Assim como no primeiro experimento, os animais foram submetidos a 10 sessões de EDS. Após 24h do último episódio, os animais foram submetidos ao TIS e, 24h após, no último dia do protocolo, os animais foram tratados com solução veículo ou PF-3845 e, duas horas após, testados no LCE. Noventa minutos após o teste, os animais foram submetidos ao procedimento de perfusão para a retirada do encéfalo para posterior realização do protocolo de imunofluorescência. O delineamento do experimento está representado na Figura 9.

Figura 9 - Esquema representativo do experimento 2 do protocolo de estudo



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Legenda: EDS: Estresse de derrota social. TIS: Teste de interação social. LCE: Labirinto em Cruz Elevado. Imagem criada com BioRender.

O protocolo experimental consistiu em 8 grupos, sendo:

- (i) Machos submetidos ao protocolo de EDS, subdivididos em:
 - i.a.: Intrusos do EDS tratados com veículo;
 - i.b.: Intrusos do EDS tratados com PF-3845.
 - i.c.: "Intrusos" da INA tratados com veículo (grupo controle);
 - i.d.: "Intrusos" da INA tratados com PF-3845 (grupo controle);

- (ii) Fêmeas submetidas ao protocolo de EDS, subdivididas em:
 - ii.a.: Intrusas do EDS tratados com veículo;
 - ii.b.: Intrusas do EDS tratados com PF-3845.
 - ii.c.: "Intrusas" da INA tratados com veículo (grupo controle);
 - ii.d.: "Intrusas" da INA tratados com PF-3845 (grupo controle);

3.11. *Análise estatística*

Após a coleta, os dados referentes à exploração do aparato no TIS foram submetidos à análise de variância (ANOVA) multifatorial para medidas repetidas, sendo considerado dois fatores [fator 1: condição (INA ou EDS); fator 2: alvo (com ou sem alvo)]. Além disso, foi conduzido um teste *t* para medidas independentes com os dados da razão de interação da ZI. Da mesma forma, os dados do ganho de peso e do TCA também foram submetidos ao teste *t* para medidas independentes. Já com os dados do TRO, em uma análise individual para cada objeto (familiar ou novo), foi realizado uma ANOVA fatorial com 2 fatores [fator 1: condição (INA ou EDS); fator 2: tratamento (veículo ou PF-3845)]. Para a comparação de exploração entre os objetos, foi conduzido o teste *t* para medidas dependentes dentro de cada grupo experimental. Os dados do LCE foram submetidos à ANOVA multifatorial, utilizando 2 fatores [fator 1: condição (INA ou EDS); fator 2: tratamento (veículo ou PF-3845)]. Por fim, a estatística da imunomarcção consistiu em uma ANOVA multifatorial de medidas repetidas com 3 fatores [fator 1: condição (INA ou EDS); fator 2: tratamento (veículo ou PF-3845); fator 3: hemisfério (esquerdo ou direito)]. Nos casos de significância, as análises foram seguidas pelo teste de comparações múltiplas de Duncan, sendo o valor de *p* menor ou igual a 0,05 considerado como significativo.

4. RESULTADOS

4.1. Experimento 1 – Efeitos do tratamento com inibidor da FAAH sobre respostas relacionadas à memória de curta duração e padrão de ativação do hipocampo dorsal de camundongos machos e fêmeas submetidos ao EDS

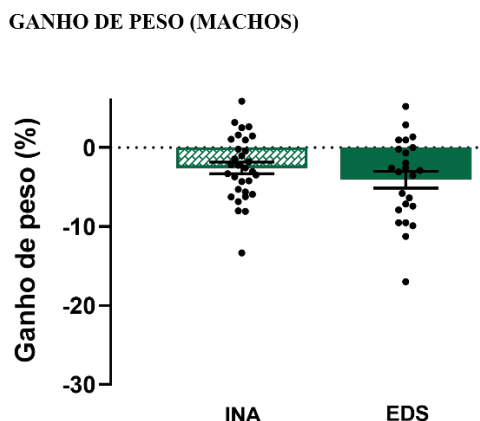
Importante ressaltar que, uma vez que o tratamento é realizado apenas no 13° dia de protocolo, os resultados dos testes comportamentais do 11° (TIS) e 12° (TCA) dia de protocolo estão distribuídos apenas nos grupos de condição (EDS/INA), desconsiderando o tratamento recebido posteriormente.

- Resultados dos camundongos machos

4.1.1. Ganho de peso

Na Figura 10, estão representados os dados obtidos pela análise do ganho de peso dos animais machos. O teste *t* para amostras independentes para a análise do ganho de peso dos animais machos não indicou diferença significativa entre os grupos [GP: $t_{(53)}=1,20$, $p=0,24$]. O resultado indica então que ambos os grupos tiveram uma perda de peso de forma similar.

Figura 10 - Efeito do estresse crônico sobre o ganho de peso em camundongos machos submetidos ao protocolo de estresse de derrota social



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Legenda: Ganho de peso referente aos animais machos. As colunas representam as médias (\pm EPM). INA, interação não-agressiva (n=31); EDS, estresse de derrota social (n=24);

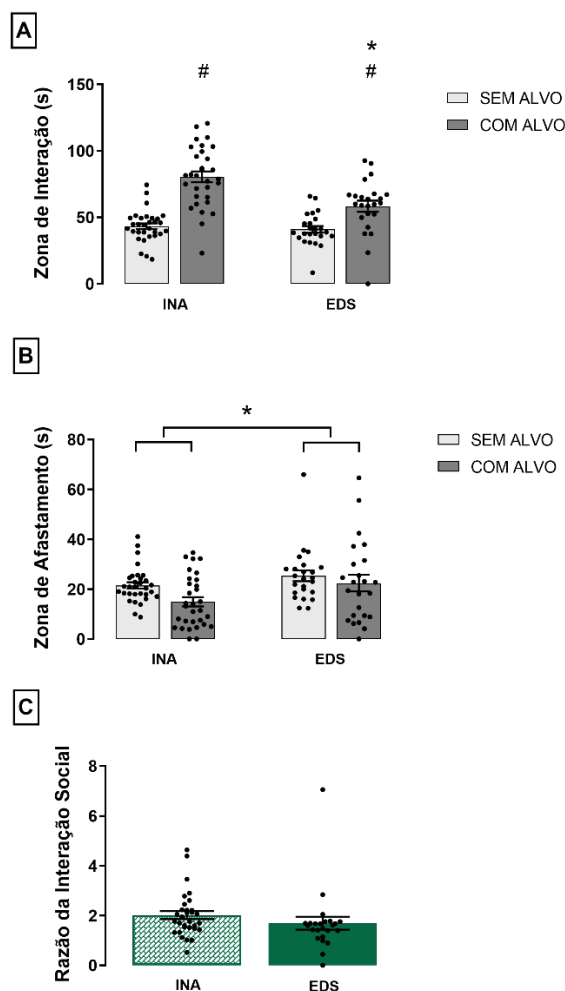
4.1.2. Teste de Interação Social

Os dados obtidos pelo TIS realizado com sujeitos machos estão representados na Figura 11. A ANOVA multifatorial de medidas repetidas indicou diferença estatística no

tempo de exploração da ZI sem o alvo em relação ao tempo de exploração da ZI na presença do alvo independente da condição (EDS/INA) [ZI: $F_{1(1,53)} = 13,07$, $p=0,0007$; $F_{2(1,53)} = 67,97$, $p = 0,00$; $F_{1 \times F_{2(1,53)}} = 8,95$, $p = 0,004$]. O teste *post-hoc* de Duncan indicou ser maior o tempo de exploração na ZI na presença do alvo para ambas as condições ($p \leq 0,0001$), além de que o grupo EDS explora menos a ZI em comparação ao grupo INA na presença do alvo ($p = 0,0001$) (Figura 11A). Os resultados referentes ao tempo de exploração da ZA são representados na Figura 11B. A ANOVA multifatorial de medidas repetidas indicou diferença estatística apenas para o fator condição e alvo, sem haver interação entre os fatores [ZA: $F_{1(1,53)} = 6,04$, $p=0,02$; $F_{2(1,53)} = 5,47$, $p = 0,02$; $F_{1 \times F_{2(1,53)}} = 0,82$, $p = 0,37$]. O teste *post-hoc* de Duncan indicou ser menor o tempo de exploração na ZA na presença do alvo para ambas as condições ($p = 0,02$), bem como indicou que o grupo EDS explora mais a ZA em comparação ao grupo INA na presença do alvo ($p = 0,02$) (Figura 11B). Por fim, em relação à razão da interação social (RI), o teste *t* para medidas independentes não indicou diferença estatística entre os grupos [RI: $t_{(53)} = 1,13$, $p= 0,08$] (Figura 11C). Então, o conjunto de resultados indica que os animais submetidos ao EDS apresentam diminuição na sociabilidade quando comparado ao grupo controle, ainda que ambos os grupos apresentem interesse em interagir com um coespecífico.

Figura 11 - Efeito do estresse crônico sobre o comportamento de evitação social em camundongos machos submetidos ao protocolo de estresse de derrota social

TESTE DE INTERAÇÃO SOCIAL (MACHOS)



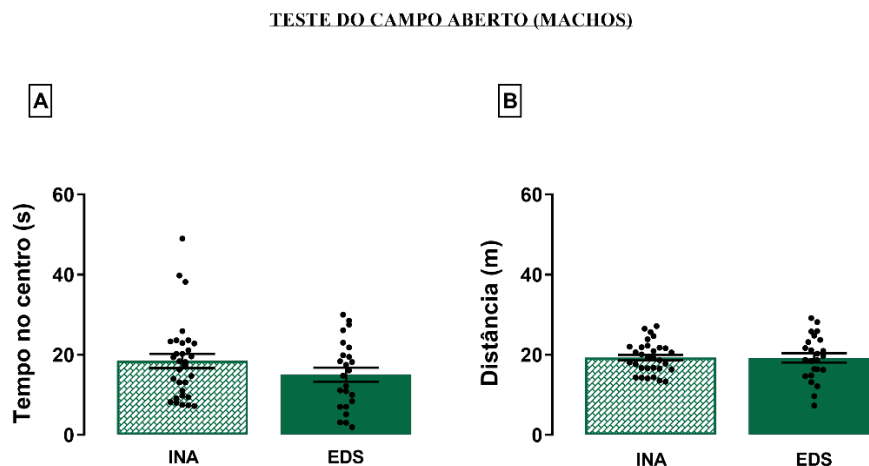
Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Legenda: Gráfico A: Tempo gasto pelo animal na zona de interação. Gráfico B: Tempo gasto na zona de afastamento. Gráfico C: Valores referentes à razão de interação social. As colunas representam as médias (\pm EPM). * $p \leq 0,05$ EDS vs INA. # $p \leq 0,05$ em relação ao sem alvo. INA, interação não-agressiva (n=31); EDS, estresse de derrota social (n=24); ZI, zona de interação; ZA, zona de afastamento.

4.1.3. Teste do Campo Aberto

Na Figura 12, está representado os dados obtidos no TCA com os animais machos. O teste t para amostras independentes para a análise do tempo gasto no centro da arena pelo animal não indicou diferença significativa entre as condições: animais submetidos ao EDS e animais submetidos à INA [TC: $t_{(53)} = 1,35$, $p = 0,18$]. Da mesma forma, não há diferença significativa entre as condições para a análise referente à distância percorrida pelo animal durante o teste [D: $t_{(53)} = 0,04$, $p = 0,97$]. O resultado indica então que ambos os grupos tiveram um comportamento exploratório similar no aparato.

Figura 12 - Efeito do estresse crônico sobre o comportamento de exploração em camundongos machos submetidos ao protocolo de estresse de derrota social



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

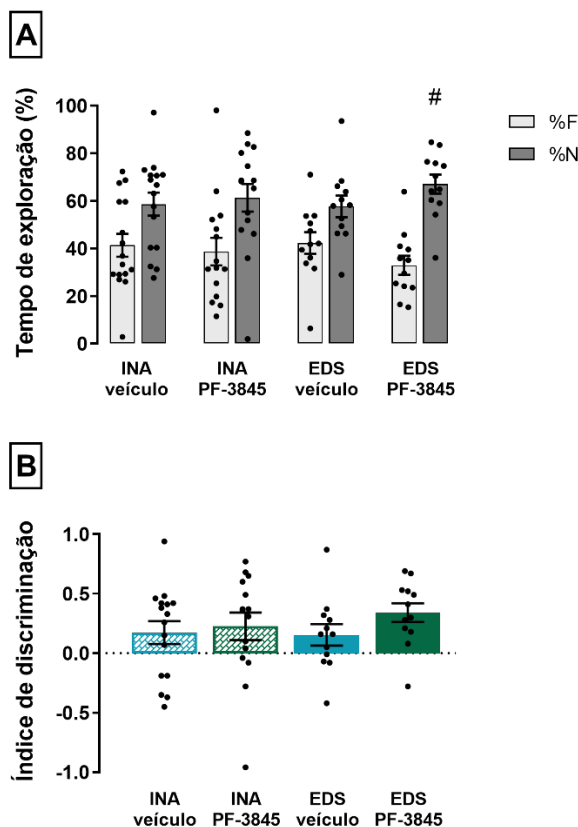
Legenda: Gráfico A: Tempo gasto no centro do aparato. Gráfico B: Distância total percorrida durante o teste. As colunas representam as médias (\pm EPM). INA, interação não-agressiva (n=31); EDS, estresse de derrota social (n=24).

4.1.4. Teste do Reconhecimento de Objetos

A Figura 13 representa os dados obtidos no teste de reconhecimento de objetos com animais machos. A análise de variância multifatorial para medidas repetidas para os dados de tempo de exploração dos objetos entre os grupos indicou não haver diferença significativa [%F ou %N: $F_{1(1,51)} = 1,63$, $p = 0,21$; $F_{2(1,51)} = 0,09$, $p = 0,77$; $F_{1 \times F_{2(1,51)}} = 1,50$, $p = 0,23$]. Já com relação à comparação de exploração dos objetos dentro de cada grupo, obteve-se os seguintes resultados: grupo INA veículo: $t_{(14)} = -1,78$, $p = 0,09$; grupo INA tratado: $t_{(14)} = -0,73$, $p = 0,47$; EDS veículo: $t_{(11)} = -1,25$, $p = 0,24$; grupo EDS tratado: $t_{(11)} = -4,31$, $p = 0,001$. Dessa forma, a análise indicou diferença estatística na exploração entre o objeto familiar e novo apenas no grupo EDS que recebeu o tratamento com o PF-3845, o qual explorou mais o objeto novo em comparação à exploração no objeto familiar (Figura 13A). Para o índice de discriminação dos objetos, a análise de variância de duas vias indicou não haver diferença entre os grupos [ID: $F_{1(1,51)} = 0,22$, $p = 0,64$; $F_{2(1,51)} = 1,40$, $p = 0,24$; $F_{1 \times F_{2(1,51)}} = 0,44$, $p = 0,51$], como está representado na Figura 13B.

Figura 13 - Efeito do tratamento sobre a memória em camundongos machos submetidos ao protocolo de estresse de derrota social

TESTE DO RECONHECIMENTO DE OBJETOS (MACHOS)



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

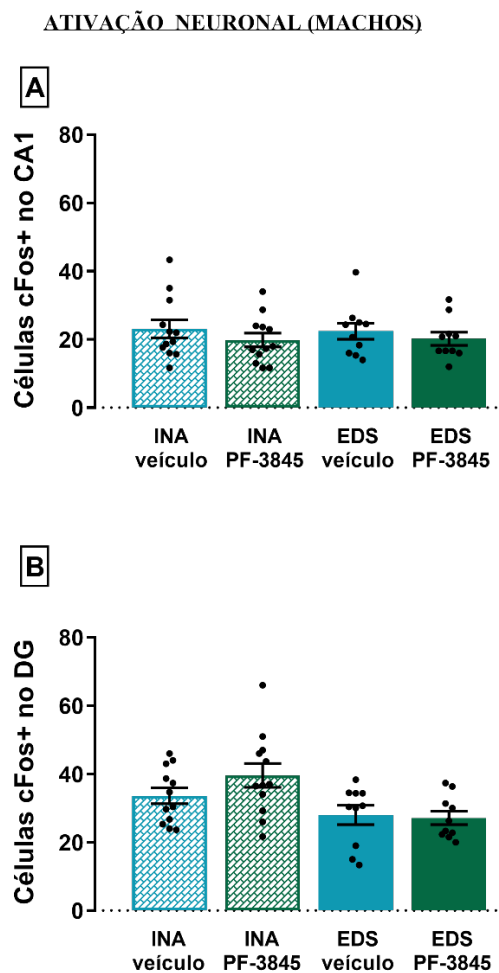
Legenda: Gráfico A: Tempo gasto explorando os objetos. Gráfico B: Índice de discriminação dos objetos pelo animal. As colunas representam as médias (\pm EPM). # $p < 0,05$ %F vs %N. INA, interação não-agressiva; EDS, estresse de derrota social; %F, porcentagem do tempo de exploração do objeto familiar; %N, porcentagem do tempo de exploração do objeto novo; INA veículo: $n=16$; INA PF-3845: $n=15$; EDS veículo: $n=12$; EDS PF-3845: $n=15$.

4.1.5. Ativação neuronal da proteína cFos

Na Figura 14, estão representados os dados obtidos com camundongos machos submetidos ao protocolo do experimento 1 pela análise da imunomarcação da proteína cFos em cortes coronais de encéfalos na região do dHPC, com foco nas sub-regiões CA1 (Figura 14A) e DG (Figura 14B). Visto a ausência de diferença estatística entres os hemisférios, optamos por representar os dados sem a divisão entre hemisférios. A ANOVA multifatorial de medidas repetidas indicou não haver diferenças significativas nos 3 fatores analisados e em suas interações no CA1 e no DG [CA1: $F_{1(1,17)} = 0,10$, $p = 0,75$; $F_{2(1,17)} = 1,00$, $p = 0,33$; $F_{3(1,17)} = 0,17$, $p = 0,68$; $F_{1 \times F_{2(1,17)}} = 2,44$, $p = 0,14$; $F_{1 \times F_{3(1,17)}} = 2,45$, $p = 0,13$; $F_{2 \times F_{3(1,17)}} = 0,37$, $p = 0,55$; $F_{1 \times F_{2 \times F_{3(1,17)}}} = 1,76$, $p = 0,20$;

DG: $F_{1(1,18)} = 0,23$, $p = 0,64$; $F_{2(1,18)} = 2,17$, $p = 0,16$; $F_{3(1,18)} = 1,00$, $p = 0,33$; $F_{1 \times F_{2(1,18)}} = 2,48$, $p = 0,13$; $F_{1 \times F_{3(1,18)}} = 0,03$, $p = 0,87$; $F_{2 \times F_{3(1,18)}} = 0,35$, $p = 0,56$; $F_{1 \times F_{2 \times F_{3(1,18)}}} = 0,74$, $p = 0,40$]. Assim, os dados evidenciam que a expressão de cFos foi similar entre os grupos e bilateralmente em ambas as regiões.

Figura 14 - Efeito do tratamento sobre a expressão da proteína cFos no hipocampo dorsal de camundongos machos submetidos ao protocolo de estresse de derrota social



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Legenda: Gráfico A: Quantificação de células cFos+ na região CA1 do dHPC. Gráfico B: Quantificação de células cFos+ na região DG do dHPC. As colunas representam as médias (\pm EPM). INA, interação não-agressiva; EDS, estresse de derrota social; INA veiculo: n=6; INA PF-3845: n=5; EDS veiculo: n=5; EDS PF-3845: n=5.

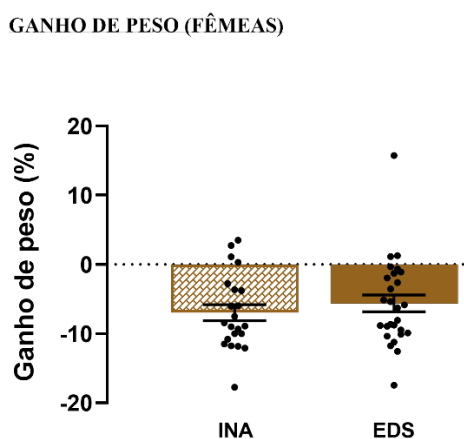
- Resultados dos camundongos fêmeas

4.1.6. Ganho de peso

Na Figura 15, está representado os dados obtidos pela análise do ganho de peso dos animais fêmeas. O teste t para amostras independentes para a análise do ganho de

peso dos animais indicou não haver diferença entre o ganho de peso dos grupos [GP: $t_{(47)} = -0,78$, $p = 0,44$].

Figura 15 - Efeito do estresse crônico sobre o ganho de peso em camundongos fêmeas submetidos ao protocolo de estresse de derrota social



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

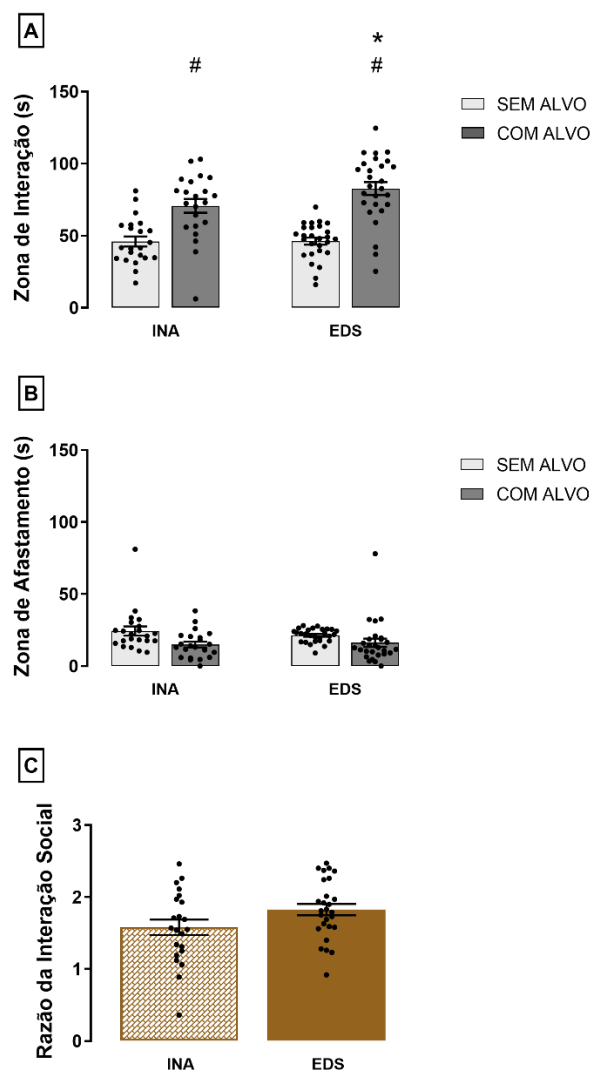
Legenda: Ganho de peso referente aos animais fêmeas. As colunas representam as médias (\pm EPM). INA, interação não-agressiva ($n=22$); EDS, estresse de derrota social ($n=27$);

4.1.7. Teste de Interação Social

Os dados obtidos pelo TIS realizado com sujeitos fêmeas estão representados na Figura 16. A ANOVA multifatorial de medidas repetidas indicou diferença estatística no tempo de exploração da ZI sem o alvo em relação ao tempo de exploração da ZI na presença do alvo independente da condição, bem como revelou diferença significativa na interação entre o fator alvo e condição [ZI: $F_{1(1,47)} = 1,62$, $p = 0,21$; $F_{2(1,47)} = 151,02$, $p = 0,00$; $F_{1 \times F_{2(1,47)}} = 837,8$, $p = 0,02$]. O teste *post-hoc* de Duncan indicou que os animais exploram por mais tempo a ZI quando há a presença do alvo em ambas as condições ($p \leq 0,0001$), além de que o grupo EDS explora mais a ZI com o alvo presente em comparação a mesma situação no grupo INA ($p=0,03$), como representado na Figura 16A. Os resultados da exploração da ZA indicaram diferença significativa apenas o fator alvo [ZA: $F_{1(1,47)} = 0,14$, $p=0,71$; $F_{2(1,47)} = 9,33$, $p=0,004$; $F_{1 \times F_{2(1,47)}} = 0,78$, $p=0,38$]. O teste *post-hoc* indicou que os grupos exploram menos a ZA quando há a presença do alvo, independente da condição ($p = 0,005$). A análise da RI das fêmeas não apresentou diferença estatística entre os grupos [RI: $t_{(47)} = -1,89$, $p = 0,06$].

Figura 16 - Efeito do estresse crônico sobre o comportamento de evitação social em camundongos fêmeas submetidos ao protocolo de estresse de derrota social

TESTE DE INTERAÇÃO SOCIAL (FÊMEAS)



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

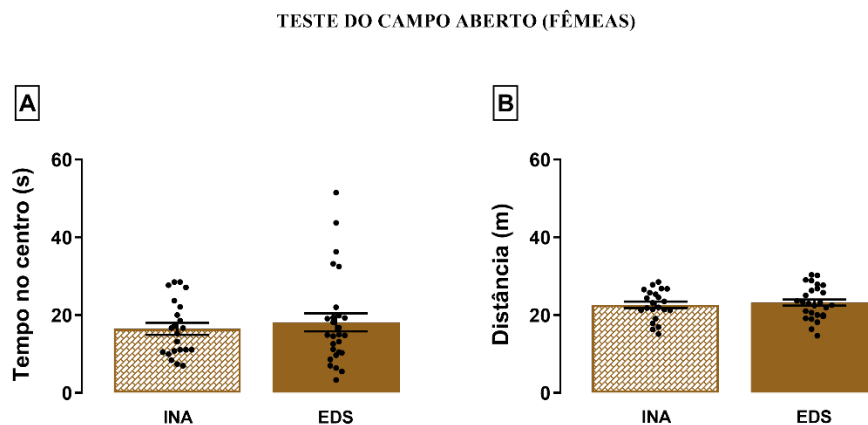
Legenda: Gráfico A: Tempo gasto pelo animal na zona de interação. Gráfico B: Tempo gasto na zona de afastamento. Gráfico C: Valores referentes à razão de interação social. As colunas representam as médias (\pm EPM). * $p \leq 0,05$ EDS com alvo vs INA com alvo. # $p \leq 0,05$ em relação ao sem alvo. INA, interação não-agressiva (n=22); EDS, estresse de derrota social (n=27); ZI, zona de interação; ZA, zona de afastamento.

4.1.8. Teste do Campo Aberto

Na Figura 17, está representado os dados obtidos no TC com os animais fêmeas. O teste t para amostras independentes para a análise do tempo gasto no centro da arena pelo animal não indicou diferença significativa entre as condições: animais submetidos ao EDS e animais submetidos à INA [TC: $t_{(47)} = -0,57$, $p = 0,57$ (figura 17A). Da mesma

forma, não há diferença significativa entre as condições para a análise referente à distância percorrida pelo animal durante o teste [D: $t_{(47)} = -0,50$, $p = 0,62$] (Figura 17B).

Figura 17 - Efeito do estresse crônico sobre o comportamento de exploração em camundongos fêmeas submetidos ao protocolo de estresse de derrota social



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

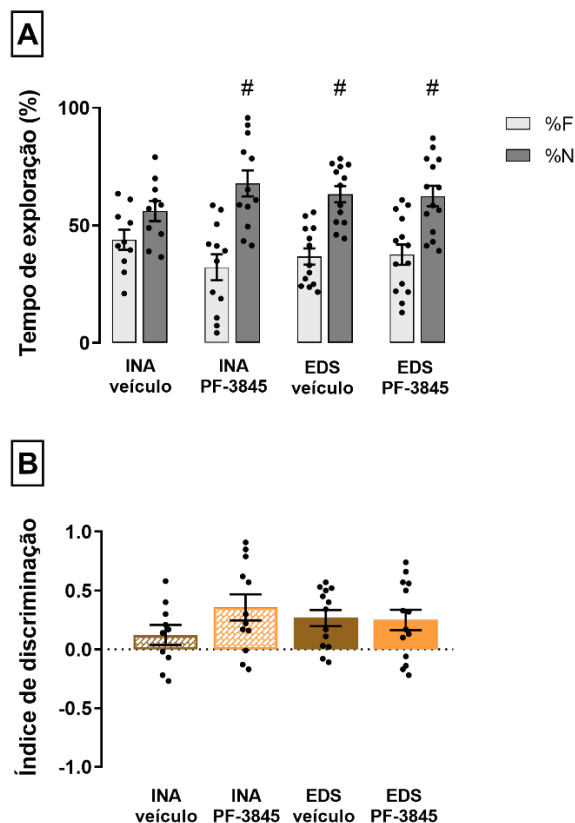
Legenda: Gráfico A: Tempo gasto no centro do aparato. Gráfico B: Distância total percorrida durante o teste. As colunas representam as médias (\pm EPM). INA, interação não-agressiva (n=22); EDS, estresse de derrota social (n=27).

4.1.9. Teste do Reconhecimento de Objetos

A Figura 18 representa os dados obtidos no teste de reconhecimento de objetos com animais fêmeas. A análise de variância multifatorial para medidas repetidas para os dados de tempo de exploração dos objetos entre os grupos indicou não haver diferença significativa [%F ou %N: $F_{1(1,45)} = 0,04$, $p = 0,84$; $F_{2(1,45)} = 1,49$, $p = 0,23$; $F_{1 \times F_{2(1,45)}} = 1,94$, $p = 0,17$]. Já com relação à comparação de exploração dos objetos dentro de cada grupo, obteve-se os seguintes resultados: grupo INA veículo: $t_{(9)} = -1,43$, $p = 0,19$; grupo INA tratado: $t_{(11)} = -3,23$, $p = 0,008$; grupo EDS veículo: $t_{(12)} = -3,83$, $p = 0,002$; grupo EDS tratado: $t_{(13)} = -2,88$, $p = 0,01$. Dessa forma, a análise indicou diferença estatística na exploração entre o objeto familiar e novo nos grupos INA tratado, EDS veículo e EDS tratado, tendo apenas o grupo INA veículo sem diferença na exploração entre o objeto familiar e novo (Figura 18A). Para o índice de discriminação dos objetos, a análise de variância de duas vias indicou não haver diferença entre os grupos [ID: $F_{1(1,45)} = 0,04$, $p = 0,84$; $F_{2(1,45)} = 1,48$, $p = 0,23$; $F_{1 \times F_{2(1,45)}} = 1,95$, $p = 0,17$], como está representado na Figura 18B.

Figura 18 - Efeito do tratamento sobre a memória em camundongos fêmeas submetidos ao protocolo de estresse de derrota social

TESTE DO RECONHECIMENTO DE OBJETOS (FÊMEAS)



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

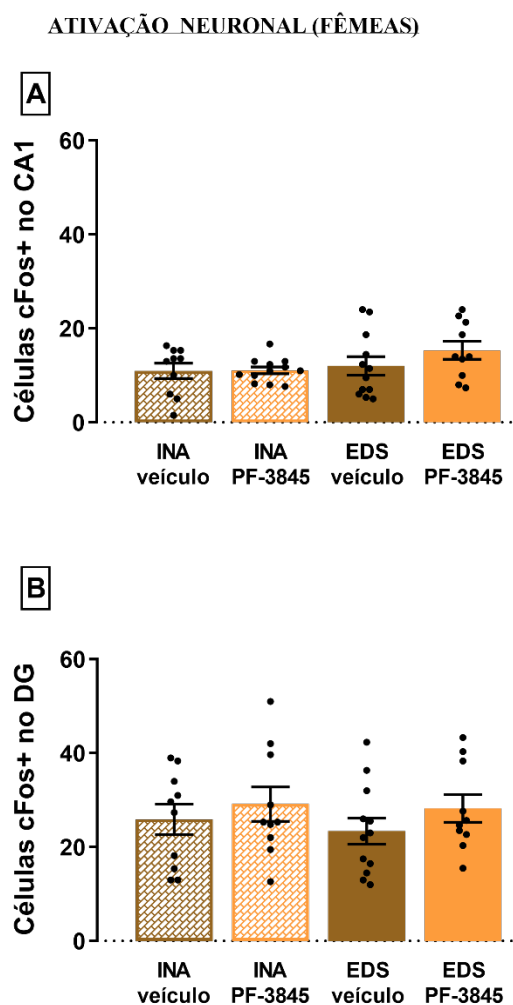
Legenda: Gráfico A: Tempo gasto explorando os objetos. Gráfico B: Índice de discriminação dos objetos pelo animal. As colunas representam as médias (\pm EPM). # $p < 0,05$ %F vs %N. INA, interação não-agressiva; EDS, estresse de derrota social; %F, porcentagem do tempo de exploração do objeto familiar; %N, porcentagem do tempo de exploração do objeto novo; INA veículo: $n=10$; INA PF-3845: $n=12$; EDS veículo: $n=13$; EDS PF-3845: $n=14$.

4.1.10. Ativação neuronal da proteína *cFos*

Na Figura 19, está representado os dados obtidos com camundongos fêmeas submetidos ao protocolo do experimento 1 pela análise da imunomarcação da proteína *cFos* em cortes coronais de encéfalos na região do dHPC, com foco nas sub-regiões CA1 (Figura 19A) e DG (Figura 19B). Visto a ausência de diferença estatística entres os hemisférios, optamos por representar os dados sem a divisão entre hemisférios. A ANOVA multifatorial de medidas repetidas indicou não haver diferença significativa nos 3 fatores analisados e em suas intera es no CA1 e no DG [CA1: $F_{1(1,18)} = 1,47$, $p = 0,24$; $F_{2(1,18)} = 0,60$, $p = 0,45$; $F_{3(1,18)} = 0,02$, $p = 0,88$; $F_{1 \times F2(1,18)} = 0,54$, $p = 0,47$; $F_{1 \times F3(1,18)} = 0,03$, $p = 0,87$; $F_{2 \times F3(1,18)} = 0,06$, $p = 0,81$; $F_{1 \times F2 \times F3(1,18)} = 1,40$, $p = 0,25$; DG: $F_{1(1,17)}$

= 0,15, $p = 0,70$; $F_{2(1,17)} = 0,83$, $p = 0,37$; $F_{3(1,17)} = 1,86$, $p = 0,19$; $F_{1 \times F_{2(1,17)}} = 0,03$, $p = 0,86$; $F_{1 \times F_{3(1,17)}} = 0,46$, $p = 0,51$; $F_{2 \times F_{3(1,17)}} = 0,05$, $p = 0,82$; $F_{1 \times F_{2 \times F_{3(1,17)}}} = 0,01$, $p = 0,92$]. Assim, os dados evidenciam que a expressão de cFos foi similar entre os grupos e bilateralmente em ambas as regiões.

Figura 19 - Efeito do tratamento sobre a expressão da proteína cFos no hipocampo dorsal de camundongos fêmeas submetidos ao protocolo de estresse de derrota social



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Legenda: Gráfico A: Quantificação de células cFos+ na região CA1 do dHPC. Gráfico B: Quantificação de células cFos+ na região DG do dHPC. As colunas representam as médias (\pm EPM). INA, interação não-agressiva; EDS, estresse de derrota social; INA veiculo: $n=5$; INA PF-3845: $n=6$; EDS veiculo: $n=6$; EDS PF-3845: $n=5$.

4.2. Experimento 2 – Efeitos do tratamento com inibidor da FAAH sobre respostas relacionadas à ansiedade e padrão de ativação do hipocampo dorsal de camundongos machos e fêmeas submetidos ao EDS

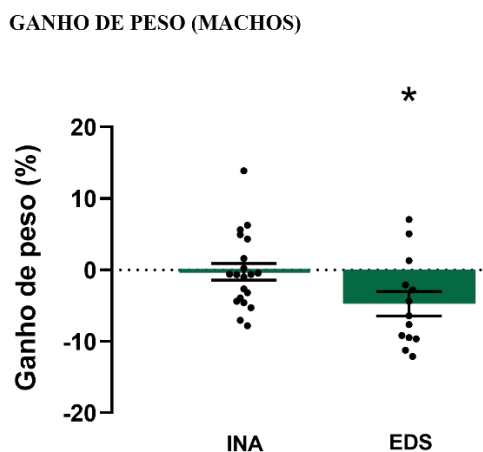
Importante ressaltar que, uma vez que o tratamento é realizado apenas no 12° dia de protocolo, os resultados do teste comportamental do 11° (TIS) dia de protocolo estão distribuídos apenas nos grupos de condição (EDS/INA), desconsiderando o tratamento recebido posteriormente.

- Resultados dos camundongos machos

4.2.1. Ganho de peso

Na Figura 20, estão representados os dados obtidos pela análise do ganho de peso dos animais machos. O teste *t* para amostras independentes para a análise do ganho de peso dos animais machos apresentou diferença significativa entre os grupos [GP: $t_{(41)} = 2,94$, $p = 0,005$], indicando que os animais que submetidos ao EDS tiveram um menor ganho de peso quando comparado ao animais da condição INA.

Figura 20 - Efeito do estresse crônico sobre o ganho de peso em camundongos machos submetidos ao protocolo de estresse de derrota social



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Legenda: Ganho de peso referente aos animais machos. As colunas representam as médias (\pm EPM). * $p < 0,05$ em relação ao grupo comparado. INA, interação não-agressiva ($n=24$); EDS, estresse de derrota social ($n=20$);

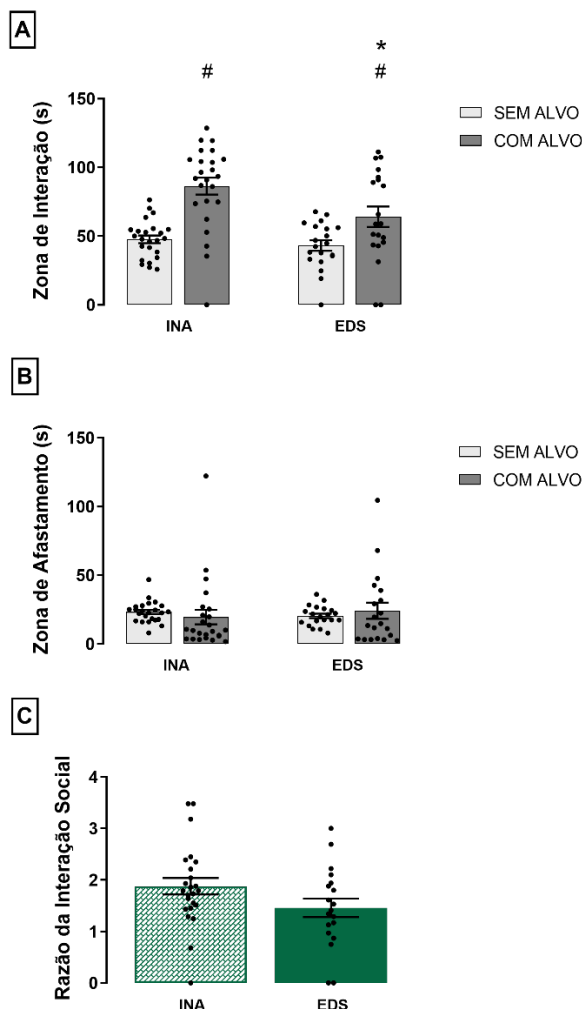
4.2.2. Teste de Interação Social

Os dados obtidos pelo TIS realizado com sujeitos machos estão representados na Figura 21. A ANOVA multifatorial de medidas repetidas indicou diferença estatística no tempo fator alvo e condição, bem como na interação entre ambos os fatores [ZI: $F_{1(1,42)} = 4,66$, $p=0,04$; $F_{2(1,42)} = 48,90$ $p = 0,00$; $F_{1 \times F_{2(1,42)}} = 4,38$, $p = 0,04$]. O teste *post-hoc* de Duncan indicou ser maior o tempo de exploração na ZI na presença do alvo ($p \leq 0,0001$)

em ambas as condições. Ademais, o teste *post-hoc* também revelou que os animais EDS exploram menos a ZI na presença do alvo do que os animais INA ($p = 0,004$), situações representadas na Figura 21A. Os resultados referentes ao tempo de exploração da ZA são esquematizados na Figura 21B, a qual mostra que a ANOVA multifatorial de medidas repetidas não indicou diferença estatística entre os fatores [ZA: $F_{1(1,42)} = 0,04$, $p=0,84$; $F_{2(1,42)} < 0,001$, $p=1,00$; $F_{1 \times F_{2(1,42)}} = 0,99$, $p = 0,33$]. Por fim, em relação à RI, o teste *t* para amostras independentes indica que não há diferença significativa entre os grupos [RI: $t_{(41)} = 1,74$, $p= 0,09$]. Ressalta-se que o N amostral da RI ($n = 19$) difere do N amostral da ZI e ZA ($n = 20$), pois matematicamente não é possível realizar o cálculo da RI de um sujeito, uma vez que o tempo de exploração na ZI sem alvo é igual a 0.

Figura 21 - Efeito do estresse crônico sobre o comportamento de evitação social em camundongos machos submetidos ao protocolo de estresse de derrota social

TESTE DE INTERAÇÃO SOCIAL (MACHOS)



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Legenda: Gráfico A: Tempo gasto pelo animal na zona de interação. Gráfico B: Tempo gasto na zona de afastamento. Gráfico C: Valores referentes à razão de interação social. As colunas representam as médias (\pm EPM). * $p \leq 0,05$ EDS com alvo vs INA com alvo. # $p \leq 0,05$ em relação ao sem alvo. INA, interação não-agressiva (n=24); EDS, estresse de derrota social (n=20); ZI, zona de interação; ZA, zona de afastamento.

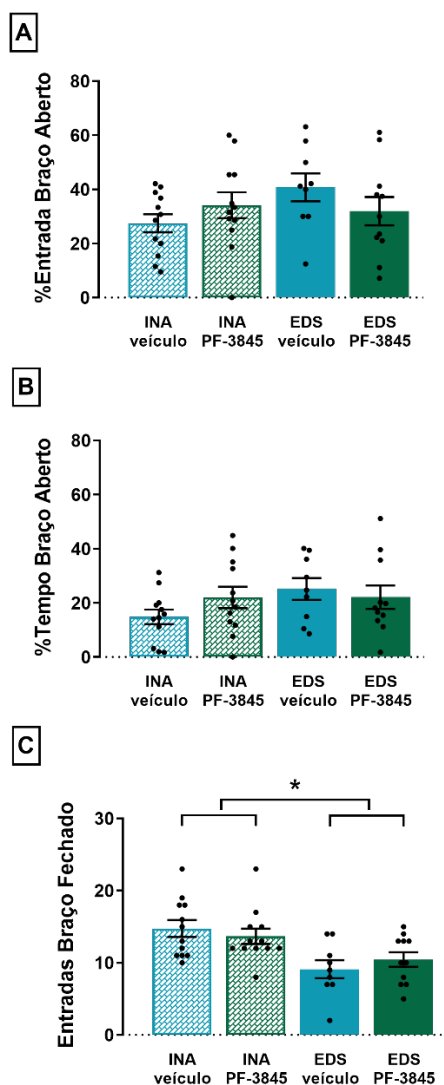
4.2.3. Teste do Labirinto em Cruz Elevado

Na Figura 22, estão apresentados os comportamentos analisados nos animais machos que foram expostos ao LCE após 10 sessões de EDS. A ANOVA bifatorial não indicou diferença significativa em relação a %EBA (Figura 22A) e %TBA (Figura 22B) entre os fatores [%EBA: $F_{1(1,40)} = 1,40$, $p = 0,24$; $F_{2(1,40)} = 0,05$, $p = 0,82$; $F_{1 \times F_{2(1,40)}} = 2,76$, $p = 0,10$; %TBA: $F_{1(1,40)} = 1,86$, $p = 0,18$; $F_{2(1,40)} = 0,30$, $p = 0,59$; $F_{1 \times F_{2(1,40)}} = 1,82$, $p = 0,18$]. Para os dados de EBF (Figura 22C), a análise estatística indicou diferença

significativa no fator condição [$F_{1(1,40)} = 15,22$ $p = 0,0003$; $F_{2(1,40)} = 0,01$, $p = 0,91$; $F_{1 \times F_{2(1,40)}} = 1,14$, $p = 0,29$]. O teste *post-hoc* revelou que os animais submetidos ao protocolo de EDS têm um menor número de entradas no BF em comparação aos animais do grupo INA ($p=0,0005$).

Figura 22 - Efeito do tratamento sobre o comportamento do tipo ansioso em camundongos machos submetidos ao protocolo de estresse de derrota social

TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (MACHOS)



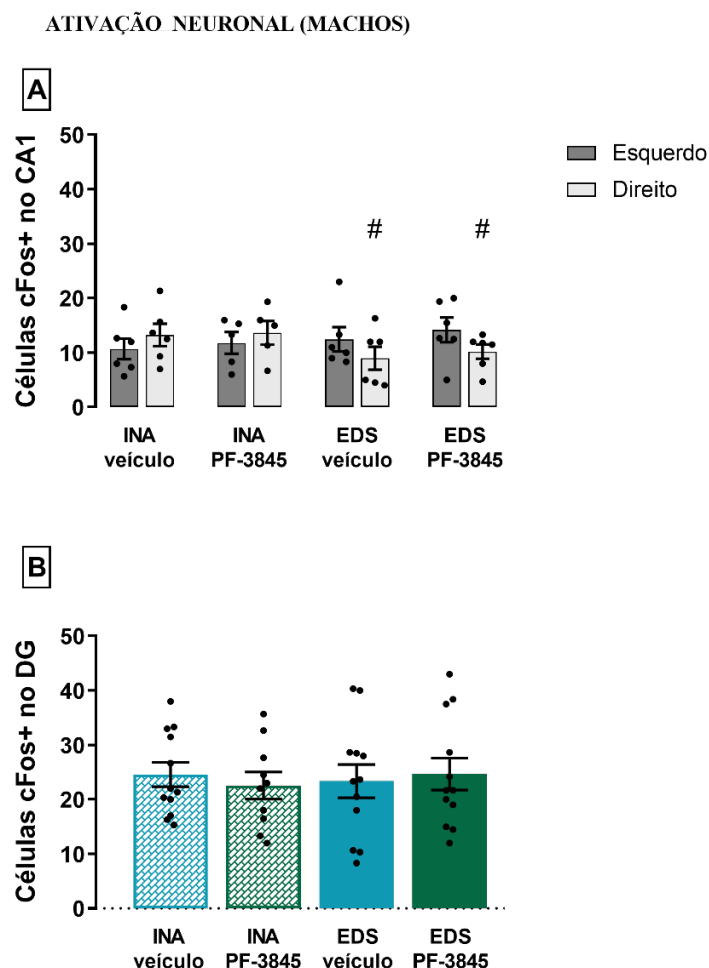
Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Legenda: Gráfico A: Porcentagem de tempo gasto nos braços abertos. Gráfico B: Porcentagem de entradas nos braços abertos. Gráfico C: Número de entradas nos braços fechados. As colunas representam as médias (\pm EPM). * $p < 0,05$ em relação ao grupo INA. INA veiculo: $n=12$; INA PF-3845: $n=12$; EDS veiculo: $n=9$; EDS PF-3845: $n=12$.

4.2.4. Ativação neuronal da proteína cFos

Na Figura 23, está representado os dados obtidos com camundongos machos submetidos ao protocolo do experimento 2 pela análise da imunomarcação da proteína cFos em cortes coronais de encéfalos na região do dHPC, com foco nas sub-regiões CA1 (Figura 23A) e DG (Figura 23B). A ANOVA multifatorial de medidas repetidas indicou diferença estatística na interação entre os fatores condição e hemisfério na região do CA1 [CA1: $F_{1(1,19)} = 0,23$, $p = 0,64$; $F_{2(1,19)} = 0,37$, $p = 0,55$; $F_{3(1,19)} = 0,85$, $p = 0,37$; $F_{1 \times F_{2(1,19)}} = 0,04$, $p = 0,85$; $F_{1 \times F_{3(1,19)}} = 13,51$, $p = 0,002$; $F_{2 \times F_{3(1,19)}} = 0,14$, $p = 0,71$; $F_{1 \times F_{2 \times F_{3(1,19)}}} = 0,005$, $p = 0,94$]. A região do DG não apresenta diferença significativa nos 3 fatores e em suas interações, e, por isso, optamos por apresentar os dados no gráfico sem a divisão entres os hemisférios [DG: $F_{1(1,19)} = 0,01$, $p = 0,90$; $F_{2(1,19)} = 0,01$, $p = 0,92$; $F_{3(1,19)} = 0,18$, $p = 0,68$; $F_{1 \times F_{2(1,19)}} = 0,20$, $p = 0,66$; $F_{1 \times F_{3(1,19)}} = 0,67$, $p = 0,42$; $F_{2 \times F_{3(1,19)}} = 1,39$, $p = 0,25$; $F_{1 \times F_{2 \times F_{3(1,19)}}} = 0,35$, $p = 0,56$]. O teste *post-hoc* revelou que os animais submetidos ao EDS apresentaram expressão de cFos estatisticamente diferente entre os hemisférios na região do CA1, sendo que o hemisfério direito teve uma maior expressão da proteína em comparação ao hemisfério esquerdo ($p=0,005$). Assim, os dados evidenciam que a expressão de cFos ocorre de forma diferente entre os hemisférios nos animais estressados na região do CA1, enquanto a quantificação da proteína é estatisticamente similar entre os grupos e hemisférios na região do DG.

Figura 23 - Efeito do tratamento sobre a expressão da proteína cFos no hipocampo dorsal de camundongos machos submetidos ao protocolo de estresse de derrota social



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Legenda: Gráfico A: Quantificação de células cFos+ na região CA1 do dHPC. Gráfico B: Quantificação de células cFos+ na região DG do dHPC. As colunas representam as médias (\pm EPM). # $p \leq 0,05$ hemisfério direito vs hemisfério esquerdo. INA, interação não-agressiva; EDS, estresse de derrota social; INA veículo: n=6; INA PF-3845: n=5; EDS veículo: n=6; EDS PF-3845: n=6.

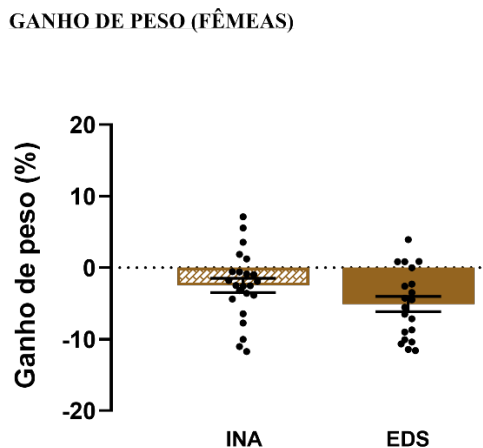
- Resultados dos camundongos fêmeas

4.2.5. Ganho de peso

Na Figura 24, estão representados os dados obtidos pela análise do ganho de peso dos animais machos. O teste t para amostras independentes para a análise do ganho de peso dos animais fêmeas não indicou diferença significativa entre os grupos [GP: $t_{(1,40)} = 1,88$, $p = 0,07$]. Ressalta-se que, por falha na coleta de dados, o N amostral do EDS no resultado do ganho de peso ($n = 20$) difere do N amostral do EDS nos resultados dos testes comportamentais ($n = 26$), uma vez que se tem apenas o peso final dos 6 sujeitos

em questão. A média do peso final desses animais é de 34,36g, similar à média do grupo de 34,51g.

Figura 24 - Efeito do estresse crônico sobre o ganho de peso em camundongos fêmeas submetidos ao protocolo de estresse de derrota social



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

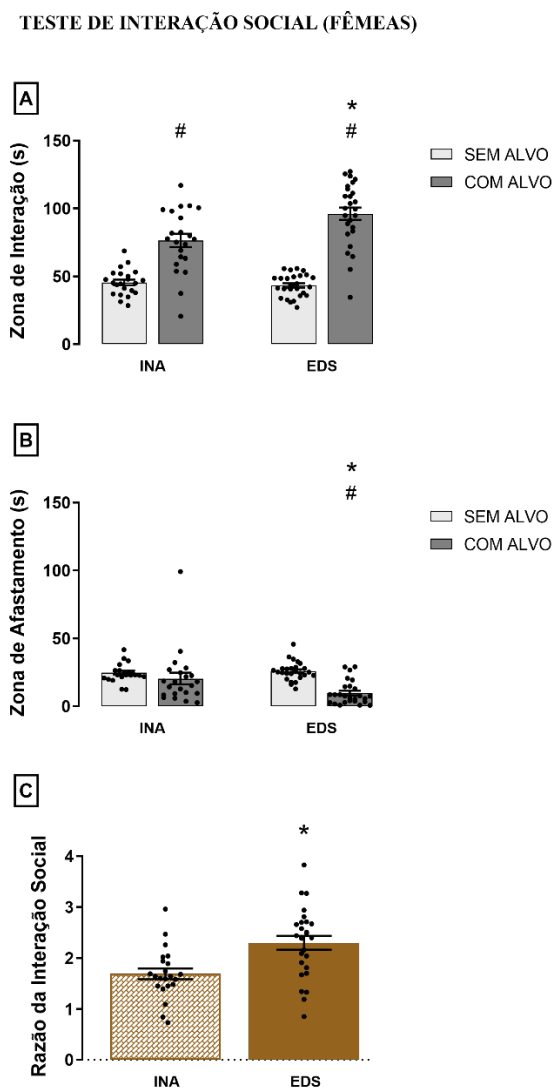
Legenda: Ganho de peso referente aos animais machos. As colunas representam as médias (\pm EPM). INA, interação não-agressiva (n=22); EDS, estresse de derrota social (n=20);

4.2.6. Teste de Interação Social

Os dados obtidos pelo TIS realizado com sujeitos fêmeas estão representados na Figura 25. A ANOVA multifatorial de medidas repetidas indicou diferença estatística no fator alvo e condição, bem como na interação entre ambos os fatores [ZI: $F_{1(1,46)} = 4,94$, $p=0,03$; $F_{2(1,46)} = 166,43$, $p=0,00$; $F_{1 \times F_{2(1,46)}} = 11,50$, $p=0,001$]. O teste *post-hoc* de Duncan indicou ser maior o tempo de exploração na ZI na presença do alvo em ambas as condições ($p \leq 0,0001$), situação representada na Figura 25A. Ademais, o teste *post-hoc* também revelou que os animais pertencentes ao grupo EDS exploram mais a ZI na presença do alvo do que os animais do grupo INA ($p < 0,0001$). Os resultados referentes ao tempo de exploração da ZA são esquematizados na Figura 25B, a qual mostra que a ANOVA multifatorial de medidas repetidas indicou diferença estatística no fator alvo e na interação entre os fatores condição e alvo [ZA: $F_{1(1,46)} = 3,67$, $p=0,06$; $F_{2(1,46)} = 20,29$, $p < 0,0001$; $F_{1 \times F_{2(1,46)}} = 6,71$, $p=0,01$]. O teste *post-hoc* revelou que os animais submetidos ao EDS exploram menos tempo a ZA na presença do alvo em comparação aos animais submetidos ao INA ($p=0,002$), bem como em comparação aos animais EDS sem a presença do alvo ($p < 0,0001$). Por fim, em relação ao RI, o teste *t* para amostras independentes indica que os animais do grupo EDS apresentam uma RI maior do que os

animais do grupo INA [RI: $t_{(1,46)} = -3,42$, $p = 0,001$].

Figura 25 - Efeito do estresse crônico sobre o comportamento de evitação social em camundongos fêmeas submetidos ao protocolo de estresse de derrota social



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Legenda: Gráfico A: Tempo gasto pelo animal na zona de interação. Gráfico B: Tempo gasto na zona de afastamento. Gráfico C: Valores referentes à razão de interação social. As colunas representam as médias (\pm EPM). * $p \leq 0,05$ EDS com alvo vs INA com alvo. # $p \leq 0,05$ em relação ao sem alvo. INA, interação não-agressiva ($n=22$); EDS, estresse de derrota social ($n=26$); ZI, zona de interação; ZA, zona de afastamento.

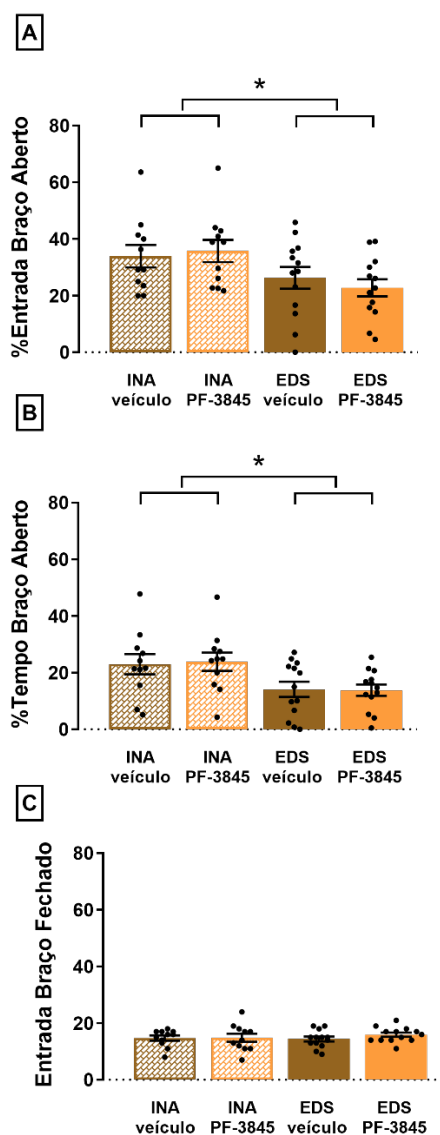
4.2.7. Teste do Labirinto em Cruz Elevado

Na Figura 25, estão apresentados os comportamentos analisados nos animais fêmeas que foram expostos ao LCE após o protocolo de EDS. A ANOVA bifatorial indicou diferença significativa em relação a %EBA (Figura 26A) e %TBA (Figura 26B) no fator condição [%EBA: $F_{1(1,44)} = 7,83$, $p = 0,007$; $F_{2(1,44)} = 0,05$, $p = 0,82$; $F_1 \times F_2(1,44)$

= 0,53, $p = 0,47$; %TBA: $F_{1(1,44)} = 10,74$, $p = 0,002$; $F_{2(1,44)} = 0,01$, $p = 0,92$; $F_{1 \times F_{2(1,44)}} = 0,04$, $p = 0,84$]. O teste *post-hoc* revelou que os animais submetidos ao EDS obtiveram uma %TBA menor do que os animais submetidos ao INA ($p=0,002$). Da mesma forma, os animais do grupo EDS apresentaram menor %EBA do que os animais do grupo INA ($p=0,01$). Para os dados de EBF (Figura 26C), a análise estatística não indicou diferença significativa [$F_{1(1,44)} = 0,15$, $p = 0,70$; $F_{2(1,44)} = 0,68$, $p = 0,41$; $F_{1 \times F_{2(1,44)}} = 0,53$, $p = 0,47$].

Figura 26 - Efeito do tratamento sobre o comportamento do tipo ansioso em camundongos fêmeas submetidos ao protocolo de estresse de derrota social

TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (FÊMEAS)



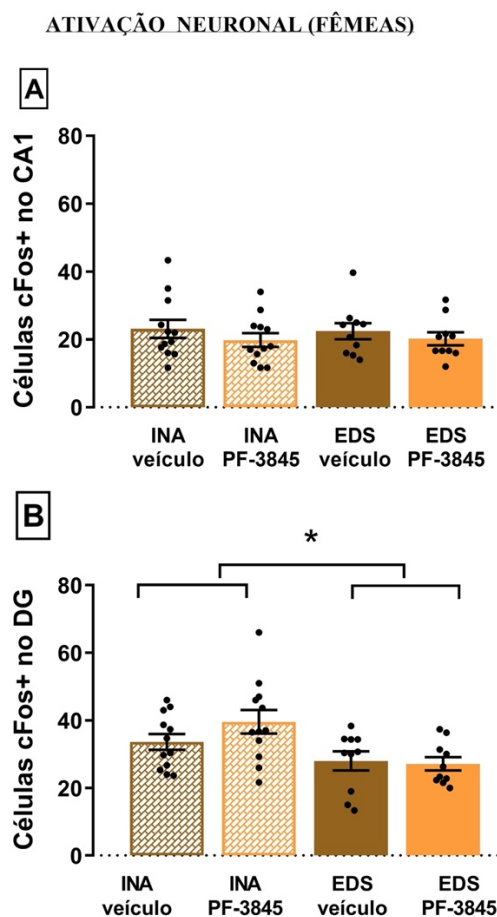
Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Legenda: Gráfico A: Porcentagem de tempo gasto nos braços abertos. Gráfico B: Porcentagem de entradas nos braços abertos. Gráfico C: Número de entradas nos braços fechados. As colunas representam as médias (\pm EPM). * $p < 0,05$ em relação ao grupo INA. INA, interação não-agressiva; EDS, estresse de derrota social; INA veículo: $n=11$; INA PF-3845: $n=11$; EDS veículo: $n=13$; EDS PF-3845: $n=13$.

4.2.8. Ativação neuronal da proteína cFos

Na Figura 27, está representado os dados obtidos com camundongos fêmeas submetidos ao protocolo do experimento 2 pela análise da imunomarcação da proteína cFos em cortes coronais de encéfalos na região do dHPC, com foco nas sub-regiões CA1 (Figura 27A) e DG (Figura 27B). A ANOVA multifatorial de medidas repetidas não indicou diferença estatística nos 3 fatores e em suas interações, e, por isso, optamos por apresentar os dados no gráfico sem a divisão entres os hemisférios [CA1: $F_{1(1,18)} = 0,003$, $p = 0,95$; $F_{2(1,18)} = 1,02$, $p = 0,33$; $F_{3(1,18)} = 0,02$, $p = 0,90$; $F_{1 \times F_{2(1,18)}} = 0,04$, $p = 0,85$; $F_{1 \times F_{3(1,18)}} = 3,29$, $p = 0,09$; $F_{2 \times F_{3(1,18)}} = 0,34$, $p = 0,57$; $F_{1 \times F_{2 \times F_{3(1,18)}}} = 0,80$, $p = 0,38$]. A região do DG, por sua vez, apresenta diferença significativa no fator condição [DG: $F_{1(1,18)} = 10,10$, $p = 0,005$; $F_{2(1,18)} = 0,80$, $p = 0,38$; $F_{3(1,18)} = 0,44$, $p = 0,51$; $F_{1 \times F_{2(1,18)}} = 1,43$, $p = 0,25$; $F_{1 \times F_{3(1,18)}} = 2,10$, $p = 0,16$; $F_{2 \times F_{3(1,18)}} = 0,17$, $p = 0,68$; $F_{1 \times F_{2 \times F_{3(1,18)}}} = 0,08$, $p = 0,78$]. O teste *post-hoc* revelou que os animais submetidos ao protocolo de EDS apresentaram uma menor expressão de cFos na região do DG em comparação aos animais do grupo INA ($p=0,005$). Assim, os dados evidenciam que a expressão de cFos foi similar entre os grupos e nos hemisférios na região do CA1. Na região do DG, o protocolo de EDS resultou na menor expressão de cFos quando comparado ao protocolo de INA.

Figura 27 - Efeito do tratamento sobre a expressão da proteína cFos no hipocampo dorsal de camundongos fêmeas submetidos ao protocolo de estresse de derrota social



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Legenda: Gráfico A: Quantificação de células cFos+ na região CA1 do dHPC. Gráfico B: Quantificação de células cFos+ na região DG do dHPC. As colunas representam as médias (\pm EPM). * $p \leq 0,05$ EDS vs INA. INA, interação não-agressiva; EDS, estresse de derrota social; INA veículo: n=6; INA PF-3845: n=6; EDS veículo: n=5; EDS PF-3845: n=5.

5. DISCUSSÃO

A presente pesquisa teve como intuito contribuir para com o entendimento do sistema eCb em machos e fêmeas, especificamente sua relação com o estresse, revelando os efeitos no comportamento. O comportamento do tipo ansioso e a memória de curta duração foram o foco do estudo, analisando-se também possíveis dimorfismos sexuais. Nossos resultados indicam que: (i) o modelo de estresse utilizado não foi efetivo para resultar em prejuízo de memória de curta-duração, tanto em animais machos quanto fêmeas, impedindo conclusões sobre a ação do fármaco utilizado; (ii) pelo mesmo motivo, não foi possível avaliar os efeitos do PF-3845 nos comportamentos do tipo ansioso

avaliados no LCE em camundongos machos; (iii) o modelo de EDS para fêmeas (EDSf) e utilizado no presente estudo não resultou em prejuízo da memória de curta duração, contudo, induz o comportamento do tipo ansioso avaliado no LCE sem prejudicar a atividade locomotora; (iv) o fármaco PF-3845, na dose utilizada, não apresenta efeito nos mecanismos relacionados à ansiedade avaliados no LCE em camundongos fêmeas, independente da condição.

Os roedores são animais sociáveis e tendem a procurar pelo contato com um coespecífico. O TIS, por sua vez, é amplamente utilizado para avaliar tal sociabilidade do animal (File; Seth, 2003), permitindo estudar o possível comportamento de evitação social e, conseqüentemente, os efeitos do modelo de estresse utilizado. Sendo assim, o TIS foi utilizado no presente estudo como uma ferramenta de controle do modelo de estresse aplicado, a fim de saber se o modelo foi efetivo. Os animais submetidos ao protocolo de EDS, independente da condição e do sexo, permanecem mais tempo na zona de interação quando o alvo está presente, mantendo o comportamento natural dos animais. Com relação aos dados dos animais machos, apesar da diminuição do tempo de exploração na ZI com o alvo presente pelo grupo estressado, a similaridade da RI entre os grupos permite o entendimento de que o estresse ao qual os animais foram submetidos não foi intenso o suficiente para afetar a sua sociabilidade no presente estudo. Ainda, a RI proporciona a análise da suscetibilidade dos animais, uma vez que camundongos machos com RI maior que 1 indica que o animal é resiliente, segundo os critérios de Golden e colaboradores (2011). O presente estudo apresentou em torno de 8% de animais considerados suscetíveis ($RI < 1$), proporção consideravelmente menor do que a encontrada na padronização do modelo, a qual é em torno de 30% (Golden *et al.*, 2011). Entende-se que tal diferença pode ser explicada pela vulnerabilidade encontrada nos animais experimentais utilizados, a qual resultou no óbito de 28,8% dos animais destinados ao protocolo de EDS, podendo considerar então que esses animais eram mais suscetíveis ao estresse.

Assim, é importante ressaltar que, apesar dos resultados referentes ao TIS de ausência de evitação social diferirem do que é comumente encontrado nos estudos que utilizam o modelo de EDS (Carnevali *et al.*, 2020; da Costa *et al.*, 2023; Santos-Costa *et al.*, 2021), a literatura apresenta resultados contraditórios sobre o TIS. A divergência presente na literatura é devido à grande sensibilidade do teste a fatores ambientais, levando a resultados inconsistentes, em razão de variáveis externas (File; Seth, 2003). A sensibilidade do TIS explica a diferença de resultados da RI dos animais fêmeas entre o

experimento 1 e 2, sendo que os animais submetidos ao EDS no experimento 2 apresentaram a RI maior do que seu grupo controle. Ao encontro do exposto, os dados da literatura apresentam resultados diversos sobre os efeitos sociais de diferentes modelos de estresses crônicos em fêmeas, tendo estudos em que se obteve a evitação social na maioria dos indivíduos fêmeas (Harris *et al.*, 2018), bem como estudos em que menos de 20% dos sujeitos se mostraram como suscetíveis (Takahashi *et al.*, 2017). Ainda, o comportamento social das fêmeas decorrido do EDSf no presente trabalho condiz com o encontrado em dados anteriores do nosso laboratório (artigo em construção).

O TCA avalia o comportamento espontâneo exploratório do animal. Em um cenário em que o comportamento é do tipo ansioso, os animais tendem a permanecer menos tempo no centro do aparato em comparação a um animal controle. Tal situação ocorre pelas propriedades menos aversivas das periferias do aparato, onde também a luminosidade costuma ser mais baixa (Kinsey *et al.*, 2007). Os resultados do TCA do presente estudo indicam que os animais machos e fêmeas do grupo submetido ao estresse apresentam comportamento similar ao grupo controle, não havendo diferença estatística no tempo gasto no centro do aparato e na distância total percorrida. Embora nosso resultado corrobore estudos que demonstraram não haver prejuízo nos comportamentos avaliados no TCA após estresse crônico (Trainor *et al.*, 2011), nossos dados divergem dos achados anteriores do nosso grupo de pesquisa (da Costa *et al.*, 2023), indicando novamente que o estresse realizado pode ter sido menos intenso quando comparado aos estudos anteriores. Já a análise do ganho de peso indica que os machos submetidos ao estresse crônico tiveram uma porcentagem de ganho de peso negativa, revelando que os animais perderam peso desde o início do protocolo. Da mesma forma, as fêmeas tiveram perda de peso ao final do protocolo, porém, o modelo de estresse crônico não apresentou efeito nesse parâmetro, visto que não houve diferença estatística entre os grupos. A relação do ganho de peso e estresse ainda é variável na literatura, uma vez que há estudos em que os animais machos perderam peso quando comparados ao grupo controle, bem como há situações em que o ganho de peso dos animais estressados não diverge do grupo controle. Com uma disponibilidade de estudos menor, um quadro similar de inconsistência é visto para os camundongos fêmeas (Tran; Gellner, 2023). A literatura ainda sugere a importância de se analisar o ganho de peso dias (ou até mesmo semanas) após o fim do estresse, porém, dado o desenho experimental do presente trabalho, tendo como foco o estudo da expressão da proteína cFos, não foi possível realizar tal coleta de

dados semanas após o fim do estresse.

O TRO, por sua vez, revelou que o protocolo de EDS em machos e fêmeas não foi eficiente em causar prejuízo na memória de curto prazo. Neste sentido, não é possível inferir se o tratamento com o fármaco é capaz de facilitar a memória no TRO, tampouco confirmar ou refutar a nossa hipótese. Entretanto, a ausência de diferença permite a análise de que o fármaco não prejudicou a diferenciação dos objetos. Sendo assim, mantemos a nossa hipótese de que processos mnemônicos envolvem a ação da AEA no hipocampo. A literatura por sua vez, demonstra que os efeitos dos endocanabinoides na memória dependem da condição cognitiva do sujeito, podendo resultar em um efeito benéfico ou neutro (Chesworth; Watt; Karl, 2018). Tal ideia é corroborada por outros estudos que evidenciaram os efeitos benéficos da inibição da FAAH no comportamento animal em situações motivadas por aversão, como no labirinto aquático (Panlilio; Justinova; Goldberg, 2013; Wise; Harloe; Lichtman, 2009). Ademais, adentrando a questão de possíveis dimorfismos sexuais, a literatura apresenta dados que demonstram que fêmeas submetidas ao mesmo estresse crônico dos machos apresentam melhor desempenho nas atividades de memória (Luine *et al.*, 2007). O estudo de Luine (2002), por exemplo, submeteu ratos Sprague-Dawley (machos e fêmeas) de 2-3 meses de idade ao estresse crônico por imobilização (6h/dia) por 21 dias. Ao fim do protocolo de estresse, os animais foram submetidos, dentre outros testes, aos testes de labirinto de braço radial e TRO. Os resultados obtidos no estudo de Luine com os machos indicam prejuízo no desempenho do labirinto de braço radial e prejuízo da memória avaliada no TRO. Já os resultados das fêmeas do mesmo estudo indicam melhora no desempenho no labirinto de braço radial e nenhuma alteração na memória avaliada no TRO.

Ainda, a exposição a um ambiente novo exige que o animal contraponha potenciais recompensas e potenciais riscos para a tomada de decisão sobre a resposta comportamental mais adequada (Calhoon; Tye, 2015). O LCE então proporciona o conflito típico de comportamentos do tipo ansioso, despertando no animal o impulso natural de explorar o local para própria sobrevivência, ao mesmo tempo em que desperta a avaliação de risco representado pelo ambiente desconhecido e potencialmente perigoso, justificando seu amplo uso para avaliar sintomas relacionados à ansiedade. Os dados obtidos no LCE com o nosso protocolo indicam que os animais submetidos ao EDSf apresentam sintomas do comportamento do tipo ansioso, independente do tratamento recebido, visto que a %TBA e %EBA dos animais EDS é menor em relação ao grupo controle. Importante ressaltar que o protocolo de estresse crônico não afetou a atividade

locomotora dos animais fêmeas, análise feita pelo número de entradas no braço fechado do aparato (Rodgers; Dalvi, 1997). Os grupos são estatisticamente diferentes apenas em relação à condição, sem haver diferença no fator tratamento, permitindo então inferir que o fármaco utilizado não modifica o tipo de comportamento dos animais fêmeas avaliado no LCE e, conseqüentemente, não reverte os efeitos do tipo ansiogênicos nos animais submetidos ao estresse crônico.

A literatura é limitada em estudos que englobem roedores fêmeas e os inibidores da FAAH como tratamento, o que prejudica a discussão do resultado obtido no presente estudo com emprego do LCE. Ainda, dentre os poucos estudos disponíveis, tem-se o de Bedse e colaboradores (2018), que utilizou fêmeas CD-1 com 6 semanas de idade, as quais foram submetidas ao estresse de choque nas patas 24h antes do teste comportamental e tratadas com PF-3845 2h antes do teste. Em suas análises do comportamento do tipo ansioso por meio do labirinto zero elevado e do teste claro-escuro, o fármaco não alterou os efeitos ansiogênicos do estresse nos camundongos fêmeas, indo ao encontro do nosso resultado. Resultado semelhante foi previamente obtido pelo nosso grupo de pesquisa (Otero, 2024) em que teve como foco o estudo da dor crônica. Em tal estudo, camundongos Swiss-Webster com 21 dias pós-natal (machos e fêmeas) foram submetidos ao modelo de hiperalgesia latente e receberam tratamento os inibidores da FAAH (PF-3845) e da MAGL (JZL184). Os dados obtidos por Otero evidenciam que os camundongos fêmeas, incluindo os tratados com PF-3845, não apresentam comportamentos diferentes dos grupos controles no LCE. Em outro estudo, de Pavón e colaboradores (2021), o tratamento com PF-3845 apresentou efeito ansiolítico em camundongos selvagens. O estudo de Pavón et al. (2021) realizou quatro testes comportamentais com intervalo de, pelo menos, 7 dias entre cada, sendo os testes: teste de suspensão de cauda, teste de nado forçado, LCE e teste claro-escuro. Os animais tratados com PF-3845 e avaliados no teste de nado forçado apresentaram aumento da latência para a imobilidade, bem como aumento do tempo no braço aberto no LCE. Por fim, apesar do tratamento não resultar em alteração no comportamento avaliado no teste de suspensão de cauda, no teste claro-escuro o mesmo efeito ansiolítico também foi observado. Este estudo evidencia o potencial terapêutico do PF-3845 em camundongos machos como tratamento para o comportamento do tipo ansioso, possibilidade que não foi possível de ser averiguada no presente estudo devido à problemática da intensidade de estresse do modelo aplicado. Com isso, os nossos dados, em conjunto com a literatura, indicam dimorfismos sexuais na ação do PF-3845 sobre o comportamento do tipo ansioso

em camundongos submetidos ao estresse crônico.

A investigação da expressão de proteína cFos na região do hipocampo, especialmente na região CA1 e DG do hipocampo dorsal, permite uma análise mais profunda dos efeitos do protocolo. O pico da expressão da proteína cFos ocorre em torno de 90 minutos após o estímulo aversivo, dessa forma, entende-se que a quantificação da proteína reflete a experiência do animal no último teste comportamental ao qual foi submetido. Os resultados indicam que o protocolo de EDS e o tratamento com PF-3845 em machos e fêmeas não afetou a experiência do animal no TRO (experimento 1) de forma que interferisse na expressão da proteína cFos no dHPC (DG e CA1), uma vez que a quantificação de cFos é estatisticamente igual entre os grupos. Anteriormente, o nosso grupo de pesquisa evidenciou resultados, a princípio, distintos aos achados do presente trabalho: O estudo de da Costa e colaboradores (2023), o qual utilizou o protocolo de EDS similar ao aqui descrito e realizou os mesmos testes comportamentais, quantificou a expressão de Δ FosB no dHPC e vHPC. Seus resultados indicam que o EDS ativa o vHPC, enquanto inibe o dHPC (Da Costa *et al.*, 2023). Dessa forma, entende-se que o dHPC possui maior relação com o prejuízo mnemônico observado em comparação ao vHPC após o EDS. Devido à nossa dificuldade de coleta dos dados do vHPC, é inviável realizar a discussão dessa parte. Com relação ao dHPC, e em conjunto com os nossos dados dos testes comportamentais, reforça-se a hipótese da intensidade do estresse: nesse caso, a baixa intensidade de estresse não permitiu alterações no comportamento avaliado no TRO (machos e fêmeas) e, conseqüentemente, na expressão de cFos. Tal situação possui duas possíveis explicações: (i) o último teste ao qual os animais foram submetidos (TRO) não representou um evento aversivo a eles, justificando então a ausência de diferença na ativação da proteína cFos nas regiões investigadas; (ii) a ausência de efeito nas habilidades mnemônicas representada no TRO, juntamente com a análise estatística da quantificação de cFos, indica que o recrutamento neuronal para a atividade de memória foi similar entre os grupos. A última justificativa baseia-se no fato de que, em contextos que envolvem a memória, o aumento da expressão de cFos pode indicar melhoria nas habilidades mnemônicas ao invés de revelar a valência emocional da atividade (Zhang *et al.*, 2024).

Todavia, é importante ressaltar a utilização de marcadores diferentes (i.e., Δ FosB e cFos), entre os estudos, indicando que a discrepância observada nos resultados pode ser devido à via de sinalização escolhida. Sendo assim, é possível que o protocolo do presente estudo resulte em ativação neuronal, porém sem envolver a via cFos. Novamente, com

outro marcador, além da diferença dos protocolos de estresse e da espécie de roedor utilizado, o estudo de Murakami e colaboradores (2005), observou redução do mRNA do BDNF no hipocampo de ratos machos Sprague-Dawley após submetê-los ao estresse diário de contenção por 1 a 3 semanas (Murakami *et al.*, 2005). Assim, é notável que estudos da literatura apontam para o hipocampo como uma região envolvida nos efeitos do estresse crônico, ainda que não seja claro o seu papel (Cooper *et al.*, 2017; Hartmann *et al.*, 2019).

O estudo de Zhang e colaboradores (2024), por sua vez, evidencia o papel do sistema endocanabinoide na consolidação da memória, uma vez que a inibição da enzima FAAH pelo fármaco JZL195 resultou em um maior número de células cFos positivas na região CA1 e CA3 do hipocampo em camundongos submetidos ao protocolo de condicionamento de medo (Zhang *et al.*, 2024). Enquanto o estudo de Zhang e colaboradores demonstra o efeito da inibição da enzima FAAH nos processos de memória em camundongos machos, nossos achados indicam que o tratamento não reverte o comportamento do tipo ansioso em camundongos fêmeas. De forma coerente com os resultados comportamentais do LCE (experimento 2), as fêmeas submetidas ao EDS apresentaram uma quantidade reduzida de células positivas para cFos em comparação ao grupo INA, independente do tratamento. Tal situação indica que o estresse crônico pode ter resultado na inibição dos circuitos neuronais da região do hipocampo, especificamente do DG. Agora, nesse contexto, sabendo que o EDS foi intenso o suficiente para ocasionar sintomas de comportamento do tipo ansioso nos animais, retoma-se o achado de da Costa e colaboradores (2023), que evidenciou a inibição da atividade neuronal do dHPC após o EDS, corroborando nossos achados. Além disso, a literatura evidencia que os mecanismos endocanabinoides apresentam dimorfismos sexuais, sendo visto que tratamentos que modulam o sistema eCb possuem efeitos distintos no hipocampo de machos e fêmeas, bem como em outras regiões cerebrais (Portugalov; Akirav, 2024; Reich; Taylor; McCarthy, 2009; Zer-Aviv; Akirav, 2016).

Por fim, os resultados da imunomarcagem referentes aos animais machos submetidos ao experimento 2 indicam que o estresse crônico induz lateralidade funcional na região do CA1 do hipocampo, indo ao encontro de estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, os quais pontuam a lateralização do córtex pré-frontal em camundongos submetidos ao EDS (Canto-de-Souza *et al.*, 2024; Santos-Costa *et al.*, 2021). Da mesma forma, o hipocampo apresenta lateralidade funcional, especialmente nas sub-regiões CA1 e CA3. Adentrando a região CA1, tem-se que o hemisfério esquerdo possui maior

correlação com a memória e experiências anteriores, enquanto a mesma região no lado direito corresponde à análise do contexto presente, auxiliando na tomada de decisões (Jordan, 2020). Sendo assim, a maior expressão da proteína cFos na região CA1 do hemisfério direito encontra embasamento na atenção requerida em um contexto novo para o animal no LCE.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo de mestrado permitem concluir que o modelo de estresse crônico utilizado não foi efetivo para resultar em prejuízo mnemônico em camundongos machos e fêmeas, bem como não teve efeito ansiogênico nos animais machos. O EDS desencadeou comportamento do tipo ansioso em camundongos fêmeas, sem alterar a atividade locomotora e a sociabilidade dos animais. Além disso, o tratamento com PF-3845 não alterou o comportamento avaliado no LCE em camundongos fêmeas, indicando que o eCB não atua nos mecanismos relacionados à ansiedade em camundongos fêmeas. Tal resultado em conjunto com a literatura indica a existência de dimorfismos sexuais na relação ansiedade x estresse x sistema endocanabinoide. A imunomarcação indica que o EDS resulta em redução da expressão da proteína cFos na região DG do dHPC em fêmeas, além de revelar lateralidade funcional na região CA1 do dHPC nos animais machos submetidos ao EDS.

REFERÊNCIAS

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais: DSM-5**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

BADDELEY, A. Working memory: Theories, models, and controversies. **Annual Review of Psychology**, v. 63, p. 1–29, 2012. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-psych-120710-100422>. Acesso em: 08 out. 2025.

BAPTISTA-DE-SOUZA, D. *et al.* Sex differences in the role of atypical PKC within the basolateral nucleus of the amygdala in a mouse hyperalgesic priming model. **Neurobiology of Pain**, v. 8, p. 100054, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2452073X20300076>. Acesso em: 08 out. 2025.

BASILE, V. T.; NEWTON-JOHN, T.; WOOTTON, B. M. Treatment histories, barriers, and preferences for individuals with symptoms of generalized anxiety disorder. **Journal of Clinical Psychology**, v. 80, n. 6, p. 1286–1305, 2024. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jclp.23665>. Acesso em: 08 out. 2025.

BEDSE, G. *et al.* Therapeutic endocannabinoid augmentation for mood and anxiety disorders: Comparative profiling of FAAH, MAGL and dual inhibitors. **Translational Psychiatry**, v. 8, n. 1, p. 92, 2018. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41398-018-0141-7>. Acesso em: 08 out. 2025.

BEERY, A. K.; ZUCKER, I. Sex bias in neuroscience and biomedical research. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 35, n. 3, p. 565–572, 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0149763410001156>. Acesso em: 08 out. 2025.

BOWERS, M. E.; RESSLER, K. J. Sex-dependence of anxiety-like behavior in cannabinoid receptor 1 (Cnr1) knockout mice. **Behavioural Brain Research**, v. 300, p. 65–69, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166432815303132>. Acesso em: 08 out. 2025.

BULLITT, E. Expression of C-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 296, n. 4, p. 517–530, 1990. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cne.902960402>. Acesso em: 08 out. 2025.

CALHOON, G. G.; TYE, K. M. Resolving the neural circuits of anxiety. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 10, p. 1394–1404, 2015. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nn.4101>. Acesso em: 08 out. 2025.

CANNON, W. B. Stresses and strains of homeostasis. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 189, n. 1, p. 1-14, 1935.

CANTO-DE-SOUZA, L. *et al.* Distinct roles of the left and right prelimbic cortices in the modulation of ethanol consumption in male mice under acute and chronic social defeat stress. **Psychopharmacology**, v. 241, n. 6, p. 1161–1176, 2024. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00213-024-06550-8>. Acesso em: 08 out. 2025.

CANTO-DE-SOUZA, L. *et al.* Sex differences in behavioral and neural responses induced by witnessing social defeat stress during adolescence or adulthood in mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 138, p. 111400, 2025. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278584625000673>. Acesso em: 08 out. 2025.

CARNEVALI, L. *et al.* The contagion of social defeat stress: Insights from rodent studies. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 111, p. 199–213, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0149763419308760>. Acesso em: 08 out. 2025.

CASTILLO, A. R. G. L. *et al.* **Transtornos de ansiedade**. Porto Alegre: Artes Médicas, 2000.

CHESWORTH, R.; WATT, G.; KARL, T. Cannabinoid modulation of object recognition and location memory — A preclinical assessment. *In*: DUDEN, A. (org.). **Handbook of Behavioral Neuroscience**. Amsterdam: Elsevier, 2018. v. 27, p. 461–488. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780128120125000318>. Acesso em: 08 out. 2025.

COHEN, S. J.; STACKMAN, R. W. Assessing rodent hippocampal involvement in the novel object recognition task. A review. **Behavioural Brain Research**, v. 285, p. 105–117, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166432814005130>. Acesso em: 08 out. 2025.

COOPER, S. E. *et al.* Comparison of chronic physical and emotional social defeat stress effects on mesocorticolimbic circuit activation and voluntary consumption of morphine. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-09106-3>. Acesso em: 08 out. 2025.

CORBETT, B. F. *et al.* Δ FosB regulates gene expression and cognitive dysfunction in a mouse model of Alzheimer’s disease. **Cell Reports**, v. 20, n. 2, p. 344–355, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28700937/>. Acesso em: 08 out. 2025.

CZÉH, B. *et al.* Chronic social stress inhibits cell proliferation in the adult medial prefrontal cortex: Hemispheric asymmetry and reversal by fluoxetine treatment. **Neuropsychopharmacology**, v. 32, n. 7, p. 1490–1503, 2007. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/1301275>. Acesso em: 08 out. 2025.

DA COSTA, V. F. **Comportamento defensivo, prejuízo na memória e ativação diferencial do hipocampo dorsal e ventral em camundongos machos submetidos ao**

protocolo de derrota social. 2022. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2023. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/items/141518a7-efbe-4964-9544-87825b56e45a>. Acesso em: 08 out. 2025.

DA COSTA, V. F. *et al.* Emotional- and cognitive-like responses induced by social defeat stress in male mice are modulated by the BNST, amygdala, and hippocampus. **Frontiers in Integrative Neuroscience**, v. 17, p. 1–15, 2023. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/integrative-neuroscience/articles/10.3389/fnint.2023.1168640/full>. Acesso em: 08 out. 2025.

DANIELI, K.; GUYON, A.; BETHUS, I. Episodic memory formation: A review of complex hippocampus input pathways. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 122, p. 110713, 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37086812/>. Acesso em: 08 out. 2025.

DIAMOND, D. M. *et al.* The temporal dynamics model of emotional memory processing: A synthesis on the neurobiological basis of stress-induced amnesia, flashbulb and traumatic memories, and the Yerkes-Dodson law. **Neural Plasticity**, v. 2007, p. 1–33, 2007. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1155/2007/60803>. Acesso em: 08 out. 2025.

FILE, S. E.; HYDE, J. R. G. Can social interaction be used to measure anxiety? **British Journal of Pharmacology**, v. 62, n. 1, p. 19–24, 1978. Disponível em: <https://bpspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1476-5381.1978.tb07001.x>. Acesso em: 08 out. 2025.

FILE, S. E.; SETH, P. A review of 25 years of the social interaction test. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1–3, p. 35–45, 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12600701/>. Acesso em: 08 out. 2025.

FORNER-PIQUER, I. *et al.* Endocannabinoid system and metabolism: The influences of sex. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 21, p. 11650, 2024. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/25/22/11909>. Acesso em: 08 out. 2025.

GARAKANI, A. *et al.* Pharmacotherapy of anxiety disorders: Current and emerging treatment options. **Frontiers in Psychiatry**, v. 11, p. 595584, 2020. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpsy.2020.595584/full>. Acesso em: 08 out. 2025.

GHAFFARIMOGHADAM, M. *et al.* A review of behavioral methods for the evaluation of cognitive performance in animal models: Current techniques and links to human cognition. **Physiology and Behavior**, v. 243, p. 113648, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031938421003395>. Acesso em: 08 out. 2025.

GOLDEN, S. A. *et al.* A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice. **Nature Protocols**, v. 6, n. 8, p. 1183–1191, 2011. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nprot.2011.361>. Acesso em: 08 out. 2025.

- HARRIS, A. Z. *et al.* A novel method for chronic social defeat stress in female mice. **Neuropsychopharmacology**, v. 43, n. 6, p. 1276–1283, 2018. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/npp2017259>. Acesso em: 08 out. 2025.
- HARTMANN, A. *et al.* Role of the endocannabinoid system in the dorsal hippocampus in the cardiovascular changes and delayed anxiety-like effect induced by acute restraint stress in rats. **Journal of Psychopharmacology**, v. 33, n. 5, p. 606–614, 2019. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/0269881119827799>. Acesso em: 08 out. 2025.
- JONIDES, J. *et al.* The mind and brain of short-term memory. **Annual Review of Psychology**, v. 59, p. 193–227, 2008. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.psych.59.103006.093615>. Acesso em: 08 out. 2025.
- JORDAN, J. T. The rodent hippocampus as a bilateral structure: A review of hemispheric lateralization. **Hippocampus**, v. 30, n. 3, p. 196–202, 2020. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/hipo.23188>. Acesso em: 08 out. 2025.
- KENWOOD, M. M.; KALIN, N. H.; BARBAS, H. The prefrontal cortex, pathological anxiety, and anxiety disorders. **Neuropsychopharmacology**, v. 47, n. 1, p. 263–277, 2022. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41386-021-01109-z>. Acesso em: 08 out. 2025.
- KIM, E. J.; KIM, J. J. Neurocognitive effects of stress: a metaparadigm perspective. **Molecular Psychiatry**, v. 28, n. 7, p. 2745–2756, 2023. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41380-023-01986-4>. Acesso em: 08 out. 2025.
- KIM, E. J.; PELLMAN, B.; KIM, J. J. Stress effects on the hippocampus: a critical review. **Learning & Memory**, v. 22, n. 9, p. 411–416, 2015. Disponível em: <https://learnmem.cshlp.org/content/22/9/411.short>. Acesso em: 08 out. 2025.
- KINSEY, S. G. *et al.* Repeated social defeat causes increased anxiety-like behavior and alters splenocyte function in C57BL/6 and CD-1 mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 21, n. 4, p. 458–466, 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889159106003552>. Acesso em: 08 out. 2025.
- KNEZEVIC, E. *et al.* The role of cortisol in chronic stress, neurodegenerative diseases, and psychological disorders. **Cells**, v. 12, n. 23, p. 2853, 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4409/12/23/2726>. Acesso em: 08 out. 2025.
- LARA APARICIO, S. Y. *et al.* Current opinion on the use of c-Fos in neuroscience. **NeuroSci**, v. 3, n. 4, p. 687–702, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2673-4087/3/4/50>. Acesso em: 08 out. 2025.
- LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, n. 2, p. 180–185, 1987. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00177912>. Acesso em: 08 out. 2025.

LOPEZ, J.; BAGOT, R. C. Defining valid chronic stress models for depression with female rodents. **Biological Psychiatry**, v. 90, n. 4, p. 254–263, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000632232101115X>. Acesso em: 08 out. 2025.

LOWE, H. *et al.* The endocannabinoid system: A potential target for the treatment of various diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 17, p. 9472, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/17/9472>. Acesso em: 08 out. 2025.

LUEPTOW, L. M. Novel object recognition test for the investigation of learning and memory in mice. **Journal of Visualized Experiments**, n. 126, p. 55718, 2017. Disponível em <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5614391/>. Acesso em: 08 out. 2025.

LUINE, V. N. *et al.* Chronic stress and neural function: accounting for sex and age. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 19, n. 10, p. 743–751, 2007. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2826.2007.01594.x>. Acesso em: 08 out. 2025.

LUINE, V. Sex differences in chronic stress effects on memory in rats. **Stress**, v. 5, n. 3, p. 205–216, 2002. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/1025389021000010549>. Acesso em: 08 out. 2025.

MACCARRONE, M. *et al.* Goods and bads of the endocannabinoid system as a therapeutic target: lessons learned after 30 years. **Pharmacological Reviews**, v. 75, n. 5, p. 885–958, set. 2023. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031699724007853>. Acesso em: 08 out. 2025.

MAJIDAZAR, R. *et al.* Pharmacotherapy of Alzheimer's disease: an overview of systematic reviews. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 78, n. 10, p. 1559–1571, out. 2022. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00228-022-03366-y>. Acesso em: 08 out. 2025.

MARTINEZ, M.; CALVO-TORRENT, A.; PICO-ALFONSO, M. A. Social defeat and subordination as models of social stress in laboratory rodents: a review. **Aggressive Behavior**, v. 24, n. 4, p. 261–276, 1998. Disponível em: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/\(SICI\)1098-2337\(1998\)24:4%3C241::AID-AB1%3E3.0.CO;2-M](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/(SICI)1098-2337(1998)24:4%3C241::AID-AB1%3E3.0.CO;2-M). Acesso em: 08 out. 2025.

MASTEN, A. S. Global perspectives on resilience in children and youth. **Child Development**, v. 85, n. 1, p. 6–20, jan./fev. 2014. Disponível em: <https://srcd.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cdev.12205>. Acesso em: 08 out. 2025.

MATSUDA, S. *et al.* Sex differences in fear extinction and involvements of extracellular signal-regulated kinase (ERK). **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 123, p. 117–124, set. 2015. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074742715001112>. Acesso em: 08 out. 2025.

MAYO, L. M. *et al.* Targeting the endocannabinoid system in the treatment of posttraumatic stress disorder: a promising case of preclinical-clinical translation? **Biological Psychiatry**, v. 91, n. 3, p. 237-247, fev. 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006322321014724>. Acesso em: 08 out. 2025.

MEDEIROS, F. de A. *et al.* Tratamento farmacológico da ansiedade generalizada: novas abordagens. **Journal of Medical and Biosciences Research**, v. 1, n. 4, p. 501–509, 23 set. 2024. Disponível em: <https://www.journalmbr.com.br/index.php/jmbr/article/view/302>. Acesso em: 08 out. 2025.

MELARAGNO, A. J. Pharmacotherapy for anxiety disorders: from first-line options to treatment resistance. **Focus**, v. 19, n. 2, p. 145–160, jun. 2021. Disponível em: <https://psychiatryonline.org/doi/full/10.1176/appi.focus.20200048>. Acesso em: 08 out. 2025.

MICULAS, D. C. *et al.* Pharmacotherapy evolution in Alzheimer’s disease: current framework and relevant directions. **Cells**, v. 12, n. 2, p. 289, jan. 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4409/12/1/131>. Acesso em: 08 out. 2025.

MICZEK, K. A. *et al.* Aggressive behavioral phenotypes in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 275, p. 1-16, dez. 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166432801002984>. Acesso em: 08 out. 2025.

MICZEK, K. A.; THOMPSON, M. L.; SHUSTER, L. Opioid-like analgesia in defeated mice. **Science**, v. 215, n. 4540, p. 1520-1522, mar. 1982. Disponível em: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.7199758>. Acesso em: 08 out. 2025.

MIGUEL, T. T.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Anxiogenic and antinociceptive effects induced by corticotropin-releasing factor (CRF) injections into the periaqueductal gray are modulated by CRF1 receptor in mice. **Hormones and Behavior**, v. 60, n. 3, p. 292–300, ago. 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0018506X11001346>. Acesso em: 08 out. 2025.

MIZUNO, I. *et al.* The role of the cannabinoid system in fear memory and extinction in male and female mice. **Psychoneuroendocrinology**, v. 138, p. 105678, abr. 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306453022000294>. Acesso em: 08 out. 2025.

MORAIS-SILVA, G. *et al.* Interaction between social defeat stress and chronic ethanol exposure on behaviors during ethanol withdrawal and pro-inflammatory cytokines in mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 97, p. 116-127, out. 2021. Disponível em: <https://www.bendola.com/journals/PNIJ/246113/>. Acesso em: 08 out. 2025.

MORENA, M. *et al.* Neurobiological interactions between stress and the endocannabinoid system. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 1, p. 80-102, jan. 2016. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/npp2015166>. Acesso em: 08 out. 2025.

MORGAN, J. I.; COHEN, D. R.; HEMPSTEAD, J. L.; CURRAN, T. Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. **Science**, v. 237, n. 4811, p. 192-197, jul. 1987. Disponível em: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.3037702>. Acesso em: 08 out. 2025.

MURAKAMI, S. *et al.* Chronic stress, as well as acute stress, reduces BDNF mRNA expression in the rat hippocampus but less robustly. **Neuroscience Research**, v. 53, n. 2, p. 129-139, out. 2005. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168010205001641>. Acesso em: 08 out. 2025.

O'CONNOR, D. B.; THAYER, J. F.; VEDHARA, K. Stress and health: a review of psychobiological processes. **Annual Review of Psychology**, v. 72, p. 663-688, jan. 2021. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev-psych-062520-122331>. Acesso em: 08 out. 2025.

ORTEGA-DE SAN LUIS, C.; RYAN, T. J. Understanding the physical basis of memory: molecular mechanisms of the engram. **Journal of Biological Chemistry**, v. 298, n. 5, p. 101889, maio 2022. Disponível em: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(22\)00306-4/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(22)00306-4/fulltext). Acesso em: 08 out. 2025.

OTERO, S. J. C. **O papel da neurotransmissão endocanabinoide na atividade neuronal da amígdala sobre a modulação do processo de cronificação da dor em camundongos machos e fêmeas.** 2018. 141 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/entities/publication/6ba38803-faf2-41c8-adb9-19850a5d3c86>. Acesso em: 08 out. 2025.

PANLILIO, L. V.; JUSTINOVA, Z.; GOLDBERG, S. R. Inhibition of FAAH and activation of PPAR: new approaches to the treatment of cognitive dysfunction and drug addiction. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 138, n. 1, p. 44-61, abr. 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163725813000053>. Acesso em: 08 out. 2025.

PAVÓN, F. J. *et al.* Selective inhibition of monoacylglycerol lipase is associated with passive coping behavior and attenuation of stress-induced dopamine release in the medial prefrontal cortex. **Neurobiology of Stress**, v. 14, p. 100319, maio 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352289521000011>. Acesso em: 08 out. 2025.

PIOMELLI, D.; TAGNE, A. M. Endocannabinoid-based therapies. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 62, p. 535-556, jan. 2022. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev-pharmtox-052220-021800>. Acesso em: 08 out. 2025.

PORTUGALOV, A.; AKIRAV, I. FAAH inhibition reverses depressive-like behavior and sex-specific neuroinflammatory alterations induced by early life stress. **Cells**, v. 11, n. 22, p. 3594, nov. 2022. Disponível em <https://www.mdpi.com/2073-4409/13/22/1881>. Acesso em: 08 out. 2025.

REGIANE-JOCA, S. L.; PADOVAN, C. M.; GUIMARÃES, F. S. Estresse, depressão e hipocampo. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 25, suppl. 2, p. 46-51, 2003. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbp/a/qbDTWLYkGg6VkXRQnYRVStF/?format=html&lang=pt>. Acesso em: 08 out. 2025.

REICH, C. G.; TAYLOR, M. E.; MCCARTHY, M. M. Differential effects of chronic unpredictable stress on hippocampal CB1 receptors in male and female rats. **Behavioural Brain Research**, v. 203, n. 2, p. 264–269, nov. 2009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166432809003131>. Acesso em: 08 out. 2025.

REIS, S. P.; MARQUES, M. L. D. G.; MARQUES, C. C. D. G. Diagnóstico e tratamento da doença de Alzheimer. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 5, n. 2, p. 5951–5963, mar./abr. 2022. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Claudia-Dias-Granito/publication/360569697_Diagnostico_e_tratamento_da_doenca_de_alzheimer_Diagnosis_and_treatment_of_alzheimer's_disease/links/67479ba7359dcb4d9d3ca736/Diagnostico-e-tratamento-da-doenca-de-alzheimer-Diagnosis-and-treatment-of-alzheimers-disease.pdf. Acesso em: 08 out. 2025.

REN, S.-Y. *et al.* Potential application of endocannabinoid system agents in neuropsychiatric and neurodegenerative diseases—focusing on FAAH/MAGL inhibitors. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 41, n. 10, p. 1263–1272, out. 2020. Disponível em <https://www.nature.com/articles/s41401-020-0385-7>. Acesso em: 08 out. 2025.

REZENDE, B. *et al.* Endocannabinoid system: chemical characteristics and biological activity. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 2, p. 238, fev. 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1424-8247/16/2/148>. Acesso em: 08 out. 2025.

RODGERS, R. J.; DALVI, A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 21, n. 6, p. 801-810, 1997. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0149763496000589>. Acesso em: 08 out. 2025.

ROESLER, R. *et al.* Amygdala-hippocampal interactions in synaptic plasticity and memory formation. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 184, p. 107493, out. 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S107474272100112X>. Acesso em: 08 out. 2025.

RUSSO, S. J. *et al.* Neurobiology of resilience. **Nature Neuroscience**, v. 15, n. 11, p. 1475-1484, nov. 2012. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nn.3234>. Acesso em: 08 out. 2025.

SANTOS-COSTA, N. *et al.* Glutamatergic neurotransmission controls the functional lateralization of the mPFC in the modulation of anxiety induced by social defeat stress in male mice. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 15, p. 709673, ago. 2021. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/behavioral-neuroscience/articles/10.3389/fnbeh.2021.695735/full>. Acesso em: 08 out. 2025.

SCOVILLE, W. B.; MILNER, B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 20, n. 1, p. 11-21, fev. 1957. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13406589/>. Acesso em: 08 out. 2025.

SELYE, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. **Nature**, v. 138, n. 3479, p. 32, jul. 1936. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/138032a0>. Acesso em: 08 out. 2025.

SELYE, H. What is stress? **Metabolism**, v. 5, n. 5, p. 525–530, set. 1956.

SHI, H.-J. *et al.* Hippocampus: molecular, cellular, and circuit features in anxiety. **Neuroscience Bulletin**, v. 39, n. 6, p. 929-948, jun. 2023. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12264-023-01020-1>. Acesso em: 08 out. 2025.

SMITH, S. M.; VALE, W. W. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 8, n. 4, p. 383–395, dez. 2006. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.31887/DCNS.2006.8.4/ssmith>. Acesso em: 08 out. 2025.

SOUTHWICK, S. M. *et al.* Resilience definitions, theory, and challenges: interdisciplinary perspectives. **European Journal of Psychotraumatology**, v. 5, p. 25338, out. 2014. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3402/ejpt.v5.25338>. Acesso em: 08 out. 2025.

SPENCER, R. L.; DEAK, T. A user's guide to HPA axis research. **Physiology & Behavior**, v. 178, p. 43-65, set. 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S003193841630720X>. Acesso em: 08 out. 2025.

SZABO, S.; TACHE, Y.; SOMOGYI, A. The legacy of Hans Selye and the origins of stress research: a retrospective 75 years after his landmark brief "letter" to the Editor of Nature. **Stress**, v. 15, n. 5, p. 472–478, set. 2012. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/10253890.2012.710919>. Acesso em: 08 out. 2025.

TAKAHASHI, A. *et al.* Establishment of a repeated social defeat stress model in female mice. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 427, dez. 2017. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-12811-8>. Acesso em: 08 out. 2025.

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. e17397, fev. 2011. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0017405>. Acesso em: 08 out. 2025.

TRAN, I.; GELLNER, A. K. Long-term effects of chronic stress models in adult mice. **Journal of Neural Transmission**, v. 130, n. 9, p. 1105-1135, set. 2023. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00702-023-02598-6>. Acesso em: 08 out. 2025.

VAN DE KAR, L. D.; BLAIR, M. L. Forebrain pathways mediating stress-induced hormone secretion. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 20, n. 2, p. 153-207, abr. 1999. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091302298901728>. Acesso em: 08 out. 2025.

VAN PRAAG, H. *et al.* Functional neurogenesis in the adult hippocampus. **Nature**, v. 415, n. 6875, p. 1030–1034, fev. 2002. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/4151030a>. Acesso em: 08 out. 2025.

VARADHARAJAN, A. *et al.* Guidelines for pharmacotherapy in Alzheimer’s disease – A primer on FDA-approved drugs. **Journal of Neurosciences in Rural Practice**, v. 14, n. 4, p. 659-668, out. 2023. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10696336/>. Acesso em: 08 out. 2025.

VITORAZZO, A. N. M. *et al.* Arsenal farmacoterapêutico disponível para o tratamento de ansiedade generalizada: revisão farmacológica e clínica. **International Journal of Health Management Review**, v. 7, n. 2, p. 132-140, 2021. Disponível em: <https://www.ijhmreview.org/ijhmreview/article/view/275>. Acesso em: 08 out. 2025.

WISE, L. E.; HARLOE, J. P.; LICHTMAN, A. H. Fatty acid amide hydrolase (FAAH) knockout mice exhibit enhanced acquisition of an aversive, but not of an appetitive, Barnes maze task. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 92, n. 4, p. 597–601, nov. 2009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074742709001270>. Acesso em: 08 out. 2025.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global status report on the public health response to dementia**. Geneva: WHO, 2021. Disponível em: <https://digitalcommons.fiu.edu/srhreports/health/health/65/>. Acesso em: 08 out. 2025.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **International Classification of Diseases for Mortality and Morbidity Statistics (11th Revision)**. Geneva: WHO, 2019. Disponível em: <https://icd.who.int/browse11/l-m/en>. Acesso em: 08 out. 2025.

YANG, Z. *et al.* A review of short-term, long-term, and memory consolidation mechanisms in the hippocampus and cerebral cortex. **IEEE Access**, v. 11, p. 63248–63283, 2023. Disponível em: <https://ieeexplore.ieee.org/abstract/document/10942600>. Acesso em: 08 out. 2025.

ZAKI, Y.; CAI, D. J. Memory engram stability and flexibility.

Neuropsychopharmacology, v. 49, n. 1, p. 111-125, jan. 2024. Disponível em:

<https://www.nature.com/articles/s41386-024-01979-z>. Acesso em: 08 out. 2025.

ZER-AVIV, T. M.; AKIRAV, I. Sex differences in hippocampal response to

endocannabinoids after exposure to severe stress. **Hippocampus**, v. 26, n. 7, p. 947–

957, jul. 2016. Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/hipo.22577>. Acesso em: 08 out. 2025.

ZHANG, J. *et al.* Inhibition of cannabinoid degradation enhances hippocampal

contextual fear memory and exhibits anxiolytic effects. **iScience**, v. 27, n. 2, p. 108933,

fev. 2024. Disponível em: [https://www.cell.com/iscience/fulltext/S2589-](https://www.cell.com/iscience/fulltext/S2589-0042(24)00140-8)

[0042\(24\)00140-8](https://www.cell.com/iscience/fulltext/S2589-0042(24)00140-8). Acesso em: 08 out. 2025.

ZLOTNIK, G.; VANSINTJAN, A. Memory: an extended definition. **Frontiers in**

Psychology, v. 10, p. 2523, nov. 2019. Disponível em:

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpsyg.2019.02523/full>. Acesso em: 08 out. 2025.