UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Julian Humberto Avalo Zuluaga

Exploração dos Efeitos da Idade, Sexo e Estresse de Testemunha da Derrota Social nos Comportamentos Relacionados à Depressão e Ativação Neural no Complexo Amidalóide e Hipocampo Dorsal

Araraquara, SP

2024

UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Julian Humberto Avalo Zuluaga

Exploração dos Efeitos da Idade, Sexo e Estresse de Testemunha da Derrota Social nos Comportamentos Relacionados à Depressão e Ativação Neural no Complexo Amidaloide e Hipocampo Dorsal

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

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza

Coorientadores: Dr. Lucas Canto de Souza e Dra. Daniela Baptista de Souza

Araraquara, SP

2024

A945e

Avalo Zuluaga, Julian Humberto.
Exploração dos Efeitos da Idade, Sexo e Estresse de Testemunha da Derrota Social nos Comportamentos Relacionados à Depressão e Ativação Neural no Complexo Amidaloide e Hipocampo Dorsal / Julian Humberto Avalo Zuluaga. – Araraquara, 2024.
58 f. : il.

Orientador: Ricardo Luiz Nunes de Souza.
Coorientador: Lucas Canto de Souza.
Coorientadora: Daniela Baptista de Souza.

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

1. Complexo amidaloide. 2. Hipocampo dorsal. 3. Estresse de Testemunho Derrota Social. 4. Estresse Crônico. 5. Camundongos. 6. Ativação neuronal. I. Souza, Ricardo Luiz Nunes de. orient. II. Souza, Lucas Canto de. coorient. III. Souza, Daniela Baptista de. coorient. IV. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33001014037P4
Esta ficha não pode ser modificada

Exploração dos Efeitos da Idade, Sexo e Estresse de Testemunha da Derrota Social nos Comportamentos Relacionados à Depressão e Ativação Neural no Complexo Amidalóide e Hipocampo Dorsal

Comissão julgadora

para obtenção do grau de mestre em Ciências Fisiológicas

Presidente e orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza

2º Examinador: Profa. Dra. Cleopatra da Silva Planeta

3º Examinador: Profa. Dra. Raquel Vecchio Fornari

4º Examinador: Prof. Dr. Marcelo Tadeu Marin

5º Examinador: Prof. Dr. Tarciso Tadeu Miguel

Araraquara, 07 de junho de 2024.

(data da defesa)

AGRADECIMENTOS

A minha família que acreditou em mim antes do que eu mesmo.

Ao Prof. Dr. Javier Leonardo Rico quem me mostrou o início desta estrada.

Ao meu orientador o Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza pelo apoio e acolhimento ao chegar num novo país.

Aos meus coorientadores o Dr. Lucas Canto de Souza e a Dr. Daniela Baptista de Souza pelos conselhos, guia e calidez.

Aos colombianos que se tornaram minha família.

À Isabela pelo seu apoio, amor e companhia.

Aos meus amigos "los gringos" que me fazem sentir em casa, ainda longe dela.

À Stephany Viatela Ramírez pela colaboração na coleta dos dados.

Aos meus colegas de laboratório pelas ideias, sugestões e risadas compartilhadas.

A todos os meus amigos que ficaram em casa, porém, sempre me acompanham no coração.

À Erika Briceño pelo impulso.

Às coincidências e imprevistos que criam novos caminhos.

A Araraquara que com seus climas intensos sempre traz tranquilidade.

À Universidade e ao corpo docente pelo conhecimento brindado.

Ao Brasil pelas oportunidades e novos horizontes.

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

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2023/01341-8) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

A todos aqueles lugares, pessoas, animais e coisas que cruzaram e compartilharam meu caminho até aqui.

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

RESUMO

Os seres humanos estão constantemente expostos a diversas fontes de estresse, com a mais prevalente atualmente originando-se do ambiente social, seja vivenciada diretamente ou observada. A exposição crônica ao estresse tem sido associada ao desenvolvimento de transtornos psiquiátricos, como depressão e ansiedade. Além disso, o estresse provoca alterações morfofuncionais em áreas cruciais do cérebro, incluindo o complexo amidaloide e o hipocampo dorsal, estruturas límbicas conhecidas por influenciar respostas emocionais decorrentes de situações estressantes. Contudo, evidências sugerem que os efeitos do estresse são diferenciados e dependentes de variáveis como sexo e idade. Diante desse contexto, este estudo teve como objetivo (i) analisar o impacto do estresse de testemunho à derrota social em diferentes fases da vida (camundongos Swiss-Webster de 21 dias pós-natal (DPN) e 58-60 DPN) nas respostas relacionadas à depressão em camundongos machos e fêmeas, avaliando-se indicadores como condição da pelagem, construção de ninho, exploração de objeto novo e ganho de peso, e (ii) examinar o padrão de ativação neuronal no complexo amidaloide e hipocampo dorsal. Para realizar essas investigações, dois experimentos foram conduzidos. No Experimento 1, foram explorados os efeitos do estresse em (a) comportamentos associados à depressão e (b) na expressão da proteína ΔFosB no complexo amidaloide e hipocampo dorsal, utilizando imunofluorescência, em camundongos machos e fêmeas expostos ao estresse de testemunha da derrota social (ETDS) aos 58-60 DPN. O Experimento 2 seguiu procedimento semelhante, porém avaliou o efeito tardio do estresse precoce (camundongos expostos ao ETDS aos 21 DPN) sobre (c) comportamentos associados à depressão e (d) na expressão da proteína ΔFosB no complexo amidaloide e hipocampo dorsal em camundongos machos e fêmeas, sendo essa avaliação realizada aos 58-62 DPN. Os principais resultados demonstraram que a exposição ao ETDS é capaz de produzir de maneira dependente do sexo e idade (i) respostas apáticas (ii) alterações na conduta exploratória, (iii) diminuição no peso corporal e uma diminuição do padrão de ativação neuronal no complexo amidaloide e hipocampo dorsal, porém somente em fêmeas expostas ao ETDS na idade adulta.

Palavras-chave: Complexo amidaloide. Hipocampo dorsal. Estresse de Testemunho Derrota Social. Estresse Crônico. Camundongos. Ativação neuronal.

ABSTRACT

Humans are constantly exposed to various sources of stress, with the most prevalent currently originating from the social environment, whether experienced directly or observed. Chronic exposure to stress has been associated with the development of psychiatric disorders, such as depression and anxiety. Additionally, stress induces morphofunctional changes in crucial areas of the brain, including the amygdala complex and dorsal hippocampus, limbic structures known to influence emotional responses to stressful situations. However, evidence suggests that the effects of stress are differentiated and dependent on variables such as sex and age. In this context, this study aimed to (i) analyze the impact of social defeat stress at different stages of life (Swiss-Webster mice at 21 days postnatal (DPN) and 58-60 DPN) on depression-related responses in male and female mice, evaluating indicators such as coat state, nest building, exploration of a novel object, and weight gain, and (ii) examine the pattern of neuronal activation in the amygdala complex and dorsal hippocampus. To carry out these investigations, two experiments were conducted. In Experiment 1, the effects of stress on (a) depression-associated behaviors and (b) the expression of the protein ΔFosB in the amygdala complex and dorsal hippocampus were explored using immunofluorescence in male and female mice exposed to social defeat stress (SDS) at 58-60 DPN. Experiment 2 followed a similar procedure, with the difference being that it assessed the late effect of early stress exposure (exposed to SDS at 21 DPN) on (c) depression-associated behaviors and (d) the expression of the protein ΔFosB in the amygdala complex and dorsal hippocampus in male and female mice, with this assessment being conducted at 58-62 DPN. The main results demonstrated that exposure to SDS can produce sex- and age-dependent responses like: (i) apathetic responses (ii) changes in exploratory behavior, (iii) decreased body weight gain, and a decrease in the pattern of neuronal activation in the amygdala complex and dorsal hippocampus only in females exposed to SDS in adulthood.

Keywords: Amygdala. Dorsal Hippocampus. Witnessing Social Defeat Stress. Chronic Stress. Mice. Neuronal activation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 12
2. OBJETIVOS 15
2.1 Objetivo Geral 15
2.2 Objetivos Específicos 15
3. MATERIAL E MÉTODOS 15
3.1 Sujeitos 15
3.2 Estresse de derrota social (EDS) e estresse de testemunha de derrota social (ETDS) 16
3.3 Condição da pelagem 17
3.4 Construção de ninhos 17
3.5 Exploração de objeto novo 18
3.6 Imunofluorescência 19
3.7 Delineamento experimental 20
3.7.1 Experimento 1 - Efeito do estresse sobre comportamentos relacionados à depressão e na expressão da proteína ΔFosB no complexo amidalóide e do hipocampo dorsal de camundongos machos e fêmeas expostos ao ETDS aos 58-60 DPN 20
3.7.2 Experimento 2 - Efeito tardio do estresse precoce sobre comportamentos relacionados à depressão e na expressão da proteína ΔFosB no complexo amidaloide e no hipocampo dorsal de camundongos machos e fêmeas expostos ao ETDS aos 21 DPN 21
3.8 Análise estatística. 22
3.9 Ética 22
4. RESULTADOS 23
4.1 Experimento 1: O ETDS induz comportamentos relacionados à apatia, aumentar o tempo de interação com um objeto novo e diminuir o padrão de ativação da amídala e do hipocampo dorsal de forma específica para o sexo. 23
4.1.1 Condição da pelagem 23
4.1.2 Construção de ninho 24
4.1.3 Exploração de objeto novo 25
4.1.4 Ganho de peso 26
4.1.5 Padrão de ativação neuronal (ΔFosB) no complexo amigdaloide 27
4.1.6 Padrão de ativação neuronal (ΔFosB) no giro denteado (DG) e campo CA1 do hipocampo dorsal 29

4.2 Experimento 2: A exposição ao ETDS durante a fase peripuberal pode desencadear respostas associadas à apatia, reduzir o tempo de interação com objetos novos e afetar o ganho de peso de maneira específica conforme o sexo, quando os indivíduos são expostos a situações estressantes na idade adulta. 33

4.2.1 Condição da pelagem 33

4.2.2 Construção do ninho 34

4.2.3 Exploração de objeto novo 35

4.2.4 Ganho de peso 36

4.2.5 Padrão de ativação neuronal (ΔFosB) no complexo amidaloide 37

4.2.6 Padrão de ativação neuronal (ΔFosB) no giro dentado do hipocampo dorsal (DG) e no campo CA1 do hipocampo dorsal (CA1) 39

5. DISCUSSÃO 43

6 CONCLUSÃO 51

7 REFERÊNCIAS 53

1. INTRODUÇÃO

O transtorno depressivo é um problema de saúde pública mundial que impacta no bem-estar, chegando a ser a quarta causa de morte nas pessoas entre os 15 e 29 anos (Organização mundial da saúde - OMS, 2021). De acordo com Institute for Health Metrics and Evaluation Global Health Data Exchange (GHDx, 2022), aproximadamente 280 milhões de pessoas têm depressão (3,8 % da população mundial), sendo as mulheres mais afetadas que os homens com uma prevalência de 4,54% e 2,96%, respectivamente.

Diversas evidências apontam que a exposição crônica a situações sociais estressantes está altamente correlacionada com o desenvolvimento da depressão tanto em humanos como em modelos animais (Alves-dos-Santos; Resende; Chiavegatto, 2020; Higashida *et al.*, 2018; Kessler, 1997). Atualmente, a forma mais comum de estresse ao qual os seres humanos estão expostos vem do ambiente social em que o indivíduo vive no dia a dia. Essas situações estressantes geralmente ocorrem em contextos sociais compartilhados, onde podem ser vivenciadas diretamente ou através da observação (Almeida, 2005; Carnevali *et al.*, 2020; Nakatake *et al.*, 2020a).

Ao longo da história, têm sido desenvolvidos diferentes modelos animais para compreender os efeitos do estresse social. Em roedores, um dos modelos de estresse muito utilizado é o da derrota social, que consiste na exposição repetida ao estresse físico e psicológico de um animal derrotado (intruso) a um agressor (residente) (Tidey; Miczek, 1996). O procedimento de derrota social mostrou-se útil para gerar comportamentos relacionados à depressão e ansiedade em camundongos (Fresca *et al.*, 2023; Golden *et al.*, 2011; Planchez; Surget; Belzung, 2019a; Santos-Costa *et al.*, 2021a; Wood; Bhatnagar, 2015). No entanto, apesar de sua alta validação, o modelo de estresse de derrota social envolve lesões físicas, as quais podem ser a causa dessas alterações comportamentais (Nakatake et al., 2020). Além disso, em sua forma original, o modelo dificulta o estudo das respostas comportamentais e fisiológicas em fêmeas, devido a sua baixa agressividade entre animais deste sexo, deixando assim, um vazio conceitual na população mais afetada pelas doenças de caráter afetivo (Harris *et al.*, 2017; Iñiguez *et al.*, 2018; Newman *et al.*, 2019; Takahashi *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2022).

Pelo fato da maioria das pesquisas serem conduzidas principalmente com machos, torna-se comum inferir que o efeito do estresse é homogêneo ao longo da vida e indiferente ao sexo. Porém, o efeito do estresse depende de diversos fatores que envolvem o tipo e a duração da exposição do agente estressor, a idade e o sexo do indivíduo estressado (Babicola *et al.*, 2021; Hodes, 2018; Luo *et al.*, 2021). Os modelos animais, especialmente os desenvolvidos para roedores, fornecem *insights* valiosos sobre as características psicobiológicas da adolescência, com marcadores comportamentais e neurobiológicos distintos observados nos estágios iniciais (DPN 21-34), médios (DPN 34-46) e tardios da adolescência (DPN 46-59) (Adriani; Laviola, 2000; Laviola *et al.*, 2003). Camundongos na etapa peripuberal exibem respostas únicas ao estresse e à novidade, indicativas de mudanças contínuas no desenvolvimento da circuitaria neural (Adriani; Laviola, 2000). Estudos neurobiológicos sugerem que a resposta do cérebro juvenil ao estresse pode diferir da dos adultos, destacando a necessidade de mais pesquisas para elucidar as complexidades do desenvolvimento cerebral adolescente (Spear; Brake, 1983). De fato, a exposição ao estresse no início da vida e na adolescência, períodos cruciais para o desenvolvimento cerebral, tem um efeito prejudicial na estrutura e função do cérebro, dano que pode persistir a longo prazo, aumentando o risco de desenvolver depressão na idade adulta (Babicola *et al.*, 2021; Dion; Muñoz; Franklin, 2022; Shimizu *et al.*, 2020; Torres Muñoz; Franklin, 2022).

Estudos recentes sugerem ser possível induzir respostas comportamentais e fisiológicas em animais expostos tanto diretamente como indiretamente ao estresse social crônico (Warren *et al.*, 2020). Por exemplo, camundongos machos e fêmeas expostos ao estresse de testemunha de derrota social podem apresentar comportamentos relacionados à depressão, tais como déficits de ganho de peso, estratégias passivas de enfrentamento, evitação social, anedonia e comportamentos relacionados à ansiedade (Carnevali et al., 2020; Iñiguez et al., 2018; Nakatake et al., 2020; Warren et al., 2013, 2020).

Além disso, a exposição ao estresse crônico promove alterações morfofuncionais em distintas áreas do cérebro, incluindo, o complexo amidaloide e o hipocampo dorsal (Flores et al., 2022; Vialou et al., 2014). Estas estruturas possuem papel importante na expressão e modulação de respostas

comportamentais, autonômicas e endócrinas frente a situações estressantes (Babicola *et al.*, 2021). Sob o aspecto clínico, foi relatado que em pacientes com depressão, o volume do complexo amidaloide aumentou nos estágios iniciais da depressão e diminuiu quando houve cronificação da doença (Kim *et al.*, 2021; Schuhmacher *et al.*, 2012). Do ponto de vista da pesquisa básica, estudos em roedores demostraram o papel destas estruturas no medo contextual, condicionamento Pavloviano e memória emocional, sendo assim, mediadoras dos sintomas-chave da depressão (Hakamata *et al.*, 2021; Radley *et al.*, 2015).

Uma das formas utilizadas para verificação da ativação de estruturas encefálicas envolvidas na resposta ao estresse crônico pode ser conduzida através da quantificação da expressão da proteína ΔFosB; um fator de transcrição estável da família Fos implicado na modulação da expressão de genes envolvidos na depressão, o qual, se acumula persistentemente por várias semanas após exposição repetidas ao evento estressor (Berton et al., 2007; Frenois et al., 2007; Gajewski; Turecki; Robison, 2016; Nestler, 2008; Vialou et al., 2014).

Hipótese

Considerando as evidências apresentadas de que o estresse de testemunha de derrota social induz alterações comportamentais e afetivas, e que o complexo amidaloide e o hipocampo dorsal desempenham um papel crucial na modulação das respostas diante de situações estressantes, a hipótese deste estudo prediz que esse protocolo tem a capacidade de modificar as respostas comportamentais associadas à depressão (piora no estado da pelagem, diminuição no ganho de peso, piora na qualidade da construção do ninho e diminuição da interação com um objeto novo). Além disso, nossa hipótese também presume que tais modificações estarão correlacionadas com um incremento no padrão de ativação neuronal no complexo amigdaloide e uma diminuição no hipocampo dorsal, sendo que essas alterações podem variar de acordo com o sexo e a idade dos sujeitos experimentais.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar a presença de diferenças sexuais em camundongos machos e fêmeas submetidos ao protocolo de estresse de testemunha de derrota social quando expostos no início da adolescência e na idade adulta sobre (i) respostas relacionadas à depressão e (ii) no padrão de ativação neuronal no complexo amidaloide e no hipocampo dorsal.

2.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar o efeito do estresse sobre comportamentos relacionados à depressão em camundongos machos e fêmeas expostos ao estresse de testemunha da derrota social aos 58-60 DPN.
2. Avaliar o impacto da exposição precoce ao estresse nas respostas frente a um novo estressor na idade adulta, analisando os comportamentos associados à depressão em camundongos machos e fêmeas que foram submetidos ao estresse de testemunha da derrota social aos 21 dias pós-natal (DPN).
3. Investigar a expressão da proteína ΔFosB no complexo amidaloide e no hipocampo dorsal em camundongos machos e fêmeas expostos ao estresse de testemunha da derrota social em diferentes idades (21 PND e 58-60 PND).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Sujeitos

Cento e sessenta e dois camundongos machos e fêmeas da linhagem Swiss-Webster (21 DPN e 58-60 DPN) foram adquiridos do “Centro de Pesquisa e Produção de Animais – CPPA” da Universidade Estadual Paulista (Botucatu/SP). Todos os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (FCFAr-UNESP). Os camundongos foram alojados em grupos de 6 por gaiola (41 × 34 × 16 cm) e os camundongos residentes foram isolados em gaiolas individuais

(28 × 17 × 12 cm). Os animais tiveram acesso livre a comida e água (exceto durante breves períodos de teste), e foram submetidos a alternância de luz (12h claro/12h escuro) em ambiente com temperatura controlada (23 ± 1 ºC). Eles foram mantidos em um ciclo claro / escuro de 12 h (luzes acesas às 07:00 h), Todos os camundongos intrusos eram ingênuos no início dos experimentos e foram usados uma vez. Os camundongos residentes (3-12 meses) foram usados mais de uma vez por meio de um esquema de rodízio definido pelo experimentador.

3.2 Estresse de derrota social (EDS) e estresse de testemunha de derrota social (ETDS)

Conforme representado na Figura 1, foi usado um protocolo similar ao de estudos prévios (Golden *et al.*, 2011; Sial *et al.*, 2016) no qual o animal intruso foi colocado por 5 minutos em uma gaiola individual perfurada e levado, junto com duas testemunhas (macho e fêmea), para a caixa de alojamento do agressor (residente). O intruso e as testemunhas tiveram interação auditiva, visual e olfativa com o animal residente, mas sem contato físico. Posteriormente, o animal intruso foi retirado da gaiola e introduzido na caixa de alojamento do agressor por mais 5 minutos para a confrontação. Finalmente, o intruso foi colocado de volta na gaiola individual, dentro da caixa de alojamento do agressor por mais 5 minutos. As testemunhas permaneceram o episódio todo sem contato físico com o residente (apenas visual, auditivo e olfativo). Ao final, o intruso e as testemunhas foram transportados para suas caixas-moradia. Este procedimento foi repetido por 10 dias consecutivos. No experimento 2, 29 dias após as 10 sessões de derrota foi realizada a sessão de gatilho. Esta consistiu em expor novamente os camundongos intrusos e testemunhas a mais uma sessão de derrota (ver Figura 4, na seção 3.7.2). Vinte quatro horas depois da última sessão de estresse foram iniciados os testes comportamentais nas testemunhas (ver Figuras 3 e 4, nas seções 3.7.1 e 3.7.2, respectivamente).

O grupo controle consistiu em animais que testemunharam a interação não-agressiva (TINA), isto é, o intruso foi exposto a um camundongo não agressor e familiar, enquanto foi observado por outras duas testemunhas (seguindo o mesmo protocolo mencionado para a derrota social, porém sem confrontação).

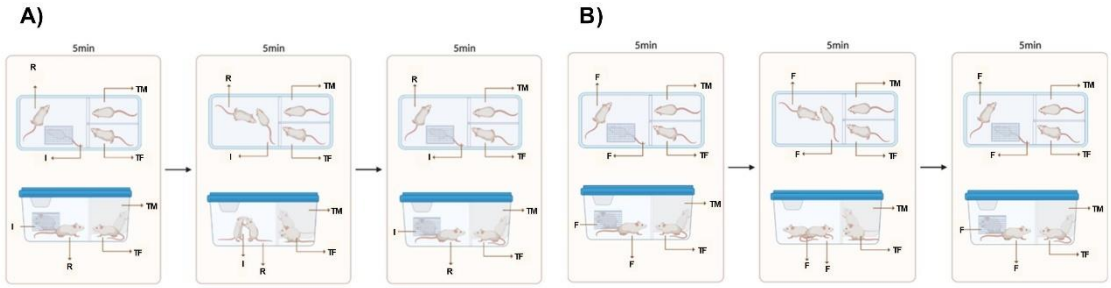

Figura 1. Representação de A) Protocolo de ETDS. B) Protocolo da interação não agressiva. R, residente; I, intruso; TM, testemunha macho; TF, testemunha fêmea; F, camundongo familiar. Fonte: Elaboração própria.

3.3 Condição da pelagem

Em roedores, a má condição da pelagem tem sido associada à apatia; a qual pode ser definida como um déficit em comportamentos orientados a objetivos (Cathomas et al., 2015; Planchez; Surget; Belzung, 2019). O protocolo utilizado foi semelhante ao mencionado por Nollet e colaboradores (2013), no qual atribui-se à qualidade do pelo um valor numérico entre 0 e 1; 0 se estiver em boas condições, 0,5 se moderadamente em más condições e 1 se em más condições. Ao final, a pontuação total pode ser conferida pela soma da análise de cada área (cabeça, pescoço, dorso, abdômen, patas dianteiras, patas traseiras e começo da cauda) com uma pontuação máxima de 7.

3.4 Construção de ninhos

A apatia de roedores pode também ser avaliada por comportamentos orientados a objetivos, incluindo a construção de ninhos (Cathomas et al., 2015; Planchez; Surget; Belzung, 2019). Foi utilizado um protocolo semelhante ao descrito por Nollet e colaboradores (2013) (Nollet; Le Guisquet; Belzung, 2013). Cada camundongo foi alojado individualmente em uma caixa moradia durante 24 horas antes do teste e mantido isolado até o final do protocolo. Uma hora antes do início do ciclo escuro, um pedaço retangular de algodão incolor e inodoro (5 × 7 cm) foi colocado na caixa de alojamento para habituação do animal ao objeto. No dia seguinte, 1 hora antes do início do ciclo escuro, o algodão foi retirado e um novo pedaço foi colocado na caixa de alojamento. Vinte e quatro horas depois, uma foto do ninho completo foi tirada para análise posterior. As

pontuações dadas ao estado do algodão, representadas na Figura 2, foram valores entre 1 e 5, sendo: 1 para o algodão está intacto, 2 quando parcialmente utilizado, 3 quando espalhado, mas não em formato de ninho, 4 quando amontoado, mas não há ninho (ninho plano) ou 5 quando amontoado em uma "bola" (como um iglu, com ou sem teto).

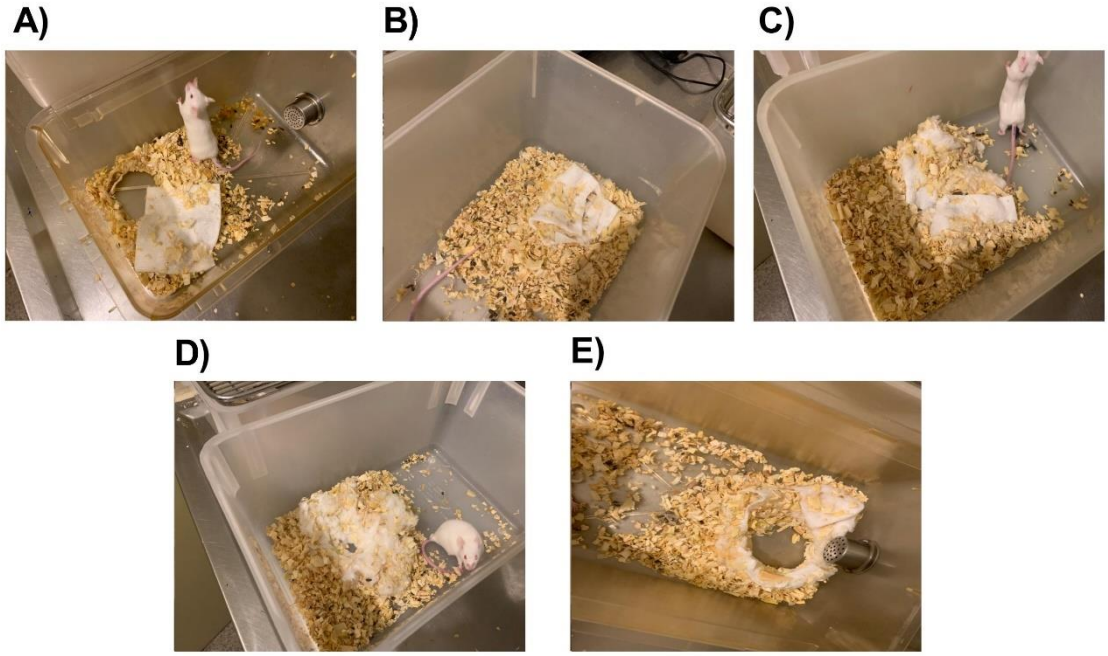

Figura 2. Representação dos ninhos feitos no teste de construção de ninho. A) Pontuação 1: O algodão está intacto. B) Pontuação 2: O camundongo utilizou parcialmente o ninho de algodão. C) Pontuação 3: O camundongo espalhou o algodão, mas não construiu um ninho. D) Pontuação 4: O camundongo reuniu o algodão para formar um ninho plano. E) Pontuação 5: O camundongo reuniu o algodão para formar um ninho com paredes. Fonte: elaboração própria.

3.5 Exploração de objeto novo

O interesse reduzido na exploração de um estímulo novo pode ser usado como indicador de apatia, neofobia ou neofilia, tanto em humanos quanto em roedores (Cathomas et al., 2015; Planchez; Surget; Belzung, 2019). Os animais foram levados para uma sala equipada com uma câmera, e lá deixados em sua caixa de alojamento por 5 minutos para habituação. Posteriormente, um objeto desconhecido foi introduzido na caixa de alojamento e o procedimento foi gravado por 5 minutos para avaliar a frequência e tempo (em segundos) de interação. A exploração do objeto foi definida como ter o focinho do animal a uma distância ≤ 2 cm do objeto ou as patas dianteiras sobre o objeto (Heyser; Chemero, 2012; Zhou et al., 2018). Os comportamentos foram registrados usando o software “X-plo-rat 2005” (Tejada; Chaim; Morato, 2018).

3.6 Imunofluorescência

Grupos independentes de camundongos foram anestesiados e perfundidos com solução salina tamponada com fosfato (PBS), seguida por paraformaldeído (PFA) a 4% vinte e quatro horas após a última sessão de ETDS ou TINA. Os encéfalos removidos foram pós-fixados em PFA por 1 hora e transferidos para uma solução de sacarose a 30% em PBS a 4°C. Após 2 dias, os encéfalos foram congelados e mantidos a -80°C até serem fatiados no criostato em secções coronais de 30-40 µm de espessura (CM1900, Leica, Alemanha). Foi feita uma marcação, com uma agulha, no lado esquerdo dos encéfalos para garantir a análise do hemisfério correto. Foram obtidas secções coronais que continham o complexo amidaloide e o hipocampo dorsal para o ensaio. O protocolo de imunofluorescência foi o mesmo adotado em estudos anteriores do Laboratório de Farmacologia da FCFAr-UNESP (SANTOS-COSTA et al., 2021;FRESCA et al., 2023). As fatias coronais foram lavadas 5 vezes com PBS e, em seguida, incubadas com solução bloqueadora - veículo (soro de cabra a 10%; Triton X-100 a 0,3% dissolvidos em PBS) por uma hora à temperatura ambiente. Após o bloqueio, as fatias foram incubadas com o anticorpo primário de interesse (anti-ΔFosB, Cat. No. EPR15905) em solução veículo por 24 horas a 4°C. Após essa incubação, as fatias foram lavadas com PBS por 5 vezes e incubadas com um anticorpo secundário (Alexa Fluor 488; ab150077) diluído em solução veículo, por 3 horas à temperatura ambiente. Em seguida, as fatias foram lavadas com PBS por 5 vezes e transferidas para solução de PB 0.1M e montadas em lâminas silanizadas. Na sequência, foram acrescentadas de 2 a 3 gotas de Fluoroshield MountingMedium + DAPI (Sigma-Aldrich) e seladas com lamínula. A imunomarcação foi capturada usando uma câmera microscópica Axiocam 503 colorida (Zeiss), acoplada ao microscópio Axio Imager 2 com sistema para observação de luz visível (iluminador halógeno, 127V, 100W) e marcação epifluorescente (iluminador HXP 120V, filtros com transmitância 430-750 nm). A quantificação da fluorescência foi realizada no software ImageJ (NIH), utilizando a técnica “Corrected total cell fluorescence”. Nesta técnica, o programa mede a fluorescência da área definida, entretanto, a fluorescência emitida pelo fundo é removida do valor final, realizado conforme descrito anteriormente ((Fresca et al., 2023; Santos-Costa et al., 2021). Os valores obtidos foram uma média de 3-4 cortes de cada sujeito experimental/área.

3.7 Delineamento experimental

3.7.1 Experimento 1 - Efeito do estresse sobre comportamentos relacionados à depressão e na expressão da proteína ΔFosB no complexo amidalóide e do hipocampo dorsal de camundongos machos e fêmeas expostos ao ETDS aos 58-60 DPN

Como demostrado na Figura 3, para a obtenção de uma linha de base, no dia 0 do protocolo (DPN 58-60) foram registrados o peso e a condição da pelagem. Posteriormente, aos 58-60 DPN os animais foram submetidos a 10 dias de ETDS ou TINA (como descrito no item 3.2). Ao longo deste período foram avaliados o peso e a qualidade da pelagem. Nos dias 6, 10 e 20 do protocolo foi realizado o teste de exploração do objeto novo (item 3.5). Nos dias 0, 2, 5, 8, 15 e 20 do protocolo os animais foram pesados. Nos dias 0, 5, 10 e 20 do protocolo foi avaliada a condição da pelagem, conforme descrito acima (no item 3.3). O teste de construção de ninho foi realizado nos dias 12, 13, 21 e 22 do protocolo (como descrito no item 3.4). Devido ao teste de construção de ninho, os animais foram isolados no dia 12 e mantidos assim até o final do protocolo (como descrito no item 3.4). Para a realização deste experimento os animais foram distribuídos em 4 grupos (n ≈ 12/grupo para testes comportamentais e n ≈ 5 para imunofluorescência), como descrito abaixo:

- Grupo 1: Animais submetidos ao ETDS e testes comportamentais.
- Grupo 2: Animais submetidos ao TINA e testes comportamentais.
- Grupo 3: Animais submetidos ETDS e, 24 horas depois da última derrota, foram anestesiados, perfundidos e os encéfalos coletados para posterior análise imuno-histoquímica (conforme o item 3.6). Destaca-se aqui que os animais não passaram pelos testes comportamentais para melhor clareza de que os resultados encontrados foram devidos à exposição ao ETDS.
- Grupo 4: Animais submetidos ao TINA e, 24 horas depois da última interação, foram anestesiados, perfundidos e os encéfalos coletados para posterior análise imuno-histoquímica (conforme o item 3.6). Novamente,

os animais não foram submetidos aos testes comportamentais pelas mesmas razões apresentadas na descrição do Grupo 3.

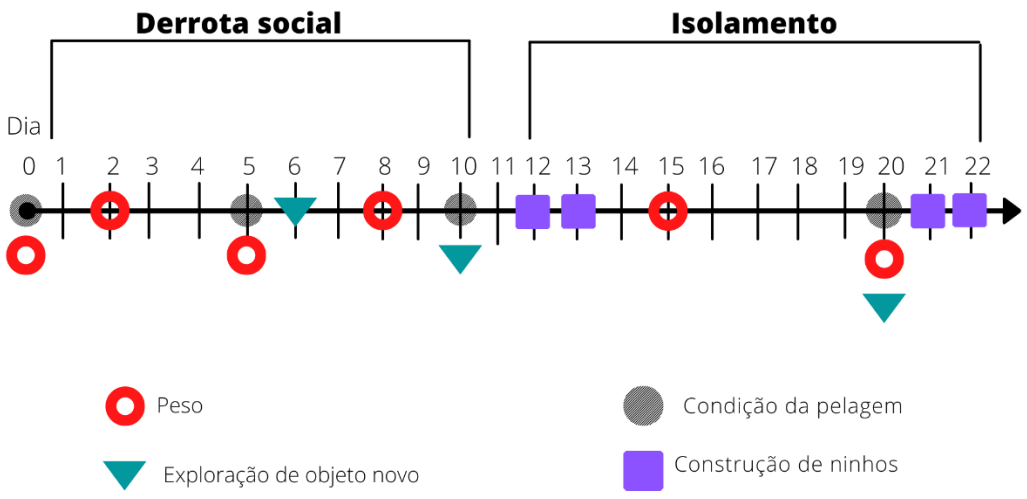

Figura 3. Delineamento experimental para o experimento 1. Observação: para o experimento envolvendo o protocolo de imunofluorescência, os animais foram eutanasiados 24h após a última derrota (dia 11). Fonte: Elaboração própria.

3.7.2 Experimento 2 - Efeito tardio do estresse precoce sobre comportamentos relacionados à depressão e na expressão da proteína ΔFosB no complexo amidaloide e no hipocampo dorsal de camundongos machos e fêmeas expostos ao ETDS aos 21 DPN

Aos 21 DPN, os animais foram submetidos a 10 dias de ETDS ou TINA (como descrito no item 3.2). Depois de 29 dias, no DPN 59, os animais foram submetidos a mais uma sessão de ETDS ou TINA (Figura 4). Nos DPN 58 e 60 foi avaliado o peso e a condição da pelagem (item 3.3). No DPN 60 foi realizado o teste de exploração do objeto novo (item 3.5). Nos DPN 61 e 62 foi feito o teste de construção de ninho conforme descrito no item 3.4. Devido ao teste de construção de ninho, os animais foram isolados no DPN 61 e mantidos assim até o final do protocolo (como descrito no item 3.4). Para a realização deste experimento os animais foram distribuídos em 4 grupos (n ≈ 12/grupo para testes comportamentais e n ≈ 4 para imunofluorescência), sendo:

- Grupo 1: Animais submetidos ao ETDS e testes comportamentais.
- Grupo 2: Animais submetidos ao TINA e testes comportamentais.

- Grupo 3: Animais submetidos ao ETDS e, no DPN 60 (24h após o gatilho), foram anestesiados, perfundidos e os encéfalos coletados para posterior análise imuno-histoquímica (conforme o item 3.6).
- Grupo 4: Animais submetidos ao TINA e, no DPN 60 (24h após o gatilho), foram anestesiados, perfundidos e os encéfalos coletados para posterior análise imuno-histoquímica (conforme o item 3.6).

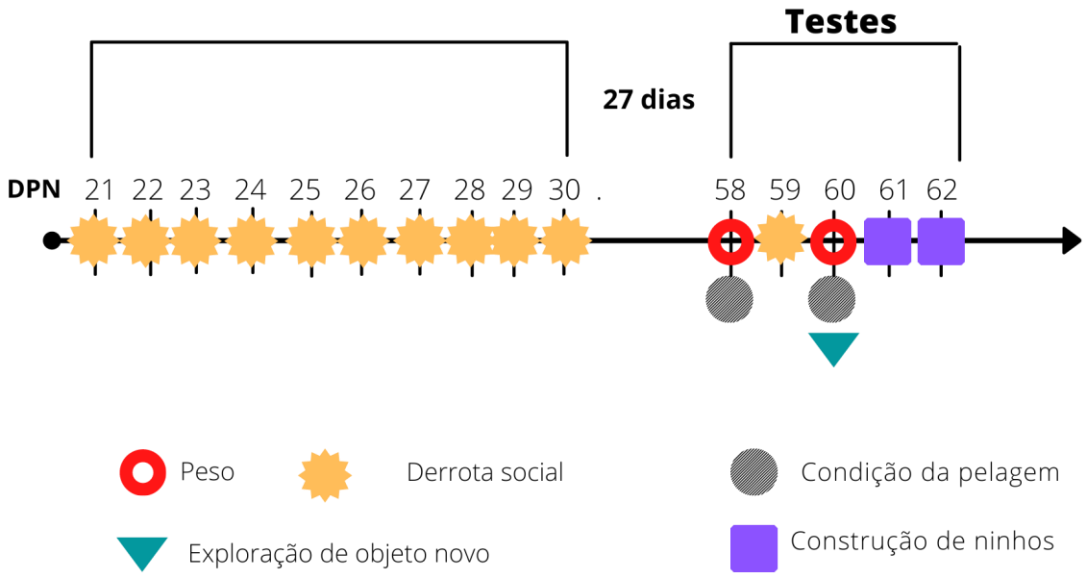

Figura 4. Delineamento experimental do experimento 2. Observação: para o experimento envolvendo o protocolo de imunofluorescência, os animais foram eutanasiados 24h após a última sessão de ETDS (DPN 60). Fonte: Elaboração própria.

3.8 Análise estatística.

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), ANOVA multifatorial para medidas repetidas (fator 1: condição TINA ou ETDS; fator 2: dia; fator 3: sexo). Para os dados obtidos no teste construção de ninhos, foi usado o teste estatístico de ANOVA não paramétrica. Nos casos de significância, as análises foram seguidas pelo teste de comparações múltiplas de Duncan. O valor de p menor ou igual a 0,05 foi considerado como significativo.

3.9 Ética

Todos os protocolos experimentais utilizados neste trabalho foram conduzidos de acordo com os princípios éticos do Conselho Nacional de

Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa local (CEUA/FCF/CAr: 23/2022).

4. RESULTADOS

4.1 Experimento 1: A exposição ao ETDS na idade adulta induz comportamentos relacionados à apatia, aumentar o tempo de interação com um objeto novo e diminuir o padrão de ativação da amídala e do hipocampo dorsal de forma específica para o sexo.

No total, foram utilizados 88 camundongos para este experimento, sendo 47 machos e 41 fêmeas.

4.1.1 Condição da pelagem

A Figura 5 mostra o efeito do ETDS sobre condição da pelagem em camundongos machos e fêmeas. A ANOVA de três fatores para medidas repetidas não indicou uma interação entre condição (F1; TINA ou ETDS), dia (F2; D0, D5, D10, D20) e o sexo (F3; macho ou fêmea) [$F1vsF2vsF3_{(3,144)} = 1.601$, $p > 0.05$]. Quando comparado por duplas, foi observada uma interação entre condição e sexo [$F1vsF3_{(1,48)} = 7.779$, $p < 0.01$]. Porém, a análise não indicou interações entre condição e dia ou sexo e dia [$F1vsF2_{(1,15)} = 0.311$, $p > 0.05$; $F2vsF3_{(1,15)} = 0.001$, $p > 0.05$]. O teste *Post hoc* de Duncan revelou diminuição significativa na qualidade da pelagem do grupo ETDS dos machos quando comparados com o grupo ETDS das fêmeas ($p < 0.01$) e com o grupo TINA dos machos ($p < 0.01$). Além disso, indicou diferenças entre o grupo TINA dos machos quando comparado com o grupo TINA das fêmeas ($p < 0.01$) porém, não indicou diferenças entre o grupo ETDS das fêmeas quando comparadas com o grupo TINA das fêmeas. Os dados estão apresentados como a média de cada animal.

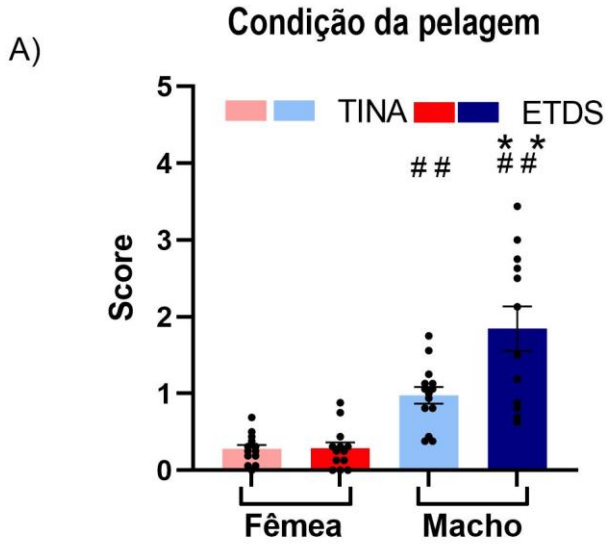

Figura 5. Efeito do ETDS sobre o estado da pelagem em camundongos machos e fêmeas submetidos ao TINA ou ETDS. Tamanho das amostras: TINAF (n = 13), ETDSF (n = 13), TINAM (n = 14), ETDSM (n = 12). **p ≤ 0.01 em comparação com o grupo TINA do mesmo sexo, ##p ≤ 0.01 em comparação com o mesmo grupo do outro sexo. As barras representam a média e pontos de dispersão de cada um dos grupos (±EPM). Fonte: Elaboração própria.

4.1.2 Construção de ninho

A Figura 6 representa o efeito do ETDS sobre a qualidade dos ninhos construídos pelos camundongos. Foi feito um ranking com os dados, e posteriormente uma ANOVA de três fatores para medidas repetidas (ANOVA não paramétrica). A ANOVA não paramétrica de três fatores para medidas repetidas não indicou interação entre condição (F1; TINA ou ETDS), Dia (F2; D13 ou D23) e o sexo (F3; macho ou fêmea) [F1*vs*F2*vs*F3$_{(1,48)}$ = 2.178, $p > 0.05$]. Quando comparado por duplas, foi observada interação entre condição e sexo e dia e sexo [F1*vs*F3$_{(1,48)}$ = 4.651, $p < 0.05$; F2vsF3$_{(1,48)}$ = 4.197, $p < 0.05$]. Porém, não indicou interações entre condição e dia [F1*vs*F2$_{(1,48)}$ = 0.220, $p > 0.05$]. O teste *Post Hoc* de Duncan revelou diminuição significativa na qualidade do ninho do grupo ETDS das fêmeas quando comparados com o grupo TINA das fêmeas e o grupo ETDS dos machos ($p < 0.05$). Porém, não indicou diferenças entre o grupo TINA das fêmeas quando comparado com o grupo TINA dos machos ($p > 0.05$). Independente do grupo, o teste indicou diferença entre machos e fêmeas somente no dia 23. Os dados estão apresentados como a média de cada animal.

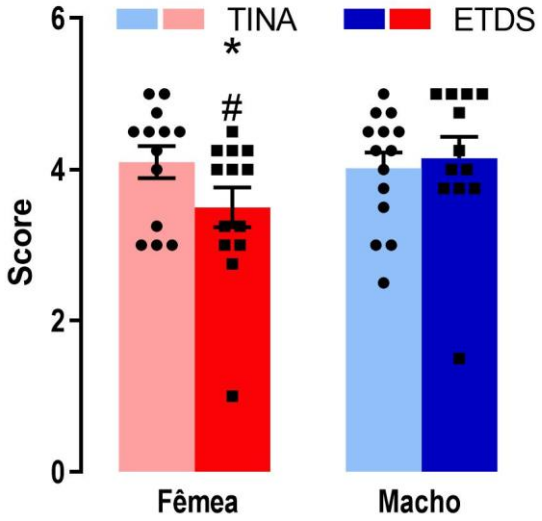

Figura 6. Efeito do ETDS sobre comportamentos relacionados à depressão avaliados com a qualidade do ninho. *p ≤ 0.05 em comparação com o grupo TINA do mesmo sexo, #p ≤ 0.05 em comparação com o mesmo grupo do outro sexo. Tamanho das amostras: TINAF (n = 13), ETDSF (n = 13), TINAM (n = 14), ETDSM (n = 12). As barras representam a média e pontos de dispersão de cada um dos grupos (±EPM). Fonte: Elaboração própria.

4.1.3 Exploração de objeto novo

A Figura 7 representa o efeito do ETDS sobre o tempo de interação com um objeto novo. A ANOVA de três fatores para medidas repetidas não indicou interação entre condição (F1; TINA ou ETDS), Dia (F2; D5, D10 ou D20) e o sexo (F3; macho ou fêmea) [F1*vs*F2*vs*F3$_{(2,96)}$ = 0.431, $p > 0.05$]. Quando comparado por duplas, foi observada interação entre condição e sexo [F1*vs*F3$_{(1,48)}$ = 4.237, $p < 0.05$]. Porém, não indicou interações entre condição e dia ou sexo e dia [F1*vs*F2$_{(2,96)}$ = 0.801, $p > 0.05$; F2*vs*F3$_{(2,96)}$ = 2.108, $p > 0.05$]. O teste *Post Hoc* de Duncan revelou aumento significativo no tempo de interação do grupo ETDS das fêmeas quando comparados com o grupo TINA das fêmeas ($p < 0.05$). Porém, não indicou diferenças entre sexos (TINAF vs TINAM ou ETDSF vs ETDSM) ou para o grupo ETDS dos machos quando comparado com o TINA dos machos ($p > 0.05$). Os dados são apresentados como a média de cada animal.

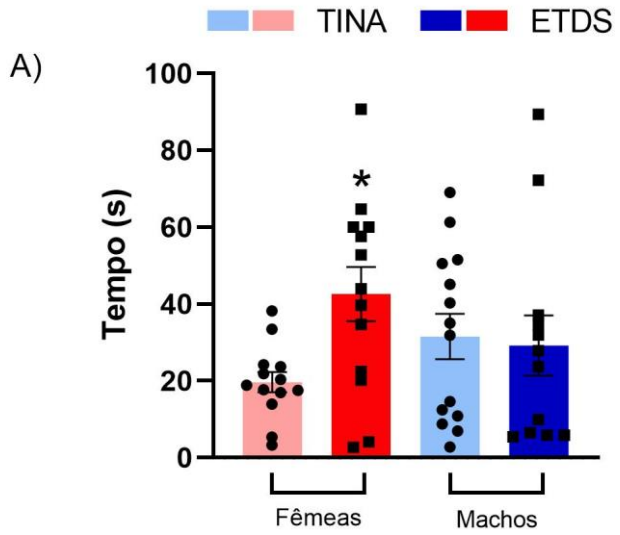

Figura 7. Efeito do ETDS sobre comportamentos relacionados à depressão avaliados com o tempo de interação com um objeto novo. *p ≤ 0.05 em comparação com o grupo TINA do mesmo sexo. Tamanho das amostras: TINAF (n = 13), ETDSF (n = 13), TINAM (n = 14), ETDSM (n = 12). As barras representam a média e pontos de dispersão de cada um dos grupos (±EPM). Fonte: Elaboração própria.

4.1.4 Ganho de peso

A Figura 8 apresenta o ganho de peso dos camundongos machos e fêmeas em diferentes fases do protocolo, incluindo ETDS e isolamento. A ANOVA de três fatores para medidas repetidas não indicou interação entre condição (F1; TINA ou ETDS), dia (F2; D0 ao D11 ou D11 ao D19) e o sexo (F3; macho ou fêmea) [F1*vs*F2*vs*F3$_{(1,48)}$ = 1.187, p > 0.05]. Quando comparado por duplas, não foram observadas interações entre os fatores condição e sexo condição e dia ou sexo e dia [F1*vs*F3$_{(1,48)}$ = 0.055, p > 0.05; F1*vs*F2$_{(1,48)}$ = 1.591, p > 0.05; F2*vs*F3$_{(1,48)}$ = 0.193, p > 0.05]. Enquanto aos fatores individuais, não foram observadas diferenças significativas para condição, dia ou grupo (p > 0.05).

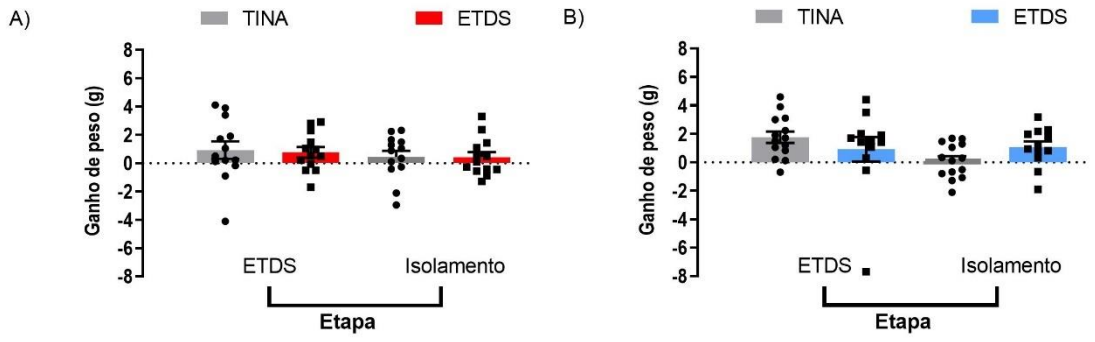

Figura 8. O ETDS não produz alterações no ganho de peso em camundongos fêmeas (A) e machos (B) submetidos ao TINA ou ETDS. Tamanho das amostras: TINAF (n = 13), ETDSF (n = 13), TINAM (n = 14), ETDSM (n = 12). As barras representam a média e pontos de dispersão de cada um dos grupos (±EPM). Fonte: Elaboração própria.

4.1.5 Padrão de ativação neuronal (ΔFosB) no complexo amigdaloide

A Figura 9 representa o efeito do ETDS sobre o padrão de ativação no complexo amigdaloide. A ANOVA de três fatores para medidas repetidas não indicou interação entre condição (F1; TINA ou ETDS), hemisfério (F2; esquerdo ou direito) e o sexo (F3; macho ou fêmea) [F1*vs*F2*vs*F3$_{(1,22)}$ = 1.301, $p > 0.05$]. Quando comparado por duplas, foi observada interação entre condição e sexo [F1*vs*F3$_{(1,22)}$ = 5.226, $p < 0.05$]. Porém, não indicou interações entre condição e hemisfério ou sexo e hemisfério [F1*vs*F2$_{(1,22)}$ = 0.538, $p > 0.05$; F2*vs*F3$_{(1,22)}$ = 0.244, $p > 0.05$]. O teste *Post Hoc* de Duncan revelou diminuição significativa na fluorescência celular total corrigida (CTCF) do grupo ETDS das fêmeas quando comparados com o grupo TINA das fêmeas e com o grupo ETDS dos machos ($p < 0.05$) entretanto, não indicou diferenças entre o grupo TINA das fêmeas quando comparado com o grupo TINA dos machos ($p > 0.05$).

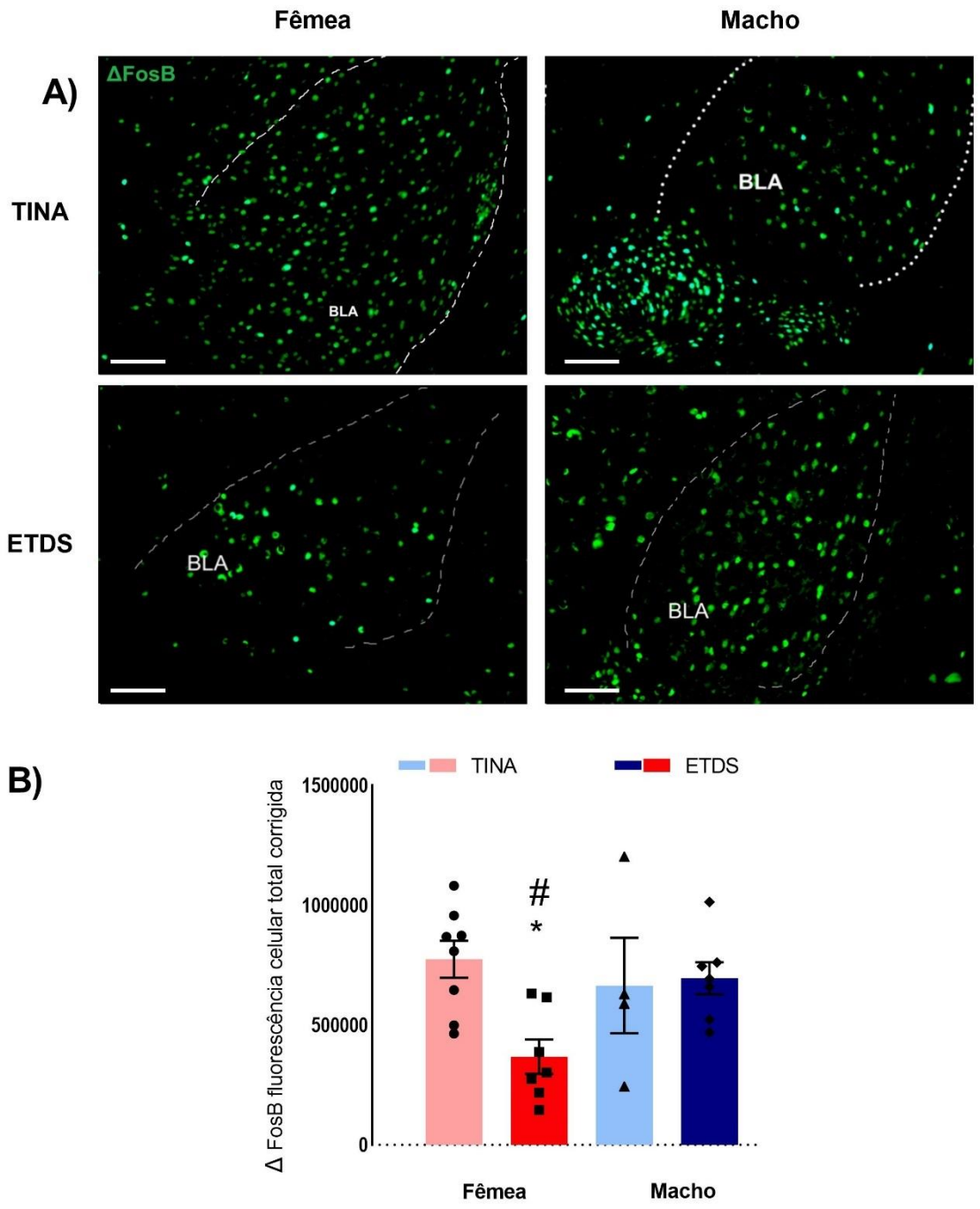

Figura 9. A) Fotomicrografias, ampliadas 20 vezes (barra de escala = 100 µm), que ilustram de maneira representativa a marcação neuronal positiva para ΔFosB no complexo amidaloide esquerdo em camundongos submetidos ao ETDS aos 60 DPN. B) Impacto do Estresse de Testemunha de Derrota Social (ETDS) na Fluorescência Celular Total Corrigida (CTCF) do complexo amidaloide, em camundongos machos e fêmeas. Tamanho das amostras: TINAF (n = 8), ETDSF (n = 7), TINAM (n = 4), ETDSM (n = 7). *p ≤ 0.05 em comparação com o grupo TINA do mesmo sexo, #p ≤ 0.05 em comparação com o mesmo grupo do outro sexo. As barras representam a média e pontos de dispersão de cada um dos grupos (±EPM). BLA, amídala basolateral. Fonte: Elaboração própria.

4.1.6 Padrão de ativação neuronal (ΔFosB) no giro denteado (DG) e campo CA1 do hipocampo dorsal

A Figura 10 representa o efeito do ETDS sobre o padrão de ativação no DG do hipocampo dorsal. A ANOVA de três fatores para medidas repetidas não indicou interação entre condição (F1; TINA ou ETDS), hemisfério (F2; esquerdo ou direito) e o sexo (F3; macho ou fêmea) [F1*vs*F2*vs*F3$_{(1,16)}$ = 0.402, $p > 0.05$]. Quando comparado por duplas, foi observada uma interação entre condição e sexo [F1*vs*F3$_{(1,16)}$ = 4.998, $p < 0.05$]. Porém, não indicou interações entre condição e hemisfério ou sexo e hemisfério [F1*vs*F2$_{(1,16)}$ = 0.318, $p > 0.05$; F2*vs*F3$_{(1,16)}$ = 0.101, $p > 0.05$]. O teste *Post Hoc* de Duncan revelou diminuição significativa na CTCF do grupo ETDS das fêmeas quando comparados com o grupo TINA das fêmeas ($p < 0.05$).

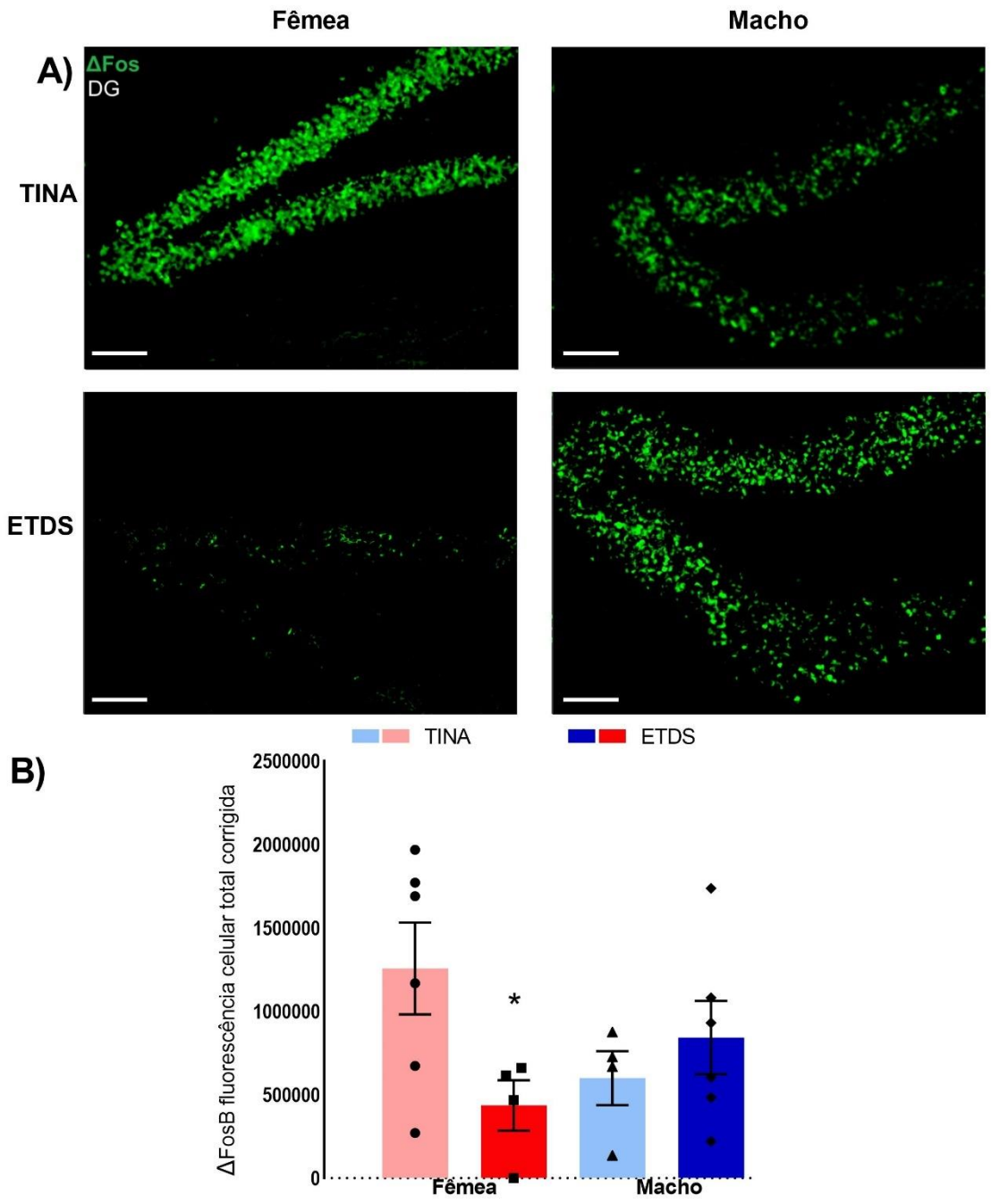

Figura 10. A) Fotomicrografias, ampliadas 20 vezes (barra de escala = 100 µm), que ilustram de maneira representativa a marcação neuronal positiva para ΔFosB no giro denteado (DG) do hipocampo dorsal direito em camundongos submetidos ao ETDS. B) Impacto do Estresse de Testemunha de Derrota Social (ETDS) na Fluorescência Celular Total Corrigida (CTCF) no giro denteado (DG) do hipocampo dorsal, em camundongos machos e fêmeas. Tamanho das amostras: TINAF (n = 6), ETDSF (n = 4), TINAM (n = 4), ETDSM (n = 6). *p ≤ 0.05 em comparação com o grupo TINA do mesmo sexo. As barras representam a média e pontos de dispersão de cada um dos grupos (±EPM). DG, Giro Denteado. Fonte: Elaboração própria.

A Figura 11 representa o efeito do ETDS sobre o padrão de ativação no CA1 do hipocampo dorsal. A ANOVA de três fatores para medidas repetidas não indicou interação entre condição (F1; TINA ou ETDS), hemisfério (F2; esquerdo

ou direito) e o sexo (F3; macho ou fêmea) [F1*vs*F2*vs*F3$_{(1,16)}$ = 0.006, p > 0.05]. Quando comparado por duplas, não indico interações entre condição e sexo, condição e hemisfério ou sexo e hemisfério [F1*vs*F3$_{(1,16)}$ = 0.002, p > 0.05; F1*vs*F2$_{(1,16)}$ = 0.001, p > 0.05; F2*vs*F3$_{(1,16)}$ = 1.334, p > 0.05]. Enquanto os fatores individuais, o teste indicou diferenças significativas entre os hemisférios [F2$_{(1,16)}$ = 8.048, p < 0.05]. Não entanto, não foram observadas diferenças para a condição ou sexo [F1$_{(1,16)}$ = 0,079 p > 0.05; F3$_{(1,16)}$ = 1.663, p > 0.05].

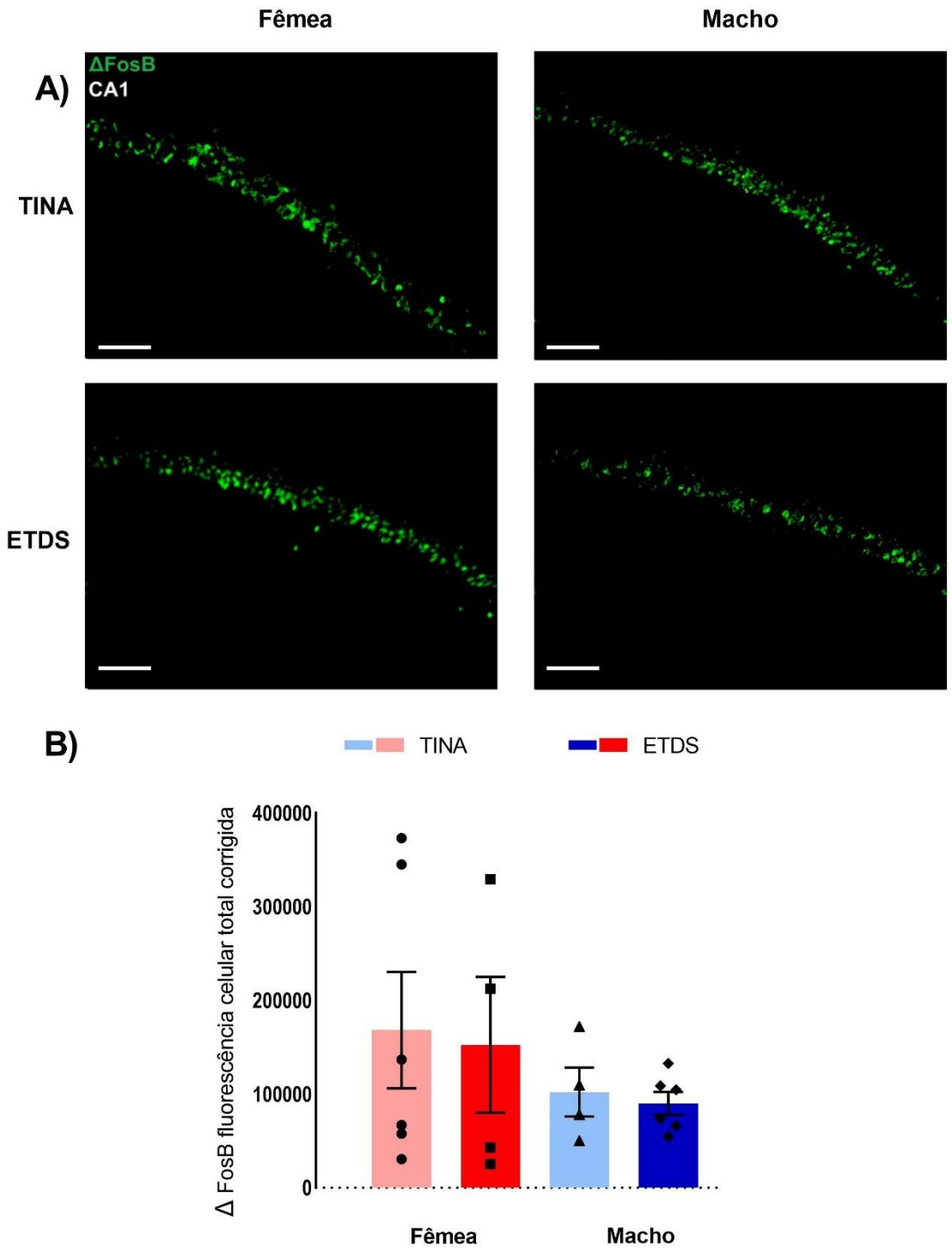

Figura 11. A) Fotomicrografias, ampliadas 20 vezes (barra de escala = 100 µm), que ilustram de maneira representativa a marcação neuronal positiva para ΔFosB no campo CA1 (CA1) do hipocampo dorsal direito em camundongos submetidos ao ETDS. B) Impacto do Estresse de Testemunha de Derrota Social (ETDS) na Fluorescência Celular Total Corrigida (CTCF) no CA1 do hipocampo dorsal, em camundongos machos e fêmeas. Tamanho das amostras: TINAF (n = 6), ETDSF (n = 4), TINAM (n = 4), ETDSM (n = 6). As barras representam a média e pontos de dispersão de cada um dos grupos (±EPM). CA1, Campo CA1. Fonte: Elaboração própria.

4.2 Experimento 2: A exposição ao ETDS durante a fase peripuberal pode desencadear respostas associadas à apatia, reduzir o tempo de interação com objetos novos e afetar o ganho de peso de maneira específica conforme o sexo, quando os indivíduos são expostos a situações estressantes na idade adulta.

Setenta e quatro camundongos foram usados para este experimento, sendo 43 machos e 31 fêmeas.

4.2.1 Condição da pelagem

A Figura 12 representa o efeito do ETDS sobre a condição da pelagem em camundongos expostos ao ETDS aos 21 DPN. A ANOVA de três fatores para medidas repetidas não indicou uma interação entre condição (F1; TINA ou ETDS), dia (F2; D58 ou D62) e o sexo (F3; macho ou fêmea) [F1*vs*F2*vs*F3$_{(1,43)}$ = 0.765, $p > 0.05$]. Quando comparado por duplas, não foram observadas interações entre condição e sexo, condição e dia ou sexo e dia [F1*vs*F3$_{(1,43)}$ = 0.990, $p > 0.05$; F1*vs*F2$_{(1,43)}$ = 1.162, $p > 0.05$; F2*vs*F3$_{(1,43)}$ = 0.020, $p > 0.05$]. Para os fatores individuais, a ANOVA indicou diferenças significativas para sexo [F3$_{(1,43)}$ = 10.234 < 0.01], condição (TINA *vs* ETDS) [F1$_{(1,43)}$ = 17.274 < 0.01], e dia (D58 *vs* D62) [F2$_{(1,43)}$ = 27.329 < 0.01]. Como o teste não indicou interação entre os fatores e, devido a diferencia entre sexos independente dos grupos, foi feita uma ANOVA de dois fatores para medidas repetidas para cada sexo respectivamente. Para o grupo dos machos o teste ANOVA não indicou interação entre os fatores condição e dia. Enquanto aos fatores individuais, indicou diferenças significativas para condição e para dia [F1$_{(1,23)}$ = 9.693 < 0.0; F2$_{(1,23)}$ = 11.772 < 0.01]. O teste *Post Hoc* de Duncan indicou piora na qualidade da pelagem do grupo ETDS quando comparado com o grupo TINA no PND 58 e PND 62 ($p < 0.05$), além disso, independente do grupo, indicou piora na qualidade da pelagem no PND 62 quando comparado com o PND 58 ($p < 0.05$). Referente ao grupo das fêmeas, o teste não indicou interação entre condição e dia, porém, evidenciou diferenças significativas para os fatores individuais condição e dia [F1$_{(1,20)}$ = 10.124 < 0.0; F2$_{(1,20)}$ = 16.977 < 0.01]. O teste *Post Hoc* de Duncan indicou piora significativa na qualidade da pelagem do grupo ETDS, quando comparado com o grupo TINA, porém somente no PND 62. Além disso,

a análise indicou piora significativa do grupo ETDS no PND 62, quando comparado com ele mesmo no PND 58.

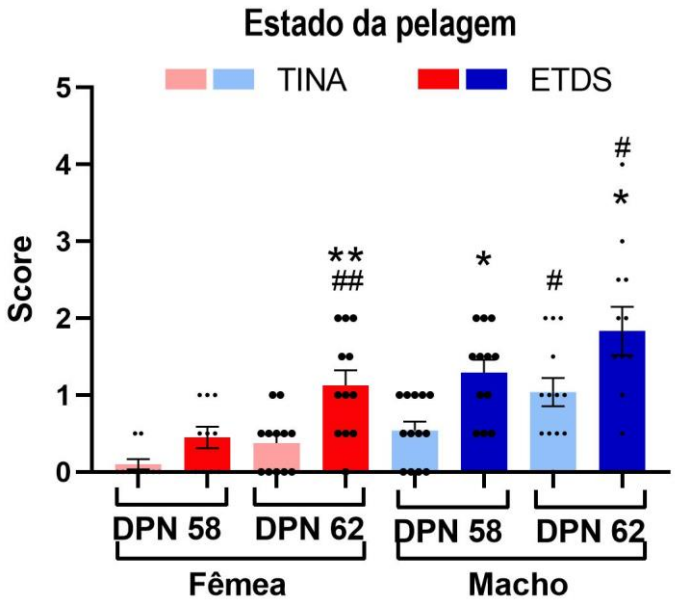

Figura 12. Efeito do ETDS antes e depois de uma exposição a uma sessão de estresse (gatilho 60 DPN) na idade adulta sobre comportamentos relacionados à depressão avaliados pelo estado da pelagem em camundongos machos e fêmeas. Tamanho das amostras: TINAF (n = 10), ETDSF (n = 12), TINAM (n = 13), ETDSM (n = 12). **p ≤ 0.01 em comparação com o grupo TINA na mesma condição, ##p ≤ 0.01 em comparação com o mesmo grupo no PND 58. As barras representam a média e pontos de dispersão de cada um dos grupos (±EPM). Fonte: Elaboração própria.

4.2.2 Construção do ninho

A Figura 13 representa o efeito do ETDS sobre a qualidade da construção do ninho em camundongos expostos ao ETDS aos 21 DPN. A ANOVA de dois fatores não indicou interação entre condição (F1; TINA ou ETDS) e o sexo [F2; macho(M) ou fêmea(F)] [F1*vs*F2$_{(1,43)}$ = 0.525, $p > 0.05$]. Enquanto aos fatores individuais, não apresentaram diferenças significativas [F1$_{(1,43)}$ = -0.008, $p > 0.05$; F2$_{(1,42)}$ = 0.176, $p > 0.05$].

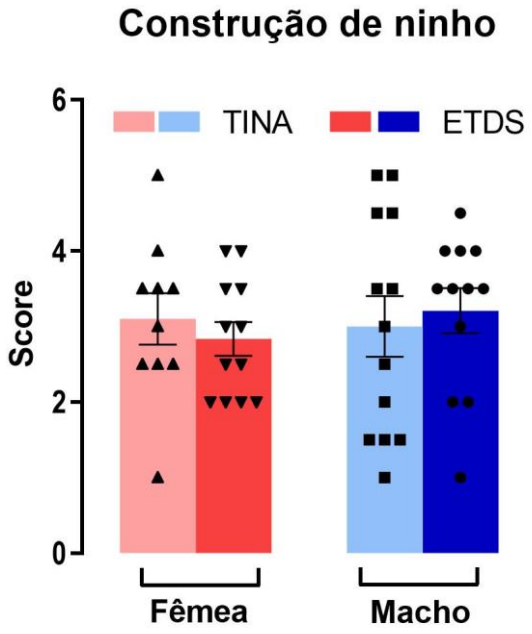

Figura 13. O ETDS precoce não induz alterações na qualidade do ninho em camundongos machos e fêmeas. Tamanho das amostras: TINAF (n = 10), ETDSF (n = 12), TINAM (n = 13), ETDSM (n = 12). As barras representam a média e pontos de dispersão de cada um dos grupos (±EPM). Fonte: Elaboração própria.

4.2.3 Exploração de objeto novo

A Figura 14 representa o efeito do ETDS sobre o tempo de interação com um objeto novo em camundongos expostos ao ETDS aos 21 DPN. A ANOVA de dois fatores indicou uma interação entre condição (F1; TINA ou ETDS) e o sexo (F2; M ou F) [$F1 vs F2_{(1,43)} = 5.118$, $p < 0.05$]. Enquanto aos fatores individuais, não foram observadas diferenças significativas para condição [$F1_{(1,43)} = 2.272$, $p > 0.05$] ou sexo [$F2_{(1,43)} = 0.016$, $p > 0.05$]. O teste *Post Hoc* de Duncan indicou diminuição significativa no tempo de interação do grupo ETDS das fêmeas quando comparado com o grupo TINA ($p < 0.05$).

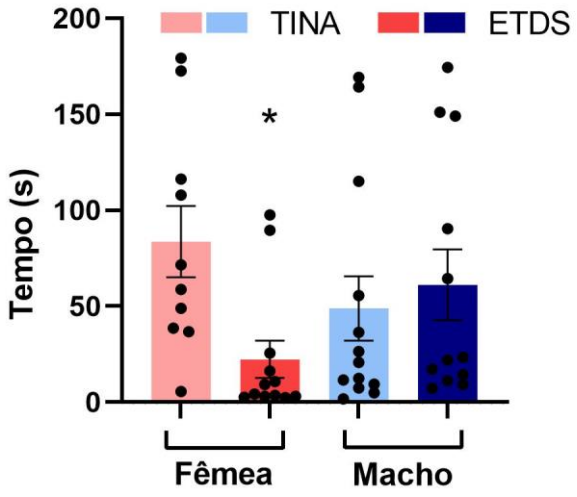

Figura 14. O ETDS precoce diminui o tempo de interação em camundongos fêmeas. Tamanho das amostras: TINAF (n = 10), ETDSF (n = 12), TINAM (n = 13), ETDSM (n = 12). *p ≤ 0.05 em comparação com o grupo TINA. As barras representam a média e pontos de dispersão de cada um dos grupos (±EPM). Fonte: Elaboração própria.

4.2.4 Ganho de peso

A Figura 15 representa o efeito do ETDS sobre o ganho de peso em camundongos expostos ao ETDS aos 21 DPN. A ANOVA de dois fatores não indicou interação entre condição (F1; TINA ou ETDS) e o sexo (F2; macho ou fêmea) [$F1 vs F2_{(1,43)} = 0.068$, $p > 0.05$]. Enquanto aos fatores individuais, foram observadas diminuição significativa no ganho de peso para o grupo ETDS, independente do sexo, quando comparado com o TINA [$F1_{(1,43)} = 7.109$, $p < 0.05$]. Não foram observadas diferencias significativas para o fator sexo [$F2_{(1,43)} = 0.589$, $p > 0.05$].

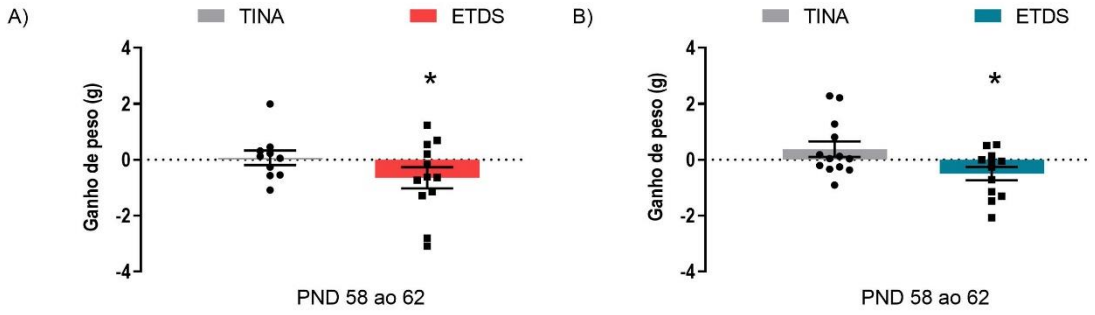

Figura 15. O ETDS precoce produz alterações no ganho de peso em camundongos fêmeas (A) e machos (B). Tamanho das amostras: TINAF (n = 10), ETDSF (n = 12), TINAM (n = 13), ETDSM (n = 12). *p ≤ 0.05 em comparação com o grupo TINA. As barras representam a média e pontos de dispersão de cada um dos grupos (±EPM). Fonte: Elaboração própria.

4.2.5 Padrão de ativação neuronal (ΔFosB) no complexo amidaloide

A Figura 16 representa o padrão de ativação no complexo amidaloide. A ANOVA de três fatores para medidas repetidas não indicou interação entre condição (F1; TINA ou ETDS), hemisfério (F2; esquerdo ou direito) e o sexo (F3; M ou F) [F1*vs*F2*vs*F3$_{(1,11)}$ = 1.953, $p > 0.05$]. Quando comparado por duplas, não foram observadas interações entre condição e sexo, condição e hemisfério ou sexo e hemisfério [F1*vs*F3$_{(1,11)}$ = 1.576, $p > 0.05$; F1*vs*F2$_{(1,11)}$ = 0.388, $p > 0.05$; F2*vs*F3$_{(1,11)}$ = 1.492, $p > 0.05$].

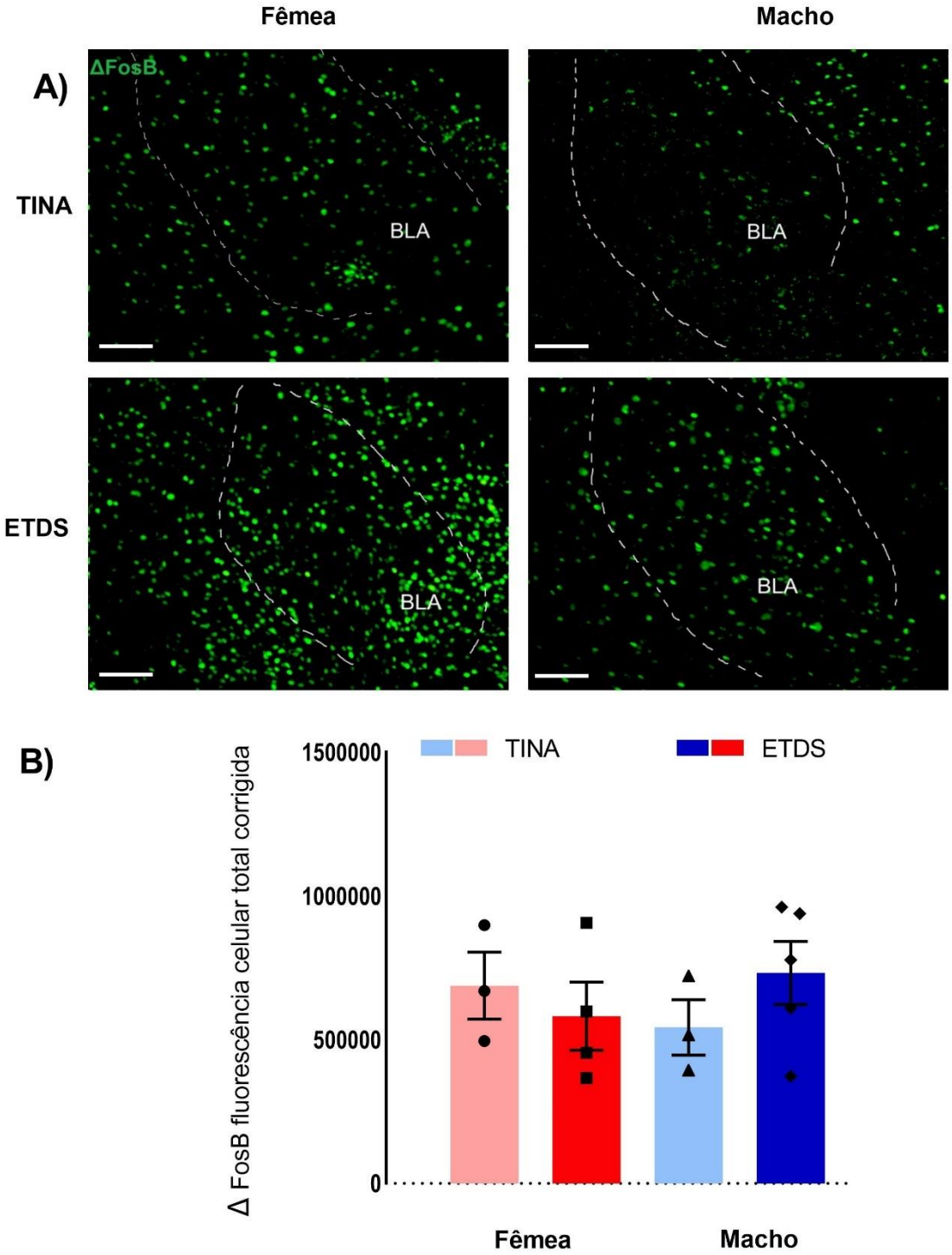

Figura 16. A) Fotomicrografias, ampliadas 20 vezes (barra de escala = 100 µm), que ilustram de maneira representativa a marcação neuronal positiva para ΔFosB no complexo amidaloide esquerdo em camundongos submetidos ao ETDS aos 21 DPN. B) Impacto do Estresse de Testemunha de Derrota Social (ETDS) na Fluorescência Celular Total Corrigida (CTCF) do complexo amidaloide, em camundongos machos e fêmeas. Tamanho das amostras: TINAF (n = 3), ETDSF (n = 4), TINAM (n = 3), ETDSM (n = 5). As barras representam a média (±SEM). BLA, amídala basolateral. Fonte: Elaboração própria.

4.2.6 Padrão de ativação neuronal (ΔFosB) no giro dentado do hipocampo dorsal (DG) e no campo CA1 do hipocampo dorsal (CA1)

A Figura 17 representa o padrão de ativação no DG do hipocampo dorsal. A ANOVA de três fatores para medidas repetidas não indicou uma interação entre condição (F1; TINA ou ETDS), hemisfério (F2; esquerdo ou direito) e o sexo (F3) [F1*vs*F2*vs*F3(1,13) = 0.225 $p > 0.05$]. Quando comparado por duplas, não foram observadas interações entre condição e sexo, condição e hemisfério ou sexo e hemisfério [F1*vs*F3(1,13) = 0.357, $p > 0.05$; F1*vs*F2(1,13) = 0.100, $p > 0.05$; F2*vs*F3(1,13) = 0.072, $p > 0.05$].

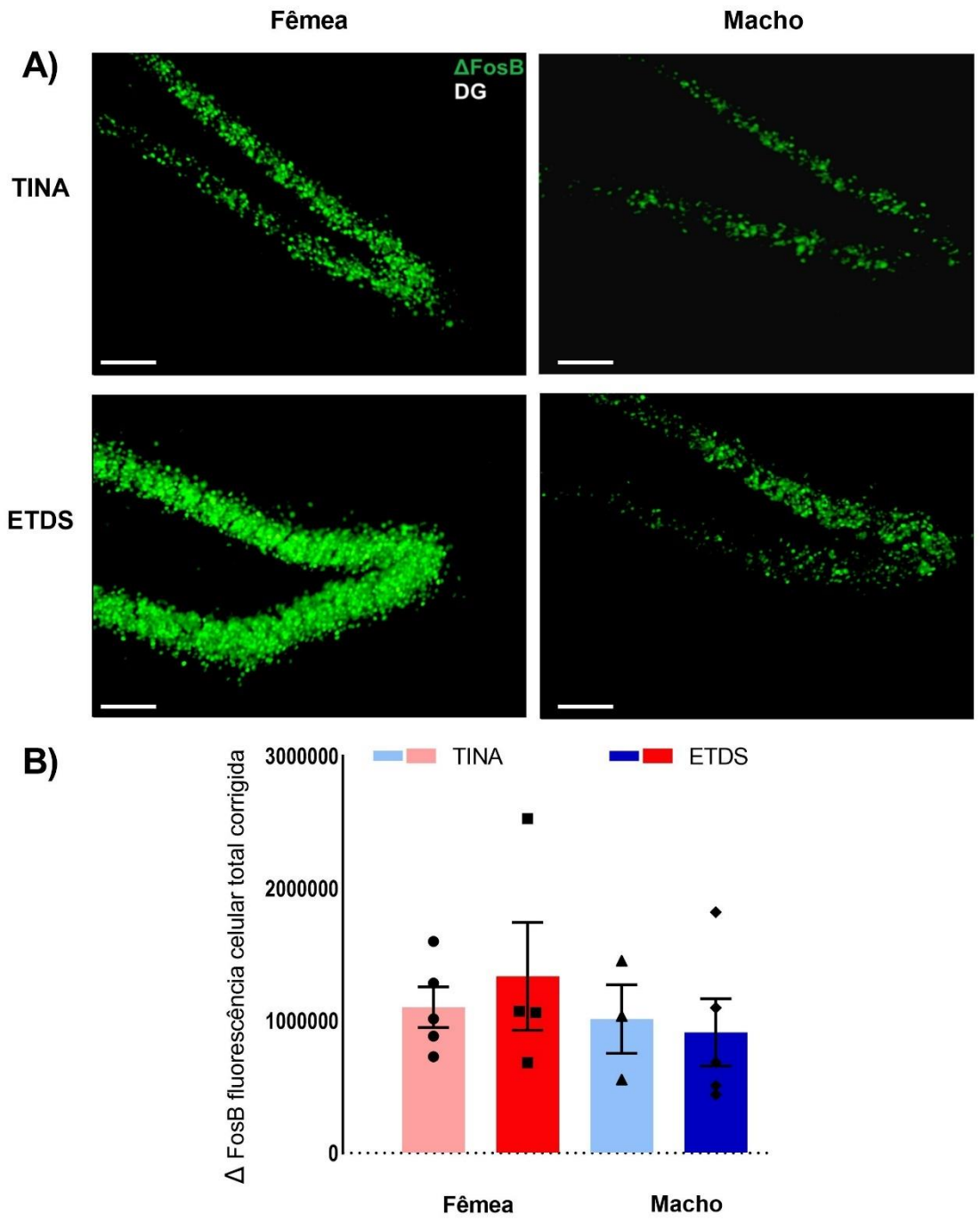

Figura 17. A) Fotomicrografias, ampliadas 20 vezes (barra de escala = 100 µm), que ilustram de maneira representativa a marcação neuronal positiva para ΔFosB no giro denteado (DG) do hipocampo dorsal direito em camundongos submetidos ao ETDS aos 21 DPN. B) Impacto do Estresse de Testemunha de Derrota Social (ETDS) na Fluorescência Celular Total Corrigida (CTCF) no giro denteado (DG) do hipocampo dorsal, em camundongos machos e fêmeas. Tamanho das amostras: TINAF (n = 5), ETDSF (n = 4), TINAM (n = 3), ETDSM (n = 5). As barras representam a média (±SEM). Fonte: Elaboração própria.

A Figura 18 representa o padrão de ativação no hipocampo dorsal. A ANOVA de três fatores para medidas repetidas não indicou uma interação entre condição (F1; TINA ou ETDS), hemisfério (F2; esquerdo ou direito) e o sexo (F3;

macho(M) ou fêmea(F)) [F1*vs*F2*vs*F3(1,13) = 1.601 p > 0.05]. Quando comparado por duplas, não foram observadas interações entre condição e sexo, condição e hemisfério ou sexo e hemisfério [F1*vs*F3(1,13) = 0.086, p > 0.05; F1*vs*F2(1,13) = 0.823, p > 0.05; F2*vs*F3(1,13) = 1.574, p > 0.05].

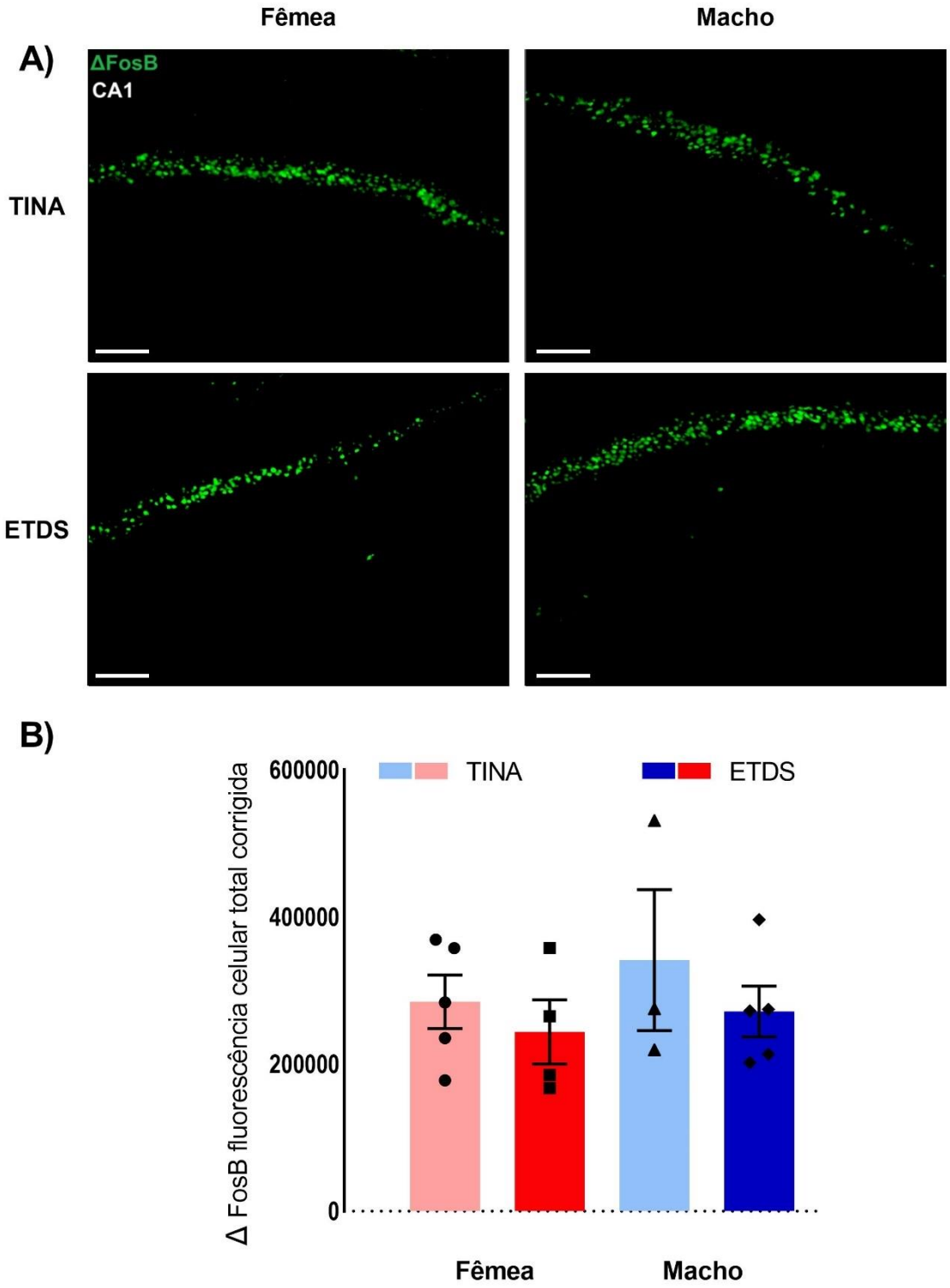

Figura 18. A) Fotomicrografias, ampliadas 20 vezes (barra de escala = 100 µm), que ilustram de maneira representativa a marcação neuronal positiva para ΔFosB no campo CA1 (CA1) do hipocampo dorsal direito em camundongos submetidos ao ETDS aos 21 DPN. B) Impacto do Estresse de Testemunha de Derrota Social (ETDS) na Fluorescência Celular Total Corrigida (CTCF) no CA1 do hipocampo dorsal, em camundongos machos e fêmeas. Tamanho das amostras: TINAF (n = 5), ETDSF (n = 4), TINAM (n = 3), ETDSM (n = 5). As barras representam a média (±SEM). Fonte: Elaboração própria.

5. DISCUSSÃO

Os testes comportamentais evidenciaram que o Estresse de Testemunha da Derrota Social (ETDS), de forma semelhante a outros tipos de estresse psicossocial, induz comportamentos associados à depressão, os quais dependem do sexo e da idade. Esses comportamentos são caracterizados pela diminuição na qualidade da pelagem, redução na qualidade da construção do ninho, diminuição no ganho de peso e alterações no tempo de exploração de um objeto novo. Adicionalmente, observam-se alterações no padrão de ativação do complexo amidaloide.

Especificamente, nossos dados demonstraram que a exposição ao ETDS na idade adulta (DPN 60) resulta na deterioração na qualidade da pelagem em camundongos machos, enquanto a pelagem das fêmeas não apresentou mudança significativa. Apesar de as fêmeas não terem exibido alterações na qualidade da pelagem, observou-se diminuição na qualidade da construção do ninho, um teste associado a respostas apáticas, semelhante à avaliação da qualidade da pelagem (Nollet; Le Guisquet; Belzung, 2013). De acordo com isso, camundongos machos da linhagem Swiss Webster, quando submetidos ao estresse de derrota social, apresentaram deterioração na qualidade da pelagem (Fresca *et al.*, 2023). De maneira semelhante, camundongos expostos ao estresse crônico leve e imprevisível também exibiram este fenótipo (Nollet; Le Guisquet; Belzung, 2013; Planchez; Surget; Belzung, 2019). Adicionalmente, (Nguyen *et al.*, 2020) relataram piora na qualidade da pelagem em camundongos machos e fêmeas da linhagem 3xTg-AD, que foram expostas ao estresse de restrição. Do mesmo modo, camundongos fêmeas da cepa C57Bl/6n expostas a um protocolo de derrota social também apresentaram deterioração na qualidade da pelagem (van Doeselaar *et al.*, 2021).

Em relação ao teste de construção de ninho, os resultados parecem ser influenciados pelo tipo específico de estresse. Foi observado que os modelos de estresse crônico leve e imprevisível resultaram em diminuição na qualidade da construção do ninho (Nollet; Le Guisquet; Belzung, 2013). Por outro lado, embora modelos de estresse de derrota social não resultem em diferenças na qualidade final do ninho, os camundongos estressados apresentam maiores latências para

iniciar a conduta (Fresca *et al.*, 2023; Otabi *et al.*, 2016; Otabi; Okayama; Toyoda, 2020).

Ao aprofundar na análise dos fenótipos resultantes do ETDS, notamos que a exposição ao ETDS na idade adulta (DPN 60) resulta no aumento do tempo de exploração de um novo objeto em fêmeas. É importante destacar que não foram observadas diferenças significativas nos machos. A exploração de um objeto novo pode indicar neofilia ou neofobia, dependendo do tempo de interação (Sheppe, 1966). Diversos estudos relatam que, em condições normais, os roedores tendem a preferir explorar objetos ou ambientes desconhecidos em comparação com aqueles que são familiares (Casarrubea *et al.*, 2023; Powell *et al.*, 2004). No entanto, em contextos de estresse, isto é, em indivíduos com uma ativação emocional elevada, verifica-se diminuição desses comportamentos exploratórios, fenótipo associado a condutas ansiosas ou depressivas (Casarrubea et al., 2023; Fresca et al., 2023; Zhou et al., 2018). Embora esse pareça ser o padrão de resposta, esses efeitos podem ser modulados por diversos fatores, tais como a espécie, o sexo e o tipo e intensidade do estressor. Por exemplo, pardais que foram expostos ao estresse crônico demonstraram sensibilidade à intensidade do estressor, o que resultou em um aumento no comportamento neofóbico (Beattie *et al.*, 2023). Por outro lado, os estorninhos europeus apresentaram neofobia apenas quando submetidos a um estresse agudo. Notavelmente, essa neofobia não foi evidente quando os estorninhos foram expostos a um estresse crônico (de Bruijn; Romero, 2021). Em relação aos roedores, foi demostrado que uma sessão de estresse prolongado não apenas resulta em diminuição na preferência social por novidade, mas também dificulta o reconhecimento de um objeto novo em ratos machos da linhagem Sprague-Dawley (Eagle; Fitzpatrick; Perrine, 2013). Em contraste, ratos machos da linhagem Wistar Han, expostos ao estresse peripuberal, demonstraram um aumento no tempo de interação com um objeto novo (Tzanoulinou *et al.*, 2014). De maneira similar, e de acordo com os dados obtidos nesta pesquisa, camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6J, quando expostas ao protocolo intermitente de ETDS, apresentaram aumento na neofilia conforme avaliado no teste da placa perfurada (Martínez-Caballero *et al.*, 2024)

Apesar de as alterações corporais decorrentes da exposição ao ETDS em camundongos adultos (60 PND), independentemente do sexo, não resultarem em mudanças significativas no ganho de peso, os resultados na literatura são de fato variados. Assim como em humanos, alguns camundongos exibem aumento de peso após serem expostos ao estresse, enquanto outros demonstram perda de peso. Por exemplo, camundongos macho expostos ao estresse de derrota social apresentaram perda de peso ao longo dos 10 dias da derrota social. Posteriormente, esse peso foi recuperado e tiveram aumento de peso quando comparados com o controle (Chuang *et al.*, 2010). Consequentemente, um protocolo adaptado de estresse por derrota social, especificamente o estresse de derrota social subcrônico e leve, resulta em aumento consistente no ganho de peso ao longo do experimento (Goto *et al.*, 2014). É interessante notar que, um protocolo de estresse social conseguiu produzir diferenças no ganho de peso ao dividir os camundongos em “dominantes” e “submissos”. Neste protocolo, os camundongos submissos apresentaram aumento no ganho de peso, enquanto os dominantes apresentaram diminuição quando comparados ao grupo controle (Bartolomucci *et al.*, 2009).

Na análise de imunofluorescência, evidenciamos que a exposição ao ETDS na idade adulta resulta numa diminuição na ativação do complexo amidaloide, avaliado pela expressão de ΔFosB (marcador inespecífico estável de atividade neural). Curiosamente, esse efeito foi observado apenas em camundongos fêmeas. Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa indicam um aumento na expressão de ΔFosB no complexo amidaloide em camundongos machos submetidos ao estresse de derrota social (Fresca *et al.*, 2023). Em contraste, o modelo de estresse por separação materna foi capaz de, além de reverter os efeitos comportamentais, reduzir o aumento da excitabilidade no complexo amidaloide, produzida pelo estresse de derrota social crônico (Qin *et al.*, 2019). Embora nossos resultados pareçam contrários ao relatado na literatura, onde, a resposta mais comum da exposição ao estresse crônico parece ser uma hiperativação no complexo amidaloide, os dados ainda são inconsistentes e dependem de fatores como a intensidade do estressor (Zhang *et al.*, 2018). De fato, os efeitos do estresse, tanto no comportamento quanto no cérebro, tendem a variar de maneira não linear, geralmente seguindo um padrão

que se assemelha a um “U” invertido (Sapolsky, 2015). Por exemplo, o fenômeno conhecido como “inoculação do estresse” sugere que a exposição a um estressor leve ou moderado pode ajudar a prevenir os efeitos prejudiciais de situações estressantes futuras (resiliência), enquanto um estressor de intensidade maior pode criar alterações a longo prazo que dificultem lidar com futuros estressores (suscetibilidade) (Qin *et al.*, 2019). Além disso, observou-se que as atividades de estruturas subcorticais são moduladas, entre outras estruturas, pelo córtex pré-frontal medial (CPFm); sendo o CPFm esquerdo responsável pela regulação do estresse mediante a inibição do CPFm direito, enquanto o CPFm direito estaria ligado à ativação do eixo HPA, desencadeando a resposta de estresse (Cerqueira; Almeida; Sousa, 2008; Fresca et al., 2023; Santos-Costa et al., 2021; Victoriano et al., 2020). Sugerimos que essa diminuição na atividade do complexo amidaloide seja um possível indicador neural de resiliência ao estresse e possa estar acompanhado de uma mudança no padrão de ativação de áreas corticais superiores como o CPFm. No entanto, a comparação de nossos dados com a literatura está dificultada devido à escassez de dados disponíveis em fêmeas. Além disso, faz-se relevante uma avaliação detalhada das potenciais diferenças entre os diversos núcleos amidaloides.

De maneira similar, a imunofluorescência do hipocampo dorsal, evidenciou que exposição ao ETDS na idade adulta está associada a alterações específicas na ativação do hipocampo em fêmeas, com uma diminuição na expressão da proteína ΔFosB no DG. No entanto, nos machos, não foram observadas alterações, e a área CA1 não parece ser afetada por essa exposição. Contudo, os resultados observados nas fêmeas são, de fato, consistentes com os efeitos do estresse relatados no hipocampo dorsal, como atrofia dendrítica e diminuição na neurogênese hipocampal adulta (Kim; Diamond, 2002; Larosa; Wong, 2022). Além disso, são parcialmente congruentes com os dados de nosso laboratório, nos quais observamos que camundongos machos expostos ao estresse de derrota social demonstram uma redução na atividade do DG no hipocampo dorsal, associada a um déficit de memória de curto prazo, como avaliado no teste de reconhecimento de objetos (Fresca *et al.*, 2023). Essa alteração específica observada apenas no DG das fêmeas pode ser atribuída a

diferenças hormonais e sexuais. Por exemplo, estudos têm mostrado níveis basais mais elevados de corticosterona plasmática em ratas fêmeas em comparação com machos (Marques *et al.*, 2016; Simpson; Kelly, 2012). Assim, o hipocampo revelou ser uma estrutura com uma alta densidade de receptores corticosteroides, os quais, quando ativados pela corticosterona, demonstraram ter efeitos adversos sobre o metabolismo neuronal, a viabilidade celular e as funções fisiológicas e a morfologia neuronal (Kim; Diamond, 2002) Enquanto a ausência de diferenças na área CA1 pode ser atribuída não apenas à função diferencial de cada uma dessas áreas, mas também às vias em que estão envolvidas. Neste sentido, o córtex entorrinal possui projeções independentes para o DG e o CA1 (Nitz; McNaughton, 2004) vias que, por sua vez, parecem estar associadas à memória de trabalho e episódica no caso do DG, e ao aprendizado do medo no caso do CA1 (Méndez; Ortega, 2020). Estas diferenças sexuais e de áreas já foram relatadas em outros modelos; um modelo de camundongos transgênicos para Alzheimer apresentou diferenças notáveis relacionadas ao sexo no DG, enquanto na área CA1 não são observadas, sendo que as fêmeas exibem um grau mais pronunciado de degeneração em comparação com os machos (Alkadhi, 2019; Melnikova *et al.*, 2016).

Quanto aos resultados do experimento 2, nossos dados demonstraram que a exposição ao ETDS na pré-puberdade (DPN 21) produz uma alteração na resposta dos camundongos diante de uma nova situação estressante, sem evidenciar alterações no padrão de ativação no complexo amidaloide ou hipocampo dorsal. No teste da condição da pelagem notou-se deterioração significativa na qualidade da pelagem tanto em machos quanto em fêmeas. No entanto, diferente dos machos, que apresentaram deterioração na qualidade da pelagem antes e depois do gatilho (sessão de ETDS), as fêmeas só mostraram essa deterioração após a exposição ao gatilho. No teste de construção do ninho, a exposição ao ETDS no DPN 21 não demonstrou diferenças significativas tanto para machos quanto para fêmeas. Esses dados parecem estar parcialmente alinhados com os achados observados em outros modelos de estresse. Por exemplo, um protocolo de separação materna de 10 dias em camundongos C57BL/6J foi capaz de produzir respostas associadas à depressão somente após uma exposição ao estresse por derrota social na vida adulta (Peña *et al.*,

2017). Em contraste, a exposição de camundongos machos e fêmeas da cepa C57BL/6J a um protocolo de estresse por separação materna de 3 dias, foi capaz de reverter o efeito ansiogênico causado por uma exposição a um estresse variado de 3 dias na idade adulta; especialmente em machos (BAUGHER; SACHS, 2022). Desta forma, os dados são inconsistentes e, como mencionado anteriormente, dependem de variáveis como intensidade e duração do evento estressor.

Em relação à conduta apática, que é definida por Planchez e colaboradores (2019) (Planchez; Surget; Belzung, 2019) como uma “deficiência no comportamento direcionado a objetivos” e é avaliada nos testes de condição da pelagem e qualidade da construção do ninho, nossas descobertas revelam diferenças nos fenótipos comportamentais produzidos pelo ETDS, os quais são dependentes do sexo e da idade em que foram expostos ao evento estressor. Embora ambos os testes avaliem a apatia, é provável que cada teste seja mais sensível a um dos sexos: o teste de qualidade da pelagem é aparentemente mais sensível para avaliar camundongos machos, enquanto o teste de qualidade do ninho parece ser mais sensível na avaliação das fêmeas, sendo mediado pela idade de exposição ao estressor como um fator de vulnerabilidade. Apesar das semelhanças dos dados apresentados neste estudo com os resultados reportados na literatura, a comparação é dificultada pela ausência de dados relatados para a construção de ninhos em fêmeas. Além disso, neste estudo, não avaliamos a latência para o início da construção do ninho, podendo se encontrar a diferença desta variável para iniciar a construção do ninho e não na qualidade final, como relatado anteriormente (Otabi *et al.*, 2016; Otabi; Okayama; Toyoda, 2020).

Em relação à exploração de um objeto novo, ao contrário do efeito observado na exposição ao ETDS na idade adulta, a exposição ao ETDS na pré-puberdade (21 dias pós-natal) resulta em redução no tempo de exploração. Embora possam parecer contraditórios, nossos resultados do teste de exploração de objeto novo destacam a complexa interação dos estressores com variáveis como sexo, idade, intensidade e duração do estressor. Assim, estressores que parecem mais intensos, como os mencionados anteriormente em outros estudos ((Beattie *et al.*, 2023; Eagle; Fitzpatrick; Perrine, 2013)

(estresse prolongado, estresse crônico), e a exposição a nosso protocolo de ETDS aos 21 DPN, parecem produzir fenótipos de conduta neofóbica; padrões comportamentais relacionados com comportamentos depressivos. Em contraste, protocolos de estresse mencionados anteriormente e aparentemente menos intensos, como o utilizado por (Martínez-Caballero *et al.*, 2024) (protocolo intermitente de ETDS), e o nosso protocolo de ETDS na idade adulta, parecem produzir fenótipos de conduta de neofilia, fenótipos relacionados ao consumo de sustâncias psicoativas.

Além de provocar mudanças comportamentais, o estresse crônico também causa alterações corporais relacionadas ao bem-estar animal. O ganho de peso não é apenas um indicador direto do estado do animal, mas também reflete indiretamente as variações no comportamento alimentar, um comportamento que é frequentemente alterado em episódios depressivos (American Psychiatric Association, 2013); alterações associadas a comportamentos de apatia e anedonia (Nollet; Le Guisquet; Belzung, 2013). Com relação aos nossos dados, observou-se uma redução significativa no ganho de peso em camundongos expostos ao ETDS na pré-puberdade (21 PND), independentemente do sexo, quando expostos a um estressor na idade adulta. Essa diferença provavelmente indica uma maior vulnerabilidade aos estressores em estágios iniciais do desenvolvimento, o que pode desencadear uma susceptibilidade ao estresse na vida adulta. De fato, uma única sessão de estresse de derrota social no início da adolescência parece ser suficiente para produzir mudanças comportamentais. No entanto, na idade adulta, são necessárias dez sessões para produzir efeito semelhante (Xu *et al.*, 2017). Outros dados que sustentam essa hipótese foram apresentados por (Keller *et al.*, 2017) onde foi observado que as fêmeas de camundongos da linhagem C57BL/6JRccHsd apresentaram perda de peso quando expostas ao estresse crônico, sendo a idade um fator de vulnerabilidade.

Em relação à análise de imunofluorescência, a exposição ao ETDS na pré-puberdade não produz mudanças significativas na ativação do complexo amidaloide ou hipocampo dorsal, avaliado pela expressão de ΔFosB. É provável que esta ausência de diferenças ocorra devido ao momento da avaliação, que ocorreu 24 horas após uma exposição a uma sessão de ETDS na idade adulta

(DPN 60). De acordo com essa afirmação, foi encontrado que a exposição a um modelo de estresse por separação materna produz alterações na expressão de mRNA na área tegmental ventral apenas no final do protocolo (17 DPN). No entanto, essas alterações não são observadas na exposição a um novo estressor na idade adulta (70 DPN) (Peña *et al.*, 2017). Para explicar as diferenças comportamentais, sugerimos ser provável que a exposição ao ETDS tenha causado uma desregulação no eixo HPA, criando assim, uma vulnerabilidade frente ao estresse. A favor desta hipótese, foi demonstrado que a exposição ao estresse precoce produz um aumento nos níveis de corticosterona no plasma após uma exposição aguda a um novo evento estressante na idade adulta, evidenciando assim uma resposta exacerbada do eixo HPA (Uchida *et al.*, 2010).

Finalmente, apesar de obter resultados quantitativamente semelhantes aos da literatura (como se pode visualizar na Tabela 1), é importante destacar as diferenças qualitativas nos fenótipos de resposta. Modelos de estresse que parecem ser mais intensos, como o estresse físico resultante de derrota social ou o estresse crônico leve e imprevisível (Fresca *et al.*, 2023; Nollet; Le Guisquet; Belzung, 2013c; Planchez; Surget; Belzung, 2019b) produzem uma alteração qualitativamente maior em comparação com modelos de estresse que parecem ser mais leves, como o estresse por restrição de 30 minutos (Nguyen *et al.*, 2020) ou o ETDS, usado neste estudo. Nesse sentido, estas diferenças qualitativas são semelhantes às relatadas na literatura, onde o estresse emocional, considerado como menos intenso, produz alterações comportamentais mais sutis quando comparado ao estresse físico (Li; Xu; Wang, 2018; Nakatake et al., 2020)

Tabela 1. Síntese dos Resultados Obtidos.

60 PND							
Sexo	Peso	Condição pelagem	Objeto novo	Construção ninho	Complexo amidaloide	DG	CA1
♂	=	↑*	=	=	=	=	=
♀	=	=	↑	↓*	↓*	↓	=
21 PND							
Sexo	Peso	Condição pelagem	Objeto novo	Construção ninho	Complexo amidaloide	DG	CA1
♂	↓	↑#	=	=	=	=	=
♀	↓	↑#	↓	=	=	=	=

Os símbolos apresentam de maneira sintetizada os resultados principais da pesquisa. ↑, Incremento em comparação com o grupo controle; ↓, Diminuição em comparação com o grupo controle; *, diferença quando comparado com o mesmo grupo do sexo oposto; #, diferença quando comparado com o mesmo grupo em outro momento; =, indica ausência de diferenças significativas.

Fonte: Elaboração própria.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo destaca a complexidade da resposta de estresse e como ela pode variar dependendo do tipo de estressor, intensidade, sexo e do estágio de desenvolvimento. De modo geral, observou-se que o modelo de ETDS é eficaz para estudar as complexas interações organismo-ambiente relacionadas ao estresse, representadas por uma curva em forma de “U” invertida. Nossos dados demonstram que a exposição na idade adulta, embora tenha sido capaz de produzir alterações comportamentais relacionadas à depressão dependentes do sexo (qualidade da pelagem e construção do ninho), estas foram qualitativamente menores quando comparadas com outros tipos de estresse mais intensos. Além disso, evidenciamos de maneira dependente do sexo sinais de resiliência frente ao estresse, como menor ativação do complexo amidaloide (um indicador neural de resiliência) e um aumento na interação com um objeto novo. Em contraste, a exposição ao ETDS na pré-puberdade evidencia que, junto com o sexo, fatores como a idade modulam essa interação entre o evento estressor e o organismo, provocando efeitos comportamentais mais intensos, como: diminuição no ganho de peso, alterações na qualidade da pelagem e diminuição da interação com um objeto novo. Embora algumas

diferenças mediadas pelo sexo permaneçam, parece que quanto mais intensa for a relação entre o estressor e o organismo, os fenótipos comportamentais se tornam mais homogêneos. Porém, quando a interação entre o estressor e o organismo é menos intensa, tornam-se mais evidentes as diferenças nos efeitos do estresse, influenciadas pelo sexo.

7 REFERÊNCIAS

ADRIANI, Walter; LAVIOLA, Giovanni. A unique hormonal and behavioral hyporesponsivity to both forced novelty and d-amphetamine in periadolescent mice. **Neuropharmacology**, [*s. l.*], v. 39, n. 2, p. 334–346, 2000. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10670429/. Acesso em: 25 mar. 2024.

ALKADHI, Karim A. Cellular and Molecular Differences Between Area CA1 and the Dentate Gyrus of the Hippocampus. **Molecular Neurobiology 2019 56:9**, [*s. l.*], v. 56, n. 9, p. 6566–6580, 2019. Disponível em: https://link.springer.com/article/10.1007/s12035-019-1541-2. Acesso em: 11 mar. 2024.

ALMEIDA, David M. Resilience and vulnerability to daily stressors assessed via diary methods. **Current Directions in Psychological Science**, [*s. l.*], v. 14, n. 2, p. 64–68, 2005.

ALVES-DOS-SANTOS, Leonardo; RESENDE, Letícia de Souza; CHIAVEGATTO, Silvana. Susceptibility and resilience to chronic social defeat stress in adolescent male mice: No correlation between social avoidance and sucrose preference. **Neurobiology of Stress**, [*s. l.*], v. 12, p. 100221, 2020.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th Edition**. [*S. l.: s. n.*], 2013. Disponível em: www.appi.org. .

BABICOLA, Lucy *et al.* Long term effects of early life stress on HPA circuit in rodent models. **Molecular and Cellular Endocrinology**, [*s. l.*], v. 521, p. 111125, 2021.

BARTOLOMUCCI, Alessandro *et al.* Metabolic Consequences and Vulnerability to Diet-Induced Obesity in Male Mice under Chronic Social Stress. **PLOS ONE**, [*s. l.*], v. 4, n. 1, p. e4331, 2009. Disponível em: https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0004331. Acesso em: 8 fev. 2024.

BAUGHER, Brittany J.; SACHS, Benjamin D. Early life maternal separation induces sex-specific antidepressant-like responses but has minimal effects on adult stress susceptibility in mice. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, [*s. l.*], v. 16, p. 941884, 2022. Disponível em: Acesso em: 13 mar. 2024.

BEATTIE, Ursula K. *et al.* Neophobia, but not perch hopping, is sensitive to long-term chronic stress intensity. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology**, [*s. l.*], v. 339, n. 10, p. 1036–1043, 2023. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jez.2752. Acesso em: 6 fev. 2024.

BERTON, Olivier *et al.* Induction of ΔFosB in the Periaqueductal Gray by Stress Promotes Active Coping Responses. **Neuron**, [*s. l.*], v. 55, n. 2, p. 289–300, 2007.

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

CASARRUBEA, Maurizio *et al.* The hole-board apparatus in the study of anxiety. **Physiology & Behavior**, [*s. l.*], v. 271, p. 114346, 2023. Disponível em: Acesso em: 6 fev. 2024.

CATHOMAS, Flurin *et al.* The translational study of apathy—An ecological approach. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, [*s. l.*], v. 9, n. September, p. 1–7, 2015a.

CATHOMAS, Flurin *et al.* The translational study of apathy—An ecological approach. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, [*s. l.*], v. 9, n. September, p. 1–7, 2015b.

CERQUEIRA, João J.; ALMEIDA, Osborne F.X.; SOUSA, Nuno. The stressed prefrontal cortex. Left? Right!. **Brain, Behavior, and Immunity**, [*s. l.*], v. 22, n. 5, p. 630–638, 2008. Disponível em: Acesso em: 10 mar. 2024.

CHUANG, Jen Chieh *et al.* A β3-Adrenergic-Leptin-Melanocortin Circuit Regulates Behavioral and Metabolic Changes Induced by Chronic Stress. **Biological Psychiatry**, [*s. l.*], v. 67, n. 11, p. 1075–1082, 2010. Disponível em: Acesso em: 7 fev. 2024.

DE BRUIJN, Robert; ROMERO, L. Michael. Chronic stress reverses enhanced neophobia following an acute stressor in European starlings. **Journal of experimental zoology. Part A, Ecological and integrative physiology**, [*s. l.*], v. 335, n. 2, p. 265–274, 2021. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33231919/. Acesso em: 6 fev. 2024.

DION, Angie; MUÑOZ, Paula Torres; FRANKLIN, Tamara B. Epigenetic mechanisms impacted by chronic stress across the rodent lifespan. **Neurobiology of Stress**, [*s. l.*], v. 17, p. 100434, 2022.

EAGLE, Andrew L.; FITZPATRICK, Chris J.; PERRINE, Shane A. Single prolonged stress impairs social and object novelty recognition in rats. **Behavioural brain research**, [*s. l.*], v. 256, p. 591–597, 2013. Disponível em: /pmc/articles/PMC3857706/. Acesso em: 6 fev. 2024.

FLORES, Angelo D. *et al.* Neuromodulation and hippocampal neurogenesis in depression: A scoping review. **Brain Research Bulletin**, [*s. l.*], v. 188, p. 92–107, 2022.

FRENOIS, François *et al.* Lipopolysaccharide induces delayed FosB/DeltaFosB immunostaining within the mouse extended amygdala, hippocampus and hypothalamus, that parallel the expression of depressive-like behavior. **Psychoneuroendocrinology**, [*s. l.*], v. 32, n. 5, p. 516–531, 2007.

FRESCA, Vinícius *et al.* responses induced by social defeat stress in male mice are modulated by the BNST , amygdala , and hippocampus. [*s. l.*], n. June, p. 1–17, 2023.

GAJEWSKI, Paula A.; TURECKI, Gustavo; ROBISON, Alfred J. Differential expression of FosB proteins and potential target genes in select brain regions of addiction and depression patients. **PLoS ONE**, [*s. l.*], v. 11, n. 8, p. 1–14, 2016.

GOLDEN, Sam A. *et al.* A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice. **Nature Protocols**, [*s. l.*], v. 6, n. 8, p. 1183–1191, 2011.

GOTO, Tatsuhiko *et al.* Subchronic and mild social defeat stress accelerates food intake and body weight gain with polydipsia-like features in mice. **Behavioural Brain Research**, [*s. l.*], v. 270, p. 339–348, 2014. Disponível em: Acesso em: 7 fev. 2024.

HAKAMATA, Yuko *et al.* Implicit and explicit emotional memory recall in anxiety and depression: Role of basolateral amygdala and cortisol-norepinephrine interaction. **Psychoneuroendocrinology**, [*s. l.*], p. 105598, 2021.

HARRIS, Alexander Z. *et al.* A Novel Method for Chronic Social Defeat Stress in Female Mice. **Neuropsychopharmacology 2018 43:6**, [*s. l.*], v. 43, n. 6, p. 1276–1283, 2017.

HEYSER, Charles J.; CHEMERO, Anthony. Novel object exploration in mice: Not all objects are created equal. **Behavioural Processes**, [*s. l.*], v. 89, n. 3, p. 232–238, 2012.

HIGASHIDA, Shu *et al.* Repeated social defeat stress impairs attentional set shifting irrespective of social avoidance and increases female preference associated with heightened anxiety. **Scientific Reports**, [*s. l.*], v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018.

HODES, Georgia E. A primer on sex differences in the behavioral response to stress. **Current Opinion in Behavioral Sciences**, [*s. l.*], v. 23, p. 75–83, 2018.

IÑIGUEZ, Sergio D. *et al.* Vicarious Social Defeat Stress Induces Depression-Related Outcomes in Female Mice. **Biological Psychiatry**, [*s. l.*], v. 83, n. 1, p. 9–17, 2018.

KELLER, Shikma *et al.* The Effect of Chronic Stress on Weight And Hypothalamic Insulin And Melanocortin 4 Receptors In Young And old Female Mice. **European Neuropsychopharmacology**, [*s. l.*], v. 27, p. S412–S413, 2017. Disponível em: Acesso em: 7 fev. 2024.

KESSLER, Ronald C. the Effects of Stressful Life. **Annual review of psychology**, [*s. l.*], p. 191–214, 1997.

KIM, Hyeyoung *et al.* Volumetric alterations in subregions of the amygdala in adults with major depressive disorder. **Journal of Affective Disorders**, [*s. l.*], v. 295, n. June, p. 108–115, 2021.

KIM, Jeansok J.; DIAMOND, David M. The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. **Nature Reviews Neuroscience 2002 3:6**, [*s. l.*], v. 3, n. 6, p. 453–462, 2002. Disponível em: https://www.nature.com/articles/nrn849. Acesso em: 11 mar. 2024.

LAROSA, Amanda; WONG, Tak Pan. The hippocampus in stress susceptibility and resilience: Reviewing molecular and functional markers. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [*s. l.*], v. 119, p. 110601, 2022. Disponível em: Acesso em: 11 mar. 2024.

LAVIOLA, Giovanni *et al.* Risk-taking behavior in adolescent mice: Psychobiological determinants and early epigenetic influence. *In*: , 2003. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. [*S. l.*]: Elsevier Ltd, 2003. p. 19–31.

LI, Man; XU, Hang; WANG, Weiwen. An Improved Model of Physical and Emotional Social Defeat: Different Effects on Social Behavior and Body Weight of Adolescent Mice by Interaction With Social Support. **Frontiers in Psychiatry**, [*s. l.*], v. 9, p. 688, 2018. Disponível em: Acesso em: 3 ago. 2022.

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

MARQUES, Alessandra Aparecida *et al.* Gender Differences in the Neurobiology of Anxiety: Focus on Adult Hippocampal Neurogenesis. **Neural Plasticity**, [*s. l.*], v. 2016, 2016. Disponível em: /pmc/articles/PMC4738969/. Acesso em: 11 mar. 2024.

MARTÍNEZ-CABALLERO, Maria Ángeles *et al.* Behavioural traits related with resilience or vulnerability to the development of cocaine-induced conditioned place preference after exposure of female mice to vicarious social defeat. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [*s. l.*], v. 130, p. 110912, 2024. Disponível em: Acesso em: 5 fev. 2024.

MELNIKOVA, Tatiana *et al.* Sex-related dimorphism in dentate gyrus atrophy and behavioral phenotypes in an inducible tTa:APPsi transgenic model of Alzheimer's disease. **Neurobiology of Disease**, [*s. l.*], v. 96, p. 171–185, 2016. Disponível em: Acesso em: 11 mar. 2024.

MÉNDEZ, J. Alfredo; ORTEGA, Arturo. Toward a dissection of β-Amyloid localized effects on glutamatergic hippocampal repertoire. **Journal of Neurochemistry**, [*s. l.*], v. 155, n. 1, p. 7–9, 2020. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jnc.15111. Acesso em: 11 mar. 2024.

NAKATAKE, Yuko *et al.* The effects of emotional stress are not identical to those of physical stress in mouse model of social defeat stress. **Neuroscience Research**, [*s. l.*], v. 158, p. 56–63, 2020a. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.neures.2019.10.008.

NAKATAKE, Yuko *et al.* The effects of emotional stress are not identical to those of physical stress in mouse model of social defeat stress. **Neuroscience Research**, [*s. l.*], v. 158, p. 56–63, 2020b.

NESTLER, Eric J. Transcriptional mechanisms of addiction: Role of ΔFosB. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, [*s. l.*], v. 363, n. 1507, p. 3245–3255, 2008.

NEWMAN, Emily L. *et al.* Fighting Females: Neural and Behavioral Consequences of Social Defeat Stress in Female Mice. **Biological Psychiatry**, [*s. l.*], v. 86, n. 9, p. 657–668, 2019.

NGUYEN, Elizabeth T. *et al.* Endocrine stress responsivity and social memory in 3xTg-AD female and male mice: A tale of two experiments. **Hormones and Behavior**, [*s. l.*], v. 126, p. 104852, 2020. Disponível em: Acesso em: 5 fev. 2024.

NITZ, Douglas; MCNAUGHTON, Bruce. Differential modulation of CA1 and dentate gyrus interneurons during exploration of novel environments. **Journal of neurophysiology**, [*s. l.*], v. 91, n. 2, p. 863–872, 2004. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14523073/. Acesso em: 11 mar. 2024.

NOLLET, Mathieu; LE GUISQUET, Anne Marie; BELZUNG, Catherine. Models of depression: Unpredictable chronic mild stress in mice. **Current Protocols in Pharmacology**, [*s. l.*], n. SUPPL.61, p. 1–17, 2013a.

NOLLET, Mathieu; LE GUISQUET, Anne Marie; BELZUNG, Catherine. Models of depression: Unpredictable chronic mild stress in mice. **Current Protocols in Pharmacology**, [*s. l.*], n. SUPPL.61, p. 1–17, 2013b.

NOLLET, Mathieu; LE GUISQUET, Anne Marie; BELZUNG, Catherine. Models of depression: Unpredictable chronic mild stress in mice. **Current Protocols in Pharmacology**, [*s. l.*], n. SUPPL.61, p. 1–17, 2013c.

OTABI, Hikari *et al.* Subchronic and mild social defeat stress alter mouse nest building behavior. **Behavioural Processes**, [*s. l.*], v. 122, p. 21–25, 2016. Disponível em: Acesso em: 5 fev. 2024.

OTABI, Hikari; OKAYAMA, Tsuyoshi; TOYODA, Atsushi. Assessment of nest building and social interaction behavior in mice exposed to acute social defeat stress using a three-dimensional depth camera. **Animal Science Journal**, [*s. l.*], v. 91, n. 1, p. e13447, 2020. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/asj.13447. Acesso em: 5 fev. 2024.

PEÑA, Catherine J. *et al.* Early life stress confers lifelong stress susceptibility in mice via ventral tegmental area OTX2. **Science (New York, N.Y.)**, [*s. l.*], v. 356, n. 6343, p. 1185, 2017. Disponível em: /pmc/articles/PMC5539403/. Acesso em: 13 mar. 2024.

PLANCHEZ, Barbara; SURGET, Alexandre; BELZUNG, Catherine. Animal models of major depression: drawbacks and challenges. **Journal of Neural Transmission**, [*s. l.*], v. 126, n. 11, p. 1383–1408, 2019a.

PLANCHEZ, Barbara; SURGET, Alexandre; BELZUNG, Catherine. Animal models of major depression: drawbacks and challenges. **Journal of Neural**

Transmission, [*s. l.*], v. 126, n. 11, p. 1383–1408, 2019b. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s00702-019-02084-y.

POWELL, Susan B. *et al.* The balance between approach and avoidance behaviors in a novel object exploration paradigm in mice. **Behavioural Brain Research**, [*s. l.*], v. 152, n. 2, p. 341–349, 2004.

QIN, Xia *et al.* Moderate maternal separation mitigates the altered synaptic transmission and neuronal activation in amygdala by chronic stress in adult mice. **Molecular Brain**, [*s. l.*], v. 12, n. 1, p. 1–12, 2019. Disponível em: https://molecularbrain.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13041-019-0534-4. Acesso em: 15 fev. 2024.

RADLEY, Jason *et al.* Chronic stress and brain plasticity: Mechanisms underlying adaptive and maladaptive changes and implications for stress-related CNS disorders. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [*s. l.*], v. 58, p. 79–91, 2015.

SANTOS-COSTA, Nathália *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**, [*s. l.*], 2021a.

SANTOS-COSTA, Nathália *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**, [*s. l.*], 2021b.

SAPOLSKY, Robert M. Stress and the brain: individual variability and the inverted-U. **Nature Neuroscience 2015 18:10**, [*s. l.*], v. 18, n. 10, p. 1344–1346, 2015. Disponível em: https://www.nature.com/articles/nn.4109. Acesso em: 15 fev. 2024.

SCHUHMACHER, Anna *et al.* Association of amygdala volumes with cortisol secretion in unipolar depressed patients. **Psychiatry Research: Neuroimaging**, [*s. l.*], v. 202, n. 2, p. 96–103, 2012.

SHEPPE, Walter. Exploration by the Deer Mouse, Peromyscus leucopus. **American Midland Naturalist**, [*s. l.*], v. 76, n. 2, p. 257, 1966. Disponível em: Acesso em: 25 mar. 2024.

SHIMIZU, Takeshi *et al.* Social Defeat Stress in Adolescent Mice Induces Depressive-like Behaviors with Reduced Oligodendrogenesis. **Neuroscience**, [*s. l.*], v. 443, p. 218–232, 2020.

SIAL, Omar K. *et al.* Vicarious social defeat stress: Bridging the gap between physical and emotional stress. **Journal of Neuroscience Methods**, [*s. l.*], v. 258, p. 94–103, 2016.

SIMPSON, Joy; KELLY, John P. An investigation of whether there are sex differences in certain behavioural and neurochemical parameters in the rat.

Behavioural Brain Research, [*s. l.*], v. 229, n. 1, p. 289–300, 2012. Disponível em: Acesso em: 11 mar. 2024.

SPEAR, Linda Patia; BRAKE, Stephen C. Periadolescence: age-dependent behavior and psychopharmacological responsivity in rats. **Developmental psychobiology**, [*s. l.*], v. 16, n. 2, p. 83–109, 1983. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6339302/. Acesso em: 25 mar. 2024.

TAKAHASHI, Aki *et al.* Establishment of a repeated social defeat stress model in female mice. **Scientific Reports 2017 7:1**, [*s. l.*], v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017.

TEJADA, Julian; CHAIM, Khallil Taverna; MORATO, Silvio. X-PloRat: A Software for Scoring Animal Behavior in Enclosed Spaces. **Psicologia: Teoria e Pesquisa**, [*s. l.*], v. 33, p. 1–4, 2018. Disponível em: https://www.scielo.br/j/ptp/a/CPg8cJxppspNpT6ywgs8KnL/. Acesso em: 6 mar. 2024.

TIDEY, Jennifer W.; MICZEK, Klaus A. Social defeat stress selectively alters mesocorticolimbic dopamine release: An in vivo microdialysis study. **Brain Research**, [*s. l.*], v. 721, n. 1–2, p. 140–149, 1996.

TORRES MUÑOZ, Paula; FRANKLIN, Tamara Brook. The anxiogenic effects of adolescent psychological stress in male and female mice. **Behavioural Brain Research**, [*s. l.*], v. 432, p. 113963, 2022.

TZANOULINOU, S. *et al.* Peripubertal stress-induced behavioral changes are associated with altered expression of genes involved in excitation and inhibition in the amygdala. **Translational Psychiatry 2014 4:7**, [*s. l.*], v. 4, n. 7, p. e410–e410, 2014. Disponível em: https://www.nature.com/articles/tp201454. Acesso em: 6 fev. 2024.

UCHIDA, Shusaku *et al.* Early Life Stress Enhances Behavioral Vulnerability to Stress through the Activation of REST4-Mediated Gene Transcription in the Medial Prefrontal Cortex of Rodents. **Journal of Neuroscience**, [*s. l.*], v. 30, n. 45, p. 15007–15018, 2010. Disponível em: https://www.jneurosci.org/content/30/45/15007. Acesso em: 14 mar. 2024.

VAN DOESELAAR, Lotte *et al.* Chronic social defeat stress in female mice leads to sex-specific behavioral and neuroendocrine effects. **Stress**, [*s. l.*], v. 24, n. 2, p. 168–180, 2021. Disponível em: https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10253890.2020.1864319. Acesso em: 14 mar. 2024.

VIALOU, Vincent *et al.* Prefrontal Cortical Circuit for Depression- and Anxiety-Related Behaviors Mediated by Cholecystokinin: Role of ΔFosB. **The Journal of Neuroscience**, [*s. l.*], v. 34, n. 11, p. 3878–3887, 2014a.

VIALOU, Vincent *et al.* Prefrontal Cortical Circuit for Depression- and Anxiety-Related Behaviors Mediated by Cholecystokinin: Role of ΔFosB. **The Journal of Neuroscience**, [*s. l.*], v. 34, n. 11, p. 3878–3887, 2014b.

VICTORIANO, Gabriel *et al.* Inhibition of the left medial prefrontal cortex (mPFC) prolongs the social defeat-induced anxiogenesis in mice: Attenuation by NMDA receptor blockade in the right mPFC. **Behavioural Brain Research**, [*s. l.*], v. 378, n. October 2019, p. 112312, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112312.

WANG, Wang *et al.* Spinal microglial activation promotes perioperative social defeat stress-induced prolonged postoperative pain in a sex-dependent manner. **Brain, Behavior, and Immunity**, [*s. l.*], v. 100, p. 88–104, 2022.

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

WARREN, Brandon L. *et al.* Neurobiological Sequelae of Witnessing Stressful Events in Adult Mice. **Biological Psychiatry**, [*s. l.*], v. 73, n. 1, p. 7–14, 2013.

WOOD, Susan K.; BHATNAGAR, Seema. Resilience to the effects of social stress: Evidence from clinical and preclinical studies on the role of coping strategies. **Neurobiology of Stress**, [*s. l.*], v. 1, n. 1, p. 164–173, 2015.

XU, Jingjing *et al.* FKBP5 and specific microRNAs via glucocorticoid receptor in the basolateral amygdala involved in the susceptibility to depressive disorder in early adolescent stressed rats. **Journal of Psychiatric Research**, [*s. l.*], v. 95, p. 102–113, 2017. Disponível em: Acesso em: 3 nov. 2022.

ZHANG, Xin *et al.* Stress-Induced Functional Alterations in Amygdala: Implications for Neuropsychiatric Diseases. **Frontiers in Neuroscience**, [*s. l.*], v. 12, n. MAY, p. 367, 2018. Disponível em: /pmc/articles/PMC5987037/. Acesso em: 11 fev. 2024.

ZHOU, Yu *et al.* Polygala japonica Houtt. reverses depression-like behavior and restores reduced hippocampal neurogenesis in chronic stress mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [*s. l.*], v. 99, p. 986–996, 2018a.

ZHOU, Yu *et al.* Polygala japonica Houtt. reverses depression-like behavior and restores reduced hippocampal neurogenesis in chronic stress mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [*s. l.*], v. 99, p. 986–996, 2018b. Disponível em: Acesso em: 21 out. 2021.