

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
PIPGCF UFSCAR/UNESP

GABRIEL VICTORIANO DOS SANTOS

**PAPEL DO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL MEDIAL NA ANSIOGÊNESE INDUZIDA
PELO ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL EM CAMUNDONGOS**

ARARAQUARA

2018

GABRIEL VICTORIANO DOS SANTOS

**PAPEL DO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL MEDIAL NA ANSIOGÊNESE INDUZIDA
PELO ESTRESSE DE DERROTA SOCIAL EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas PIPGCF UFSCar/UNESP, como requisito obrigatório para obtenção do Título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza

ARARAQUARA

2018

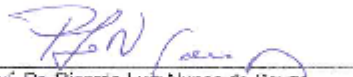


UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS


Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa da Dissertação de Mestrado da candidata Gabriel Victoriano dos Santos, realizada em 18/09/2018:



Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza
UNESP



Prof. Dr. Marcelo Tadeu Mizin
UNESP



Prof. Dr. Tarciso Tadeu Miguel
UFU

A Deus, aos meus pais, Neusa e Getúlio, e a todos meus amigos por todo apoio e incentivo em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, o autor da minha vida, que me trouxe até aqui e me encarregou dessa linda missão de descobrir parte do seu conhecimento, a todo tempo me dando forças, sabedoria, proteção, saúde e razão para o existir. Sem Ele, nada sou.

Aos meus pais, Neusa e Getúlio, que sempre apoiaram incondicionalmente minhas escolhas, dando suporte à luta pelos meus sonhos, além de toda base e educação familiar, sem a ajuda deles, jamais teria concluído essa etapa.

Ao meu orientador, Professor Ricardo, pela oportunidade, orientação, paciência e ensinamentos durante esses anos do mestrado.

À Nathália, minha “co-orientadora”, que gentilmente me ensinou grande parte do que aprendi nesses anos de laboratório, pelos ensinamentos, paciência, risadas, discussões, experimentos, momentos de tensões e por me ajudar sempre.

Ao Professor e amigo Francisco Gouvêa Junior, por sempre ter acreditado em mim, por todas as oportunidades de docência na Unesp Bauru, por ter me inspirado a seguir a fisiologia e ensinar valores que só o melhor amigo e professor poderia ter compartilhado, jamais me esquecerei da sua amizade.

Ao Professor Laurival, que me ensinou atributos únicos para se ter uma didática singular, pelas conversas, inspirações, longas discussões e ensinamentos.

Aos Professores da Unesp de Bauru que me apoiaram a seguir a vida acadêmica e sempre acreditaram em mim: Rosana Rossi, Carlos Vicentini, Irene Vicentini, Taitiâny Bonzanini, Terezinha de Fátima Fumis, Amaral, Job Antonio e Katsumasa Hoshino.

Aos professores e funcionários do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia, do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara e do Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas pelos ensinamentos e auxílios acadêmicos e administrativos.

Aos meus queridos amigos Emilson, Camilla e Karine por estarem sempre comigo nessa jornada, mesmo antes do processo seletivo, compartilhando não só os tópicos mais importantes do “Guyton”, mas também por terem me ensinado o verdadeiro valor da amizade e companheirismo além do laboratório.

A Rosana Pupim e Elisabete Lepera, pessoas extraordinárias e dedicadas, que sempre me ajudaram com todo o apoio técnico e suporte em todos os momentos.

À Tirene, pelas risadas e todo o suporte na área administrativa.

Aos amigos Celina, Lucas Gomes, Jéssica, Willian e Diulie, pelos passeios, desabafos, revelações, diversões, risadas e gordices, que mesmo em momentos de muita tensão e pressão puderam me demonstrar como é bom estar entre amigos mais chegados que irmãos.

Aos colegas e amigos do laboratório e do Programa de Pós-graduação, em especial Marion, Diego, Leandro, Matheus, Tati, Beatriz, Lucas Canto, Leandro, Lucas Barreto, Ricardo, Lígia, Gessynger, Carlão, Rodrigo, Mayara, Wilson, Lino e Marco, pelas boas conversas, conselhos, auxílios e por tornarem eses anos de muito trabalho menos difíceis.

A minha amiga Ana, por ter me ajudado a pensar e desenvolver um racional lógico para a redação desse texto.

À minha amiga Adriana Licursi, que foi uma amiga especial e pôde me ajudar com conselhos, broncas, risadas, desabafos, revelações e apoio incondicional nesse tempo.

À direção, docentes, alunos e funcionários da Escola Estadual Professora Alva Fabri Miranda, com os quais compartilhei momentos inesquecíveis, muito além da sala de aula, e que me inspiraram a nunca desistir de ser um cientista e professor, simultaneamente.

À direção, docentes, alunos e funcionários da Escola Estadual Professor José Nicolau Piráquine que, nessa nova fase, me ensinaram muito mais do que conteúdos, em especial a turma do 3ºB – 2017 (Alison, Anderson, Bruna, Deived, Elder, João Marcelo, Henrique, Isabelle, Lucas, Larissa, Luciana, Matheus, Maxwel, Milene, Nádyá, Nathalia, Pedro, Rafael, Raiane, Raíssa, Robson, Tainá, Victória), da qual tive o privilégio de ser paraninfo. Vocês mudaram minha vida como professor e pessoa!

Aos amigos Paula Benetton, Daniel, Carol, Isabela, Juliano, Viviane, Graziela, Mariana e Guilherme que me ajudaram com conselhos, correções, sugestões e incentivo nessa jornada.

Aos membros da Comunidade Evangélica Sara Nossa Terra de Jaú que sempre me apoiaram nesses anos de muitíssimas viagens, em especial ao meu líder Evair que sempre me motivou e aos amigos Bruna, Alexandre, Gabriel Garcia, Jennifer, Diego, Ana Vitória e a todos amigos das Equipes Skaikru, Kamikazee pastores Jessé e Michele

Aos sujeitos utilizados nesta pesquisa, sem os quais não seria possível sua realização, meu profundo respeito e agradecimento.

Às agências de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), CNPq e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro e suporte na realização deste trabalho.

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

“O binômio ENSINO-APRENDIZAGEM eficaz é, antes de mais nada, uma questão de afeto.

É ele que tem feito as pessoas, mestres e alunos, crescerem sem perder a dimensão do humano, e faz a atividade científica ser algo mais que mero oportunismo na competição para a projeção pessoal ou vantagem econômica. Esse afeto faz as pessoas buscarem a competência serena e a vontade de compartilhar o conhecimento.”

Prof. Dr. Katsumasa Hoshino

“Não temas, porque eu sou contigo; não te assombres, porque eu sou teu Deus; eu te fortaleço, e te ajudo, e te sustento com a destra da minha justiça. ”

Isaías 41:10

RESUMO

Recentes evidências sugestivas apontam que o Córtex Pré-Frontal medial (CPFm) possui um papel lateralizado na resposta a eventos estressores, sendo que o hemisfério esquerdo (CPFmE) atenuaria as respostas ansiogênicas comandadas pelo direito (CPFmD). A inativação química temporária do CPFmE, seguida pelo estresse de derrota social (EDS), repercute em respostas ansiogênicas que perduram por 24 horas em camundongos. No presente estudo, investigamos: (1) os níveis de ansiedade de camundongos expostos ao labirinto em cruz elevado (LCE) 2, 5 e 10 dias após o EDS sob inativação do CPFmE e se o (2) os receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (N-metil-D-aspartato) localizados no CPFmD desenvolvem algum papel nesse processo. Camundongos Suíços machos receberam microinjeção intra-CPFmE de salina ou cloreto de cobalto (CoCl_2 , inibidor sináptico inespecífico) e foram submetidos ao EDS agudo ou interação não agressiva. Dois, cinco ou 10 dias depois, foram expostos ao LCE para avaliação das medidas convencionais de ansiedade [porcentagem de entradas e tempo nos braços abertos (%EBA; %TBA)], atividade locomotora [frequência de entradas nos braços fechados (EBF)] e medidas complementares [frequências de *Stretched attend posture* em ambientes protegidos (SAPp) e desprotegidos (SAPd) e *Head-dipping* protegidos (HDp) e desprotegidos (HDd)]. Os resultados demonstraram que a associação “inativação do CPFmE + EDS” reduziu %EBA e %TBA, sem alterar EBF, aumentou o SAPp nos 2º e 5º dias, diminuiu SAPd apenas no 5º dia e reduziu o HDd em todos os tempos analisados. No experimento 2, dois dias após receberem a combinação CoCl_2 ou salina no CPFmE e o EDS, foi realizada a microinjeção intra-CPFmD de salina ou AP7 (antagonista de receptor NMDA) 10 minutos antes da exposição dos camundongos ao LCE. Assim, a combinação CoCl_2 + EDS confirmou a ansiogênese, porém somente nos animais tratados com salina no CPFmD. Esses resultados sugerem que a inativação do CPFmE pode tornar os animais susceptíveis ao EDS, repercutindo em respostas relacionadas a ansiedade por até 10 dias. Entretanto, esse efeito ansiogênico pode ser revertido pelos bloqueios dos receptores NMDA no CPFmD

Palavras-chave: Ansiedade, córtex pré-frontal medial esquerdo e direito, lateralização funcional, estresse de derrota social, camundongos

ABSTRACT

Recent findings have demonstrated that the medial prefrontal cortex (mPFC) has a lateralized role in the control of response to stressors, and the left hemisphere (LmPFC) would attenuate the anxiogenic responses elicited by right medial prefrontal cortex (RmPFC). The temporary chemical inactivation of LmPFC, followed by social defeat stress (SDS) provokes an anxiogenic effect that persists for up to 24 hours in mice. In the present study, we investigated: (1) the anxiety levels of mice exposed to the elevated plus maze (EPM) 2, 5 or 10 days after the combination SDS + LmPFC inactivation and (2) the role of the glutamate NMDA (n-methyl-D-aspartate) receptors located in the RmPFC in anxiety-related behaviors in mice exposed to the EPM two days after the combination "SDS + LmPFC inactivation". Male Swiss mice received intra-LmPFC microinjection of saline or cobalt chloride (CoCl₂, non-specific synaptic inhibitor) and were exposed to acute SDS or non-aggressive interaction. Two, five or 10 days later, they were exposed to the EPM to assess conventional anxiety [percentage of open arm entries and percentage of open arm time (%OE; %OT)] and complementary [Stretched attend posture frequencies in protected (pSAP) and unprotected (uSAP) places and protected Head-dipping (pHD) and unprotected (uHD) places] measures. Locomotor activity [frequency of closed-arms entries (CE)] was also recorded. The results showed that the association "inactivation of LmPFC + SDS" decreased %OE and %OT, increased pSAP and decreased uSAP and uHD in almost all testing days. In experiment 2, two days after receiving intra-LmPFC CoCl₂ or saline + SDS, the animals received intra- RmPFC microinjection of saline or AP7 (NMDA receptor antagonist) 10 minutes before being exposed to the EPM. Results showed that the CoCl₂ + SDS combination confirmed the anxiogenic effect, however only in the animals treated with saline in the LmPFC. CE was remained unchanged in both experiments. These results suggest that the inactivation of the LmPFC may prolong to up to 10 days the anxiogenic-like effects induced by SDS. Interestingly, this type of stress-induced anxiogenesis is impaired by the blockade of the NMDA receptor located in the RmPFC of mice.

Keywords: Anxiety, left and right medial prefrontal cortex, functional lateralization, social defeat stress, mice

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama esquemático (à esquerda) e uma fotomicrografia representativa (à direita) dos sítios de microinjeção no CPFm de camundongos

Figura 2. Efeitos da microinjeção de CoCl_2 (1 mM) no CPFmE de camundongos, na porcentagem de entradas nos braços abertos (BA), 2, 5 e 10 dias após a interação não-agressiva ou derrota social

Figura 3. Efeitos da microinjeção de CoCl_2 (1 mM) no CPFmE de camundongos na porcentagem de tempo nos braços abertos (BA) em 2, 5 e 10 dias após a interação não-agressiva ou derrota social

Figura 4. Efeitos da microinjeção de CoCl_2 (1 mM) no CPFmE de camundongos, na frequência de entradas nos braços fechados (EBF) em 2, 5 e 10 dias após a interação não-agressiva ou derrota social

Figura 5. Efeitos da microinjeção de CoCl_2 (1 mM) no CPFmE de camundongos, na frequência das medidas complementares em 2, 5 e 10 dias após a interação não-agressiva ou derrota social. A) SAPp; B) SAPd; C) HDPp; D) HDd

Figura 6. Fotomicrografia representativa dos sítios de microinjeção bilateral no CPFm de camundongos.

Figura 7. Efeitos da microinjeção de salina ou CoCl_2 (1 mM) seguida da administração de salina ou AP7 no CPFmD de camundongos, 2 dias após o EDS, nas porcentagens de entradas e tempo nos braços abertos. Acima: Animais com microinjeção fora do sítio alvo (OUT)

Figura 8. Efeitos da microinjeção intra-CPFmE de salina ou CoCl_2 (1 mM) associada ao EDS e, 2 dias depois, a administração intra CPFmD de salina ou AP7, no número de entradas nos braços fechados (EBF) de camundongos expostos ao LCE

Figura 9. Efeitos da microinjeção intra-CPFmE de salina ou CoCl_2 (1mM) associada ao EDS e, 48 horas depois, à microinjeção intra-CPFmD de salina ou AP7 nas medidas complementares exibidas por camundongos expostos ao LCE. A) SAPp; B) SAPd; C) HDp; D) HDd

LISTA DE ABREVIATURAS

- %EBA – Porcentagem de entradas nos braços abertos;
- %TBA – Porcentagem de tempo nos braços abertos;
- AMPA – α -amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
- AP7 – Ácido 2-amino-7-fosfo-heptanóico
- BA – Braços abertos;
- BF – Braços fechados;
- Cg1 – Córtex cingulado área 1
- CoCl₂ – Cloreto de cobalto
- CPFm – Córtex pré-frontal medial
- CPFmD – Córtex pré-frontal medial direito
- CPFmE – Córtex pré-frontal medial esquerdo
- DSM – *Diagnostic Statistical Manual of Mental Disorders*
- EBF – Frequência de entradas nos braços fechados;
- EDS – Estresse de derrota social
- GR – Receptor de glicocorticóides GR
- HD – *Head-dipping*
- HDd – *Head-dipping* desprotegido
- HDp – *Head-dipping* protegidos
- HPA – Hipotálamo-hipófise-adrenal
- IL – Córtex infralímbico
- INEP – Instituto Nacional de Estudos e Pesquisas Educacionais Anísio Teixeira
- LCE – Labirinto em cruz elevado
- NLET – Núcleo leito da estria terminal
- NO – Óxido nítrico
- NOC-9 – 6-(2-hidroxi-1-metil-2-nitrosodiazirino)-N-metil-1-hexanamina)
- PISA – Programa internacional de avaliação de alunos
- PrL – Córtex pré-límbico
- PVN – Núcleo paraventricular
- SAP – *Stretched attend posture*
- SAPd – *Stretched attend posture* desprotegidos
- SAPp – *Stretched attend posture* protegidos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1. Estresse	15
2.2. Estresse de Derrota social	16
2.3. Diálogos com a Educação	17
2.4. Ansiedade.....	21
2.5. Labirinto em Cruz Elevado	22
2.6. Córtex pré-frontal medial.....	24
3. OBJETIVOS	
3.1. Objetivo geral	29
3.8. Objetivos específicos	29
4. MATERIAL E MÉTODOS	
4.1. Sujeitos.....	30
4.2. Cirurgia Estereotáxica.....	30
4.3. Fármacos	30
4.4. Microinjeção	31
4.5. Escolha de agressores	31
4.6. Estresse de derrota social	31
4.7. Labirinto em Cruz Elevado e Análise Comportamental	32
4.8. Procedimentos Gerais	33
4.8.1. Experimento 1 - Avaliação comportamental de camundongos expostos ao labirinto em cruz elevado 2, 5 ou 10 dias após serem tratados com microinjeção intra-CPFmE de CoCl ₂ ou salina e submetidos à interação social agressiva (derrota social) ou não agressiva (controle).....	33
4.8.2. Experimento 2 - Avaliação do bloqueio dos receptores NMDA do CPFmD nos comportamentos defensivos de camundongos expostos ao LCE 2 dias após a inativação do CPFmE por CoCl ₂ e submetidos ao EDS.....	34
4.9. Análise Histológica.....	35
4.10. Análise Estatística.....	35
5. RESULTADOS	
5.1. Experimento 1: Ansiogênese aumentada em camundongos expostos ao LCE 2, 5 ou 10 dias após a combinação “inativação do CPFmE + derrota social”.	37

5.1.1.	Injeções no CPFmE.	37
5.1.2.	Medidas espaço-temporais.	<u>37</u>
5.1.1.	Medidas complementares.	40
5.2.	Experimento 2: A ansiedade de camundongos expostos ao LCE dois dias após a combinação “inativação do CPFmE + EDS” é bloqueada pela injeção de AP7 no CPFmD.....	42
5.2.1.	Injeções Bilaterais np CPFm.	42
5.2.2.	Medidas espaço-temporais.	42
5.2.3.	Medidas complementares.	44
6.	DISCUSSÃO	47
7.	CONCLUSÃO	56
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

1 INTRODUÇÃO

A ansiedade é uma emoção evolutivamente importante para a sobrevivência e tem suas origens nas reações de defesa, como por exemplo, avaliações de risco, enfrentamento, evitação ou fuga, adotadas por diferentes espécies animais para sobreviver às ameaças e manter a sua integridade (GRAEFF; GUIMARÃES, 2012; SULLIVAN; GRATON, 2002). Ao passar por um evento estressor, o organismo responde por meio de um repertório de respostas fisiológicas e comportamentais para se adaptar às alterações ambientais. Essas respostas possuem valor adaptativo de sobrevivência, mas que podem se tornar mal adaptativas se forem exacerbadas. Logo, o estresse pode ser um fator de risco para a saúde mental e levar ao desenvolvimento de transtornos de ansiedade (MATHEW et al., 2008). É importante definir estressor como um evento ou estímulo que provoca ou induz ao estresse (HOUAISS et al., 2011). Tais estressores podem resultar na exibição de um repertório de respostas comportamentais e autonômicas, denominadas reações de defesa, acompanhadas da liberação de hormônios e neurotransmissores que preparam o organismo para responder à ameaça. Embora importantes em contextos aversivos, essas alterações tornam-se mal-adaptadas em condições que não oferecem perigo ao indivíduo e, em se tratando da espécie humana, estas respostas defensivas eliciadas expressariam a ocorrência de transtornos de ansiedade (GRAEFF; GUIMARÃES, 2012).

Diversas estruturas encefálicas são tidas como substratos neurais relacionados à ansiedade, cabendo destaque ao córtex pré-frontal medial (CPFm), por ser uma estrutura que modula essas respostas e ser o objeto de estudo do presente trabalho. O CPFm participa da modulação de eventos motivacionais, positivos ou negativos, e possui conexões com diversas estruturas relacionadas à ansiedade e ao estresse (EUSTON et al., 2012; TOVOTE et al., 2015). Lesões do CPFm de camundongos levam a diminuição nos comportamentos defensivos e na interação social (GONZALEZ et al., 2000). Ainda, há aumento da exploração e tempo nos braços abertos no labirinto em cruz elevado (LCE) em ratos com lesão excitotóxica no CPFm, conforme visto por Lacroix et al. (2000) e Shah e Treit (2003). Logo, esses resultados sugerem que o CPFm esteja envolvido na mediação da ansiedade. Além disso, o CPFm ainda está envolvido com atividades de memória, tomada de decisão, resposta ao estresse e comportamento adaptativo (EUSTON et al., 2012). O CPFm também é um regulador da resposta ao estresse, sendo que o estresse crônico pode levar a diminuição de sua atividade, seja por atrofia ou por diminuição de contatos sinápticos com outras estruturas (DIORO et al., 1993; CERQUEIRA et al., 2008). No entanto, há evidências sugestivas de um papel diferenciado entre os dois hemisférios do CPFm, no qual o hemisfério esquerdo (CPFmE) exerce um papel

inibitório sobre as respostas emocionais negativas relacionadas ao estresse, que seriam dependentes do hemisfério direito (CPFmD) (CERQUEIRA et al., 2008). Nesse sentido, Lee et al. (2015) observaram alterações eletrofisiológicas no CPFmE e D de acordo com a capacidade do animal em lidar com o estresse de derrota social (EDS). Em todos os animais estressados cronicamente por EDS, houve aumento nos disparos do CPFmD, entretanto, o número de disparos e a ativação do CPFmE diferiu entre os animais, o hemisfério esquerdo de alguns apresentou menor atividade eletrofisiológica em relação aos outros, sendo que esses animais foram classificados como vulneráveis, enquanto aqueles que não exibiram tal diminuição foram resilientes ao estresse. Logo, os autores sugeriram que o CPFm esteja envolvido nas respostas defensivas e interação social.

Há diversos neurotransmissores candidatos a mediar a resposta ansiogênica no CPFm, com destaque ao óxido nítrico (NO) (GUIMARÃES et al., 2005) e o glutamato (STERN et al., 2010; COSTA, 2017), este último sobretudo via ativação dos receptores do tipo N-Metil-D-Aspartato (NMDA), (SAITOH et al., 2014). Estudos recentes do nosso grupo (COSTA et al., 2016), realizados em camundongos expostos ao LCE, mostraram que a facilitação nitrérgica do CPFmD com doador de NO, NOC-9, foi capaz de diminuir a exploração dos braços abertos, efeito ansiogênico. A mesma manipulação farmacológica realizada no CPFmE ou bilateralmente, não alterou tal resposta comportamental. Ainda, foi evidenciado que a inibição do CPFmE e CPFmD, separadamente, com CoCl_2 , induziu o aumento e diminuição, respectivamente, dos comportamentos defensivos no LCE em animais não-estressados. Esses resultados corroboram a hipótese de que o CPFmE module o CPFmD, que quando ativado leva às respostas ansiogênicas observadas durante a exposição dos animais ao LCE. Os autores ainda demonstraram a continuidade do efeito ansiogênico 24 horas após a inativação do CPFmE em camundongos estressados pelo modelo de derrota social. Porém, ainda não se sabe a duração desse efeito ansiogênico e qual é a participação do CPFmD nesse processo.

Portanto, é relevante conhecer por quanto tempo esse efeito relacionado à ansiedade perdura, pois caso sua duração se estenda por mais tempo, a inibição do CPFmE antes da derrota social poderia mimetizar os efeitos de um protocolo de estresse crônico, com efeito ansiogênico observado por mais de 24 horas após um evento de estresse agudo. Além disso, tomando por base os resultados obtidos pelo antagonismo dos receptores NMDA na ansiogênese induzida pelo NOC-9 no CPFmD e a participação de receptores NMDA nas reações de defesa no LCE, propomos investigar também a participação dessa estrutura enquanto durar o efeito ansiogênico produzido pelo estresse agudo de derrota social, já que ainda não se sabe o papel do CPFmD nas respostas relacionadas a ansiedade nessas condições experimentais. A nossa hipótese é de

que o efeito ansiogênico permaneça em camundongos estressados após 24 horas, sendo que a inativação do CPFmE com CoCl_2 possa interferir nos comportamentos defensivos no LCE e que o bloqueio dos receptores NMDA no CPFmD revertam os comportamentos ansiogênicos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Estresse

O estudo do estresse é reconhecidamente uma questão de amplo debate nas áreas das neurociências básica e clínica. Inicialmente, o termo “estresse” foi descrito na física para explicar o grau de deformidade sofrido por um material quando submetido a um esforço ou tensão. Mas foi só na década de 50 que os pesquisadores Hans Selye e Walter Cannon “pegaram emprestado” o termo “estresse” para utilizá-lo em uma perspectiva biológica e adaptativa, popularizando a palavra na fisiologia (GODOY et al., 2018). Segundo Selye (1950), estresse é uma resposta do organismo que envolve a interação entre dano e defesa de alguma situação não específica. Além de emprestar o termo “estresse” da física, Selye também cunhou o termo “síndrome de adaptação geral” (SAG), estritamente relacionado ao estresse.

A SAG, como descrita nos trabalhos de Selye, pode ser entendida como o conjunto de reações não-específicas desencadeadas quando o organismo é exposto a um estímulo ameaçador à manutenção da homeostase, englobando reações fisiológicas (FRIEDERICH et al., 2015), o que inclui a inaptidão de lidar com os eventos aversivos. A SAG é dividida em 3 fases, sendo elas: alarme, resistência e exaustão. Na primeira fase, alarme, o organismo emite comportamentos defensivos e respostas fisiológicas para fugir de ou evitar algum fator estressante a fim de voltar às condições normais. Caso os estressores permaneçam, o organismo entra na segunda fase, resistência, na qual as respostas anteriores desaparecem e novas respostas são produzidas para que ele se adapte à essa situação. A terceira fase da SAG, denominada exaustão, ocorre quando o organismo não consegue se adaptar fisiologicamente às situações aversivas, o que pode levar ao aparecimento de diversas doenças, com destaque aos transtornos mentais que serão abordados nesse trabalho (SELYE, 1950; CID-10, 2008).

Com base nesses fundamentos de Selye, podemos considerar o estresse como as respostas gerais dos organismos, fisiológicas e comportamentais, que ocorrem diante de uma situação aversiva. São exemplos dessas alterações físicas e comportamentais geradas pelo estresse, a liberação de glicocorticoides a partir da ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), a liberação de catecolaminas centrais e periféricas, o redirecionamento energético (oxigênio e nutrientes), o aumento do estado de alerta, a supressão de atividade sexual e da atenção, que podem garantir a sobrevivência (SANT’ANNA; QUEVEDO, 2000). Apesar de serem adaptativas e comuns aos seres vivos, já que permitem a sobrevivência dos animais, essas respostas ao estresse podem ser um fator de risco para o aparecimento de doenças

cardiovasculares, transtornos psiquiátricos e outras doenças (CID-10, 2008; CRESTANI et al., 2016; HAMMELS et al. 2015; KAPCZINSKI et al., 2000; MATHEW et al., 2008).

Nesse sentido, a Classificação Internacional de Doenças (CID-10, 2008), a qual foi elaborada pela Organização Mundial de Saúde, atribui ao estresse um fator preponderante para o surgimento de doenças psiquiátricas, como reações ao estresse, transtorno de estresse pós-traumático, transtorno de adaptação, reações não-específicas a um estresse grave, transtornos de humor, depressão, transtornos psicóticos, transtornos dissociativos, transtornos somatoformes, transtornos de alimentação, transtornos de personalidade e transtornos de ansiedade (TA), sendo esse último grupo de transtornos os discutidos neste trabalho.

Sabe-se que o tipo e a duração do estresse são fatores determinantes para o desenvolvimento de comportamentos relacionados à ansiedade (ARMARIO et al., 2008; BELDA et al., 2008; COSTA et al., 2016; GODOY et al., 2018; HAMMELS et al., 2015), sendo que os estressores sociais, como o estresse de derrota social, tendem a elevar os níveis das respostas do tipo ansiedade dos animais (HAMMELS et al., 2015). Além disso, não só o evento estressor, mas também a resposta de estresse pode diferir entre os organismos, havendo indivíduos resilientes, aqueles que são capazes de se recuperar dos episódios de estresse, e aqueles vulneráveis, que não se recuperam e podem desenvolver doenças psiquiátricas, como depressão, ansiedade e transtorno de estresse pós-traumático (DEL GIUDICE et al., 2011; McEWEN, 2012).

2.2 Estresse de Derrota Social

Sabe-se que diversas espécies de animais compõem sociedades (i.e., grupo de indivíduos da mesma espécie) marcadas por uma hierarquia de dominância, nas quais o macho dominante impõe aos submissos a restrição de espaço, comida e parceiros sexuais (KUZEL et al., 2013). Assim, camundongos são animais que formam uma sociedade hierárquica semelhante, demarcada pela luta por territórios, competição e pela presença de um animal dominante, que apresentam comportamento agressivo, e de subordinados (UHRICH, 1938), tanto em ambientes naturais (CROWCROFT; ROWE, 1963), quanto em biotérios (KUZEL et al., 2013). Essas interações sociais apresentadas por esses animais podem ser uma importante fonte para o desenvolvimento de diferentes protocolos de estresse baseados na interação social, que por sua vez facilitam o entendimento dos mecanismos da neurobiologia do estresse (BLANCHARD et al., 2001).

Existem diferentes protocolos baseados nas interações e estresse social, sendo um deles o modelo de estresse de derrota social (EDS) (BLANCHARD et al., 2001). O EDS é um modelo que consiste no conflito social entre coespecíficos. Nele, o animal dominante (residente), geralmente maior em peso e tamanho, ataca um coespecífico (intruso), resultando na exibição de comportamentos defensivos por parte do animal agredido. Uma vez derrotado, o animal agredido torna-se subordinado do agressor e pode passar por situações de medo, mesmo se for exposto a situações que não tenham a presença, propriamente dita, do agressor, mas de seus sinais, como odor ou de pistas visuais (BJÖRKQVIST, 2001). O confronto físico, e não só o contato sensorial, entre os coespecíficos é responsável pelo efeito ansiogênico no intruso (NAKAYASU; KATO, 2011).

Primeiramente, o EDS tornou-se amplamente utilizado para o entendimento da neurobiologia da agressão (SIEGFRIED et al., 1990) e das consequências do estresse crônico sobre os parâmetros comportamentais, fisiológicos, farmacológicos e moleculares (KRISHNAN et al., 2007). As alterações comportamentais e fisiológicas envolvidas no EDS foram sugestivas para a investigação de distúrbios do humor e emocionais, tais como depressão, ansiedade social e abuso de drogas como consequências desse tipo de estresse (BJÖRKQVIST, 2001, HAMMELS et al., 2015, KEENEY; HOGG, 1999, LAVIOLA et al., 1999, MACEDO et al., 2018). Já foram observadas alterações fisiológicas e comportamentais semelhantes à depressão e ansiedade em animais derrotados, logo após o contato com o agressor (BERTON et al., 1999; COSTA et al., 2016). Sabe-se que tanto ratos quanto camundongos apresentam comportamentos relacionados a ansiedade no LCE após o EDS, seja após um protocolo agudo ou crônico (BERTON et al., 2005; KORTE; DE BOER, 2003; KRISHNAN et al.; 2007; MACEDO et al., 2018). Costa et al. (2016) observaram elevação de respostas defensivas em camundongos no LCE em 5 minutos após um evento único de EDS. Portanto, há na literatura evidências que relacionam a derrota social ao aumento dos níveis das respostas do tipo ansiedade em animais (BJÖRKQVIST, 2001; HAMMELS et al., 2015).

2.3. Diálogos com a Educação

Atualmente, há estudos na literatura que tentam comparar e transpor os resultados fisiológicos e comportamentais encontrados em animais submetidos a situações de estresse social para o contexto das relações sociais humanas. Por muito tempo, o paradigma residente-intruso de derrota social tem fornecido diversos dados que têm contribuído para a compreensão da base biológica do estresse. O modelo de estresse de derrota social (EDS) possui boa validade

etológica, pois se assemelha a situações humanas como o *bullying*, uma vez que envolve agressão ou abuso físico e subordinação social (BUWALDA et al., 2011; VASCONCELOS, 2017). Segundo Björkqvist (2001), o animal agressor tem sido comparado ao *bully* (indivíduo que provoca o *bullying*) e o animal agredido à vítima, submetida à subordinação. O autor ainda destaca que a vítima de *bullying* experimenta estressores tão aversivos quanto o animal derrotado socialmente. Portanto, é possível traçar diálogos entre algumas observações na derrota social em animais e situações de estresse social em humanos. Para tanto, é importante observar não só as alterações no agredido, mas também no agressor, bem como o comportamento de agressividade em si.

Na literatura, é possível verificar estudos envolvendo derrota social e agressividade em diversas espécies de animais, como porco, macaco, roedores e, mais recentemente, humanos (BJÖRKQVIST, 2001). A maioria desses estudos dá enfoque à síntese de alguns hormônios e sua possível relação com a agressividade. Como exemplo, num estudo realizado por Ehrenkranz et al. (1974), foi observada uma correlação positiva entre síntese de testosterona e agressividade em homens presidiários. Em outro estudo, presidiários acusados de crimes mais violentos secretavam níveis de testosterona maiores que os presidiários de crimes menos perigosos, sugerindo que os altos níveis de testosterona estariam relacionados ao comportamento mais agressivo, violento ou abusivo. Dabbs et al. (1997) realizaram o mesmo estudo com fêmeas em presídios e observou semelhante correlação entre comportamentos agressivos e testosterona. Em contrapartida, em outro estudo, não observaram correlação entre níveis de testosterona e comportamento de infratores convictos de que realizaram, voluntariamente, crimes graves (BAIN et al., 1987).

Atualmente, alguns estudos têm focado na derrota social como um evento que ocorre também em humanos em diferentes contextos. As situações que envolvem estresse social, como *bullying*, abuso ou o término de um relacionamento, são os tipos mais comuns que os indivíduos enfrentarão na vida (ALMEIDA, 2005). Diante disso, pode-se destacar o *bullying* como uma das situações mais aversivas socialmente, sendo a ambiente escolar o maior local de incidência (LOPES NETO; SAAVEDRA, 2003).

Apesar de ser um tema bastante discutido no contexto educacional, ainda há muitas divergências quanto a definição do que é o *bullying* e em quais situações ele acontece (ZOTTIS, 2012). Portanto, na literatura pode-se encontrar diversas definições para esse termo, sendo algumas aqui apresentadas.

“Por definição, o *bullying* compreende todas as atitudes agressivas, intencionais e repetidas, que ocorrem sem

motivação evidente, adotadas por um ou mais estudante contra outro(s), causando dor e angústia, sendo executadas dentro de uma relação desigual de poder. (...) Trata-se de comportamentos agressivos que ocorrem nas escolas e que são tradicionalmente admitidos como naturais, sendo habitualmente ignorados ou não valorizados, tanto por professores quanto pelos pais.” (LOPES-NETO, 2005, p. S166)

“Eu defino *bullying* como: Uma pessoa está sendo intimidada ou vitimada quando ela é exposta, repetidamente e, ao longo do tempo, por ações negativas a partir de uma ou mais pessoas. O significado da expressão ações negativas deve ser mais definido quando alguém intencionalmente inflige ou tenta infligir, causa lesão ou desconforto sobre o outro, basicamente, o que é implícito na definição de comportamento agressivo. Ações negativas podem ser realizadas por contato físico, por palavras, ou de outras maneiras, como fazer caretas ou gestos obscenos ou recusar-se a cumprir os desejos de outra pessoa. Deve-se ressaltar que os termos *bullying* ou vitimização não são (ou não devem ser) usados quando duas pessoas com, aproximadamente, a mesma “força” (física ou psicológica) estão lutando ou brigando. Logo, para usar o termo *bullying*, deve haver um desequilíbrio de forças (uma relação de poder assimétrica): A pessoa que está exposta a ações negativas tem dificuldade em se defender e é impotente contra o assediador ou assediadores. É útil fazer a distinção entre *bullying*/vitimização direta e ataques relativamente abertos à vítima - e ao *bullying* indireto / vitimização na forma de isolamento social e exclusão de um grupo. É importante prestar atenção também à segunda forma menos visível de vitimização”. (OLWEUS, 1994, p. 98)

A exposição contínua ao estresse, característica no *bullying*, pode levar a transtornos psicossociais em indivíduos vulneráveis, enquanto outros que não desenvolvem podem ser designados como resilientes (FINNELL; WOOD, 2016). Um fator relacionado à suscetibilidade e resiliência é o estilo de enfrentamento individual adotado para lidar com o estressor (FINNELL; WOOD, 2016). Resumidamente, há duas formas de enfrentar o estresse social: o *coping* passivo e o ativo (FINNELL; WOOD, 2016). O *coping* ativo, descrito por Walter Cannon (CANNON, 1915 citado por FINNELL; WOOD, 2016), se relaciona às respostas de luta ou fuga, já o *coping* passivo é caracterizado por imobilidade e pouca agressividade (ENGEL; SCHMALE, 1972). Em humanos, o *coping* ativo está relacionado à resiliência, direcionando o indivíduo a resolver problemas, buscar ajuda e se adaptar as novas situações

(CAIRNS et al., 2014), enquanto o *coping* passivo está relacionado à vulnerabilidade, levando a comportamentos de evitação de novos desafios, busca de reafirmação e outros comportamentos negativos (BLALOCK; JOINER-JR, 2000). Os autores ainda ressaltam que, em algumas situações de estresse contínuo, tanto o *coping* ativo quanto o passivo podem ser preponderantes para o desenvolvimento de depressão ou transtornos de ansiedade (BLALOCK; JOINER-JR, 2000).

Segundo dados do Programa Internacional de Avaliação dos Alunos (PISA, 2015), que no Brasil é coordenado pelo Instituto Nacional de Estudos e Pesquisas Educacionais Anísio Teixeira (INEP), cerca de 17,5% dos estudantes brasileiros se queixam por sofrerem algum tipo de *bullying* no ambiente escolar e muitos deles podem desenvolver transtornos relacionados a depressão ou ansiedade (LOPES-NETO, 2015). Além disso, os alunos do Brasil estão acima na média mundial (55%) no que diz respeito a problemas com ansiedade decorrentes de trabalhos escolares (80,8%), que abrangem fatores além do *bullying* (PISA, 2015; FERREIRA, 2017). Swearer et al. (2008) apontaram o *bullying* na escola como um dos fatores desencadeantes para depressão e transtornos de ansiedade em adolescentes, sendo que as vítimas deixam de exibir o enfrentamento ativo diante da situação aversiva.

Segundo um levantamento feito por Isolan (2012), o *bullying* é um fenômeno que pode desencadear doença psiquiátricas em agressores, vítimas e agressores-vítimas (i.e., sujeitos que realizam ambos papéis: de agressor e vítima em diferentes situações) são mais vulneráveis a desenvolver transtornos psiquiátricos, relacionados a ansiedade e depressão, principalmente os agredidos. Kaltiala-Heino et al (2000) ainda destacou que o *bullying* entre os adolescentes pode um fator de risco para a indução de diversos transtornos psiquiátricos, relacionados ao consumo excessivo de etanol e outras substâncias, transtornos alimentares, doenças psicossomáticas que podem estar relacionados com os transtornos de ansiedade.

Vaillancort et al. (2013) ressaltaram que o *bullying* pode ser uma experiência que cause modificações no encéfalo da vítima, sendo que o CPFm pode estar envolvido. Um estudo longitudinal realizado por Casement et al. (2014) analisou meninas de 16 anos com histórico de *bullying* desde os 11 anos e observou, por meio da análise de neuroimagens funcionais, alterações no funcionamento do CPFm, como a diminuição da resposta de recompensa em determinadas tarefas. Dessa forma, é possível não só relacionar o estudo do presente trabalho com o contexto escolar, mas também traçar diálogos que nos permitam compreender a neurobiologia do estresse e ansiedade de indivíduos submetidos ao estresse social.

2.4 Ansiedade

A ansiedade é uma emoção subjetivamente desagradável, acompanhada de sensações de apreensão e insegurança e um conjunto de alterações comportamentais e somáticas (gastrointestinais, motoras, respiratórias, cardiovasculares e neurológicas) (NUTT, 1990). Evolutivamente, a ansiedade é uma emoção que garante a eficácia nos comportamentos relacionados à sobrevivência. No livro “A expressão das emoções no homem e nos animais”, Darwin afirmou que o homem, por possuir ancestrais em comum com os outros seres vivos, compartilha de um repertório de comportamentos emocionais semelhantes (DARWIN, 1872 apud VICENTE, 2009). Esse princípio postulado por Darwin, junto a estudos comportamentais de ansiedade em outros vertebrados, demonstra similaridades nas estruturas neurais ativadas (i.e. amígdala, matéria cinzenta periaquedutal) frente a situações de perigo e nas reações de defesa (DAVIS, 1992; VIANNA, 2001). Nesse sentido, a ansiedade possui origem nas reações de defesa que os animais exibem para se proteger de alguma situação aversiva. Isso nos permite utilizar outras espécies como ferramenta de estudo das reações de defesa humanas (BRANDÃO et al., 2003; LEDOUX, 1995).

Embora seja uma resposta adaptativa, a ansiedade pode se tornar prejudicial e patológica quando é intensa, exacerbada, persistente e desproporcional em situações inócuas. Caso as respostas relacionadas à ansiedade não se privem a apenas um episódio, mas sejam recorrentes na vida do indivíduo, prejudicando o seu cotidiano, podem categorizar clinicamente um transtorno mental relacionado à ansiedade (DALGALARRONDO, 2008). Os transtornos de ansiedade foram agrupados no último Manual Diagnóstico e Estatístico de Doenças Mentais, DSM-V (do inglês, *Diagnostic Statistical Manual of Mental Disorders*) como: transtorno de ansiedade de separação, mutismo seletivo, fobias específicas, transtorno de ansiedade social, transtorno do pânico, agorafobia, transtorno de ansiedade generalizada, transtorno de ansiedade devido a uma condição médica geral, outros transtornos de ansiedade especificados e transtornos de ansiedade não-especificados (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

De acordo com Steel et al. (2014), os transtornos de ansiedade são os mais prevalentes na população, afetando 1 em cada 15 pessoas, anualmente. Segundo a Organização Mundial da Saúde, a prevalência mundial dos transtornos é de 3,6%, sendo que o Brasil é um dos países com maior número de pessoas que sofrem com esses transtornos, mais de 18 milhões de pessoas, cerca de 9,3% da população, média que é 3 vezes superior ao percentual mundial (WHO, 2017), demonstrando a importância de estudos sobre esse transtorno. Devido a elevada

prevalência no Brasil e no mundo, torna-se importante investigar os mecanismos neurobiológicos envolvidos nas respostas e nos transtornos relacionados a ansiedade para auxiliar na produção de novos fármacos e tratamentos (GRAEFF; GUIMARÃES, 2012)

No livro “Neuropsychology of anxiety”, Gray e McNaughton (2000) buscaram sistematizar algumas estruturas que estão envolvidas nas reações de defesa. Estruturalmente, os autores destacaram três sistemas envolvidos nas respostas ansiogênicas, o sistema de fuga, luta ou congelamento (SFLC), composto pelo CPFm, amígdala e matéria cinzenta periaqueductal; o sistema de aproximação comportamental (SAC), constituído pelo CPFm, núcleo *accumbens* e estriado ventral; e o terceiro, sistema de inibição comportamental (SIC) formado pelo hipocampo (McNAUGHTON; CORR, 2004). Resumidamente, o SFLC resalta estímulos de punição ou a ausência de recompensa inatos ou condicionados (falta de reforçadores essenciais para a sobrevivência: água, alimento ou parceiro sexual) e leva o animal ao comportamento de fuga ou esquiva. A presença de estímulos reforçadores, inatos ou condicionados, ou a ausência de punição são identificadas pelo SAC, encarregado de levar o animal à aproximação de fontes de demanda biológica (McNAUGHTON; CORR, 2014; 2018). No entanto, quando um determinado estímulo apresenta natureza que ativa ambos sistemas e direciona tanto ao comportamento de esquiva quanto ao de aproximação, o SIC detecta esse conflito, aumentando o estado de vigilância e atenção, resultando no estado do tipo ansiedade e em comportamentos de avaliação de risco. O estado do tipo ansiedade gerada por esse conflito envolve a ativação da formação septo-hipocampo. McNaughton e Corr (2004) sugeriram que há uma hierarquia de estruturas que são recrutadas nas reações de defesa, sendo que reações de medo e mais intensas são eliciadas quando o estímulo de perigo está próximo, ativando estruturas mais caudais (como matéria cinzenta periaqueductal e hipotálamo medial), enquanto as estruturas mais rostrais (como córtex pré-frontal medial e amígdala) são mais ativadas quando a fonte de perigo está distante e conduzem aos comportamentos mais sutis de avaliação de risco e do tipo ansiedade (CARVALHO-NETO, 2009).

2.5 Labirinto em Cruz Elevado

A utilização de testes em animais para a investigação de doenças psiquiátricas e melhor entendimento das reações de defesa é essencial para desvendar os mecanismos neurais envolvidos na neurobiologia da ansiedade (RODGERS, 1997). Os testes etologicamente fundamentados baseiam-se na aversão inata do animal diante da exposição a situações hostis sem que haja punição (i.e., choque nas patas, restrição de água ou alimento, exposição ao frio,

calor ou dor) tornando-os mais naturalísticos, já que não necessitam de condicionamento (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005). Entre esses testes, o labirinto em cruz elevado (LCE) é amplamente utilizado para a compreensão dos comportamentos relacionados à ansiedade em roedores (LISTER, 1985). Inicialmente, o LCE foi descrito tendo ratos como sujeitos (PELLOW et al., 1985) e, mais tarde, em camundongos, por Lister (1985). O LCE tem sido utilizado para a avaliação do efeito de drogas ansiolíticas ou ansiogênicas e para o estudo dos mecanismos da neurobiologia da ansiedade (CRUZ; GRAEFF, 1994; RODGERS; COLE, 1994).

O LCE baseia-se num conflito, um impasse entre o comportamento exploratório do animal, de reconhecer o ambiente, e a aversão à locais abertos, relacionada à exposição a predadores ou inimigos naturais (MORATO, 2005; PELLOW et al., 1985). O aparato é composto de quatro braços, sendo dois fechados rodeados por paredes (áreas protegidas) e dois abertos, sem parede (áreas desprotegidas), unidos por uma plataforma central. Tradicionalmente, são analisados no LCE os índices do tipo ansiedade, mensurados pelas medidas espaço-temporais, i.e., pela esquivas dos braços abertos (porcentagens de entradas e tempo nos braços abertos), e também a atividade locomotora, medida pelo número de entradas nos braços fechados. Além disso, para complementar os dados obtidos a partir das medidas espaços-temporais, também podem ser analisadas outras medidas, como por exemplo, comportamentos de avaliação de risco (e.g. esticada ou *Stretched attend posture* e mergulho ou *Head-dipping*), exibidos pelos animais tanto nas áreas protegidas quanto desprotegidas (ESPEJO, 1997a; LISTER, 1987; RODGERS; JOHNSON, 1995). Essas medidas, embora denominadas complementares, são igualmente importantes para avaliar os índices do tipo ansiedade, uma vez que são mais sensíveis ao efeito de algumas drogas ansiolíticas ou ansiogênicas (CRUZ et al., 1997). De acordo com Espejo (1997a), as medidas complementares por si só não indicam a ansiogênese, mas juntas as complementares, reforçam a exibição de um fenótipo do tipo ansioso no LCE.

Diante desse contexto, a exploração no LCE pode recrutar estruturas relacionadas ao sistema cerebral de defesa ou inibição comportamental do encéfalo do animal, sendo fundamental para a compreensão dos mecanismos neurobiológicos subjacentes à ansiedade e ao medo (HANDLEY; MITHANI, 1984; PELLOW et al., 1985; LISTER, 1987; RODGERS; COLE, 1994).

2.6 Córtex pré-frontal medial

As respostas relacionadas à ansiedade são orquestradas por substratos neurais que podem estar envolvidos com o sistema límbico. O sistema límbico participa do controle das respostas emocionais (GODOY et al., 2018), e nele podemos destacar para o córtex pré-frontal medial (CPFm), estrutura límbica que tem sido amplamente investigada pelo nosso grupo de pesquisa no Laboratório de Neuropsicofarmacologia (e.g., MIGUEL et al., 2014; VILAR; 2014; COSTA et al, 2016; COSTA, 2017; CARDOSO, 2017) e objeto de estudo do presente trabalho. Essa estrutura está relacionada ao preparo das respostas emocionais aos eventos estressores (GOLD et al., 2015; MAREN; HOLMES, 2016). O CPFm é uma estrutura límbica bilateral, localizada no encéfalo rostral, que apresenta densas conexões recíprocas com outras estruturas, como amígdala, hipocampo, hipotálamo, núcleo dorsal da rafe, núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo e matéria cinzenta periaquedutal (EUSTON et al., 2012; GODOY et al., 2018), o que o permite modular estados emocionais positivos [ex., busca por situações recompensadoras (alimentos)] ou negativos, como medo e ansiedade (COURTIN et al., 2013; EUSTON et al., 2012; GOLD et al., 2015; TOVOTE et al., 2015).

Um estudo de neuroimagem por ressonância magnética funcional em pacientes com um histórico saudável (i.e., sem doenças psiquiátricas) demonstrou a ativação bilateral do CPFm durante um episódio de estresse agudo, evidenciando sinais de “flexibilidade neural” no CPFm diante do enfrentamento ativo a um evento aversivo (*coping*), enquanto a baixa atividade dessa região poderia ser preditiva aos comportamentos mal adaptativos (SINHA et al., 2016). Uma vez que está envolvido no controle de respostas adaptativas aos eventos estressores, o CPFm também é uma estrutura candidata no desenvolvimento da resiliência (COSTA, 2017).

Outro estudo com tomografia por emissão de pósitron demonstrou ativação de regiões do CPFm durante a antecipação de um fenômeno aversivo (i.e., ansiedade) em pacientes que eram avisados que receberiam diversos choques, com duração de 10 segundos, nos dedos (SIMPSON-JR, 2001). Além disso, o CPFm ainda possui atuação na memória (EUSTON et al., 2012), tomada de decisão (BECHARA e DAMASIO, 2002), funções cognitivas (YUAN; RAZ, 2014), interação social e processamento emocional (DAMASIO, 2000), resposta ao estresse e comportamento adaptativo (EUSTON et al., 2012).

O CPFm possui papel relevante na resposta aos estímulos estressores. Essa estrutura límbica pode ser recrutada quando o animal é confrontado a estímulos estressores, como a derrota social, levando ao aumento de respostas defensivas imediatas no LCE (COSTA et al., 2016). Entretanto, sabe-se que no estresse, o CPFm atua não só nas respostas comportamentais,

mas também nas neuroendócrinas e autonômicas (SULLIVAN; GRATON, 1999). Em 1985, Feldman e Conforti observaram que a estimulação elétrica bilateral de determinadas regiões do córtex pré-frontal eleva a produção de corticosterona. Sullivan e Gratton (1999) demonstraram que lesões bilaterais ou no CPFmD em ratos diminuem o pico de corticosterona induzida pelo estresse de restrição.

Estudos a partir de lesões do CPFm de camundongos demonstraram aumento nas reações de defesa e diminuição na interação social (GONZALEZ et al., 2000; LACROIX et al., 2000), sugerindo que o CPFm esteja envolvido na mediação das respostas do tipo ansiedade. O CPFm está subdividido em três porções: córtex cingulado anterior 1 (Cg1), córtex pré-límbico (PrL) e córtex infralímbico (IL) (McKLEVEEN et al., 2015; PAXINOS; FRANKLIN, 2001) que atuam diferentemente no estresse (RADLEY et al., 2006; JONES et al., 2011; SUZUKI et al., 2016). Sullivan e Gratton (2002) sugerem que lesões em regiões dorsais (PrL) causam efeitos ansiogênicos, enquanto o efeito ansiolítico surge apenas em caso de lesões ventrais (IL).

Entretanto, a função do CPFm na resiliência pode ser prejudicada quando animais são submetidos ao estresse crônico (LEE et al., 2015). O estresse contínuo leva à diminuição dos contatos sinápticos entre o CPFm e outras estruturas límbicas (DIORO et al., 1993; CERQUEIRA et al., 2008), um prejuízo que tem sido associado à potencialização da expressão das reações de defesa em roedores (BLANCHARD et al., 1998). De acordo com Lee et al. (2015), disfunções no CPFm relacionadas ao estresse podem reduzir a resiliência do organismo e levar ao desenvolvimento de transtornos de humor e ansiedade. Assim, o estresse crônico de derrota social é uma condição preponderante para o estabelecimento de mal adaptações relacionadas ao estresse e a atividade do CPFm parece estar envolvida nesse processo (CERQUEIRA et al., 2008; ELIOT et al., 2016; KRISHNAM et al., 2007)

Contudo, no que tange essa modulação das respostas ao estresse, há evidências sugestivas de um papel diferenciado entre os dois hemisférios do CPFm, no qual o hemisfério esquerdo (CPFmE) exerceria um papel inibitório sobre as respostas emocionais negativas relacionadas ao estresse, que seriam dependentes da ativação do hemisfério direito (CPFmD, CERQUEIRA et al., 2008).

Nessa mesma perspectiva, Costa et al. (2016) mostraram que a inibição do CPFmE e CPFmD, separadamente, provocada com injeção local de cloreto de cobalto (CoCl₂), um inibidor sináptico inespecífico, induziu ansiogênese e ansiólise, respectivamente, em animais expostos ao LCE. Esses resultados corroboram evidências sugestivas de que o CPFmE e o CPFmD atuam diferentemente na modulação de respostas do tipo ansiedade (e.g., CERQUEIRA et al., 2008, LEE et al., 2015, SULLIVAN; GRATON, 1999), e indicam que a

lateralidade funcional desta estrutura deve ser levada em conta nos estudos que buscam investigar seu papel na neurobiologia da ansiedade. Costa et al. (2016) sugerem que o CPFmE module o CPFmD e que a ativação deste resultaria na resposta ansiogênicas observada durante a exposição dos animais ao LCE.

Costa et al. (2016) também mostraram que o CPFmE exerce um papel modulador sobre os efeitos ansiogênicos desencadeados pelo estresse da derrota social (EDS) entre camundongos. Sucintamente, esses autores injetaram salina (controle) ou CoCl_2 no CPFmE de camundongos e, 10 minutos depois, os submeteram ao EDS agudo. Os animais derrotados foram, então, expostos ao LCE 24 horas após o EDS. Enquanto os animais controle apresentaram índices normais de exploração nos braços abertos do LCE, revelando uma recuperação (ou resiliência) do estresse sofrido, os camundongos que receberam CoCl_2 intra-CPFmE apresentaram porcentagens menores de entradas e de tempo na área mais aversiva do aparato, indicando um papel modulador do CPFmE nos efeitos ansiogênicos do EDS. Apesar da inibição química do CPFmE ter levado à recrudescência dos efeitos ansiogênicos, registrados 24 horas após o EDS, não se sabe se este efeito se estende por mais tempo. A perenidade dos efeitos da inibição do CPFmE na modulação da ansiedade induzida pelo EDS pode ter importantes implicações no papel desta estrutura límbica na modulação de estados emocionais e do humor (e.g., ansiedade, depressão).

Portanto, torna-se relevante investigar o papel do CPFmE na resiliência ao estresse e por quanto tempo esse efeito ansiogênico perdura, pois caso sua duração se estenda por mais tempo, a inibição do CPFmE antes da derrota social poderia mimetizar os efeitos de um protocolo de estresse crônico, com efeito ansiogênico observado por mais de 24 horas após um único evento aversivo agudo, uma vez que a literatura apresenta apenas o aumento dos índices de ansiedade a longo prazo em situações de estresse crônico (ELIOT et al., 2016; KRISHNAN et al., 2007; MACEDO et al., 2018). Do ponto de vista prático e ético, esse protocolo pode agilizar a obtenção de animais com perfil ansiogênico semelhante aos de animais submetidos ao estresse crônico (a partir de um estresse agudo), porém, por terem sido submetidos a menos episódios de estresse, estariam menos propensos a lesões corporais e/ou sofrimento em geral.

Além disso, ainda não se sabe o papel do CPFmD no estabelecimento desse efeito ansiogênico prolongado, sendo importante investigar a participação de ambos hemisférios do CPFm nesses animais.

Para se estudar o papel de uma estrutura ou sub-região específicas do sistema nervoso central nas respostas defensivas, diversos trabalhos na literatura utilizaram lesões eletrolíticas (JOEL et al., 1997; DE OCA et al., 1998; VIANNA, 2001; SULLIVAN; GRATTON, 1999) e

citotóxicas (SWERDLOW et al., 1984; DEACON et al., 2003; SULLIVAN; GRATTON, 2002) como ferramentas. Entretanto, esses procedimentos geram alterações permanentes no encéfalo e nos comportamentos associados. Com o intuito de evitar esse problema, o cloreto de cobalto (CoCl_2) vem sendo utilizado com o objetivo de investigar o papel de estruturas do sistema nervoso em algumas respostas emocionais e fisiológicas sem causar danos teciduais (COSTA et al. 2016; CRESTANI et al., 2009; SCOPINHO et al., 2010; TAVARES; CORRÊA, 2006). O CoCl_2 é um inativador sináptico reversível que reduz o influxo de cálcio através da competição do íon bivalente Co^{2+} com o cálcio (Ca^{2+}), limitando a transmissão da informação entre neurônios (KRETZ, 1984).

No entanto, por ser uma ferramenta farmacológica inespecífica (KRETZ, 1984), os resultados obtidos a partir dessa substância química não elucidam completamente a neuroquímica envolvida na mediação da ansiedade, mas ampliam os horizontes para a investigação de diferentes sistemas de neurotransmissão específicos no CPFm que estejam relacionados a esse processo.

Entre os candidatos a neurotransmissão relacionadas aos comportamentos do tipo ansioso no CPFm, podemos destacar o glutamato. Segundo McKlveen et al. (2015), cerca de 80 a 90% do CPFm é composto por neurônios piramidais glutamatérgicos e o restante composto por interneurônios que liberam parvalbumina, colecistocinina, polipeptídeo intestinal vasoativo, calretina, calbidina e somatostatina. Sabe-se que há grande liberação de glutamato no PrL e IL após a ativação de seus neurônios por veratrina (fármaco ativador de canais de sódio), capaz de reproduzir comportamentos do tipo ansioso em camundongos expostos ao campo aberto (SAITOH et al. 2014; SUZUKI et al., 2016). Já o bloqueio dos canais de sódio nos neurônios pré-sinápticos por lamotrigina no PrL foi capaz de impedir a liberação de glutamato induzida por veratrina (SAITOH et al, 2014). Além disso, tanto o estresse agudo quanto o crônico aumentam os níveis extracelulares de glutamato e a ativação de neurônios glutamatérgicos (MUSAZZI et al., 2010; McKLVEEN et al., 2015). No CPFm, há receptores de glutamato do tipo NMDA, AMPA (α -amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico) e cainato, sendo que os receptores do tipo NMDA participam majoritariamente do estresse.

Nesse sentido, estudos recentes do nosso grupo (Costa et al., 2016), realizados em camundongos expostos ao labirinto em cruz elevado (LCE), evidenciaram que a facilitação nitrérgica do CPFm direito (CPFmD), desencadeada pela injeção local de NOC-9 [6-(2-hidroxi-1-metil-2-nitrosodiazino)-N-metil-1-hexanamina], um doador de óxido nítrico (NO), foi capaz de diminuir a exploração dos braços abertos, produzindo um efeito ansiogênico. A mesma

manipulação farmacológica realizada no CPFm esquerdo (CPFmE) ou bilateralmente, não alterou tal resposta comportamental. Ainda, aprofundando-se na investigação da neurotransmissão glutamatérgica, via receptores NMDA (N-metil-D-aspartato), nas respostas ansiogênicas, camundongos *naive* receberam microinjeções em diferentes doses (0,05; 0,1 e 0,2 nmol) do antagonista AP7 (ácido 2-amino-7-fosfo-heptanóico) no CPFmD e apresentaram perfil ansiolítico na dose de 0,1 nmol no LCE, enquanto a dose de 0,05 nmol não apresentou efeito significativo. Além disso, em outro experimento, foi demonstrado que a injeção de AP7 (na dose de 0,05 nmol) no CPFmD impediu a ansiogênese induzida por NOC-9 no mesmo hemisfério, sugerindo que a neurotransmissão glutamatérgica tenha importante papel na mediação das respostas relacionadas a ansiedade no LCE (COSTA, 2017).

A partir dessas evidências, a nossa hipótese é de que os animais estressados e com o CPFmE inativado expressem níveis aumentados de ansiedade por mais tempo, mesmo se expostos ao LCE após 24 horas. Nossa hipótese também estima ser a atividade glutamatérgica em receptores NMDA localizados no CPFmD importante para os efeitos ansiogênicos duradouros da combinação EDS e inibição do CPFmE.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar por quanto tempo perdura o efeito ansiogênico em animais derrotados socialmente sob inibição do CPFmE, bem como avaliar o papel do CPFmD na mediação desse aumento das respostas defensivas.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Analisar os níveis de respostas do tipo ansiedade de camundongos expostos ao LCE dois, cinco ou dez dias após serem submetidos a combinação “derrota social e inativação do CPFmE”.

- b) Avaliar os efeitos do bloqueio de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA do CPFmD, através da injeção local do antagonista seletivo AP7, sobre as respostas do tipo ansiedade de camundongos expostos ao LCE dois dias após a combinação “derrota social e inibição do CPFmE”.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Sujeitos

Cento e vinte camundongos Suíços machos (Biotério de Botucatu, Universidade Estadual Paulista), pesando entre 25 a 35 g, foram utilizados nesse estudo. Os animais foram alojados em caixas de polipropileno (28,5 × 19,5 × 12 cm) com capacidade máxima de 5 indivíduos por caixa. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura (23 ± 1°C) e luz (ciclo de 12/12 horas com luzes acesas às 07:00) e com livre acesso ao alimento e à água, exceto durante os curtos períodos de teste. Os experimentos deste projeto foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP Araraquara), sob protocolo UNESP/CAr 41/2016.

4.2 Cirurgia Estereotáxica

Os animais receberam anestesia intraperitoneal com associação de anestésico (cetamina, 80 mg/Kg) e relaxante muscular (Xilazina, 8 mg/Kg) e então foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implante intracraniano de uma cânula-guia (26 gauge - aço inoxidável) de 7,0 mm de comprimento) no córtex pré-frontal medial esquerdo (CPFmE) ou direito (CPFmD), de acordo com as coordenadas do Atlas Paxinos e Franklin (2001). As coordenadas utilizadas foram: +1,7 mm anterior e ±0,3 mm lateral (hemisfério esquerdo ou direito) ao bregma e 1,8 mm ventral à superfície do crânio. A cânula foi fixada no crânio com cimento acrílico. Um mandril (33 gauge, aço inoxidável, 7,0 mm de comprimento, Fishtex Industry and Commerce of Plastics Ltd.) foi inserido na cânula para impedir a sua obstrução. No final da cirurgia, os animais receberam injeção subcutânea de anti-inflamatório analgésico (Banamine, 3,5 mg/kg, flunixin meglumina, Intervet Schering-Plough, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, na dose de 0,1mL/10g) e injeção intramuscular de penicilina-G benzatina (Pentabiótico, 56,7 mg/Kg no volume de 0,1 mL, Fort Dodge, Campinas, SP, Brasil).

4.3 Fármacos

Para os Experimentos 1 e 2, foi utilizado CoCl₂ (1 mM, Sigma, St Louis, MO, USA), inibidor inespecífico da atividade sináptica, diluído em salina 0,9%; e apenas para o Experimento 2, AP7 (ácido 2-amino-7-fosfo-heptanóico) (Tocris, Cookson, Ballwin, MO,

USA), antagonista de receptores NMDA, na dose de 0,05 nmol/0,2 μ L. As doses foram baseadas em estudos anteriores (COSTA, 2014; FARIA et al., 2016; MIGUEL et al., 2014).

4.4 Microinjeção

Foi feita injeção de 0,2 μ L de CoCl_2 , AP7 ou salina (controle) no CPFmE ou CPFmD de camundongos cinco a sete dias após a estereotaxia por meio da inserção de uma agulha (33 gauge) de 8,0 mm de comprimento no interior da cânula guia, conectada, por meio de um tubo de polietileno (PE-10), a uma microsseringa (Modelo 7001 KH 2 μ L, 25GA, Hamilton Company). A injeção foi realizada manualmente no período de 30 segundos e a agulha permaneceu acoplada a cânula por mais 30 segundos para garantir o escoamento do fármaco. Dez minutos após o procedimento de microinjeção, os animais foram submetidos ao EDS ou à interação não agressiva.

4.5 Escolha dos agressores

Após a chegada ao biotério local do Laboratório de Neuropsicofarmacologia, os animais foram alojados em caixas-moradia (ver item “4.1. Sujeitos”). No período de habituação sob as condições locais, foram identificados os camundongos dominantes de cada caixa (definido como o sujeito que exibe comportamentos espontaneamente agressivos em relação aos demais da gaiola), que foram isolados em caixas individuais com sistema próprio de ventilação (28 x 17 x 12 cm) por, no mínimo, 4 semanas, para intensificação do comportamento agressivo (VALZELLI, 1981). Nesse caso, o isolamento social é um fator de estresse preponderante para garantir que o animal confronte fisicamente o intruso

4.6. Estresse de derrota social

Há diversos protocolos de EDS realizados em várias linhagens de roedores (HAMMELS et al, 2015; NAKAYASU; KATO, 2011). Nesse trabalho, utilizamos o protocolo proposto por Miczek et al (1982), em que há um confronto em que o intruso permanece na caixa do agressor residente por 5 minutos ou até exibir a postura de submissão. A derrota social é observada quando o animal agredido exibe a postura de submissão (i.e., elevação do corpo sobre as patas traseiras, patas dianteiras estendidas em direção ao agressor, cabeça retraída e orelhas arqueadas durante pelo menos 3 segundos; MICZEK et al., 1982). A derrota social consiste em 4 fases: reconhecimento do intruso, agressão física e postura de submissão por 3 segundos, que destaca

a submissão do intruso em detrimento do residente, e reconhecimento da derrota. No caso da interação não-aversiva, o intruso é colocado numa caixa de mesma dimensão com outro coespecífico, de comportamento não-agressivo, que já conviviam antes do início do experimento. No presente estudo, o intruso permaneceu em interação com o coespecífico durante 5 minutos (sem que houvesse agressão) e foi devolvido a sua caixa moradia após transcorrido o tempo total.

4.7. Labirinto em Cruz elevado e Análise Comportamental

O labirinto cruz elevado (LCE) é um aparato de madeira que fica a 38,5 cm do chão, e possui 4 braços ortogonais (30 x 5 x 0,25 cm) conectados por uma área central (5 x 5 cm), sendo que dois deles representam áreas protegidas, com paredes de vidro transparentes (braços fechados - BF) e dois braços com áreas desprotegidas, i.e. sem paredes perpendiculares a superfície (braços abertos - BA). No dia do teste, os animais foram separados de suas caixas-moradia e transportados até o LCE (numa sala isolada, localizada ao lado da sala experimental). No início do experimento, os animais foram individualmente posicionados na plataforma central, com a cabeça voltada para um dos braços abertos. Em seguida, o experimentador retirava-se para uma sala adjacente. A duração do teste foi de 5 minutos por animal. Cada teste foi registrado por câmera e os vídeos salvos em cartão de memória SD. O aparato era limpo com álcool 20% entre as sessões. Os testes foram realizados sob iluminação reduzida (lâmpada 60 W incandescente amarela, posicionada a 1,80 m da superfície do LCE). Os comportamentos foram analisados através do *software* “X-Plo-Rat 2005”, desenvolvido pelo grupo do Professor Doutor Silvio Morato, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP, Brasil (Disponível em <http://scotty.ffclrp.usp.br/X-Plo-Rat.html>). Os comportamentos defensivos analisados foram os parâmetros convencionais de ansiedade (medidas espaço-temporais): número de entradas nos braços abertos (EBA) e fechados (EBF) (denominada pelo cruzamento de todas as patas do animal em um dos braços) e tempo gasto nos braços abertos (RODGERS; JOHNSON, 1995). Esses dados foram utilizados para o cálculo da porcentagem relacionada a entrada nos braços abertos (%EBA, número de entradas nos braços abertos/número total de entradas x 100) e tempo despendido nos braços abertos [%TBA, (tempo, em segundos, gasto nesse compartimento/300) x 100]. Para o número de entradas nos braços fechados, foram utilizados números absolutos. Além das medidas espaço-temporais, foram avaliadas as medidas complementares relacionadas a ansiedade (ESPEJO, 1997a, RODGERS; JOHNSON, 1995), tais como:

- a) esticar - *Stretched attend posture (SAP)*, movimento de avaliação de risco característico por manter as patas posteriores fixas, esticar o corpo e retrá-lo de volta à posição original, nos compartimentos protegidos, ou seja, nos braços fechados e área central (SAPp) e desprotegidos, nos braços abertos (SAPd);
- b) mergulho - *Head-dipping (HD)*: Movimento exploratório da cabeça/ombros em direção ao solo; esse comportamento pode ser diferenciado em protegido (HDp), quando ocorrer em compartimentos seguros (i.e. área central) ou desprotegido (HDd) se for realizado nos braços abertos.

De acordo com Espejo (1997a; 1997b), o aumento do número de entradas nos braços abertos e de HDd, acompanhados da diminuição de SAPp e HDp são variáveis que indicam diretamente o aumento da ansiólise. Já as entradas nos braços fechados e levantamentos estão relacionadas com a atividade locomotora. Ainda, o aumento de SAPp e o retorno aos braços fechados se relacionam com ao conflito aproximação-esquiva, medidas indiretamente correlacionadas com a ansiedade.

4.7. Procedimentos Gerais

4.7.1 Experimento 1 – Avaliação comportamental de camundongos expostos ao labirinto em cruz elevado 2, 5 ou 10 dias após serem tratados com microinjeção intra-CPFmE de CoCl_2 ou salina e submetidos à interação social agressiva (derrota social) ou não agressiva (controle).

Dez minutos após a microinjeção (0,2 μL) de salina ou CoCl_2 no CPFmE, os animais foram expostos ao estresse de derrota social ou interação não agressiva. Em seguida, retornaram para suas caixas-moradia por 2, 5 ou 10 dias, quando, então, foram expostos ao LCE para avaliação dos comportamentos relacionados à ansiedade (índices clássicos: %EBA, %TBA; medidas complementares: SAPp SAPd, HDp e HDd) e locomoção por 5 minutos. Os grupos foram formados de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1 - Grupos amostrais analisados do experimento 1

Condição	Tratamento	Tempo (dias)	N
Sem estresse	Salina	2	12
Sem estresse	CoCl ₂	2	15
Com estresse	Salina	2	9
Com estresse	CoCl ₂	2	9
Sem estresse	Salina	5	9
Sem estresse	CoCl ₂	5	10
Com estresse	Salina	5	9
Com estresse	CoCl ₂	5	10
Sem estresse	Salina	10	12
Sem estresse	CoCl ₂	10	9
Com estresse	Salina	10	9
Com estresse	CoCl ₂	10	9

4.7.2 Experimento 2 - Avaliação do bloqueio dos receptores NMDA do CPFmD nos comportamentos defensivos de camundongos expostos ao LCE 2 dias após a inativação do CPFmE por CoCl₂ e submetidos ao EDS.

Dez minutos após a microinjeção (0,2 µL) de salina ou CoCl₂ no CPFmE, todos os animais foram submetidos ao estresse de derrota social e, então, retornaram a suas caixas-moradia. Dois dias após, os animais receberam microinjeção intra-CPFmD de salina ou AP7 (0,05 nmol/0,2 µL; dose desprovida de efeitos intrínsecos sobre as respostas do tipo ansiedade) e, então, foram expostos ao LCE para avaliação dos comportamentos relacionados à ansiedade (índices clássicos: %EBA, %TBA; medidas complementares: SAPp SAPd, HDp e HDd) e locomoção durante 5 minutos. Os grupos foram formados conforme a tabela 2.

Tabela 2 - Grupos amostrais analisados do experimento 2

Manipulação intra-CPFmE	Manipulação intra-CPFmD	N
Salina	Salina	10
Salina	AP7	10
CoCl ₂	Salina	9
CoCl ₂	AP7	10

4.8 Análise histológica

Ao final do teste, os animais receberam microinjeção intra-CPFmE (Experimento 1) ou bilateral (Experimento 2) de 0,2 µL do corante azul de Evans a 1%, seguindo o mesmo procedimento realizado para microinjeção do fármaco. Em seguida, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂, seus encéfalos retirados e armazenados em solução de formalina a 10%, a 4°C por pelo menos 48 horas. Os encéfalos foram cortados em secções coronais (50 µm) para observação do trajeto da cânula e a marcação do corante com auxílio de criostato (LEICA CM 1850). As secções foram verificadas com o uso de uma lupa (LEICA DM LB) e a visualização da dispersão do corante confirmava o local da injeção. Baseados em resultados anteriores do laboratório (COSTA et al., 2016; COSTA, 2017) e outros trabalhos (LEE et al., 2015; SULLIVAN; GRATTON, 1999; SUZUKI et al., 2016), foram considerados positivos apenas os animais com marcação nas regiões do córtex cingulado (Cg1) e pré-límbico (PrL) no hemisfério esquerdo e direito. Os outros animais que receberam microinjeção em outra região foram excluídos do estudo.

4.9 Análise estatística

As análises foram feitas através do software Statistica®. Todos os resultados foram inicialmente submetidos ao teste de homogeneidade de variância de Levene. No experimento 1, os dados, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de três fatores, sendo o fator 1

– Condição: Estresse ou sem estresse; o fator 2 – Tratamento: Salina ou CoCl_2 e o Fator 3 – Tempo: 2, 5 ou 10 dias.

No experimento 2, os resultados foram submetidos a ANOVA de dois fatores, sendo o fator 1 – Manipulação no intra-CPFmE e o fator 2 - Manipulação no intra-CPFmD. Em seguida, foi realizado um teste *post hoc* de Duncan para todos os dados. Foram considerados significativos os valores de $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Experimento 1: Ansiogênese aumentada em camundongos expostos ao LCE 2, 5 ou 10 dias após a combinação “inativação do CPFmE + derrota social”.

5.1.1 Injeções no CPFmE

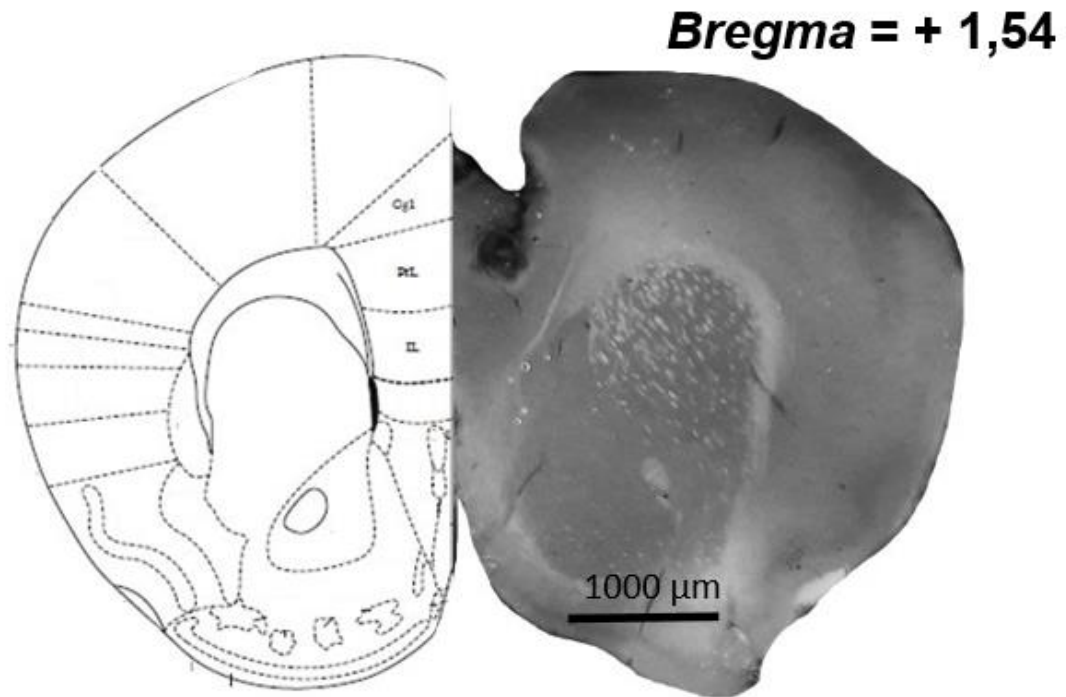


Figura. 1. Diagrama esquemático (esquerda) e fotomicrográfico (direita) de um sítio de microinjeção representativo no CPFm esquerdo de camundongo. A secção corresponde 1,54 mm anterior ao Bregma (PAXINOS; FRANKLIN, 2001). Foram consideradas positivas as injeções nas subregiões dorsais do CPFmE: Cg1 e PrL, conforme os últimos experimentos do laboratório (COSTA et al., 2016; COSTA, 2017).

5.1.2 Medidas espaço-temporais

A ANOVA trifatorial não apresentou quaisquer diferenças significativas nas medidas %EBA, %TBA e EBF dos animais não-estressados (Maior valor de $F_{(1,122)} = 2,15$; $p > 0,05$). Para os animais derrotados, o mesmo teste estatístico revelou diferenças significativas no fator tratamento para %EBA e %TBA [$F_{(1,122)} = 14,35$; $F_{(1,122)} = 9,60$; $p < 0,05$, respectivamente] e na interação dos fatores tratamento \times condição [(%EBA: $F_{(1,122)} = 6,88$; $p < 0,05$); (%TBA: $F_{(1,122)} = 9,12$; $p < 0,05$)]. O teste *post hoc* de Duncan revelou que a injeção de CoCl_2 intra-CPFmE reduziu %EBA e %TBA nos animais socialmente derrotados quando comparados aos

demais grupos (Figuras 2 e 3). Não foram observadas diferenças significativas em EBF nos animais derrotados socialmente (Maior valor de $F_{(1,122)} = 2,24$; $p > 0,05$; Figura 4).

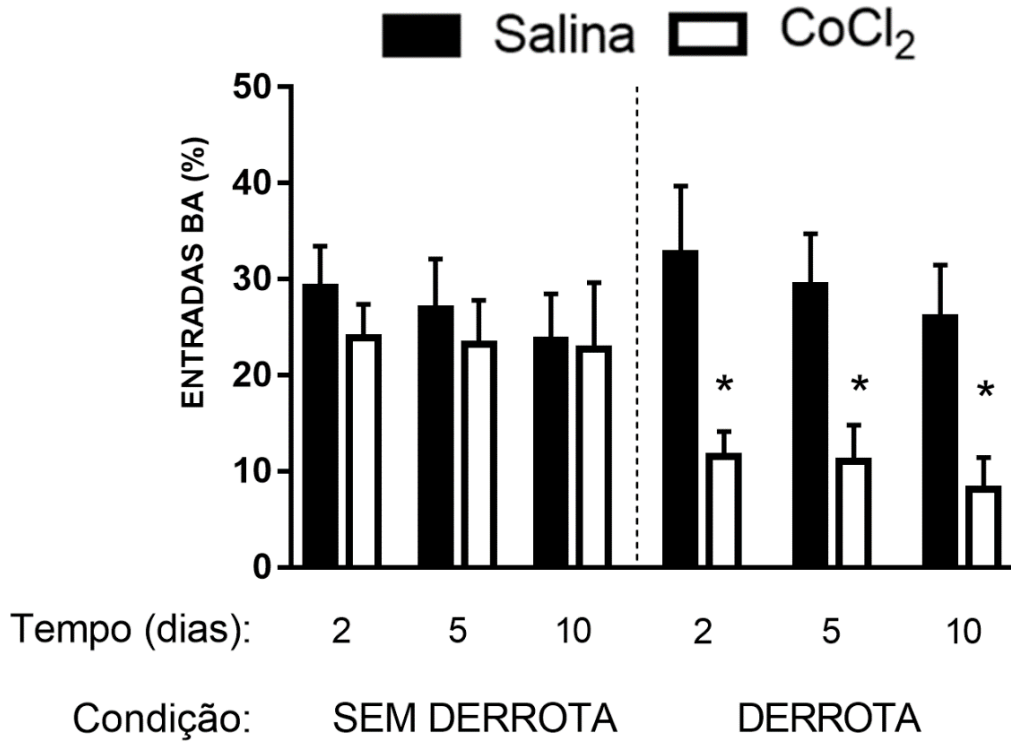


Figura 2 - Efeitos da microinjeção de CoCl₂ (1 mM) no CPFmE de camundongos, na porcentagem de entradas nos braços abertos (BA), 2, 5 e 10 dias após a interação não-agressiva ou derrota social. * $p < 0.05$ em comparação aos grupos salina.

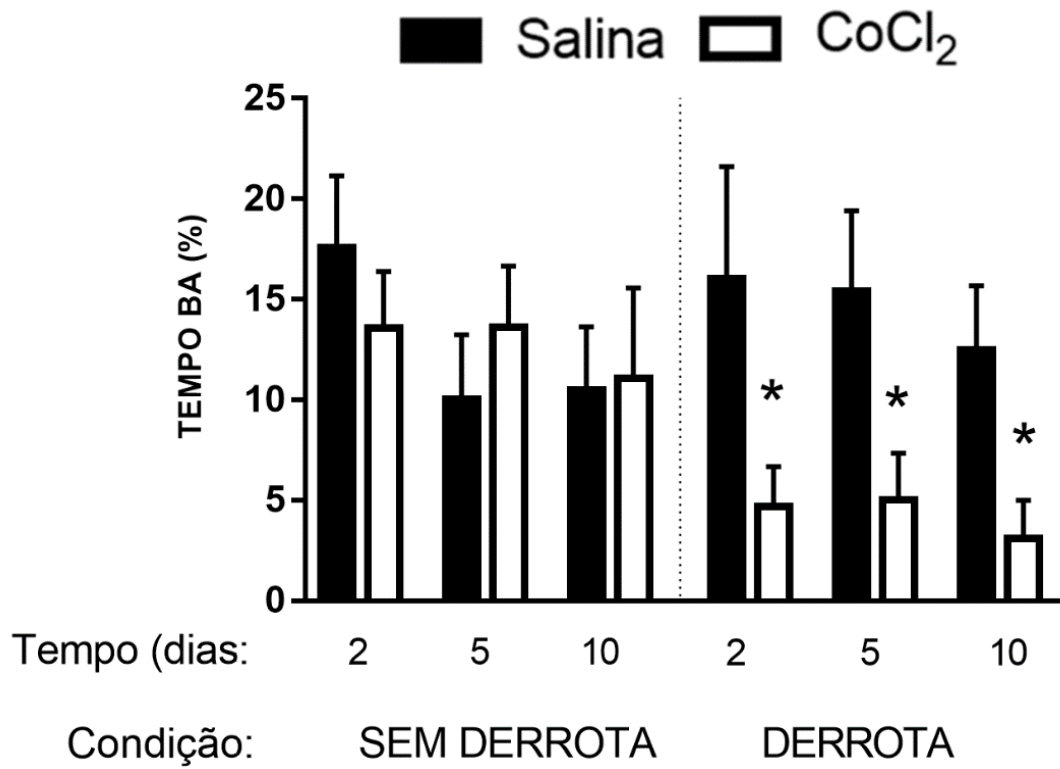


Figura 3 - Efeitos da microinjeção de CoCl₂ (1 mM) no CPFmE na porcentagem de tempo nos braços abertos (BA) em 2, 5 e 10 dias após a interação não-agressiva ou derrota social. *p<0.05 em comparação aos grupos salina.

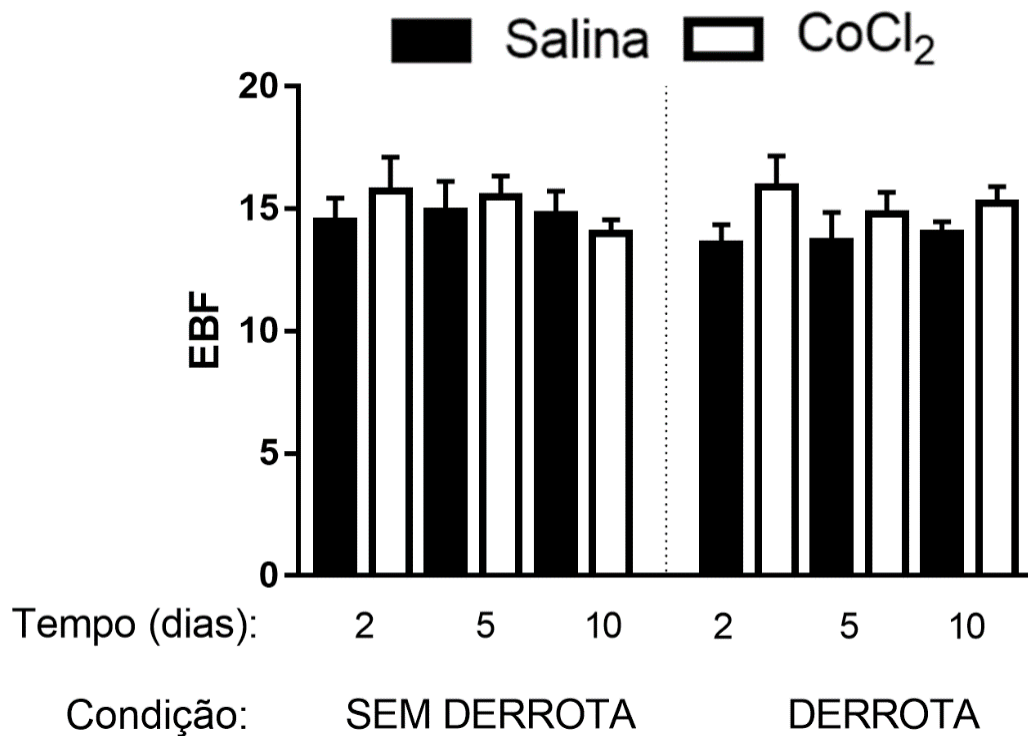


Figura 4 – Ausência de Efeitos da microinjeção de CoCl₂ (1 mM) no CPFmE de camundongos, na frequência de entradas nos braços fechados (EBF) em 2, 5 e 10 dias após a interação não-agressiva ou derrota social

4.1.3 Medidas complementares

A ANOVA trifatorial não apresentou diferenças significativas nas medidas complementares (i.e., SAPp, SAPd, HDp, HDd) nos animais não-estressados ($p > 0,05$). A ANOVA trifatorial revelou alterações significativas nas medidas de SAPp nos fatores tratamento [$F_{(1,122)} = 4,06$; $p < 0,05$] e condição [$F_{(1,122)} = 7,17$; $p < 0,05$]. O teste *post hoc* de Duncan demonstrou aumento significativo do SAPp apenas no grupo CoCl₂-estresse exposto ao LCE nos tempos de 2 e 5 dias (Figura 5) ($p < 0,05$), mas não em 10 dias. Ao analisar o SAPd, a ANOVA trifatorial mostrou efeito dos fatores condição [$F_{(1,222)} = 5,88$; $p < 0,05$], tempo [$F_{(1,222)} = 5,74$; $p < 0,05$] e tratamento [$F_{(1,122)} = 7,28$; $p < 0,05$], além da interação entre fatores condição \times tratamento [$F_{(1,122)} = 6,02$; $p < 0,05$]. Para esta medida complementar, o teste *post hoc* revelou uma tendência de diminuição em 2 dias ($p = 0,07$), e uma significativa redução no tempo de 5 dias dos animais derrotados que receberam microinjeção de CoCl₂ ($p < 0,05$; Figura 5B).

Não foram apontadas quaisquer diferenças significativas no HDp para nenhum grupo (Maior valor de $F_{(1,122)} = 2,11$; $p > 0,05$; Figura 5C). Por outro lado, o HDd, apresentou

diferenças significativas, a ANOVA revelou efeito nos fatores condição [$F_{(1,122)} = 4,08$; $p < 0,05$], tratamento [$F_{(1,122)} = 11,20$; $p < 0,05$], e na interação condição \times tratamento [$F_{(1,122)} = 8,48$; $p < 0,05$]. De acordo com o teste *post hoc* de Duncan, o grupo estresse-CoCl₂ realizou o HDd com menor frequência em todos os tempos (2, 5 e 10 dias) em relação aos outros grupos (Figura 5D).

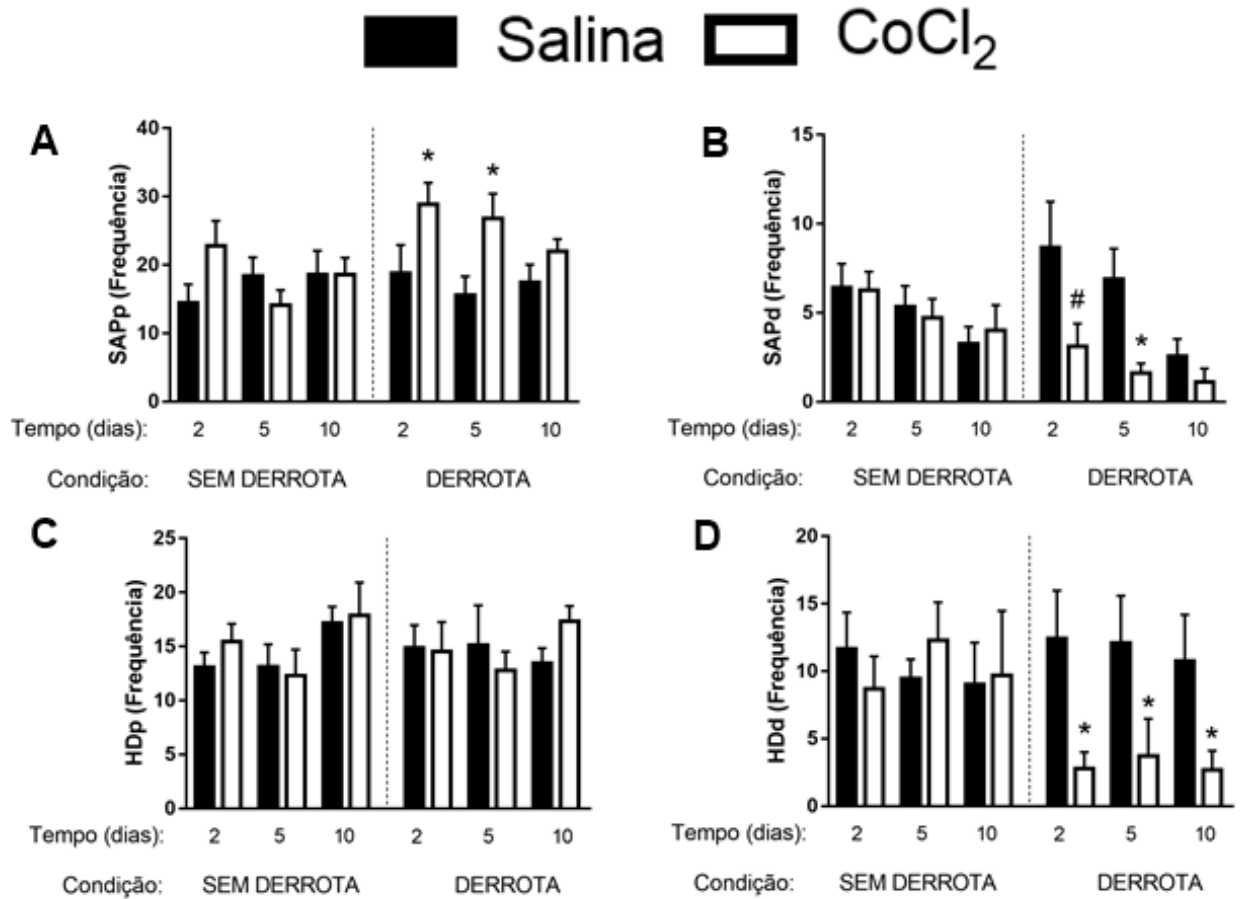


Figura 5 - Efeitos da microinjeção de CoCl₂ (1 mM) no CPFmE de camundongos na frequência das medidas complementares em 2, 5 e 10 dias após a interação não-agressiva ou derrota social. (A) Frequência de SAPp. (B) Frequência de SAPd. (C) Frequência de HDp. (D) Frequência de HDd. * $p < 0,05$ em comparação aos grupos salina. # $p = 0,07$ em relação ao grupo salina-derrota-2 dias.

5.2 Experimento 2: A ansiedade de camundongos expostos ao LCE dois dias após a combinação “inativação do CPFmE + EDS” é bloqueada pela injeção de AP7 no CPFmD.

5.2.1 Injeções Bilaterais no CPFm

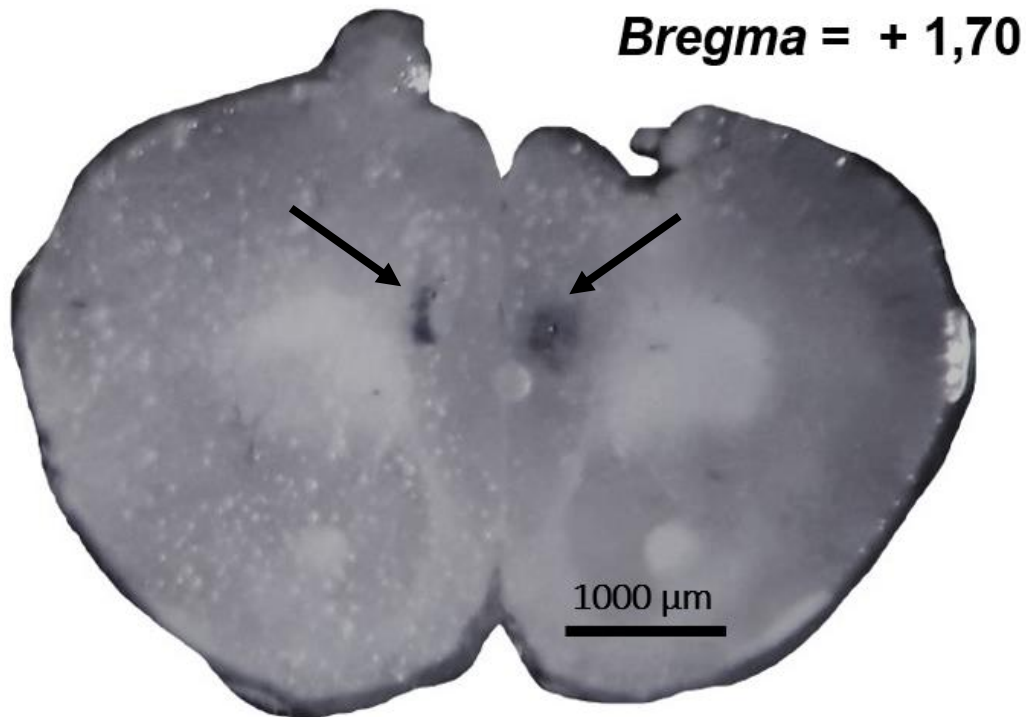


Figura 6 - Fotomicrografia representativa dos sítios (setas) de microinjeção no CPFm de camundongos (PAXINOS; FRANKLIN, 2001). Foram consideradas positivas as injeções nas sub-regiões dorsais do CPFm (bilateral): Cg1 e PrL, conforme os últimos experimentos do laboratório (COSTA et al., 2016; COSTA, 2017)

5.2.2 Medidas espaço-temporais

A ANOVA de dois fatores revelou diferenças significativas para %EBA nos fatores manipulação intra-CPFmE [$F_{(1,39)} = 7,44$; $p < 0,05$] e manipulação intra-CPFmD [$F_{(1,39)} = 6,52$; $p < 0,05$] e na interação entre eles [$F_{(1,39)} = 7,62$; $p < 0,05$]. O teste *post hoc* de Duncan revelou que a injeção de CoCl_2 intra-CPFmE e, logo após, a administração intra-CPFmD de AP7 aumentou a %EBA em comparação ao grupo CoCl_2 -salina (%EBA: $p < 0,05$; Figura 7). Nesse sentido, a análise estatística para %TBA demonstrou diferenças significativas nos fatores manipulação intra-CPFmE [$F_{(1,39)} = 5,14$; $p < 0,05$] e na interação entre ambos fatores,

manipulação intra-CPFmE e manipulação intra-CPFmD [$F_{(1,39)} = 8,12; p < 0,05$]. De modo semelhante à %EBA, o teste *post hoc* de Duncan para %TBA demonstrou que a microinjeção de AP7 no CPFmD dos animais que receberam previamente CoCl_2 no CPFmE elevou o tempo de exploração nos braços abertos desse grupo, em relação aos animais que receberam inicialmente CoCl_2 no CPFmE e, posteriormente, salina no CPFmD (%TBA: $p < 0.05$; Figura 7). O mesmo teste estatístico não apontou quaisquer diferenças significativas nas medidas de EBF em todos os grupos [$F_{(1,39)} = 0,04; p > 0,05$; Figura 8]. Somente apresentaram efeito as manipulações realizadas no CPFm (Cg1 e PrL), uma vez que os animais que receberam microinjeção em fora do sítio alvo (OUT) não demonstraram diferenças evidentes no comportamento.

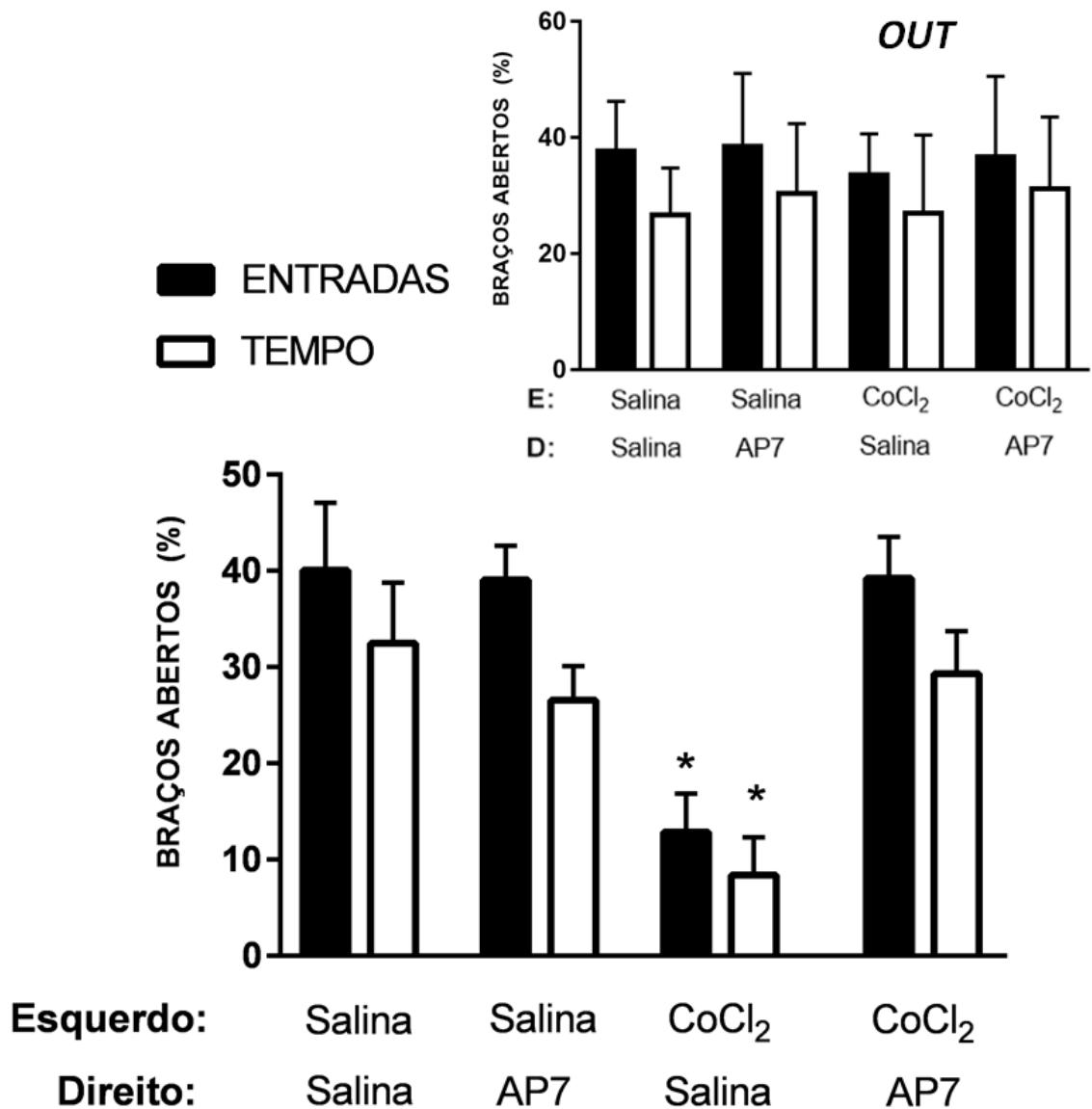


Figura 7 - Efeitos da microinjeção de salina ou CoCl₂ (1 mM) intra-CPFmE e, 48 horas depois, da administração de salina ou AP7 (0,05 nmol/0,2 μL) no intra-CPFmD de camundongos, 2 dias após o EDS, nas porcentagens de entradas e tempo nos braços abertos. *p<0.05 em comparação a todos os grupos. ACIMA: Grupos que receberam microinjeção intra-CPFmE e CPFmD fora do sítio de Cg1 e PrL (OUT)

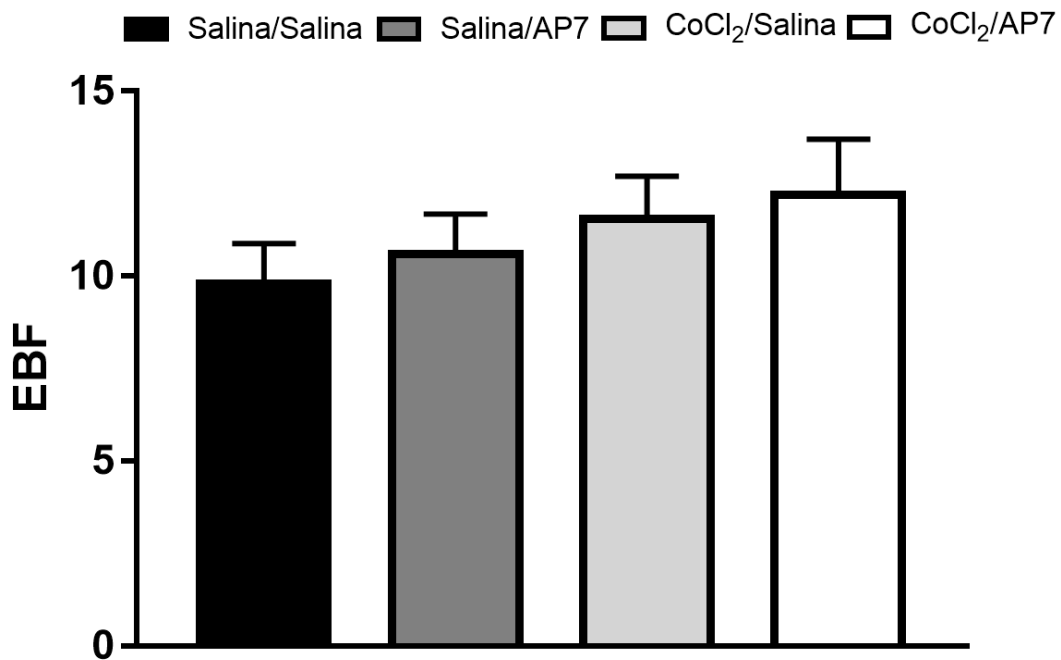


Figura 8 – Ausência de efeitos da microinjeção intra-CPFmE de salina ou CoCl₂ (1 mM) associada ao EDS e, 2 dias depois, da administração intra-CPFmD de salina ou AP7, no número de entradas nos braços fechados (EBF) de camundongos expostos ao LCE

5.2.3 Medidas complementares

A ANOVA bifatorial não revelou alterações significativas nas medidas de SAPp (Maior valor de $F_{(1,39)} = 3,01$; $p > 0,05$). No entanto, o teste *post hoc* de Duncan mostrou aumento significativo do SAPp no LCE apenas no grupo CoCl₂-salina, se comparado ao grupo salina-salina (Figura 9A; $p < 0,05$), e uma tendência se comparado aos grupos salina-AP7 (Figura 9A; $p = 0,09$) e CoCl₂-AP7 ($p = 0,08$). A análise do SAPd mostrou efeito do fator CPFmE [$F_{(1,39)} = 5,49$; $p < 0,05$]. Para essa medida complementar, o teste *post hoc* revelou uma diminuição significativa nos animais do grupo CoCl₂-salina em relação aos demais grupos ($p < 0,05$; Figura 9B).

Não foram observadas quaisquer diferenças significativas no HDp para nenhum grupo (Maior valor de $F_{(1,39)} = 2,75$; $p > 0,05$; Figura 5C). Em contrapartida, o HDd apresentou diferenças significativas, a ANOVA bifatorial revelou efeito nos fatores manipulação do CPFmE [$F_{(1,39)} = 10,16$; $p < 0,05$], manipulação do CPFmD [$F_{(1,39)} = 14,34$; $p < 0,05$], e na interação CPFmE \times CPFmD [$F_{(1,39)} = 13,86$; $p < 0,05$]. Segundo o teste *post hoc* de Duncan, o

grupo CoCl₂-salina realizou o HDd com menor frequência em relação aos outros grupos ($p < 0,05$; Figura 5D).

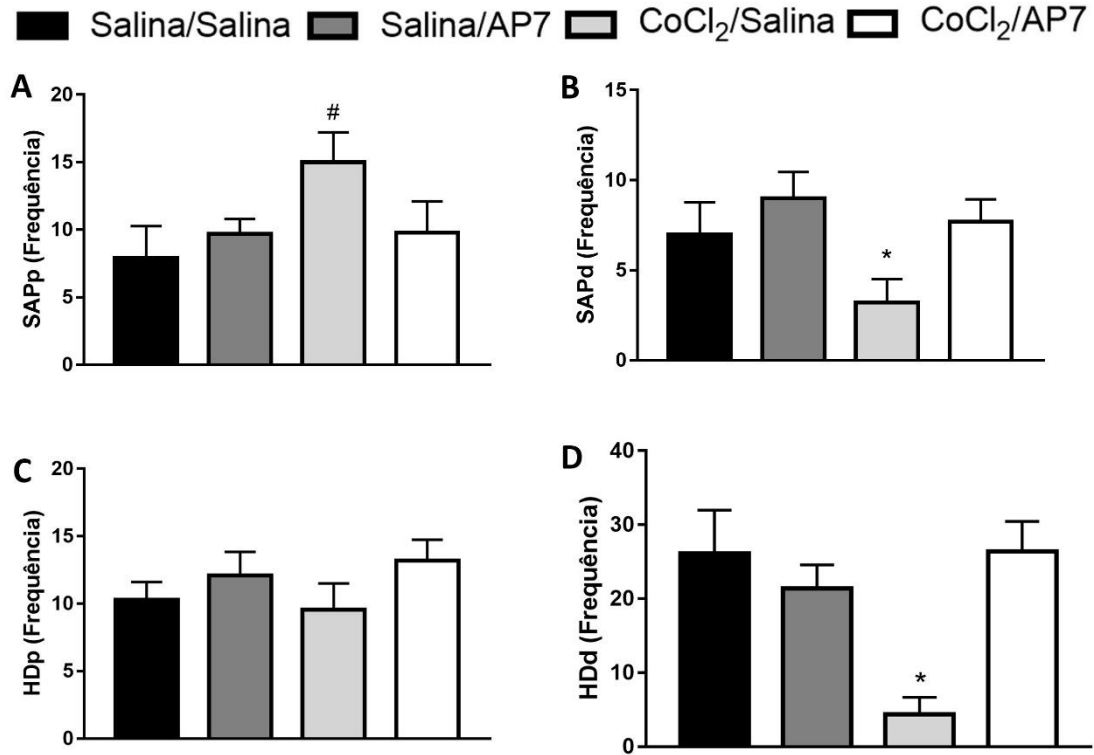


Figura 9 - Efeitos da microinjeção intra-CPFmE de salina ou CoCl₂ (1mM) associada ao EDS e, 48 horas depois, à microinjeção intra-CPFmD de salina ou AP7 nas medidas complementares exibidas por camundongos expostos ao LCE. (A) Frequência de SAPp. (B) Frequência de SAPd. (C) Frequência de HDp. (D) Frequência de HDd. * $p < 0,05$ em comparação a todos os grupos. # $p = 0,09$ em relação ao grupo CoCl₂-AP7.

6. DISCUSSÃO

Os resultados desse estudo demonstraram que a inativação sináptica do CPFmE (através do tratamento com CoCl_2), seguida de uma única sessão de estresse de derrota social, induz o aumento da exibição de comportamentos defensivos, evidenciados pela esquiva dos braços abertos do LCE 2, 5 e 10 dias após o evento estressor (Figuras 2 e 3). Por outro lado, se os animais passam pelo EDS com essa estrutura intacta (i.e., grupo salina), o perfil comportamental relacionado à ansiedade é semelhante ao dos camundongos não-estressados. Também foi observada a alteração dos comportamentos de avaliação de risco, com aumento desses comportamentos nas áreas protegidas (SAPp) e diminuição nas áreas desprotegidas (SAPd e HDd), que estão correlacionados com aumento das respostas do tipo ansiedade (Figuras 5B e D) (ESPEJO, 1997a). Esses dados fortalecem estudos anteriores (COSTA et al., 2016; LEE et al., 2015) que sugerem ser a funcionalidade do CPFmE importante para que os animais lidem (*cope*) com o evento estressor e não tenham alterações comportamentais duradouras relacionadas com a ansiedade, uma vez que a sua inativação somada à experiência do EDS resultou em ansiogênese que perdurou por até 10 dias. Cabe ressaltar que o efeito ansiogênico foi apresentado apenas por animais derrotados que receberam CoCl_2 no CPFmE [Figuras 2 e 3 (Experimento 1)] e também nos animais estressados do experimento 2 que receberam CoCl_2 no CPFmE e salina intra-CPFmD antes de ser exposto ao LCE (Figura 7). Também vale ressaltar que o efeito ansiogênico, observado no experimento 1, foi revertido com o bloqueio dos receptores NMDA do CPFmD (Figura 7, Experimento 2). Dessa forma, apesar do animal passar pelo episódio de EDS com o CPFmE inativado, o que já havia demonstrado ser capaz de gerar comportamentos ansiogênico (Figuras 2 e 3), com o bloqueio da neurotransmissão glutamatérgica, via receptores NMDA, do CPFmD, seu comportamento exploratório nos braços abertos do LCE retorna aos níveis normais.

A maioria dos estudos prévios enfocando o papel do CPFm no controle das respostas do tipo ansiedade de animais expostos ao LCE tem levado em consideração o emprego da sua lesão bilateral (GONZALEZ et al. 2000; LACROIX et al., 2000; SHAH; TREIT, 2003). Deziel e Tasker (2017), através de um modelo de indução farmacológica de acidente vascular encefálico (AVE) isquêmico no CPFm em ratos, constataram que os animais evitavam os braços abertos no LCE por até 28 dias após o episódio. Esse procedimento, apesar de considerar apenas lesões bilaterais, demonstrou que o mau funcionamento do CPFm pode levar à ansiogênese prolongada.

Já o fenômeno de lateralização funcional do CPFm foi sugerido por Sullivan e Gratton (1999), diante da observação que animais com lesões bilaterais ou apenas do CPFmD (e não do esquerdo), por ibotenato, apresentaram diminuição da produção de corticosterona durante estresse de restrição. Ademais, Costa et al. (2016) demonstraram que a inativação do CPFmE ou D, por CoCl_2 , induziu ansiogênese e ansiólise no LCE, respectivamente, em camundongos que não passaram pelo EDS.

Além das evidências obtidas com inativação química sobre a lateralidade funcional do CPFm no controle das respostas do tipo ansiedade, Costa et al. (2016) também demonstraram que a ativação nitrérgica desta estrutura provoca efeitos ansiogênicos somente quando realizada no hemisfério direito. Sucintamente, esses autores observaram que a injeção intra-CPFmD e E de NOC-9, um doador de NO, provoca, respectivamente, aumento e ausência de efeitos sobre as respostas defensivas de camundongos expostos ao LCE. Interessantemente, quando o NOC-9 foi injetado bilateralmente no CPFm, nenhum efeito sobre as respostas relacionadas a ansiedade foi observado (COSTA et al., 2016), sugerindo que a ativação nitrérgica do CPFmE, de alguma forma, iniba os efeitos ansiogênicos decorrentes do aumento de NO no CPFmD. Assim, esses estudos foram essenciais para as recentes investigações da lateralização funcional do CPFm.

Ainda, de acordo com Czéh et al. (2008), o EDS pode promover atrofia dendrítica com maior impacto no CPFmE do que no direito, revertendo a assimetria intrínseca entre os hemisférios. Diante disso, Cerqueira et al. (2008) sugeriram que o hemisfério esquerdo modula as respostas negativas relacionadas ao estresse desencadeadas pela ativação do direito. De maneira geral, o CPFmD seria responsável pela ativação do eixo HPA, relacionado ao estresse, e o esquerdo atuaria como inibidor dessa resposta (CERQUEIRA et al., 2008).

Vale ressaltar que o CPFm não é uma área que participa isoladamente como uma ilha na resposta ao estresse. Funcionalmente, em condições basais de estresse, a ativação do IL, associada a amígdala, aumentam a atividade do PVN, elevando as respostas fisiológicas associadas ao estresse e, conseqüentemente, os níveis de ansiedade, enquanto as áreas Cg1, PrL, juntamente com o hipocampo, podem atenuar essas respostas fisiológicas e comportamentais (CERQUEIRA et al., 2008). Já num contexto de estresse crônico, ocorre uma modificação das redes neurais, sendo que há uma atrofia e redução da atividade do CPFmE e uma superativação da amígdala, levando ao aumento da atividade do CPFmD e do núcleo leito da estria terminal (NLET), resultando em disfunções no eixo HPA, com o aumento dos níveis de corticosterona, ativação simpática e alterações comportamentais que podem estar relacionadas com depressão e/ou ansiedade (CERQUEIRA et al., 2008). Portanto, embora haja

evidências de que a inativação do CPFmE eleve os níveis de respostas do tipo ansiedade nos animais, é importante investigar quais projeções que chegam a cada hemisfério do CPFm e saiam deles, e como a sua interação entre as estruturas (i.e. amígdala, NLET, matéria cinzenta periaquedutal) (TOVOTE et al., 2015) podem estar correlacionadas, direta ou indiretamente, com os resultados do presente estudo.

Portanto, os hemisférios esquerdo e direito do CPFm parecem responder diferentemente ao estresse (LEE et al., 2015; SULLIVAN; GRATTON, 1999), sendo que o CPFmE seria uma importante estrutura na capacidade de lidar com estressores (ou modular a resiliência) (McEWEN, 2012; 2015). Nesse sentido, Lee et al. (2015) realizaram um protocolo de estresse crônico de derrota social de 10 dias em camundongos, seguida do teste de interação social, com o intuito de separar os animais em resilientes (indivíduos com maior interação social) e vulneráveis (menor interação) ao estresse. Foram observadas diferenças eletrofisiológicas entre o CPFmE e D desses animais, em que os vulneráveis apresentaram menor ativação do CPFmE, um fenômeno que perdurou por até 10 dias. Já o CPFmD dos animais estressados permaneceu mais ativo em relação ao dos animais não-estressados. Os autores salientam que a organização e expressão das respostas comportamentais ao estresse são processadas diferentemente nos dois hemisférios. Enquanto o CPFmD faria parte de um mecanismo de processamento “tudo ou nada” para as experiências estressantes, o CPFmE atuaria gradualmente, de modo que a intensidade de sua ação poderia influenciar nos comportamentos relacionados ao estresse. Em outras palavras, os animais susceptíveis possuiriam menor ativação do CPFmE quando comparados aos resilientes ou não-estressados. Os resultados do presente estudo vão ao encontro dessas evidências, uma vez que os animais estressados e tratados com CoCl_2 no CPFmE não se recuperaram do episódio de estresse, mimetizando o perfil de susceptibilidade.

Nossos resultados são sugestivos de que a inativação do CPFmE associada ao EDS impeça que esta estrutura límbica mantenha sua atividade normal para inibir a ativação do CPFmD, tornando parte dos animais vulneráveis ao EDS. Da mesma forma, a integridade funcional do CPFmD parece ser essencial para a manutenção dos índices de ansiedade, uma vez que o seu bloqueio via receptores NMDA parece reverter o perfil ansiogênico no LCE.

Por outro lado, os resultados do presente estudo apontam que a interação social não-aversiva (i.e., sem derrota social) não provocou quaisquer alterações nos comportamentos defensivos dos animais expostos ao LCE 2, 5 ou 10 dias depois. Esses dados demonstram que o efeito ansiogênico obtido nos animais estressados se deve a associação entre a microinjeção de CoCl_2 e o EDS e não pelo efeito da droga em si, já que o efeito desse inibidor sináptico perdura por até 60 minutos (LOMBER, 1999). Costa et al. (2016) também observaram que a

inativação do CPFmE não é capaz de gerar efeito ansiogênico prolongado em camundongos que não passaram pelo EDS. De acordo com Lee et al. (2015), a fotoinibição do CPFmE não altera a interação social entre animais *naive*.

O mesmo perfil de ausência de alterações comportamentais foi observado nos animais tratados com injeção de salina no CPFmE e submetidos ao EDS. Esses animais não exibiram um perfil comportamental defensivo diferente daquele apresentado pelos animais não estressados e expostos ao LCE nos dias 2, 5 e 10 pós-estresse. Esses resultados indicam que, pelo menos sob a análise comportamental diante da exposição ao LCE, os animais se recuperaram do evento aversivo, corroborando os resultados de Costa et al. (2016), que observaram essa mesma tendência ao avaliar os níveis de ansiedade de camundongo 24 horas após receber microinjeção de salina no CPFmE e passar pelo episódio de EDS. Por outro lado, Korte e De Boer (2003) verificaram a permanência do efeito relacionados a ansiedade em ratos derrotados no LCE 24 horas após o EDS, mas não em 2, 7 e 14 dias.

Por outro lado, a inativação do CPFmE por CoCl_2 seguida do estresse de derrota social provocou aumentos significativos nos comportamentos relacionados à ansiedade nos camundongos. Isso foi observado pelas diminuições de %EBA, %TBA e HDd (Figuras 2, 3 e 5D), as quais foram mantidas em todos os tempos (i.e., aos 2, 5 e até 10 dias após o EDS). Estes resultados corroboram os achados de Costa et al. (2016), agregando indícios a ideia de que a associação entre “inibição química do CPFmE e EDS” leva a consequências duradouras sobre as respostas do tipo ansiedade, avaliada no LCE, em camundongos.

Segundo Espejo (1997b), alterações nas medidas complementares (i.e., diminuição de HDd e SAPd e aumento do SAPp), acompanhadas de alterações em medidas espaço-temporais (diminuição de %EBA e %TBA) são indicativas de estado ansiogênico. No presente estudo, as medidas complementares de ansiedade como SAPd permaneceram reduzidas até o 5º dia e igualaram-se aos demais grupos no 10º dia (Fig. 5B). De acordo com Espejo (1997a), os SAPp e SAPd são medidas relacionadas ao estado de ansiedade, logo a diminuição de SAPd acompanhada do aumento de SAPp (até o 5º dia) pode ser indicativo de ansiogênese, enquanto seu desaparecimento no 10º dia pode ser um indício de que o animal já esteja se recuperando do efeito da exposição ao EDS sob inativação do CPFmE (Fig. 5A). Contudo, embora seja possível que esses efeitos desapareçam após um prazo maior, podemos sugerir que a inativação do CPFmE seguida do EDS tem efeitos duradouros nos comportamentos ansiogênicos desses animais no LCE, já que os animais dos demais grupos (todos não-estressados e os que receberam salina antes do EDS) do experimento 1 se recuperaram do episódio de EDS.

Em geral, a maioria dos estudos esteve voltada a analisar os efeitos fisiológicos do estresse agudo a curto prazo (i.e. 24 horas; e.g., ARMARIO et al., 2008). Contudo, nas últimas décadas, esta tendência foi substituída pelo interesse dos pesquisadores em investigar os efeitos de longo prazo do estresse agudo em outras medidas, que não fossem apenas comportamentais (ARMARIO et al., 2008; ANTELMAN, 1989; KOOLHAAS et al., 1997). Koolhaas et al. (1997) descreveram que um episódio de EDS pode acarretar mudanças a curto prazo, como aumento da produção de corticosterona em 4 horas, e a longo-prazo, como alteração no controle da temperatura (7 dias), perda de peso (4 dias) e diminuição da atividade locomotora no campo aberto. Em um dos únicos estudos voltados para o comportamento, realizado por Belda et al. (2008), ratos foram submetidos ao estresse de restrição agudo durante 2 horas e suas respostas ansiogênicas foram analisadas no LCE 1 e 7 dias após o estresse. Os autores sugeriram um perfil ansiogênico, observado pela diminuição da %EBA e %TBA nos grupos expostos ao LCE em ambos os dias. Além disso, também nos dois dias, os autores observaram elevação dos níveis plasmáticos de corticosterona dos animais estressados em relação aos animais não estressados. Em contrapartida, Calfa et al. (2006) constataram que o EDS foi capaz de aumentar os comportamentos defensivos de ratos expostos ao LCE, após 24 horas. Esse efeito foi revertido com o bloqueio dos receptores de glicocorticoides (GR) no septo lateral. Há regiões anteriores do PrL que se projetam para estruturas límbicas em ratos, como o septo lateral, formando circuitos relacionados a ansiedade (DUNCAN et al., 1996; HEIDBREDEDER; GROENEWEGEN, 2003).

Nosso estudo possui a novidade de apresentar um protocolo em que um animal apresenta respostas comportamentais duradouras relacionadas à ansiedade a partir de um evento estressor único de derrota social, uma vez que esse perfil ansiogênico havia sido observado somente quando os animais eram submetidos ao estresse crônico (e.g., por mais de 10 dias; AVGUSTINOVICH et al., 1997; KRISHNAN et al., 2007; MACEDO et al., 2018).

Diante de todo o exposto, nosso estudo acrescenta à literatura um importante achado, a saber, a experiência aversiva decorrente de uma única derrota social em camundongos com o CPFmE inativado leva a consequências duradouras sobre as respostas do tipo ansiedade avaliada no LCE.

É importante ressaltar que os mecanismos pelos quais o estresse agudo pode levar a respostas ansiogênicas a longo prazo ainda são pouco compreendidos. Ao que parece, o desenvolvimento de um perfil vulnerável ao estresse depende do tipo do evento aversivo, como a derrota social, exposição ao predador e restrição de movimentos. Ainda, a duração do estresse, além de diferenças individuais, entre os períodos de vida (início da vida, adolescência, idade

adulta e idoso) e entre as linhagens dos animais, parecem contribuir para o perfil mais ou menos vulnerável ao estresse (BEERY; KAUFER, 2015; BELDA et al., 2008). Armario et al. (2008) argumentam que um evento aversivo de carga emocional com alta intensidade induz o aumento da atividade do eixo HPA por um tempo prolongado, podendo levar ao aumento dos comportamentos defensivos. Cerqueira et al. (2008) já descreveram que, mesmo em condições basais de estresse, há produção de glicocorticoides pelo eixo HPA, via estimulação do CPFmD, aumentando temporariamente respostas relacionadas à ansiedade, até que haja atenuação desses efeitos fisiológicos pela atividade do CPFmE. Naturalmente, espera-se que esses efeitos se tornem mais deletérios numa situação de estresse crônico, com a desregulação da síntese de glicocorticoides e aumento dos níveis de ansiedade (CERQUEIRA et al., 2008). Visto que nossos resultados indicam que o CPFm participe da modulação dos efeitos ansiogênico de longo prazo desencadeados pelo EDS, mesmo que seja a partir de um evento agudo, é possível formular a hipótese que a inibição do CPFmE seja capaz de mimetizar as alterações comportamentais causadas pelo estresse crônico decorrentes da possível hiperativação do eixo pelo CPFmD. Nesse mesmo sentido, com o bloqueio dos receptores NMDA no CPFmD, essa estrutura deixaria de ser estimulada, passando a não haver alterações significativas prolongadas no eixo HPA, na desregulação da síntese de glicocorticoides e no aumento de comportamentos defensivos. Entretanto, ainda não se sabe quais são as alterações hormonais que podem estar envolvidas no fenômeno observado nesse estudo, sendo necessários experimentos complementares para confirmar tal hipótese

Tendo em vista a novidade dos resultados encontrados no presente estudo, podemos sugerir que o CPFmE é fundamental para a modulação da resiliência e que sua inativação torna os animais mais susceptíveis aos efeitos do estresse. É provável que os transtornos de ansiedade em humanos também apresentem esse mesmo perfil, conforme preconizado por Cerqueira et al. (2008). Portanto, nosso estudo pode servir de base para novas pesquisas translacionais que visem tornar o indivíduo resiliente ao estresse através da estimulação ou tratamento unilateral do CPFm.

Quanto a possíveis neurotransmissores envolvidos, o CPFm é composto principalmente por 80-90% de neurônios piramidais glutamatérgicos e, também, por interneurônios com outros sistemas de neurotransmissão (McKLVEEN et al., 2015). Entretanto, entre os sistemas de neurotransmissão envolvidos nas respostas defensivas, podemos destacar o glutamato (STERN et al., 2010), sobretudo via ativação dos receptores do tipo N-Metil-D-Aspartato (NMDA) (LISBOA et al., 2011; SAITOH et al., 2014). Esse destaque está baseado tanto nessa evidência de que há uma elevada densidade de neurônios glutamatérgicos que se comunicam via

receptores NMDA, quanto em resultados recentes do nosso laboratório que apontam esse neurotransmissor na modulação de respostas defensivas relacionadas ao CPFm (FARIA et al., 2016; COSTA et al., 2016; COSTA, 2017). Ainda, na literatura há trabalhos que atribuem a função do glutamato na resposta de medo e ansiedade (LACROIX et al., 2000; SULLIVAN; GRATTON, 2002), memória e atenção (BENN et al., 2016; ROBBINS; MURPHY, 2006), dependência química (UYS et al., 2008) e respostas cardiovasculares em resposta ao estresse (RESSTEL et al., 2006; TAVARES et al., 2009). Portanto, investigamos o papel do receptor NMDA na resposta do tipo ansiedade apresentada pelos animais submetidos ao EDS com o CPFmE inativado, 48 horas após o estresse. Esse período foi escolhido por ser o que os animais apresentavam uma resposta ansiogênica robusta, passível de ser observada nas medidas espaço-temporais e complementares do LCE (Figuras 2, 3, 5 e 7).

Assim, no experimento 2, os animais que receberam microinjeção de CoCl_2 no CPFmE, e foram derrotados por um agressor-residente, exploraram mais os braços abertos no LCE ao receberem uma microinjeção de AP7 no CPFmD (0,05 nmol), 10 minutos antes da exposição ao LCE, quando comparados ao grupo que recebeu salina no segundo tratamento, destacando uma reversão do perfil ansiogênico (Figuras 6 e 7). Ainda, foi possível observar que a dose do antagonista utilizada (0,05 nmol/0,2 μml) não causou ansiólise por si nos animais, pois o grupo que recebeu salina no CPFmE e, em seguida, AP7 no CPFmD, apresentou exploração dos braços abertos na mesma proporção que o grupo que recebeu salina em ambos os tratamentos. Numa curva dose-resposta feita por Costa (2017), a autora salientou que animais *naive* não exibiram aumento dos níveis de ansiedade no LCE ao receber uma injeção intra-CPFmD da dose em questão. É importante destacar que a reversão do efeito ansiogênico se deve ao bloqueio dos receptores NMDA, que parecem estar relacionados com os comportamentos defensivos no CPFmD e não pelo fármaco AP7 em si, uma vez que já foi demonstrado o efeito ansiolítico por bloqueio desses receptores através de outros fármacos, como o LY235959 (LISBOA, 2011; RESSTEL, 2006). Além disso, os animais que receberam o AP7 fora do sítio não apresentaram o mesmo comportamento dos animais positivos (Figura 7).

Esse resultado sugere que não só a integridade do CPFmE seja importante para que o indivíduo lide com o estresse, mas também a atividade do CPFmD, já que o bloqueio dos receptores NMDA nessa estrutura parece prevenir a indução de um perfil ansiogênico. Esses achados reforçam a hipótese que a resposta ansiogênica apresentada pelos animais que passaram pelo EDS com CPFmE inativado no LCE envolva neurotransmissão glutamatérgica, direta ou indiretamente, já que o bloqueio dos receptores NMDA no CPFmD atenuou essa ansiogênese induzida pelo estresse. Nossos resultados vão ao encontro do que foi sugerido em

estudos que demonstraram que a inibição aguda da neurotransmissão glutamatérgica repercute em ansiólise no CPFm (LISBOA et al, 2011; RESSTEL et al., 2006; COSTA, 2017) e também em outras estruturas, como o NLET (FARIA et al., 2016) e a MCP (GUIMARÃES et al., 1991; CAROBREZ et al., 2001). Por outro lado, a inativação do CPFmD por manipulações optogenéticas inespecíficas realizada por Lee et al. (2015) não foi capaz de reverter o comportamento de esquivas sociais em camundongos susceptíveis ao EDS.

Segundo Sanacora et al. (2012), diferentes tipos de estresse promovem a liberação de glutamato em áreas corticais e límbicas (em humanos e em animais) que podem se relacionar com transtornos de humor ou ansiedade. Dessa forma, é possível que a hipofuncionalidade do CPFmE, de alguma forma (direta ou indiretamente), leve a alterações na neurotransmissão glutamatérgica no CPFmD, provocando efeitos do tipo ansiedade (COSTA, 2017), que podem ser atenuados pelo bloqueio dos receptores NMDA.

Ainda, além das vias glutamatérgicas, podemos ressaltar a participação da dopamina intra-CPFm na modulação de estados emocionais aversivos. Nesse sentido, Carlson et al. (1993) descreveram que o estresse inescapável (i.e. choque nas patas num protocolo de desamparo aprendido) provoca aumento de dopamina no CPFmD, através de sua conexão com núcleo *accumbens* (via mesocorticolímbica). A produção de dopamina depende do estímulo estressor (COVINGTON III et al., 2005), sendo que a diminuição da atividade da via dopaminérgica de recompensa dificulta ao organismo lidar com estressores (LEE et al., 2015). Se assim, é possível que a perda da capacidade de lidar com o estresse, observada nos animais com CPFmE inativado, esteja correlacionada com a diminuição da neurotransmissão dopaminérgica nessa estrutura. A alteração nos sistemas de neurotransmissão é plausível, já que o efeito do CoCl_2 é temporário, cerca de 30-60 minutos (LOMBER, 1999) e os efeitos ansiogênicos da inativação do CPFmE permaneceram por mais tempo (2, 5 e 10 dias) nos animais derrotados.

Além disso, é relevante destacar que numa situação de estresse, não há participação apenas do CPFm, mas também de outras estruturas relacionadas à ansiedade que se conectam a ele (CERQUEIRA et al., 2008; TOVOTE et al., 2015; GODOY et al., 2018). Dentre elas, destacam-se o núcleo leito da estria terminal (NLET) (FARIA et al., 2016), matéria cinzenta periaquedutal (GUIMARÃES et al., 1991), amígdala (SORREGOTTI et al., 2018), hipocampo ventral (ADHIKARI et al., 2009) e núcleos da rafe (MELONI et al., 2007). Segundo Cerqueira et al. (2008), enquanto a ativação do CPFmD modula positivamente o NLET, levando à ativação do eixo HPA e produção de glicocorticóides, conferindo a resposta neuroendócrina ao estresse; a ativação do CPFmE parece inibir as respostas eliciadas pelo direito em condições basais. O controle tônico do esquerdo sobre o direito é prejudicado em situações de estresse

crônico, repercutindo no aumento de respostas relacionadas a ansiedade e depressão (CERQUEIRA et al., 2008). Dessa forma, os nossos resultados tentam inferir, elegantemente, são sugestivos de que as respostas do tipo ansiedade provenientes de um protocolo de estresse agudo repercutam em reações de defesas prolongadas em função da relação entre hipoatividade do CPFmE e hiperatividade do CPFmD.

6 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo são sugestivos de que a integridade e a relação entre os córtex pré-frontal medial esquerdo e direito são fundamentais para que o organismo possa lidar com os eventos aversivos no sentido de se recuperar dos efeitos do EDS, com importante participação da neurotransmissão glutamatérgica, principalmente via receptores NMDA. Novos estudos são necessários para entender como ocorre essa relação e modulação das respostas de ansiedade entre os hemisférios esquerdo e direito do CPFm, e como a neurotransmissão glutamatérgica, acompanhada de outros neurotransmissores, atua nos efeitos ocasionados pelo EDS, os quais podem culminar em transtornos relacionados à ansiedade e/ou depressão.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADHIKARI, A.; TOPIWALA, M. A.; GORDON, J. A. Synchronized activity between the ventral hippocampus and the medial prefrontal cortex during anxiety. **Neuron**, v. 65, p. 257-269, 2009.

ALMEIDA, D. M. Resilience and Vulnerability to Daily Stressors Assessed via Diary Methods. **Current Directions in Psychological Science**, v. 14, p. 64-68, 2005.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders**. 5. ed. Washington, DC: Academic Press, v. 1, 2013

ANTELMAN, S. M. Persistent sensitization of clonidine-induced hypokinesia following one exposure to a stressor: possible relevance to panic disorder and its treatment. **Psychopharmacology**, v. 98, p. 97-101, 1989.

ARMARIO, A.; ESCORIHUELA, R.M.; NADAL, R. Long-term neuroendocrine and behavioural effects of a single exposure. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 32, p. 1121-1135, 2008.

AVGUSTINOVICH, D.F.; GORBACH, O.V.; KUDRYAVTSEVA, N.N. Comparative Analysis of Anxiety-Like Behavior in Partition and Plus-Maze Tests After Agonistic Interactions in Mice. **Physiology & Behavior**, v. 61, p. 37-43, 1997.

BECHARA, A.; DAMASIO, H. Decision-making and addiction (part 1): impaired activation of somatic states in substance dependent individuals when pondering decisions with negative future consequences. **Neuropsychologia**, v. 40, p. 1675-1689, 2002.

BAIN, J. B. et al. Sex hormones in murderers and assaulters. **Behavioral Sciences & the Law**, v. 5, p. 95 - 101, 1987.

BELDA, X.; FUENTES, S.; NADAL, R.; ARMARIO, A. A single exposure to immobilization causes long-lasting pituitary-adrenal and behavioral sensitization to mild stressors. **Hormones and Behavior**, v. 54, p. 654-661, 2008.

BENN et al. Optogenetic Stimulation of Prefrontal Glutamatergic Neurons Enhances Recognition Memory. **Journal of Neuroscience**, v. 36, p. 4930-4939, 2016.

BEERY, A.; KAUFER, D., Stress, social behavior, and resilience: Insights from rodents. **Neurobiology of Stress**, v. 1, p. 116-127, 2015.

BERTON, O. et al. Essential Role of BDNF in the Mesolimbic Dopamine Pathway in Social Defeat Stress. **Science**, v. 311, p. 864-868, 2005.

BJÖRKQVIST, K. Social defeat as a stressor in humans. **Physiology & Behavior**, v. 73, p. 435-442, 2001.

BLALOCK, J.A.; JOINER-JR., T. E. Interaction of Cognitive Avoidance Coping and Stress in Predicting Depression/Anxiety. **Cognitive Therapy and Research**, v. 24, p. 47-65, 2000.

- BLANCHARD, D. C. et al. Human defensive behaviors to threat scenarios show parallels to fear and anxiety-related defense patterns of non-human mammals. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 25, p. 761-70, 2001.
- BLANCHARD, R. J. et al. Behavioral and Endocrine Change Following Chronic Predatory Stress, **Physiology & Behavior**, v. 63, p. 561-569, 1998.
- BRANDÃO, M. L.; VIANNA, D. M.; MASSON, S.; SANTOS, J. Neural organization of different types of fear: implications for the understanding of anxiety. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 25, p. 36-41, 2003.
- BUWALDA, B. et al. Social behavior and social stress in adolescence: A focus on animal models. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 35, p. 1713-1721, 2011.
- CAIRNS, K.E., YAP, M.B.H., PILKINGTON, P.D., JORM, A.F. Risk and protective factors for depression that adolescents can modify: A systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. **Journal of Affective Disorders**, v. 169, p. 61-75, 2014.
- CALFA, G.; VOLOSIN, M.; MOLINA, V. A. Glucocorticoid receptors in lateral septum are involved in the modulation of the emotional sequelae induced by social defeat. **Behavioural Brain Research**, v. 172, p. 324-332, 2006.
- CARDOSO, B. S. **O papel do Córtex Pré-Frontal medial Esquerdo (CPFmE) no comportamento defensivo de camundongos expostos ao labirinto em cruz elevado (LCE)**. 2017. 41 f. Trabalho de conclusão de curso (Farmácia-Bioquímica) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2017.
- CARLSON, J. N.; FITZGERALD, R. W., KELLER JR, S. D. Glick, Lateralized changes in prefrontal cortical dopamine activity induced by controllable and uncontrollable stress in the rat. **Brain Research**, p. 178-187, 1993.
- CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, p. 1193-1205, 2005.
- CARVALHO-NETO, E. F. Medo e Ansiedade: aspectos comportamentais e neuroanatômicos. **Arquivos médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo**, v. 54(2), p. 62-5, 2009
- CASEMENT, M. D. et al. Girls' Challenging Social Experiences in Early Adolescence Predict Neural Response to Rewards and Depressive Symptoms. **Developmental Cognitive Neuroscience**, v. 8, p. 18-27, 2014.
- CERQUEIRA, J. J.; OSBORNE, F. X.; ALMEIDA, N. S. The stressed prefrontal cortex. Left? Right? **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 22, p. 630-638, 2008.
- COSTA, N. S. et al. Functional lateralization of the medial prefrontal cortex in the modulation of anxiety in mice: Left or right? **Neuropharmacology**, v. 108, p. 82-90, 2016.

COSTA, N. S. **Papel do córtex pré-frontal medial no comportamento defensivo de camundongos: avaliação farmacológica da lateralização funcional.** 2017. 46 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2017.

COURTIN, J. et al. Medial prefrontal cortex neuronal circuits in fear behavior. **Neuroscience**, v. 240, p. 219-242, 2013

COVINGTON III, H.E. et al. Brief Social Defeat Stress: Long Lasting Effects on Cocaine Taking During a Binge and Zif268 mRNA Expression in the Amygdala and Prefrontal Cortex. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, p. 310-321, 2005.

CRESTANI, C. C.; ALVES, F. H.; TAVARES, R. F.; CORRÊA, F. M. Role of the bed nucleus of the stria terminalis in the cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. **Stress**, v. 12, p. 268-278, 2009.

CRESTANI, C. C. Emotional Stress and Cardiovascular Complications in Animal Models: A Review of the Influence of Stress Type. **Frontiers in Physiology**, v. 7, Article 251. doi: 10.3389/fphys.2016.00251, 2016.

CROWCROFT, P.; ROWE, F. P. Social organization and territorial behavior in the. **Proceedings of the Zoological Society of London**, v. 140, n. 3, p. 517–531, 1963.

CRUZ, A. P. M. et al. Modelos animais de ansiedade: implicações para a seleção de drogas ansiolíticas. **Psicologia: Teoria e Pesquisa**, v. 13, p. 269-278, 1997.

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

CZÉH, B.; PEREZ-CRUZ, C.; FUCHS, E.; FLUGGE, G. Chronic stress-induced cellular changes in the medial prefrontal cortex and their potential clinical implications: Does hemisphere location matter? **Behavioural Brain Research**, v. 190, p. 1-13, 2008.

DABBS, J. M. Age, testosterone, and behavior among female prison inmates. **Psychosomatic Medicine**, v. 59, p. 213-221, 1997.

DALGALARRONDO, P. **Psicopatologia e semiologia dos transtornos mentais.** 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 438 p.

DAMASIO, A.R.; EIGHTH, C.U. The fabric of the mind: a neurobiological perspective, **Progress in Brain Research**, v. 126, p. 457-467, 2000.

DAVIS, M. The role of the amygdala in conditioned fear. In: Aggleton, J.P. (Org.). **The amygdala: Neurobiological aspects of emotion, memory and mental dysfunction.** New York: Plenum Press, 1992. p. 255–305.

DE OCA, B. M. et al. Distinct Regions of the Periaqueductal Gray Are Involved in the Acquisition and Expression of Defensive Responses. **The Journal of Neuroscience**, v. 18, p. 3426-3432, 1998.

DEACON, R.M.J.; PENNY, C.; RAWLINS, J.N.P. Effects of medial prefrontal cortex cytotoxic lesions in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 139, p. 139-155, 2003.

DEL GIUDICE, M.; ELLIS, B. J.; SHIRTCLIFF, E.A., The Adaptive Calibration Model of stress responsivity. **Neuroscience Biobehavioral Reviews**, v. 35, p. 1562–1592, 2011.

DEZIEL, R. A.; TASKER, R. A. Bilateral ischaemic lesions of the medial prefrontal cortex are anxiogenic in the rat. **Acta Neuropsychiatrica**,; p. 1-6, 2017.

DIORO, D.; VIAU, V. MEANEY, M. J. The role of the medial pre-frontal cortex (cingulate gyrus) in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. **The Journal of Neuroscience**, v. 13, n. 9, p. 3839-3847, 1993.

DUNCAN, G. E.; KNAPP, D. J.; BREESE, G. R. Neuroanatomical characterization of Fos induction in rat behavioral models of anxiety. **Brain Research**, p. 79-91, 1996.

EHRENKRANZ, J.; BLISS, E.; SHEARD, M. H. Plasma Testosterone: Correlation with Aggressive Behavior and Social Dominance in Man. **Psychosomatic Medicine**, v. 36, p. 469–475, 1974.

ELIOT, E. et al. Dnmt3a in the Medial Prefrontal Cortex Regulates Anxiety-Like Behavior in Adult Mice. **The Journal of Neuroscience**, v. 36, p.730-740, 2016.

ENGEL, G. L., SCHMALE, A.H. Conservation-withdrawal: a primary regulatory process for organismic homeostasis. **Ciba Foundation Symposium**, v. 8, p.57-75, 1972.

ESPEJO, E. F. Structure of the mouse behaviour on the elevated plus-maze test of anxiety. **Behavioural Brain Research**, v. 86, p. 105-112, 1997a.

ESPEJO, E. F. Effects of weekly or daily exposure to the elevated plus-maze in male mice. **Behavioural Brain Research**, v. 87, p. 233-228, 1997b.

EUSTON, D. R.; GRUBER, A. J.; McNAUGHTON, B. L. The role of medial pre-frontal cortex in memory and decision making. **Neuron**, v. 76, p. 1057-1070, 2012.

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

FELDMAN, S.; CONFORTI; N. Modifications of adrenocortical responses following frontal cortex stimulation in rats with hypothalamic deafferentations and medial forebrain bundle lesions. **Neuroscience**, v. 15, p. 1045–1047, 1985.

FERREIRA, P. Estudantes brasileiros estão entre os mais ansiosos do mundo. **O Globo**, Rio de Janeiro, 19 abr. 2017. Folha Educação. Disponível em: < <https://oglobo.globo.com/sociedade/educacao/estudantes-brasileiros-estao-entre-os-mais-ansiosos-do-mundo-21225685>>. Acesso em: 6 ago 2018.

FINNELL, J. E.; WOOD, S. K. Neuroinflammation at the interface of depression and cardiovascular disease: Evidence from rodent models of social stress. **Neurobiology of Stress**, v. 4, p. 1-14, 2016.

FRANKLIN, B. J.; SAAB, I.M. Mansuy, Neural mechanisms of stress resilience and vulnerability, **Neuron**, v. 75, p. 747-761, 2012.

FRIEDERICH, A. C. D.; MACEDO, F.; REIS, A. H. Vulnerabilidade ao stress em adultos jovens. **Revista Psicologia organizações e trabalho**, v. 15, p. 59-70, 2015.

GODOY, L. D. et al. A Comprehensive Overview on Stress Neurobiology: Basic Concepts and Clinical Implications. **Frontiers in Behavioural Neuroscience**, v. 12, p. 127, 2018.

GOLD, A. L.; MOREY, R. A.; MCCARTHY, G. Amygdala-prefrontal cortex functional connectivity during threat-induced anxiety and goal distraction. **Biological Psychiatry**, v. 77, p. 394-403, 2015.

GONZALEZ, L.E. et al. Medial prefrontal transection enhances social interaction: Behavioral studies. **Brain Research**, v.886, p.7-15, 2000.

GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. S. **Fundamentos de Psicofarmacologia**. 2.Ed. São Paulo: Atheneu, 2012, 279 p.,

GUIMARÃES, F. S. et al. Anxiolytic effect in the elevated plus-maze of the NMDA receptor antagonist AP7 microinjected into the dorsal periaqueductal grey. **Psychopharmacology**, v. 103, p. 91-94, 1991

GUIMARÃES, F. S.; BEIJAMINI, V.; MOREIRA, F. A.; AGUIAR, D. C.; DE LUCCA, A. C. Role of nitric oxide in brain regions related to defensive reactions. **Neuroscience Biobehavioral Reviews**, v. 29, p. 1313-1322, 2005.

HAMMELS, C. et al. Defeat stress in rodents: From behavior to molecules. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 59, p. 111-140, 2015.

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

HEIDBREder, C. A.; GROENEWEGEN, H. J. The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 27, p. 555-579, 2003.

HOUAISS, A; VILLAR, M. S.; FRANCO, F. M. **Dicionário Houaiss da Língua Portuguesa**. 1. Ed. Rio de Janeiro: Editora Objetiva, 2001.

ISOLAN, L. R. **Ansiedade na infância e adolescência e bullying escolar em uma amostra comunitária de crianças e adolescentes**. 2012. 157 f. Tese (Doutorado em Psiquiatria). Univeridade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

JOEL, D. Electrolytic lesions of the medial prefrontal cortex in rats disrupt performance on an analog of the Wisconsin Card Sorting Test, but do not disrupt latent inhibition: implications for animal models of schizophrenia. **Behavioural Brain Research**, v. 85, p. 187-201, 1997.

JONES, K. R. et al. Stimulation of the prelimbic cortex differentially modulates neuroendocrine responses to psychogenic and systemic stressors. **Physiology & Behavior**, v. 104, p. 266–271, 2011.

KALTIALA-HEINO, R. et al. Bullying at school—an indicator of adolescents at risk for mental disorders. **Journal of Adolescence**, v. 23, p. 661–674, 2000.

KEENEY; A.J.; HOGG, S. Behavioural consequences of repeated social defeat in the mouse: preliminary evaluation of a potential animal model of depression. **Behavioral Pharmacology**, v. 10, p. 753-764, 1999.

KOOLHAAS, J. M. et al. The Temporal Dynamics of the Stress Response. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 21, p. 775-782, 1997.

KORTE, S. M.; DE BOER, S. F. A robust animal model of state anxiety: fear-potentiated behaviour in the elevated plus-maze, v. 463, p. 163-175, 2003.

KRETZ, R. Local cobalt injection: a method to discriminate presynaptic axonal from postsynaptic neuronal activity. **Journal Neuroscience Methods**, v. 11, p. 129-135, 1984.

KRISHNAN, V et al. Molecular Adaptations Underlying Susceptibility and Resistance to Social Defeat in Brain Reward Regions. **Cell**, v. 131, p. 391-404, 2007.

KUZEL, M. A. A. et al. Estudo da hierarquia de camundongos Swiss Webster através do uso de sistemas com gaiolas interligadas (SGI). **RESBCAL**, v.2 n.1, p. 49-60, 2013.

LACROIX, L., SPINELLI, S., HEIDBREDE, C.A., FELDON, J. Differential role of the medial and lateral prefrontal cortices in fear and anxiety. **Behavioral Neuroscience**, v. 114, p. 1119-1130, 2000.

LAVIOLA, G. et al. Psychobiological risk factors for vulnerability to psychostimulants in human adolescents and animal models. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, p. 993-1010, 1999.

LEDOUX, J. E. Emotion: Clues from the Brain. **Annual Review of Psychology**, v. 46, p. 209-235, 1995.

LEE, E. et al. Left brain cortical activity modulates stress effects on social behavior. **Nature Scientific Reports** 5, Article number: 13342, 2015 DOI: 10.1038/srep13342

LISBOA, S. F. et al, Anxiety-Behavior Modulated by Ventral Medial Prefrontal Cortex of Rats Submitted to the Vogel Conflict Test Involves a Local NMDA Receptor and Nitric Oxide. **Journal of Behavioral and Brain Science**, v.1, p. 181-187, 2011

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

LOMBER, S. G. The advantages and limitations of permanent or reversible deactivation techniques in the assessment of neural function. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 86, p. 109-117, 1999.

- LOPES NETO, A.A.; SAAVEDRA, L.H. **Diga não para o bullying: Programa de redução do comportamento agressivo entre estudantes**. Rio de Janeiro, ABRAPIA, 146 p. 2003.
- LOPES-NETO, A. A. Bullying: comportamento agressivo entre estudantes. **Jornal de Pediatria**, v. 81, p. 164-172, 2005
- MACEDO, G. M. et al. Consequences of continuous social defeat stress on anxiety- and depressive-like behaviors and ethanol reward in mice. **Hormones and Behavior**, v. 97, p. 154-161, 2018.
- MAREN, S.; HOLMES, A. Stress and fear extinction. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, p. 58-79, 2016.
- MATHEW, S. J.; PRICE, R. B.; CHARNEY, D. S. Recent Advances in the Neurobiology of Anxiety Disorders: implications for Novel Therapeutics. **American Journal of Medical Genetics Part C (Seminars in medical Genetics)**, v. 148C, p. 89-98, 2008.
- McEWEN, B. S. Brain on stress: How the social environment gets under the skin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, p. 17180 – 17185, 2012.
- McEWEN, B.S.; GRAY, J.D.; NASCA, C. Recognizing resilience: Learning from the effects of stress on the brain. **Neurobiology of Stress**, v. 1, p. 1-11, 2015
- McKLVEEN, J. M. et al. The Medial Prefrontal Cortex: Coordinator of Autonomic, Neuroendocrine and Behavioural Responses to Stress. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 27, p. 446–456, 2015.
- McNAUGHTON, N.; CORR, P.J. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.28, 285305, 2004.
- McNAUGHTON, N.; CORR, P.J. Survival circuits and risk assessment. **Current Opinion in Behavioral Sciences**, v. 24, p. 14-20, 2018.
- MELONI, E. G. et al. Activation of raphe efferents to the medial prefrontal cortex by corticotropin-releasing factor: correlation with anxiety-like behavior. **Biology Psychiatry**, v. 63, p. 832-839, 2007.
- MICZEK, K. A.; THOMPSON, M. L.; SHUSTER, L. Opioid-Like Analgesia in Defeated Mice. **Science**, v. 215, p. 1520-1522, 1982.
- MIGUEL, T. T.; GOMES, K. S.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Tonic modulation of anxietylike behavior by corticotropin-releasing factor (CRF) type 1 receptor (CRF1) within the medial prefrontal cortex (mPFC) in male mice: role of protein kinase A (PKA). **Hormones and Behavior**, v. 66, p. 247-256, 2014.
- MORATO, S. O papel da visão na aversão aos espaços abertos no labirinto em cruz elevado. **Psicologia USP**, v. 17, p. 159-174, 2006.

MUSAZZI, L. Acute stress increases depolarization-evoked glutamate release in the rat prefrontal/frontal cortex: the dampening action of antidepressants. **PLoS One**, v. 5, p. e8566. 2010.

NAKAYASU, T., KATO, K. Is full physical contact necessary for buffering effects of pair housing on social stress in rats? **Behavioural Processes**, v. 86, p. 230–235, 2011.

NUTT, D. J. The pharmacology of human anxiety. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 47, n. 2, p. 233–266, 1990.

OLWEUS, D. Bullying at School: Long-Term Outcomes for the Victims and an Effective School-Based Intervention Program. In: HUESMANN, L. R.(Org.) **Aggressive Behavior**. New York: Plenum Press, 1994. p. 97-130.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde – CID-10**. Disponível em: <www.datasus.gov.br/cid10/v2008/cid10.ht... Acesso em: 20 jul. 2018.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K.B.J. **The mouse brain in stereotaxic coordinates**. Academic Press, California, USA, 2001.

PELLOW, S. et al. M. Validation of open-closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience and Methods**, v.14, p.149-67, 1985.

RADLEY, J. J.; ARIAS, C. M., SAWCHENKO, P. E. Regional differentiation of the medial prefrontal cortex in regulating adaptive responses to acute emotional stress. **The Journal of Neuroscience**, v. 26, 12967–12976. doi: 10.1523/jneurosci.4297-4306.2006, 2006.

RESSTEL, L. B. M.; CORREA, F. M. A. Medial prefrontal cortex NMDA receptors and nitric oxide modulate the parasympathetic component of the baroreflex. **European Journal of Neuroscience**, v. 23, p. 481–488, 2006.

ROBBINS, T. W.; MURPHY, E. R. Behavioural pharmacology: 40+ years of progress, with a focus on glutamate receptors and cognition. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 27, p. 141–148, 2006.

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

RODGERS, R. J. et al. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, V. 30, p. 289-304, 1997.

RODGERS, R. J.; JOHNSON, N. J. T. Factor Analysis of Spatiotemporal and Ethological Measures in the Murine Plus-Maze Test of Anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 52, p. 297-303, 1995.

SAITOH, A. et al. Activation of the Prelimbic Medial Prefrontal Cortex Induces Anxiety-Like Behaviors Via N-Methyl-D-Aspartate Receptor-Mediated Glutamatergic Neurotransmission in Mice. **Journal of Neuroscience Research**, v. 92, p. 1044-1053, 2014.

SANACORA, G.; TRECCANI, G.; POPOLI, M. Towards a glutamate hypothesis of depression. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 63–77, 2012.

SANT'ANA, M. K.; QUEVEDO, J. Psiconeuroendocrinologia. In: KAPCZINSKI, F.; QUEVEDO, K.; IZQUIERDO, I. (Orgs.) **Bases Biológicas dos Transtornos Psiquiátricos**. Artmed: Porto Alegre, 2000. P. 85-100.

SCOPINHO, A.A. et al. 2010. Acute reversible inactivation of the ventral medial prefrontal cortex induces antidepressant-like effects in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 214, p. 437-442, 2010.

SELYE, H. Stress and the general adaptation syndrome. **British Medical Journal**, v. 1, p. 1383-1392, 1950.

SHAH, A. A.; TREIT, D. Excitotoxic lesions of the medial prefrontal cortex attenuate fear responses in the elevated-plus maze, social interaction and shock probe burying tests. **Brain Research**, v. 969, p. 183-194, 2003.

SIEGFRIED, B.; FRISCHKNECHT, H. R.; NUNES DE SOUZA, R. L. An ethological model for the study of activation and interaction of pain, memory and defensive systems in the attacked mouse, role of endogenous opioids. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 14, p. 481-490, 1990.

SIMPSON-JR. J. R.; DREVETS, W. C.; SNYDER, A. Z.; GUSNARD, D. A.; RAICHLE, M. Emotion-induced changes in human medial prefrontal cortex: II. During anticipatory anxiety, **PNAS**, p. 688-693, 2001.

SINHA, R. et al. Dynamic neural activity during stress signals resilient coping. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 31, p. 8837-8842, 2016.

SORREGOTTI, T. et al. Amygdaloid involvement in the defensive behavior of mice exposed to the open elevated plus-maze. **Behavioural Brain Research**, v. 338, p. 159-165, 2018.

STEEL, Z. et al. The global prevalence of common mental disorders: a systematic review and meta-analysis 1980–2013. **International Journal of Epidemiology**, v. 43, p. 476–493, 2014

STERN, C. A. J. et al. Activity in prelimbic cortex is required for adjusting the anxiety response level during the elevated plus-maze retest. **Neuroscience**, v. 170, p. 214-222, 2010.

SULLIVAN, R. M.; GRATTON, A. Lateralized effects of medial prefrontal cortex lesions on neuroendocrine and autonomic stress response in rats. **The Journal of neuroscience**, v. 19, 2834-2840, 1999.

SULLIVAN, R.M.; GRATTON, A. Behavioral effects of excitotoxic lesions of ventral medial prefrontal cortex in the rat are hemisphere-dependent. **Brain Research**, v. 927, n. 1,p. 69-79, 2002

SWERDLOW, N. R. Substantia innominata: critical link in the behavioral expression of mesolimbic dopamine stimulation in the rat. **Neuroscience Letters**, v. 50, p. 19-25, 1984.

TAVARES, R. F., CORREA, F. M. A. , RESSTEL, L. B. M. Opposite role of infralimbic and prelimbic cortex in the tachycardiac response evoked by acute restraint stress in rats. **Journal of Neuroscience Research**, v. 87, p. 2601–2607, 2009.

TAVARES, R. F.; CORRÊA, F. M., Role of the medial prefrontal cortex in cardiovascular responses to acute restraint in rats. **Neuroscience**, v. 143, p. 231-240, 2006.

THE ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **PISA 2015 Results: Students' Well-Being**. Paris: OECD Publishing, 2017. v. 3.

TOVOTE P.; FADOK. J. P.; LUTHI, A. Neuronal circuits for fear and anxiety. **Nature Reviews**, v. 16, p. 317-331, 2015.

UHRICH, J. The social hierarchy in albino mice. **Journal of Comparative Psychology**, v. 25, p. 373-413, 1938.

VAILLANCOURT, T.; HYMEL, S.; MCDUGALL, P. The Biological Underpinnings of Peer Victimization: Understanding Why and How the Effects of Bullying Can Last a Lifetime. **Theory Into Practice**, v. 52, p. 241-248, 2013.

UYS, J. et al. Glutamate: The New Frontier in Pharmacotherapy for Cocaine Addiction. **CNS & Neurological Disorders - Drugs Targets**, v. 7, p. 482-491, 2008.

VALZELLI, L. **Psychology of Aggression and Violence**. Raven Press, New York, 1981.

VASCONCELOS, P. E. N. S. **Suscetibilidade e resiliência aos efeitos anedônicos da subjugação social prolongada em camundongos machos adolescentes: estudo da expressão cerebral do receptor serotoninérgico 5-HT₆**. 2017. 25 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, 2017.

VIANNA, D. M. Lesion of the Ventral Periaqueductal Gray Reduces Conditioned Fear but Does Not Change Freezing Induced by Stimulation of the Dorsal Periaqueductal Gray. **Learning & Memory**, v. 8, p. 164-169, 2001.

VICENTE. M. A. **Papel dos receptores do tipo 5-HT_{2c} do núcleo basolateral do complexo amigdalóide de ratos na modulação de comportamentos defensivos associados à ansiedade e ao pânico**. 2009. 81 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2009.

VILAR, L. S. **Efeitos ansiogênicos do óxido nítrico no córtex pre-frontal medial de camundongos**. 2011. 46 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Farmácia-Bioquímica) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates**. Geneva: World Health Organization, 2017. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254610/WHO-MSD-MER-2017.2-eng.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 4 jul 2018.

YUAN, P.; RAZ, N. Prefrontal cortex and executive functions in healthy adults: a meta-analysis of structural neuroimaging studies. **Neuroscience Biobehavioural Reviews**, v. 42, p. 180-192, 2014.

ZOTTIS, G. A. H. **Bullying na adolescência: Associação entre práticas parentais de disciplina e comportamento agressivo na escola**. 2012. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas: Psiquiatria) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Rio Grande do Sul. 2012