



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa Interinstitucional De Pós-Graduação Em Ciências Fisiológicas

Dissertação de Mestrado

**COMPORTAMENTO DEFENSIVO, PREJUÍZO NA MEMÓRIA E ATIVAÇÃO
DIFERENCIAL DO HIPOCAMPO DORSAL E VENTRAL EM CAMUNDONGOS
MACHOS SUBMETIDOS AO PROTOCOLO DE DERROTA SOCIAL**

Vinicius Fresca da Costa

**Araraquara, SP
- 2021**

Vinicius Fresca da Costa

Vinicius Fresca da Costa

**COMPORTAMENTO DEFENSIVO, PREJUÍZO NA MEMÓRIA E ATIVAÇÃO
DIFERENCIAL DO HIPOCAMPO DORSAL E VENTRAL EM CAMUNDONGOS
MACHOS SUBMETIDOS AO PROTOCOLO DE DERROTA SOCIAL**

Dissertação a ser apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas

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

Araraquara, SP
- 2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Vinicius Fresca da Costa, realizada em 26/11/2021.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza (UNESP)

Prof. Dr. Tarciso Tadeu Miguel (UFU)

Profa. Dra. Cleopatra da Silva Planeta (UNESP)

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

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar, minha família, que sempre esteve presente desde o início dessa jornada científica e é a figura que me incentivou desde a decisão por essa jornada de jaleco. Agradeço meu pai Edson, minha mãe Cássia, meu irmão Iago e minha irmã Iasmin, são minha base e minha energia para tudo que faço.

Agradeço minha namorada Nathalia, companheira ferrenha, que ia até mesmo aos sábados e domingos no laboratório para poder me acompanhar e se sentava ao meu lado, nas longas horas de leitura e escrita que se passaram.

Agradeço meus amigos do peito Reba, Claudinho, Walid e Luizão, que entre um churrasco e outro, escutavam sobre minhas investigações científicas e refletiam, argumentavam e eventualmente nem entendiam muito, mas com um sorriso no rosto, sempre admiravam a minha escolha pela academia, “O Vini sempre teve jeito para essas coisas”.

Aos integrantes do laboratório de Neuropsicofarmacologia, que fizeram falta no período de quarentena, foram inúmeras as vezes que na sala dos alunos, compartilhávamos conquistas, experimentos que deram errados, apresentações que deram certo, angústias do dia-a-dia. São muitos que passaram nesses quase 3 anos, mas faço questão de citar: Lilian, Lucas Gomes, Lucas Barreto, Leandro, Willian, Rodrigo, Carlão e Celina. Em especial para os alunos do nosso grupo, do professor Ricardo: Caterin, Natália, Diego, Daniela, Lucas Canto, Fernando, Bruna, Gessy, Ingrid e Mariana, que além de se enquadrarem no último agradecimento, somam-se os experimentos compartilhados, manhãs e tardes seguidas fazendo companhia um ao outro com nossos também rotineiros companheiros, camundongos.

Ao professor Ricardo Luiz Nunes de Souza, que desde o meu TCC na UFSCar, me aceitou dentro do grupo e abriu as portas para mim. O admiro como grande figura na ciência e também como pessoa, que sempre tem uma palavra gentil para mostrar uma alternativa para os rotineiros desafios de laboratório e da vida.

Aos professores do laboratório de Farmacologia, prof. Dr. Carlos Cesar Crestani, Prof. Dr. Marcelo Tadeu Marin e a Profa. Dra. Cleopatra da Silva Planeta, por manter o laboratório em forma comunitária, que vem contribuindo imensamente com a troca de conhecimento e de amizade entre os membros.

À secretária do departamento Tírene Pavanelli, como profissional e companheira do cafezinho, aos secretários do PIPGCF Alexandre Chiva (UFSCar) e Cláudia Molina (UNESP).

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCFar/UNESP) pelo espaço físico e equipamentos oferecidos para o desenvolvimento do projeto e ao Programa

Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PIPGCF-UFSCar/
UNESP) pela a oportunidade.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

RESUMO

O hipocampo (HPC) é uma área do encéfalo bem conhecida por regular a memória e a navegação espacial, mas também por ser uma estrutura cerebral muito plástica e que é influenciada por outras áreas como o córtex pré-frontal medial (CPFm), bem como por estímulos relacionados ao estresse. No presente estudo, investigamos os efeitos da exposição ao estresse de derrota social crônica (EDS) em camundongos machos sobre (i) o comportamento de evitação social avaliado no teste de interação social (TIS); (ii) o comportamento do tipo ansioso no labirinto em cruz elevado (LCE); (iii) a memória de curto prazo no teste de reconhecimento de objetos (RO); (iv) a verificação da presença de projeções do CPFm esquerdo para o HPC dorsal e ventral (HPCd e HPCv); (v) a marcação de Δ FosB, CaMKII, bem como a dupla marcação de Δ FosB + CaMKII em neurônios localizados no HPCd e HPCv. Os resultados mostraram que o EDS crônico induziu comportamentos do tipo ansioso e prejuízo da memória de curto prazo, seguido por diminuição e aumento na marcação de Δ FosB no HPCd e HPCv, respectivamente. No HPCv, também foi demonstrado aumento na marcação CaMKII. Houve presença de projeções do CPFm esquerdo para HPCd e HPCv. Juntos, esses achados sugerem que a exposição crônica de camundongos ao EDS pode induzir (a) ativação de neurônios glutamatérgicos no HPCv, levando a um aumento nas respostas ansiogênicas, e (b) inibição do HPCd, causando prejuízo da memória de curto prazo. Dado que o EDS crônico também prejudica o funcionamento do CPFm esquerdo, esses efeitos induzidos pelo EDS nos comportamentos e no HPCv e HPCd podem estar relacionados a alterações na modulação do CPFm esquerdo sobre a atividade neuronal do hipocampo.

Palavras-chaves: Ansiedade; Hipocampo; Córtex Pré-Frontal medial; Camundongo; Estresse de derrota social; Evitação social; Prejuízo na memória; Neurotransmissão glutamatérgica; Neuroanatomia; Neurotracejamento.

ABSTRACT

The hippocampus (HPC) is a brain area well known to regulate memory and spatial navigation but also known to be a very plastic brain structure that is influenced by other areas like the medial prefrontal cortex (mPFC) as well as by stress-related stimuli. In the present study, we investigated the effects of the exposition of chronic social defeat stress (SDS) in male mice on (i) the avoidance behavior assessed in the social interaction test (SIT); (ii) the anxiety-like behavior in the elevated plus-maze (EPM); (iii) the working memory in the object recognition test (ORT); (iv) The presence of projections from the left mPFC to the dorsal HPC and ventral HPC (dHPC and vHPC) was also investigated (v) Δ FosB, CaMKII as well as Δ FosB+CaMKII labeling in neurons located in the dorsal and ventral hippocampus (d & vHPC). Results showed that chronic SDS induced defensive- and anxiety-like behaviors and memory impairment, followed by decrease and increase in Δ FosB labeling in the dHPC and vHPC, respectively. In the vHPC, an increase in the CaMKII labeling was also shown. There was a presence of projections from the left mPFC to both dHPC and vHPC. Together, these findings suggest that chronic exposure of mice to SDS may have (a) overactivated glutamatergic neurons in the vHPC, leading to an increase in defensive- and anxiogenic-like responses, and (b) inhibited the dHPC, causing memory impairment. Given that chronic SDS also impairs the left mPFC functioning, these SDS-induced effects on behavior and vHPC & dHPC may be related to a failure of the left mPFC control on the neuronal activity of the hippocampus.

Keywords: Anxiety; Hippocampus; Medial Prefrontal Cortex; Mice; Chronic Social Defeat Stress; Social avoidance; Memory impairment; Glutamatergic neurotransmission; Neuroanatomy; Neuronal tracing

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	4
RESUMO	6
ABSTRACT.....	7
1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVO	16
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4 RESULTADOS	26
5 DISCUSSÃO	39
6 CONCLUSÃO	46
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

1 INTRODUÇÃO

Aproximadamente 264 milhões de pessoas no mundo sofrem de transtornos de ansiedade (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017), o que seria equivalente a 125% da população total do Brasil (“Population, total | Data”, [s.d.]; “Population Clock: World”, [s.d.]). Tais transtornos são causados por má adaptações a estímulos estressores, causando respostas psicofisiológicas temporárias ou permanentes (DEL GIUDICE; ELLIS; SHIRTCLIFF, 2011; RUSSO et al., 2012).

O estresse pode induzir uma série de comportamentos relacionados a ansiedade e depressão (HOFFMAN; DUKES; WITTCHEN, 2008; LEUNER; SHORS, 2013; PÉREZ-CANO et al., 2020; SHIN; LIBERZON, 2010) e prejuízo de memória de curto prazo (LUPIEN et al., 1994; MCEWEN; SAPOLSKY, 1995; SEEMAN et al., 1997). Um dos estímulos que pode causar tais transtornos é o conflito social (BOLGER et al., 1989; NEZLEK; PLESKO, 2001).

Alguns modelos animais tem sido usados nos últimos anos para o estudo de confrontos sociais em animais da mesma espécie, fenômeno conhecido como estresse de derrota social (EDS) [para uma revisão, ver (TOYODA, 2017)]. O EDS se destaca por se tratar de um conflito entre coespecíficos, no qual um animal dominante residente ataca um intruso, resultando na exibição de diversos comportamentos defensivos no animal agredido, como respostas do tipo ansiosa, tanto em camundongos (RODGERS; COLE, 1993), quanto em outros roedores (FUCHS; FLÜGGE, 2002). Inicialmente descrito por Yen e colaboradores (YEN; STANGER; MILLMAN, 1959), esse procedimento tornou-se amplamente utilizado para o estudo da neurobiologia da agressão [para uma revisão ver (MICZEK et al., 1994; SIEGFRIED; FRISCHKNECHT; NUNES DE SOUZA, 1990)] e das consequências do estresse crônico sobre diversos parâmetros comportamentais, fisiológicos, farmacológicos e moleculares (KRISHNAN et al., 2007; ZELENA et al., 1999). Posteriormente, tal paradigma foi otimizado e padronizado para fazer tal avaliação em roedores (GOLDEN et al., 2011).

Devido às alterações comportamentais, endócrinas e fisiológicas induzidas pela derrota social, tem-se proposto este modelo para o estudo de desordens comportamentais, tais como depressão, abuso de drogas e ansiedade social (BJÖRKQVIST, 2001; KEENEY; HOGG, 1999; LAVIOLA et al., 1999; STEIN; BOUWER, 1997). Além disso, recentemente, nosso grupo tem usado o modelo EDS para a investigação de comportamentos defensivos dos camundongos atacados/intrusos (FARIA; LAVERDE; NUNES-DE-SOUZA, 2020; SANTOS-COSTA et al., 2021; VICTORIANO et al., 2020a).

Outro modelo animal bastante utilizado para a pesquisa do comportamento do tipo ansioso em roedores, é o labirinto em cruz elevado (RODGERS; DALVI, 1997). Na década de 50, Montgomery (MONTGOMERY, 1955) conduziu trabalhos com labirintos em forma de Y e notou que os ratos tinham preferência pelos braços fechados neste aparato, defendendo a hipótese sobre dois diferentes *drives*, o de exploração e o do medo, que se conflitavam neste aparato. Pautada nesta discussão, quase trinta anos depois, um novo modelo baseado no labirinto em Y foi desenvolvido para melhor análise deste conflito, estudando os comportamentos do tipo ansioso em roedores, o labirinto em X elevado ou mais comumente conhecido, labirinto em cruz elevado (HANDLEY; MITHANI, 1984). Amplamente utilizado para análise do comportamento tipo ansioso em manipulações farmacológicas (HANDLEY; MITHANI, 1984; LISTER, 1987; PELLOW et al., 1985), ele também tem sido usado de forma a analisar variações deste comportamento em protocolos de estresse (ADAMEC; SHALLOW, 1993; BATSCHAUER et al., 2020), assim como o próprio EDS (MORAIS-SILVA et al., 2019; SANTOS-COSTA et al., 2021; VICTORIANO et al., 2020a).

Além de acentuar comportamentos do tipo ansioso, o estresse também se mostrou capaz de reduzir a formação de memórias (EAGLE; FITZPATRICK; PERRINE, 2013; LI et al., 2012; NAVA-MESA; LAMPREA; MÚNERA, 2013), com efeitos sobre o Hipocampo ((BARKER; WARBURTON, 2011; TUSCHER et al., 2018)) e o córtex (AKIRAV; MAROUN, 2006; BARKER et al., 2007; TUSCHER et al., 2018), como possíveis áreas afetadas pelo estresse e com modulação da memória. Considerando essa alteração comportamental, o teste de

reconhecimento de objetos (para revisão, LEGER et al., 2013), é uma boa escolha para a análise de memória de curto prazo. Com os estudos de Berlyne, também na década de 50 (assim como os de Montgomery) (BERLYNE, 1950), sobre o poder que um estímulo novo tem sobre os ratos, quase quarenta anos depois, foram propostos os primeiros modelos de um teste de única exposição, o teste de reconhecimento de objetos (AGGLETON, 1985; ENNACEUR; DELACOUR, 1988). Posteriormente, esse teste também foi adaptado para camundongos (DODART; MATHIS; UNGERER, 1997; MESSIER, 1997) e tem sido utilizado tanto para manipulações farmacológicas (CANTO DE SOUZA et al., 2017; HAETTIG et al., 2011; LIMA et al., 2009), quanto comportamentais, como de interesse comum de nosso grupo, para protocolos de estresse (MOURA et al., 2020; PROVENSÍ et al., 2019) e EDS (DUQUE; VINADER-CAEROLS; MONLEÓN, 2016; TIAN; XU; GUI, 2018; WANG et al., 2011).

Dentre os estudos que investigam as respostas defensivas de roedores, uma das regiões encefálicas que se destacam por direta modulação aos estímulos estressores, é o Córtex Pré-Frontal medial (CPFm) (CERQUEIRA; ALMEIDA; SOUSA, 2008; SULLIVAN; GRATTON, 1999). Apesar de ser uma região que difere bastante em relação a nomenclatura adotada ao longo das espécies (DALLEY; CARDINAL; ROBBINS, 2004; VAN HEUKELUM et al., 2020), há definição para quatro sub-regiões no CPFm de roedores, o pré-limbico (PrL), o infra-limbico (IL) e as áreas 1 e 2 do córtex cingulado anterior (Cg1 e Cg2) (BRODMANN, 1909; ROSE; WOOLSEY, 1948). A inibição específica do PrL com cloreto de cobalto (inibidor sináptico;(KRETZ, 1984), foi capaz de causar efeitos ansiogênicos em ratos expostos a testes de ansiedade e medo (LISBOA et al., 2010). Em estudo recente do nosso grupo, também demonstramos que a inibição específica somente do PrL esquerdo de camundongos, foi capaz de gerar respostas ansiogênicas na exploração do LCE (SANTOS-COSTA et al., 2021), indicando assim, uma sub-região de interesse, para estudos de comportamentos defensivos.

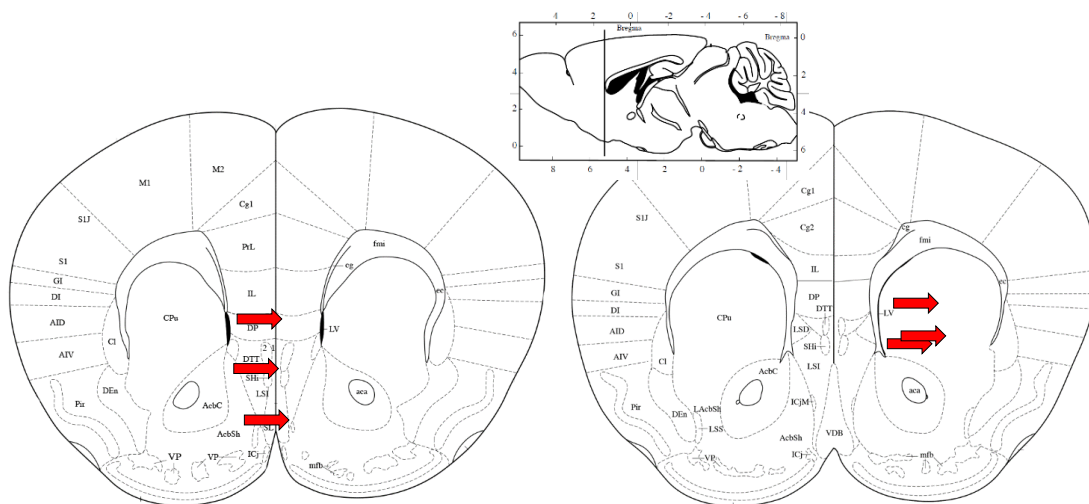


Figura 1: Representação diagramática baseada no atlas de Paxinos & Watson (PAXINOS; FRANKLIN, 2001); em vermelho, as 3 sub-regiões do CPFm, o pré-lobulocuneado (PrL), o infra-lobulocuneado (IL) e o córtex cingulado anterior - Áreas 1 e 2 (Cg1 e Cg2) 1,54 mm e 1,42 mm anterior ao Bregma.

Como citado anteriormente, há diferença funcional, a depender do hemisfério manipulado no CPFm, alterando o padrão de comportamentos defensivos apresentados (COSTA et al., 2016; LEE et al., 2015; SANTOS-COSTA et al., 2021). Já demonstramos em estudos do grupo o papel do CPFm direito na modulação de resposta ao EDS (FARIA; LAVERDE; NUNES-DE-SOUZA, 2020; VICTORIANO et al., 2020b). No mesmo estudo já citado (SANTOS-COSTA et al., 2021), além dos efeitos ansiogênicos na inibição do PrL esquerdo no LCE, houve também aumento de atividade neuronal (no PrL e no IL) no lado direito após tal inibição. Esse mesmo padrão foi encontrado, quando os animais submetidos ao EDS, apresentaram redução da atividade neuronal (redução da expressão de Δ FosB e CaMKII) no CPFm esquerdo e aumento da atividade neuronal (aumento da expressão de Δ FosB e CaMKII) no CPFm direito, indicando mais uma vez, a lateralização funcional desta área em relação aos comportamentos defensivos.

O CPFm e o hipocampo (HPC) têm projeções recíprocas que também regulam a resposta ao estresse (CERQUEIRA et al., 2007; GOLDMAN-RAKIC; SELEMON; SCHWARTZ, 1984; IRLE; MARKOWITSCH, 1982; PADILLA-

COREANO et al., 2016; ROSENE; VAN HOESEN, 1977; SANT'ANA et al., 2019), formando assim um sistema de via dupla. O HPC apresenta direta modulação à respostas defensivas e da ansiedade, (WINGENFELD; WOLF, 2014) e sua função também é afetada por estímulos estressores (KIM; DIAMOND, 2002). Duas das suas sub-regiões ganham destaque nestes estudos, o HPC dorsal (HPCd) relacionado a localização e a memória espacial (BANNERMAN et al., 2004a; MOSER et al., 1995) e o HPC ventral (HPCv) relacionado a modulação ao estresse e a respostas emocionais (BANNERMAN et al., 2004a). Ainda que estudos anteriores tenham delimitado cada uma destas regiões para cada processo, tanto o HPCd, quanto o HPCv tem funções complementares nos processos de memória espacial, quanto no de resposta emocional ao estresse. Ainda neste aspecto, o HPCv já foi relacionado a memória espacial (CERNOTOVA; STUCHLIK; SVOBODA, 2021) e recuperação de memória (RIAZ et al., 2017), enquanto o HPCd também estaria modulando comportamentos do tipo ansioso, com a participação de uma série de neurotransmissores, quando exposto ao estresse (HARTMANN et al., 2019a; SANT'ANA et al., 2019). Além disso, quando exposto ao estresse, o hipocampo apresentou alterações morfológicas: como supressão da neurogênese no Giro Dentado, perda das espinhas neuronais da região 1 do Corno de Amon (CA1), atrofia dos dendritos da região CA3 e diminuição de volume (MCEWEN, 1999a), e mesmo antes de expostos a estímulos estressores, animais suscetíveis ao estresse apresentaram menor volume hipocampal (NASCA et al., 2019).

O hipocampo tem seus neurônios organizados em camadas e recebe informações de quase todas áreas neocorticais, via córtex perirrinal, giro parahipocampal e córtex entorrinal (CE) (VAN STRIEN; CAPPAERT; WITTER, 2009), onde a camada II de neurônios, tem projeções das células granuladas para o giro dentado (GD) (STRANGE et al., 2014). Vale ressaltar que mesmo essas projeções são distintas entre o HPCv e HPCd (SWANSON; COWAN, 1977). Comunicando-se com o GD, estão presentes as regiões CA1 e CA3, que possuem quatro camadas (piramidal, stratum oriens, stratum lucidum, stratum radiatum) (LAVENEX; AMARAL, 2000). Todas essas sub-regiões interligadas formam um

sistema com feed-forward (sistema de alimentação anteroativo), que pode ser crítico para a memória e aprendizado, mas que também contribui para a vulnerabilidade durante o estresse (LAVENEX; AMARAL, 2000). Dado que demonstramos recentemente que o CPFm esquerdo e direito são afetados diferencialmente pelo EDS (SANTOS-COSTA et al., 2021), eventual lateralização funcional do hipocampo no controle da ansiedade (no atual estudo, utilizando o EDS) permanece a ser determinada.

Diversas ferramentas têm sido utilizadas para caracterizar o envolvimento de uma área do encéfalo na modulação de uma resposta comportamental, fisiológica ou farmacológica. Nesse contexto, a quantificação da expressão de proteínas da família Fos em regiões encefálicas tem sido amplamente utilizada para esse fim (BAILEY; SILVER, 2014; NESTLER, 2015; NESTLER; BARROT; SELF, 2001). Para identificar o envolvimento de uma área particular do encéfalo em animais cronicamente estressados, o fator de transcrição Δ FosB tem sido bastante útil, sendo o fator com maior estabilidade molecular, cumulativo frente a um estímulo sustentado (assim como o estresse crônico) e amplamente usado para a pesquisa comportamental (NESTLER, 2008; NESTLER; KELZ; CHEN, 1999).

Além do padrão de ativação destas regiões, é válido verificar qual neurotransmissão é utilizada para modulação do estresse. Na região do HPC, há a predominância de neurônios glutamatérgicos presentes nas células granulosas do giro dentado e neurônios piramidais da região CA1 e CA3 (CITRI; MALENKA, 2008). O desbalanço desta neurotransmissão está intimamente interligado a fisiopatologia dos transtornos de ansiedade e humor em humanos e roedores, em especial para os mediados pelos receptores N-Metil-D-Aspartato (NMDA) (MCEWEN, 1999b; NASCA et al., 2015; SANACORA; TRECCANI; POPOLI, 2012).

Com neurotransmissão em comum e relevante comunicação entre o HPC e o CPFm regulando a resposta ao estresse (CERQUEIRA et al., 2007; GOLDMAN-RAKIC; SELEMON; SCHWARTZ, 1984; IRLE; MARKOWITSCH, 1982; PADILLA-COREANO et al., 2016; ROSENE; VAN HOESEN, 1977; SANT'ANA et al., 2019),

levantamos a hipótese de que os comportamentos defensivos, do tipo ansioso de roedores e evocados pelo uso do EDS, são regulados via neurotransmissão glutamatérgica e com alteração no padrão de comunicação entre CPFm esquerdo/hipocampo. Para testar nossa hipótese, nós investigamos os efeitos da exposição ao estresse de derrota social crônica (EDS) em camundongos machos sobre (i) o comportamento de evitação social avaliado no teste de interação social (TIS); (ii) o comportamento do tipo ansioso no labirinto em cruz elevado (LCE); (iii) a memória de curto prazo no teste de reconhecimento de objetos (RO); (iv) a marcação de Δ FosB, CaMKII, bem como a dupla marcação de Δ FosB + CaMKII em neurônios localizados no hipocampo dorsal e ventral (HPCd e HPCv); (v) a presença de projeções do PrL (CPFm) esquerdo para o HPCd e HPCv também foi investigada via BDA (Dextran Amine-Texas Red® , Biotinylated; Vector Laboratories) (KIMET *et al.*, 2019).

2 OBJETIVO

2.1 Objetivos Gerais

Investigar (a) possíveis alterações comportamentais decorrentes da exposição ao estresse de derrota social (EDS), (b) identificar potenciais projeções do CPFm ao HPC e (c) a participação da neurotransmissão glutamatérgica no HPC de camundongos estressados.

2.2 Objetivos específicos

1. Verificar o comportamento associados a ansiedade e memória de animais socialmente derrotados cronicamente e submetidos ao teste de interação social, no labirinto em cruz elevado e no teste de reconhecimento de objetos.
2. Verificar nas porções dorsal e ventral do hipocampo projeções provenientes do CPFm através de microinjeção intra Pré Limbico esquerdo de BDA (neurotraçador anterógrado)
3. Investigar o padrão de atividade hipocampal através da quantificação Δ FosB, e marcação neuronal de CaMKII, e colocalizações Δ FosB/CaMKII em camundongos submetidos ao EDS.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Sujeitos

Cinquenta camundongos Swiss-Webster machos [(Universidade Estadual Paulista / UNESP, SP, Brasil) (proveniente do biotério central da UNESP, SP de Botucatu, SP)], com 7 semanas de idade e 35 camundongos agressores Swiss-Webster machos, com cerca de 6 a 8 meses de idade, foram usados para realizar o presente estudo. Os indivíduos atacados foram alojados em grupos de 10 por gaiola (41 × 34 × 16 cm) e mantidos sob um ciclo claro/escuro de 12: 12 h (luzes às 07:00 h) em um ambiente com temperatura controlada (23 ± 1 °C). Comida e água estavam disponíveis *ad libitum*, exceto durante breves períodos de teste. Todos os sujeitos eram ingênuos no início dos experimentos e foram usados apenas para esse experimento e eutanasiados ao fim deste. Os camundongos agressores foram alojados individualmente em suas residências (28 x 17 x 12 cm) e usados mais de uma vez por meio de um esquema de rotação definido pelo experimentador.

3.2 Cirurgia estereotáxica e injeção de neurotraçador

Os camundongos foram submetidos a cirurgia estereotáxica para receber 0,1 µL do traçador neuronal anterógrado BDA (Dextran AmineTexas Red®, Biotinylated-Vector Laboratories). O procedimento cirúrgico utilizou anestesia inalatória com isoflurano (concentração de indução de 4-5% + 0,8-1 L / min e concentração de manutenção de 1-3% + 0,8-1 L / min) e inserção da agulha de injeção no CPFm esquerdo, seguindo as coordenadas: 1,9 mm posterior ao bregma; 0,3 mm lateral ao bregma; 2,0 mm ventral à superfície do crânio. As soluções foram infundidas com o suporte de uma bomba (Micro4 Micro seringa Pump) acoplada a uma seringa (0,5 µL, Neuros Syringe, modelo 7000,5 KH, 32 gauge) a uma taxa de 0,02 µL / min (volume final 0,1 µL). Ao final da infusão do traçador neuronal, a agulha permaneceu no encéfalo do animal por 5 minutos para difundir o líquido. Ao final da cirurgia estereotáxica, os animais receberam injeção subcutânea do anti-inflamatório e analgésico cetoprofeno (ácido benzeno acético,

5 mg / kg) e injeção intramuscular do antibiótico ceftriaxona (ceftriaxona hemipenta-hidratada sódica, 4 mg / kg) (STEPANOVIC-PETROVIC et al., 2014).

3.3 Estresse Crônico de Derrota Social (EDS)

O EDS consiste em um conflito entre coespecíficos, no qual um animal agressor residente dominante ataca um intruso, resultando na exibição de diversos comportamentos defensivos no animal atacado. O residente, animal que apresenta comportamento agressivo espontâneo, é isolado socialmente em gaiolas individuais (28 × 17 × 12 cm) com ventilação separada por pelo menos 4 semanas para intensificar seu comportamento agressivo. Por causar mudanças comportamentais, endócrinas e fisiológicas, o modelo de derrota social foi proposto para o estudo de distúrbios comportamentais [por exemplo, depressão, abuso de drogas e ansiedade social. A derrota social é definida pela exibição da postura submissa (elevação do corpo nas patas traseiras, patas dianteiras estendidas em direção ao agressor, cabeça retraída e orelhas arqueadas por pelo menos 3 segundos), ou por um período máximo de 3 minutos de agressão, o que ocorrer primeiro. Posteriormente, o animal intruso foi colocado em um recipiente perfurado (15,5 cm x 10,6 cm x 4,8 cm), no qual ainda podia cheirar e ver o animal residente, mas sem contato físico, período a que chamamos de derrota psicológica, por 5 minutos. Esse procedimento foi realizado sob luz vermelha (5 lux), por um total de 10 dias consecutivos (sessões).

3.4 Interação Não Agressiva (INA)

INA consiste em uma interação entre membros da mesma família, ou seja, animais que vivem na mesma gaiola. Semelhante ao protocolo EDS, os animais foram colocados no mesmo modelo de caixa, no qual dois animais interagiram por 3 minutos. Posteriormente, um dos animais (escolhido ao acaso) foi colocado em um recipiente perfurado (15,5 x 10,6 x 4,8 cm) por 5 minutos. Após esse período, os animais trocavam de posição, o que ficava preso no recipiente ia para fora e vice-versa, por mais 5 minutos. Este procedimento também foi realizado sob luz vermelha (5 lux) e por um total de 10 dias consecutivos (sessões). Os protocolos

usados para as sessões de EDS e INA foram semelhantes aos descritos por Golden e colegas (2011).

3.5 Teste da Interação Social (TIS)

Os sujeitos foram colocados individualmente na extremidade oposta da caixa de contenção de arame da arena de interação social, que é um aparelho que consiste em uma caixa de acrílico cinza opaca (42 × 42 × 15 cm) com uma caixa de contenção de arame (10 × 6 × 15 cm) centrado em uma das paredes, com a zona de interação em torno dela e duas zonas de espaçamento em cantos opostos, voltados para o lado oposto do alvo vazio, para avaliar a exploração da linha de base por 150 segundos (habituação). Após esse tempo, cada intruso foi removido da arena e um residente agressor foi colocado no alvo. O intruso era então colocado de volta na arena por mais 150 segundos para avaliar o comportamento da interação social. Todas as sessões foram gravadas sob iluminação de luz vermelha (5 lux no chão da arena) por uma câmera montada verticalmente ligada a um monitor e a arena foi cuidadosamente limpa com álcool 20% entre cada sujeito.

3.6 Labirinto em cruz elevado (LCE)

Um dos primeiros estudos usados para validar o comportamento de exploração de braços abertos e fechados foi o de Montgomery (MONTGOMERY, 1955), no protótipo do que seria o LCE, porém ainda em formato em Y. Nos anos seguinte outros grupos adaptaram este aparato como usado hoje (HANDLEY; MITHANI, 1984; PELLOW et al., 1985) e por fim adaptado para camundongos (LISTER, 1987). Desde então vem sendo frequentemente usado como teste comportamental para mensurar o comportamento do tipo ansioso (RODGERS; DALVI, 1997). A principal medida usada para indicar variações deste comportamento é o tempo gasto nos braços abertos (PELLOW et al., 1985).

O LCE usado neste estudo é composto de dois braços abertos (30 × 5 × 0,25 cm) e dois braços fechados (30 × 5 × 15 cm) conectados por meio de uma plataforma central comum (5 × 5 cm). O aparelho foi construído em madeira (piso)

e vidro transparente (paredes transparentes) e foi elevado a uma altura de 38,5 cm acima do nível do chão. Cada camundongo foi colocado em uma gaiola de contenção individual e posteriormente transportado para a sala do labirinto. O teste começou colocando o sujeito na plataforma central do labirinto (de frente para um braço aberto), após isto, o experimentador se retirou imediatamente para uma sala adjacente. As sessões de teste duraram 5 minutos e o labirinto foi cuidadosamente limpo com álcool a 20% entre cada sujeito. Todos os experimentos foram realizados sob iluminação de 1×60 W durante a fase de luz do ciclo claro-escuro (ou seja, 50 lux no piso da área central do LCE), com diferença da luminosidade do EDS e TIS, para evitar memória de contexto.

Todas as sessões foram gravadas por uma câmera montada verticalmente ligada a um monitor. As sessões foram pontuadas às cegas para o tratamento por um observador altamente treinado (confiabilidade intraexaminador $\geq 0,90$) usando o software "X-Plo-rat 2005", (X-plo-rat 2005, Universidade de São Paulo) para comportamento análise. Os parâmetros comportamentais compreenderam as medidas espaço temporais convencionais: frequências de entradas de braço fechado (CE) [(medida usada para avaliar a atividade motora do animal (CRUZ et al, 1994)] e entradas de braço aberto (OE) (entrada = todas as quatro patas em um braço) e o tempo gasto no braço aberto do labirinto. Esses dados foram usados para calcular a porcentagem de entradas de braço aberto [(% OE) - (aberto / total) $\times 100$] e a porcentagem de tempo de braço aberto (% OT) [(tempo aberto / 300) $\times 100$].

3.7 Teste de Reconhecimento de Objeto (RO)

Desde os estudos de Berlyne (BERLYNE, 1950), o fator novidade vem sendo usado para mensurar a memória tanto de curto prazo, quanto de longo prazo de roedores, por meio do teste de RO (AGGLETON, 1985; DODART; MATHIS; UNGERER, 1997; ENNACEUR; DELACOUR, 1988). Ainda que tenham alguns modelos diferentes, nosso grupo optou por seguir o modelo de Ennaceur e Delacour (ENNACEUR; DELACOUR, 1988) com o uso da habituação prévia, sem os objetos presentes na arena (FRICK; GRESACK, 2003; LEGER et al., 2013).

O paradigma RO mede uma forma de memória baseada em experimentos curtos e não repetidos sem qualquer reforço, como comida ou choques elétricos. O reconhecimento de objetos é uma tarefa de uma única tentativa e não envolve o aprendizado de nenhuma regra, sendo inteiramente baseado no comportamento exploratório espontâneo de roedores em relação a objetos. Em resumo, os camundongos foram colocados em uma caixa quadrada de madeira laminada de 40 × 40 cm revestida com um laminado de plástico e cercados por uma parede de 50 cm de altura com piso de fácil limpeza e iluminação de 1 × 60 W durante a fase de luz do ciclo claro-escuro (50 lux no piso da área central). Os objetos a serem discriminados eram frutas coloridas de plástico: dois saleiros na forma de um abacaxi e um em forma de abacate, ambos de 10 cm de altura.

A tarefa de RO consistiu em uma fase de treinamento (T1) e uma fase de teste (T2). Vinte e quatro horas antes do T1, eles foram habituados por 10 min ao aparato experimental na ausência de qualquer objeto. Cada camundongo foi submetido ao procedimento separadamente e o cuidado foi tomado para remover quaisquer pistas olfativas/sabor, limpando cuidadosamente a arena e objetos teste entre as tentativas. No dia do experimento, o camundongo foi colocado por 5 min na arena de teste voltado para a mesma direção e na mesma posição na presença de dois objetos de plástico idênticos (T1). O comportamento dos camundongos foi registrado, e o tempo gasto explorando ativamente os objetos foi medido por dois observadores experientes, desconhecendo a condição dos camundongos (estressados ou NA) o aparato foi cuidadosamente limpo com álcool a 20% entre cada sujeito..

A exploração foi definida como cheirar ou tocar objetos com o nariz e/ou patas dianteiras. Sentar ou girar ao redor dos objetos não era considerado comportamento exploratório. T2 foi realizado 2 h após T1, onde cada camundongo foi novamente colocado na arena de teste por 5 min na presença de um dos objetos familiares (F) e um objeto novo (N). A posição dos objetos (esquerda/direita) foi randomizada para evitar viés de ordem ou preferência de lugar. Os camundongos foram colocados em uma gaiola temporária entre as tentativas. O comportamento dos camundongos durante o T2 foi registrado, e os períodos de

exploração do familiar (tF) e do novo objeto (tN) foram medidos por um observador experiente, inconsciente da condição de estresse. Um índice de discriminação (ID) foi calculado de acordo com a fórmula $(tN - tF) / (tN + tF)$. Cuidados foram tomados para evitar preferência de lugar e estímulos olfatórios, alterando aleatoriamente a posição dos dois objetos durante T2, e limpando-os cuidadosamente com álcool 20% (tanto em T1, quanto em T2).

3.8 Imunofluorescência

Após o TIS, os camundongos foram perfundidos transcárdialmente com 24 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) 1X em pH 7,4, seguido por 50 mL de PFA fresco. Os encéfalos removidos foram fixados posteriormente em paraformaldeído por 1 hora e transferidos para uma solução de sacarose a 30% em PBS 4 ° C. Após 2 dias, o encéfalo foi congelado em gelo seco por 1 hora e mantido a -80 ° C, até ser fatiado em seções coronais de 35 µm de espessura (entre 2,54 mm e 3,08 mm posterior ao Bregma) no criostato (Leica CM 1850). Vale ressaltar que foi feita uma marca, com uma agulha, no lado direito do encéfalo para ter certeza sobre o hemisfério que estava sendo quantificado. As fatias foram alocadas de forma seriada em placas de 12 poços de forma que cada em um dos poços contivesse 8 fatias em bregmas semelhantes.

Para o Δ FosB e CaMKII duplamente marcados, as seções foram colocadas em série em uma placa de 12 poços contendo tampão fosfato 0,1 M (PB) com azida de sódio 0,01%. As seções foram lavadas 3 vezes em 0,1 M PB e, em seguida, incubadas em bloco numa solução, contendo 10% de soro normal de cabra e 0,3% de Triton-X 100 em 0,1 M PB, por 1 hora em temperatura ambiente com agitação suave. As seções foram incubadas durante a noite com o anticorpo primário previamente diluído em uma solução de bloqueio. Os anticorpos primários usados foram: anti- Δ FosB (1: 1000, cat. No. EPR15905, Abcam) e anti-mouse CaMKII (cat. No. TH269517: 6G9, Thermo Fischer Scientific. Rockford - IL, EUA - na concentração 1: 200). Os cortes foram lavados 5 vezes em 0,1 M PB e, a seguir, incubados por 2 horas à temperatura ambiente com anticorpo secundário (1: 1000 cada) diluído em solução de bloqueio. Os anticorpos secundários usados

foram: IgG Alexa-Fluor 488 anti-rabbit (1: 1000, cat. No. A21206, Life Technologies Co. Eugene-OR, EUA) e IgG Alexa-Fluor 568 anti-mice (1: 1000, cat No. A11004, Life Technologies Co. Eugene-OR, EUA). Após a incubação secundária, as seções foram lavadas 5 vezes em 0,1 M PB, montadas em lâminas de vidro, cobertas usando Fluoroshield Mounting Medium e seladas com esmalte de unha, uma vez curadas.

As imagens foram obtidas em ampliação de 10X, 20X e 40X através de um microscópio de fluorescência (Axio Imager.D2, Carl Zeiss Microscopy, LLC, Thornwood-NY, EUA) conectado a um computador e digitalizadas pelo software Zen Pro 2.0 (Carl Zeiss Microscopy, LLC, Thornwood-NY, EUA). A quantificação da fluorescência foi realizada no software ImageJ (NIH), utilizando a técnica "Corrected total cell fluorescence". Nesta técnica o programa mede a fluorescência da área definida, entretanto, a fluorescência emitida pelo fundo (background) é removida do valor final (FITZPATRICK, 2014). Os valores obtidos referem-se a uma média obtida com 3-4 cortes de cada sujeito experimental/área.

Para a marcação BDA, as fatias contendo as regiões do encéfalo de interesse foram montadas em lâminas gelatinizadas e lamínulas. Posteriormente, as projeções do CPFm esquerdo para o HPCv e HPCd foram observadas via microscópio de fluorescência (Axio Imager.D2, Carl Zeiss Microscopy, LLC, Thornwood-NY, EUA).

3.9 Delineamento experimental

3.9.1 Experimento 1: Análise comportamental de camundongos submetidos a derrota social crônica ou a interação não agressiva

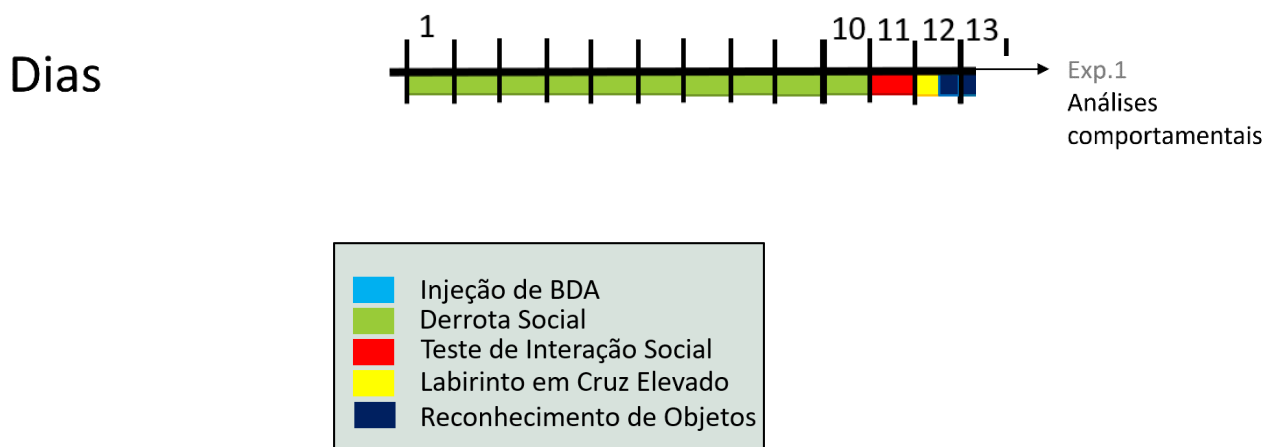
Vinte animais foram submetidos a dez sessões de EDS (n = 11) ou interação não agressiva (NA) (n = 9) (ver seção 2.4 para detalhes) e então expostos à interação social (11º dia), labirinto em cruz elevado (12º dia) e testes de reconhecimento de objetos (13º dia).

3.9.2 Experimento 2: Avaliação das projeções do CPFm esquerdo no hipocampo HPCd e HPCv marcadas via BDA e análise qualitativa da expressão de Δ FosB, CaMKII e Δ FosB + CaMKII

Quatro camundongos receberam microinfusão de traçador neuronal dentro do CPFm esquerdo (ver seção 2.2 para detalhes), e, após doze dias, foram eutanasiados, e seus encéfalos removidos e histologicamente processados para análises de projeção em neurônios do HPCd e HPCv que expressam Δ FosB, CaMKII, e marcação Δ FosB + CaMKII.

2.9.3 Experimento 3: Padrão de ativação neuronal (Δ FosB) e sua correlação com a neurotransmissão glutamatérgica (CaMKII) nas áreas do hipocampo de camundongos submetidos a EDS ou INA

Vinte animais foram submetidos a dez sessões de EDS (n = 10) ou INA (n = 10) (ver seção 2.4 para detalhes), e, após 24 horas, foram eutanasiados, e seus encéfalos foram removidos para ensaio de imunofluorescência para identificar Δ FosB, CaMKII e Δ FosB + CaMKII em neurônios bilateralmente marcados no hipocampo ventral e dorsal. Um grupo experimentalmente ingênuo (n = 6) também foi adicionado a este experimento para registrar os níveis basais de imunofluorescência. Este grupo também incluiu o uso de BDA, já que em um primeiro delineamento, seria o usado o TIS para screening de animais resilientes/suscetíveis ao estresse, posteriormente, esse screening não obteve resultados esperados e teve sua avaliação descartada, porém sem influência aos resultados obtidos neste experimento.



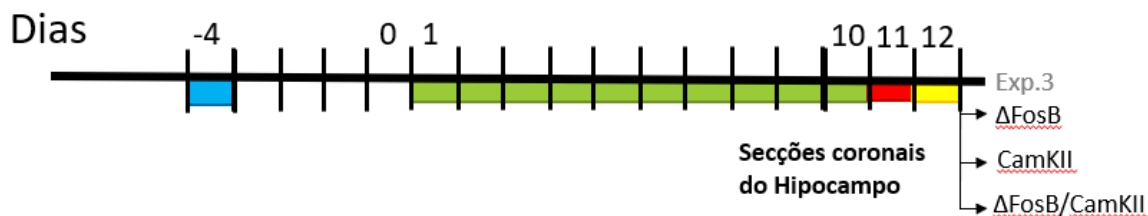


Figura 2. Delineamento experimental dos experimentos 1 e 3.

3.10 Estatística.

Todos os resultados foram inicialmente submetidos ao teste de Levene para homogeneidade de variância. No TIS, a análise de variância (ANOVA) de duas vias para medidas repetidas foi usada para avaliar os dados [fator 1: condição (INA ou estresse); fator 2: alvo (sem alvo ou com alvo)]. O LCE e o RO foram analisados usando-se o teste t de Student para amostras independentes. Os dados de imunistoquímica foram analisados por meio da ANOVA de uma via, considerando-se o fator estresse (ingênua x não agressiva x estresse). Quando significativa, os dados da ANOVA foram analisados adicionalmente usando-se o teste post hoc de comparações múltiplas de Duncan. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.

3.11 Ética: Os protocolos experimentais foram conduzidos de acordo com os princípios éticos do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa local (CEUA / FCF -UNESP: protocolo número 23/2020).

4 RESULTADOS

4.1 Experimento 1: EDS crônico aumenta o comportamento defensivo e prejudica a memória

4.1.1 Teste de interação social

A Figura 3 representa o tempo gasto na (A) zona de interação (ZI) ou (B) zona de afastamento (ZA) exibida por camundongos submetidos a interação não agressiva (INA; $n = 9$) e submetidos as derrotas (EDS; $n = 11$) na ausência (sem alvo) e presença (alvo) de um residente da mesma espécie. Uma ANOVA de duas vias para medidas repetidas indicou efeitos significativos para o tempo de exploração no ZI para a condição [F (1,36) = 9,61; $p < 0,05$] e alvo [F (1,36) = 58,82; $p < 0,05$] fatores, mas não para interação entre fatores [F (1,36) = 1,90; $p > 0,05$]. O teste post hoc revelou que os camundongos INA exploraram mais o ZI na presença do que na ausência do alvo. Em contraste, os camundongos EDS passaram menos tempo no ZI na presença do que na ausência do alvo (Fig.3A). A ANOVA de dois fatores para medidas repetidas também indicou mudanças significativas na ZA para a condição [F (1,36) = 4,22; $p < 0,05$] e alvo [F (1,36) = 9,09; $p < 0,05$] mas não para interação entre fatores [F (1,36) = 3,25; $p > 0,05$]. O teste post hoc revelou que o grupo EDS também passou mais tempo na ZA com o alvo em comparação com a situação em que o alvo não está presente (Fig.3B).

A Figura 3C representa a razão de interação social no ZI e ZA de camundongos INA e EDS. O teste t de Student indicou uma diminuição no ZI [t (18) = 2,23, $p < 0,05$] e aumento no ZA [t (18) = -1,21, $p < 0,05$]. Esses resultados demonstraram um aumento no comportamento de evitação social no grupo EDS em comparação com o grupo INA (Fig.3C).

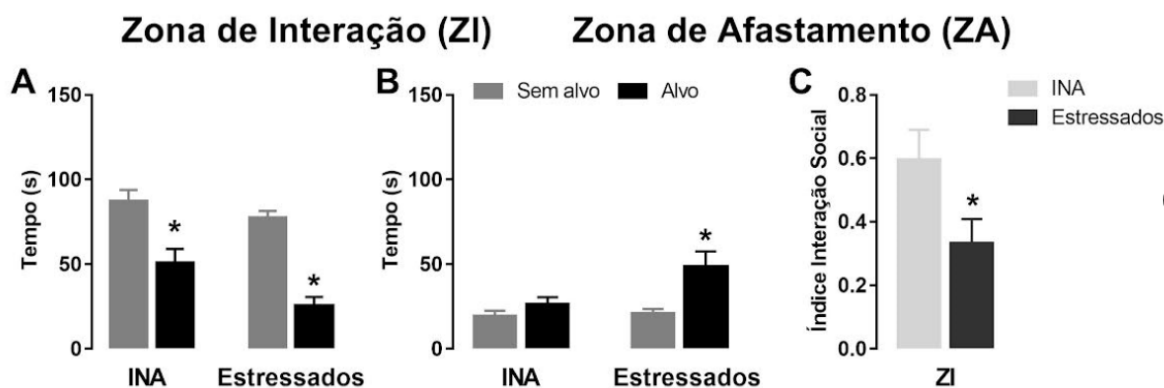


Figura 3. O estresse crônico de derrota social induz comportamento de evitação social em camundongos. (A) Camundongos EDS ($n = 11$) passam menos tempo na zona de interação (ZI) com um alvo não familiar em comparação com os camundongos INA ($n = 9$). (B) Tempo gasto na zona de afastamento (ZA) na ausência e presença do alvo. (C) Taxa de interação social no ZA. As barras representam a média (+ SEM). * $p < 0,05$ em comparação com a sem o alvo do respectivo grupo ou com o grupo INA. INA, interação não agressiva; EDS, estresse de derrota social.

4.1.2 Labirinto em Cruz Elevado

A Figura 4 representa a porcentagem de entradas e tempo no braço aberto (A), e a frequência de entradas no braço fechado (B) de camundongos submetidos a interação EDS ou INA e expostos ao LCE. O teste t de Student indicou que os animais EDS ($n = 11$) apresentaram uma redução na porcentagem de tempo de braço aberto em comparação com os animais INA ($n = 9$) tempo ($t(18) = 2,40$; $p < 0,05$) (Fig. 4A). Não foram encontradas diferenças significativas para o número de entradas no braço fechado ($t(18) = 1,03$; $p > 0,05$) (Fig. 2B). Esses resultados demonstraram um aumento no comportamento do tipo ansioso no grupo EDS em comparação com o grupo INA.

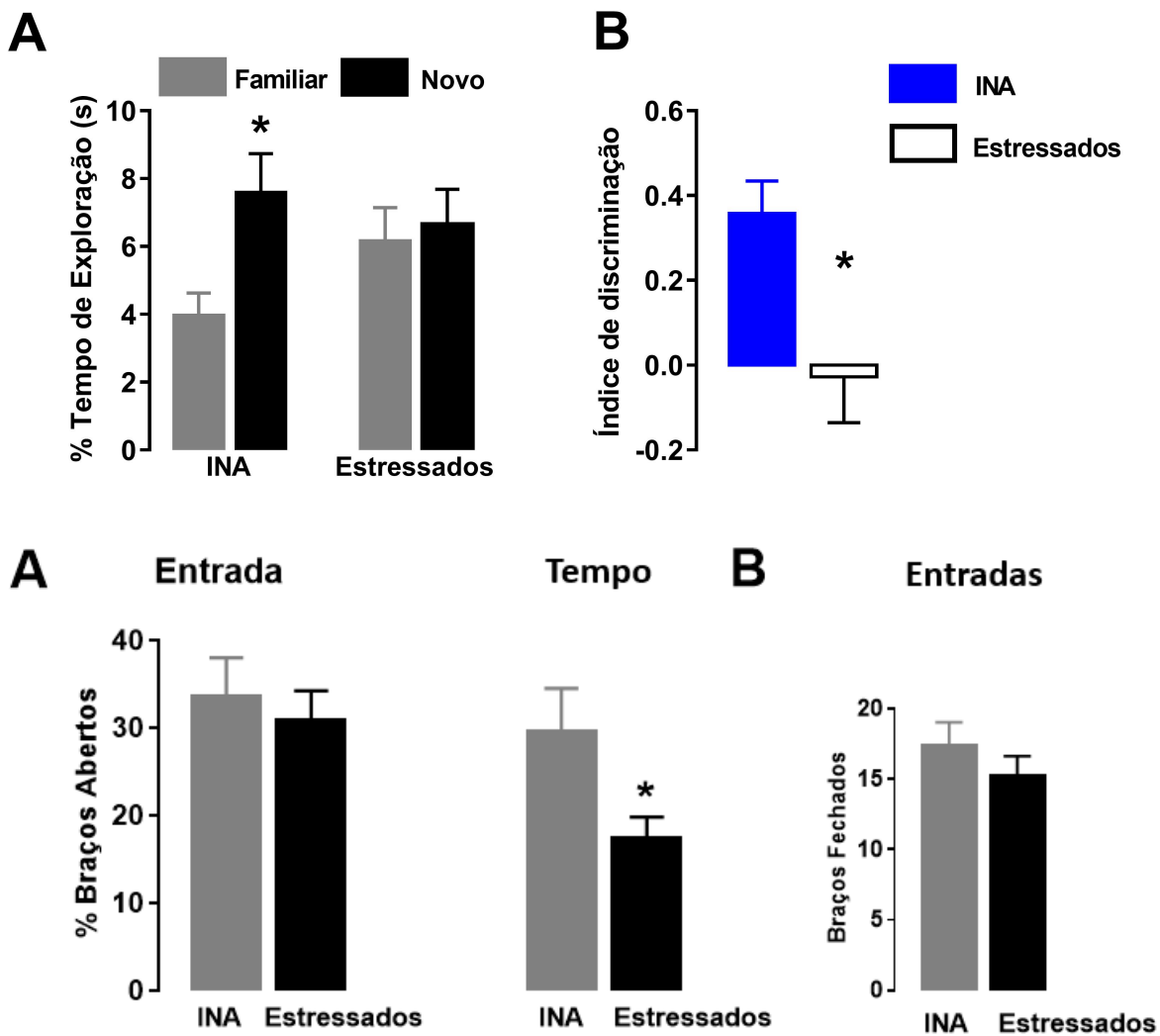


Figura 4. O estresse de derrota social crônica (EDS) induz comportamento semelhante à ansiedade em camundongos. (A) Porcentagem de entradas e porcentagem de tempo no braço aberto do LCE. (B) Frequência de entradas de braço fechado no LCE. As barras representam a média (+ SEM). * $p < 0,05$ comparado ao grupo INA. INA, interação não agressiva; EDS, estresse de derrota social.

4.1.3 Teste de reconhecimento de memória (RO)

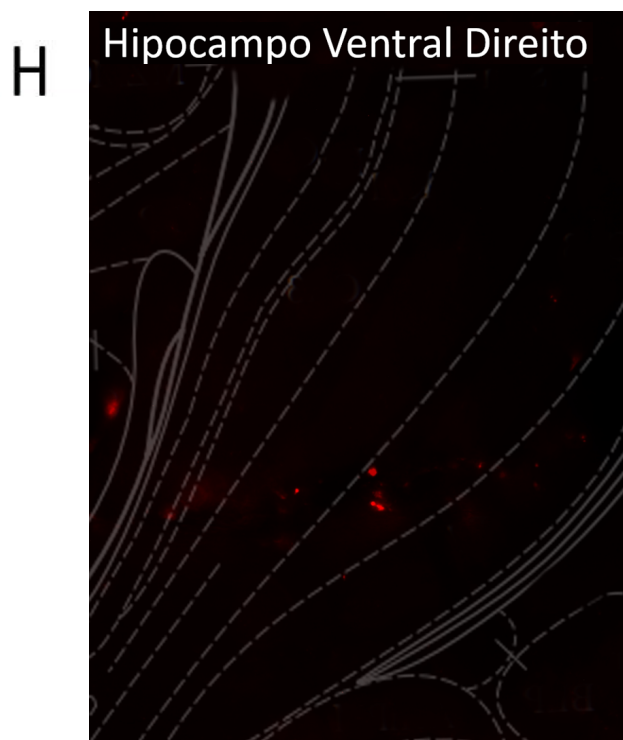
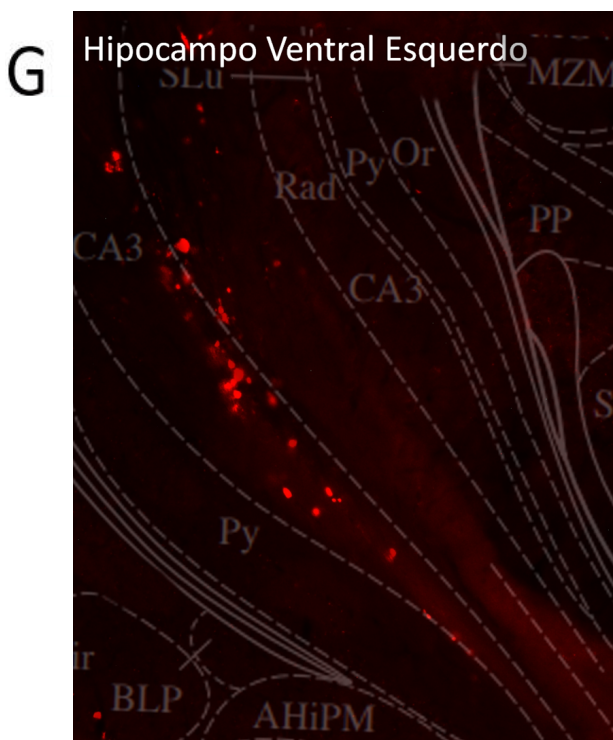
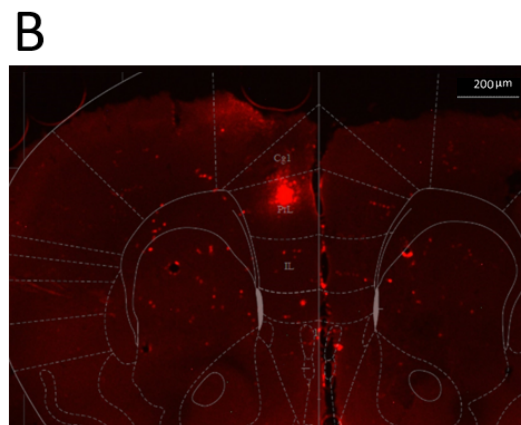
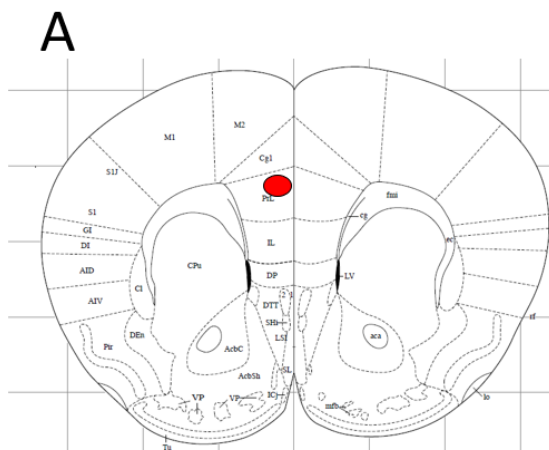
A Figura 5 representa o tempo gasto explorando objetos novos ou familiares (A) e o índice de discriminação (B). A ANOVA de duas vias revelou efeito significativo para o fator objeto [$F(1,36) = 4,26$; $p < 0,05$] mas não para o fator condição [F

(1,36) = 3,82; $p > 0,05$] ou para interação entre o tratamento e a porcentagem de tempo gasto explorando objetos novos ou familiares [$F(1,36) = 2,49$; $p > 0,05$] (Fig. 5A). O teste t de Student indicou que os animais EDS ($n = 11$) têm um índice de discriminação prejudicado em comparação com os animais INA ($n = 9$) ($t(18) = 2,77$; $p < 0,05$) (Fig. 5B). Esses resultados demonstraram um comprometimento da memória do grupo EDS em comparação com o grupo INA.

Figura 5. A Memória de reconhecimento de objetos do grupo EDS foi prejudicada em camundongos. (A) Porcentagem de tempo gasto explorando o objeto familiar e novo no RO. (B) Índice de Discriminação no RO. As barras representam a média (+ SEM). * $p < 0,05$ comparado ao grupo INA. INA, interação não agressiva; EDS, estresse de derrota social.

4.2 Experimento 2: A injeção de BDA no CPFm esquerdo atinge HPCd e HPCv, onde a marcação Δ FosB, CaMKII e Δ FosB + CaMKII são expressas.

A Figura 6 mostra o local de injeção de BDA, o PrL esquerdo (Fig. 6A), a migração do traçador neuronal BDA para o hipocampo dorsal (Fig. 6C e 6D) e para o ventral (Fig. 6E e 6F) e um representação diagramática do corte marcado via BDA do HPC (Fig. 6G).



F

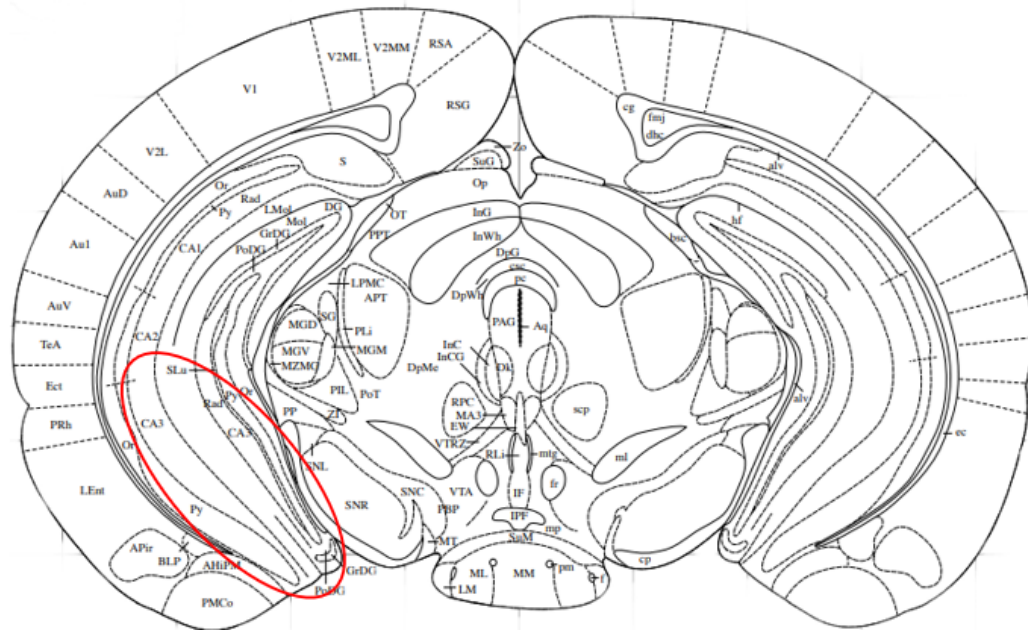


Figura 6: Fotomicrografias representativas da injeção do BDA. (A) Figura representativa do PrL esquerdo, representação diagramática baseada no atlas de Paxinos & Watson (2001) (PAXINOS; FRANKLIN, 2001). (B) Local de microinjeção de BDA no PrL esquerdo (barra de escala= 200 μ m). (C) Figura representativa do HPCd e (F) HPCv, representação diagramática baseada no atlas de Paxinos & Watson (2001) (PAXINOS; FRANKLIN, 2001). Projeções marcadas via BDA no HPCd

esquerdo (D); no HPCd direito (E); no HPCv esquerdo (G) e no HPCv direito (H). (D, E, G e H, barra de escala= 20 μ m);

4.3 Experimento 3: O estresse de derrota social crônica provoca efeitos diferenciados na marcação neuronal Δ FosB, CaMKII e Δ FosB + CaMKII no HPCd e HPCv.

A Figura 7 mostra uma fotomicrografia ilustrativa de cortes de imunofluorescência de neurônios marcados com Δ FosB (Fig.7A) e CaMKII (Fig. 7B) no HPCd.

A Figura 8 representa o padrão de ativação em Δ FosB, CaMKII e Δ FosB + CaMKII no HPCd. Para o Δ FosB, a ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo para o fator condição ($F(2, 30) = 10,47, P < 0,05$), mas sem efeito significativo para o fator lado ($F(1, 30) = 0,8213, P > 0,05$), e entre o fator interação ($F(2, 30) = 0,6967, P > 0,05$). A análise post hoc de Duncan revelou uma diminuição na expressão de Δ FosB nos lados direito e esquerdo do HPCd em animais que foram submetidos ao EDS crônico (Fig. 8B).

Nas avaliações para a imunofluorescência CaMKII, a ANOVA de duas vias não revelou efeitos significativos para nenhum fator [Condição ($F(2,30) = 0,448, P > 0,05$); Lado ($F(1, 30) = 0,1368, P > 0,05$); Interação ($F(2,30) = 0,09977, P > 0,05$)]. Uma falta de efeitos semelhante foi revelada para a marcação Δ FosB + CaMKII no HPCd [Condição ($F(2,30) = 1,796, P > 0,05$); Lado ($F(1, 30) = 0,404, P > 0,05$); Interação ($F(2,30) = 0,1197, P > 0,05$)].

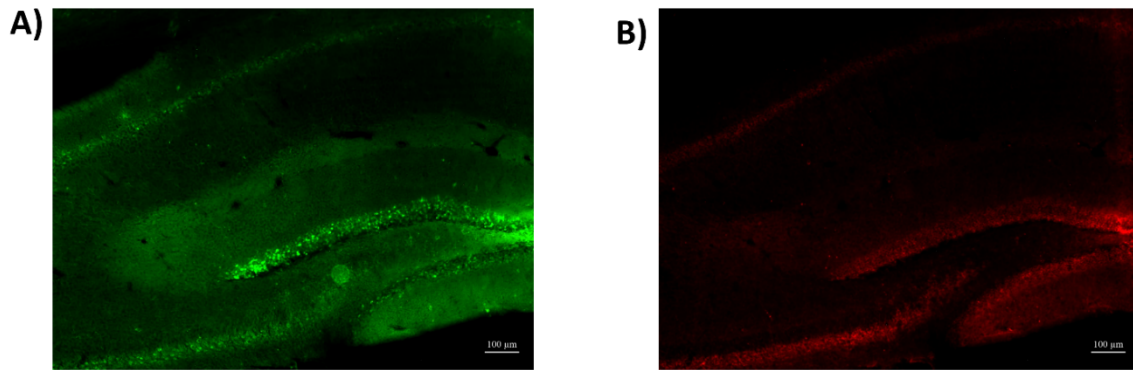
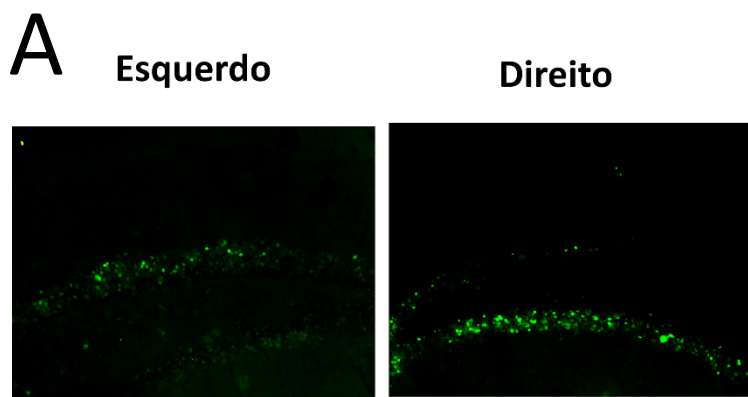


Figura 7: Fotomicrografia representativa no aumento de 10X de neurônios marcados positivamente para (A) Δ FosB e (B) CaMKII no hipocampo dorsal. Bregma: -1,94 (barra de escala= 100 μ m).



B

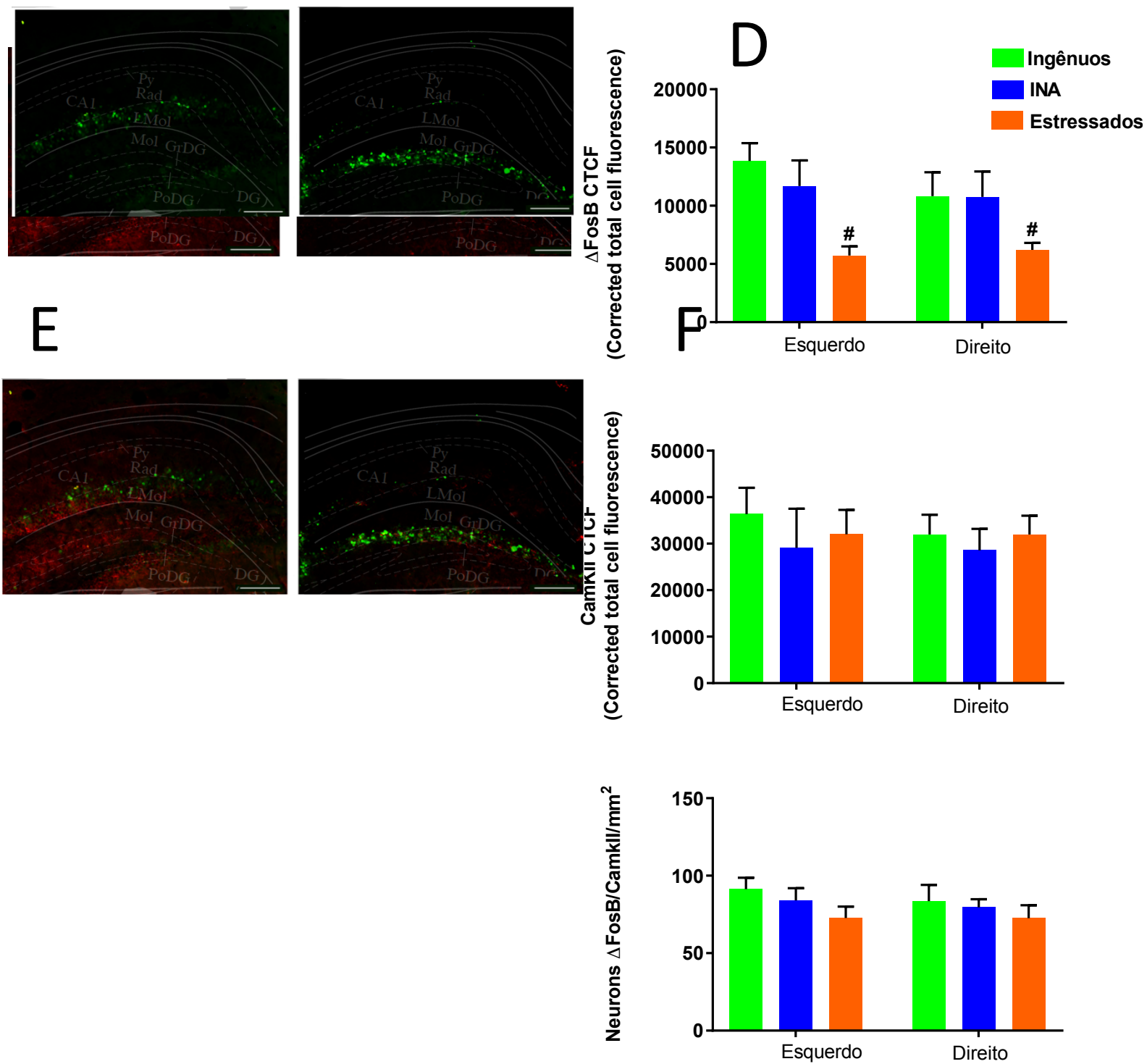


Figura 8: (A) Fotomicrografias das regiões esquerda e direita do hipocampo dorsal em um aumento de 20X representativo da marcação neuronal positiva para Δ FosB, (D) CaMKII e (E) colocalização Δ FosB + CaMKII em animais ingênuos, ou submetidos à interação INA ou EDS (Estressado) (A, C e E, barra de escala= 50 μ m). (B) Avaliação da fluorescência total corrigida (CTCF) para Δ FosB, (D) CaMKII e (F) colocalização Δ FosB + CaMKII por mm² no hipocampo dorsal. As barras representam as médias e o erro padrão da média (+ EPM). #p < 0,05 comparado ao grupo ingênuo e NA; n = 5-7 por grupo.

A Figura 9 representa o padrão de ativação em Δ FosB, CaMKII e Δ FosB + CaMKII no HPCv. Para o Δ FosB, a ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo para o fator de condição ($F(2, 30) = 16,58, P > 0,05$), mas sem efeito significativo para o fator lado ($F(1, 30) = 0,02, P > 0,05$), e interação entre fatores ($F(2, 30) = 0,99, P > 0,05$). A análise post hoc de Duncan revelou um aumento na expressão de Δ FosB nos lados direito e esquerdo do HPCv em animais que foram submetidos ao EDS crônico (Fig. 9B).

Nas avaliações para a imunofluorescência CaMKII, a ANOVA de duas vias revelou efeito significativo para o fator de condição ($F(2, 30) = 12,72, P > 0,05$), mas nenhum efeito significativo para o fator lado ($F(1, 30) = 0,23, P > 0,05$) e interação entre os fatores ($F(2,30) = 0,18, P > 0,05$). A análise post hoc de Duncan revelou um aumento na expressão de CaMKII nos lados direito e esquerdo do HPCv em animais que foram submetidos a EDS crônico (Fig. 9D). As análises estatísticas de colocalizações para Δ FosB + CaMKII no hipocampo ventral também revelaram efeitos significativos para o fator de condição ($F(2, 30) = 9,96, P > 0,05$), mas nenhum efeito significativo para o fator lado ($F(1, 30) = 0,05, P > 0,05$) e interação entre os fatores ($F(2, 30) = 0,07, P > 0,05$). O teste post hoc de Duncan revelou uma redução da marcação Δ FosB + CaMKII no HPCv de animais expostos a EDS em comparação com grupos INA e ingênuo (Fig. 9F).

A

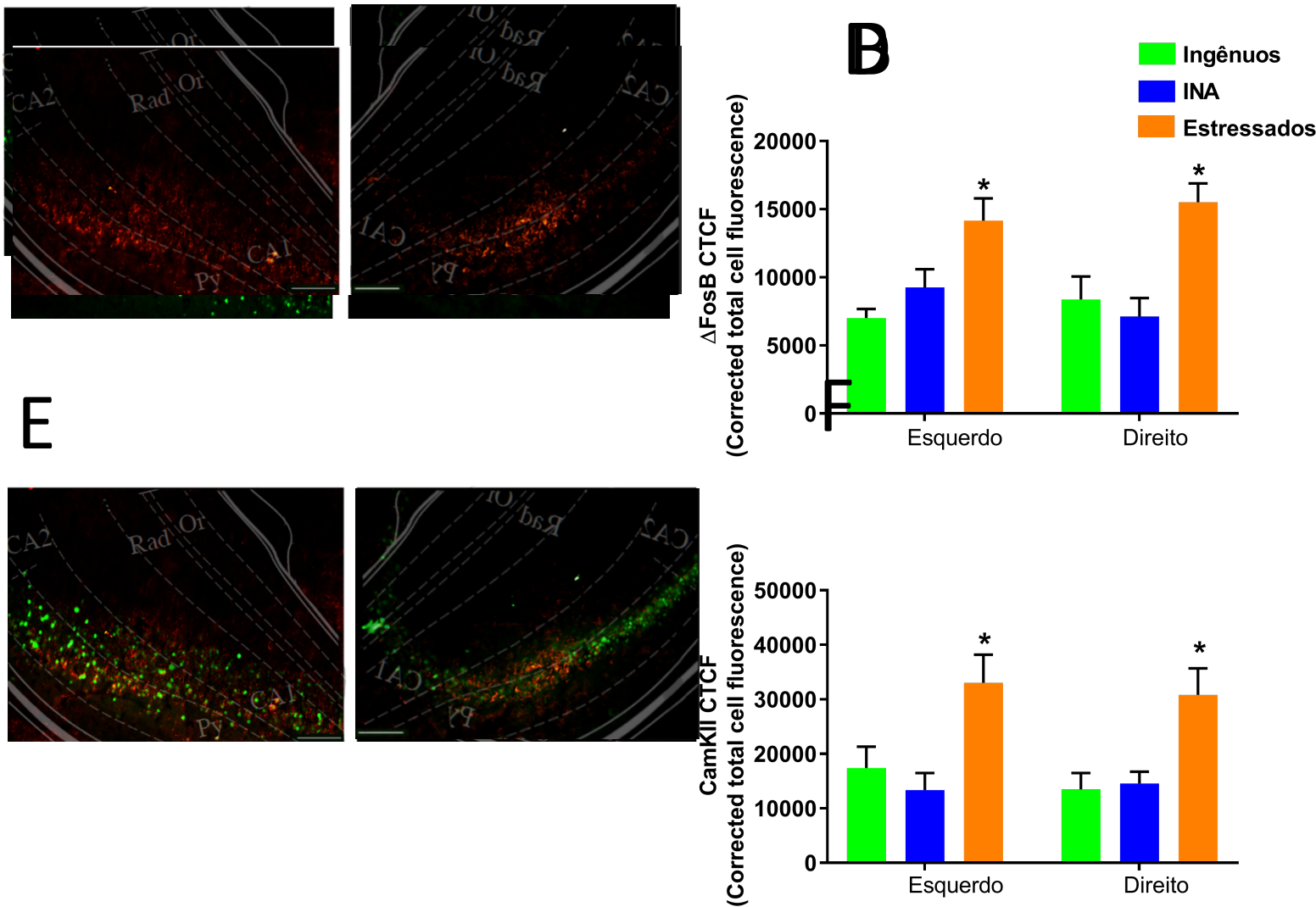
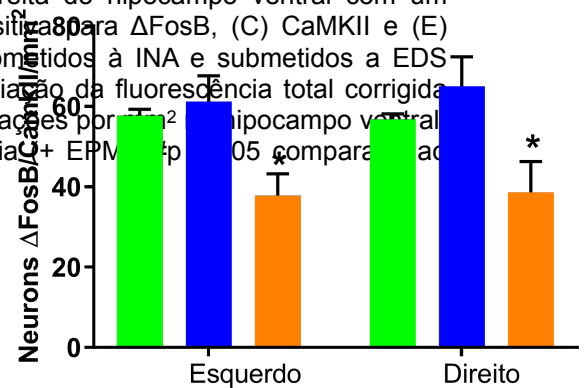
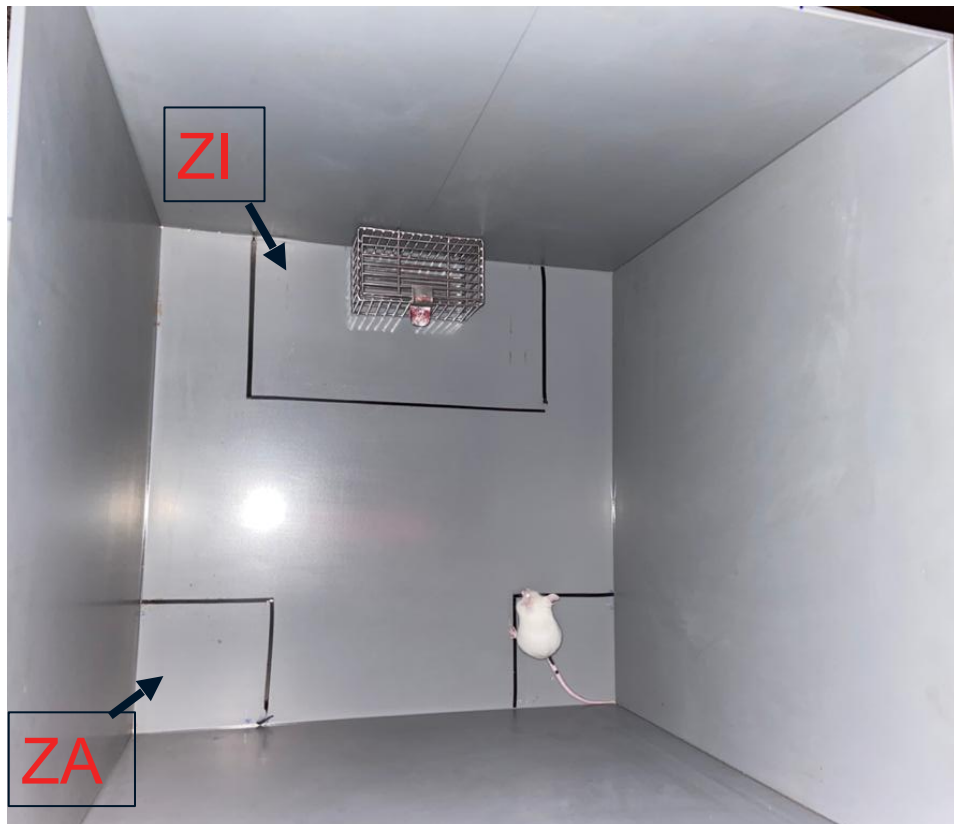


Figura 9: (A) Fotomicrografias das regiões esquerda e direita do hipocampo ventral com um aumento de 20X representativo da marcação neuronal positiva para Δ FosB, (C) CaMKII e (E) Colocalizações; Δ FosB / CaMKII em animais ingênuos, submetidos à INA e submetidos a EDS (Estressados). (A, C e E, barra de escala= 50 μ m) (B) Avaliação da fluorescência total corrigida (CTCF) para Δ FosB, (D) CaMKII e (F) Δ FosB / CaMKII localizações por μ m² no hipocampo ventral. As barras representam as médias e o erro padrão da média. * p < 0,05 comparando o grupo ingênuo e NA; n = 5-7 por grupo.



5 DISCUSSÃO



Neste estudo, observamos mais uma vez que o protocolo de EDS é capaz de alterar o padrão comportamental dos animais, desde evitação social, até alterações no comportamento de tipo ansioso e prejuízo na memória de curto prazo. Outro achado que corrobora trabalhos anteriores do grupo é o envolvimento não somente do CPFm como um todo, mas especificamente da região do PrL esquerdo, tendo comunicações marcadas (ou seja, projeções diretas) por BDA, tanto para o HPCd quanto HPCv (para ambos os lados, mesmo que em proporções diferentes). Sobre estas duas últimas regiões, nas análises de imuno-histoquímica, encontramos diferenças no padrão de ativação das proteínas Δ FosB/CaMKII, com diminuição bilateral na expressão de Δ FosB no HPCd e aumento bilateral na expressão de Δ FosB e CaMKII no HPCv nos animais

estressados, indicando assim a diferença do papel destas regiões na modulação de comportamentos defensivos e da memória.

Os testes comportamentais demonstraram que o protocolo de EDS foi capaz de gerar comportamentos defensivos, principalmente os do tipo ansioso. No teste de interação social, os animais demonstraram evitação social, principalmente



pelo tempo gasto na zona de afastamento na presença de um animal residente, um resultado semelhante aos obtidos no protocolo que nos baseamos neste estudo (GOLDEN et al., 2011). Como estudado por Montgomery (MONTGOMERY, 1955), os camundongos apresentam dois *drives*, o do medo e o da exploração, que somado aos estudos de Berlyne (BERLYNE, 1950), que abordavam a preferência pela novidade e curiosidade destes animais, indicando o comportamento mais comum destes animais no TIS, interagir com o coespecífico residente. Este realmente é o comportamento observado para os animais

expostos a INA, porém o mesmo não ocorre para os submetidos ao EDS, que evitam explorar esta região onde um residente semelhante (residente/agressor nunca usado no protocolo EDS do animal testado) está presente. Este comportamento, a evitação social, tem sido encontrado até mesmo em animais que apenas testemunham o EDS, sem nunca ter tido contato corporal com um residente/agressor (CARNEVALI et al., 2020; WARREN et al., 2013).

Figura 10: Aparato usado no TIS. ZI: Zona de interação, ZA: Zona de afastamento.

Aqui vale a menção de que os resultados obtidos neste protocolo, para os animais INA, foram diferentes do que normalmente foi encontrado em testes de TIS (GOLDEN et al., 2011; SANTOS-COSTA et al., 2021), já que em nosso estudo este grupo evitou também a zona de interação do alvo. Algumas hipóteses foram levantadas para explicar esse desvio de resultado, no teste que usamos como base (GOLDEN et al., 2011), o alvo utilizado impossibilita que os animais o subam, já no nosso caso, isso foi possível e observamos que os animais acabam passando bastante tempo sobre a gaiola sem o animal residente. Outro possível motivo é a leva de animais, notamos que algumas delas os animais vinham mais estressados por si só e em outros, não. O que nos leva a esse motivo é que em resultados não usados neste estudo, em datas bem próximas, os animais INA não demonstraram evitação a zona de interação, mesmo com a presença do animal alvo. Atualmente já adquirimos um recipiente que impossibilita a subida dos animais nele, logo nossos próximos estudos devem ter esse resultado mais próximo dos estudos usados como base e também outros resultados do próprio grupo.

Figura 11: Aparato usado no LCE.

No labirinto em cruz elevado, os animais demonstraram uma diminuição no tempo gasto nos braços abertos do labirinto, compatível com efeito ansiogênico causado pelo EDS, tanto em protocolos agudos (BERTON et al., 1999; LIEBSCH et al., 1995; RODGERS; COLE, 1993), quanto crônicos (AVGUSTINOVICH;

KOVALENKO; KUDRYAVTSEVA, 2005). Além disso, estímulos estressores, de maneira geral, parecem suscitar tal efeito, já que outros protocolos de estresse, também foram capazes de induzir aumento de comportamento do tipo ansioso no LCE. Dentre eles, destacam-se os de restrição (GAMEIRO et al., 2006; MANCHANDA; JAGGI; SINGH, 2011), de isolamento social (HERMES et al., 2011; WEISS et al., 2004) e de instabilidade social (GREEN; BARNES; MCCORMICK, 2013; SAAVEDRA-RODRÍGUEZ; FEIG, 2013). Este conjunto de comportamentos do tipo ansioso também foi demonstrado em estudos anteriores do nosso grupo (COSTA et al., 2016; FARIA; LAVERDE; NUNES-DE-SOUZA, 2020; SANTOS-COSTA et al., 2021; VICTORIANO et al., 2020b).

Ainda sobre os testes comportamentais, os animais estressados apresentaram um prejuízo no reconhecimento de novos objetos. Há uma vasta literatura indicando as razões em que o estresse prejudica a formação de memória, principalmente as relacionadas ao hipocampo (DIAMOND et al., 2007; JOËLS; BARAM, 2009; VOGEL et al., 2017). Aparentemente, esta é uma adaptação para que apenas memórias relacionadas ao estresse sejam adquiridas e consolidadas (DIAMOND et al., 2007; JOËLS; FERNANDEZ; ROOZENDAAL, 2011; SCHWABE et al., 2012). As razões para tal mudança de prioridade na formação de memória vão desde diminuição tanto na ramificação dendrítica apical quanto no comprimento dendrítico total (GALEA et al., 1997; WATANABE et al., 1992), mudança no padrão de produção genômica de glicocorticoides (JOËLS; BARAM, 2009), até alteração da consolidação da memória do eixo “cognitivo” CPFm-Hipocampo ao rígido controle pelo corpo estriado dorsal da memória baseada em hábitos (SCHWABE et al., 2012; VOGEL et al., 2017).

O protocolo de EDS, usado nesse estudo, foi baseado naquele descrito por Golden e colaboradores (GOLDEN et al., 2011), no qual por meio de 10 dias de confronto agonístico, os animais apresentam comportamentos do tipo ansioso, condizentes com os resultados encontrados neste estudo e em anteriores (CARNEVALI et al., 2020; WARREN et al., 2014). Com base no protocolo do EDS, também observamos prejuízos na memória semelhantes a outros estudos com

EDS (DUQUE; VINADER-CAEROLS; MONLEÓN, 2016; TIAN; XU; GUI, 2018; WANG et al., 2011). Cabe ressaltar que outros protocolos de estresse também levam a prejuízos na memória, dentre eles, o de restrição de movimento, nado forçado e exposição ao éter (EAGLE; FITZPATRICK; PERRINE, 2013; LI et al., 2012; NAVA-MESA; LAMPREA; MÚNERA, 2013); o estresse crônico moderado (uma variedade de estressores imprevisíveis) (LI et al., 2008); e o de instabilidade social (PROVENSI et al., 2019).

Outra região abordada nesse estudo foi o CPFm. Usando a injeção de BDA (um marcador de neuro-comunicação anterógrada) na sub-região do PrL esquerdo, onde já encontramos evidências recentes com um papel proeminente na regulação do estresse (COSTA et al., 2016; VICTORIANO et al., 2020). Condizente com a literatura atual, houve marcação no hipocampo, demonstrando a importante comunicação direta entre essas duas regiões (CERQUEIRA; ALMEIDA; SOUSA, 2008; KIM; CHO, 2017b; KO, 2017). A atividade sincronizada destas duas regiões, somada também a comunicação com a amígdala, forma uma circuitaria responsável pela formação de memória relacionada ao contexto do estresse (KIM; CHO, 2017a). Vale ressaltar que o hipocampo tem função distinta dependendo da sua região e que estas comunicações recebidas do CPFm são continuadas de diferentes formas, como a região ventral tendo projeções retornando para o CPFm (KIM; CHO, 2017a) e para a amídala (KISHI et al., 2006), enquanto a região dorsal se comunica indiretamente via córtices entorrinal e perirrinal com estas mesmas regiões (PITKÄNEN et al., 2000; TANAKA et al., 2014).

Nas nossas análises de imunofluorescência, encontramos algumas diferenças nas sub-regiões do hipocampo, tanto para a expressão do Δ FosB (um marcador de atividade neuronal) (NESTLER, 2013; PERROTTI et al., 2004) , quanto para CaMKII (um marcador para neurotransmissão glutamatérgica) bem como para a dupla marcação Δ FosB/CaMKII. No hipocampo dorsal houve uma diminuição bilateral na expressão de Δ FosB dos animais estressados. Não houve diferença para o CaMKII e para dupla marcação, indicando uma possível menor

ativação de tal região. Ainda que haja resultados indicando o efeito oposto no GD dorsal (COOPER et al., 2017), este é condizente com o efeito do estresse no hipocampo, como a atrofia dos dendritos (GALEA et al., 1997; WATANABE et al., 1992) ou a supressão da neurogênese desta região (MCEWEN, 1999b). Por outro lado, esses resultados também indicam que os neurônios afetados não são ativados por glutamato, já que a ativação por meio de canais de NMDA, induz o influxo de Cálcio e a cascata de ativação da enzima CaMKII, e mesmo com menor ativação dos neurônios da região (redução de Δ FosB), a expressão de CaMKII permaneceu inalterada. Este achado pode indicar a ocorrência de modulação por outros neurotransmissores, como serotonina (SANT'ANA et al., 2019), acetilcolina (AMARAL; KURZ, 1985; MORENO-CASTILLA et al., 2017), adrenalina (VERNEY et al., 1985) e/ou endocanabinoide (HARTMANN et al., 2019b).

Interessantemente, um elegante estudo envolvendo o uso de *“Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs”* (DREADDs) demonstrou que a inativação do HPCd levou a prejuízo na memória do teste de RO (TUSCHER et al., 2018). Corroborando, a inibição do HPCd também causou prejuízo em outros testes de memória, como o de localização de objetos (HAETTIG et al., 2011; TUSCHER et al., 2016), a preferência por um objeto novo e o do labirinto aquático de Morris (STACKMAN et al., 2016). Corroborando nossos resultados, a literatura demonstra que a inibição/menor ativação do HPCd induz ao prejuízo na memória em diferentes testes do tipo, porém uma pergunta ainda fica em aberto: O que levou a inibição/menor ativação do HPCd? Ainda que a hipótese do estresse modular esse processo sobre o HPC (GALEA et al., 1997; MCEWEN, 1999b; WATANABE et al., 1992) seja a resposta mais robusta, ainda não está claro qual é o exato mecanismo de ação para tal.

Diferente dos resultados obtidos no HPCd, a imunofluorescência no HPCv mostrou aumento bilateral da expressão de Δ FosB e CaMKII nos animais estressados, indicando um importante papel desta região na modulação a exposição ao estresse. Dado que a exposição ao EDS crônico também induziu comportamentos defensivos e do tipo ansioso, sugerimos que esse perfil

ansio gênico induzido pelo estresse possa ser modulado por neurônios glutamatérgicos localizados no HPCv. Se assim for, esses resultados corroboram estudos anteriores, que mostram o envolvimento da porção ventral do hipocampo na modulação do comportamento ansio gênico (BANNERMAN et al., 2004b; HENKE, 1990; TOVOTE; FADOK; LÜTHI, 2015) bem como o papel dos neurônios glutamatérgicos em seu controle (ROBISON; NESTLER, 2011). Curiosamente, os presentes resultados também mostraram uma diminuição bilateral na colocalização Δ FosB + CaMKII no HPCv de animais estressados, indicando que além de estimular os neurônios glutamatérgicos, o EDS crônico também ativou outros sistemas de neurotransmissão [por exemplo, serotoninérgicos (KÖHLER; CHAN-PALAY; STEINBUSCH, 1981; SAULIN; SAVLI; LANZENBERGER, 2012), noradrenérgico (HARING; DAVIS, 1985) e/ou endocanabinóide (HUDSON; RUSHLOW; LAVIOLETTE, 2018; TAKÁCS et al., 2015)] que podem desempenhar um papel inibitório nos neurônios glutamatérgicos.

O grupo de Gordon J. A. vem demonstrado nos últimos anos que a inibição da comunicação (via emprego da técnica de optogenética) do HPCv e do CPFm gera respostas do tipo ansiosas (ADHIKARI; TOPIWALA; GORDON, 2010, 2011; PADILLA-COREANO et al., 2016). Concomitantemente, outros tipos de inibição também foram capazes de levar a respostas do tipo ansiosa, como lesões citotóxicas e inativação farmacológica (BANNERMAN et al., 2003; KJELSTRUP et al., 2002). Em contrapartida, a ativação de projeções do HPCv para o CPFm, aumentou as respostas defensivas (PARFITT et al., 2017). Somado aos nossos resultados, o HPCv parece modular positivamente comportamentos defensivos quando estimulado, mas uma questão muito parecida com os resultados do HPCd permanece: o que teria ocasionado a maior ativação do HPCv? Como discutido aqui, projeções vindas e enviadas ao CPFm parecem ter papel central neste processo, que corroboram também nossos resultados com o emprego do BDA. Contudo, novos estudos são necessários para esclarecer este tema.

Entretanto, diferente do que ocorre com o CPFm (COSTA et al., 2016; FARIA; LAVERDE; NUNES-DE-SOUZA, 2020; SANTOS-COSTA et al., 2021;

VICTORIANO et al., 2020), não encontramos nenhum efeito de lateralidade no HPC. Analisando a literatura, é possível identificar a lateralização funcional do HPC, mas com vasta quantidade de dados, apenas para humanos, onde o lado esquerdo é especializado para memória episódica, contextual e autobiográfica (MAGUIRE; FRITH, 2003; SPIERS et al., 2001) e o lado direito é especializado para navegação espacial (HOWARD et al., 2014; MAGUIRE et al., 1998; SPIERS et al., 2001). Contudo, os estudos envolvendo roedores, ainda não chegaram a resultados conclusivos, mas já existe uma série de achados indicando lateralidade para aquisição de memória espacial e a habilidade de criar rotas, no HPC de roedores (JORDAN, 2020; KLUR et al., 2009; SHINOHARA et al., 2012). Como no nosso estudo o teste de memória não envolveu localização espacial, possivelmente não conseguimos identificar a lateralização funcional demonstrada em outros estudos, uma vez que nossos resultados apontaram para aumento ou diminuição de ativação, os quais foram igualmente distribuídos nos hemisférios do HPC. Todavia, quando o tema é lateralidade do HPC na modulação de comportamentos defensivos, há escassez de trabalhos na área, deixando em aberto a lacuna para novas investigações.

Em resumo, nossos resultados sugerem que há comunicação direta do CPFm esquerdo e o HPC, tanto para sua porção ventral como para a dorsal, já que o BDA não é um marcador transináptico. Outro resultado encontrado neste estudo indicou que o estresse do EDS alterou a neurocomunicação do hipocampo, tendo consequências opostas em cada sub-região e demonstrando a atuação de outras neurotransmissões, além da glutamatérgica.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstra que (i) o EDS crônico pode induzir evitação social e (ii) comportamentos ansiogênicos e comprometimento da memória de curto prazo, e (iii) diferentes padrões de ativação neuronal no hipocampo dorsal e ventral de camundongos, (iv) não apenas os neurônios glutamatérgicos foram

recrutados para desempenhar um papel na modulação desses comportamentos e ainda que (v) a sub-região do Pré Limbico esquerdo do CPFm tem ligações bilaterais tanto para o hipocampo dorsal quanto para hipocampo ventral.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMEC, R. E.; SHALLOW, T. Lasting effects on rodent anxiety of a single exposure to a cat. **Physiology & behavior**, v. 54, n. 1, p. 101–109, jul. 1993.

ADHIKARI, A.; TOPIWALA, M. A.; GORDON, J. A. Synchronized activity between the ventral hippocampus and the medial prefrontal cortex during anxiety. **Neuron**, v. 65, n. 2, p. 257–269, jan. 2010.

ADHIKARI, A.; TOPIWALA, M. A.; GORDON, J. A. Single units in the medial prefrontal cortex with anxiety-related firing patterns are preferentially influenced by ventral hippocampal activity. **Neuron**, v. 71, n. 5, p. 898–910, set. 2011.

AGGLETON, J. P. One-Trial Object Recognition by Rats. **The Quarterly Journal of Experimental Psychology Section B**, v. 37, n. 4b, p. 279–294, 1985.

AKIRAV, I.; MAROUN, M. Ventromedial prefrontal cortex is obligatory for consolidation and reconsolidation of object recognition memory. **Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)**, v. 16, n. 12, p. 1759–1765, dez. 2006.

AMARAL, D. G.; KURZ, J. An analysis of the origins of the cholinergic and noncholinergic septal projections to the hippocampal formation of the rat. **The Journal of comparative neurology**, v. 240, n. 1, p. 37–59, out. 1985.

AVGUSTINOVICH, D. F.; KOVALENKO, I. L.; KUDRYAVTSEVA, N. N. A model of anxious depression: persistence of behavioral pathology. **Neuroscience and behavioral physiology**, v. 35, n. 9, p. 917–924, nov. 2005.

BAILEY, M.; SILVER, R. Sex differences in circadian timing systems: implications for disease. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 35, n. 1, p. 111–139, jan. 2014.

BANNERMAN, D. M. et al. Ventral hippocampal lesions affect anxiety but not spatial learning. **Behavioural brain research**, v. 139, n. 1–2, p. 197–213, fev. 2003.

BANNERMAN, D. M. et al. Regional dissociations within the hippocampus - Memory and anxiety. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 28, n. 3, p. 273–283, 2004a.

BANNERMAN, D. M. et al. Regional dissociations within the hippocampus—memory and anxiety. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 28, n. 3, p. 273–283, 2004b.

BARKER, G. R. I. et al. Recognition memory for objects, place, and temporal order: a disconnection analysis of the role of the medial prefrontal cortex and perirhinal cortex. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 27, n. 11, p. 2948–2957, mar. 2007.

BARKER, G. R. I.; WARBURTON, E. C. When is the hippocampus involved in recognition memory? **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 31, n. 29, p. 10721–10731, jul. 2011.

BATSCHAUER, T. et al. Behavioral, cardiovascular and endocrine alterations induced by chronic stress in rats fed a high-fat diet. **Physiology & behavior**, v. 223, p. 113013, set. 2020.

BERLYNE, D. E. NOVELTY AND CURIOSITY AS DETERMINANTS OF EXPLORATORY BEHAVIOUR1. **British Journal of Psychology. General Section**, v. 41, n. 1–2, p. 68–80, 1950.

BERTON, O. et al. Behavioral, neuroendocrine and serotonergic consequences of single social defeat and repeated fluoxetine pretreatment in the Lewis rat strain. **Neuroscience**, v. 92, n. 1, p. 327–341, 1999.

BJÖRKQVIST, K. Social defeat as a stressor in humans. **Physiology and Behavior**, 2001.

BOLGER, N. et al. Effects of daily stress on negative mood. **Journal of personality and social psychology**, v. 57, n. 5, p. 808–818, nov. 1989.

BRODMANN, K. **Vergleichende Lokalisationslehre der Grosshirnrinde in ihren Prinzipien dargestellt auf Grund des Zellenbaues**. [s.l.] Barth, 1909.

CANTO DE SOUZA, L. et al. Carbonic anhydrase activation enhances object recognition memory in mice through phosphorylation of the extracellular signal-regulated kinase in the cortex and the hippocampus. **Neuropharmacology**, v. 118, p. 148–156, 2017.

CARNEVALI, L. et al. The contagion of social defeat stress: Insights from rodent studies. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 111, p. 12–18, abr. 2020.

CERNOTOVA, D.; STUHLIK, A.; SVOBODA, J. Transient Inactivation of the Medial Prefrontal Cortex and Ventral Hippocampus Impairs Active Place Avoidance Retrieval on a Rotating Arena. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 15, n. April, p. 1–10, 2021.

CERQUEIRA, J. J. et al. The prefrontal cortex as a key target of the maladaptive response to stress. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 27, n. 11, p. 2781–2787, mar. 2007.

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

CITRI, A.; MALENKA, R. C. Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 1, p. 18–41, jan. 2008.

COOPER, S. E. et al. Comparison of chronic physical and emotional social defeat stress effects on mesocorticolimbic circuit activation and voluntary consumption of morphine. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 8445, ago. 2017.

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.

DALLEY, J. W.; CARDINAL, R. N.; ROBBINS, T. W. Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 28, n. 7, p. 771–784, 2004.

DEL GIUDICE, M.; ELLIS, B. J.; SHIRTCLIFF, E. A. The Adaptive Calibration Model of stress responsivity. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 35, n. 7, p. 1562–1592, jun. 2011.

DIAMOND, D. M. et al. The temporal dynamics model of emotional memory processing: a synthesis on the neurobiological basis of stress-induced amnesia, flashbulb and traumatic memories, and the Yerkes-Dodson law. **Neural plasticity**, v. 2007, p. 60803, 2007.

DODART, J. C.; MATHIS, C.; UNGERER, A. Scopolamine-induced deficits in a two-trial object recognition task in mice. **Neuroreport**, v. 8, n. 5, p. 1173–1178, mar. 1997.

DUQUE, A.; VINADER-CAEROLS, C.; MONLEÓN, S. Effects of social stress and clomipramine on emotional memory in mice. **Acta neurobiologiae experimentalis**, v. 76,

n. 3, p. 225–233, 2016.

EAGLE, A. L.; FITZPATRICK, C. J.; PERRINE, S. A. Single prolonged stress impairs social and object novelty recognition in rats. **Behavioural brain research**, v. 256, p. 591–597, nov. 2013.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. **Behavioural brain research**, v. 31, n. 1, p. 47–59, nov. 1988.

FARIA, M. P.; LAVERDE, C. F.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Anxiogenesis induced by social defeat in male mice: Role of nitric oxide, NMDA, and CRF1 receptors in the medial prefrontal cortex and BNST. **Neuropharmacology**, v. 166, n. March 2019, p. 107973, 2020.

FITZPATRICK, M. **Measuring cell fluorescence using ImageJ — The Open Lab Book v1.0**. Disponível em: <<https://theolb.readthedocs.io/en/latest/imaging/measuring-cell-fluorescence-using-imagej.html#measuring-cell-fluorescence-using-imagej>>. Acesso em: 2 out. 2021.

FRICK, K. M.; GRESACK, J. E. Sex differences in the behavioral response to spatial and object novelty in adult C57BL/6 mice. **Behavioral neuroscience**, v. 117, n. 6, p. 1283–1291, dez. 2003.

FUCHS, E.; FLÜGGE, G. Social stress in tree shrews: effects on physiology, brain function, and behavior of subordinate individuals. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 73, n. 1, p. 247–258, ago. 2002.

GALEA, L. A. et al. Sex differences in dendritic atrophy of CA3 pyramidal neurons in response to chronic restraint stress. **Neuroscience**, v. 81, n. 3, p. 689–697, dez. 1997.

GAMEIRO, G. H. et al. Nociception- and anxiety-like behavior in rats submitted to different periods of restraint stress. **Physiology & behavior**, v. 87, n. 4, p. 643–649, abr. 2006.

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

GOLDMAN-RAKIC, P. S.; SELEMON, L. D.; SCHWARTZ, M. L. Dual pathways connecting the dorsolateral prefrontal cortex with the hippocampal formation and parahippocampal cortex in the rhesus monkey. **Neuroscience**, v. 12, n. 3, p. 719–743, jul. 1984.

GREEN, M. R.; BARNES, B.; MCCORMICK, C. M. Social instability stress in adolescence increases anxiety and reduces social interactions in adulthood in male Long-Evans rats. **Developmental psychobiology**, v. 55, n. 8, p. 849–859, dez. 2013.

HAETTIG, J. et al. HDAC inhibition modulates hippocampus-dependent long-term memory for object location in a CBP-dependent manner. **Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 18, n. 2, p. 71–79, fev. 2011.

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

HARTMANN, A. et al. Role of the endocannabinoid system in the dorsal hippocampus in the cardiovascular changes and delayed anxiety-like effect induced by acute restraint stress in rats. **Journal of Psychopharmacology**, v. 33, n. 5, p. 606–614, 2019a.

HARTMANN, A. et al. Role of the endocannabinoid system in the dorsal hippocampus in the cardiovascular changes and delayed anxiety-like effect induced by acute restraint stress in rats. **Journal of psychopharmacology (Oxford, England)**, v. 33, n. 5, p. 606–

614, maio 2019b.

HENKE, P. G. Hippocampal pathway to the amygdala and stress ulcer development. **Brain research bulletin**, v. 25, n. 5, p. 691–695, nov. 1990.

HERMES, G. et al. Post-weaning chronic social isolation produces profound behavioral dysregulation with decreases in prefrontal cortex synaptic-associated protein expression in female rats. **Physiology & behavior**, v. 104, n. 2, p. 354–359, ago. 2011.

HOFFMAN, D. L.; DUKES, E. M.; WITTCHEN, H.-U. Human and economic burden of generalized anxiety disorder. **Depression and anxiety**, v. 25, n. 1, p. 72–90, 2008.

HOWARD, L. R. et al. The hippocampus and entorhinal cortex encode the path and Euclidean distances to goals during navigation. **Current biology : CB**, v. 24, n. 12, p. 1331–1340, jun. 2014.

IRLE, E.; MARKOWITSCH, H. J. Widespread cortical projections of the hippocampal formation in the cat. **Neuroscience**, v. 7, n. 11, p. 2637–2647, 1982.

JOËLS, M.; BARAM, T. Z. **The neuro-symphony of stress.** **Nature reviews. Neuroscience**, jun. 2009.

JOËLS, M.; FERNANDEZ, G.; ROOZENDAAL, B. Stress and emotional memory: a matter of timing. **Trends in cognitive sciences**, v. 15, n. 6, p. 280–288, jun. 2011.

JORDAN, J. T. The rodent hippocampus as a bilateral structure: A review of hemispheric lateralization. **Hippocampus**, v. 30, n. 3, p. 278–292, mar. 2020.

KEENEY, A. J.; HOGG, S. Behavioural consequences of repeated social defeat in the mouse: preliminary evaluation of a potential animal model of depression. **Behavioural pharmacology**, v. 10, n. 8, p. 753–764, dez. 1999.

KIM, W. BIN; CHO, J.-H. Synaptic Targeting of Double-Projecting Ventral CA1 Hippocampal Neurons to the Medial Prefrontal Cortex and Basal Amygdala. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 37, n. 19, p. 4868–4882, maio 2017a.

KIM, W. BIN; CHO, J. H. Synaptic targeting of double-projecting ventral CA1 hippocampal neurons to the medial prefrontal cortex and basal amygdala. **Journal of Neuroscience**, 2017b.

KIM, J. J.; DIAMOND, D. M. The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 3, n. 6, p. 453–462, jun. 2002.

KISHI, T. et al. Topographical projection from the hippocampal formation to the amygdala: a combined anterograde and retrograde tracing study in the rat. **The Journal of comparative neurology**, v. 496, n. 3, p. 349–368, maio 2006.

KJELSTRUP, K. G. et al. Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 16, p. 10825–10830, ago. 2002.

KLUR, S. et al. Hippocampal-dependent spatial memory functions might be lateralized in rats: An approach combining gene expression profiling and reversible inactivation. **Hippocampus**, v. 19, n. 9, p. 800–816, set. 2009.

KO, J. Neuroanatomical Substrates of Rodent Social Behavior: The Medial Prefrontal Cortex and Its Projection Patterns. **Frontiers in neural circuits**, v. 11, p. 41, 2017.

- KRETZ, R. Local cobalt injection: a method to discriminate presynaptic axonal from postsynaptic neuronal activity. **Journal of Neuroscience Methods**, 1984.
- KRISHNAN, V. et al. Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. **Cell**, v. 131, n. 2, p. 391–404, out. 2007.
- LAVENEX, P.; AMARAL, D. G. Hippocampal-neocortical interaction: a hierarchy of associativity. **Hippocampus**, v. 10, n. 4, p. 420–430, 2000.
- LAVIOLA, G. et al. Psychobiological risk factors for vulnerability to psychostimulants in human adolescents and animal models. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 23, n. 7, p. 993–1010, nov. 1999.
- LEE, E. et al. Left brain cortical activity modulates stress effects on social behavior. **Scientific reports**, v. 5, p. 13342, ago. 2015.
- LEGER, M. et al. Object recognition test in mice. **Nature protocols**, v. 8, n. 12, p. 2531–2537, dez. 2013.
- LEUNER, B.; SHORS, T. J. Stress, anxiety, and dendritic spines: what are the connections? **Neuroscience**, v. 251, p. 108–119, out. 2013.
- LI, S. et al. Chronic mild stress impairs cognition in mice: From brain homeostasis to behavior. **Life Sciences**, v. 82, n. 17, p. 934–942, 2008.
- LI, S. et al. Effects of acute restraint stress on different components of memory as assessed by object-recognition and object-location tasks in mice. **Behavioural brain research**, v. 227, n. 1, p. 199–207, fev. 2012.
- LIEBSCH, G. et al. Chronic infusion of a CRH1 receptor antisense oligodeoxynucleotide into the central nucleus of the amygdala reduced anxiety-related behavior in socially defeated rats. **Regulatory peptides**, v. 59, n. 2, p. 229–239, out. 1995.
- LIMA, R. H. et al. Infusion of protein synthesis inhibitors in the entorhinal cortex blocks consolidation but not reconsolidation of object recognition memory. **Neurobiology of learning and memory**, v. 91, n. 4, p. 466–472, maio 2009.
- LISBOA, S. F. et al. Different role of the ventral medial prefrontal cortex on modulation of innate and associative learned fear. **Neuroscience**, v. 171, n. 3, p. 760–768, dez. 2010.
- LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, n. 2, p. 180–185, 1987.
- LUPIEN, S. et al. Basal cortisol levels and cognitive deficits in human aging. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 14, n. 5 Pt 1, p. 2893–2903, maio 1994.
- MAGUIRE, E. A. et al. Knowing where and getting there: a human navigation network. **Science (New York, N.Y.)**, v. 280, n. 5365, p. 921–924, maio 1998.
- MAGUIRE, E. A.; FRITH, C. D. Lateral asymmetry in the hippocampal response to the remoteness of autobiographical memories. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 23, n. 12, p. 5302–5307, jun. 2003.
- MANCHANDA, R. K.; JAGGI, A. S.; SINGH, N. Ameliorative potential of sodium cromoglycate and diethyldithiocarbamic acid in restraint stress-induced behavioral alterations in rats. **Pharmacological reports : PR**, v. 63, n. 1, p. 54–63, 2011.
- MCEWEN, B. S. Stress and hippocampal plasticity. **Annual review of neuroscience**, v.

22, p. 105–122, 1999a.

MCEWEN, B. S. Stress and hippocampal plasticity. **Annual Review of Neuroscience**, v. 22, p. 105–122, 1999b.

MCEWEN, B. S.; SAPOLSKY, R. M. Stress and cognitive function. **Current opinion in neurobiology**, v. 5, n. 2, p. 205–216, abr. 1995.

MESSIER, C. Object recognition in mice: improvement of memory by glucose. **Neurobiology of learning and memory**, v. 67, n. 2, p. 172–175, mar. 1997.

MICZEK, K. A. et al. Neurobiological mechanisms controlling aggression: preclinical developments for pharmacotherapeutic interventions. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 18, n. 1, p. 97–110, 1994.

MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory drive. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 48, n. 4, p. 254–260, 1955.

MORAIS-SILVA, G. et al. Cardiovascular outcomes related to social defeat stress: New insights from resilient and susceptible rats. **Neurobiology of stress**, v. 11, p. 100181, nov. 2019.

MORENO-CASTILLA, P. et al. Hippocampal release of dopamine and norepinephrine encodes novel contextual information. **Hippocampus**, v. 27, n. 5, p. 547–557, maio 2017.

MOSER, M. B. et al. Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 21, p. 9697–9701, out. 1995.

MOURA, C. A. et al. Prenatal restraint stress impairs recognition memory in adult male and female offspring. **Acta neuropsychiatrica**, p. 1–6, jan. 2020.

NASCA, C. et al. Mind the gap: glucocorticoids modulate hippocampal glutamate tone underlying individual differences in stress susceptibility. **Molecular Psychiatry**, v. 20, n. 6, p. 755–763, 2015.

NASCA, C. et al. Multidimensional Predictors of Susceptibility and Resilience to Social Defeat Stress. **Biological Psychiatry**, v. 86, n. 6, p. 483–491, 2019.

NAVA-MESA, M. O.; LAMPREA, M. R.; MÚNERA, A. Divergent short- and long-term effects of acute stress in object recognition memory are mediated by endogenous opioid system activation. **Neurobiology of learning and memory**, v. 106, p. 185–192, nov. 2013.

NESTLER, E. J. Review. Transcriptional mechanisms of addiction: role of DeltaFosB. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 363, n. 1507, p. 3245–3255, out. 2008.

NESTLER, E. J. Δ FosB: a Molecular Switch for Reward. **Journal of Drug and Alcohol Research**, 2013.

NESTLER, E. J. Δ FosB: a transcriptional regulator of stress and antidepressant responses. **European journal of pharmacology**, v. 753, p. 66–72, abr. 2015.

NESTLER, E. J.; BARROT, M.; SELF, D. W. DeltaFosB: a sustained molecular switch for addiction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 20, p. 11042–11046, set. 2001.

- NESTLER, E. J.; KELZ, M. B.; CHEN, J. DeltaFosB: a molecular mediator of long-term neural and behavioral plasticity. **Brain research**, v. 835, n. 1, p. 10–17, jul. 1999.
- NEZLEK, J. B.; PLESKO, R. M. Day-to-Day Relationships among Self-Concept Clarity, Self-Esteem, Daily Events, and Mood. **Personality and Social Psychology Bulletin**, v. 27, n. 2, p. 201–211, 2001.
- PADILLA-COREANO, N. et al. Direct Ventral Hippocampal-Prefrontal Input Is Required for Anxiety-Related Neural Activity and Behavior. **Neuron**, v. 89, n. 4, p. 857–866, 2016.
- PARFITT, G. M. et al. Bidirectional Control of Anxiety-Related Behaviors in Mice: Role of Inputs Arising from the Ventral Hippocampus to the Lateral Septum and Medial Prefrontal Cortex. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 42, n. 8, p. 1715–1728, jul. 2017.
- PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. B. J. **The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, 2nd edition Academic Press**, 2001.
- PELLOW, S. et al. Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 3, p. 149–167, 1985.
- PÉREZ-CANO, H. J. et al. Anxiety, depression, and stress in response to the coronavirus disease-19 pandemic. **Cirugia y cirujanos**, v. 88, n. 5, p. 562–568, 2020.
- PERROTTI, L. I. et al. Induction of deltaFosB in reward-related brain structures after chronic stress. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 24, n. 47, p. 10594–10602, nov. 2004.
- PITKÄNEN, A. et al. Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex, and postrhinal cortex in rat. A review. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 911, p. 369–391, jun. 2000.
- Population, total | Data**. Disponível em: <<https://data.worldbank.org/indicator/SP.POP.TOTL?end=2019&start=2019&view=map>>. Acesso em: 16 jun. 2021.
- Population Clock: World**. Disponível em: <<https://www.census.gov/popclock/world/br>>. Acesso em: 16 jun. 2021.
- PROVENSI, G. et al. Preventing adolescent stress-induced cognitive and microbiome changes by diet. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 116, n. 19, p. 9644–9651, maio 2019.
- RIAZ, S. et al. Ventral, but not dorsal, hippocampus inactivation impairs reward memory expression and retrieval in contexts defined by proximal cues. **Hippocampus**, v. 27, n. 7, p. 822–836, 2017.
- ROBISON, A. J.; NESTLER, E. J. Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 12, n. 11, p. 623–637, out. 2011.
- RODGERS, R. J.; COLE, J. C. Anxiety enhancement in the murine elevated plus maze by immediate prior exposure to social stressors. **Physiology & behavior**, v. 53, n. 2, p. 383–388, fev. 1993.
- RODGERS, R. J.; DALVI, A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 21, n. 6, p. 801–810, 1997.
- ROSE, J. E.; WOOLSEY, C. N. Structure and relations of limbic cortex and anterior thalamic nuclei in rabbit and cat. **The Journal of comparative neurology**, v. 89, n. 3, p.

279–347, dez. 1948.

ROSENE, D. L.; VAN HOESEN, G. W. Hippocampal efferents reach widespread areas of cerebral cortex and amygdala in the rhesus monkey. **Science (New York, N.Y.)**, v. 198, n. 4314, p. 315–317, out. 1977.

RUSSO, S. J. et al. Neurobiology of resilience. **Nature neuroscience**, v. 15, n. 11, p. 1475–1484, nov. 2012.

SAAVEDRA-RODRÍGUEZ, L.; FEIG, L. A. Chronic social instability induces anxiety and defective social interactions across generations. **Biological psychiatry**, v. 73, n. 1, p. 44–53, jan. 2013.

SANACORA, G.; TRECCANI, G.; POPOLI, M. Towards a glutamate hypothesis of depression: an emerging frontier of neuropsychopharmacology for mood disorders. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 63–77, jan. 2012.

SANT'ANA, A. B. et al. Role of 5-HT_{2C} receptors of the dorsal hippocampus in the modulation of anxiety- and panic-related defensive responses in rats. **Neuropharmacology**, v. 148, n. January, p. 311–319, 2019.

SANTOS-COSTA, N. et al. Glutamatergic neurotransmission controls the functional lateralization of the mPFC in the modulation of anxiety induced by social defeat stress in male mice. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, n. Received on: 15 Apr 2021, 2021.

SCHWABE, L. et al. Stress effects on memory: an update and integration. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 36, n. 7, p. 1740–1749, ago. 2012.

SEEMAN, T. E. et al. Increase in urinary cortisol excretion and memory declines: MacArthur studies of successful aging. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 82, n. 8, p. 2458–2465, ago. 1997.

SHIN, L. M.; LIBERZON, I. The neurocircuitry of fear, stress, and anxiety disorders. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 1, p. 169–191, jan. 2010.

SHINOHARA, Y. et al. Right-hemispheric dominance of spatial memory in split-brain mice. **Hippocampus**, v. 22, n. 2, p. 117–121, fev. 2012.

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 and biobehavioral reviews**, v. 14, n. 4, p. 481–490, 1990.

SPIERS, H. J. et al. Unilateral temporal lobectomy patients show lateralized topographical and episodic memory deficits in a virtual town. **Brain : a journal of neurology**, v. 124, n. Pt 12, p. 2476–2489, dez. 2001.

STACKMAN, R. W. J. et al. Temporary inactivation reveals that the CA1 region of the mouse dorsal hippocampus plays an equivalent role in the retrieval of long-term object memory and spatial memory. **Neurobiology of learning and memory**, v. 133, p. 118–128, set. 2016.

STEIN, D. J.; BOUWER, C. A neuro-evolutionary approach to the anxiety disorders. **Journal of anxiety disorders**, v. 11, n. 4, p. 409–429, 1997.

STEPANOVIC-PETROVIC, R. M. et al. Antihyperalgesic/antinociceptive effects of ceftriaxone and its synergistic interactions with different analgesics in inflammatory pain in rodents. **Anesthesiology**, v. 120, n. 3, p. 737–750, mar. 2014.

- STRANGE, B. A. et al. Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 15, n. 10, p. 655–669, out. 2014.
- SULLIVAN, R. M.; GRATTON, A. Lateralized effects of medial prefrontal cortex lesions on neuroendocrine and autonomic stress responses in rats. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 19, n. 7, p. 2834–2840, abr. 1999.
- SWANSON, L. W.; COWAN, W. M. An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat. **The Journal of comparative neurology**, v. 172, n. 1, p. 49–84, mar. 1977.
- TANAKA, K. Z. et al. Cortical representations are reinstated by the hippocampus during memory retrieval. **Neuron**, v. 84, n. 2, p. 347–354, out. 2014.
- TIAN, S.-W.; XU, F.; GUI, S.-J. Apelin-13 reverses memory impairment and depression-like behavior in chronic social defeat stressed rats. **Peptides**, v. 108, p. 1–6, 2018.
- TOVOTE, P.; FADOK, J. P.; LÜTHI, A. Neuronal circuits for fear and anxiety. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 16, n. 6, p. 317–331, jun. 2015.
- TOYODA, A. Social defeat models in animal science: What we have learned from rodent models. **Animal Science Journal**, v. 88, n. 7, p. 944–952, 2017.
- TUSCHER, J. J. et al. Inhibition of local estrogen synthesis in the hippocampus impairs hippocampal memory consolidation in ovariectomized female mice. **Hormones and behavior**, v. 83, p. 60–67, jul. 2016.
- TUSCHER, J. J. et al. Chemogenetic inactivation of the dorsal hippocampus and medial prefrontal cortex, individually and concurrently, impairs object recognition and spatial memory consolidation in female mice. **Neurobiology of learning and memory**, v. 156, p. 103–116, dez. 2018.
- VAN HEUKELUM, S. et al. Where is Cingulate Cortex? A Cross-Species View. **Trends in neurosciences**, v. 43, n. 5, p. 285–299, maio 2020.
- VAN STRIEN, N. M.; CAPPAERT, N. L. M.; WITTER, M. P. The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 10, n. 4, p. 272–282, abr. 2009.
- VERNEY, C. et al. Morphological evidence for a dopaminergic terminal field in the hippocampal formation of young and adult rat. **Neuroscience**, v. 14, n. 4, p. 1039–1052, abr. 1985.
- VICTORIANO, G. et al. Inhibition of the left medial prefrontal cortex (mPFC) prolongs the social defeat-induced anxiogenesis in mice: Attenuation by NMDA receptor blockade in the right mPFC. **Behavioural Brain Research**, v. 378, p. 112312, 2020.
- VOGEL, S. et al. Stress Induces a Shift Towards Striatum-Dependent Stimulus-Response Learning via the Mineralocorticoid Receptor. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 42, n. 6, p. 1262–1271, maio 2017.
- WANG, X.-D. et al. Forebrain CRHR1 deficiency attenuates chronic stress-induced cognitive deficits and dendritic remodeling. **Neurobiology of disease**, v. 42, n. 3, p. 300–310, jun. 2011.
- WARREN, B. L. et al. Neurobiological sequelae of witnessing stressful events in adult mice. **Biological psychiatry**, v. 73, n. 1, p. 7–14, jan. 2013.

WARREN, B. L. et al. Altered gene expression and spine density in nucleus accumbens of adolescent and adult male mice exposed to emotional and physical stress. **Developmental Neuroscience**, 2014.

WATANABE, Y. et al. Phenytoin prevents stress- and corticosterone-induced atrophy of CA3 pyramidal neurons. **Hippocampus**, v. 2, n. 4, p. 431–435, out. 1992.

WEISS, I. C. et al. Effect of social isolation on stress-related behavioural and neuroendocrine state in the rat. **Behavioural brain research**, v. 152, n. 2, p. 279–295, jul. 2004.

WINGENFELD, K.; WOLF, O. T. Stress, Memory, and the Hippocampus. In: **Frontiers of Neurology and Neuroscience**. [s.l.: s.n.]. v. 34p. 109–120.

WORLD HEALTH ORGANISATION. Depression and other common mental disorders: global health estimates. **World Health Organization**, 2017.

YEN, C. Y.; STANGER, R. L.; MILLMAN, N. Ataractic suppression of isolation-induced aggressive behavior. **Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie**, v. 123, p. 179–185, dez. 1959.

ZELENA, D. et al. Social stress of variable intensity: physiological and behavioral consequences. **Brain research bulletin**, v. 48, n. 3, p. 297–302, fev. 1999.