



UNESP

PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS - (PIPGCF)
ASSOCIAÇÃO UFSCar/UNESP

MATHEUS PEGORARO FARIA

**O BLOQUEIO DOS RECEPTORES NMDA OU CRF₁ NO NÚCLEO
INTERSTICIAL DA ESTRIA TERMINAL IMPEDE A ANSIOGÊNESE
INDUZIDA PELA ATIVAÇÃO NITRÉRGICA DO CÓRTEX PRÉ-
FRONTAL MEDIAL E DERROTA SOCIAL EM CAMUNDONGOS**

ARARAQUARA – SP

-2019-

MATHEUS PEGORARO FARIA

O BLOQUEIO DOS RECEPTORES NMDA OU CRF₁ NO NÚCLEO INTERSTICIAL DA ESTRIA TERMINAL IMPEDE A ANSIOGÊNESE INDUZIDA PELA ATIVAÇÃO NITRÉRGICA DO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL MEDIAL E DERROTA SOCIAL EM CAMUNDONGOS

Tese apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológica, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

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

ARARAQUARA – SP

-2019-



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Matheus Pegoraro Faria, realizada em 20/09/2019:

Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza
UNESP

Profa. Dra. Isacel Marian Hartmann de Quadros
UNIFESP

Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani
UNESP

Profa. Dra. Patricia Maria de Paula
UNESP

Prof. Dr. Hélio Zangrossi Junior
JSP

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais **Nelson** e **Maria José**, pelo amor incondicional, pela educação a mim dada e principalmente pelo apoio em todas as fases da minha vida. Sem vocês eu não teria chegado até aqui, obrigado por tudo.

Aos meus irmãos **Fernanda** e **Eduardo**, pelas conversas de apoio, pelos conselhos, pelas risadas em casa e por toda a amizade que temos.

Aos meus sobrinhos **Estêvão**, **Marina** e **Laura**, que sempre me mostram a beleza da vida e das pequenas coisas. Amo vocês.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza** pela dedicação com seus alunos, pela orientação e ensinamentos, tanto acadêmicos como de vida e principalmente pela pessoa que é. Obrigado por todos esses anos juntos.

Ao meu antigo coorientador **Prof. Dr. Tarciso Tadeu Miguel**, por todos os ensinamentos na época de iniciação científica. Você foi muito importante na minha caminhada dentro do laboratório, obrigado por tudo meu amigo.

A **Celina** por toda sua contribuição nesse trabalho, pelos ensinamentos, pelas manhãs e tarde correndo imuno e, sobretudo, pela amizade que construímos.

Ao **Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani** e ao **Prof. Dr. Marcelo Tadeu Marin**, por serem sempre solícitos aos alunos do laboratório e pelas contribuições no presente trabalho.

A **Tirene**, pelos excelentes serviços prestados, por sempre ajudar os alunos, pelos cafezinhos e principalmente pelas conversas que tivemos, obrigado pela amizade e por ser esta pessoa maravilhosa.

As antigas técnicas do laboratório, **Rosana** e **Elisabete**, que se aposentaram, mas que foram muito importantes no meu aprendizado. Vocês fazem falta.

Aos meus amigos de laboratório, **Lucas Canto, Daniela, Paula (Pupu), Gessy, Willian, Diego, Carlos, Nathália (Bang), Carlos Eduardo (Cadu), Rodrigo, Leandro, Vinícius, Lucas e Ricardo**. Pela grande amizade e por tornar o ambiente de trabalho sempre mais divertido. Vocês são demais!

A **Raiane**, por tudo que vivemos no período da minha pós-graduação, você me inspirou e me deu forças nos momentos mais difíceis que passei. Obrigado por estar ao meu lado e por sempre me apoiar, você é maravilhosa.

Aos meus amigos **Lucas (Debi) e Gustavo (Minero)**, pelo companheirismo, pela paciência, pelas conversas no almoço e principalmente pela amizade que fortalecemos a cada dia morando juntos. Como é gostoso morar com vocês meus caros.

A **Cláudia** (UNESP) e ao **Alexandre** (UFSCar) pela assistência prestada na secretaria do programa.

Aos **funcionários da FCFar/UNESP** pelo apoio prestado durante todos esses anos de faculdade, mestrado e agora doutorado.

Ao **Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas Associação UFSCar/ UNESP (PIPGCF)**, pelo suporte acadêmico, pela excelente estrutura e pela oportunidade de realizar esse projeto.

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pelo apoio financeiro concedido para desenvolver esse trabalho.

*“A nossa mais elevada tarefa deve ser a de formar seres humanos
livres que sejam capazes de, por si mesmos, encontrar
propósito e direção para suas vidas.”*
(Rudolf Steiner)

RESUMO

A liberação de óxido nítrico (NO) no córtex pré-frontal medial direito (CPFmD) produz ansiogênese. No núcleo intersticial da estria terminal (BNST), uma região que recebe projeções neuronais do CPFm, o NO também provoca ansiedade, um efeito que é bloqueado por injeções locais de antagonista de receptor do fator de liberação de corticotrofina do tipo 1 (CRF₁) ou antagonista de receptor n-metil-d-aspartato (NMDAr). A ansiedade também pode ser aumentada pelo estresse de derrota social, e o estresse crônico prejudica e facilita, respectivamente, as funções do CPF e do BNST na modulação de respostas comportamentais desencadeadas por situações aversivas. Este estudo investigou se o (i) estresse de derrota social crônico (EDSC) aumenta a sinalização de NO no CPFm; (ii) os efeitos ansiogênicos provocados pela injeção intra-CPFmD de NOC-9 (um doador de NO) ou pelo EDSC são prevenidos por injeções intra-BNST de AP-7 (0,05 nmol) ou CP 376395 (3,0 nmol), respectivamente, antagonistas de NMDAr e CRF₁, em camundongos *Swiss-Webster* machos expostos ao labirinto em cruz elevado (LCE). Os resultados mostraram que (a) EDSC aumentou a ansiedade (ou seja, reduziu a exploração do braço aberto) e ativou neurônios contendo NOSn, medidos pela dupla marcação de Δ FosB (um marcador não específico estável da atividade neural) + NOSn, no CPFm direito (mas não no esquerdo), (b) NOC-9 no CPFmD também aumentou a ansiedade e (c) ambos os efeitos provocados pelo EDSC e NOC-9 foram revertidos por injeções de AP-7 ou CP 376395 no BNST. Estes resultados sugerem que os receptores NMDAr e CRF₁ localizados no BNST desempenham um papel importante na modulação da ansiedade provocada pelo NO no CPFmD, bem como pela derrota social crônica em camundongos.

Palavras-chave: CPFm e BNST, Óxido Nítrico; Dupla Marcação Δ FosB + NOSn; Receptores NMDA e CRF₁; Camundongos socialmente derrotados; Ansiedade

ABSTRACT

Nitric oxide (NO) release in the right medial prefrontal cortex (RmPFC) produces angiogenesis. In the bed nucleus of the stria terminalis (BNST), a region that receives neuronal projections from the mPFC, NO also provokes anxiety, an effect that is blocked by local injections of corticotrophin-releasing factor type 1 receptor (CRF1) or n-methyl-D-aspartate receptor (NMDAr) antagonist. Anxiety is also enhanced by social defeat stress, and chronic stress impairs and facilitates, respectively, PFC and BNST roles in modulating behavioral responses to aversive situations. This study investigated whether the (i) chronic social defeat stress (CSDS) increases NO signaling in the mPFC; (ii) angiogenic effects provoked by intra-RmPFC injection of NOC-9 (an NO donor) or by CSDS are prevented by intra-BNST injections of AP-7 (0.05 nmol) or CP 376395 (3.0 nmol), respectively, NMDAr and CRF1 antagonists, in male Swiss-Webster mice exposed to the elevated plus-maze (EPM). Results showed that (a) CSDS increased anxiety (i.e. reduced open-arm exploration) and repeatedly activated NOSn containing neurons, measured by Δ FosB (a stable nonspecific marker of neural activity) + NOSn double-labeling, in the right (but not left) mPFC, (b) NOC-9 in the RmPFC also increased anxiety and (c) both CSDS and NOC-9 effects were reversed by injections of AP-7 or CP 376395 into the BNST. These results suggest that NMDA and CRF1 receptors located in BNST play an important role in the modulation of anxiety provoked by NO in the RmPFC as well as by chronic social defeat in mice.

Key-words: mPFC and BNST, Nitric Oxide; Δ FosB + NOSn double-labeling; NMDA and CRF1 receptors; Socially defeated mice; Anxiety

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Medo e ansiedade.....	11
1.2 Estresse e derrota social.....	12
1.3 Substratos neurais envolvidos nos sistemas encefálicos de defesa.....	15
1.4 Neurotransmissão: glutamato, óxido nítrico (NO) e fator de liberação de corticotropina (CRF).....	19
2. OBJETIVOS.....	25
2.1 Objetivo geral.....	25
2.2 Objetivos específicos.....	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1 Ética.....	26
3.2 Sujeitos.....	26
3.3 Escolha de camundongos coespecíficos agressivos.....	26
3.4 Fármacos.....	27
3.5 Cirurgia e microinjeção.....	27
3.6 Modelos animais.....	28
3.6.1 Labirinto em cruz elevado.....	28
3.6.2 Derrota social crônica.....	29
3.7 A proteína delta FosB.....	30
3.8 Delineamento experimental.....	31
3.8.1 Experimento 1.....	31
3.8.2 Experimento 2.....	31
3.8.3 Experimento 3.....	32
3.9 Dissecção dos encéfalos e imunofluorescência para Δ FosB e NOSn.....	32
3.10 Contagem de células.....	32
3.11 Análise histológica.....	33
3.12 Análise estatística.....	33
4. RESULTADOS.....	35
4.1 Experimento 1: O estresse crônico por derrota social aumenta a dupla marcação de Δ FosB e NOSn apenas no CPFm direito.....	35

4.2	Injeções no BNST e no CPFmD.....	38
4.3	Experimento 2: Injeções intra-BNST de AP-7 ou CP 376395 bloqueiam os efeitos ansiogênico provocados pela injeção intra-CPFmD de NOC-9.....	40
4.4	Experimento 3: O bloqueio dos receptores NMDA ou CRF1 no BNST prejudica os efeitos ansiogênicos provocados pelo estresse de derrota social crônica.....	43
5.	DISCUSSÃO.....	47
6.	CONCLUSÃO.....	54
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

1. INTRODUÇÃO

1.1 Medo e Ansiedade

O medo e a ansiedade são emoções consideradas parte do repertório de defesa exibidas pelos animais frente a diversos estímulos aversivos. São emoções correlacionadas, qualificadas subjetivamente como não prazerosas e desagradáveis, acompanhadas por um conjunto de alterações comportamentais, fisiológicas e cognitivo-subjetivas (GRAEFF, 1990). Para Schmitt e Kapczinsk (2004), a ansiedade pode ser apontada como um sentimento responsável pela sobrevivência da espécie humana e parece ser um consenso que esse estado emocional confere valor adaptativo entre as diversas espécies.

O estudo sistemático da ansiedade e do medo tomou grande impulso a partir dos trabalhos originais de Charles Darwin publicados no seu livro *The Expression of Emotions in Man and Animals* (1872, *Apud* ZANGROSSI JR; GRAEFF, 2004). A partir de então, a abordagem evolucionária proposta por Darwin tem permeado muitas das teorias sobre a função e a importância que as emoções desempenham para as diferentes espécies. Por esta abordagem, o homem, tendo outros animais como ancestrais, compartilharia com estes, suas emoções, possibilitando que comparações entre o seu comportamento e o de outros animais fossem traçadas (ZANGROSSI JR; GRAEFF, 2004). Diversos estudos clínicos conceituaram os transtornos de ansiedade em humanos como transtornos de defesa (BECK, 1976; DEAKIN; GRAEFF, 1991; KIDMAN, 1989), nos quais o fundamento do distúrbio é a ativação inapropriada de comportamentos defensivos decorrente da avaliação equivocada da fonte de perigo.

Até um determinado nível a ansiedade pode favorecer o desempenho de tarefas motoras e cognitivas, mas passa a ser indesejada, ou patológica, quando interfere com o comportamento normal do indivíduo (ZANGROSSI JR; GRAEFF, 2004). A patologia é definida a partir do momento em que o sofrimento provocado pela ansiedade trazer prejuízo à pessoa, em função de comportamentos de fuga e esquiva de situações importantes da vida social e profissional do indivíduo (ANDRADE; GORENSTEIN, 1998). Nesse caso, as reações manifestadas são denominadas Transtornos de Ansiedade e são consequências de disfunções nos sistemas encefálicos que modulam as reações de defesa (BRAGA, 2010). Do ponto de vista

comportamental, já é bem estabelecido que os animais são capazes de apresentar diversas reações de defesa em resposta a ameaças externas, por exemplo, quando há exposição a um predador ou um agressor coespecífico (AYERS et al., 2013; BULOS; POBBE; ZANGROSSI, 2015; EDMUNDS, 1974; MASINI; SAUER; CAMPEAU, 2005). Em mamíferos, como roedores, tais comportamentos classicamente compreendem congelamento (*freezing*), fuga, ataques defensivos e até mesmo simulação de morte (imobilidade tônica) (AYERS et al., 2013; BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2003) , sendo que tais respostas são dependentes tanto da iminência da ameaça (RATNER, 1967) quanto da oportunidade de fuga (BLANCHARD et al., 1990).

1.2 Estresse e Derrota Social

O conceito de estresse surgiu na literatura médica no início do século 20, com os trabalhos do pesquisador Hans Selye. A partir dos trabalhos de Selye, o estresse foi definido como uma resposta não específica de um corpo a qualquer demanda, sendo, por sua vez, denominado estressor aquele que produz estresse (MONROE, 2000). Diferentes estudos têm relacionado à produção dos transtornos de ansiedade com o estresse (BECK, 1976; GOLD; CHROUSOS, 2002; LLOYD; NEMEROFF, 2011; PALAZIDOU, 2012) e, segundo Mcewen, (2000), o estresse pode ser definido como uma ameaça real ou potencial para a integridade psicológica ou fisiológica de um indivíduo e que resulta em respostas fisiológicas e/ou comportamentais. Assim, diversos estudos estabelecem uma relação entre essas respostas e a expressão de comportamentos relacionados à ansiedade. Neste sentido, além da importância do nível de estresse basal na expressão de tais comportamentos, tem sido sugerido que a exposição crônica ao estresse de naturezas diversas repercute no aparecimento de distúrbios neuropsiquiátricos (DE KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005). Por exemplo, roedores submetidos ao estresse crônico apresentam reações defensivas potencializadas frente a estímulos aversivos. Estressores muitas vezes geram essas respostas comportamentais, as quais visam restaurar a homeostase interna. No entanto, diante de estressores incontroláveis, prolongados ou especialmente graves, podem ocorrer várias consequências negativas para a saúde, incluindo depressão maior, transtorno do pânico, e transtorno de estresse pós-traumático (PTSD) (ABELSON et al., 2007; HEIM et al., 2008; MEEWISSE et al., 2007). O estresse também tem sido relacionado ao abuso de drogas e esquizofrenia (BELUJON; GRACE, 2011; FALLOON et al., 1996; GOEDERS, 2003; GOEL; BALE, 2009).

Todos os avanços sobre os efeitos fisiológicos e psicológicos do estresse, bem como sobre os substratos neurobiológicos envolvidos nestes processos só foram possíveis com o desenvolvimento de modelos animais capazes de avaliar as mudanças induzidas pela exposição aguda ou crônica a estressores (por ex. predadores, choques, restrição de movimento). As diferenças principais entre estes modelos se relacionam com a duração (aguda ou crônica) e natureza do estressor (físico ou psicossocial) (CAMPOS et al., 2013b).

Dentre os vários modelos animais de estresse utilizados, destaca-se o modelo de derrota social por suas características mais etológicas. Este modelo consiste num conflito entre coespecíficos, no qual um animal dominante residente ataca um intruso, resultando na exibição de diversos comportamentos defensivos no animal agredido. A derrota social observada em conflitos entre camundongos se caracteriza pela exibição da postura de submissão (por ex. postura de levantar defensivo) do animal atacado (MICZEK; THOMPSON; SHUSTER, 1982). Primeiramente descrito por Yen et al. (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 vários parâmetros comportamentais, fisiológicos, farmacológicos e moleculares (por ex. BROUILLARD et al., 2019; COLYN et al., 2019; KRISHNAN et al., 2007; ZELENA et al., 1999). Devido às alterações comportamentais, endócrinas e fisiológicas observadas na derrota social, tem-se proposto este modelo como sendo válido para o estudo de desordens comportamentais, tais como depressão, abuso de drogas e ansiedade social (BJÖRKQVIST, 2001; FERRER-PÉREZ et al., 2019; JIANG et al., 2019; KEENEY; HOGG, 1999; LAVIOLA et al., 1999; STEIN; BOUWER, 1997). Corroborando esses achados, existem evidências que mostram ser a exposição a episódios de estresse social indutora de ansiedade em animais expostos ao labirinto em cruz elevado (LCE) e outros modelos animais de ansiedade (CALFA; VOLOSIN; MOLINA, 2006; KINSEY et al., 2007; PULLIAM et al., 2010; WATT et al., 2009).

As alterações comportamentais, endócrinas e fisiológicas são um reflexo do equilíbrio dinâmico (homeostase) ameaçado por um estressor. Como resultado, o comportamento é dirigido no sentido de avaliar o potencial desestabilizador desse estressor. Se o evento não corresponde a alguma representação cognitiva com base na experiência subjetiva anterior do indivíduo, há um aumento na excitação, estado de alerta, vigilância, atenção focada e processamento cognitivo. (SELYE; 1936 apud MICZEK; YAP; COVINGTON, 2008). A interface entre a informação

sensorial recebida e o processo de avaliação é formada por estruturas do sistema límbico, que incluem o hipocampo, a amígdala e o córtex pré-frontal (DE KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005; DE OLIVEIRA et al., 2000).

Diversas espécies de animais, incluindo os seres humanos, vivem em ambientes sociais altamente complexos e com hierarquias bem estabelecidas. Dentro desse contexto, os membros de um grupo social apresentam diferentes tipos de interações entre si; enquanto alguns indivíduos são menos expostos a interações agressivas, outros enfrentam níveis altos e persistentes de agressão, a qual representa uma fonte intensa de estresse social (MARTINEZ; PHILLIPS; HERBERT, 1998).

Animais submetidos a interações agressivas com coespecíficos e que se reconhecem submissos apresentam várias alterações fisiológicas e comportamentais (MARTINEZ; PHILLIPS; HERBERT, 1998). Dentre as alterações fisiológicas, destacam-se (a) a ativação de sistemas neuroendócrinos como eixo hipotálamo – pituitária – adrenal (eixo HPA) e eixo hipotálamo – pituitária – gônadas (eixo HPG) (COVINGTON; MICZEK, 2005; FUCHS; FLÜGGE, 2002; HERBERT, 1987; NORMAN et al., 2015), as quais causam, respectivamente, elevação de níveis plasmáticos dos hormônios adrenocorticotrofina (ACTH), cortisol, corticosterona, β -endorfina e redução de hormônios andrógenos (BLANCHARD et al., 1995; CARNEVALI et al., 2017; HUHMANN et al., 1990; KOCH et al., 2016; RAAB et al., 2004); (b) aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial, alterações do ritmo circadiano da frequência cardíaca e da temperatura corpórea (FINNELL et al., 2017; MORAIS-SILVA et al., 2019; TORNATZKY; MICZEK, 1993); (c) prejuízo na função imunológica e redução da resistência dos indivíduos a doenças (AMBRÉE et al., 2019; BEDEN; BRAIN, 1982; FLESHNER et al., 1989; HARDY et al., 1990; NIE et al., 2018). A derrota social também apresenta consequências sobre o comportamento dos animais, tais como: redução do comportamento de exploração no paradigma de campo aberto (JAISINGHANI; ROSENKRANZ, 2015; KUDRYAVTSEVA; BAKSHTANOVSKAYA; KORYAKINA, 1991; RAAB et al., 2004); inibição do comportamento agressivo e sexual, aumento do comportamento de submissão (AHNAOU; DRINKENBURG, 2016; ALBONETTI; FARABOLLINI, 1994; BLANCHARD et al., 1993, 1995; KUDRYAVTSEVA; BAKSHTANOVSKAYA; KORYAKINA, 1991; VAN DE POLL et al., 1982; YOSHIMURA; KIMURA, 1991); aumento dos comportamentos defensivos, incluindo congelamento e avaliação de risco (AHNAOU; DRINKENBURG, 2016; BLANCHARD et al., 1993, 1995; DAVIES et al., 2016) e além disso, tem sido sugerido que situações de estresse agudo e crônico são capazes de

aumentar a ansiedade em animais expostos ao labirinto em cruz elevado (LCE, um teste animal de ansiedade amplamente utilizado; por exemplo, CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005; LISTER, 1987) (DAVIES et al., 2016; RODGERS; COLE, 1993, 1994; VENZALA et al., 2012).

O estresse social, principalmente sob a forma de conflito entre indivíduos, é uma das formas mais intrusivas de estresse vivenciadas por muitas espécies de animais. A derrota social é um modelo animal único e valioso para investigar a neurobiologia do comportamento defensivo (DAVIES et al., 2016; JASNOW; DAVIS; HUHMAN, 2004). Além disso, a exposição prolongada à subordinação social está relacionada com sinais fisiológicos do estresse (MAKINSON et al., 2015).

Os animais exibem uma série de fenótipos característicos, quando submetidos aos modelos animais de estresse crônico como, por exemplo, corticosterona basal elevada, hipertrofia adrenal, involução do timo e diminuição do peso corpóreo (AHNAOU; DRINKENBURG, 2016; MARTÍ et al., 1994; OTTENWELLER et al., 1989, 1992). O estresse crônico leva a ativação do eixo HPA que culmina numa diminuição da responsividade desse eixo. Este tipo de estresse leva a um aumento dos níveis basais de ACTH e/ou secreção de corticosterona bem como da expressão de RNAm de CRF e da vasopressina (AVP) no núcleo paraventricular do hipotálamo (HAUGER et al., 1988; HERMAN; ADAMS; PREWITT, 1995; KISS; AGUILERA, 1993; ULRICH-LAI et al., 2006). Elucidar os efeitos em longo prazo do estresse crônico sobre a neuroplasticidade em regiões encefálicas críticas envolvidas na regulação do eixo (HPA) é de suma importância e pode ter amplas implicações para o tratamento de perturbações afetivas (CONRAD et al., 2011).

1.3 Substratos neurais envolvidos nos sistemas encefálicos de defesa

O núcleo intersticial da estria terminal (do inglês: *bed nucleus of stria terminalis*, BNST) é uma estrutura límbica do prosencéfalo basal, pertencente à amígdala estendida (ALHEID; HEIMER, 1988; DE OLMOS; HEIMER, 1999). É uma região de retransmissão crítica para a integração de respostas do cérebro ao estresse e ansiedade (KASH, 2012; WALKER; DAVIS, 2008). É uma área encefálica com papel na modulação de estados emocionais, haja vista o envolvimento de neurotransmissores nesta estrutura na mediação de respostas comportamentais, autonômicas e endócrinas frente ao estresse, medo e ansiedade (ALHEID, 2003; BARRETTO-DE-SOUZA et al., 2018; DAVIS, 1998; DUNN, 1987; FARIA et al., 2016; GARCIA-GARCIA et al., 2017; HEIMER, 2003; MOR; SAPHIER; FELDMAN, 1987; SAHUQUE et al., 2006; SCHMIDT et al.,

2018; SCHULKIN; MORGAN; ROSEN, 2005). Neste sentido, foi demonstrado que a estimulação elétrica do BNST em ratos promove alterações comportamentais e endócrinas similares às aquelas evocadas pelo estresse (CASADA; DAFNY, 1991; DUNN, 1987), enquanto a inativação farmacológica deste núcleo diminui a expressão de respostas condicionadas ou incondicionadas a estímulos aversivos, denotando a função desta área também nas respostas inatas (SAHUQUE et al., 2006). Tem sido sugerido que o BNST responde a sinais mais semelhantes à ansiedade do que aos de medo (HAMMACK et al., 2004; LEE et al., 2008; WALKER; TOUFEXIS; DAVIS, 2003). Ainda, Davis e colaboradores (2010) têm mostrado que o BNST está implicado na modulação de comportamentos do tipo ansiedade de longa duração e sustentada. Segundo Walker e colaboradores (2003), o BNST participa de um sistema de resposta lenta (ansiedade), que uma vez ativado continua a influenciar o comportamento mesmo após o estímulo inicial ter cessado.

Esta estrutura do prosencéfalo é caracterizada pelas suas muitas ligações recíprocas com outras áreas límbicas bem como com os núcleos do tronco encefálico (ALHEID; HEIMER, 1988; DE OLMOS; ALHEID; BELTRAMINO, 1985; GRAY; MAGNUSON, 1987; KASH, 2012; MAKINO; GOLD; SCHULKIN, 1994; MOGA; SAPER; GRAY, 1989). É um sítio primário para retransmissão para o PVN (CULLINAN; HERMAN; WATSON, 1993; DONG; SWANSON, 2004, 2006; DONG; PETROVICH; SWANSON, 2001; SAWCHENKO; SWANSON, 1983). O BNST é considerado um local de convergência de informação a partir de regiões do cérebro associadas com o controle emocional, cognitivo, comportamental e resposta autonômica, relacionadas ao estresse e a estímulos nocivos (CIRIELLO; JANSSEN, 1993; DONG; PETROVICH; SWANSON, 2001; KASH, 2012). O BNST controla respostas agudas e crônicas ao estresse (CHOI et al., 2006, 2008a, 2008b; RADLEY; GOSSELINK; SAWCHENKO, 2009). A ansiedade é alterada após o estresse crônico e está associada com mudanças estruturais e funcionais do BNST (JANKORD; HERMAN, 2008; PÊGO et al., 2008; SOUSA; CERQUEIRA; ALMEIDA, 2008). O volume e a arborização dendrítica do BNST aumentam após estresse crônico, o que pode facilitar ainda mais a ansiedade após este tipo de estresse (PÊGO et al., 2008; VYAS; BERNAL; CHATTARJI, 2003). Estudos de tracejamento têm mostrado que o BNST recebe projeções de áreas corticais como as infra-límbica e pré-límbica do córtex pré-frontal medial (CHIBA; KAYAHARA; NAKANO, 2001; HURLEY et al., 1991; KASH, 2012; VERTES, 2004), que podem ser importantes para respostas de estresse, medo e ansiedade.

O Córtex Pré-frontal medial (CPFm) é uma estrutura prosencefálica e límbica, que pode ser subdividida em cingulados (Cg) 1 e 2, pré-límbico (PrL) e infra-límbico (IL) (PAXINOS; FRANKLIN, 2001). Estudos em pacientes com lesão no CPF mostraram que esta região está relacionada com memória de trabalho, tomada de decisão, planejamento e flexibilidade de comportamento, bem como com interações sociais e processamento emocional (Damasio, 2000, *apud* CERQUEIRA; ALMEIDA; SOUSA, 2008). Essa região se comunica com o hipotálamo, o qual medeia vias homeostáticas intrínsecas, como fome e sede, e coordena os sistemas autônomo e endócrino (SAPER, 2000 *apud* EUSTON; GRUBER; MCNAUGHTON, 2012). Outra conexão é com a matéria cinzenta periaquedutal (MCP), região envolvida com a modulação da agressão, comportamento defensivo e dor (NELSON; TRAINOR, 2007, *apud* EUSTON; GRUBER; MCNAUGHTON, 2012; SEWARDS; SEWARDS, 2002). Além dessas, o CPFm tem diferentes conexões com os sistemas neuromodulatórios, incluindo os núcleos da rafe, área tegumentar ventral e *locus coeruleus*, os quais desempenham papel importante nas respostas adaptativas a eventos estressantes e na via da recompensa (ITOI; SUGIMOTO, 2010 *apud* EUSTON; GRUBER; MCNAUGHTON, 2012; ITOI; SUGIMOTO, 2010; MAIER; WATKINS, 2005). Ou seja, o CPFm tem acesso a informações sobre estímulos motivacionais, incluindo dor e recompensa, bem como controle sobre atividades autonômica e esquelética.

O CPFm está envolvido no controle da resposta comportamental e neuroendócrina ao estresse crônico (HERMAN et al., 2003; JAFERI; BHATNAGAR, 2007). No entanto, vários estudos apontam para uma diferença entre os papéis dos dois hemisférios: o hemisfério esquerdo parece exercer um papel inibitório sobre respostas emocionais relacionadas ao estresse, e tais respostas seriam dependentes do hemisfério direito (CPFm D) (DENERBERG, 1983 *apud* CERQUEIRA; ALMEIDA; SOUSA, 2008; DENENBERG, 1983; SULLIVAN, 2004). Essas observações do domínio do hemisfério são consistentes com os resultados de Sullivan and Gratton, (1999, 2002), os quais relataram que as ações reguladoras do CPFm parecem se originar de dentro do hemisfério direito, pois resultados de lesões bilaterais foram fielmente reproduzidas por lesões unilaterais do CPFm direito, mas não do CPFm esquerdo. No que diz respeito a estudos envolvendo investigação de neurogliogênese, Czéh e colaboradores (2007) demonstraram que o CPFm possui assimetria intrínseca, com maior proliferação e sobrevivência das células gliais no CPFm esquerdo. Tal lateralização pode refletir uma assimetria funcional, indicando um “domínio” dessa região em situações basais. Neste mesmo estudo, foi demonstrado que o estresse de derrota social crônico

causa uma reversão na assimetria, com maior proliferação e sobrevivência de células no CPFm direito, o que pode refletir a hiperativação dessa área durante o estresse crônico. Tais resultados são apoiados por estudos *post mortem*, os quais revelaram que os números de neurônios e células da glia são afetados em pacientes que tiveram transtornos do humor (CZÉH et al., 2008; RAJKOWSKA et al., 2007; RAJKOWSKA; MIGUEL-HIDALGO, 2007). Além disso, alterações no hipocampo induzidas pelo estresse diminuem algumas funções do CPF (CERQUEIRA et al., 2007) permitindo que amígdala/BNST (responsáveis por coordenar respostas emocionais a estímulos) assumam uma função dominante. Contudo, conforme demonstrado por Johnstone e colaboradores (2007), em situações basais, o CPFm Esquerdo está seletivamente envolvido na regulação (*downregulation*) de emoções negativas, e sua ativação tem alta correlação com a diminuição da atividade da amígdala.

Neste sentido, resultados preliminares do nosso laboratório apontam para a lateralização funcional do CPFm em camundongos expostos ao labirinto em cruz elevado. Enquanto a facilitação nitrérgica (com fármaco doador de NO) do hemisfério esquerdo (CPFm E) ou bilateral não altera a ansiedade, o mesmo composto produz efeito ansiogênico quando injetado no CPFm D. Além disso, a inativação com cloreto de cobalto (CoCl_2) do CPFm E e D aumenta e reduz, respectivamente, os comportamentos defensivos (COSTA et al., 2016). Sendo assim, e considerando 1) que a exposição aguda a diferentes estressores (ex. derrota social; estresse de contenção) não induz alterações no comportamento defensivo de camundongos quando expostos ao labirinto em cruz elevado 24h após o estresse (COSTA et al., 2016), 2) que a exposição crônica ao estresse de naturezas diversas repercute na precipitação de distúrbios neuropsiquiátricos, como transtornos de ansiedade (DE KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005), e 3) que a diminuição volumétrica do CPFm Esquerdo e consequente redução funcional desta área pode estar relacionada com disfunção comportamental e aparecimento de transtornos de ansiedade (CERQUEIRA; ALMEIDA; SOUSA, 2008; DAVIDSON, 1998; JOHNSTONE et al., 2007), uma das hipóteses levantadas no presente estudo é que os efeitos do estresse crônico (isto é, perda do domínio do hemisfério esquerdo e hiperativação do hemisfério direito) podem ser mimetizados pela ativação aguda do CPFm direito, culminando no aparecimento de comportamento ansioso em animais expostos a um teste de ansiedade.

O controle do CPFm sobre o eixo HPA é prejudicado quando os animais são submetidos ao estresse crônico. Sullivan and Gratton (1999) relataram um pico de corticosterona após quatro

semanas de estresse de restrição, um efeito que se acentuou quando o CPFm foi lesado, sendo suas funções complementadas pela amígdala e BNST (CULLINAN et al., 1995; FIGUEIREDO et al., 2003; SULLIVAN; GRATTON, 1999). Corroborando esses resultados, Cerqueira e colaboradores (2007) mostraram que o estresse causa mudanças no hipocampo o que leva a um prejuízo em algumas funções do CPF, permitindo então que a amígdala/BNST assumam uma função dominante. Sabe-se que o córtex infra-límbico projeta extensivamente para o BNST (HURLEY et al., 1991; SESACK et al., 1989; TAKAGISHI; CHIBA, 1991) e que o córtex pré-frontal medial e ventral envia projeções às subdivisões ântero-medial do BNST (CANTERAS; SIMERLY; SWANSON, 1995; CRANE; BULLER; DAY, 2003; CULLINAN; HERMAN; WATSON, 1993). O CPF tem inervações limitadas e não diretas ao PVN (CULLINAN; HERMAN; WATSON, 1993; GRAY; CARNEY; MAGNUSON, 1989; PREWITT; HERMAN, 1998). Estudos de tracejamento têm mostrado que o BNST recebe projeções do córtex pré-frontal que podem ser importantes para respostas de medo, ansiedade e estresse (CHIBA; KAYAHARA; NAKANO, 2001; HURLEY et al., 1991; TAKAGISHI; CHIBA, 1991; VERTES, 2004) e que também é um sítio primário de retransmissão para o PVN (DONG; SWANSON, 2004, 2006). Sendo assim, outra hipótese levantada no presente estudo é que os efeitos do estresse crônico de derrota social (o qual tem o potencial de levar a perda do domínio do CPFm esquerdo e hiperativação do hemisfério direito) ative o BNST, que, por sua vez, modulará os comportamentos defensivos de animais expostos a um teste de ansiedade (LCE). Assim, considerando que a ativação nitrérgica do CPFm Direito resulta em ansiogênese tal como o faz a derrota social crônica, nossa hipótese indica que ambas as condições possam compartilhar mecanismos subjacentes. Se assim, o estresse crônico poderia ser mimetizado pela ativação nitrérgica aguda do CPFm direito (por exemplo, com injeção local de um doador de óxido nítrico), culminando na ansiogênese em animais expostos ao LCE.

1.4 Neurotransmissão: glutamato, óxido nítrico (NO) e fator de liberação de corticotrofina (CRF)

Mudanças comportamentais são acompanhadas de alterações moleculares e estruturais nas quais o envolvimento do glutamato, aminas biogênicas (por ex., dopamina, noradrenalina e serotonina) e CRF já foi demonstrado (revisão, ver DE KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005). O estudo do envolvimento de neurotransmissores nas reações de defesa evidenciou um papel pró-aversivo dos aminoácidos excitatórios, dentre os quais, o principal é o glutamato, bem como o

neuropeptídeo fator de liberação de corticotrofina (CRF - do inglês “*corticotropin-releasing factor*”) (BALDWIN et al., 1991; FARIA et al., 2016; GARTHWAITE; CHARLES; CHESS-WILLIAMS, 1988; MARTINS; MARRAS; GUIMARÃES, 1997; MIGUEL; GOMES; NUNES-DE-SOUZA, 2014; SAHUQUE et al., 2006). Outro importante composto com ações excitatórias em algumas estruturas é o óxido nítrico (NO), um neurotransmissor atípico devido às suas características físico-químicas particulares, constituindo-se um gás altamente difusível e lipofílico (GALLY et al., 1990). O NO é produzido sob ação de uma enzima, a NOS (óxido nítrico sintetase), através de uma reação entre o oxigênio molecular e L-arginina (desaminação oxidativa de seu grupo guanidina), tendo como cofator a molécula de fosfato reduzido de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH - LOHSE; FÖRSTERMANN; SCHMIDT, 1998; MAYER et al., 1991), produzindo, além de NO, uma molécula de L-citrulina (bastante utilizada como método indireto de investigação da produção de NO). Existem três isoformas (isômeros) da NOS: a NOS I ou NOS_n, presente nos neurônios, a NOS II ou NOS_i, induzida, alguns a chamam de imunológica, presente nos macrófagos, neutrófilos e outras células que atuam na resposta a estímulos patológicos (defesa do organismo) e a NOS III ou NOS_e, presente nas células endoteliais (BECKMAN, 1991; DALKARA et al., 1994; DINERMAN et al., 1994; GARTHWAITE; BOULTON, 1995; KOPROWSKI et al., 1993; MURPHY et al., 1993). Tanto a NOS_n quanto a NOS_e são constitutivamente expressas e brevemente ativadas pelo aumento do cálcio intracelular, enquanto a NOS_i requer a síntese de proteínas antes que a enzima seja expressa. Uma vez expressa, a NOS_i produz grandes quantidades de NO durante períodos prolongados que podem resultar em danos neuronais (CHAO et al., 1992; GALEA; FEINSTEIN; REIS, 1992).

Tem sido demonstrado o papel pró-aversivo do NO, que também pode facilitar a liberação de neurotransmissores como o glutamato e o CRF (LEE; KIM; RIVIER, 1999; PRAST; PHILIPPU, 2001; RABER; KOOB; BLOOM, 1995). Na matéria cinzenta periaquedutal (MCP), a inibição da NOS_n bloqueou completamente os efeitos aversivos produzidos pela injeção de NMDA, sugerindo o papel do NO nas reações de defesa (MIGUEL; NUNES-DE-SOUZA, 2006). No BNST, através da injeção de um doador de NO (NOC-9), o NO demonstrou um efeito ansiogênico, provocando *freezing* e aumentando os índices de ansiedade de camundongos expostos ao LCE (FARIA et al., 2016). Além disso, a ativação nitrérgica do CPFm direito (mas não da sua porção esquerda ou bilateralmente) provoca a ansiogênese em camundongos expostos ao LCE (COSTA et al., 2016). Ainda, descobertas anteriores sugerem que a integridade funcional do CPFm (particularmente sua

porção hemisférica esquerda) também contribui para a capacidade de os camundongos lidarem com os efeitos ansiogênicos induzidos pela derrota social (COSTA et al., 2016).

Com relação ao glutamato, sabe-se que é o principal aminoácido excitatório e ubíquo no Sistema Nervoso Central; ele ativa receptores ionotrópicos do tipo NMDA (N-metil-D-Aspartato), AMPA e CAINATO (HERESCO-LEVY, 2003; HUNTLEY; VICKERS; MORRISON, 1994; OZAWA; KAMIYA; TSUZUKI, 1998; SEEBURG, 1993) e também receptores metabotrópicos (acoplados à proteína G). Seus receptores são amplamente distribuídos no SNC e diversos estudos demonstram a presença e participação de receptores do tipo NMDA em estruturas relacionadas com respostas de medo e ansiedade como a MCP, BNST e o CPFm (FARIA et al., 2016; MIGUEL; NUNES-DE-SOUZA, 2008; REN et al., 2019). Os receptores NMDA quando ativados promovem um influxo celular de cálcio, o que desencadeia uma cascata de eventos celulares incluindo ativação da NOS, culminando na produção de NO, como descrito acima (GARTHWAITE et al., 1989; HERESCO-LEVY, 2003; MAYER et al., 1991).

Além das evidências que apontam para o envolvimento da transmissão glutamatérgica sobre a liberação de NO, outros estudos indicam ser o NO um mensageiro retrógrado (difunde-se da célula pós-sináptica para a pré-sináptica) o qual provoca retro-alimentação positiva na liberação de glutamato, através de um mecanismo dependente de GMPc (NOWICKY; BINDMAN, 1993). Além de sua ação sobre o glutamato, o NO parece estar também envolvido direta ou indiretamente na liberação de outros neurotransmissores, como o GABA (ácido gama-amino-butírico), acetilcolina, serotonina, noradrenalina, dopamina, neuropeptídeos, histamina e purinas. Porém, seu papel em muitos casos é dual e depende de sua concentração (PRAST; PHILIPPU, 2001).

Com relação à interação NO/Glutamato, Miguel e Nunes-de-Souza (2006) observaram que os efeitos comportamentais como saltos, corrida e congelamento e antinociceptivo, provocados pela injeção intra-MCP de NMDA (agonista de receptores de mesmo nome) foram completamente bloqueados pela injeção do inibidor específico da enzima NOS neuronal, o NPLA (N ω -propil-L-arginina), no mesmo sítio. Ainda neste contexto, injeções intra-MCPd de AP-7 e NBQX, antagonistas de receptores glutamatérgicos NMDA e AMPA/Cainato, respectivamente, inibiram a resposta de fuga eliciada pelo SIN-1, um doador de NO (MOREIRA; MOLCHANOV; GUIMARÃES, 2004). Estudos do nosso laboratório mostraram que injeções intra-BNST de AP-7 inibiram comportamentos ansiosos eliciados pelo doador de NO, o NOC-9, no LCE (FARIA et al., 2016). Tomadas em conjunto, tais evidências são sugestivas de que o NO pode interferir na

modulação de respostas defensivas tanto na MCPd quanto no BNST, sendo possível que esteja envolvido na modulação do medo/ansiedade desencadeado pela ativação de receptores NMDA nesses núcleos.

Além do glutamato, outro composto, o fator de liberação de corticotrofina (CRF – do inglês “corticotropin-releasing factor”), tem despertado interesse em diversos grupos de pesquisa devido ao seu comprovado envolvimento na excitabilidade neuronal. O CRF é um peptídeo com 41 aminoácidos produzido no hipotálamo, sendo inicialmente conhecido por sua função na via ou eixo HPA, estimulando a secreção de (ACTH) na hipófise anterior (pituitária). O ACTH, por sua vez, estimula a produção de glicocorticóides no córtex das adrenais (VALE et al., 1981). No entanto, estudos anatômicos utilizando anticorpos para CRF identificaram vários sítios no encéfalo de ratos que contêm altas densidades de neurônios CRFérgicos, incluindo núcleos amidalóides, hipocampo, núcleo dorsal da rafe, locus coeruleus (LC), MCP e BNST (BITTENCOURT; SAWCHENKO, 2000; MERCHENTHALER, 1984; SWANSON et al., 1983). Tais evidências foram corroboradas por Van Pett e colaboradores (2000), que identificaram presença de RNA-m codificadores para receptores CRF nestas regiões, que incluem áreas envolvidas no processamento do medo, ansiedade e de informações nociceptivas, caracterizando a importância do desenvolvimento de pesquisas sobre o papel do CRF na antinocicepção induzida por situações ameaçadoras e aversivas.

Além da sua conhecida ação no eixo HPA, o CRF também age em diversas áreas encefálicas, como a amígdala (CARRASCO; VAN DE KAR, 2003; SHEKHAR et al., 2005), BNST (BITTENCOURT; SAWCHENKO, 2000), núcleo dorsal da rafe (CARRASCO; VAN DE KAR, 2003), matéria cinzenta periaquedutal (BORELLI; BRANDÃO, 2008; MARTINS; MARRAS; GUIMARÃES, 1997; MIGUEL; NUNES-DE-SOUZA, 2011), aumentando respostas ansiogênicas em vários testes animais. Existem evidências de que os receptores para o CRF são acoplados à proteína Gs (estimulatória), que estimula a via do AMPc-PKA, sendo subdivididos em dois subtipos, o CRF1 (CHANG et al., 1993; CHEN et al., 1993; VITA et al., 1993) e o CRF2 (LOVENBERG et al., 1995; PERRIN et al., 1995). Sabe-se que o CRF intra-cerebroventricular produz reações comportamentais, fisiológicas e endócrinas semelhantes ao produzido por estresse (DUNN; BERRIDGE, 1990). Camundongos nocaute para receptores CRF₁ apresentaram redução da ansiedade, sugerindo sua participação na modulação desse estado emocional (SMITH et al., 1998; TIMPL et al., 1998). Além disso, foi demonstrado que as ações excitatórias mediadas pela

estimulação dos receptores CRF₁ são bloqueadas por seus antagonistas (BARAM et al., 1997). Bowers e colaboradores (2003) mostraram que a aplicação de CRF na MCP de ratos produziu aumento significativo na taxa de disparos espontâneos das células estudadas. Esse aumento na excitabilidade celular foi também observado em outras regiões. Quanto ao subtipo CRF₂, seu papel nos comportamentos eliciados pelo medo/ ansiedade não está claro, existindo trabalhos contraditórios quanto a sua participação (BALE et al., 2000; KISHIMOTO et al., 2000; TAKAHASHI et al., 2001).

Um conjunto de provas apoia o papel da sinalização CRFérgica no BNST na ansiedade geral (GAFFORD et al., 2012; SAHUQUE et al., 2006; SINK et al., 2013), ansiedade social (LEE et al., 2008), em respostas ao sobressalto acústico (SINK et al., 2013; WALKER et al., 2009), na ansiedade gerada por estresse (HEISLER et al., 2007; TRAN; SCHULKIN; MEERVELD, 2014) de retenção da memória emocional (LIANG; CHEN; CHEN, 2001) e ansiedade durante a retirada de drogas de abuso (HUANG et al., 2010; QI et al., 2016). Stout e colaboradores (2000) relataram que o estresse crônico está associado com níveis extracelulares significativamente elevados de CRF no BNST. Injeções sistêmicas de antagonista seletivo do receptor de CRF₁ reduzem o comportamento de ansiedade no LCE após a derrota social (GRIEBEL et al., 2002). Trabalhos anteriores indicam que a derrota social é modulada pelo CRF (COOPER; HUHMAN, 2005). Evidências indicam que o córtex ativa o eixo HPA e pode fazê-lo potencialmente através de receptores glutamatérgicos bem como CRFérgicos via núcleos do BNST modulando comportamentos defensivos (CHOI et al., 2008a, 2008b; HURLEY et al., 1991; MASSI et al., 2008; RADLEY et al., 2006).

Ainda, com relação à derrota social, pouco se sabe sobre os mecanismos neurobiológicos subjacentes às mudanças comportamentais desencadeadas por tais situações (JASNOW; DAVIS; HUHMAN, 2004). No entanto, diversas linhas de evidências sugerem que o CRF é um candidato para modular essas mudanças. Os efeitos fisiológicos e comportamentais da administração exógena de CRF ou peptídeos relacionados são semelhantes à exposição a um estressor natural (JONES et al., 1998; MOREAU; KILPATRICK; JENCK, 1997; SHERMAN; KALIN, 1987). Além disso, infusões de antagonistas de CRF bloqueiam os efeitos comportamentais da exposição ao estresse e ao CRF administrado exogenamente (FENDT; KOCH; SCHNITZLER, 1997; LUNDKVIST et al.,

1996; MANSBACH; BROOKS; CHEN, 1997; MARTINS; MARRAS; GUIMARÃES, 1997; MENZAGHI et al., 1994).

Juntos, esses achados são sugestivos de que os receptores NMDA e CRF₁ localizados no BNST desempenham um papel na modulação do estresse e da ansiedade e que a liberação de NO no CPFmD e BNST desencadeia respostas ansiogênicas em camundongos expostos ao LCE. Assim, levantamos a hipótese de que a ativação nitrérgica do CPFmD mimetizaria uma condição de estresse, recrutando ativação de receptores NMDA e CRF₁ no BNST. Para investigar esta hipótese, avaliamos (i) a dupla marcação para Δ FosB e NOSn em neurônios do CPFm esquerdo e direito em camundongos cronicamente derrotados; (ii) os efeitos de injeções intra-BNST de antagonistas de receptores NMDA ou CRF₁ na modulação da ansiogênese induzida pela injeção intra-CPFmD de um doador de NO (NOC-9) ou pelo estresse crônico de derrota social em camundongos expostos ao LCE.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Este estudo visou investigar o envolvimento de receptores NMDA e CRF do tipo 1 (CRF₁) no BNST na modulação da ansiedade induzida pela ativação nitrérgica do CPFm Direito e pela derrota social crônica em camundongos submetidos ao LCE.

2.2 Objetivos específicos:

- ✓ Investigar a marcação de Δ FosB e NOSn em neurônios do CPFm esquerdo e direito em camundongos cronicamente derrotados (Experimento 1);
- ✓ Investigar os efeitos do bloqueio de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA e CRFérgicos do tipo 1 no BNST sobre o efeito ansiogênico do NO no CPFm direito de camundongos expostos ao LCE (Experimento 2);
- ✓ Investigar os efeitos do bloqueio de receptores NMDA e CRF₁ no BNST sobre a ansiedade induzida pelo estresse de derrota social crônico (10 dias) em camundongos expostos ao LCE (Experimento 3).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Ética

Os protocolos experimentais realizados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (CEUA/FCF/CAR-UNESP: protocolo número 12/2016) e foram conduzidos de acordo com a regulamentação do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

3.2 Sujeitos:

Os sujeitos utilizados foram 245 camundongos Suíços-Webster machos, pesando entre 25-35g no dia do teste e mais 30 camundongos machos, agressores e da mesma linhagem, pesando entre 40-50g no dia do teste provenientes do biotério central da Universidade Estadual Paulista – UNESP e 14 camundongos coespecíficos não agressivos e também Suíços-Webster, pesando entre 25-30g. Os camundongos foram alojados em grupos de 10 por gaiola (tamanho: 43 x 29 x 16 cm) e os camundongos agressivos foram isolados em gaiolas individuais (28 x 17 x 12 cm). Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura (23 ± 2 °C) e luz (ciclo de 12/12 horas, luzes acesas às 07:00 a.m.) e tiveram livre acesso ao alimento e água, exceto durante os curtos períodos de teste. Todos os camundongos não-agressivos eram *naïve* no início dos experimentos e foram usados apenas uma vez. Os camundongos agressores foram utilizados mais de uma vez, por meio de um cronograma de rotação definido pelo experimentador, a fim de preservar a integridade dos animais. Os camundongos não-agressores foram retirados de um grupo de coespecíficos familiares.

3.3 Escolha de camundongos coespecíficos agressivos

Uma vez chegados ao biotério do Laboratório de Farmacologia (Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP), os camundongos foram alojados em grupos de 10 animais por gaiola (43 x 29 x 16 cm). Durante a habituação às condições locais, um observador treinado identificou os camundongos dominantes de cada gaiola (definido como o sujeito que exibiu comportamento agressivo espontâneo contra outros animais na gaiola de origem), isolando-os em uma gaiola individual (28 x 17 x 12 cm) por pelo menos 4 semanas antes de serem usados como agressores.

3.4 Fármacos

Os fármacos usados foram o NOC-9 [6-(2-hidroxi-1-metil-2-nitrosohidrazino)-N-metil-1-hexanamina], um diazeniodiolato (NONOate), doador de NO de liberação rápida (Tocris Cookson Inc., Ballwin, EUA). O NOC-9 se dissocia espontaneamente dependente do pH, num processo de primeira ordem meia-vida de 1 min e 3 min a 37 °C e 22-25 °C, respectivamente (pH 7,4), para liberar 2 mol de NO por mole do composto original (HRABIE et al., 1993; KEEFER et al., 1996). A principal via fisiológica para a degradação do óxido nítrico atua através do grupo heme (SEREGÉLYES et al., 2004). O NO difunde-se muito rapidamente através das membranas até o lúmen dos vasos, onde reage com hemoglobina (Hb) formando nitratos e metemoglobina (metHb) (GUIX et al., 2005). Outros fármacos foram o CP 376395 [cloridrato de *N*-(1-etilpropil)-3,6-dimetil-2-(2,4,6-trimetilfenoxi)-4-piridinamina], um antagonista seletivo do receptor CRF₁ (Tocris Cookson Inc., Ballwin, EUA) e AP-7 (ácido 2-amino-7-fosfo-heptanóico), um antagonista do receptor de glutamato NMDA. As doses foram baseadas em estudos anteriores (NUNES-DE-SOUZA et al., 2010; SAHUQUE et al., 2006). O NOC-9 foi dissolvido numa solução TRIS, pH 10,00. A razão para a dissolução de NOC-9 em uma solução de pH 10,00 teve por base evitar a formação de NO até o fármaco atingir o tecido cerebral, onde seria produzido em pH fisiológico (7,4) (SECCIA et al., 1996). Os outros fármacos foram dissolvidos em soro fisiológico 0,9%. Assim, enquanto a solução TRIS (veículo) foi usada como controle para injeções de NOC-9, a solução salina fisiológica a 0,9% foi usada como controle para injeções de AP-7 e CP 376395.

3.5 Cirurgia e microinjeção:

Cada camundongo foi submetido à cirurgia estereotáxica para o implante intracraniano de cânula guia (Insight Equipamentos Científicos Ltda., Calibre 26) de aço inoxidável de 7 mm, sob anestesia com injeção intraperitoneal de cetamina (100 mg / kg) e xilazina (10 mg / kg). As cânulas guias foram fixadas ao crânio com parafusos e cimento acrílico. As coordenadas estereotáxicas para o BNST foram 0,5 mm anterior ao bregma, \pm 3,0 mm bilateralmente à linha média e 3,2 mm ventral à superfície do crânio, com a cânula guia em ângulo de 32 °. As coordenadas para o CPFmD foram 1,7 mm anterior ao bregma, -0,3 mm lateral à linha média e 2,1 mm ventral à superfície do crânio (PAXINOS; FRANKLIN, 2001), com a cânula guia na posição vertical +1,0 mm

dorsalmente ao alvo estrutura. Para evitar problemas com obstrução e para reduzir contaminação, foi inserido um estilete (mandril) na cânula-guia.

Imediatamente após a cirurgia, os animais receberam injeção intramuscular de penicilina G benzatina (Pentabiótico, 56,7mg/kg em volume de 0,1 ml; Fort Dodge, Campinas, SP, Brasil) e injeção subcutânea do analgésico anti-inflamatório Banamine (0,5 mg/kg de flunixinina meglumina num volume de 0,3 mL). Cinco a sete dias após a cirurgia, diferentes soluções foram injetadas bilateral ou unilateralmente no BNST e CPFm, respectivamente, por meio de unidades de microinjeção (cânula de aço inoxidável de 33 gauge; Insight Equipamentos Científicos Ltd., Brasil) que se estendem 1,0 mm além da ponta do cânula guia. Cada unidade de microinjeção foi acoplada a uma micro-seringa Hamilton de 2 μ l via tubo de polietileno (PE-10). O procedimento de microinjeção consistiu em moderadamente restringir o animal, removendo a cânula fictícia, inserindo a unidade de injeção in situ e procedendo com a microinjeção, deixando a agulha por mais 30s após a microinjeção estar completa. O volume do fármaco/veículo injetado foi de 0,2 μ L unilateral (CPFmD) e bilateralmente (BNST). A confirmação de um procedimento de injeção foi obtida monitorando o movimento de uma pequena bolha de ar no tubo PE-10.

3.6 Modelos animais

3.6.1 Labirinto em cruz elevado

A busca pela compreensão dos transtornos de ansiedade resultou no desenvolvimento de modelos animais, dentre os quais destaca-se o labirinto em cruz elevado (LCE), um modelo que se baseia na aversão natural de roedores a espaços abertos, amplamente utilizado como ferramenta para estudar comportamentos relacionados à ansiedade (HANDLEY; MITHANI, 1984; LISTER, 1987; PELLOW et al., 1985).

O desenho básico do LCE foi muito semelhante ao originalmente descrito por Lister (1987) e composto de dois braços abertos ($30 \times 5 \times 0,25$ cm) e dois braços fechados ($30 \times 5 \times 15$ cm) conectados através de uma plataforma central comum (5×5 cm). O aparelho foi construído em madeira (assoalho) e vidro transparente (paredes transparentes) e o conjunto de braços elevado a uma altura de 38,5 cm acima do nível do chão por um suporte de madeira.

Após a injeção do fármaco no CPFmD e/ou BNST (para mais detalhes, ver Experimentos 2 e 3 abaixo), cada camundongo foi colocado em uma gaiola (28 × 17 × 12 cm) e, subsequentemente, transportado para a sala do labirinto. Os testes começaram colocando o sujeito na plataforma central do labirinto (de frente para um braço aberto), quando o experimentador imediatamente se retirava para um laboratório adjacente. As sessões de teste duraram 5 minutos e, entre cada animal testado, o labirinto foi completamente limpo com 20% de álcool. Todas as experiências foram realizadas sob iluminação de 1 × 60 W (ou seja, 50 lux no assoalho do LCE), durante a fase de luz do ciclo claro-escuro. Todas as sessões foram gravadas por uma câmera montada verticalmente (JVC “Everio” GZMS110) posicionada a aproximadamente 1 metro do aparelho, ligada a um monitor e gravador de DVD. Os animais foram testados em uma ordem contrabalançada para condições de tratamento.

Os comportamentos apresentados pelos camundongos durante os testes foram analisados e quantificados por um observador treinado sem conhecimento prévio das condições experimentais de cada indivíduo (confiabilidade $\geq 0,90$). As análises comportamentais foram realizadas por meio do software “X-plo-rat 2005”, desenvolvido pelo grupo do Dr. Morato na Faculdade de Filosofia das Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP (o software pode ser baixado gratuitamente em <http://www.oocities.org/xplorat/>). Os parâmetros comportamentais incluíram as medidas espaço-temporais convencionais: número de entradas nos braços abertos (entrada = todas as quatro patas em um braço) e o tempo gasto no braço aberto do labirinto. Estes dados foram utilizados para calcular a percentagem de entradas nos braços abertos ($[\text{aberto} / \text{total}] \times 100$) e a percentagem de tempo gasto no braço aberto do labirinto [por exemplo $(\text{tempo no braço aberto} / 300) \times 100$]. A distância (em centímetros) movida no braço fechado e na plataforma central foi usada como uma medida da atividade locomotora geral.

3.6.2 Derrota social crônica

A derrota social consiste num conflito entre coespecíficos, no qual um animal dominante residente - agressor - que exibe comportamento agressivo espontâneo aos demais da gaiola - vive isolado por, no mínimo, 4 semanas, para intensificar o comportamento agressivo (VALZELLI, 1985) ataca um intruso, que, por sua vez, exibe vários comportamentos defensivos. Ao causar alterações comportamentais, endócrinas e fisiológicas, o modelo de

derrota social tem sido proposto para o estudo de distúrbios comportamentais [por exemplo, depressão, abuso de drogas e ansiedade social (BJÖRKQVIST, 2001; KEENEY; HOGG, 1999; LAVIOLA et al., 1999; STEIN; BOUWER, 1997)]. A derrota social é definida pela exibição da postura de submissão [elevação do corpo sobre as patas traseiras, patas dianteiras estendidas em direção ao agressor, cabeça retraída e orelhas arqueadas (MICZEK, 1983)] por pelo menos 3 segundos ou por um período total máximo de 5 minutos de agressão, o que ocorrer primeiro (YAP et al., 2006). Após a interação social, os animais intrusos voltaram para suas gaiolas, e esse processo foi repetido por 10 dias (derrota social crônica). No 11º dia, os animais tiveram seus encéfalos removidos para a quantificação de neurônios positivos para Δ FosB e NOSn no CPFm ou receberam injeção de fármacos intra-BNST e, em seguida, foram individualmente expostos ao LCE para registro das medidas comportamentais descritas no item 3.6.1 (para detalhes, ver Experimentos 1 e 3 no item 3.7).

3.7 A proteína Δ FosB

A Δ FosB é uma variante truncada via *splicing* alternativo do gene FosB, que pertence à família de genes de ativação imediata Fos e são classificados como fatores de transcrição. Quando uma célula é ativada por diferentes estímulos ocorre a produção da Δ FosB e devido a esse motivo, as proteínas dessa família são largamente empregadas no mapeamento da ativação neural (KOVÁCS, 1998). A Δ FosB é uma proteína composta por 237 aminoácidos, com aproximadamente 26 kD, fortemente estável devido a sua estrutura bioquímica que não possui domínios de degradação em sua porção C-terminal. Além disso, também sofre fosforilação por proteínas quinases no resíduo de Ser27 da porção N-terminal, que oferece proteção adicional contra a degradação proteolítica (NESTLER, 2015). Diversos estudos demonstram que FosB e Δ FosB são produzidas mediante a estímulos repetidos. Enquanto a FosB é rapidamente degradada após sua produção, a variante Δ FosB, altamente estável, se acumula no interior da célula (RUFFLE, 2014).

Nesse sentido, um estudo com ratos Sprague-Dawley submetidos ao estresse agudo de restrição tiveram aumento de c-Fos e FosB nas regiões do CPF e núcleo accumbens (Acb), enquanto a expressão de Δ FosB apareceu somente após o estresse crônico de restrição, predominantemente nas regiões do CPF, Acb e amígdala basolateral (BLA) (PERROTTI et al.,

2004). Ainda, segundo Perrotti e colaboradores (2004), seria interessante especular que a indução robusta de Δ FosB dentro do CPFm pelo estresse crônico altera a função cortical pré-frontal de forma a hiper- (*upregulation*) ou sub-regular (*downregulation*) a influência da região sobre o eixo hipotálamo-pituitária-adrenais (HPA).

3.8 Delineamento experimental

3.8.1 Experimento 1. Efeitos do estresse crônico de derrota social na dupla marcação de Δ FosB e NOSn em neurônios da região dorsal esquerda e direita (PrL + Cg1) do CPFm.

Vinte e quatro horas após a última sessão do estresse de derrota social crônica de 10 dias (n = 5) ou interação não agressiva (n = 6) os animais tiveram seus cérebros removidos para quantificação dos neurônios positivos Δ FosB e NOSn no CPFm. Para controlar os níveis de linha de base da expressão de Δ FosB e NOSn no CPFm, um grupo *naïve* de camundongos (n = 6), ou seja, sem qualquer manipulação comportamental ou farmacológica, foi adicionado ao experimento. Todos os animais foram anestesiados com uretano (2,5 g/kg, por via intraperitoneal) e submetidos a uma perfusão transcardíaca com solução salina tamponada com fosfato (PBS) 0,01 M durante 2 min, seguido por 4% de paraformaldeído (PFA) durante 8 min. Os cérebros foram removidos e mantidos em solução de sacarose a 30% para crioproteção por 48 h. Em seguida, os tecidos foram seccionados a 30 μ m em criostato (Leica CM 1850) e armazenados em solução anticongelante de sacarose e etilenoglicol para serem processados para procedimentos imunoistoquímicos.

3.8.2 Experimento 2. Efeitos de injeções intra-BNST de AP-7 ou CP 376395 na ansiogênese induzida pela injeção intra-CPFmD de NOC-9 em camundongos expostos ao LCE.

Cento e quarenta e seis animais foram pré-tratados bilateralmente com salina, AP-7 0,05 nmol ou CP 376395 3,0 nmol no BNST e 10 min depois receberam tratamento intra-CPFmD de veículo ou NOC-9 37,50 nmol. Imediatamente após a injeção intra-CPFmD do doador de NO, cada camundongo foi colocado no LCE para registrar os índices de ansiedade (% de entradas nos braços abertos – EBA e % de tempo nos braços abertos – TBA) e locomoção (distância percorrida nos braços fechados e na plataforma central) por um período de 5 minutos.

3.8.3 Experimento 3. Efeitos de injeções intra-BNST de AP-7 ou CP 376395 na ansiedade de camundongos expostos ao estresse de derrota social crônica.

Vinte e quatro horas após a última sessão do estresse de derrota social crônica de 10 dias, 82 animais receberam microinjeção bilateral intra-BNST de salina, AP-7 0,05 nmol ou CP 3,00 nmol e, após 10 minutos, foram expostos ao LCE para registrar os índices de ansiedade (% EBA e % TBA) e de locomoção (distância percorrida nos braços fechados e na plataforma central) por um período de 5 minutos. Com o objetivo de controlar o efeito do estresse sobre o comportamento, 49 animais não estressados (isto é, camundongos expostos a um camundongo familiar não agressivo por um período de 5 min durante 10 dias consecutivos) receberam injeção intra-BNST de solução salina, AP-7 (0,05 nmol) ou CP (3,00 nmol) e, após 10 minutos, foram expostos ao LCE.

3.9 Dissecção dos encéfalos e imunofluorescência para Δ FosB e NOSn

As fatias dos encéfalos foram lavadas três vezes de 10 min com PBS 0,01 M num agitador. Em seguida, todas as fatias foram expostas durante 1 h em solução bloqueadora contendo 3% de albumina de soro bovino (BSA), 0,2% de Triton X-100 e 5% de soro equino diluído em PBS 0,01 M. Depois disso, as fatias foram incubadas *overnight* a 4 °C com os anticorpos primários anti-rabbit, reativo para FosB/ Δ FosB [1: 1000, cat. No. (EPR15905), ab184938, Abcam, Cambridge-MA, EUA] e anti-mouse, reativo para NOSn [1: 1000, cat.No. 37-2800 (3G6B10), Life Technologies Co., Rockford-IL, EUA]. Subsequentemente, as fatias foram incubadas durante 2 h à temperatura ambiente em anticorpos secundários anti-rabbit IgG Alexa-Fluor 488 (1: 1000, cat. No. A21206, Life Technologies Co., Eugene-OR, EUA) e anti-mouse IgG Alexa-Fluor 568 (1: 1000, cat. No. A11004, Life Technologies Co., Eugene-OR, EUA). Após várias lavagens em PBS 0,01 M, as fatias foram montadas em lâminas revestidas com gelatina e cobertas com Fluoroshield com DAPI (Sigma-Aldrich F6057, St. Louis-MO, EUA).

3.10 Contagem de células

O número de células imunorreativas foi contado separadamente no CPFm esquerdo e direito. Células positivas duplamente marcadas para Δ FosB e NOSn foram realizadas em três fatias por animal do Bregma +1.70 a +2.22 (coordenadas estereotáticas de Atlas of Paxinos e Franklin, 2011).

Células positivas duplamente marcadas para a contagem de Δ FosB e NOSn foram realizadas em três fatias por cada nível antero-caudal. O valor atribuído de células positivas ao animal foi a média dessas três fatias. Imagens deles foram obtidas em uma ampliação de 20X usando um microscópio de fluorescência (Axio Imager.D2, Carl Zeiss Microscopy, LLC, Thornwood-NY, EUA) conectado a um computador e digitalizado pelo Zen Pro 2.0 (Carl Zeiss Microscopy, LLC, Thornwood- NY, EUA). A dupla marcação foi analisada através da sobreposição das imagens de Δ FosB e NOSn das porções Cg1 e PrL do CPFm com o auxílio de ImageJ 1.48 (National Institutes of Health, Bethesda-MD, EUA) e contadas manualmente.

3.11 Análise histológica:

No final do teste, todos os animais receberam uma infusão intra-CPFmD e/ou intra-BNST de 0,2 μ L de azul de Evans a 1% utilizando o mesmo procedimento de microinjeção descrito para os fármacos. Os animais foram então eutanasiados em uma câmara de CO₂, seus encéfalos foram removidos, e os locais de injeção foram visualizados histologicamente, com base no Atlas de Paxinos e Franklin (2001). As microinjeções foram consideradas válidas quando as unidades de injeção atingiram bilateralmente o BNST e/ou as porções PrL ou Cg1 do CPFmD. Os dados de todas as microinjeções que caíram fora do local foram analisados separadamente como controles anatômicos. Dados de cânulas posicionadas fora do sítio em pelo menos um dos sítios alvo foram excluídos do estudo.

3.12 Análise estatística:

Os dados imunoistoquímicos foram analisados pela análise de variância (ANOVA) de duas vias, considerando os fatores estresse (Controle vs Não-Agressivo vs. Estresse) e hemisfério (direito x esquerdo). Apenas a região dorsal do CPFm (isto é, PrL e Cg1) foi analisada. Nos casos em que a ANOVA apresentou diferenças significativas, foi realizado o teste post hoc de Tukey HSD.

Todos os resultados comportamentais foram inicialmente submetidos ao teste de Levene para homogeneidade de variância. Quando o teste de Levene confirmou a homogeneidade, os resultados foram submetidos à ANOVA de duas vias [Experimento 1 (fator 1: pré-tratamento; fator 2: tratamento); Experimento 3 (fator 1: condição de estresse; fator 2: tratamento), seguida do teste post hoc de Tukey. Quando o teste de Levene indicou heterogeneidade significativa, os resultados

foram submetidos a testes não paramétricos (Kruskal-Wallis seguido de Teste de Dunn). Em todos os casos, o valor de $p < 0,05$ foi aceito como significativo. A homogeneidade de variância foi violada nos seguintes casos: Exp. 2 (para % TBA naqueles animais com implante de cânula positiva e para todas as medidas comportamentais nos animais com cânulas posicionadas fora da área alvo).

4. RESULTADOS

4.1 Experimento 1: O estresse crônico por derrota social aumenta a dupla marcação de Δ FosB e NOSn apenas no CPFm direito.

Enquanto ANOVA de duas vias não revelou qualquer efeito significativo da derrota social para contagem total de marcação de Δ FosB ($F \leq 0,54$; $p \geq 0,58$) ou NOSn ($F \leq 2,75$; $p \geq 0,11$) no mPFC (detalhes para análises estatísticas estão mostrados na Tabela 1), a análise dos dados mostrou efeitos significativos nos fatores estresse ($F_{2,28} = 4,28$, $p = 0,02$) e hemisfério ($F_{1,28} = 7,91$, $p = 0,008$) e uma tendência na interação estresse versus hemisfério ($F_{2,28} = 3,20$, $p = 0,056$) para dupla marcação com Δ FosB e NOSn. O teste post hoc de Tukey revelou que os animais socialmente derrotados apresentaram maior dupla marcação de Δ FosB e NOSn em comparação com grupos não agressivos ($p = 0,03$) e controle ($p = 0,017$) apenas no hemisfério direito. Além disso, o teste de Tukey HSD revelou um aumento da dupla marcação de Δ FosB e NOSn no CPFm direito em comparação com o CPFm esquerdo apenas para animais estressados ($p = 0,017$) (Figura 1A).

Tabela 1. Ausência de efeitos do estresse de derrota social crônico na contagem total da marcação de Δ FosB e NOSn (neurônios positivos/mm²) no CPFm.

Grupo	Controle (n= 6)		INA (n = 6)		Estressados (n=5)		Estatísticas	
	Lado	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo		Direito
ΔFosB							(2,28)= 0,55; 0,58	
Contagem		172,22	196,18	272,92	220,14	204,79	242,71	(1,28)= 0,003; 0,95
Neurônios		(\pm 25,52)	(\pm 39,88)	(\pm 57,27)	(\pm 51,03)	(\pm 32,63)	(\pm 29,09)	(2,28)= 0,31; 0,73
NOSn							(2,28) = 1,01; 0,37	
Contagem		270,43	346,35	299,65	611,11	345,63	1033,75	(1,28) = 2,75; 0,11
Neurônios		(\pm 140,62)	(\pm 170,60)	(\pm 154,84)	(\pm 249,49)	(\pm 204,84)	(\pm 216,58)	(2,28) = 0,65; 0,53

Valores representam médias \pm EPM. INA: interação não agressiva

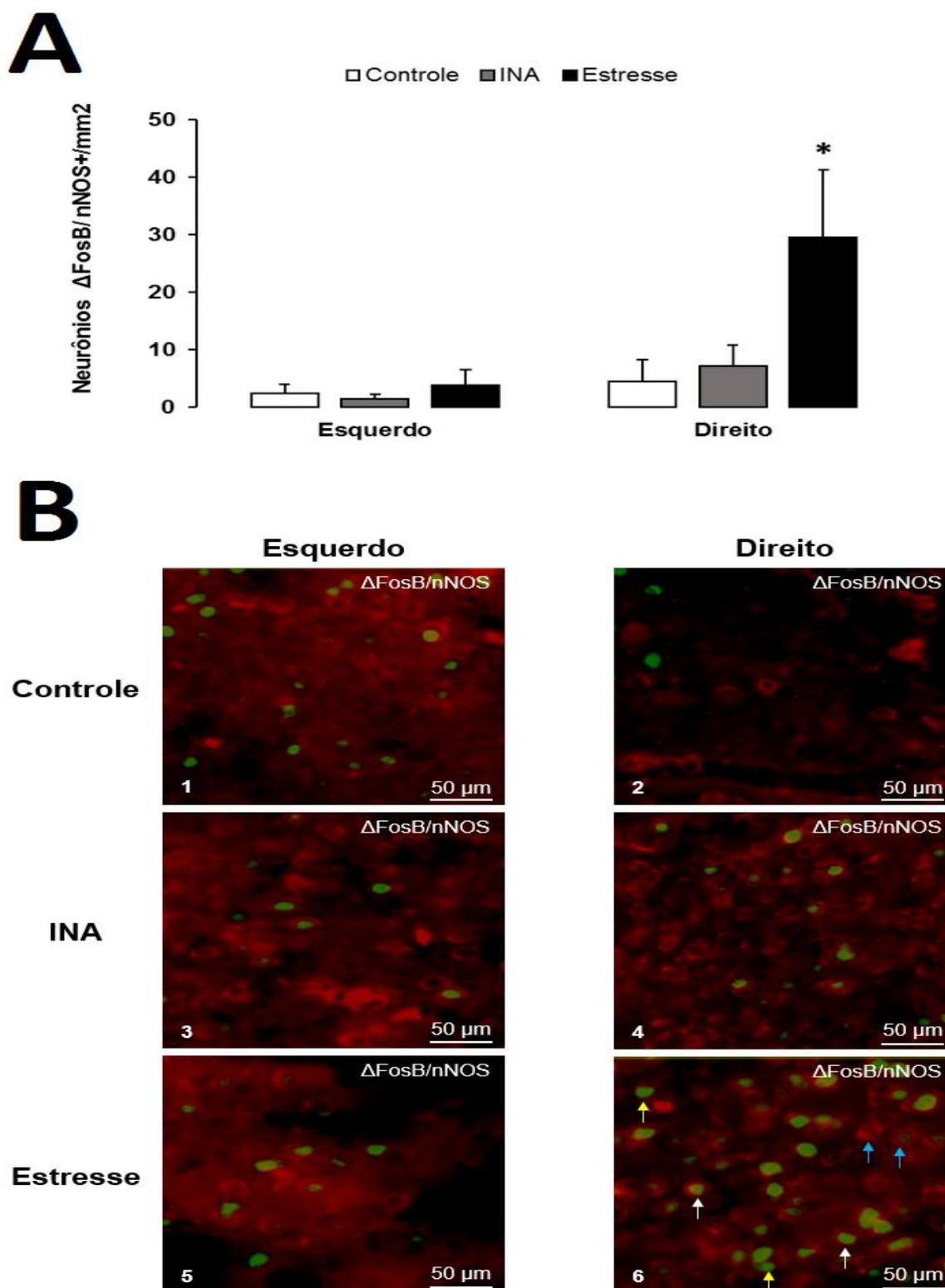


Figura 1: A, Média (+EPM) de neurônios positivos Δ FosB e NOSn no córtex pré-frontal medial esquerdo e direito (CPFm) de camundongos *naive* (controle; n = 6), não estressado (INA: exposto a uma interação não agressiva; n = 6) ou socialmente derrotados (estressados; n = 5). * p < 0,05 comparado a todos os grupos. B, fotomicrografias representativas dos grupos experimentais [controle, não estressado (INA: interação não agressiva) e socialmente derrotado (estressado)] por meio de dupla marcação para Δ FosB e NOSn por imunofluorescência verificada à esquerda (1, 3 e 5) e à direita (2, 4 e 6) do CPFm. Setas significam neurônios positivos para dupla marcação de Δ FosB + NOSn (branco), Δ FosB (amarelo) e NOSn (azul).

4.2 Injeções no BNST e no CPFmD

A Fig. 2A e B mostra um diagrama esquemático de fatias cerebrais coronais, indicando locais da microinjeção bilateral no BNST (Exp. 3) e unilateral (lado direito) no CPFm (Exp. 2), respectivamente. Da mesma forma, a Fig. 2 também ilustra um diagrama esquemático (esquerda) e uma fotomicrografia representativa (direita) dos locais da microinjeção dentro do BNST e CPFmD (C e D; Exp. 2) ou somente no BNST (C; Exp. 3) de camundongos (Paxinos e Franklin, 2001).

A histologia confirmou que um total de 94 (36,43% de um total de 258 animais) camundongos tinham colocação precisa de cânulas no CPFmD e/ou bilateralmente no BNST. Um total de 50 (34,24% de um total de 146 animais) camundongos foram utilizados para investigar os efeitos de injeções intra-BNST de AP-7 ou CP 376395 sobre os efeitos comportamentais produzidos pela injeção intra-CPFmD de NOC-9 em camundongos expostos ao LCE [Experimento 2: salina + veículo (n = 9); salina + NOC-9 (n = 8); Veículo + AP-7 (n = 8); AP-7 + NOC-9 (n = 8); Veículo + CP (n = 9)]; CP + NOC-9 (n = 8). Quarenta e quatro (39,29% de um total de 112 animais) camundongos foram utilizados para avaliar os efeitos das injeções intra-BNST de AP-7 ou CP 376395 na ansiedade de camundongos expostos ao estresse crônico de derrota social [Experimento 3: salina não- agressivo (n = 8); AP-7 não agressivo (n = 5); CP não agressivo (n = 5); salina estressado (n = 9); AP-7 estressado (n = 9); CP estressado (n = 8)]. A histologia também mostrou que um total de 78 (30,23%) camundongos tinham colocações de cânula fora do CPFmD e/ou do BNST. Destes, um total de 40 animais foram utilizados no experimento 2 [salina + veículo (n = 6); salina + NOC-9 (n = 11); Veículo + AP-7 (n = 5); AP-7 + NOC-9 (n = 9); Veículo + CP (n = 3)]; CP + NOC-9 (n = 6)], e trinta e oito animais foram utilizados no experimento 3 [salina não agressivo (n = 7); AP-7 não agressivo (n = 5); CP não agressivo (n = 5); salina estressado (n = 7); AP-7 estressado (n = 5); CP estressado (n = 9)]. Finalmente, a histologia mostrou que um total de 86 (33,33% de um total de 258 animais) camundongos tinham colocações de cânula fora do CPFmD e/ou do BNST direito e/ou esquerdo BNST. Assim, 56 e 30 animais foram excluídos dos experimentos 2 e 3, respectivamente. Em relação aos animais que tiveram colocação de cânula fora do CPFmD, cerca de 80% deles foram colocados na área M2 (córtex motor secundário) e 20% no fmi (fórceps menor do corpo caloso). Posicionamentos de cânula fora do BNST foram colocados em muitas áreas diferentes, no entanto cerca de 36% estavam no núcleo septal medial e lateral (MS e LS), 23% no CPu (caudado putamen) e 13% no MPA (área pré-óptica medial).

4.3 Experimento 2. Injeções intra-BNST de AP-7 ou CP 376395 bloqueiam os efeitos ansiogênicos provocados pela injeção intra-CPFmD de NOC-9.

A Fig. 3A mostra os efeitos do pré-tratamento (isto é, injeções intra-BNST de salina, AP-7 ou CP 376395) nos efeitos do tipo ansiogênico provocados pelo tratamento (ie injeção intra-CPFmD de NOC-9) em camundongos expostos ao LCE. Em relação à porcentagem de entradas no bra

ço aberto, a ANOVA de duas vias não revelou diferenças significativas para o pré-tratamento [$F(2,44) = 2,16$; $p = 0,12$] e tratamento [$F(1,44) = 2,79$; $p = 0,10$], mas mostrou um efeito significativo para a interação pré-tratamento versus tratamento [$F(2,44) = 3,29$; $p = 0,04$]. O teste post hoc de Tukey revelou que o NOC-9 no CPFmD (salina + NOC-9) produziu uma tendência para reduzir a porcentagem EBA em comparação com o controle (salina + veículo; $p = 0,06$). Além disso, nem a micro-injeção de AP-7 nem a de CP 376395 no BNST impediram a tendência ansiogênica induzida por NOC-9 na medida % entrada no braço aberto ($p \geq 0,13$). Em relação à porcentagem de tempo no braço aberto, a ANOVA de Kruskal-Wallis revelou efeitos significativos [$H(5,50) = 13,93$; $p = 0,016$] e o teste post hoc de Dunn mostrou que a injeção intra-CPFmD de NOC-9 reduziu a % TBA apenas naqueles camundongos que receberam injeção intra-BNST de salina (salina + NOC-9) quando comparados com todos os outros grupos ($p \leq 0,03$ comparado a todos os grupos). Em relação à distância percorrida nos braços fechados e na plataforma central, não houve alterações significativas para os fatores pré-tratamento [$F(2,44) = 0,60$; $p = 0,55$], tratamento [$F(1,44) = 1,22$; $p = 0,27$] para a interação pré-tratamento versus tratamento [$F(2,44) = 0,25$; $p = 0,78$] (Fig. 3B).

A Fig. 3C-D mostra a ausência de efeitos do fármaco no comportamento nos animais que tinham injeções fora do CPFmD e do BNST. A ANOVA de Kruskal-Wallis não revelou diferenças significativas em nenhum dos índices de ansiedade [% EBA: $H(5,40) = 1,52$; $p = 0,91$; % TBA: $H(5,40) = 0,87$; $p = 0,97$] ou da atividade locomotora geral [$H(5,40) = 2,79$; $p = 0,73$].

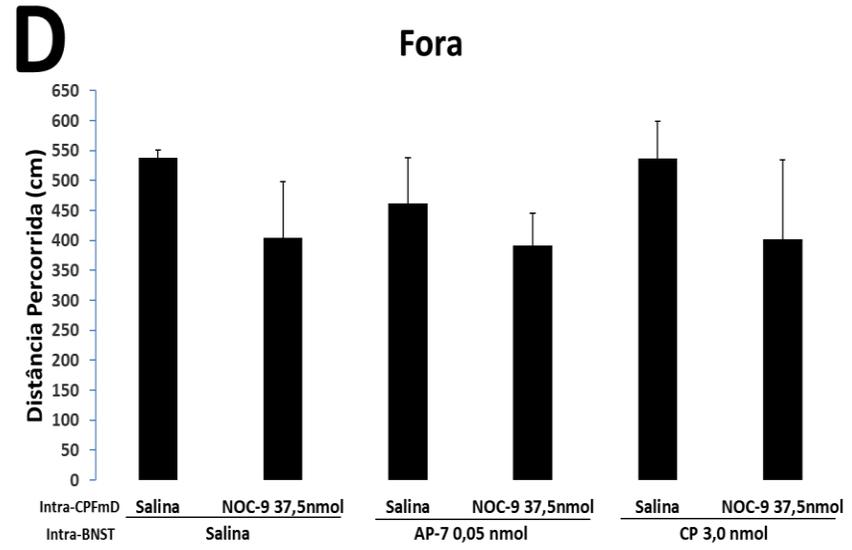
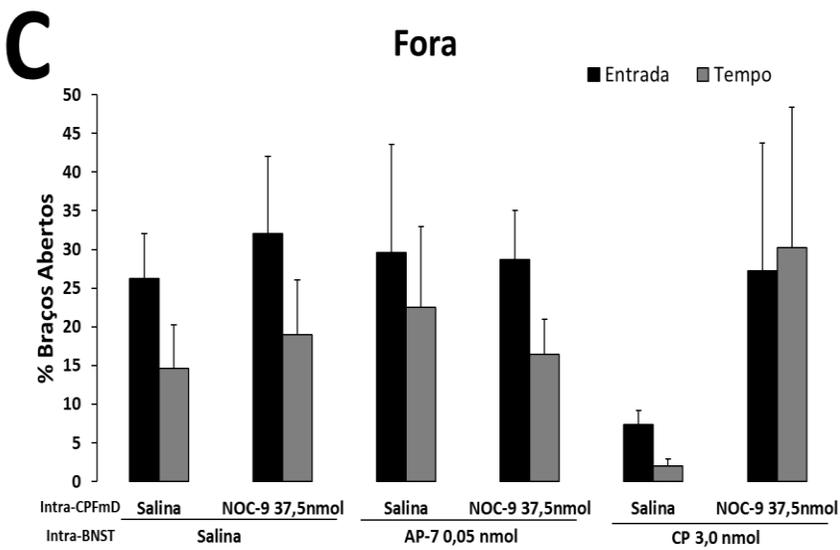
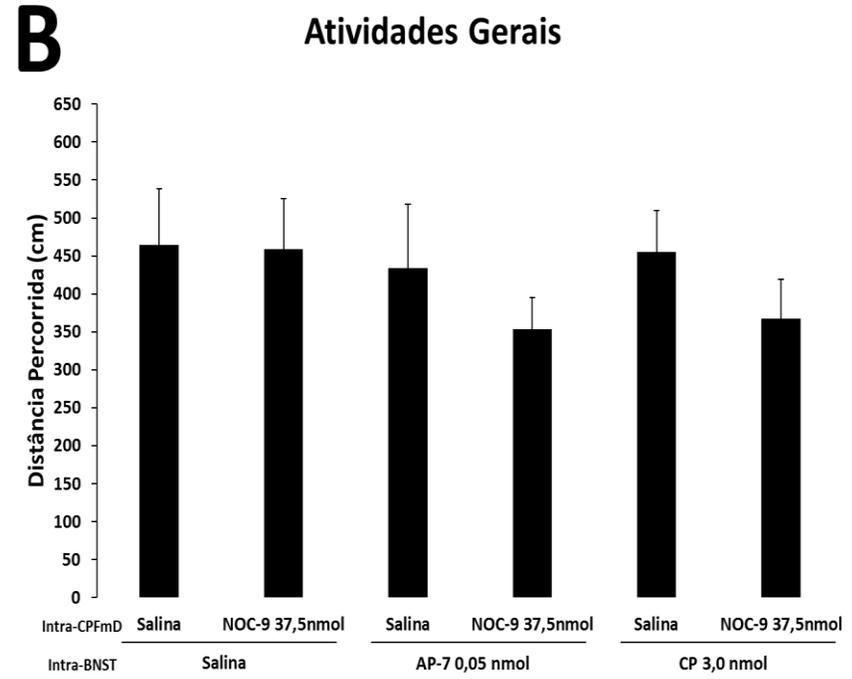
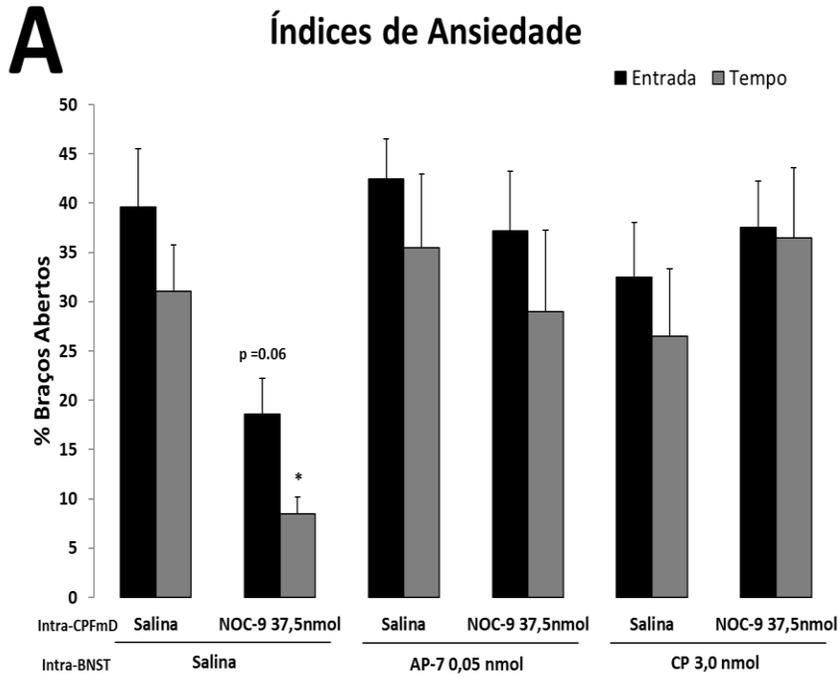


Figura 3. O bloqueio de receptores NMDA (com AP-7) ou CRF₁ (com CP 376395) no BNST prejudica o efeito ansiogênico (A. % EBA e % TBA) provocado pela injeção intra-CPFmD de NOC-9 sem alterar a resposta da atividade locomotora (B. distância percorrida) em camundongos expostos ao LCE [salina + veículo (n = 9); salina + NOC-9 (n = 8); Veículo + AP-7 (n = 8); AP-7 + NOC-9 (n = 8); Veículo + CP (n = 9); CP + NOC-9 (n = 8)]. * p < 0,03 comparado a todos os outros grupos. Ausência de efeitos de AP-7, CP 376395 e NOC-9 injetados fora do BNST e CPFmD na % EBA e % TBA (C) e distância percorrida (D) de camundongos expostos ao LCE [salina + veículo (n = 6); salina + NOC-9 (n = 11); Veículo + AP-7 (n = 5); AP-7 + NOC-9 (n = 9); Veículo + CP (n = 3); CP + NOC-9 (n = 6)]. Barras representam média + EPM.

4.4 Experimento 3. O bloqueio dos receptores NMDA ou CRF₁ no BNST prejudica os efeitos ansiogênicos provocados pelo estresse de derrota social crônica.

A Figura 4A-B mostra os efeitos das injeções intra-BNST de AP-7 ou CP 376395 no comportamento de camundongos expostos ao LCE 24 horas após o estresse social de 10 dias. Em relação à porcentagem de entradas nos braços abertos (% EBA), a ANOVA de duas vias revelou diferenças significativas para o fator de tratamento [$F(2,38) = 4,28$; $p = 0,02$], sem apresentar diferenças significativas para a condição de estresse [$F(1,38) = 2,59$; $p = 0,12$] e condição de estresse versus interação com o tratamento [$F(2,38) = 1,38$; $p = 0,26$]. O teste post hoc de Tukey HSD revelou um aumento da % EBA produzido pela injeção intra-BNST de AP-7 em animais estressados em comparação com animais estressados que receberam salina no BNST ($p = 0,017$). Nenhuma outra diferença significativa de tratamento foi alcançada para % EBA. Em relação à % TBA, a ANOVA revelou diferenças significativas para os fatores estresse [$F(1,38) = 6,44$; $p = 0,015$] e tratamento [$F(2,38) = 8,68$; $p = 0,001$] bem como para a interação estresse versus tratamento [$F(2,38) = 5,37$; $p = 0,01$]. O teste post hoc de Tukey revelou que o estresse crônico de derrota social reduziu a % TBA de animais tratados com salina intra-BNST em comparação com o grupo controle sem estresse (salina não-estressado; $p = 0,001$). Importante, injeções intra-BNST de AP-7 ou CP 376395 aboliram o efeito ansiogênico induzido pelo estresse de derrota social ($p = 0,0003$ e $p = 0,0005$, respectivamente). Finalmente, em relação à distância percorrida nos braços fechados e na plataforma central, a ANOVA não revelou diferença para os fatores estresse [$F(1,38) = 0,07$; $p = 0,79$], tratamento [$F(2,38) = 1,43$; $p = 0,25$] ou interação estresse versus tratamento [$F(2,38) = 1,25$; $p = 0,29$] (Fig. 4B).

A Fig. 4C-D mostra a falta de efeitos de fármacos no comportamento naqueles animais que tinham locais de injeção fora do BNST. Em relação à porcentagem de entradas de braços abertos e à porcentagem de tempo de braço aberto (Fig. 4C), a ANOVA de dois fatores revelou diferenças significativas apenas para fator estresse [% EBA: $F(1,32) = 12,48$; $p = 0,001$; % TBA: $F(1,32) = 31,74$; $p = 0,000$]. Em outras palavras, o efeito do estresse nesses índices de ansiedade não dependeu do tratamento [% EBA: $F(2,32) = 0,78$; $p = 0,47$; % TBA: $F(2,32) = 1,14$; $p = 0,33$]. Além disso, a ANOVA de dois fatores não revelou diferenças significativas para a interação estresse versus tratamento [% EBA: $F(2,32) = 0,67$; $p = 0,52$; % TBA: $F(2,32) = 1,15$; $p = 0,33$]. Finalmente, em relação à distância percorrida nos braços fechados e na plataforma central (Fig. 4D), a ANOVA de dois fatores não revelou diferença para a condição de estresse [$F(1,32) = 0,11$; $p = 0,74$], tratamento [$F(2,32) = 0,82$; $p = 0,45$] ou interação estresse versus tratamento [$F(2,32) = 0,36$; $p = 0,69$].

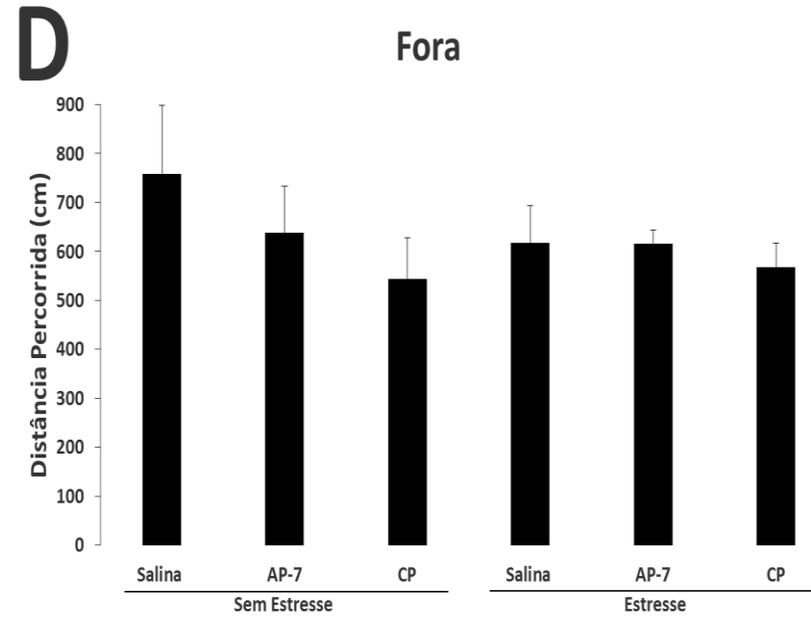
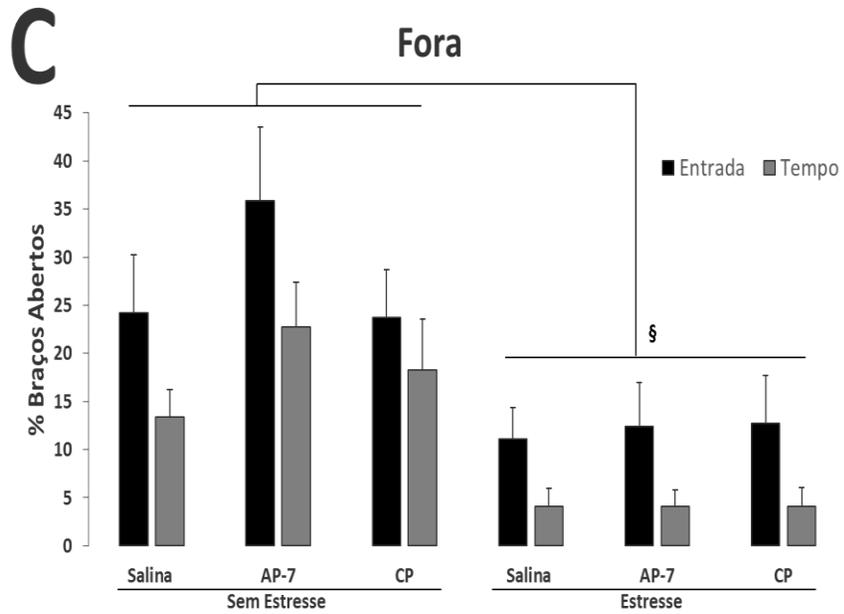
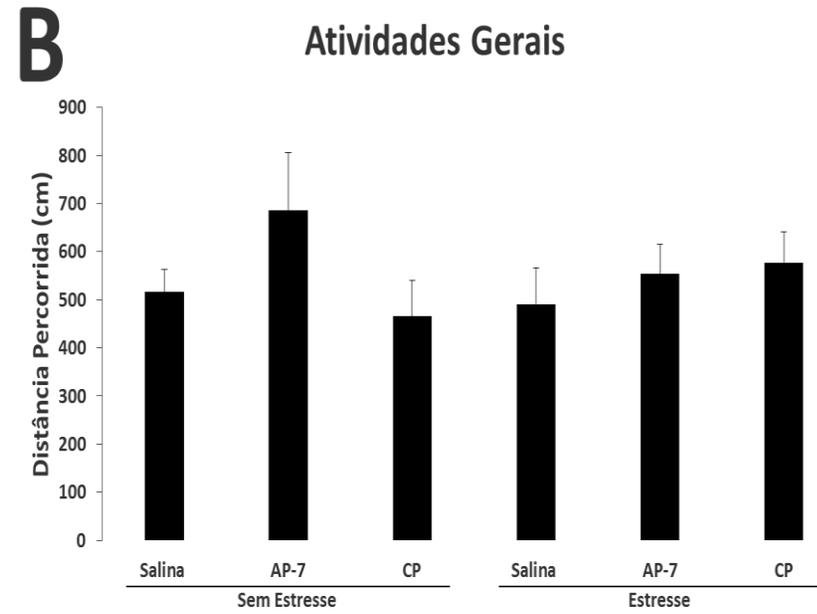
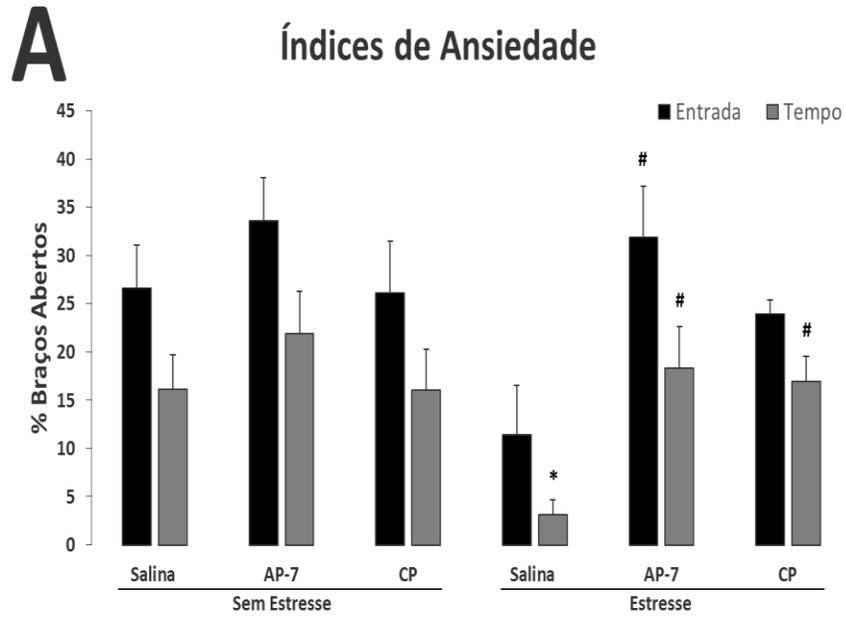


Figura 4. O bloqueio de receptores NMDA (com AP-7) ou CRF1 (com CP 376395) no BNST antagoniza os efeitos ansiogênicos (A: % EBA e % TBA) produzidos pelo estresse crônico de derrota social, sem alterar a atividade locomotora (B : distância percorrida) [salina não agressivo (n = 8); AP-7 não agressivo (n = 5); CP não agressivo (n = 5); salina estressado (n = 9); AP-7 estressado (n = 9); CP estressado (n = 8)]. *, # p <0,01 em comparação com os grupos controle (sem estresse + salina) e estresse + salina, respectivamente. Ausência de efeitos do AP-7 e CP 376395 injetados fora do BNST sobre os efeitos do tipo ansiogênico (C) induzidos pelo estresse crônico de derrota social. § p ≤ 0,001. Nem a injeção de fármacos fora do BNST nem a derrota social crônica alteraram a atividade locomotora geral (D: distância percorrida) de camundongos expostos ao LCE [salina não agressivo (n = 7); AP-7 não agressivo (n = 5); CP não agressivo (n = 5); salina estressado (n = 7); AP-7 estressado (n = 5); CP estressado (n = 9)].

5. DISCUSSÃO

Os principais resultados obtidos no presente estudo (i) mostraram que camundongos cronicamente derrotados apresentam maior dupla marcação de Δ FosB e NOSn nos neurônios do CPFm direito (mas não do esquerdo), (ii) confirmaram achados anteriores mostrando que a ativação nitrérgica do CPFmD (através de injeção local de um doador de NO) provoca efeitos ansiogênicos em camundongos expostos ao LCE, (iii) revelaram que a ansiogênese induzida por NOC-9 foi completamente bloqueada por injeções de doses intrinsecamente inativas de AP-7 ou CP 376395 no BNST. Estes resultados sugerem que a liberação de NO no CPFmD facilita a ativação do receptor glutamatérgico do tipo NMDA e do receptor CRF₁ no BNST levando à ansiogênese. Além disso, (iv) as injeções intra-BNST de AP-7 e CP 376395 também prejudicaram os efeitos ansiogênicos induzidos pelo estresse crônico de derrota social, sugerindo que essa modalidade de ansiedade induzida ambientalmente também recruta receptores NMDA e CRF₁ dessa área límbica do prosencéfalo.

Apesar da derrota social não ter produzido efeitos significativos na expressão total de neurônios positivos para Δ FosB ou NOSn no CPFm, é importante ressaltar que os camundongos socialmente derrotados apresentaram maior expressão de dupla marcação para Δ FosB e NOSn em células na área cortical do que os não-estressados (expostos a um coespecífico não agressivo) ou camundongos experimentalmente *naïve* (controle). Curiosamente, esta diferença de imunofluorescência se mostrou dependente do hemisfério, uma vez que a dupla marcação aumentou apenas no CPFmD. O aumento significativo da marcação de Δ FosB em neurônios contendo NOSn, mas não na população geral de células, sugere que a derrota social crônica ativa repetidamente os neurônios nitrérgicos. A expressão lateralizada de Δ FosB + NOSn em camundongos socialmente derrotados é sugestiva de que alguns neurônios do CPFmD (mas não do CPFmE) são ativados por essa modalidade de estresse em camundongos. Neste contexto, parece razoável sugerir que o NO liberado por alguns neurônios da região dorsal (PrL e Cg1) do CPFmD desempenha um papel na ansiogênese induzida pela derrota social crônica. Para manter a coerência com os locais-alvo destinados aos experimentos 2 e 3, a porção IL do CPFm não foi investigada no presente estudo. A principal razão que evitamos analisar a IL foi baseada em estudos anteriores mostrando que manipulações farmacológicas da porção ventral do CPFm levam a resultados

inconsistentes no comportamento de defesa (CERQUEIRA; ALMEIDA; SOUSA, 2008; CHAN et al., 2011; FITZPATRICK; KNOX; LIBERZON, 2011; SUZUKI et al., 2016).

De fato, injeções intra-CPFmD de NOC-9 reduziram a exploração dos braços abertos, sugerindo um efeito ansiogênico do NO nesta estrutura límbica do prosencéfalo. É importante ressaltar que os efeitos produzidos pelo NOC-9 parecem ser seletivos em comportamentos relacionados à ansiedade, porque esse doador não alterou a distância percorrida nos braços fechados, considerado um índice válido de atividade geral (CRUZ; FREI; GRAEFF, 1994; FILE, 1992; RODGERS; DALVI, 1997). Os resultados do presente estudo corroboram achados prévios mostrando que a injeção intra-CPFmD do NOC-9 provoca ansiedade em camundongos expostos ao LCE (COSTA et al., 2016). Costa e colaboradores (2016) também demonstraram que o efeito ansiogênico após a liberação de NO no CPFm depende do hemisfério onde o doador de NO é injetado. Em resumo, enquanto as injeções de NOC-9 no CPFm esquerdo ou mesmo bilateralmente em ambos os hemisférios não alteraram a ansiedade, esse doador de NO reduziu acentuadamente a exploração dos braços abertos no LCE quando injetado no CPFmD de camundongos. Vários estudos já demonstraram o papel ansiogênico do NO em muitas estruturas cerebrais, como a matéria cinzenta periaquedutal (MCP), o BNST e também o CPF (BRAGA; AGUIAR; GUIMARÃES, 2009; CAMPOS et al., 2013a; COSTA et al., 2016; FARIA et al., 2016; GUIMARÃES et al., 2005; MIGUEL; GOMES; NUNES-DE-SOUZA, 2012). No entanto, enquanto injeções intra-MCP de NOC-9 provocaram comportamento motor explosivo (por exemplo, saltos, corridas), seguido de congelamento e ansiedade (MIGUEL; GOMES; NUNES-DE-SOUZA, 2012), injeções intra-BNST deste doador NO produziram apenas congelamento seguido por aumento da ansiedade no LCE (FARIA et al., 2016). Embora não registrado sistematicamente no presente estudo, comportamentos motores explosivos não foram observados em camundongos que receberam NOC-9 no CPFmD. A ausência de tais efeitos comportamentais corrobora os achados prévios mostrando que a injeção intra-CPFmD desse doador de NO provoca efeito ansiogênico sem produzir saltos, corridas e congelamentos em camundongos (COSTA et al., 2016). Em conjunto, essas evidências e os resultados do presente estudo vão ao encontro do construto teórico postulado por McNaughton e Corr (2004), mostrando que o medo e a ansiedade estão provavelmente organizados em um sistema hierárquico encefálico de defesa.

Com relação aos mecanismos pelos quais o NO produz efeitos do tipo ansiogênicos, vários autores sugeriram que este neurotransmissor atípico induz liberação de glutamato e CRF em diferentes áreas do sistema encefálico de defesa, como a MCP, hipotálamo, *nucleus accumbens*, amígdala, BNST e CPF (COSTA et al., 1993, 2016; FARIA et al., 2016; MOREIRA; MOLCHANOV; GUIMARÃES, 2004; PRAST et al., 1996, 1998; RABER; KOOB; BLOOM, 1995). Mais especificamente no CPF, Montague e colaboradores (1994) demonstraram que injeções locais de L-NOARG, um inibidor da síntese de óxido nítrico (NOS), diminuíram a liberação de glutamato induzida pela ativação do receptor NMDA. Em relação à neurotransmissão do CRF no CPFm, Miguel e colaboradores (2014) demonstraram que injeções locais do neuropeptídeo CRF e do antagonista do CRF₁, CP 376395, aumentaram e atenuaram, respectivamente, a ansiedade de camundongos expostos ao LCE. Além disso, estudos prévios mostraram que os efeitos do tipo ansiogênico provocados pelo NOC-9 são bloqueados por injeções prévias de antagonistas do CRF₁ na MCP (MIGUEL; GOMES; NUNES-DE-SOUZA, 2012) e no BNST (FARIA et al., 2016) em camundongos. O bloqueio dos efeitos ansiogênicos induzidos pela injeção de NOC-9 intra-BNST também foi observado com injeção local prévia de AP-7 (FARIA et al., 2016), sugerindo que além de induzir a liberação de CRF, o NO pode afetar a sinalização glutamatérgica no BNST. Vale ressaltar que, nas doses utilizadas no presente estudo, nem o CP 376395 nem o AP-7 produziram efeitos intrínsecos na ansiedade quando injetados no BNST. Faria e colaboradores (2016) também demonstraram que nem CP 376395 (1,0-3,0 nmol) nem AP-7 (0,05 e 0,1 nmol) injetados no BNST foram capazes de alterar os níveis de ansiedade em camundongos expostos ao LCE. Em outras palavras, os resultados do presente estudo sugerem que o bloqueio de receptores NMDA ou CRF₁ no BNST prejudica seletivamente os efeitos ansiogênicos induzidos pela ativação nitrérgica do CPFmD. Embora os resultados atuais indiquem o envolvimento do CRF e do glutamato no BNST na modulação da ansiedade induzida pela ativação nitrérgica do CPFmD, não se pode excluir a potencial participação de outros neurotransmissores. Ou seja, sabe-se que o NO também é capaz de liberar acetilcolina, dopamina, serotonina e GABA, os quais, por sua vez, são fortes candidatos à modulação da ansiedade (DE OLIVEIRA et al., 2000; MOREIRA; GUIMARÃES, 2004; MOREIRA; MOLCHANOV; GUIMARÃES, 2004; PRAST et al., 1998).

O presente estudo não demonstrou como o bloqueio dos receptores NMDA e do CRF₁ no BNST impede a ansiogênese induzida pela ativação nitrérgica do CPFmD. Tem sido demonstrado que o CPFm estabelece conexões recíprocas com várias áreas subcorticais, como o *nucleus accumbens*,

amígdala, BNST, hipotálamo, núcleo do trato solitário e MCP (GABBOTT et al., 2005; HARDY; LEICHNETZ, 1981; HERMAN et al., 2005; HURLEY et al., 1991; VERTES, 2004). Em outras palavras, ao lado do BNST, todas essas áreas são importantes candidatas a desempenhar um papel na modulação da ansiedade induzida pela liberação de NO no CPFmD. Em relação às conexões entre CPFm e BNST, estudos anteriores mostraram que o BNST recebe projeções excitatórias do CPFm (CH'NG et al., 2018; MASSI et al., 2008; VERTES, 2004). Sendo assim, é possível que a estimulação nitrérgica do CPFmD ative projeções excitatórias para o BNST, levando à ansiogênese. Não se sabe se essa interconexão entre o CPF e o BNST é direta ou indireta (por exemplo, via amígdala) para modular a ansiedade. Nesse contexto, estudos prévios demonstraram projeções glutamatérgicas e CRFérgicas do CPFm para a amígdala (MCDONALD; MASCAGNI; GUO, 1996) e da amígdala para o BNST (DONG; PETROVICH; SWANSON, 2001; GUNGOR; YAMAMOTO; PARE, 2015; MYERS et al., 2014; SAKANAKA; SHIBASAKI; LEDERIS, 1986). Assim, com o objetivo de explicar os presentes resultados, e considerando que a ativação do receptor glutamatérgico do tipo NMDA leva à síntese e liberação de NO (GARTHWAITE et al., 1989), sugerimos que o aumento da produção de NO no BNST (desencadeado pela ativação nitrérgica das projeções excitatórias) do CPFmD facilitaria a liberação de glutamato nesta estrutura do prosencéfalo. Além disso, considerando os achados anteriores (FARIA et al., 2016) que mostraram que a ansiogênese induzida pela produção de NO no BNST é prevenida pela dose intrinsecamente ineficaz de CP 376395 (ou seja, a mesma dose utilizada no presente estudo), também sugerimos que o aumento da liberação de glutamato leva à produção de NO (GARTHWAITE et al., 1989), que, como neurotransmissor retrógrado, facilitaria a liberação de glutamato e de CRF. Embora atraente, essa hipótese precisa ser investigada em novos estudos.

Os nossos resultados também corroboram estudos prévios que demonstraram ser a exposição crônica a estressores altamente ansiogênica (BONDI et al., 2008; DANIEL; RAINNIE, 2016; NORMANDEAU et al., 2018; PÊGO et al., 2008; SHEKHAR et al., 2005). Exposições agudas e crônicas a vários estressores também alteram o funcionamento do cérebro, e vários estudos enfatizaram que algumas estruturas cerebrais (por exemplo, hipocampo, CPFm, amígdala, BNST) são particularmente vulneráveis à situações aversivas (e.g., CERQUEIRA; ALMEIDA; SOUSA, 2008; GEE; CASEY, 2015; MCEWEN, 2008, 2017; MCEWEN; NASCA; GRAY, 2015). Por exemplo, enquanto a exposição repetitiva a estressores causa encurtamento dendrítico no CPFm (COOK; WELLMAN, 2004; RADLEY et al., 2004, 2006; WELLMAN, 2001), esta situação

aversiva provoca efeitos opostos (crescimento dendrítico) na amígdala e BNST (PÊGO et al., 2008; VYAS et al., 2002; VYAS; BERNAL; CHATTARJI, 2003). Além disso, Cerqueira e colaboradores (2008) enfatizaram que o estresse crônico induz a atrofia do hipocampo e altera algumas funções do CPFm (isto é, enquanto prejudica o lado esquerdo, facilita sua porção direita), levando à hiperativação da amígdala e do BNST. As disfunções do CPFm também prejudicam o controle das respostas emocionais, comportamentais e neuroendócrinas aos estressores (GOLD; MOREY; MCCARTHY, 2015; HERMAN et al., 2003; MAREN; HOLMES, 2016; VERMETTEN; BREMNER, 2002). Além disso, o estresse crônico variável tem sido relacionado à plasticidade/remodelação neuronal no BNST, facilitando a expressão de transtornos de medo e ansiedade (HAMMACK et al., 2009). Baseado em evidências anteriores mostrando que o BNST desempenha um papel crucial na modulação das respostas de estresse/ansiedade através de neurotransmissões glutamatérgicas e CRFérgicas (FARIA et al., 2016; KASH; WINDER, 2006; STOUT et al., 2000; TRAN; SCHULKIN; MEERVELD, 2014), nós levantamos a hipótese de que o bloqueio dos receptores de NMDA ou CRF₁ atenuaria a ansiogênese induzida pela derrota social crônica. Assim, como mostrado no Exp. 3, injeções bilaterais de AP-7 e CP 376395 no BNST reverteram completamente a ansiogênese induzida pela derrota social em camundongos expostos ao LCE, sugerindo que a derrota social crônica facilita a ansiedade por meio da neurotransmissão do glutamato e do CRF no BNST. Se assim, o aumento da ansiedade em camundongos expostos à derrota social crônica poderia ter levado a uma disfunção do controle do CPFm sobre a expressão de ansiedade, facilitando a ativação do hemisfério direito e aumentando a ansiedade através da liberação de CRF e glutamato no BNST. Nesse contexto, o aumento da dupla marcação de Δ FosB + NOSn verificada em neurônios do CPFmD (Exp. 1) parece dar apoio a esta hipótese. Embora não tenhamos investigado a integridade neuronal do CPFm neste estudo, a atenuação da ansiedade em camundongos socialmente derrotados que receberam injeção intra-BNST de antagonistas de receptores NMDA ou CRF₁ sugere que tanto a sinalização de glutamato quanto de CRF no BNST desempenha um papel importante na modulação deste tipo de ansiedade induzida pelo ambiente.

Os resultados apresentados neste trabalho parecem estar em consonância com estudos anteriores que demonstraram uma *upregulation* de CRF no BNST induzida por situações de estresse prolongado (MAKINO; GOLD; SCHULKIN, 1994; SHEPARD; BARRON; MYERS, 2003; WATTS; SANCHEZ-WATTS, 1995). Tran e colaboradores (2012) também relataram que o implante de corticosterona (CORT) no núcleo central da amígdala (CeA) provocou efeitos

semelhantes à aversão (por exemplo, aumento da resposta nociceptiva) e aumentou a expressão de RNAm de CRF, bem como elevou a proporção de receptores de CRF₁/CRF₂ no BNST. De modo interessante, a injeção intra-BNST de antagonista de CRF₁ prejudicou os efeitos pró-aversivos induzidos pela CORT intra-CeA. Esse grupo de pesquisa também relatou que enquanto a injeção intra-BNST de CP 376395 não alterou os níveis basais de ansiedade, este antagonista de CRF₁ diminuiu o efeito ansiogênico induzido por situações estressantes em ratos expostos ao LCE (TRAN; SCHULKIN; MEERVELD, 2014). Assim, é possível que o efeito ansiogênico induzido pelo estresse crônico de derrota social em camundongos, o qual também aumenta a CORT plasmática (por exemplo, KOOLHAAS et al., 1997; NORMAN et al., 2015), pode estar relacionado à sensibilização do sistema CRF no BNST, via ativação de neurônios do núcleo CeA. Embora atraente, essa hipótese precisa ser investigada em estudos posteriores.

Embora os resultados mostrados neste estudo enfatizem que os receptores de CRF₁ localizados no BNST desempenham um papel importante no controle da ansiedade induzida pelo estresse de derrota social em camundongos machos, tal conclusão pode não ser necessariamente aplicável a camundongos fêmeas. Neste contexto, estudos anteriores demonstraram que o sistema de CRF no BNST é sexualmente dimórfico (JANITZKY et al., 2014; UCHIDA et al., 2019). Por exemplo, recentemente Uchida e colaboradores (2019) demonstraram que houve uma predominância significativa no número de neurônios expressando CRF no núcleo oval do BNST e no BNST anterolateral de camundongos fêmeas.

Vale ressaltar que os resultados dos Exps. 1-3 foram seguidos por uma conclusão bastante consistente, por exemplo, (i) o estresse de derrota social crônica aumentou a ativação dos neurônios NOSn positivos no CPFmD (Exp. 1), (ii) injeções intra-BNST de AP-7 ou CP 376395 bloquearam a ansiogênese causada pela injeção intra-CPFmD de NOC-9 (Exp. 2) ou por derrota social crônica (Exp. 3). Assim, embora o Exp. 3 não tenha investigado o papel do CPFmD no aumento da ansiedade em camundongos socialmente derrotados, os resultados dos três experimentos são sugestivos de que o estresse crônico por derrota social poderia ter levado à liberação de NO no CPFmD, o que, por sua vez, facilitou a ativação de receptores NMDA e CRF₁ no BNST. No entanto, mais estudos são necessários para esclarecer se a estimulação nitrérgica do CPFmD desempenha um papel crucial no controle da ansiedade induzida pela ativação de receptores NMDA e CRF₁ localizados no BNST em camundongos socialmente derrotados. Finalmente,

embora a lateralização hemisférica do CPFm deva ser considerada em estudos que investigam respostas relacionadas à ansiedade (CERQUEIRA; ALMEIDA; SOUSA, 2008; COSTA et al., 2016; SULLIVAN; GRATTON, 1999; presentes resultados), permanecem indeterminados se os receptores NMDA e/ou o CRF1 localizados no BNST desempenham uma função lateralizada no controle da ansiedade induzida pela ativação nitrérgica do CPFmD ou pelo estresse crônico de derrota social.

6. CONCLUSÃO

Este estudo mostrou que tanto a ativação nitrérgica do CPFmD quanto a derrota social crônica provocam ansiedade sem alterar a atividade locomotora em camundongos expostos ao LCE. Tanto o receptor NMDA quanto o CRF₁ localizados no BNST modulam a ansiedade induzida pela injeção intra-CPFmD de NOC-9 e pela derrota social crônica. Além disso, dado que a derrota social crônica ativa os neurônios NOS_n-positivos no CPFmD, uma única injeção intra-CPFm de um doador de NO, particularmente no lado direito desta estrutura límbica do prosencéfalo, parece ser um protocolo experimental potencialmente útil e rápido para se investigar as consequências ansiogênicas induzidas pelo estresse crônico de derrota social em camundongos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELSON, J. L. et al. HPA axis activity in patients with panic disorder: review and synthesis of four studies. **Depression and Anxiety**, v. 24, n. 1, p. 66–76, 2007.

AHNAOU, A.; DRINKENBURG, W. H. Simultaneous Changes in Sleep, qEEG, Physiology, Behaviour and Neurochemistry in Rats Exposed to Repeated Social Defeat Stress. **Neuropsychobiology**, v. 73, n. 4, p. 209–23, 2016.

ALBONETTI, M. E.; FARABOLLINI, F. Social stress by repeated defeat: effects on social behaviour and emotionality. **Behavioural Brain Research**, v. 62, n. 2, p. 187–93, 1994.

ALHEID, G. F. Extended amygdala and basal forebrain. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 985, p. 185–205, 2003.

ALHEID, G. F.; HEIMER, L. New perspectives in basal forebrain organization of special relevance for neuropsychiatric disorders: The striatopallidal, amygdaloid, and corticopetal components of substantia innominata. **Neuroscience**, v. 27, n. 1, p. 1–39, 1988.

AMBRÉE, O. et al. Social Defeat Modulates T Helper Cell Percentages in Stress Susceptible and Resilient Mice. **Int J Mol Sci.**, v. 20, n. 14, p. E3512, 2019.

ANDRADE, L. H. S. G.; GORENSTEIN, C. Aspectos gerais das escalas de avaliação de ansiedade. In: **Revista de Psiquiatria Clínica**. 25. ed. São Paulo: [s.n.]. p. 285–90.

AYERS, L. W. et al. Freezing to the predator odor 2,4,5 dihydro 2,5 trimethylthiazoline (TMT) is disrupted by olfactory bulb removal but not trigeminal deafferentation. **Behavioural Brain Research**, v. 253, p. 54–9, 2013.

BALDWIN, H. A. et al. CRF antagonist reverses the “anxiogenic” response to ethanol withdrawal in the rat. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 103, n. 2, p. 227–32, 1991.

BALE, T. L. et al. Mice deficient for corticotropin-releasing hormone receptor-2 display anxiety-like behaviour and are hypersensitive to stress. **Nature Genetics**, v. 24, n. 4, p. 410–414, 2000.

BARAM, T. Z. et al. The CRF1 receptor mediates the excitatory actions of corticotropin releasing

factor (CRF) in the developing rat brain: In vivo evidence using a novel, selective, non-peptide CRF receptor antagonist. **Brain Research**, v. 770, n. 1–2, p. 89–95, 1997.

BARRETTO-DE-SOUZA, L. et al. Dual role of nitregeric neurotransmission in the bed nucleus of the stria terminalis in controlling cardiovascular responses to emotional stress in rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 175, n. 19, p. 3773–3783, 2018.

BECK, A. T. **Cognitive therapy and the emotional disorders**. New York: New American Library, 1976.

BECKMAN, J. S. The double-edged role of nitric oxide in brain function and superoxide-mediated injury. **J Dev Physiol.**, v. 15, n. 1, p. 53–9, 1991.

BEDEN, S. N.; BRAIN, P. F. Studies on the effect of social stress on measures of disease resistance in laboratory mice. **Aggressive Behavior**, v. 8, n. 2, p. 126–129, 1982.

BELUJON, P.; GRACE, A. A. Hippocampus, amygdala, and stress: interacting systems that affect susceptibility to addiction. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 1216, p. 114–21, 2011.

BITTENCOURT, J. C.; SAWCHENKO, P. E. Do Centrally Administered Neuropeptides Access Cognate Receptors?: An Analysis in the Central Corticotropin-Releasing Factor System. **The Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 3, p. 1142–1156, 2000.

BJÖRKQVIST, K. Social defeat as a stressor in humans. **Physiol Behav.**, v. 73, n. 3, p. 435–42, 2001.

BLANCHARD, D. C. et al. Subordination stress: behavioral, brain, and neuroendocrine correlates. **Behavioural Brain Research**, v. 58, n. 1–2, p. 113–21, 1993.

BLANCHARD, D. C. et al. VISIBLE BURROW SYSTEM AS A MODEL OF CHRONIC SOCIAL STRESS : BEHAVIORAL AND NEUROENDOCRINE. **Psychoneuroendocrinology**, v. 20, n. 2, p. 117–34, 1995.

BLANCHARD, D. C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R. J. Conditioning and residual emotionality effects of predator stimuli: some reflections on stress and emotion. **Prog**

Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry., v. 27, n. 8, p. 1177–85, 2003.

BLANCHARD, R. J. et al. The characterization and modelling of antipredator defensive behavior. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 14, n. 4, p. 463–72, 1990.

BONDI, C. O. et al. Chronic unpredictable stress induces a cognitive deficit and anxiety-like behavior in rats that is prevented by chronic antidepressant drug treatment. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 2, p. 320–331, 2008.

BORELLI, K. G.; BRANDÃO, M. L. Effects of ovine CRF injections into the dorsomedial, dorsolateral and lateral columns of the periaqueductal gray: a functional role for the dorsomedial column. **Hormones and Behavior**, v. 53, n. 1, p. 40–50, 2008.

BOWERS, L. K.; SWISHER, C. B.; BEHBEHANI, M. M. Membrane and synaptic effects of corticotropin-releasing factor on periaqueductal gray neurons of the rat. **Brain Research**, v. 981, n. 1–2, p. 52–57, 2003.

BRAGA, A. A.; AGUIAR, D. C.; GUIMARÃES, F. S. NOC-9, a selective nitric oxide donor, induces flight reactions in the dorsolateral periaqueductal gray of rats by activating soluble guanylate cyclase. **Neuroscience Letters**, v. 459, n. 2, p. 79–83, 2009.

BRAGA, J. E. F. Ansiedade Patológica: Bases Neurais E Avanços Na Abordagem Psicofarmacológica. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, p. 93–100, maio 2010.

BROUILLARD, C. et al. Vulnerability to stress consequences induced by repeated social defeat in rats: Contribution of the angiotensin II type 1 receptor in cardiovascular alterations associated to low brain derived neurotrophic factor. **Eur J Pharmacol.**, p. 172595, 2019.

BULOS, E. M.; POBBE, R. L.; ZANGROSSI, H. J. Behavioral consequences of predator stress in the rat elevated T-maze. **Physiol Behav.**, v. 146, p. 28–35, 2015.

CALFA, G.; VOLOSIN, M.; MOLINA, V. A. Glucocorticoid receptors in lateral septum are involved in the modulation of the emotional sequelae induced by social defeat. **Behavioural Brain Research**, v. 172, n. 2, p. 324–32, 2006.

CAMPOS, A. C. et al. Increased nitric oxide-mediated neurotransmission in the medial prefrontal cortex is associated with the long lasting anxiogenic-like effect of predator exposure. **Behavioural Brain Research**, v. 256, p. 391–397, 2013a.

CAMPOS, K. F. et al. Ethopharmacological evaluation of the rat exposure test: a prey-predator interaction test. **Behavioural Brain Research**, v. 240, p. 160–70, 2013b.

CANTERAS, N. S.; SIMERLY, R. B.; SWANSON, L. W. Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat. **J Comp Neurol.**, v. 360, n. 2, p. 213–45, 1995.

CARNEVALI, L. et al. Social stress contagion in rats: Behavioural, autonomic and neuroendocrine correlates. **Psychoneuroendocrinology**, v. 82, p. 155–163, 2017.

CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior : The elevated plus-maze model 20 years on. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, p. 1193–1205, 2005.

CARRASCO, G. A.; VAN DE KAR, L. D. Neuroendocrine pharmacology of stress. **Eur J Pharmacol.**, v. 463, n. 1–3, p. 235–72, 2003.

CASADA, J. H.; DAFNY, N. Restraint and stimulation of bed nucleus of the stria terminalis produce similar stress-like behaviors. **Brain Res Bull.**, v. 27, n. 2, p. 207–12, 1991.

CERQUEIRA, J. J. et al. The Prefrontal Cortex as a Key Target of the Maladaptive Response to Stress. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 11, p. 2781–2787, 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, 2008.

CH'NG, S. et al. The intersection of stress and reward: BNST modulation of aversive and appetitive states. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, n. August 2017, p. 0–1, 2018.

CHAN, T. et al. The role of the medial prefrontal cortex in innate fear regulation in infants,

juveniles, and adolescents. **J Neurosci.**, v. 31, n. 13, p. 4991–9, 2011.

CHANG, C. P. et al. Identification of a seven transmembrane helix receptor for corticotropin-releasing factor and sauvagine in mammalian brain. **Neuron**, v. 11, n. 6, p. 1187–1195, 1993.

CHAO, C. C. et al. Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. **J Immunol.**, v. 149, n. 8, p. 2736–41, 1992.

CHEN, R. et al. Expression cloning of a human corticotropin-releasing-factor receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 19, p. 8967–8971, 1993.

CHIBA, T.; KAYAHARA, T.; NAKANO, K. Efferent projections of infralimbic and prelimbic areas of the medial prefrontal cortex in the Japanese monkey, *Macaca fuscata*. **Brain Research**, v. 888, n. 1, p. 83–101, 2001.

CHOI, D. C. et al. Chronic social stress in the visible burrow system modulates stress-related gene expression in the bed nucleus of the stria terminalis. **Physiol Behav.**, v. 89, n. 3, p. 301–310, 2006.

CHOI, D. C. et al. The Anteroventral Bed Nucleus of the Stria Terminalis Differentially Regulates Hypothalamic-Pituitary- Adrenocortical Axis Responses to Acute and Chronic Stress. **Endocrinology**, v. 149, n. 2, p. 818–26, 2008a.

CHOI, D. C. et al. The role of the posterior medial bed nucleus of the stria terminalis in modulating hypothalamic – pituitary – adrenocortical axis responsiveness to acute and chronic stress. **Psychoneuroendocrinology**, v. 33, n. 5, p. 659–669, 2008b.

CIRIELLO, J.; JANSSEN, S. A. Effect of glutamate stimulation of bed nucleus of the stria terminalis on arterial pressure and heart rate. **Am J Physiol.**, v. 265, n. 5 Pt 2, p. H1516-22, 1993.

COLYN, L. et al. Chronic social defeat stress induces sustained synaptic structural changes in the prefrontal cortex and amygdala. **Behavioural Brain Research**, v. 373, p. 112079, 2019.

CONRAD, K. L. et al. Physiology & Behavior Stress-induced alterations in anxiety-like behavior and adaptations in plasticity in the bed nucleus of the stria terminalis. **Physiology & Behavior**, v. 104, n. 2, p. 248–256, 2011.

COOK, S. C.; WELLMAN, C. L. Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. **Journal of Neurobiology**, v. 60, n. 2, p. 236–248, 2004.

COOPER, M. A.; HUHMANN, K. L. Corticotropin-releasing factor type II (CRF2) receptors in the bed nucleus of the stria terminalis modulate conditioned defeat in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). **Behavioral Neuroscience**, v. 119, n. 4, p. 1042–1051, 2005.

COSTA, A. et al. Nitric oxide modulates the release of corticotropin-releasing hormone from the rat hypothalamus in vitro. **Brain Res**, v. 605, p. 187–192, 1993.

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.

COVINGTON, H. E.; MICZEK, K. A. Intense cocaine self-administration after episodic social defeat stress, but not after aggressive behavior: dissociation from corticosterone activation. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 183, n. 3, p. 331–40, 2005.

CRANE, J. W.; BULLER, K. M.; DAY, T. A. Evidence that the bed nucleus of the stria terminalis contributes to the modulation of hypophysiotropic corticotropin-releasing factor cell responses to systemic interleukin-1beta. **THE JOURNAL OF COMPARATIVE NEUROLOGY**, v. 467, n. 2, p. 232–42, 2003.

CRUZ, A. P. M.; FREI, F.; GRAEFF, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 49, n. 1, p. 171–176, 1994.

CULLINAN, W. E. et al. Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. **Neuroscience**, v. 64, n. 2, p. 477–505, 1995.

CULLINAN, W. E.; HERMAN, J. P.; WATSON, S. J. Ventral Subicular Interaction With the Hypothalamic Paraventricular Nucleus: Evidence for a Relay in the Bed Nucleus of the Stria Terminalis. **J Comp Neurol.**, v. 332, n. 1, p. 1–20, 1993.

CZÉH, B. et al. Chronic Social Stress Inhibits Cell Proliferation in the Adult Medial Prefrontal Cortex: Hemispheric Asymmetry and Reversal by Fluoxetine Treatment. **Neuropsychopharmacology**, v. 32, n. 7, p. 1490–1503, 2007.

CZÉH, B. et al. Chronic stress-induced cellular changes in the medial prefrontal cortex and their potential clinical implications: Does hemisphere location matter? **Behavioural Brain Research**, v. 190, n. 1, p. 1–13, 2008.

DALKARA, T. et al. Dual role of nitric oxide in focal cerebral ischemia. **Neuropharmacology**, v. 33, n. 11, p. 1447–52, 1994.

DAMASIO, A. R. Eighth C.U. Ariëns Kappers Lecture. The fabric of the mind: a neurobiological perspective. **Prog Brain Res**, v. 126, p. 457–67, 2000.

DANIEL, S. E.; RAINNIE, D. G. Stress modulation of opposing circuits in the bed nucleus of the stria terminalis. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, p. 103–125, 2016.

DAVIDSON, R. J. Cerebral asymmetry emotions and affective style. In: DAVIDSON, R. J.; HUGHDAHL, K. (Eds.). . **Brain Asymmetry**. Cambridge: MIT Press, 1998. p. 361–387.

DAVIES, D. R. et al. Mild Traumatic Brain Injury with Social Defeat Stress Alters Anxiety, Contextual Fear Extinction, and Limbic Monoamines in Adult Rats. **Front Behav Neurosci.**, v. 10, p. 71, 2016.

DAVIS, M. Are different parts of the extended amygdala involved in fear versus anxiety? **Biological Psychiatry**, v. 44, n. 12, p. 1239–1247, 1998.

DAVIS, M. et al. Phasic vs Sustained Fear in Rats and Humans : Role of the Extended Amygdala in Fear vs Anxiety. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 1, p. 105–35, 2010.

DE KLOET, E. R.; JOËLS, M.; HOLSBOER, F. Stress and the brain: From adaptation to disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 6, n. 6, p. 463–475, 2005.

DE OLIVEIRA, R. M. et al. Expression of neuronal nitric oxide synthase mRNA in stress-related brain areas after restraint in rats. **Neurosci Lett**, v. 289, n. 2, p. 123–126, 2000.

DE OLMOS, J. S.; ALHEID, G. F.; BELTRAMINO, C. A. Amygdala. In: PAXINOS, G. (Ed.). . **The rat nervous system**. 1. ed. Sydney: Academic Press, 1985. p. 223–334.

DE OLMOS, J. S.; HEIMER, L. **The concepts of the ventral striatopallidal system and**

extended amygdala. [s.l: s.n.]. v. 877

DEAKIN, J. F. W.; GRAEFF, F. G. 5-HT and mechanisms of defense. **Psychopharmacology**, v. 5, n. 4, p. 305–15, 1991.

DENENBERG, H. Lateralization of function in rats. **Am J Physiol.**, v. 245, n. 4, p. R505-9, 1983.

DINERMAN, J. L. et al. Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 91, n. 10, p. 4214–8, 1994.

DONG, H.; SWANSON, L. W. Projections from Bed Nuclei of the Stria Terminalis , Posterior Division : Implications for Cerebral Hemisphere Regulation of Defensive and Reproductive Behaviors. **J Comp Neurol.**, v. 471, n. 4, p. 396–433, 2004.

DONG, H. W.; PETROVICH, G. D.; SWANSON, L. W. Topography of projections from amygdala to bed nuclei of the stria terminalis. **Brain Research Reviews**, v. 38, n. 1–2, p. 192–246, 2001.

DONG, H. W.; SWANSON, L. Projections from bed nuclei of the stria terminalis, dorsomedial nucleus: implications for cerebral hemisphere integration of neuroendocrine, autonomic, and drinking responses. **J Comp Neurol.**, v. 494, n. 1, p. 75–107, 2006.

DUNN, A. J.; BERRIDGE, C. W. Physiological and behavioral responses to corticotropin-releasing factor administration: is CRF a mediator of anxiety or stress responses? **Brain Res Brain Res Rev.**, v. 15, n. 2, p. 71–100, 1990.

DUNN, J. D. Plasma corticosterone responses to electrical stimulation of the bed nucleus of the stria terminalis. **Brain Research**, v. 407, n. 2, p. 327–31, 1987.

EDMUNDS, M. Defence in Animals. In: New York: Longman, 1974.

EUSTON, D. R.; GRUBER, A. J.; MCNAUGHTON, B. L. The role of medial prefrontal cortex in memory and decision making. **Neuron.**, v. 76, n. 6, p. 1057–70, 2012.

FALLOON, I. R. et al. Early detection and intervention for initial episodes of schizophrenia. **Schizophr Bull.**, v. 22, n. 2, p. 271–82, 1996.

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

FENDT, M.; KOCH, M.; SCHNITZLER, H. U. Corticotropin-releasing factor in the caudal pontine reticular nucleus mediates the expression of fear-potentiated startle in the rat. **Eur J Neurosci.**, v. 9, n. 2, p. 299–305, 1997.

FERRER-PÉREZ, C. et al. Social Housing Conditions Modulate the Long-Lasting Increase in Cocaine Reward Induced by Intermittent Social Defeat. **Front Behav Neurosci.**, v. 13, n. 148, 2019.

FIGUEIREDO, H. F. et al. Stress Integration after Acute and Chronic Predator Stress : Differential Activation of Central Stress Circuitry and Sensitization of the Hypothalamo-Pituitary-Adrenocortical Axis. **Endocrinology**, v. 144, n. 12, p. 5249–58, 2003.

FILE, S. E. Behavioural detection of anxiolytic action. In: ELLIOTT, J. M.; HEAL, D. J.; MARSDEN, C. A. (Eds.). . **Experimental Approaches To Anxiety and Depression**. Chichester: Wiley, 1992. p. 25–44.

FINNELL, J. E. et al. Physical versus psychological social stress in male rats reveals distinct cardiovascular, inflammatory and behavioral consequences. **PLoS One.**, v. 12, n. 2, p. e0172868, 2017.

FITZPATRICK, C. J.; KNOX, D.; LIBERZON, I. Inactivation of the prelimbic cortex enhances freezing induced by trimethylthiazoline, a component of fox feces. **Behavioural Brain Research**, v. 221, n. 1, p. 320–3, 2011.

FLESHNER, M. et al. Reduced serum antibodies associated with social defeat in rats. **Physiol Behav.**, v. 45, n. 6, p. 1183–7, 1989.

FUCHS, E.; FLÜGGE, G. Social stress in tree shrews: effects on physiology, brain function, and behavior of subordinate individuals. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 73, n. 1, p. 247–58, 2002.

GABBOTT, P. L. A. et al. Prefrontal cortex in the rat: Projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. **Journal of Comparative Neurology**, v. 492, n. 2, p. 145–177, 2005.

GAFFORD, G. M. et al. Cell-type specific deletion of GABA(A) 1 in corticotropin-releasing factor-containing neurons enhances anxiety and disrupts fear extinction. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 40, p. 16330–16335, 2012.

GALEA, E.; FEINSTEIN, D. L.; REIS, D. J. Induction of calcium-independent nitric oxide synthase activity in primary rat glial cultures. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 89, n. 22, p. 10945–9, 1992.

GALLY, J. A. et al. The NO hypothesis : Possible effects of a short-lived , rapidly diffusible signal in the development and function of the nervous system. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 87, n. 9, p. 3547–51, 1990.

GARCIA-GARCIA, A. L. et al. Serotonin inputs to the dorsal BNST modulate anxiety in a 5-HT1A receptor dependent manner. **Mol Psychiatry**, v. 23, n. 10, p. 1990–1997, 2017.

GARTHWAITE, J. et al. NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. **European Journal of Pharmacology: Molecular Pharmacology**, v. 172, n. 4–5, p. 413–416, 1989.

GARTHWAITE, J.; BOULTON, C. L. Nitric oxide signaling in the central nervous system. **Annu Rev Physiol.**, v. 57, p. 683–706, 1995.

GARTHWAITE, J.; CHARLES, S.; CHESS-WILLIAMS, R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. **Nature**, 1988.

GEE, D. G.; CASEY, B. J. The impact of developmental timing for stress and recovery. **Neurobiology of Stress**, v. 1, p. 184–194, 2015.

GOEDERS, N. E. The impact of stress on addiction. **Eur Neuropsychopharmacol.**, v. 13, n. 6, p. 435–41, 2003.

GOEL, N.; BALE, T. L. Examining the intersection of sex and stress in modelling neuropsychiatric disorders. **J. Neuroendocrinol.**, v. 21, n. 4, p. 415–20, 2009.

GOLD, A. L.; MOREY, R. A.; MCCARTHY, G. Amygdala–Prefrontal Cortex Functional Connectivity During Threat-Induced Anxiety and Goal Distraction. v. 77, n. 4, p. 394–403, 2015.

GOLD, P. W.; CHROUSOS, G. P. Organization of the stress system and its dysregulation in melancholic and atypical depression: high vs low CRH/NE states. **Mol Psychiatry**, v. 7, n. 3, p. 254–75, 2002.

GRAEFF, F. G. Brain defense system and anxiety. In: ROTH, M.; BURROUS, G. P.; NOYES, R. (Eds.). . **Handbook of anxiety**. Amsterdam: Elsevier, 1990. p. 307–54.

GRAY, T. S.; CARNEY, M. E.; MAGNUSON, D. J. Direct projections from the central amygdaloid nucleus to the hypothalamic paraventricular nucleus: possible role in stress-induced adrenocorticotropin release. **Neuroendocrinology**, v. 50, n. 4, p. 433–46, 1989.

GRAY, T. S.; MAGNUSON, D. J. Neuropeptide neuronal efferents from the bed nucleus of the stria terminalis and central amygdaloid nucleus to the dorsal vagal complex in the rat. **J Comp Neurol.**, v. 262, n. 3, p. 365–74, 1987.

GRIEBEL, G. U. Y. et al. 3-thiazol-2-amine Hydrochloride (SSR125543A), a Potent and Selective Corticotrophin-Releasing Factor 1 Receptor Antagonist . II . Characterization in Rodent Models of Stress-Related Disorders. v. 301, n. 1, p. 333–345, 2002.

GUIMARÃES, F. S. et al. Role of nitric oxide in brain regions related to defensive reactions. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 8, p. 1313–1322, 2005.

GUIX, F. X. et al. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. **Progress in Neurobiology**, v. 76, n. 2, p. 126–152, 2005.

GUNGOR, N. Z.; YAMAMOTO, R.; PARE, D. Optogenetic Study of the Projections From the Bed Nucleus of the Stria Terminalis To the Central Amygdala. **Journal of Neurophysiology**, p. jn.00677.2015, 2015.

HAMMACK, S. E. et al. Chemical Lesion of the Bed Nucleus of the Stria Terminalis Blocks the Behavioral Consequences of Uncontrollable Stress. **Behav Neurosci.**, v. 118, n. 2, p. 443–8, 2004.

HAMMACK, S. E. et al. Chronic stress increases pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression in the bed nucleus of the stria terminalis (BNST): Roles for PACAP in anxiety-like behavior. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, n. 6, p. 833–843, 2009.

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

HARDY, C. A. et al. Altered T-lymphocyte response following aggressive encounters in mice. **Physiol Behav.**, v. 47, n. 6, p. 1245–51, 1990.

HARDY, S. G. P.; LEICHNETZ, G. R. Frontal cortical projections to the periaqueductal gray in the rat: A retrograde and orthograde horseradish peroxidase study. **Neuroscience Letters**, v. 23, n. 1, p. 13–17, 1981.

HAUGER, R. L. et al. Corticotropin-releasing factor receptors and pituitary adrenal responses during immobilization stress. **Endocrinology**, v. 123, n. 1, p. 396–405, 1988.

HEIM, C. et al. The link between childhood trauma and depression: insights from HPA axis studies in humans. **Psychoneuroendocrinology**, v. 33, n. 6, p. 693–710, 2008.

HEIMER, L. A new anatomical framework for neuropsychiatric disorders and drug abuse. **Am J Psychiatry.**, v. 160, n. 10, p. 1726–39, 2003.

HEISLER, L. K. et al. Serotonin 5-HT_{2C} receptors regulate anxiety-like behavior. **Genes, Brain and Behavior**, v. 6, n. 5, p. 491–496, 2007.

HERBERT, J. Neuroendocrine responses to social stress. **Baillieres Clin Endocrinol Metab**, v. 1, n. 2, p. 467–90, 1987.

HERESCO-LEVY, U. Glutamatergic neurotransmission modulation and the mechanisms of antipsychotic atypicality. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 27, n. 7, p. 1113–1123, 2003.

HERMAN, J. P. et al. Central mechanisms of stress integration: Hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 24, n. 3, p. 151–180, 2003.

HERMAN, J. P. et al. Limbic system mechanisms of stress regulation: Hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 29, n. 8, p. 1201–1213, 2005.

HERMAN, J. P.; ADAMS, D.; PREWITT, C. Regulatory changes in neuroendocrine stress-integrative circuitry produced by a variable stress paradigm. **Neuroendocrinology**, v. 61, n. 2, p. 180–90, 1995.

HRABIE, J. A. et al. New nitric oxide-releasing zwitterions derived from polyamines. **J. Org. Chem.**, v. 58, p. 1472–1476, 1993.

HUANG, M. M. et al. Corticotropin-releasing factor (CRF) sensitization of ethanol withdrawal-induced anxiety-like behavior is brain site specific and mediated by CRF-1 receptors: relation to stress-induced sensitization. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 332, n. 1, p. 298–307, 2010.

HUHMANN, K. L. et al. Effects of social conflict on POMC-derived peptides and glucocorticoids in male golden hamsters. **Physiol Behav.**, v. 47, n. 5, p. 949–56, 1990.

HUNTLEY, G. W.; VICKERS, J. C.; MORRISON, J. H. Cellular and synaptic localization of NMDA and non-NMDA receptor subunits in neocortex: organizational features related to cortical circuitry, function and disease. **Trends Neurosci.**, v. 17, n. 12, p. 536–43, 1994.

HURLEY, K. M. et al. Efferent projections of the infralimbic cortex of the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 308, n. 2, p. 249–276, 1991.

ITOI, K.; SUGIMOTO, N. The brainstem noradrenergic systems in stress, anxiety and depression. **J Neuroendocrinol.**, v. 22, n. 5, p. 355–61, 2010.

JAFERI, A.; BHATNAGAR, S. Corticotropin-releasing hormone receptors in the medial prefrontal cortex regulate hypothalamic-pituitary-adrenal activity and anxiety-related behavior regardless of prior stress experience. **Brain Research**, v. 1186, n. 1, p. 212–223, 2007.

JASINGHANI, S.; ROSENKRANZ, J. A. Repeated social defeat stress enhances the anxiogenic effect of bright light on operant reward-seeking behavior in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 290, p. 172–9, 2015.

JANITZKY, K. et al. Increased CRF mRNA expression in the sexually dimorphic BNST of male but not female GAD67 mice and TMT predator odor stress effects upon spatial memory retrieval. **Behavioural Brain Research**, v. 272, p. 141–9, 2014.

JANKORD, R.; HERMAN, J. P. Limbic regulation of hypothalamo-pituitary-adrenocortical function during acute and chronic stress. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1148, p. 64–73, 2008.

JASNOW, A. M.; DAVIS, M.; HUHMAN, K. L. Involvement of Central Amygdalar and Bed Nucleus of the Stria Terminalis Corticotropin-Releasing Factor in Behavioral Responses to Social Defeat. **Behav Neurosci.**, v. 118, n. 5, p. 1052–1061, 2004.

JIANG, N. et al. Antidepressant-like effects of 20(S)-protopanaxadiol in a mouse model of chronic social defeat stress and the related mechanisms. **Phytother Res.**, 2019.

JOHNSTONE, T. et al. Failure to Regulate: Counterproductive Recruitment of Top-Down Prefrontal-Subcortical Circuitry in Major Depression. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 33, p. 8877–8884, 2007.

JONES, D. N. et al. The behavioural effects of corticotropin-releasing factor-related peptides in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 138, n. 2, p. 124–32, 1998.

KASH, T. L. The role of biogenic amine signaling in the bed nucleus of the stria terminals in alcohol abuse. **Alcohol**, v. 46, n. 4, p. 303–8, 2012.

KASH, T. L.; WINDER, D. G. Neuropeptide Y and corticotropin-releasing factor bi-directionally modulate inhibitory synaptic transmission in the bed nucleus of the stria terminalis. **Neuropharmacology**, v. 51, n. 5, p. 1013–1022, 2006.

KEEFER, L. K. et al. “NONOates” (1-substituted diazen-1-ium-1,2-diolates) as nitric oxide donors: convenient nitric oxide dosage forms. **Methods Enzymol.**, v. 268, p. 281–93, 1996.

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**, 1999.

KIDMAN, A. Neurochemical and cognitive aspects of anxiety disorders. **Progress in Neurobiology**, v. 32, n. 5, p. 391–402, 1989.

KINSEY, S. G. et al. Repeated social defeat causes increased anxiety-like behavior and alters splenocyte function in C57BL / 6 and CD-1 mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 21, n. 4, p. 458–66, 2007.

KISHIMOTO, T. et al. Deletion of *crhr2* reveals an anxiolytic role for corticotropin-releasing hormone receptor-2. **Nature Genetics**, v. 24, n. 4, p. 415–9, 2000.

KISS, A.; AGUILERA, G. Regulation of the hypothalamic pituitary adrenal axis during chronic stress : responses to repeated intraperitoneal hypertonic saline injection. **Brain Research**, v. 630, n. 1–2, p. 262–270, 1993.

KOCH, C. E. et al. Time-of-day-dependent adaptation of the HPA axis to predictable social defeat stress. **J Endocrinol.**, v. 231, n. 3, p. 209–221, 2016.

KOOLHAAS, J. M. et al. The temporal dynamics of the stress response. **Neurosci Biobehav Rev.**, v. 21, n. 6, p. 775–82, 1997.

KOPROWSKI, H. et al. In vivo expression of inducible nitric oxide synthase in experimentally induced neurologic diseases. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 90, n. 7, p. 3024–7, 1993.

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

KRISHNAN, V. et al. Molecular Adaptations Underlying Susceptibility and Resistance to Social Defeat in Brain Reward Regions. **Cell.**, v. 131, n. 2, p. 391–404, 2007.

KUDRYAVTSEVA, N. N.; BAKSHTANOVSKAYA, I.; KORYAKINA, L. A. Social model of depression in mice of C57BL/6J strain. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 38, n. 2,

p. 315–20, 1991.

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, 1999.

LEE, S.; KIM, C. K.; RIVIER, C. Nitric oxide stimulates ACTH secretion and the transcription of the genes encoding for NGFI-B, corticotropin-releasing factor, corticotropin-releasing factor receptor type 1, and vasopressin in the hypothalamus of the intact rat. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 19, n. 17, p. 7640–7647, 1999.

LEE, Y. et al. Repeated stimulation of CRF receptors in the BNST of rats selectively induces social but not panic-like anxiety. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 11, p. 2586–94, 2008.

LI, J.; SUN, Y.; YE, J. Electroacupuncture Decreases Excessive Alcohol Consumption Involving Reduction of FosB / D FosB Levels in Reward-Related Brain Regions. **PloS ONE**, v. 7, n. 7, p. e40347, 2012.

LIANG, K. C.; CHEN, H. C.; CHEN, D. Y. Posttraining infusion of norepinephrine and corticotropin releasing factor into the bed nucleus of the stria terminalis enhanced retention in an inhibitory avoidance task. **Chin J Physiol.**, v. 44, n. 1, p. 33–43, 2001.

LISTER, R. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, n. 2, p. 0–5, 1987.

LLOYD, R. B.; NEMEROFF, C. B. The role of corticotropin-releasing hormone in the pathophysiology of depression: therapeutic implications. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 6, p. 609–17, 2011.

LOHSE, M. J.; FÖRSTERMANN, U.; SCHMIDT, H. H. H. W. Pharmacology of NO : cGMP signal transduction. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.**, v. 358, n. 1, p. 111–2, 1998.

LOVENBERG, T. W. et al. Cloning and characterization of a functionally distinct corticotropin-releasing factor receptor subtype from rat brain. **Proceedings of the National Academy of**

Sciences of the United States of America, v. 92, n. 3, p. 836–840, 1995.

LUNDKVIST, J. et al. A non peptidic corticotropin releasing factor receptor antagonist attenuates fever and exhibits anxiolytic-like activity. **Eur J Pharmacol.**, v. 309, n. 2, p. 195–200, 1996.

MAIER, S. F.; WATKINS, L. R. Stressor controllability and learned helplessness: the roles of the dorsal raphe nucleus, serotonin, and corticotropin-releasing factor. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 4–5, p. 829–41, 2005.

MAKINO, S.; GOLD, P. W.; SCHULKIN, J. Effects of corticosterone on CRH mRNA and content in the bed nucleus of the stria terminalis ; comparison with the effects in the central nucleus of the amygdala and the paraventricular nucleus of the hypothalamus. **Brain Research**, v. 657, n. 1–2, p. 141–9, 1994.

MAKINSON, R. et al. Physiology & Behavior Chronic social subordination stress modulates glutamic acid decarboxylase (GAD) 67 mRNA expression in central stress circuits. **Physiology & Behavior**, v. 146, p. 7–15, 2015.

MANSBACH, R. S.; BROOKS, E. N.; CHEN, Y. L. Antidepressant-like effects of CP-154,526, a selective CRF1 receptor antagonist. **Eur J Pharmacol.**, v. 323, n. 1, p. 21–6, 1997.

MAREN, S.; HOLMES, A. Stress and fear extinction. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 1, p. 58–79, 2016.

MARTÍ, O. et al. Direct evidence for chronic stress-induced facilitation of the adrenocorticotropin response to a novel acute stressor. **Neuroendocrinology**, v. 60, n. 1, p. 1–7, 1994.

MARTINEZ, M.; PHILLIPS, P. J.; HERBERT, J. Adaptation in patterns of c-fos expression in the brain associated with exposure to either single or repeated social stress in male rats. **European Journal of Neuroscience**, v. 10, n. 1, p. 20–33, 1998.

MARTINS, A. P.; MARRAS, R. A.; GUIMARÃES, F. S. Anxiogenic effect of corticotropin-releasing hormone in the dorsal periaqueductal grey. **Neuroreport.**, v. 8, n. 16, p. 3601–4, 1997.

MASINI, C. V.; SAUER, S.; CAMPEAU, S. Ferret odor as a processive stress model in rats:

neurochemical, behavioral, and endocrine evidence. **Behavioral Neuroscience**, v. 119, n. 1, p. 280–92, 2005.

MASSI, L. et al. Cannabinoid Receptors in the Bed Nucleus of the Stria Terminalis Control Cortical Excitation of Midbrain Dopamine Cells In Vivo. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 42, p. 10496–10508, 2008.

MAYER, B. et al. Brain nitric oxide synthase is a biopterin- and flavin-containing. **FEBS Lett.**, v. 288, n. 1–2, p. 187–91, 1991.

MCDONALD, A. J.; MASCAGNI, F.; GUO, L. Projections of the medial and lateral prefrontal cortices to the amygdala: A Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study in the rat. **Neuroscience**, v. 71, n. 1, p. 55–75, 1996.

MCEWEN, B. S. Stress, Definitions and Concepts of. In: FINK, G. (Ed.). . **Encyclopedia of Stress**. 1st. ed. San Diego: Academic Press, 2000. p. 508–509.

MCEWEN, B. S. Central effects of stress hormones in health and disease: Understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. **European Journal of Pharmacology**, v. 583, n. 2–3, p. 174–185, 2008.

MCEWEN, B. S. Neurobiological and Systemic Effects of Chronic Stress. **Chronic Stress**, v. 1, 2017.

MCEWEN, B. S.; NASCA, C.; GRAY, J. D. Stress Effects on Neuronal Structure : Hippocampus , Amygdala , and Prefrontal Cortex. v. 41, n. 1, p. 3–23, 2015.

MCNAUGHTON, N.; CORR, P. J. A two-dimensional neuropsychology of defense: Fear/anxiety and defensive distance. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 28, n. 3, p. 285–305, 2004.

MEEWISSE, M. L. et al. Cortisol and post-traumatic stress disorder in adults: systematic review and meta-analysis. **Br J Psychiatry**, v. 191, p. 387–92, 2007.

MENZAGHI, F. et al. Characterization of a novel and potent corticotropin-releasing factor antagonist in rats. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 269, n. 2, p. 564–72, 1994.

MERCHENTHALER, I. Corticotropin releasing factor (CRF)-like immunoreactivity in the rat central nervous system. Extrahypothalamic distribution. **Peptides**, v. 5, n. 1, p. 53–69, 1984.

MICZEK, K. A. Ethological analysis of drug action on aggression and defense. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 7, n. 4–6, p. 519–24, 1983.

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.

MICZEK, K. A.; YAP, J. J.; COVINGTON, H. E. Social stress, therapeutics and drug abuse: preclinical models of escalated and depressed intake. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 120, n. 2, p. 102–28, 2008.

MICZEK, K.; THOMPSON, M.; SHUSTER, L. Opioid-like analgesia in defeated mice. **Science**, 1982.

MIGUEL, T. T.; GOMES, K. S.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Contrasting effects of nitric oxide and corticotropin-releasing factor within the dorsal periaqueductal gray on defensive behavior and nociception in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 4, p. 299–307, 2012.

MIGUEL, T. T.; GOMES, K. S.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Tonic modulation of anxiety-like behavior by corticotropin-releasing factor (CRF) type 1 receptor (CRF1) within the medial prefrontal cortex (mPFC) in male mice: Role of protein kinase A (PKA). **Hormones and Behavior**, v. 66, n. 2, p. 247–256, 2014.

MIGUEL, T. T.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Defensive-like behaviors and antinociception induced by NMDA injection into the periaqueductal gray of mice depend on nitric oxide synthesis. **Brain Research**, v. 1076, n. 1, p. 42–8, 2006.

MIGUEL, T. T.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Anxiogenic-like effects induced by NMDA receptor activation are prevented by inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the periaqueductal gray in mice. **Brain Research**, v. 1240, p. 39–46, 2008.

MIGUEL, T. T.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Anxiogenic and antinociceptive effects induced by corticotropin-releasing factor (CRF) injections into the periaqueductal gray are modulated by CRF1 receptor in mice. **Hormones and Behavior**, v. 60, n. 3, p. 292–300, 2011.

MOGA, M. M.; SAPER, C. B.; GRAY, T. S. Bed nucleus of the stria terminalis: cytoarchitecture, immunohistochemistry, and projection to the parabrachial nucleus in the rat. **J Comp Neurol.**, v. 283, n. 3, p. 315–32, 1989.

MONROE, S. M. Psychological Stressors, Overview. In: FINK, G. (Ed.). . **Encyclopedia of Stress**. 1st. ed. San Diego: Academic Press, 2000. p. 287–294.

MONTAGUE, P. R. et al. Role of NO production in NMDA receptor-mediated neurotransmitter release in cerebral cortex. **Science (New York, N.Y.)**, 1994.

MOR, G.; SAPHIER, D.; FELDMAN, S. Neural pathways that mediate the effects of afferent stimuli on paraventricular nucleus multiunit activity in freely moving rats. **Journal of Neuroscience Research**, v. 17, n. 4, p. 452–8, 1987.

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

MOREAU, J. L.; KILPATRICK, G.; JENCK, F. Urocortin, a novel neuropeptide with anxiogenic-like properties. **Neuroreport.**, v. 8, n. 7, p. 1697–701, 1997.

MOREIRA, F. A.; GUIMARÃES, F. S. Benzodiazepine receptor and serotonin 2A receptor modulate the aversive-like effects of nitric oxide in the dorsolateral periaqueductal gray of rats. **Psychopharmacology**, v. 176, n. 3–4, p. 362–368, 2004.

MOREIRA, F. A.; MOLCHANOV, M. L.; GUIMARÃES, F. S. Ionotropic glutamate-receptor antagonists inhibit the aversive effects of nitric oxide donor injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats. **Psychopharmacology**, v. 171, n. 2, p. 199–203, 2004.

MURPHY, S. et al. Synthesis of nitric oxide in CNS glial cells. **Trends Neurosci.**, v. 16, n. 8, p. 323–8, 1993.

MYERS, B. et al. Central stress-integrative circuits: Forebrain glutamatergic and GABAergic projections to the dorsomedial hypothalamus, medial preoptic area, and bed nucleus of the stria terminalis. **Brain Structure and Function**, v. 219, n. 4, p. 1287–1303, 2014.

NELSON, R. J.; TRAINOR, B. C. Neural mechanisms of aggression. **Nat Rev Neurosci.**, v. 8, n. 7, p. 536–46, 2007.

NESTLER, E. J. Δ FosB: A transcriptional regulator of stress and antidepressant responses. **European Journal of Pharmacology**, v. 753, p. 66–72, 2015.

NIE, X. et al. The Innate Immune Receptors TLR2/4 Mediate Repeated Social Defeat Stress-Induced Social Avoidance through Prefrontal Microglial Activation. **Neuron.**, v. 99, n. 3, p. 464–479, 2018.

NORMAN, K. J. et al. Social stress and escalated drug self-administration in mice I. Alcohol and corticosterone. **Psychopharmacology (Berl).**, v. 232, n. 6, p. 991–1001, 2015.

NORMANDEAU, C. P. et al. A key role for neurotensin in chronic-stress-induced anxiety-like behavior in rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 43, n. 2, p. 285–293, 2018.

NOWICKY, A. V.; BINDMAN, L. J. The nitric oxide synthase inhibitor, N-monomethyl-L-arginine blocks induction of a long-term potentiation-like phenomenon in rat medial frontal cortical neurons in vitro. **Journal of Neurophysiology**, v. 70, n. 3, p. 1255–9, 1993.

NUNES-DE-SOUZA, R. L. et al. Role of nitric oxide in the periaqueductal gray in defensive behavior in mice: Influence of prior local N- methyl-D-aspartate receptor activation and aversive condition. **Psychology and Neuroscience**, v. 3, n. 1, p. 59–66, 2010.

OTTENWELLER, J. E. et al. Adrenocortical and behavioral responses to repeated stressors: toward an animal model of chronic stress and stress-related mental illness. **Biological Psychiatry**, v. 26, n. 8, p. 829–41, 1989.

OTTENWELLER, J. E. et al. A chronic stress state in rats: effects of repeated stress on basal corticosterone and behavior. **Physiol Behav.**, v. 51, n. 4, p. 689–98, 1992.

OZAWA, S.; KAMIYA, H.; TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Progress in Neurobiology**, v. 54, n. 5, p. 581–618, 1998.

PALAZIDOU, E. The neurobiology of depression. **British Medical Bulletin**, v. 101, p. 127–45, 2012.

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

PÊGO, J. M. et al. Dissociation of the morphological correlates of stress-induced anxiety and fear. **European Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 6, p. 1503–1516, 2008.

PELLOW, S. et al. Validation of open " closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J Neurosci Methods.**, v. 14, n. 3, p. 149–167, 1985.

PERRIN, M. et al. Identification of a second corticotropin-releasing factor receptor gene and characterization of a cDNA expressed in heart. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 7, p. 2969–73, 1995.

PERROTTI, L. I. et al. Induction of deltaFosB in reward-related brain structures after chronic stress. **J Neurosci.**, v. 24, n. 47, p. 10594–10602, 2004.

PRAST, H. et al. Nitric oxide influences the release of histamine and glutamate in the rat hypothalamus. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, 1996.

PRAST, H. et al. Nitric oxide-induced release of acetylcholine in the nucleus accumbens: role of cyclic GMP, glutamate, and GABA. **Journal of Neurochemistry**, v. 71, n. 1, p. 266–273, 1998.

PRAST, H.; PHILIPPU, A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. **Progress in Neurobiology**, v. 64, n. 1, p. 51–68, 2001.

PREWITT, C. M. F.; HERMAN, J. P. Anatomical interactions between the central amygdaloid nucleus and the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat : a dual tract-tracing analysis. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 15, n. 3, p. 173–185, 1998.

PULLIAM, J. V. et al. Social defeat stress produces prolonged alterations in acoustic startle and

body weight gain in male Long Evans rats. **Journal of Psychiatric Research**, v. 44, n. 2, p. 106–11, 2010.

QI, X. et al. Overexpression of CRF in the BNST diminishes dysphoria but not anxiety-like behavior in nicotine withdrawing rats. **Eur Neuropsychopharmacol.**, v. 26, n. 9, p. 1378–1389, 2016.

RAAB, A. et al. Behavioural, physiological and immunological consequences of social status and aggression in chronically coexisting resident-intruder dyads of male rats. **Physiol Behav.**, v. 24, n. 47, p. 10594–602, 2004.

RABER, J.; KOOB, G. F.; BLOOM, F. E. Interleukin-2 (IL-2) induces corticotropin-releasing factor (CRF) release from the amygdala and involves a nitric oxide-mediated signaling; comparison with the hypothalamic response. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, 1995.

RADLEY, J. J. et al. Chronic behavioral stress induces apical dendritic reorganization in pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex. **Neuroscience**, v. 125, n. 1, p. 1–6, 2004.

RADLEY, J. J. et al. Repeated stress induces dendritic spine loss in the rat medial prefrontal cortex. **Cerebral Cortex**, v. 16, n. 3, p. 313–320, 2006.

RADLEY, J. J.; GOSSELINK, K. L.; SAWCHENKO, P. E. A Discrete GABAergic Relay Mediates Medial Prefrontal Cortical Inhibition of the Neuroendocrine Stress Response. **The Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 22, p. 7330–7340, 2009.

RAJKOWSKA, G. et al. GABAergic neurons immunoreactive for calcium binding proteins are reduced in the prefrontal cortex in major depression. **Neuropsychopharmacology**, v. 32, n. 2, p. 471–82, 2007.

RAJKOWSKA, G.; MIGUEL-HIDALGO, J. J. Gliogenesis and glial pathology in depression. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v. 6, n. 3, p. 219–33, 2007.

RATNER, S. C. Comparative aspects of hypnosis. In: GORDON, J. E. (Ed.). . **Handbook of Clinical and Experimental Hypnosis**. New York: Collier Macmillan Ltd, 1967. p. 550–587.

REN, W. et al. Embryonic Ketamine Produces a Downregulation of Prefrontal Cortex NMDA Receptors and Anxiety-Like Behavior in Adult Offspring. **Neuroscience**, v. 415, p. 18–30, 2019.

RODGERS, R. J.; COLE, J. C. Anxiety enhancement in the murine elevated plus maze by immediate prior exposure to social stressors. **Physiol Behav.**, v. 53, n. 2, p. 383–8, 1993.

RODGERS, R. J.; COLE, J. C. Anxiolytic-like effect of (S)-WAY 100135, a 5-HT_{1A} receptor antagonist, in the murine elevated plus-maze test. **European Journal of Pharmacology**, 1994.

RODGERS, R. J.; DALVI, A. Anxiety, Defence and the Elevated Plus-maze. v. 21, n. 6, p. 801–810, 1997.

RUFFLE, J. K. Molecular neurobiology of addiction: what's all the (Δ)FosB about? **The American Journal of Drug and Alcohol Abuse**, v. 40, n. 6, p. 428–437, 2014.

SAHUQUE, L. L. et al. Anxiogenic and aversive effects of corticotropin-releasing factor (CRF) in the bed nucleus of the stria terminalis in the rat: Role of CRF receptor subtypes. **Psychopharmacology**, v. 186, n. 1, p. 122–132, 2006.

SAKANAKA, M.; SHIBASAKI, T.; LEDERIS, K. Distribution and efferent projections of corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in the rat amygdaloid complex. **Brain Research**, v. 382, n. 2, p. 213–238, 1986.

SAPER, C. B. Hypothalamic connections with the cerebral cortex. **Prog Brain Res**, v. 126, p. 39–48, 2000.

SAWCHENKO, P. E.; SWANSON, L. W. The organization of forebrain afferents to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. **J Comp Neurol.**, v. 218, n. 2, p. 121–44, 1983.

SCHMIDT, K. T. et al. Stress-Induced Alterations of Norepinephrine Release in the Bed Nucleus of the Stria Terminalis of Mice. **ACS Chemical Neuroscience**, 2018.

SCHMITT, R.; KAPCZINSKI, F. Transtorno de ansiedade generalizada. In: GRAEFF, F. G.; HETEM, L. A. B. (Eds.). **Transtornos de Ansiedade**. 105. ed. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 265–283.

SCHULKIN, J.; MORGAN, M. A.; ROSEN, J. B. A neuroendocrine mechanism for sustaining fear. **Trends in Neurosciences**, v. 28, n. 12, p. 629–635, 2005.

SECCIA, M. et al. Inhibition of Cu²⁺-induced LDL oxidation by nitric oxide: A study using donors with different half-time of NO release. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 220, n. 2, p. 306–309, 1996.

SEEBURG, P. H. The TiPS/TINS lecture: the molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. **Trends Pharmacol Sci.**, v. 14, n. 8, p. 297–303, 1993.

SEREGÉLYES, C. et al. NO-degradation by alfalfa class 1 hemoglobin (Mhb1): A possible link to PR-1a gene expression in Mhb1-overproducing tobacco plants. **FEBS Letters**, v. 571, n. 1–3, p. 61–66, 2004.

SESACK, S. R. et al. Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tract-tracing study with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. **J Comp Neurol.**, v. 290, n. 2, p. 213–42, 1989.

SEWARDS, T. V.; SEWARDS, M. A. Fear and power-dominance drive motivation: neural representations and pathways mediating sensory and mnemonic inputs, and outputs to premotor structures. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 26, n. 5, p. 553–79, 2002.

SHEKHAR, A. et al. Role of stress, corticotrophin releasing factor (CRF) and amygdala plasticity in chronic anxiety. **Stress**, v. 8, n. 4, p. 209–219, 2005.

SHEPARD, J. D.; BARRON, K. W.; MYERS, D. A. Stereotaxic localization of corticosterone to the amygdala enhances hypothalamo-pituitary-adrenal responses to behavioral stress. **Brain research**, v. 963, n. 1–2, p. 203–13, 2003.

SHERMAN, J. E.; KALIN, N. H. The effects of ICV-CRH on novelty-induced behavior. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 26, n. 4, p. 699–703, 1987.

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.

481–90, 1990.

SINK, K. S. et al. Anxiogenic effects of CGRP within the BNST may be mediated by CRF acting at BNST CRFR1 receptors. **Behavioural Brain Research**, v. 243, n. 1, p. 286–293, 2013.

SMITH, G. W. et al. Corticotropin releasing factor receptor 1-deficient mice display decreased anxiety, impaired stress response, and aberrant neuroendocrine development. **Neuron**, v. 20, n. 6, p. 1093–1102, 1998.

SOUSA, N.; CERQUEIRA, J. J.; ALMEIDA, O. F. X. Corticosteroid receptors and neuroplasticity. **Brain Research Reviews**, v. 57, n. 2, p. 561–70, 2008.

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

STOUT, S. C. et al. Increased corticotropin-releasing factor concentrations in the bed nucleus of the stria terminalis of anhedonic rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 401, n. 1, p. 39–46, 2000.

SULLIVAN, R. M. Hemispheric asymmetry in stress processing in rat prefrontal cortex and the role of mesocortical dopamine. **Stress**, v. 7, n. 2, p. 131–43, 2004.

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. 2834–40, 1999.

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

SUZUKI, S. et al. The infralimbic and prelimbic medial prefrontal cortices have differential functions in the expression of anxiety-like behaviors in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 304, p. 120–4, 2016.

SWANSON, L. W. et al. Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells

and fibers in the rat brain: An immunohistochemical study. **Neuroendocrinology**, 1983.

TAKAGISHI, M.; CHIBA, T. Efferent projections of the infralimbic (area 25) region of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tracer PHA-L study. **Brain Research**, v. 566, n. 1–2, p. 26–39, 1991.

TAKAHASHI, L. K. et al. Antagonism of CRF(2) receptors produces anxiolytic behavior in animal models of anxiety. **Brain research**, v. 902, n. 2, p. 135–42, 2001.

TIMPL, P. et al. Impaired stress response and reduced anxiety in mice lacking a functional corticotropin-releasing hormone receptor 1. **Nature Genetics**, v. 19, n. 2, p. 162–6, 1998.

TORNATZKY, W.; MICZEK, K. A. Long-term impairment of autonomic circadian rhythms after brief intermittent social stress. **Physiol Behav.**, v. 53, n. 5, p. 983–93, 1993.

TRAN, L.; SCHULKIN, J.; MEERVELD, B. G. Importance of CRF Receptor-Mediated Mechanisms of the Bed Nucleus of the Stria Terminalis in the Processing of Anxiety and Pain. **Neuropsychopharmacology**, v. 39, n. 11, p. 2633–2645, 2014.

TRAN, L.; WISKUR, B.; MEERVELD, B. G. The role of the anteriolateral bed nucleus of the stria terminalis in stress- induced nociception. **Neuropsychopharmacology**, v. 302, n. 11, p. G1301-9, 2012.

UCHIDA, K. et al. Female-biased sexual dimorphism of corticotropin-releasing factor neurons in the bed nucleus of the stria terminalis. **Biol Sex Differ.**, v. 10, n. 1, p. 6, 2019.

ULRICH-LAI, Y. M. et al. Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v. 291, n. 5, p. 965–73, 2006.

VALE, W. W. et al. Pharmacology of gonadotropin releasing hormone: a model regulatory peptide. **Adv Biochem Psychopharmacol.**, v. 28, p. 609–25, 1981.

VALZELLI, L. Animal models of behavioral pathology and violent aggression. **Methods Find Exp Clin Pharmacol**, 1985.

VAN DE POLL, N. E. et al. Aggressive behaviour in rats: Effects of winning or losing on

subsequent aggressive interactions. **Behav Processes.**, v. 7, n. 2, p. 143–55, 1982.

VAN PETT, K. et al. Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 428, n. 2, p. 191–212, 2000.

VENZALA, E. et al. Chronic social defeat stress model: behavioral features, antidepressant action, and interaction with biological risk factors. **Psychopharmacology (Berl)**., v. 224, n. 2, p. 313–25, 2012.

VERMETTEN, E.; BREMNER, J. D. Circuits and systems in stress. II. Applications to neurobiology and treatment in posttraumatic stress disorder. **Depression and Anxiety**, v. 16, n. 1, p. 14–38, 2002.

VERTES, R. P. Differential Projections of the Infralimbic and Prelimbic Cortex in the Rat. **Synapse**, v. 51, n. 1, p. 32–58, 2004.

VIALOU, V. et al. Δ FosB in brain reward circuits mediates resilience to stress and antidepressant responses. **Nature Neuroscience**, v. 13, n. 6, p. 745–752, 2010.

VITA, N. et al. Primary structure and functional expression of mouse pituitary and human brain corticotrophin releasing factor receptors. **FEBS Lett**, v. 335, n. 1, p. 1–5, 1993.

VYAS, A. et al. Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 22, n. 15, p. 6810–6818, 2002.

VYAS, A.; BERNAL, S.; CHATTARJI, S. Effects of chronic stress on dendritic arborization in the central and extended amygdala. **Brain Research**, v. 965, n. 1–2, p. 290–294, 2003.

WALKER, D. et al. Differential effects of the CRF-R1 antagonist GSK876008 on fear-potentiated, light- and CRF-enhanced startle suggest preferential involvement in sustained vs phasic threat responses. **Neuropsychopharmacology**, v. 34, n. 6, p. 1533–42, 2009.

WALKER, D. L.; DAVIS, M. Role of the extended amygdala in short-duration versus sustained fear: A tribute to Dr. Lennart Heimer. **Brain Structure and Function**, v. 213, n. 1–2, p. 29–42,

2008.

WALKER, D. L.; TOUFEXIS, D. J.; DAVIS, M. Role of the bed nucleus of the stria terminalis versus the amygdala in fear , stress , and anxiety. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1–3, p. 199–216, 2003.

WATT, M. J. et al. Adolescent male rats exposed to social defeat exhibit altered anxiety behavior and limbic monoamines as adults. **Behav Neurosci.**, v. 123, n. 3, p. 564–76, 2009.

WATTS, A. G.; SANCHEZ-WATTS, G. Region-specific regulation of neuropeptide mRNAs in rat limbic forebrain neurones by aldosterone and corticosterone. **J Physiol.**, v. 484, n. Pt 3, p. 721–36, 1995.

WELLMAN, C. L. Dendritic reorganization in pyramidal neurons in medial prefrontal cortex after chronic corticosterone administration. **Journal of Neurobiology**, 2001.

YAP, J. J. et al. Repeated brief social defeat episodes in mice: Effects on cell proliferation in the dentate gyrus. **Behavioural Brain Research**, v. 172, n. 2, p. 344–350, 2006.

YEN, C. Y.; STANGER, R. L.; MILLMAN, N. Ataractic suppression of isolation-induced aggressive behavior. **Arch Int Pharmacodyn Ther.**, v. 123, p. 179–85, 1959.

YOSHIMURA, H.; KIMURA, N. Ethopharmacology of copulatory disorder induced by chronic social conflict in male mice. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 15, n. 4, p. 497–500, 1991.

ZANGROSSI JR, H.; GRAEFF, F. G. Modelos Animais. In: HETEM, L. A. B.; GRAEFF, F. G. (Eds.). . **Transtornos de Ansiedade**. 1ª ed. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 55–73.

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