



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Araraquara



**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FISIOLÓGICAS – PIPGCF UFSCAR-UNESP**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA  
LABORATÓRIO DE NEUROPSICOFARMACOLOGIA**

**NATHÁLIA SANTOS COSTA**

:

**LATERALIZAÇÃO FUNCIONAL DO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL MEDIAL NA  
ANSIEDADE EM CAMUNDONGOS: avaliações molecular e psicofarmacológica**

ARARAQUARA

2021



**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS - PIPGCF**

**NATHÁLIA SANTOS COSTA**

**LATERALIZAÇÃO FUNCIONAL DO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL  
MEDIAL NA ANSIEDADE EM CAMUNDONGOS: avaliações molecular e  
psicofarmacológica**

Tese apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (UFSCar-Unesp) como parte dos requisitos para a obtenção do título de doutora em Ciências Fisiológicas

Ricardo Luiz Nunes de Souza

**Orientador**

Araraquara  
2021



## UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

---

### Folha de Aprovação

---

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Nathália Santos Costa, realizada em 05/08/2021.

#### Comissão Julgadora:

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

Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani (UNESP)

Profa. Dra. Rosana Camarini (USP)

Profa. Dra. Raquel Vecchio Fornari (UFABC)

Prof. Dr. Tarciso Tadeu Miguel (UFU)

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

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

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho ao meu sangue ancestral, presente em cada gota de suor que escorreu pelo lombo de meu pai e em cada lágrima que nem chegou a escorrer pelo rosto de minha mãe. Às minhas irmãs e irmãos, que compartilham comigo da água e do vinho, em trabalho árduo e brincadeira. E a cada uma de minhas sobrinhas e sobrinhos, que nos colorem com o verde mais puro das folhas novas que brilham um tanto mais perto do Sol.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de fazer publica minha gratidão às irmãs e irmãos de jornada, cujas presenças nesse momento da minha trajetória-sobrevivência se fizeram definitivas em diversos níveis.

**MARIA NAZARÉ SANTOS COSTA ∞ OTÁVIO DE ARAÚJO COSTA ∞ OTÁVIO SANTOS COSTA ∞ NÁGILA M SANTOS COSTA ∞ ANNA LUIZA COSTA ∞ OTÁVIO AUGUSTO COSTA ∞ GUILHERME COSTA ∞ LETÍCIA COSTA ∞ ANDREIA B BRAGA ∞ FRANCISCO RIBEIRO CAMARGO ∞ HANNAH LEVY ∞ SARAH DE PAULA ∞ MIRIAN ALINE “MIMI OSBOURN” VILCENSQUI ∞ CYNTIA MARIA ∞ LEILA ROCHA ∞ PRISCILA ALTIVO ∞ NIC OLIVEIRA ∞ JEIMMY MARION “MARICA” PENAGOS GIL ∞ MARINA CANTO SOUZA ∞ MARINA STRACI ∞ ALICE ROSA ∞ “AS ROLEZEIRAS” ∞ ANA CLÁUDIA “LIVRA” CIPRIANO ∞ TATI SORREGOTTI ∞ PAULA “PUPU” BIANCHI ∞ TIRENE PAVANELI ∞ DIEGO CARDOZO MASCARENHAS ∞ CELINA FERRARI LAVERDE ∞ CATERIN CAIPA RAMÍREZ ∞ LUQUINHAS GOMES ∞ GABRIEL VICTORIANO ∞ FERNANDO HEBLING ∞ PROFESSORA MARIA LUIZA CERQUEIRA LIMA ∞ PROFESSORA KARLA JOENY AYRES COSTA ∞ FLÁVIO MONTEIRO ∞ ISABELA KANUPP ∞ PAOLA BISACCIONI ∞ MARLI MADRINHA DO “INSTITULO RAIOS DE LUZ” ∞ RAIMUNDA “MÃEZINHA” DE OLIVEIRA SANTOS ∞ VICÊNCIA ALVES DA COSTA *in MEMORIAN* ∞ PITOMBA ∞ BLUE ∞ YONCÈ ∞ JON ∞ TIÃO ∞ RODOLFO ∞ CHICÓ ∞ VOCÊS SÃO DEFINITOS**

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP Araraquara e ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PIPGCF – UFSCar/UNESP) pela infraestrutura e recursos humanos que possibilitaram a realização do meu doutoramento. Ao Conselho Nacional

de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – 2016/24568-4), pelo suporte financeiro, imprescindível para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao meu orientador, Ricardo, e ao nosso grupo de pesquisa, que me ampararam para além de qualquer compromisso científico ou profissional durante esta trajetória acadêmica, sem os quais este trabalho, e, eu mesma, não teria chegado aqui. Dedico um agradecimento especial a Daniela Baptista, Gessynger Moraes e Lucas Canto, pela construção dessa tese, em cada um de seus caracteres.

“As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade do(s) autor(es) e não necessariamente refletem a visão da FAPESP”

*“To live without reflection for so long might make you wonder if you even truly exist. [...] When it’s all said and done, I don’t even know my own native tongue. And If I can’t speak myself, I can’t think myself. And if I can’t think myself, I cant be myself. But if I can’t be myself, I will never know me. So, Uncle Sam, tell me this, if I will never know me, how can you? One time I took a swim in the Nile”. (Beyoncé Knowles, in: Black is King)*



## RESUMO

O cortex pré-frontal medial (CPFm) processam respostas emocionais induzidas por estímulos estressores, e a inibição CPFm esquerdo (CPFmE) e direito (D) elicia ansiogênese e ansiólise, respectivamente. Aqui, nosso objetivo foi investigar (i) a lateralização funcional do CPFm nos comportamentos defensivos/relacionados à ansiedade em camundongos submetidos ao estresse de derrota social (EDS) crônico; (ii) os efeitos da inibição do CPFmE (com injeção local de CoCl<sub>2</sub>) sobre o padrão de ativação do CPFmD; e (iii) os efeitos do bloqueio de receptores NMDA do CPFmE sobre a ansiedade induzida pela inibição do CPFmE em camundongos expostos ao labirinto em cruz elevado (LCE). Os resultados demonstraram que o EDS crônico induziu comportamentos relacionados à ansiedade, seguidos pelo aumento de marcação de  $\Delta$ FosB e da dupla marcação de  $\Delta$ FosB + CaMKII bilateralmente nos córtices cingulado (Cg1) e infralímbico (IL), sub-regiões do CPFm. O EDS crônico também aumentou  $\Delta$ FosB e  $\Delta$ FosB + CaMKII seletivamente no córtex pré-límbico (PrL) direito, apenas. Além disso, a inibição do PrL esquerdo causou o aumento da marcação de cFos + CaMKII nos PrL e IL contralaterais. Ainda, a ansiogênese induzida pela inibição do PrL esquerdo foi bloqueada pelo antagonismo de receptores NMDA no PrL direito, através da injeção local de AP7. Estes achados sugerem controle lateralizado da neurotransmissão glutamatérgica na modulação de respostas emocionais em camundongos submetidos ao estresse.

**Palavras-chave:** Córtex Pré-frontal medial, lateralização funcional, receptores NMDA, estresse

## ABSTRACT

The left and right medial prefrontal cortex (L & RmPFC) process emotional responses induced by stress-related stimuli, and LmPFC and RmPFC inhibition elicit anxiogenesis and anxiolysis, respectively. Here we sought to investigate (i) the mPFC functional laterality on defensive/anxiogenic-like behaviors in mice subjected to chronic social defeat stress (SDS); (ii) the effects of LmPFC inhibition (with local injection  $\text{CoCl}_2$ ) on the RmPFC glutamatergic neuronal activation pattern; and (iii) the effects of the RmPFC NMDA receptor blockade on the anxiety induced by LmPFC inhibition in mice exposed to the elevated plus-maze (EPM). Results showed that chronic SDS induced defensive-like behaviors followed by the rise of  $\Delta\text{FosB}$  labeling and by  $\Delta\text{FosB} + \text{CaMKII}$  double-labeling bilaterally in the cingulate (Cg1) and infralimbic (IL) subareas of the mPFC. Chronic SDS also increased  $\Delta\text{FosB}$  and by  $\Delta\text{FosB} + \text{CaMKII}$  labeling only on the right prelimbic (PrL). Also, left PrL inhibition increased cFos + CaMKII labeling in the contralateral PrL and IL. Moreover, anxiogenesis induced by the left PrL inhibition was blocked by NMDA receptor antagonist AP7 injected into the right PrL. These findings suggest the lateralized control of the glutamatergic neurotransmission in the modulation of emotional-like responses in mice subjected to chronic SDS.

**Keywords:** medial prefrontal cortex, functional lateralization, NMDA receptors, stress

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| RESUMO.....                            | 8  |
| ABSTRACT.....                          | 9  |
| LISTA DE FIGURAS.....                  | 11 |
| <i>SÍNTESE</i> .....                   | 13 |
| INTRODUÇÃO .....                       | 15 |
| OBJETIVOS.....                         | 24 |
| MATERIAL E MÉTODOS.....                | 26 |
| PRINCIPAIS RESULTADOS ENCONTRADOS..... | 30 |
| DISCUSSÃO GERAL.....                   | 34 |
| CONCLUSÃO .....                        | 45 |

*Glutamatergic neurotransmission controls the functional lateralization of the mPFC in the modulation of anxiety induced by social defeat stress in male mice*

|                             |     |
|-----------------------------|-----|
| ABSTRACT .....              | 49  |
| INTRODUCTION.....           | 50  |
| MATERIAL AND METHODS.....   | 52  |
| RESULTS.....                | 61  |
| DISCUSSION.....             | 79  |
| CONCLUSION .....            | 85  |
| SUPPLEMENTAL MATERIAL ..... | 99  |
| REFERÊNCIAS .....           | 100 |

## Lista de Figuras

**Figure 1.** Chronic social defeat stress induces social avoidance-like behavior in mice. **(A)** SDS mice (n=15) spend less time in the interaction zone (IZ) with a non-familiar target compared to the NA mice (n=9). **(B)** Time spent in the corner zone (CZ) in the absence and presence of the target. **(C)** Social interaction ratio in the IZ and CZ. Bars represent mean (+ SEM). \*p < 0.05 compared to the No target of the respective group or to the NA group. NA, non-aggressive; SDS, social defeat stress. (p.59)

**Figure 2.** Chronic social defeat stress (SDS) induces anxiety-like behavior in mice. **(A)** percentage of open arm entries and percentage of open arm time in the EPM. **(B)** Frequency of closed arm entries in the EPM. Bars represent mean (+SEM). \*p < 0.05 compared to the NA group. NA, non-aggressive; SDS, social defeat stress. (p.61)

**Figure 3.** Representative 10X (scale bar = 100  $\mu$ m) **(A)** and 40X (scale bar = 20  $\mu$ m) **(B)** images showing  $\Delta$ FosB, CaMKII immunoreactivity, and double-labeling merge for  $\Delta$ FosB (labeled in green) and CaMKII (labeled in red) in the mPFC. Representative 20X images showing  $\Delta$ FosB, CaMKII, and double-labeling for  $\Delta$ FosB + CaMKII on the Cg1 **(C)**, PrL **(E)** and IL **(G)** (scale bar = 100  $\mu$ m). Corrected total cell fluorescence (CTCF) for  $\Delta$ FosB, CaMKII, and  $\Delta$ FosB + CaMKII positive neurons in the Cg1 **(D)**, PrL **(F)** and IL **(H)**. **(E)** Representative 20X images showing  $\Delta$ FosB, CaMKII, and double-labeling for  $\Delta$ FosB+ CaMKII on the PrL. **(F)** Corrected total cell fluorescence (CTCF) for  $\Delta$ FosB, CaMKII, and  $\Delta$ FosB + CaMKII positive neurons in the PrL. **(G)** Representative 20X images showing  $\Delta$ FosB, CaMKII, and double-labeling for  $\Delta$ FosB+ CaMKII on the IL. **(H)**. Sample sizes: Naïve (n=6), NA (n=7) SDS (n=6). Bars represent mean (+SEM). \*p < 0.05 compared to the same group on the opposite hemisphere. #p < 0.05 compared to the naïve group. L, left; R, right; NA, non-aggressive; SDS, social defeat stress; Cg1, cingulate cortex, area 1; PrL, prelimbic cortex; IL, infralimbic cortex. (p.64)

**Figure 4.** Photomicrographs depicting the anterogradely labeled neurons in the mPFC. **(A)** BDA microinjection site in the left PrL (scale bar = 100  $\mu$ m). **(B)** White arrows show the presence of labeled neurons in the right PrL (scale bar = 50  $\mu$ m). (p.67)

**Figure 5.** Anxiogenesis induced by left PrL inhibition (with local injection of CoCl<sub>2</sub>) increases cFos and cFos + CaMKII labeling in the right PrL and IL (but not Cg1) subareas. **(A)** Effects of CoCl<sub>2</sub> injection into the left-PrL on the percentage of open arm entries and percentage of open arm time, and **(B)** frequency of closed arm entries in the EPM of Saline (n=10) and CoCl<sub>2</sub> (n=8) groups. Bars represent mean (+SEM). \*p < 0.05. Representative 20X images showing cFos, CaMKII, and double-labeling for cFos (labeled in green) and CaMKII (labeled in red) on the right-Cg1 **(C)**, PrL **(E)**, and IL **(G)** (scale bar = 100  $\mu$ m). Corrected total cell fluorescence (CTCF) for cFos, CaMKII, and cFos + CaMKII positive neurons in the right-Cg1 **(D)**, PrL **(F)**, and IL **(H)**. Saline (n=7) and CoCl<sub>2</sub> (n=6). Bars represent mean (+SEM). \*p < 0.05. Cg1, cingulate cortex, area 1; PrL, prelimbic cortex; IL, infralimbic cortex. (p.70)

**Figure 6.** Effects of AP7 injected into the RmPFC [AP7 (R)] subsequently to CoCl<sub>2</sub> injection into the LmPFC [CoCl<sub>2</sub> (L)] on behavior of mice exposed to the EPM. **(A)** Grouped Cg1 and PrL analysis on the percentage of open arm entries and percentage of open arm time, and frequency of closed arm entries [Sal (L) + Sal (R) (n=20); Sal (L) + AP7 (R) (n=19); CoCl<sub>2</sub> (L) + Sal (R) (n=21); CoCl<sub>2</sub> (L) + AP7 (R) (n=15)]. **(B)** Cg1 analysis on the percentage of open arm entries and time, and frequency of closed arm entries [Sal (L) + Sal (R) (n=9); Sal (L) + AP7 (R) (n=7); CoCl<sub>2</sub> (L) + Sal (R) (n=6); CoCl<sub>2</sub> (L) + AP7 (R) (n=7)]. **(C)** PrL analysis of the percentage of open arm entries and percentage of open arm time, and frequency of closed arm entries [Sal (L) + Sal (R) (n=7); Sal (L) + AP7 (R) (n=8); CoCl<sub>2</sub> (L) + Sal (R) (n=10); CoCl<sub>2</sub> (L) + AP7 (R) (n=7)]. \*p < 0.05 compared to the Sal (L) + sal (R) group; #p < 0.05 compared to the CoCl<sub>2</sub> (L) + Sal (R) group. L, left; R, right; Sal, saline; Cg1, cingulate cortex, area 1; PrL, prelimbic cortex. (p.74)

### Supplementary Material

**Figure 1.** Schematic diagram (left) and a photomicrograph (right) of a representative microinfusion site (shadow area or black arrow) within the mPFC of the mouse. Section corresponds to 1.94 mm anterior to bregma (Paxinos and Franklin, 2001). Abbreviations: Cg1, cingulate cortex, area 1; PrL, prelimbic cortex; IL, infralimbic cortex; fmi, forceps minor of the corpus callosum (p.96)

# SÍNTESE

O conteúdo da tese foi organizado em duas partes, sendo uma redigida em português e outra em língua estrangeira (inglês). Na primeira parte, denominada síntese (redigida em português), foi feita uma introdução sobre o assunto, apresentados os objetivos, uma breve apresentação da metodologia seguidos de um resumo dos resultados obtidos e uma discussão geral, para que o leitor compreenda a problemática a qual a tese contempla. A segunda parte (redigida em inglês), é composta pelo manuscrito, na íntegra, produzido a partir dos dados obtidos durante o período de doutorado, publicado pelo periódico “*Frontiers in Behavioral Neuroscience*”.

# INTRODUÇÃO



## 1. Epidemiologia dos transtornos mentais: ansiedade e depressão

Os transtornos mentais (ou neuropsiquiátricos) são altamente incapacitantes, de difícil tratamento e demandam grande atenção dentro da Saúde Pública. Uma meta-análise publicada pelo *International Journal of Epidemiology*, em 2014, demonstrou que a prevalência global de doenças neuropsiquiátricas entre os anos de 1983 e 2013 foi de cerca de 20%. Dentre elas, em primeiro lugar encontram-se os transtornos de ansiedade (1 a cada 15 pessoas), seguidos pelos transtornos do humor (1 a cada 20) (STEEL *et al.*, 2014). Em 2017, esses transtornos foram responsáveis por mais de 6% de todos os anos de vida perdidos ajustados por incapacidade (do inglês, *DALY's, disability-adjusted life years*) (JAMES *et al.*, 2018), o que impacta diretamente na qualidade de vida dos pacientes e na mão-de-obra economicamente ativa de um país.

No Brasil, um estudo de 2012, conduzido na cidade de São Paulo e região metropolitana, mostrou uma prevalência de quase 20% para os transtornos de ansiedade e 11% para os transtornos de humor (ANDRADE 2012). Em 2015, esses transtornos foram responsáveis por cerca de 6% de todos os anos de vida perdidos ajustados por incapacidade no Brasil, semelhante a resultados encontrados para a população mundial (BONADIMAN, 2017). Um estudo prospectivo realizado com uma população do sul do Brasil mostrou uma prevalência do transtorno de depressão maior de 7,9% e do transtorno de ansiedade generalizado de 12,7% em adultos com 30 anos de idade (QUEVEDO 2020). Recentemente, durante a pandemia causada pela COVID-19, a prevalência de sintomas de depressão e ansiedade na população brasileira geral foi de pouco mais de 46% e 39%, respectivamente (SERAFIM 2021).

Além da grande prevalência na população, os transtornos de depressão e a ansiedade ainda não possuem um tratamento cuja efetividade possa ser considerada ideal. Os tratamentos farmacológicos atualmente disponíveis possuem diversos efeitos adversos relacionados à sua terapêutica (NEMEROFF, 2007) e uma alta taxa de ineficácia (BLANCO 2013; CEPEDA *et*

al., 2018; NEMEROFF, 2007). A depressão resistente ao tratamento, por exemplo, tem uma prevalência de cerca de 30% (HALARIS, 2020; ZHDANAVA, 2021), enquanto os custos associados à sua prevalência aos sistemas de saúde podem chegar a quase 50% (ZHDANAVA, 2021).

O estresse é um fator de risco para o desenvolvimento de diversas dessas doenças neuropsiquiátricas, como transtorno de estresse pós-traumático e depressão maior (FRANKLIN *et al.*, 2012; MCEWEN; AKIL, 2020). Ele pode ser definido como um conjunto de respostas fisiológicas e comportamentais a condições e eventos que perturbam o funcionamento e equilíbrio do organismo. Tais respostas visam proteger o organismo, preparando-o para se defender do estressor (fase de alerta); todavia, se o estímulo aversivo persiste, outras respostas surgem para tentar reestabelecer o equilíbrio (fase de resistência), e, se as estratégias não forem bem sucedidas, o estresse pode gerar uma sobrecarga ao indivíduo (fase de exaustão), sendo esta, relacionada com aparecimento de patologias (SELYE, 1956; MCEWEN, 2012). No entanto, nem todos os indivíduos que vivenciam eventos estressores desenvolvem doenças relacionadas a ele. Isto se deve à existência de diferentes graus de suscetibilidade, em que os indivíduos mais vulneráveis se adaptam mal (ou não se adaptam) ao estressor e expressam respostas inapropriadas, as quais podem se tornar alterações permanentes, enquanto indivíduos resilientes (não suscetíveis) desenvolvem respostas psicofisiológicas adaptativas, se recuperando das alterações induzidas pelo estresse (DEL GIUDICE; ELLIS; SHIRTCLIFF, 2011). Assim, diversos estudos têm objetivado identificar os mecanismos neurais pelos quais o estresse induz sintomas mal adaptativos.

## **2. Neurobiologia do estresse e desenvolvimento de transtornos neuropsiquiátricos: o papel do córtex pré-frontal medial**

O córtex pré-frontal medial (CPFm) é uma estrutura prosencefálica e límbica, que pode ser dividida anatomicamente em cíngulados (Cg) áreas 1 e 2, pré-límbico (PrL) e infra-límbico (IL) (PAXINOS; FRANKLIN, 2001). Funcionalmente, o CPFm de roedores pode ser dividido em dorsal (CPFmD), que abrange os Cg e a parte mais dorsal do PrL, e ventral (CPFmV), formado pela parte ventral do PrL e pelo IL (XU et al., 2019). Essas áreas parecem equivaler ao córtex cíngulado anterior (CgA) e ao córtex pré-frontal medial dorsolateral de primatas (LAUBACH et al., 2018; SEAMANS; LAPISH; DURSTEWITZ, 2008). O CPFm está envolvido com memória (EUSTON *et al.*, 2012), tomada de decisão (BECHARA; DAMASIO, 2002), flexibilidade cognitiva (GRUBER *et al.*, 2010), cognição executiva (YUAN; RAZ, 2014), interação social e processamento emocional (DAMASIO, 2000). Ele apresenta densas conexões recíprocas com outras áreas relacionadas ao controle e expressão das emoções [e.g. amígdala, hipocampo, hipotálamo, rafe dorsal e matéria cinzenta periaquedutal (e.g. EUSTON; GRUBER; MCNAUGHTON, 2012)], o que promove sua habilidade de modular estados emocionais como medo e ansiedade (COURTIN *et al.*, 2013; GOLD; MOREY; MCCARTHY, 2015).

A fim de tentar uma padronização na nomenclatura do CPFm aumentando a homologia entre as espécies de roedores utilizadas na pesquisa em relação aos seres humanos, estudos recentes têm nomeado a região mais rostral do Cg, o PrL e o IL de roedores como CgA (que seria o equivalente ao CgA de humanos), enquanto a região mais caudal do Cg é nomeada córtex cíngulado medial (CgM, e seria o equivalente ao CgM de humanos) (HEUKELUM; VAN et al., 2020).

Diversas alterações morfológicas e funcionais são encontradas no CPFm após a exposição crônica ao estresse. A exposição de ratos ao estresse de restrição repetido diminui a arborização dendrítica dos neurônios piramidais no CgA (COOK; WELLMAN, 2004; LISTON

et al., 2006; RADLEY et al., 2006), assim como a exposição ao estresse crônico variável induz uma diminuição de volume no CPFm e prejuízo dos mecanismos de plasticidade dependentes do hipocampo (região densamente inervada pelo CPFm) em ratos (CERQUEIRA et al., 2007). A exposição ao estresse de derrota social (EDS) reduz a expressão de genes relacionados à produção e manutenção da mielina no sistema nervoso central (SNS), o que acarreta na diminuição da mielinização do CPFm (LEHMANN et al., 2017). Essas alterações na morfologia neuronal são acompanhadas pela diminuição na expressão de genes de expressão imediata (COVINGTON et al., 2005), pela diminuição da atividade serotoninérgica (BEKRIS et al., 2005) e desregulação da neurotransmissão glutamatérgica (JETT et al., 2017). Além disso, alterações no volume do CPFm se correlacionam com a evitação social em camundongos suscetíveis ao EDS (ANACKER et al., 2016). Alterações equivalentes no volume e atividade do CPFm são encontradas em pacientes com diagnóstico de depressão (COVINGTON 2010; BELLEAU; TREADWAY; PIZZAGALLI, 2019; MAYBERG, 2009).

O CPFm também é conhecido por controlar as respostas adaptativas ao estresse, e, recentemente, tem sido apontado como uma estrutura alvo para prever resiliência. Sucintamente, um estudo de imagem por ressonância magnética funcional (do inglês, *fMRI*), em pacientes sem histórico de transtornos psiquiátricos, demonstrou que sinais de flexibilidade neural no CPFm durante o estresse agudo se correlaciona com o *coping* (enfrentamento) ativo, ao passo que a baixa atividade dessa região pôde prever um nível maior de comportamentos mal adaptativos (SINHA *et al.*, 2016). Em mulheres adolescentes com histórico de abuso sexual durante a infância, um maior volume do CPFm parece estar relacionado com um efeito protetor contra o transtorno de estresse pós-traumático (MUTLUER et al., 2018). Apesar de diversos estudos terem evidenciado seu papel no controle das respostas comportamental e neuroendócrina ao estresse, são conhecidas importantes diferenças funcionais entre as

subdivisões dorso-ventrais do CPFm (e.g. SUZUKI *et al.*, 2016). Além disso, uma crescente linha de evidências vem demonstrando uma importância da lateralização funcional do CPFm na modulação dessas respostas (CERQUEIRA 2008). Neste sentido, Sullivan e Gratton (1999) demonstraram que lesões bilaterais ou do CPFm direito (CPFmD) (mas não somente do esquerdo) de ratos diminuem o pico de corticosterona induzida por estresse de restrição, causando resistência ao estresse. Ainda, quando submetido ao estresse crônico, o CPFm esquerdo (CPFmE) sofre perda estrutural, refletindo em diminuição volumétrica (CZECH, 2007), enquanto o hemisfério direito passa a ter um papel dominante, facilitando a resposta hormonal ao estresse, através da interação com o eixo hipotálamo-pituitária-adrenais (HPA) (SULLIVAN; GRANTON, 1999). Esses dados vão ao encontro de estudos *post-mortem* que apontam uma diminuição volumétrica do CPFm em pacientes que sofriam de transtornos de humor (RAJKOWSKA *et al.*, 2007a; RAJKOWSKA; MIGUEL-HIDALGO, 2007b *apud* CZÉH, 2008). Além disso, conforme demonstrado por Johnstone e colaboradores (2007) com um estudo de fMRI em humanos, em situações basais, o CPFmE está seletivamente envolvido na regulação (*downregulation*) de emoções negativas, diminuindo a ativação da amígdala; o que não ocorre em pacientes deprimidos (para revisão ver Cerqueira; Almeida; Sousa, 2008).

Nesse cenário, um estudo de nosso laboratório demonstrou a lateralização funcional do CPFm nos comportamentos relacionados à ansiedade e na modulação do estresse social em camundongos (COSTA *et al.*, 2016). Resumidamente, os resultados sugerem haver um controle tônico do CPFmE sobre os comportamentos defensivos de camundongos expostos ao labirinto em cruz elevado (LCE), uma vez que enquanto a ativação nitrérgica (através da injeção local de um doador de NO) do CPFmD promove efeitos ansiogênicos, nenhuma alteração no perfil comportamental defensivo é observada quando o doador de NO é injetado unilateralmente (no CPFmE) ou bilateralmente nesta estrutura. Além disso, a inativação temporária com cloreto de

cobalto ( $\text{CoCl}_2$ , um bloqueador sináptico) do CPFmD e CPFmE promove efeitos ansiolíticos e ansiogênicos, respectivamente. Ainda, quando a inibição do CPFmE é associada a uma única sessão de EDS, ocorre um aumento nos comportamentos ansiosos 24h após o evento, um efeito não observado quando o animal passa pelo estresse com o CPFmE intacto. Em outras palavras, parece que os efeitos deletérios do estresse [evidenciados pela relação entre diminuição volumétrica/funcional do CPFmE e comportamentos mal adaptativos (i.e., aumento ansiedade; depressão)] podem ser mimetizados pela inativação do CPFmE, culminando na expressão de suscetibilidade. Neste mesmo sentido, Lee e colaboradores (2015) demonstraram (através de um protocolo que permite classificar camundongos quanto à resiliência x suscetibilidade) que os animais suscetíveis ao estresse de derrota social voltam a interagir socialmente quando é feita fotoativação de neurônios do CPFmE e, por outro lado, a fotoinativação desses neurônios em animais resilientes induz evitação social. De maneira interessante, ambos os trabalhos supracitados (i.e., Costa *et al.*, 2016 e Lee *et al.*, 2015), além de demonstrarem uma relação entre lateralidade do CPFm e suscetibilidade, tiveram como alvo de manipulações o PrL esquerdo, denotando que as diferenças entre as sub-regiões dorso-ventrais parecem ser importantes.

Desta maneira, estes dados reforçam a ideia de que o CPFm seja uma estrutura importante para o processamento de eventos aversivos e, sua funcionalidade, isto é, seu padrão de ativação, sobretudo na diferenciação entre os hemisférios, crucial para a expressão do fenótipo resiliente ou suscetível. No entanto, ainda não se sabe qual o mecanismo pelo qual o *déficit* funcional do CPFmE leve a alterações deletérias, ou seja, relacionadas à suscetibilidade a eventos aversivos.

Uma das maneiras de se estudar a ativação neuronal é através da quantificação de membros da família de proteínas FOS, com destaque para os fatores de transcrição c-FOS e

$\Delta$ FosB. Embora ambos os fatores sejam induzidos em resposta a estressores, o primeiro, c-Fos, tem uma indução rápida e transiente, sendo interessante para detectar ativação mediante estímulos agudos. Já o segundo,  $\Delta$ FosB, um produto de alta estabilidade molecular, é induzido tardiamente ao estímulo e se acumula, sendo interessante para detecção de alterações induzidas por estímulos crônicos e repetidos (NESTLER; KELZ; CHEN, 1999; NESTLER, 2008). A exposição a diversos estímulos estressores de maneira crônica, como nos protocolos de estresse crônico variável, estresse crônico de restrição e EDS, aumenta os níveis de  $\Delta$ FosB em diversas regiões encefálicas (LAINE et al., 2017; PERROTTI et al., 2004). Assim, a  $\Delta$ FosB parece ser um importante regulador transcricional da resposta neuronal ao estresse. Diversos estudos têm evidenciado alterações com relação ao fator  $\Delta$ FosB como importantes para a expressão do fenótipo de resiliente ou suscetível ao estresse, em que alterações na sua expressão parecem estar envolvidos com a resiliência e com a eficácia de tratamentos antidepressivos, dependendo da região encefálica analisada (NESTLER, 2015). Com relação ao CPFm, Vialou e colaboradores (2014) detectaram diferenças na expressão da  $\Delta$ FosB entre os fenótipos de enfrentamento ao estresse. Esse estudo encontrou aumento de sua expressão no PrL em camundongos suscetíveis ao estresse de derrota social, enquanto os animais resilientes apresentaram um aumento no IL. Todavia, nesse estudo, assim como na maioria, não houve uma preocupação com relação à lateralidade funcional, foco do presente estudo.

Sabe-se que o CPFm é predominantemente composto por neurônios glutamatérgicos (80-90%) (MCKLVEEN; MYERS; HERMAN, 2015) e diversos estudos têm demonstrado, em humanos ou roedores, uma grande relação entre alterações na neurotransmissão glutamatérgica e a fisiopatologia de transtornos de ansiedade e de humor, sobretudo no que diz respeito à função dos receptores N-Metil-D-Aspartato (NMDA) (para revisão, ver SANACORA TRECCANI; POPOLI, 2012). Ainda, diferentes estressores aumentam a liberação de glutamato

(GLU) e alteram sua transmissão sináptica em estruturas cortico-límbicas, além de induzirem efeitos estruturais e morfológicos e, possivelmente, reduções volumétricas, semelhantes ao encontrado em pacientes com depressão maior (SANACORA; TRECCANI; POPOLI, 2012). Neste sentido, resultados obtidos em nosso laboratório (VICTORIANO *et al.*, 2020) indicam a participação de receptores NMDA da região mais dorsal do CPFm nos comportamentos relacionados à ansiedade em camundongos expostos ao EDS e LCE, com diferentes papéis nos hemisférios direito e esquerdo, uma vez que o bloqueio de tais receptores (através da injeção de AP7, um antagonista seletivo para receptores NMDA) no CPFmD reverte os efeitos ansiogênicos desencadeados pelo bloqueio sináptico do CPFmE e da exposição ao EDS no LCE. Assim, faz-se interessante aprofundar a investigação sobre a neurotransmissão glutamatérgica no âmbito da lateralização funcional e sua relação com a suscetibilidade/resiliência ao estresse. Nesse contexto, a proteína quinase dependente de Cálcio/Calmodulina – CaMKII – é um membro da cascata de sinalização celular subjacente à ativação dos receptores NMDA e um bom marcador de neurônios glutamatérgicos no neocórtex (WANG *et al.*, 2013).



# OBJETIVOS

## **Geral**

Investigar a participação dos CPFm direito e esquerdo nas alterações comportamentais relacionadas à ansiedade bem como as alterações moleculares envolvidas nas consequências emocionais do estresse de derrota social em camundongos.

## **Específicos:**

- Investigar os efeitos do EDS crônico sobre a evitação social e comportamentos relacionados à ansiedade no LCE;
- Investigar os efeitos do EDS crônico sobre a expressão de  $\Delta$ FosB, CaMKII e na expressão conjunta de  $\Delta$ FosB e CaMKII no CPFm;
- Mapear a existência de projeções da sub-região PrL do CPFmE para as sub-regiões do CPFmD;
- Investigar os efeitos da inibição sináptica do CPFmE nos comportamentos relacionados à ansiedade no LCE e padrão de ativação neuronal do CPFmD;
- Investigar o papel dos receptores do tipo NMDA do CPFmD nos efeitos da inibição sináptica do CPFmE sobre os comportamentos relacionados à ansiedade no LCE.

# **MATERIAL E MÉTODOS**

### 3. Abordagem experimental

O presente trabalho investigou as alterações comportamentais relacionadas à ansiedade através do teste do labirinto em cruz elevado, bem como as alterações moleculares via imunofluorescência para proteínas da família Fos (cFOS ou  $\Delta$ FosB) em dupla marcação com a proteína quinase dependente de Cálcio/calmodulina (CaMKII), membro da cascata de sinalização intracelular subjacente à ativação de receptores glutamatérgicos NMDA.

A participação dos receptores NMDA do CPFmD na ansiogênese induzida pela inativação do CPFmE foi investigada através da microinjeção de fármacos ( $\text{CoCl}_2$ , bloqueador sináptico; AP7, antagonista glutamatérgico) em camundongos machos que passaram por estereotaxia para implante de cânulas nas sub-regiões especificadas. Para o estudo de alterações induzidas pelo estresse, foi utilizado o protocolo de EDS crônico (modelo residente-intruso) seguido do teste de interação social (TIS), o qual avalia o índice de evitação a um coespecífico, utilizado para classificar indivíduos como suscetíveis ou resilientes ao estresse.

A análise de projeções neuronais entre os dois hemisférios do CPFm foi investigada por meio da injeção de BDA (Dextran Amine-Texas Red®, Biotinylated), um neurotraçador anterógrado (LANCIEGO 2020; BRANDT, 1992).

Os seguintes protocolos experimentais foram utilizados:

#### 3.1. Experimentos 1 e 2: Efeitos comportamentais do estresse de derrota social crônico no teste de interação social e labirinto em cruz elevado

Quarenta e um camundongos foram submetidos a dez sessões de EDS ( $n = 25$ ) ou interação não-agressiva ( $n = 16$ ) e, 24 horas depois, uma parte foi testado quanto a evitação social no TIS ou quanto aos comportamentos relacionados à ansiedade no LCE.

3.2. Experimento 3: Efeito do estresse de derrota social crônico na expressão de  $\Delta$ FosB, CaMKII e na dupla marcação  $\Delta$ FosB/CaMKII bilateralmente no córtex pré-frontal medial

Dezenove camundongos foram submetidos a dez sessões de EDS (n = 7) ou interação não-agressiva (n = 6) e, 24 horas depois, foram eutanasiados e tiveram seus encéfalos processados para análise da expressão de  $\Delta$ FosB, CaMKII e da dupla marcação  $\Delta$ FosB/CaMKII por imunofluorescência bilateralmente no CPFm. Um grupo experimental ingênuo (n = 6) foi acrescentado nesse experimento para avaliação dos níveis basais de fluorescência.

3.3. Experimento 4: Tracejamento das projeções do córtex pré-frontal medial esquerdo (sub-região pré-límbica) para o córtex pré-frontal medial direito (sub-regiões cingulada 1, pré-límbica e infralímbica)

Cinco camundongos receberam o neurotraçador anterógrado BDA na sub-região PrL do CPFmE e, três semanas depois, foram eutanasiados e tiveram seus encéfalos processados para avaliação das projeções neuronais.

3.4. Experimento 5: Efeito da injeção de cloreto de cobalto no córtex pré-frontal medial esquerdo nos comportamentos relacionados à ansiedade e na expressão de cFos, CaMKII e na dupla marcação cFos/CaMKII no córtex pré-frontal medial direito

Vinte e cinco camundongos tiveram cânulas para microinjeção implantadas no CPFmE. Seis dias após a cirurgia, os animais foram transportados para sala experimental e mantidos em habituação por 30 minutos antes do início dos experimentos. Salina ou  $\text{CoCl}_2$  (1,0 mM/0,2  $\mu\text{L}$ ) foram injetados na sub-região PrL do CPFmE e, 10 minutos depois, os animais foram testados no LCE por 5 minutos. Noventa minutos após o término do LCE, os animais foram eutanasiados

e tiveram os encéfalos processados para análise a expressão de cFos, CaMKII e da dupla marcação cFos/CaMKII no córtex pré-frontal medial direito.

### 3.5. Experimento 6: Efeito da injeção de AP7 e cloreto de cobalto no córtex pré-frontal medial direito e esquerdo, respectivamente, nos comportamentos relacionados à ansiedade no labirinto em cruz elevado

Setenta e oito camundongos tiveram cânulas para microinjeção implantadas no CPFmE. Seis dias após a cirurgia, os animais foram transportados para sala experimental e mantidos em habituação por 30 minutos antes do início dos experimentos. Salina ou AP7 (0,05 nmol/0,2 µL) foram injetados no CPFmD seguidos de salina ou CoCl<sub>2</sub> (1,0 mM/0,2 µL) no CPFmE e, 10 minutos depois, os animais foram testados no LCE por 5 minutos.

**PRINCIPAIS  
RESULTADOS  
ENCONTRADOS**

#### 4. Resumo dos principais resultados encontrados

O presente estudo demonstra que (i) o estresse de derrota social induz comportamentos defensivos/relacionados à ansiedade e distintas ativação/inibição neuronal das sub-regiões do CPFmD e CPFmE e (ii) que a inibição do CPFmE também induz tais efeitos, que são principalmente relacionados à subárea pré-límbica do hemisfério esquerdo do CPFm de camundongos. Esses achados, juntamente à evidencia de que neurônios do CPFmE projetam-se diretamente ao CPFmD, sugerem que o PrL esquerdo modula a atividade neural dos córtices PrL e IL direitos, cuja estimulação elicia ansiedade em camundongos expostos ao LCE. O CPFmE parece ter papel tônico na modulação da ansiedade, uma vez que sua inibição funcional, particularmente da subárea PrL, intensifica a evitação dos braços abertos do LCE. Adicionalmente, a manipulação farmacológica (injeção de AP7, antagonista NMDA) junto às análises de imunofluorescência (Fos + CaMKII em dupla marcação) demonstram papel crucial do sistema glutamatérgico (através de receptores NMDA) no CPFmD PrL e IL na modulação ansiogênica em camundongos machos.

Os resultados comportamentais demonstraram que o EDS crônico aumenta os comportamentos defensivos/ansiogênicos em camundongos. No TIS, o EDS crônico diminuiu o tempo de permanência na zona de interação na sessão em que um alvo social estava presente. No LCE, os resultados indicaram que esse protocolo promoveu diminuição expressiva da exploração dos braços abertos, sugerindo perfil ansiogênico em animais estressados.

A análise de imunofluorescência demonstrou diferentes alterações na expressão de  $\Delta$ FosB (um marcador de atividade neuronal prolongada) e de  $\Delta$ FosB/CaMKII (um fator da cascata de ativação subjacente a ativação de receptores NMDA) em dupla marcação, dependendo da subárea do hemisfério do CPFm. Por exemplo, no Cg1, o EDS crônico induziu aumento bilateralmente na expressão de  $\Delta$ FosB e  $\Delta$ FosB/CaMKII em dupla marcação,



enquanto no PrL, animais estressados apresentaram diminuição no hemisfério esquerdo e aumento no hemisfério direito de  $\Delta$ FosB. Lateralização similar foi observada para neurônios positivos para ambas  $\Delta$ FosB+CaMKII, uma vez que foi detectado aumento apenas no lado direito. No IL, o estresse provocou aumento na expressão de  $\Delta$ FosB bilateralmente, mas a dupla marcação foi acentuada apenas no hemisfério direito. Em camundongos naïve, a análise das sub-regiões dorsais do CPFm (Cg1 and PrL) apontou menor expressão de  $\Delta$ FosB no hemisfério direito do que no esquerdo.

A análise do tracejamento neuronal, três semanas depois da injeção do neurotracejador anterógrado BDA, mostrou que os neurônios da sub-região PrL do CPFmE se projetam para todas as sub-regiões do CPFmD. Isso foi evidenciado pela presença de fibras marcadas pelo tracejador injetado no CPFmE nas sub-regiões Cg1, PrL e IL do CPFmD.

A inativação sináptica do PrL esquerdo, através da injeção local de  $\text{CoCl}_2$ , induziu ansiogênese, a qual foi abolida quando receptores NMDA do PrL direito foram bloqueados pela injeção de AP7. O tratamento com  $\text{CoCl}_2$  também causou aumento de cFos + CaMKII no PrL e IL contralaterais (i.e., direito), mas não no Cg1.

Os resultados decorrentes do bloqueio sináptico do CPFm esquerdo, isto é, considerando os efeitos da injeção local de  $\text{CoCl}_2$  em ambos Cg1 e PrL, não indicaram efeito claro da inativação química sobre os índices de ansiedade no LCE. Porém, quando os dados foram analisados separadamente, os resultados demonstram efeitos ansiogênicos do  $\text{CoCl}_2$ , porém quando injetado no PrL, mas não no Cg1. Tal efeito desaparece quando o PrL contralateral foi tratado com o antagonista NMDA, AP7. Nessas condições, os animais tratados com o bloqueador sináptico no CPFmE e antagonista NMDA no CPFmD ( $\text{CoCl}_2$ +AP7) exploraram as regiões aversivas do LCE de maneira similar aos tratados com salina (salina + salina ou salina + AP7). Também, a dose de AP7 utilizada (0,05 nmol) não alterou por si só as medidas

relacionadas à ansiedade e tampouco influenciou as entradas nos braços fechados do labirinto em cruz elevado, sugerindo um bloqueio seletivo deste antagonista NMDA sobre os índices de ansiedade.

# **DISCUSSÃO GERAL**

## 5. Discussão

Os experimentos propostos neste estudo têm por base a busca por aumentar a compreensão sobre a lateralização funcional do CPFm e seu papel na modulação de respostas comportamentais desencadeadas por estímulos aversivos.

O CPFmE e CPFmD processam respostas emocionais induzidas por estímulos relacionados ao estresse, e a inibição do CPFmE e CPFmD elicia ansiogênese e ansiólise, respectivamente (COSTA *et al.*, 2016). Nesse estudo nosso objetivo foi investigar a lateralização funcional do CPFm nos comportamentos de defesa (relacionados à ansiedade) em camundongos submetidos ao EDS crônico, os efeitos da inibição do CPFmE (via injeção local de  $\text{CoCl}_2$ , inativador sináptico) sobre o padrão de ativação neuronal e glutamatérgica do CPFmD e os efeitos do bloqueio de receptores NMDA do CPFmD sobre o aumento de ansiedade induzida pela inativação do CPFmE em camundongos expostos ao LCE. Também investigamos a existência de projeções neuronais partindo do CPFmE em direção ao CPFmD.

Os resultados mostraram que o EDS crônico induziu comportamentos defensivos (**Exp. 1 e 2**) seguidos pelo aumento da marcação de  $\Delta\text{FosB}$  e da dupla marcação de  $\Delta\text{FosB} + \text{CaMKII}$  nas subáreas cíngulado 1 (Cg1) e infralímbico (IL) do CPFm, bilateralmente. Além disso, o EDS aumentou a marcação de  $\Delta\text{FosB}$  e a dupla marcação de  $\Delta\text{FosB} + \text{CaMKII}$  seletivamente no pré-límbico (PrL) direito (**Exp. 3**). Através da injeção do neurotraçador anterógrado (BDA), foi possível observar projeções diretas do CPFmE em direção ao CPFmD PrL e IL, sugerindo a presença de modulação de atividade entre os hemisférios (**Exp. 4**). Também foi observado que a inibição transiente do CPFmE aumentou a marcação de  $\text{cFos} + \text{CaMKII}$  no PrL e IL contralaterais (**Exp. 5**). Ainda, o aumento de ansiedade induzido pela inativação do

PrL esquerdo foi bloqueado pelo antagonista de receptores NMDA, o AP7, injetado no PrL direito (**Exp. 6**).

Os resultados obtidos no TIS mostraram que os animais expostos ao EDS de maneira crônica apresentam evitação social, como evidenciado pela diminuição do tempo gasto na zona de interação quando um coespecífico desconhecido estava presente no teste. Diversos estudos têm reportado alterações semelhantes em camundongos expostos ao EDS, tanto em animais da linhagem Swiss-Webster (a mesma utilizada em nosso estudo) quanto em animais da linhagem C57BL/6J (LEHMANN 2017; MACEDO 2017; BROWNE 2017; PIARDI 2020; FOX 2020; MUL 2018; BERTON 2006). Outros estudos, por outro lado, utilizam o TIS para classificar os animais que passaram pelo estresse em dois perfis: resiliente e suscetível (KRISHNAN 2014). Contudo, nossos resultados indicaram que, com o protocolo utilizado, uma parcela muito pequena de animais apresenta o fenótipo resiliente (n=3), razão de excluirmos estes animais da atual análise. Essa maior suscetibilidade dos nossos animais ao protocolo pode estar relacionada a diferenças nas linhagens de camundongos utilizadas (a maioria dos estudos utiliza camundongos da linhagem C57BL/6J), ao nível de agressividade dos residentes ou a condições ambientais do local utilizado para a realização do TIS.

Com relação aos comportamentos relacionados à ansiedade avaliada no LCE, foi possível observar que o grupo estressado apresenta aumento do comportamento defensivo, evidenciado pela diminuição da exploração das áreas aversivas do LCE (menor porcentagem de entradas e de tempo de permanência nos braços abertos), quando comparado ao grupo controle. Estes resultados sugerem que o EDS crônico é capaz de alterar o comportamento de animais, desencadeando diminuição da interação social no TIS e aumento da aversão no LCE. Em outras palavras, o EDS crônico pode desencadear alterações mal adaptativas, aumentando a exibição de comportamentos “ansiosos”. Esses achados vão ao encontro da nossa proposta,

em que se destaca a importância de se separar os perfis comportamentais de indivíduos que passam por situações estressoras e, a partir disso, investigar possíveis diferenças em seus mecanismos neurobiológicos relacionadas com as estratégias de enfrentamento ao estresse.

Com relação à análise de imunofluorescência para  $\Delta$ FosB e CaMKII em animais expostos ao EDS crônico, nossos resultados demonstraram que há um aumento da expressão de  $\Delta$ FosB bilateralmente no Cg1 em comparação aos animais controle não estressados. Além disso, a análise também demonstrou que na região cortical PrL, esse aumento ocorre apenas no lado direito (semelhante ao observado quando da inativação temporária do CPFmE PrL por  $\text{CoCl}_2$ ). Estes resultados sugerem ser o PrL uma sub-região chave no processo de lateralização na modulação das respostas emocionais de animais submetidos cronicamente ao EDS.

Com relação à expressão da CaMKII em animais submetidos ao estresse, o aumento no número de colocalizações da expressão destas proteínas indicou aumento do recrutamento glutamatérgico no PrL e IL direito, bem como a diminuição no IL esquerdo dos animais estressados. Esses achados corroboram estudos anteriores em que se sugere que quando submetido ao estresse crônico, o CPFm Esquerdo (CPFmE) sofre perda estrutural, refletindo em diminuição volumétrica (CZECH, 2007), enquanto o hemisfério direito passaria a ter um papel principal na facilitação da resposta hormonal ao estresse, através da interação com o eixo hipotálamo-pituitária-adrenais (HPA) (SULLIVAN; GRANTON, 1999).

De maneira interessante, nossos resultados de imunofluorescência revelaram que o aumento de comportamentos relacionados à ansiedade induzido pela inativação do CPFmE PrL parece ser modulado pelas sub-regiões PrL e IL contralaterais. O ensaio demonstrou o aumento de cFos (marcador de ativação neuronal) e sua dupla marcação com CaMKII (fator da cascata de ativação de receptores NMDA) nessas duas sub-regiões quando os sujeitos receberam  $\text{CoCl}_2$

no CPFmE PrL em comparação com os animais que receberam salina. É importante ressaltar que não houve alterações na expressão dessas proteínas isoladas ou combinadas no Cg1, enfatizando a importância de se levar em conta a subárea do CPFm.

A inativação sináptica do CPFm, especificamente a sub-região pré-límbica esquerda, promove aumento dos comportamentos relacionados à ansiedade, uma vez que o tratamento com  $\text{CoCl}_2$  nessa estrutura diminui significativamente a exploração dos braços abertos do LCE, denotando papel tônico unilateral da região na modulação dos comportamentos exibidos no teste. De maneira interessante, o efeito induzido pelo bloqueio sináptico do CPFmE não é observado quando a estrutura contralateral está sob bloqueio de receptores NMDA, uma vez que os animais que receberam  $\text{CoCl}_2$  no CPFmE PrL concomitantemente ao AP7 intra-CPFmD PrL exploram as áreas aversivas do LCE de maneira semelhante aos animais que receberam apenas salina (grupo controle). Vale destacar que a dose utilizada de AP7 (0,05 nmol) não tem efeito por si sobre as medidas clássicas de ansiedade (%EA e %TA) e tampouco alterou a atividade geral (entradas nos braços fechados), o que poderia prejudicar a interpretação dos resultados. Porém, é indispensável enfatizar que os efeitos observados dependem da sub-região do CPFm que é manipulada, ou seja, são sítio-específicos. Nesse sentido, foi possível observar que a inativação sináptica promovida pelo  $\text{CoCl}_2$  induz perfil ansiogênico, reduzindo a exploração dos braços abertos do LCE, apenas nos animais que receberam a injeção na sub-região PrL. No entanto, tais alterações não foram observadas quando as intervenções farmacológicas atingiram a área 1 do córtex cingulado anterior (Cg1). Assim, é possível sugerir que a inativação do CPFmE PrL desencadeou efeitos semelhantes ao encontrado em nossos resultados anteriores, com o diferencial de que naquele estudo (COSTA *et al.*, 2016), embora não tenha sido abordado o papel do CPFm IL, também não houve distinção entre as sub-regiões dorsais (Cg1 e PrL) do CPFm.

Neste sentido, a análise da ativação neuronal inferida pela expressão de cFos indica que a inativação sináptica produzida por  $\text{CoCl}_2$  no hemisfério esquerdo do CPFm PrL aumenta o recrutamento de neurônios do CPFm PrL contralateral. Extrapolando os achados, pode ser sugerido que a inativação do CPFmE PrL cause o aumento da ativação do hemisfério direito, desencadeando as respostas comportamentais de caráter ansiogênico observadas. Sendo o CPFm composto por 80-90% de neurônios glutamatérgicos (SANACORA; TRECCANI; POPOLI, 2012), o bloqueio dos receptores NMDA (Exp. 3) parece explicar a ausência do efeito pró-aversivo do tratamento com  $\text{CoCl}_2$  em animais que receberam AP7 no hemisfério direito.

Resultados anteriores de nosso grupo de pesquisa mostraram que a facilitação nitrérgica (através do NOC-9, doador de NO) do CPFmD promove efeitos ansiogênicos, enquanto a mesma facilitação concomitante no CPFmE impede que tais efeitos apareçam. Em outras palavras, injeções bilaterais no CPFm de NOC-9 não alteram a ansiedade de camundongos expostos ao LCE (COSTA et al., 2016), sugerindo que de alguma forma a liberação de óxido nítrico no CPFmE prejudica os efeitos ansiogênicos observados com a facilitação nitrérgica no CPFmD. Além disso, a inativação temporária (através do bloqueador sináptico  $\text{CoCl}_2$ ) do CPFmD ou E promove, respectivamente, efeitos ansiolítico e ansiogênico (COSTA et al., 2016). Cabe destacar que tais resultados consideram como CPFm as sub-regiões Cg1 e PrL agrupadas. Ainda, resultados de nosso laboratório demonstraram que o bloqueio de receptores NMDA no CPFm PrL promove efeitos contrários em camundongos expostos ao LCE. Assim, enquanto o tratamento com AP7 produz efeitos ansiolítico no hemisfério direito (em doses mais elevadas que a do presente estudo: 0,1 e 0,2 nmol), este antagonista NMDA produz efeitos ansiogênicos quando injetado no CPFmE (resultados não publicados). Desta forma, parece que a ativação do CPFmD é responsável pelo aumento dos comportamentos defensivos exibidos diante de situações ameaçadoras, ao passo que, de alguma maneira, a ativação do CPFmE



parece impedir o aumento exacerbado dessas respostas, ajudando a animal a lidar com a situação, reduzindo a expressão de comportamentos relacionados à ansiedade. Neste mesmo sentido, recentemente, demonstramos que camundongos expostos a uma única sessão de estresse de derrota social sob inibição do CPFmE por  $\text{CoCl}_2$  exibem aumento de comportamentos ansiosos que perduram por 2, 5 e até 10 dias, quando avaliados no LCE. Ainda, este tipo de ansiogênese prolongada foi revertido pelo bloqueio dos receptores NMDA do CPFmD (AP7, 0,05 nmol – dose sem efeitos intrínsecos sobre a ansiedade) no momento do teste (VICTORIANO et al., 2020).

Alguns estudos já demonstraram que a lateralização funcional do CPFm está envolvida com o processamento do controle emocional em humanos (DAVIDSON, 1998) e animais (e.g. SULLIVAN; GRATTON, 1999). Trabalhos importantes da área mostraram que o CPFm tem papel lateralizado na modulação de respostas neuroendócrinas e autonômicas ao estresse em vários mamíferos. Por exemplo, lesões bilaterais ou do CPFmD (mas não apenas do esquerdo) reduzem o pico de corticosterona induzido por estresse de restrição em ratos (SULLIVAN; GRATTON, 1999). Além disso, situações de estresse crônico têm sido relacionadas com alterações volumétricas e funcionais do CPFm, e parece haver diferenças hemisféricas: hiperativação do hemisfério direito e diminuição da atividade do hemisfério esquerdo (CZECH, 2007; LEE et al., 2015). Dessa maneira, Cerqueira *et al.* (2008) propõem que o CPFmE tenha um papel de controle inibitório sobre o CPFmD em condições basais e que disfunções nessa estrutura possam estar relacionadas com o aparecimento de respostas mal adaptativas, como aumento de comportamentos relacionados à ansiedade. Nossos resultados vão ao encontro dessa hipótese, uma vez que encontramos projeções provenientes do CPFmE para o CPFmD e a inativação do CPFmE aumenta os índices de ansiedade nos animais. Além disso, tais efeitos parecem ser decorrentes da desinibição glutamatérgica do CPFmD, uma vez que o bloqueio

concomitante dos receptores NMDA nesse hemisfério reverte o efeito pró-aversivo. Dessa maneira, considerando todos os resultados do presente estudo, é possível que a hipofuncionalidade do CPFmE, de alguma forma (direta ou indiretamente), leve à desregulação da neurotransmissão glutamatérgica no CPFmD, promovendo um descontrole comportamental frente a situações aversivas.

Dentre uma série de processos que envolvem modulação via CPFm, tem sido mais recorrente se investigar particularidades morfofuncionais com relação a suas subdivisões no eixo dorso-ventral. No entanto, embora existentes, poucos trabalhos se atêm à lateralização funcional ou mencionam o hemisfério em estudos com intervenção unilateral da estrutura. Tendo isso em vista, alguns achados indicam diferenças funcionais entre o Cg1 e o PrL. Por exemplo, com relação aos processos relacionados à memória avaliados em testes de esQUIVA inibitória, Padro-Acalá e colaboradores (2017) demonstraram que a inativação reversível do PrL impede a consolidação da memória em ratos que receberam choque nas patas, o que não ocorre em animais com o Cg1 inativado. Também em ratos, Croteau *et al.* (2017) observaram que a administração crônica de corticosterona (através do implante bilateral no CPFm de *micropellets* de corticosterona) reduz a exploração das regiões aversivas em dois testes para comportamentos relacionados à ansiedade, o campo aberto e o labirinto em cruz elevado. Contudo, esse efeito desencadeado pelos altos níveis do glicocorticoides só foi demonstrado em intervenções no PrL e IL, mas não no Cg1. Em ambos os trabalhos mencionados, as discussões se encaminham por diferenças já conhecidas entre PrL e IL e apontam para o possível papel de projeções entre o CPFm e os subnúcleos da amígdala, por exemplo.

Marek e colaboradores (2018) demonstraram, através do uso de marcadores retrógrados e cFos, conexão excitatória unidirecional do PrL para o IL num modelo de extinção de medo. Embora nesse estudo os autores não tenham especificado ou discutido acerca de lateralização

funcional, parece razoável sugerir, considerando achados prévios de nosso grupo de pesquisa, que a queda na modulação tônica a partir do PrL esquerdo leva ao aumento da ativação do PrL direito (através de receptores NMDA), a qual pode enviar projeções glutamatérgicas para o IL ipsilateral, causando aumento das respostas de ansiedade. Apesar de atraente, esta hipótese necessita ser investigada em outros experimentos voltados a esclarecer as vias subjacentes à lateralização funcional envolvidas na modulação dos comportamentos defensivos. Neste sentido, encontra-se em andamento em nosso laboratório, investigações morfofuncionais em que buscamos identificar, via utilização de neurotraçadores e quantificação de  $\Delta$ FosB, o papel de estruturas corticais (e.g., CPFm e hipocampo) e subcorticais (e.g., amígdalas e BNST) na modulação de respostas defensivas desencadeadas por situações aversivas e potencializadas por estressores.

Se assim, é possível sugerir que existam eferências (diretas ou indiretas) do CPFmE com papel inibitório sobre o CPFmD. Neste sentido, não é de nosso conhecimento haver trabalhos na literatura que tenham realizado um mapeamento em camundongos com relação às projeções do CPFm. Porém, Franklin e colaboradores (2017) observaram que projeções glutamatérgicas do CPFm para a matéria cinzenta periaquedutal (MCP) modulam as respostas a situações aversivas, como o estresse de derrota social, uma vez que a inibição desses neurônios reduz a esquiva social em camundongos que foram submetidos previamente a este estresse. Alguns trabalhos realizados em ratos, investigando o CPFm sem se aterem à lateralização, nos dão um panorama de quais outras áreas importantes, além da MCP, possam estar recebendo projeções do CPFmE. Em ratos, foi observado uma diferença marcante das projeções emitidas pela porção IL em comparação à PrL do CPFm, podendo-se destacar as projeções da região IL para o septo lateral, o núcleo leito da estria terminal (BNST), os núcleos amidaloides (medial, basomedial, central e cortical) e hipotalâmicos (dorsomedial, lateral,

perifornical, posterior e supramamilar). Com relação à porção PrL, destacam-se as projeções para córtex insular agranular, núcleo accumbens, tálamo, a parte capsular do núcleo central e do núcleo basolateral da amígdala e, em menor escala em comparação às projeções do IL, também para o núcleo leito da estria terminal (VERTES, 2004). Por sua vez, nossos resultados demonstram projeções da porção PrL do CPFmE para todas as sub-regiões do CPFmD.

Em resumo, os resultados obtidos reforçam a hipótese da lateralização funcional do CPFm, em que os hemisférios direito e esquerdo parecem possuir diferentes participações na modulação de respostas desencadeadas por situações aversivas (e.g., braços abertos do LCE; interação social agressiva). Os dados também sugerem influência da atividade de um hemisfério sobre o outro, corroborando a proposta de Cerqueira e colaboradores (2008) de que o CPFmD, responsável pelo aumento de comportamentos relacionados à ansiedade, sofra um controle inibitório oriundo do CPFmE. Contudo, não se pode excluir o papel de outras estruturas subcorticais sobre essas modulações. Neste sentido, recentes resultados obtidos em nosso laboratório mostraram que o bloqueio de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA e para o neuropeptídeo fator liberador de corticotropina (CRF) do tipo 1 (CRF1) no núcleo intersticial da estria terminal (BNST) antagoniza os efeitos ansiogênicos desencadeados pela injeção de NOC-9 (doador de NO) no córtex pré-frontal medial direito (FARIA; LAVERDE; NUNES-DE-SOUZA, 2020).

Somados a essas evidências anteriores, os resultados apresentados aqui são sugestivos de que, se de alguma forma, a funcionalidade do CPFmE PrL impede um aumento exacerbado da atividade do CPFmD. A inativação do CPFm do hemisfério esquerdo, por sua vez, provoca um aumento nos índices de ansiedade por ativação do hemisfério direito dessa estrutura, sobretudo via modulação por receptores glutamatérgicos do tipo NMDA.



# CONCLUSÃO

Em conclusão, nossos resultados sugerem que a sub-região PrL do CPFmE exerce um papel inibitório sobre o CPFmD, e que a inibição do CPFmE PrL leva a uma desinibição do CPFmD, por meio da modulação dos receptores NMDA. Essa inibição do CPFmE e desinibição do CPFmD está relacionada com um aumento dos comportamentos relacionados à ansiedade em resposta a estímulos aversivos. Além disso, nosso estudo ressalta a importância do estudo funcional do CPFm como uma estrutura diversa, em que cada sub-região no eixo dorso-ventral e cada hemisfério possui um papel diferente na modulação das respostas emocionais ao estresse.

**MANUSCRIPT**





## **Glutamatergic neurotransmission controls the functional lateralization of the mPFC in the modulation of anxiety induced by social defeat stress in male mice**

**Nathália Santos-Costa<sup>1,2†</sup>, Daniela Baptista-de-Souza<sup>1†</sup>, Lucas Canto-de-Souza<sup>1†</sup>, Vinícius Fresca da Costa, Ricardo Luiz Nunes-de-Souza<sup>1,2\*</sup>**

† These authors have contributed equally to this work and share the first authorship

<sup>1</sup>Lab. Pharmacology, School of Pharmaceutical Sciences, Univ. Estadual Paulista, UNESP, Araraquara, SP, 14800-903, Brazil.

<sup>2</sup>Joint Graduate Program in Physiological Sciences (PIPGCF) UFSCar-UNESP, São Carlos, SP, 13565-905, Brazil

\*corresponding author

Lab. Farmacologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP, Rodovia Araraquara-Jaú, Km 01, CEP: 14800-903  
Araraquara, SP, Brazil

Phone: +55 16 33016983

E-mail addresses: [ricardo.nunes-souza@unesp.br](mailto:ricardo.nunes-souza@unesp.br)

**Keywords: mPFC, Anxiety,  $\Delta$ FosB, CaMKII, Glutamatergic neurotransmission, Chronic Social Defeat Stress, Mice**

**Abstract**

The left and right medial prefrontal cortex (L & RmPFC) process emotional responses induced by stress-related stimuli, and LmPFC and RmPFC inhibition elicit anxiogenesis and anxiolysis, respectively. Here we sought to investigate (i) the mPFC functional laterality on defensive/anxiogenic-like behaviors in mice subjected to chronic social defeat stress (SDS); (ii) the effects of LmPFC inhibition (with local injection  $\text{CoCl}_2$ ) on the RmPFC glutamatergic neuronal activation pattern; and (iii) the effects of the RmPFC NMDA receptor blockade on the anxiety induced by LmPFC inhibition in mice exposed to the elevated plus-maze (EPM). Results showed that chronic SDS induced defensive-like behaviors followed by the rise of  $\Delta\text{FosB}$  labeling and by  $\Delta\text{FosB} + \text{CaMKII}$  double-labeling bilaterally in the cingulate (Cg1) and infralimbic (IL) subareas of the mPFC. Chronic SDS also increased  $\Delta\text{FosB}$  and by  $\Delta\text{FosB} + \text{CaMKII}$  labeling only on the right prelimbic (PrL). Also, left PrL inhibition increased cFos + CaMKII labeling in the contralateral PrL and IL. Moreover, anxiogenesis induced by the left PrL inhibition was blocked by NMDA receptor antagonist AP7 injected into the right PrL. These findings suggest the lateralized control of the glutamatergic neurotransmission in the modulation of emotional-like responses in mice subjected to chronic SDS.

## 1. INTRODUCTION

Several studies have pointed out that ~15% of adults in the world are affected by anxiety disorders, one of the most common psychiatric disorders (World Health Organisation, 2017; Alonso et al., 2018; Charlson et al., 2019). Stressful situations are widely known as a predictor of anxiety conditions (Myin-Germeys et al., 2003). In this sense, interpersonal conflicts can promote a huge impact on emotional responses (Bolger et al., 1989; Nezlek and Plesko, 2001).

From a basic research perspective, Rodgers and colleagues (1993) have published the first evidence about the anxiogenesis-like response in mice induced by hard confrontation with an aggressive male conspecific, a phenomenon known as social defeat stress (SDS). Posteriorly, the protocol was standardized to improve the expertise in evaluating affective-like disorders in rodents (Golden et al., 2011). Therefore, our group has used the SDS to investigate the neuronal basis of defensive behaviors in the attacked mouse (Faria et al., 2020; Victoriano et al., 2020).

Among the various limbic areas that modulate the emotional consequences induced by SDS (Cooper et al., 2015), the medial prefrontal cortex (mPFC) is a highlighted forebrain area for regulating the behavioral responses such as social avoidance induced by stress in mice (Diorio et al., 1993; Blanchard et al., 1998; Cerqueira et al., 2008). Furthermore, a body of evidence indicates that mPFC lesion alters the anxiety-related behavior in rats exposed to the elevated plus-maze (EPM) and social interaction test (Gonzalez et al., 2000; Lacroix et al., 2000; Shah and Treit, 2003), highlighting the relevance of this forebrain area as a potential target for the effects of anxiolytic drugs (e.g., McNaughton and Corr, 2004; Jaferi and Bhatnagar, 2007; Holmes and Wellman, 2009).

Previous studies have shown the proaversive effects of various classes of drugs injected into the mPFC [e.g., blockade of  $\beta_1$  adrenergic (atenolol), muscarinic cholinergic (scopolamine), or ionotropic glutamatergic (ap-5) (Stern et al., 2010) receptors; excitotoxic

lesion (Shah and Treit, 2003)]. Lisboa et al. (2010) showed that cobalt chloride [ $\text{CoCl}_2$ , a synaptic inhibitor (Kretz, 1984) that does not interfere with the fibers of passage function (Lomber, 1999)] injections into the prelimbic (PrL) and/or infralimbic (IL) portions of the mPFC of rats induce anxiogenic- and anxiolytic-like effects, respectively, in rats exposed to innate (i.e., EPM and Light-dark box) and learned (i.e., contextual fear conditioning, Vogel conflict) anxiety/fear tests. Besides the distinct aversiveness nature of the test used to evaluate anxiety-related responses, such discrepant findings could be related to the involvement of the mPFC subregions or even to the functional lateralization of this forebrain area (Sullivan and Gratton, 1999, 2002; Cerqueira et al., 2008; Lee et al., 2015; Costa et al., 2016; Faria et al., 2020; Victoriano et al., 2020), which were not taken into account in most studies investigating the role of the mPFC in the modulation of anxiety. Regarding functional lateralization, previous studies have demonstrated that inhibition of the left and right mPFC produces anxiogenic- and anxiolytic-like effects, respectively, in mice exposed to various tests of anxiety (Lee et al., 2015; Costa et al., 2016).

Besides the employment of techniques of functional inhibition (for instance, with irreversible lesions or local injections of  $\text{CoCl}_2$ ), the use of immunofluorescence assays is also convenient to investigate the role of a brain area in the modulation of an emotional state. In this context, the protein Fos has probably been the most commonly used neuronal activity marker in behavioral research, including studies on fear and anxiety (e.g., Morgan and Curran, 1991; Brenhouse and Stellar, 2006; Cruz et al., 2015). For instance, increased expression of protein Fos has been identified in limbic areas of animals exposed to the EPM (e.g., Duncan et al., 1996; Linden et al., 2003; Sorregotti et al., 2018). Moreover, Pati et al. (2018) have demonstrated the increase of Fos, and the involvement of CaMKII [ $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II, an NMDAR signaling activation-related protein (De Koninck and

Schulman, 1998; Sanhueza et al., 2011; Carvajal et al., 2016)], in the mPFC of rats exposed to the EPM and open field tests.

Given that glutamate neurotransmission is ubiquitous in the PFC (McKlveen et al., 2015) and the mPFC plays a lateralized function in the control of anxiety (Cerqueira et al., 2008; Lee et al., 2015; Costa et al., 2016; Victoriano et al., 2020), we hypothesized that the raised of defensive behaviors, specially anxiogenic-like responses, induced by SDS are modulated by the glutamatergic neurotransmission in the mPFC. Furthermore, our hypothesis also points out that the increase in anxiety-like behavior can be a consequence of hemispheric lateralization disturbance in subregions of this forebrain area.

To test these hypotheses, we investigated the influence of social defeat stress protocol in mice on (i) the avoidance behavior assessed in the social interaction and (ii) EPM tests, and (iii)  $\Delta$ FosB, CaMKII as well as  $\Delta$ FosB+CaMKII labeling in neurons located in both hemispheres of the mPFC of mice. Furthermore, we evaluated the (iv) presence of projections from the left to the right mPFC, (v) whether the anxiogenesis induced by LmPFC inhibition leads to cFos, CaMKII, and cFos+CaMKII labeling in neurons located in the RmPFC, and (vi) the effect of intra-RmPFC injection of AP7 (an NMDA receptor antagonist) on the anxiogenic-like effect induced by  $\text{CoCl}_2$  injection into the LmPFC in mice exposed to the EPM.

## **2. MATERIAL AND METHODS**

### **2.1 Subjects**

One hundred sixty-eight male Swiss-Webster mice (São Paulo State University - Unesp, SP, Brazil) of 5-6 weeks of age were used in this study. Mice were housed in groups of 10 per

cage (size: 41 × 34 × 16 cm) and maintained under a normal 12-h light cycle (lights on at 7:00 a.m) in a temperature-controlled environment ( $23 \pm 2$  °C). Food and water were freely available except during the brief test periods. All mice were naive at the beginning of the experiments and they were used once. Housing conditions and experimental procedures were approved by the Ethical Committee for Use of Animals of the School of Pharmaceutical Sciences/Unesp, which complies with Brazilian and international guidelines for animal use and welfare (CEP/FCF/CAR-UNESP: protocol number 22/2017).

## **2.2 Drugs**

The following drugs were used: Cobalt chloride ( $\text{CoCl}_2$  – nonspecific synaptic blocker- 1 mM/0.2  $\mu\text{L}$ ); AP7 (2-amino-7- phosphonoheptanoic acid - an NMDA glutamate receptor antagonist - 0.05 nmol/0.2  $\mu\text{L}$ ). The drugs were dissolved in 0.9% physiological saline solution. Doses were based on previous studies (Costa et al., 2016; Faria et al., 2016; Victoriano et al., 2020).

## **2.3 Surgery and neurotracer and drug microinjection**

Mice were bi- or unilaterally (for details, see 2.5 General Procedures section) implanted with a 7-mm stainless steel guide cannula (26 gauge; Insight Equipamentos Científicos Ltd., Brazil) targeted to the mPFC, under anesthesia induced by intraperitoneal injection of ketamine (100 mg/kg) plus xylazine (10 mg/kg). Stereotaxic coordinates (Paxinos and Franklin, 2001) for the mPFC were: 1.94 mm anterior to bregma,  $\pm$  0.3 mm lateral to the midline for left and

right hemispheres, and 1.9 mm ventral to the skull surface, with the guide cannulae in the vertical position.

For the neurotracer infusion experiment, 0,1  $\mu\text{L}$  of the antegrade neurotracer BDA (Dextran Amine-Texas Red®, Biotinylated; Vector Laboratories) was microinjected into the left prelimbic area. The BDA infusion was performed through an infusion pump (Micro4 Microsyringe Pump) linked to a syringe (0.5  $\mu\text{L}$ , Neuros Syringe, Model 7000.5 KH, 32 gauge) in a ratio of 0.02  $\mu\text{L}/\text{min}$  (final volume 0.1  $\mu\text{L}$ ). At the end of the infusion, the needle remained within the area for extra five minutes (Reiner et al., 2000; Vercelli et al., 2000) to avoid the reflux of BDA.

For experiments with drug microinjections, guide cannulae were fixed to the skull with dental acrylic and jeweler's screws. A dummy cannula (33 gauge, stainless steel wire; Fishtex Industry and Commerce of Plastics Ltd.), inserted into each guide cannula, served to reduce the incidence of occlusion. Immediately after surgery, the animals received an intramuscular injection of penicillin-G benzathine (Pentabiotic®, 56.7 mg/kg in a 0.1 mL volume; Fort Dodge, Campinas, SP, Brazil) and a subcutaneous injection of the anti-inflammatory analgesic Banamine® (3.5 mg/kg flunixin meglumine, Intervet Schering-Plough, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, in a volume of 0.3 mL). Five to seven days after surgery, solutions (see 2.2. Drugs section) were injected into the mPFC through microinjection units (33 gauge stainless steel cannula; Insight Equipamentos Científicos Ltda., Brazil), which extended 1.0 mm beyond the tip of the guide cannula. Each microinjection unit was attached to a 2  $\mu\text{L}$  Hamilton microsyringe via polyethylene tubing (PE-10). The microinjection procedure consisted of gently restraining the animal, removing the dummy cannula, inserting the injection unit in situ, and proceeding with the microinjection over a 30-s period, after which the needle was left for a further 30 s.

The final volume delivered was 0.2  $\mu$ L. The successful procedure was verified by monitoring the movement of a small air bubble in the PE-10 tubing.

#### **2.4. Social defeat stress (SDS)**

The chronic SDS is based on the conflict between conspecifics and consists of the interaction between an aggressor resident and an intruder mouse placed on the aggressor's cage. This aggressive interaction triggers various behavioral, endocrine, and autonomic changes in the defeated animal. The test has been used for the study of stress-related disorders, i.e., depression, anxiety, and drug abuse (Keeney and Hogg, 1999; Björkqvist, 2001; Hammels et al., 2015). The resident, an animal that displays spontaneous aggressive behavior, is socially isolated in individual cages (28  $\times$  17  $\times$  12 cm) with separated ventilation for at least 4 weeks to intensify their aggressive behavior. During the confrontation, the intruder remains in the aggressor's home cage for 5 min or until it presents a submissive posture: elevation of the body on the hind legs, front legs extended towards the aggressor, head retracted, and ears arched, for 3 seconds (Miczek et al., 1982). Non-aggressive group (non-defeated intruders) were exposed to a familiar non-aggressive conspecific for 5 min. The aggressive or non-aggressive interactions were carried out once a day for 10 consecutive days. Immediately after each daily interaction, the intruders remained in their home cages. To select the aggressor animals (residents), we followed a protocol similar to that described by Golden and colleagues (2011).

#### **2.5. Social Interaction test**



One day after the last aggressive or non-aggressive interaction, mice were subjected to the social interaction test. The social interaction arena ( $42 \times 42 \times 15$  cm) and the behavioral analysis were similar to those described by Golden and colleagues (2011). Briefly, the social interaction test was composed of two phases of 150s each, separated by an interval of 30 s, either with or without the target (a non-familiar male resident) placed into a wire mesh cage ( $10 \times 6 \times 15$  cm), called interaction zone (IZ). In the first phase, each mouse (previously subjected to the SDS or non-aggressive interaction) was placed in the center of the open field faced to the empty wire-mesh cage (no target) and was allowed to explore the arena. At the end of the first phase, the mouse was removed from the arena and left undisturbed in a holding cage for 30 s. During this time, a resident mouse (target) was placed in the wire-mesh cage. The second phase started when the experimental mouse was placed again in the arena, in the same position as described for the first phase, except that now faced the wire mesh cage where the resident mouse was in (target). All sessions were recorded under red light illumination (50 lux on the floor of the arena) by a vertically mounted camera linked to a monitor. The exploration time (in seconds) of the IZ and corner zones (CZ) were recorded in the absence (no target) and presence of the target. The social avoidance behavior was also expressed as a social interaction ratio, which is the ratio of time a mouse spends in the IZ or CZ in the presence of a target compared with the absence of a target.

## **2.6 Elevated plus maze and behavioral analysis**

The basic elevated plus maze (EPM) design comprised two open arms ( $30 \times 5 \times 0.25$  cm) and two closed arms ( $30 \times 5 \times 15$  cm), connected via a common central platform ( $5 \times 5$  cm). The apparatus was constructed from wood covered with Formica (floor) and transparent glass (clear walls) and was raised to a height of 38.5 cm above floor level. After drug injection

(see 2.3 section for details) into the mPFC, each mouse was placed in an individual holding cage and then transported to the maze. Testing commenced by placing the subject on the central platform of the maze (facing an open arm), following which the experimenter immediately withdrew to an adjacent room. The test sessions were 5-min in duration and, between subjects, the maze was thoroughly cleaned with 20% alcohol. All experiments were performed under low luminosity (50 lux on the central platform of the EPM), during the light phase of the light-dark cycle. All sessions were recorded by a vertically mounted camera linked to a monitor. The EPM videos were scored by using software (X-plo-rat 2005, University of São Paulo) (Tejada et al., 2018). Behavioral parameters comprised conventional spatiotemporal measures: frequencies of closed-arm entries (CE), and open-arm entries (OE), and the time (in seconds) spent in the open arm of the maze (entry = all four paws into an arm). These data were used to calculate the percentage of open-arm entries  $[(\%OE) - (\text{open}/\text{total}) \times 100]$  and percentage of open-arm time (%OT)  $[(\text{time open}/300) \times 100]$  (Rodgers and Johnson, 1995).

## **2.7 Immunofluorescence**

Mice were transcardially perfused with 30 mL of 1X phosphate-buffered saline (PBS) at pH 7.4, followed by 50 mL of fresh PFA. The brain was dissected and transferred to a 30% sucrose solution in PBS for 48 hr at 4 °C. After the brains had submerged, the tissues were embedded in OCT and sectioned at 35  $\mu\text{m}$  thickness on a cryostat. Sections were placed in serial order in a 12-well plate containing 0.1 M phosphate buffer (PB) with 0.01% sodium azide. Sections were washed 3 times in 0.1 M PB and then incubated in a blocking solution, containing 10% Normal Goat Serum and 0.3% Triton-X 100 in 0.1 M PB, for 1 h at room temperature with gentle rocking. Sections were incubated overnight with the primary antibody previously diluted

in a blocking solution. The primary antibodies used were: rabbit-anti-FOS (cat. No. 5348: SER-32 D82C12, Cell Signaling Technology Inc. Danvers – MA, EUA - 1:1000 working dilution), anti- $\Delta$ FosB (1:1000, cat. No. EPR15905, Abcam) and anti-mouse CaMKII (cat. No. TH269517: 6G9, Thermo Fischer Scientific. Rockford – IL, EUA – 1:1000 working concentration). Sections were washed 5 times in 0.1 M PB and, then, incubated for 2 h at room temperature with secondary antibody (1:1000 each) diluted in blocking solution. The secondary antibodies used were: anti-rabbit IgG Alexa-Fluor 488 (1:1000, cat. No. A21206, Life Technologies Co. Eugene-OR, USA) e anti-mouse IgG Alexa-Fluor 568 (1:1000, cat. No. A11004, Life Technologies Co. Eugene-OR, USA). Following secondary incubation, sections were washed 5 times in 0.1 M PB, mounted onto glass slides, cover-slipped using *Fluoroshield Mounting Medium*, and sealed with nail polish, once cured. The images from each slide were acquired using a fluorescence microscope (Axio Imager.D2, Carl Zeiss Microscopy, LLC, Thornwood-NY, USA) connected Zen Pro 2.0 software (Carl Zeiss Microscopy, LLC, Thornwood-NY, USA), and were analyzed using ImageJ software (NIH). The corrected total cellular fluorescence [CTCF = Integrated Density – (Area of selected tissue area  $\times$  Mean fluorescence of background readings)] of the RmPFC was measured by subtracting the background fluorescence from the integrated intensity and performed as described previously (Burgess et al., 2010; McCloy et al., 2014; Baptista-de-Souza et al., 2020).

## **2.8 General procedure**

### **2.8.1- Experiment 1 and 2: Behavioral effects of chronic SDS in mice**

Forty-one mice were subjected to ten sessions of SDS (n = 25) or non-aggressive interaction (n = 16) (see section 2.4 for details), and 24h later, some of them were exposed to the social interaction test for defensive behavior assessment (n = 24; Experiment 1), while another group (n = 17) was exposed to the EPM.

### **2.8.2- Experiment 3: Effects of chronic SDS on $\Delta$ FosB, CaMKII, and $\Delta$ FosB + CaMKII labeling in the mPFC bilaterally**

Nineteen mice were subjected to ten sessions of SDS (n = 7) or non-aggressive interaction (n = 6) (see section 2.4 for details), and 24 hours later, they were euthanized, and their brains were removed to immunofluorescence assay to identify  $\Delta$ FosB, CaMKII, and  $\Delta$ FosB + CaMKII labeled neurons bilaterally in the mPFC. An experimentally naïve group (n = 6) was also added to this experiment to record the basal levels of immunofluorescence.

### **2.8.3- Experiment 4: Evidence of projections from the LmPFC (prelimbic area) to the RmPFC (Cg1, prelimbic, and infralimbic areas)**

Five mice received neurotracer microinfusion within the left prelimbic area (see section 2.3 for details), and, three weeks later, they were euthanized, and their brains removed and histologically processed to verification of projection analyses.

### **2.8.4- Experiment 5: Effects of intra-LmPFC injection of $\text{CoCl}_2$ on anxiety, cFos, CaMKII, and cFos + CaMKII labeling in the RmPFC**

Six days after surgery, twenty-five mice were transported to the experimental room and left undisturbed for at least 30 min before testing. Saline or CoCl<sub>2</sub> (1.0 mM/0.2 μL) were injected into the prelimbic (PrL) area of the left mPFC and, 10 minutes later, each animal was placed on the EPM to record the anxiety (%OE and %OT) and locomotion (CE) indices for a 5-min period. Ninety minutes later, the animals were euthanized, and their brains were removed to immunofluorescence assay to identify cFos, CaMKII, and cFos + CaMKII labeled neurons in the RmPFC.

#### **2.8.5- Experiment 6: Effects of AP7 and CoCl<sub>2</sub> injected into the RmPFC and LmPFC, respectively, on the anxiety of mice exposed to the EPM**

Six days after surgery, seventy-eight mice were transported to the experimental room and left undisturbed for at least 30 min before testing. Then, saline or AP7 (0.05 nmol/0.2 μL) were injected into the RmPFC followed by saline or CoCl<sub>2</sub> (1.0 mM/0.2 μL) injection into the LmPFC and, ten minutes later, each mouse was exposed to the EPM to record the anxiety indices (%OE and %OT) and locomotion (CE) for a 5-min period.

### **2.8 Statistical analysis**

All results were initially subjected to Levene's test for homogeneity of variance. The data of experiments 2 and 5 were submitted to the Student *t*-test for independent samples. Two-way analysis of variance (ANOVA) was used to evaluate the data from experiment 1 [factor 1: condition (NA or Stress); factor 2: target (no target or target)], experiment 3 [factor 1: condition (Naïve, NA or Stress); factor 2: side (left or right)] and experiment 6 [factor 1: treatment in the

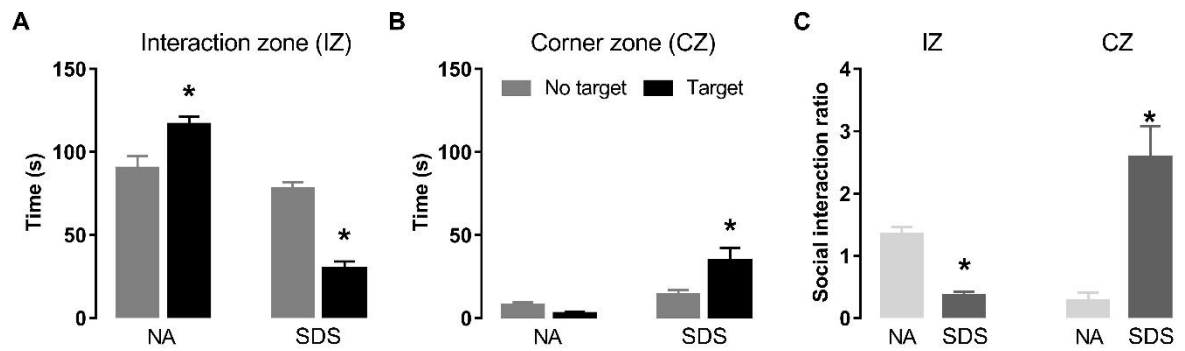
LmPFC (saline or CoCl<sub>2</sub>); factor 2: treatment in the RmPFC (saline or AP7)]. When significant, data were further analyzed using post hoc Duncan's multiple comparisons test. Values of  $p \leq 0.05$  were considered significant.

### 3. Results

#### 3.1- Experiment 1: Chronic SDS increases defensive behavior

Figure 1A-B represents the time spent in the (A) interaction zone (IZ) or (B) corner zone (CZ) exhibited by non-aggressive (NA; n=9) and chronic SDS mice (SDS; n=15) in the absence (no target) and presence (target) of a resident conspecific. A two-way ANOVA for repeated measures indicated significant effects for the exploration time in the IZ for condition [ $F(1,22) = 89.63$ ;  $p < 0.05$ ] and target [ $F(1,22) = 5.98$ ;  $p < 0.05$ ] factors as well as for between-factor interaction [ $F(1,22) = 68.43$ ;  $p < 0.05$ ]. Post hoc test revealed that the NA mice explored more the IZ in the presence than in the absence of the target. In contrast, SDS mice spent less time in the IZ in the presence than in the absence of the target (**Fig.1A**). A two-way ANOVA for repeated measures also indicated significant changes in the CZ for condition [ $F(1,22) = 8.97$ ;  $p < 0.05$ ] and target [ $F(1,22) = 3.11$ ;  $p < 0.05$ ] factors as well as for between-factors interaction [ $F(1,22) = 8.66$ ;  $p < 0.05$ ]. Post hoc test revealed that the SDS group also spent more time in the CZ with the target compared to the situation wherein the target is not present (**Fig.1B**).

Figure 1C represents the social interaction ratio in the IZ and CZ of NA and SDS mice. Student's *t*-test indicated a decrease in the IZ [ $t_{(22)} = 9.36$ ,  $p < 0.05$ ] and increase in the CZ [ $t_{(22)} = -3.53$ ,  $p < 0.05$ ]. These results demonstrate an increase in the social avoidance behavior in the SDS group compared to the NA group (**Fig.1C**).

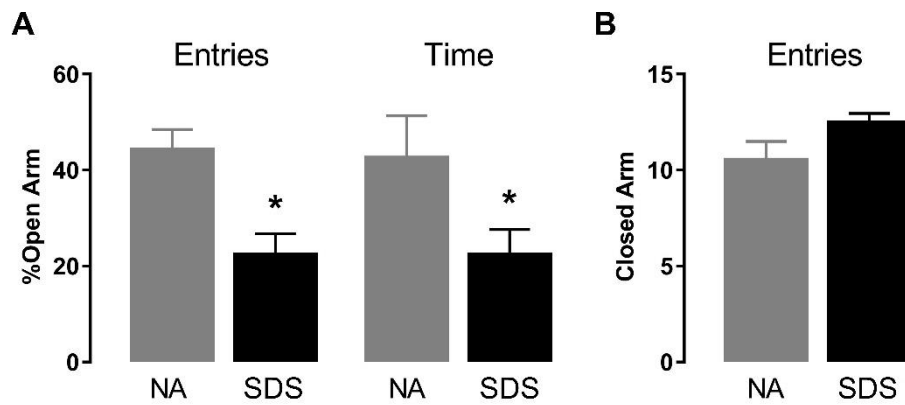


**Figure 1.** Chronic social defeat stress induces social avoidance-like behavior in mice. **(A)** SDS mice ( $n=15$ ) spend less time in the interaction zone (IZ) with a non-familiar target compared to the NA mice ( $n=9$ ). **(B)** Time spent in the corner zone (CZ) in the absence and presence of the target. **(C)** Social interaction ratio in the IZ and CZ. Bars represent mean (+ SEM). \* $p < 0.05$  compared to the No target of the respective group or to the NA group. NA, non-aggressive; SDS, social defeat stress.

### 3.2 - Experiment 2: Anxiety-like behavior induced by chronic SDS

Figure 2 represents the percentage of entries and time in the open arm (A), and the frequency of closed arm entries (B) of mice subjected to non-aggressive or chronic SDS interaction and exposed to in the EPM. Student's *t*-test indicated that SDS animals (n= 10) reduced percentage of open arm exploration (entries and time) compared to NA animals (n= 7) [entries ( $t_{(15)}= 3.58$ ;  $p < 0.05$ ) and time ( $t_{(15)}= 2.14$ ;  $p < 0.05$ )] (**Fig. 2A**). No significant differences were recorded were found for the number of closed arm entries ( $t_{(15)}= 2.06$ ;  $p > 0.05$ ) (**Fig. 2B**). These results demonstrate an increase in anxiety-like behavior in the SDS group compared to the NA group.





**Figure 2.** Chronic social defeat stress (SDS) induces anxiety-like behavior in mice. **(A)** percentage of open arm entries and percentage of open arm time in the EPM. **(B)** Frequency of closed arm entries in the EPM. Bars represent mean (+SEM). \* $p < 0.05$  compared to the NA group. NA, non-aggressive; SDS, social defeat stress.

### 3.3 - Experiment 3: Chronic SDS promotes differential activation pattern in $\Delta$ FosB, CaMKII, and $\Delta$ FosB + CaMKII labeling in the mPFC subareas (Cg1, PrL, and IL)

Figure 3 represents the activation pattern in  $\Delta$ FosB, CaMKII, and  $\Delta$ FosB + CaMKII (merge) labeling in Cg1, PrL, and IL subareas of the left and right mPFC. The brain of experimentally naïve ( $n = 6$ ) mice and those exposed to non-aggressive ( $n = 7$ ) or SDS ( $n = 6$ ) interaction were subjected to the immunofluorescence assay.

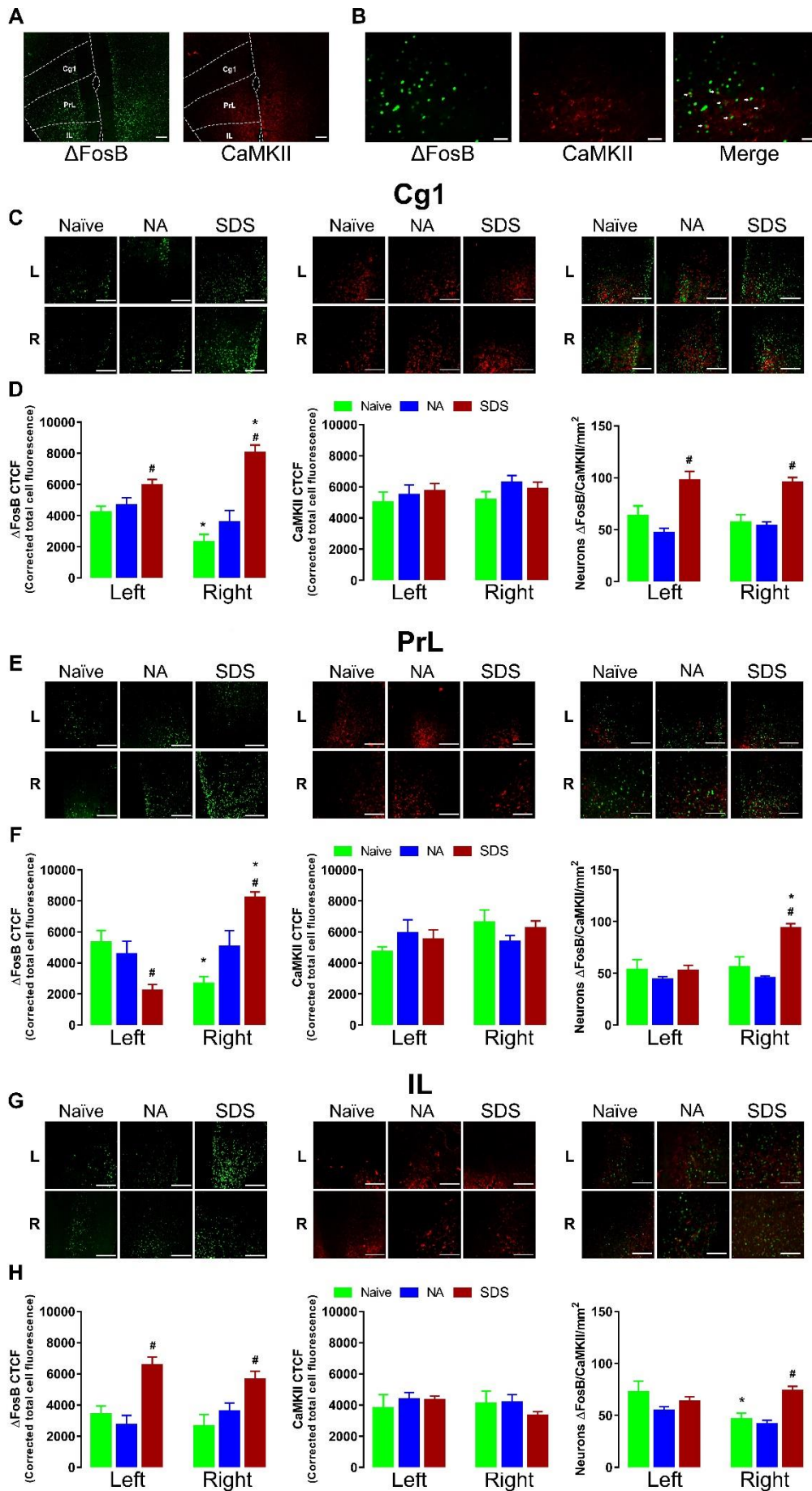
**Cg1:** Two-way ANOVA of the cingulate cortex (**Cg1 area**) indicated significant differences on  $\Delta$ FosB labeling for stress condition factor [ $F(2,32) = 28.23$ ;  $p < 0.05$ ], and for stress versus side interaction [ $F(2,32) = 8.16$ ;  $p < 0.05$ ], but not differences for side factor [ $F(1,32) = 0.59$ ;  $p > 0.05$ ]. Post hoc test showed that the right side of naïve mice has lower  $\Delta$ FosB labeling compared to the left side, and higher  $\Delta$ FosB expression in both sides of SDS group compared to their respective naïve mice. Moreover, the  $\Delta$ FosB labeling of stressed animals was higher in the right side than in the left side. For CaMKII labeling, two-way ANOVA did not indicate any significant effect [Stress condition:  $F(2,32) = 1.35$ ;  $p > 0.05$ ; Side:  $F(2,32) = 0.67$ ;  $p > 0.05$ ; Stress x Side interaction:  $F(2,32) = 0.28$ ;  $p > 0.05$ ]. For double-labeling ( $\Delta$ FosB + CaMKII) analysis, two-way ANOVA indicated significant differences only for Stress condition factor [ $F(2,32) = 28.36$ ;  $p < 0.05$ ; Side:  $F(1,32) = 0.02$ ;  $p > 0.05$ ; Stress condition x side interaction:  $F(2,32) = 0.57$ ;  $p > 0.05$ ]. Post hoc test revealed higher levels of  $\Delta$ FosB + CaMKII labeling in both sides of stressed animals compared to their respective naïve and NA groups (**Fig. 3D**).

**PrL:** Two-way ANOVA for  $\Delta$ FosB labeling indicated significant effects for stress condition [ $F(2,32) = 1.36$ ;  $p < 0.05$ ], and hemispheric [ $F(1,32) = 5.22$ ;  $p < 0.05$ ] factors, as well as for stress x side interaction [ $F(2,32) = 19.80$ ;  $p < 0.05$ ]. Post hoc test revealed lower  $\Delta$ FosB labeling

in the right compared to the left hemisphere of naïve mice.  $\Delta$ FosB labeling in stressed animals was lower in the left side and higher in the right side than in naïve and NA groups. Two-way ANOVA did not reveal any significant main factor effect for CaMKII labeling [stress:  $F(2,32) = 0.13$ ;  $p > 0.05$ ; Side:  $F(2,32) = 2.53$ ;  $p > 0.05$ ; stress x side interaction:  $F(2,32) = 2.64$ ;  $p > 0.05$ ]. For double-labeling ( $\Delta$ FosB + CaMKII) analysis, two-way ANOVA indicated significant main effect for all factors [stress:  $F(2,32) = 14.56$ ;  $p < 0.05$ ; side:  $F(1,32) = 11.04$ ;  $p < 0.05$ ; stress x side interaction:  $F(2,32) = 8.25$ ;  $p < 0.05$ ]. Post hoc test revealed an increase of the  $\Delta$ FosB + CaMKII labeling only in the right side of the SDS group compared to the respective naïve and NA groups (**Fig. 3F**).

**II:** Two-way ANOVA indicated significant differences of  $\Delta$ FosB labeling only for stress condition factor [ $F(2,32) = 19.10$ ;  $p < 0.05$ ; side:  $F(1,32) = 0.91$ ;  $p > 0.05$ ; stress x side:  $F(2,32) = 2.23$ ;  $p < 0.05$ ]. A post hoc test revealed that SDS animals presented higher  $\Delta$ FosB labeling in both hemispheres than naïve and NA groups. Two-way ANOVA did not reveal any significant main factor effect for CaMKII labeling [stress:  $F(2,32) = 0.38$ ;  $p > 0.05$ ; side:  $F(2,32) = 0.45$ ;  $p > 0.05$ ; stress x side interaction:  $F(2,32) = 0.69$ ;  $p > 0.05$ ]. For  $\Delta$ FosB + CaMKII double labeling, two-way ANOVA indicated significant effects for all three factors [stress:  $F(2,32) = 7.65$ ;  $p < 0.05$ ; side:  $F(1,32) = 4.90$ ;  $p < 0.05$ ; stress x side interaction:  $F(2,32) = 5.90$ ;  $p < 0.05$ ]. Post hoc test revealed a reduction of double-labeling in the right compared to the left side in naïve animals. An increase of double-labeling was recorded in right side of SDS mice compared to the respective naïve and NA groups (**Fig. 3H**).

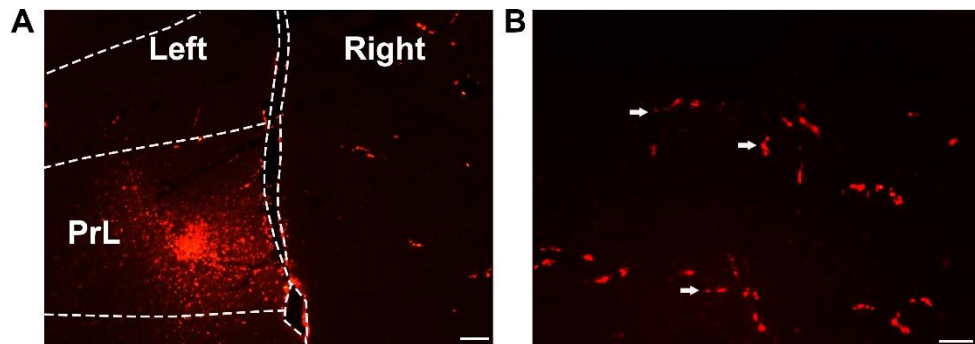
Photomicrographs illustrating immunofluorescence slices of  $\Delta$ FosB, CaMKII, and  $\Delta$ FosB + CaMKII labeling are shown in **Fig. 3 (A, B, C, E, and G)**.



**Figure 3.** Representative 10X (scale bar = 100  $\mu\text{m}$ ) (**A**) and 40X (scale bar = 20  $\mu\text{m}$ ) (**B**) images showing  $\Delta\text{FosB}$ , CaMKII immunoreactivity, and double-labeling merge for  $\Delta\text{FosB}$  (labeled in green) and CaMKII (labeled in red) in the mPFC. Representative 20X images showing  $\Delta\text{FosB}$ , CaMKII, and double-labeling for  $\Delta\text{FosB} + \text{CaMKII}$  on the Cg1 (**C**), PrL (**E**) and IL (**G**) (scale bar = 100  $\mu\text{m}$ ). Corrected total cell fluorescence (CTCF) for  $\Delta\text{FosB}$ , CaMKII, and  $\Delta\text{FosB} + \text{CaMKII}$  positive neurons in the Cg1 (**D**), PrL (**F**) and IL (**H**). (**E**) Representative 20X images showing  $\Delta\text{FosB}$ , CaMKII, and double-labeling for  $\Delta\text{FosB} + \text{CaMKII}$  on the PrL. (**F**) Corrected total cell fluorescence (CTCF) for  $\Delta\text{FosB}$ , CaMKII, and  $\Delta\text{FosB} + \text{CaMKII}$  positive neurons in the PrL. (**G**) Representative 20X images showing  $\Delta\text{FosB}$ , CaMKII, and double-labeling for  $\Delta\text{FosB} + \text{CaMKII}$  on the IL. (**H**). Sample sizes: Naïve (n=6), NA (n=7) SDS (n=6). Bars represent mean (+SEM). \*p < 0.05 compared to the same group on the opposite hemisphere. #p < 0.05 compared to the naïve group. L, left; R, right; NA, non-aggressive; SDS, social defeat stress; Cg1, cingulate cortex, area 1; PrL, prelimbic cortex; IL, infralimbic cortex.

### **3.4 - Experiment 4: The left PrL projects to the right mPFC**

To identify potential direct neuronal projections from the left PrL to the right mPFC, we injected the fluorescent BDA marker, an anterograde tracer, into the left PrL (**Fig. 4A**) of five mice. Figure 4B shows anterogradely labeled axons in the right mPFC visualized three weeks after BDA injection.



**Figure 4.** Photomicrographs depicting the anterogradely labeled neurons in the mPFC. **(A)** BDA microinjection site in the left PrL (scale bar = 100  $\mu\text{m}$ ). **(B)** White arrows show the presence of labeled neurons in the right PrL (scale bar = 50  $\mu\text{m}$ ).

### 3.5 - The anxiogenic effect produced by CoCl<sub>2</sub> injected into the left PrL increases cFos and cFos + CaMKII labeling in neurons of the right PrL and IL subregions

#### Histology

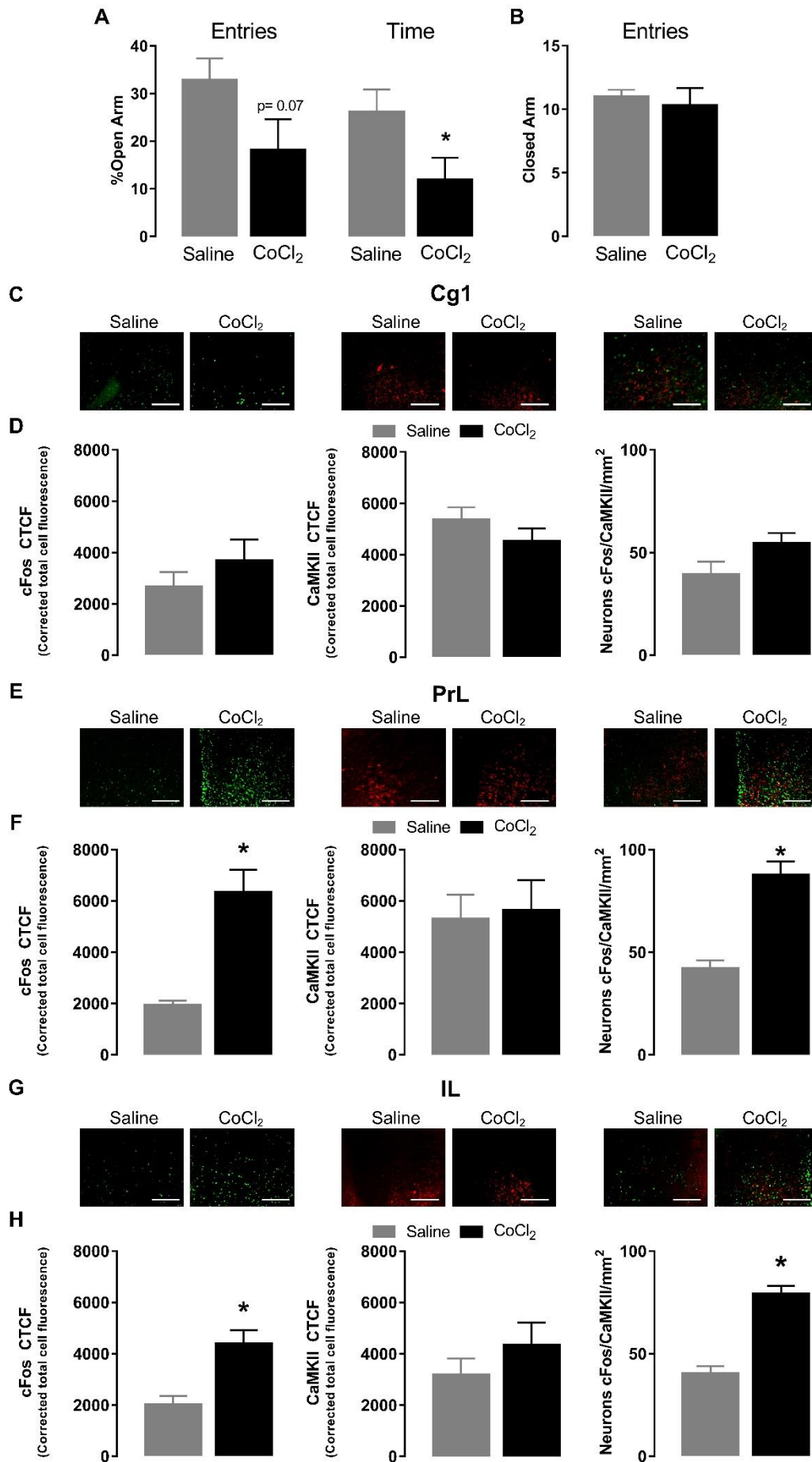
Figure 1 (supplement) shows a schematic diagram (left) and a representative photomicrograph (right) of the microinfusion sites within the mPFC of the mouse. Further, the mPFC can be subdivided into cingulate (Cg1), prelimbic (PrL), and infralimbic (IL) cortices (Paxinos and Franklin, 2001). Reaches outside these portions were excluded from the study.

Student's *t*-test indicated that mice treated with CoCl<sub>2</sub> (n= 9) reduced the open arm exploration compared to saline-treated animals (n= 10) [%entries ( $t_{(17)}= 1.93$ ;  $p=0.07$ ) and %time ( $t_{(17)}= 2.18$ ;  $p<0.05$ )] (**Fig. 5A**). No significant between-group differences were indicated in the number of closed arm entries ( $t_{(17)}= 0.48$ ;  $p>0.05$ ) (**Fig. 5B**).

For immunofluorescence assay analysis, data from the right mPFC of seven mice from CoCl<sub>2</sub> group and six animals from saline group were evaluated. Student's *t*-test indicated no significant between-group differences in the right **Cg1** for cFos ( $t_{(11)}= 1.061$ ;  $p > 0.05$ ), CaMKII ( $t_{(11)}= 0.97$ ;  $p>0.05$ ) and for cFos+CaMKII colocalization ( $t_{(11)}= -1.97$ ;  $p > 0.05$ ) (**Fig. 5D**). For **PrL** subregion, Student's *t*-test indicated that the injection of CoCl<sub>2</sub> in the left-PrL increased cFos ( $t_{(11)}= - 5.39$ ;  $p<0.05$ ), and cFos+CaMKII labeling in neurons of right PrL portion ( $t_{(11)}= - 6.32$ ;  $p < 0.05$ ). The analysis for CaMKII-positive neurons did not indicate significant differences between groups ( $t_{(11)} = -0.23$ ;  $p > 0.05$ ). (**Fig. 5F**). Finally, Student's *t*-test indicated that the injection of CoCl<sub>2</sub> into the left-**PrL** also increased cFos ( $t_{(11)}= - 4.06$ ;  $p<0.05$ ) and cFos+CaMKII ( $t_{(11)}= -7.63$ ;  $p<0.05$ ), without changing CaMKII ( $t_{(11)}= -1.10$ ;  $p>0.05$ ) labeling



in the IL portion of the RmPFC (**Fig. 5H**). Photomicrographs illustrating immunofluorescence slices of  $\Delta$ FosB, CaMKII, and  $\Delta$ FosB + CaMKII labeling are shown in **Fig. 5 (C, E and G)**.



**Figure 5.** Anxiogenesis induced by left PrL inhibition (with local injection of  $\text{CoCl}_2$ ) increases cFos and cFos + CaMKII labeling in the right PrL and IL (but not Cg1) subareas. **(A)** Effects of  $\text{CoCl}_2$  injection into the left-PrL on the percentage of open arm entries and percentage of open arm time, and **(B)** frequency of closed arm entries in the EPM of Saline (n=10) and  $\text{CoCl}_2$  (n=8) groups. Bars represent mean (+SEM). \* $p < 0.05$ . Representative 20X images showing cFos, CaMKII, and double-labeling for cFos (labeled in green) and CaMKII (labeled in red) on the right-Cg1 **(C)**, PrL **(E)**, and IL **(G)** (scale bar = 100  $\mu\text{m}$ ). Corrected total cell fluorescence (CTCF) for cFos, CaMKII, and cFos + CaMKII positive neurons in the right-Cg1 **(D)**, PrL **(F)**, and IL **(H)**. Saline (n=7) and  $\text{CoCl}_2$  (n=6). Bars represent mean (+SEM). \* $p < 0.05$ . Cg1, cingulate cortex, area 1; PrL, prelimbic cortex; IL, infralimbic cortex.

### 3.5.1 - Experiment 6: Blockade of NMDA receptor in the RmPFC impairs the anxiogenic-like effects produced by injection of CoCl<sub>2</sub> into the LmPFC: role of PrL (but not Cg1)

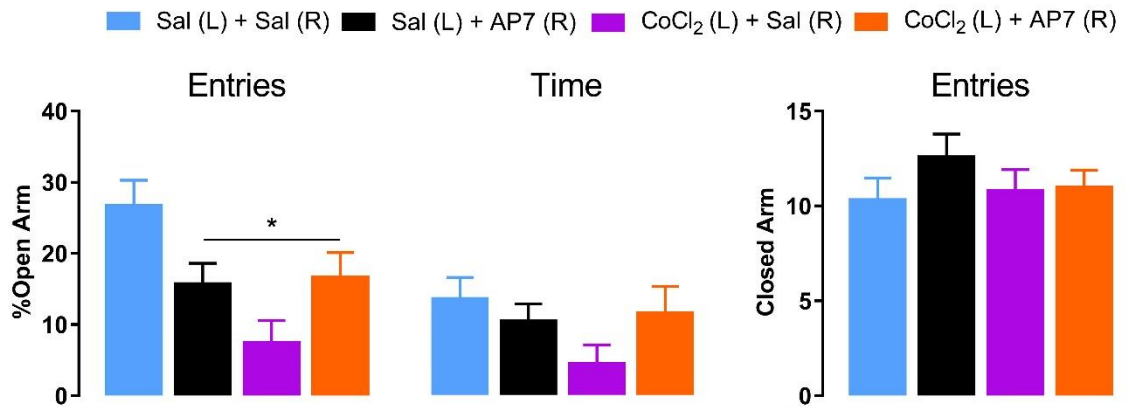
**Mixed Cg1 and PrL injections:** Figure 6A represents the effects of AP7 and CoCl<sub>2</sub> injected into the RmPFC and LmPFC, respectively, on the anxiety-like behavior of mice exposed to the EPM. Thus, in this scenario, data were analyzed considering both Cg1 and PrL subareas. A two-way ANOVA indicated significant changes in the percentage of open arm entries for LmPFC injection (saline or CoCl<sub>2</sub>) [ $F(1,56)= 7.99$ ;  $p < 0.05$ ] and for between factors interaction [ $F(1,56)=9.74$ ;  $p < 0.05$ ] but not for injection in the RmPFC (saline or AP7) [ $F(1,56)= 0.07$ ;  $p > 0.05$ ]. A post hoc analysis revealed a reduction of open arm entries of Sal+AP7, CoCl<sub>2</sub>+Sal and CoCl<sub>2</sub>+AP7 groups compared to Sal+Sal group. For percentage of open arm time, statistical analysis indicated no significant differences for LmPFC [ $F(1,56)= 1.87$ ;  $p > 0.05$ ] and RmPFC [ $F(1,56)= 0.46$ ;  $p > 0.05$ ] injections, and for between factors interaction [ $F(1,56)= 3.16$ ;  $p > 0.05$ ]. Two-way ANOVA did not indicate any main effect for all factors in the number of closed arm entries [drugs injected into the left side:  $F(1,56)= 0.26$ ;  $p > 0.05$ ; drugs injected into the right side:  $F(1,56)= 1.24$ ;  $p > 0.05$ ; drugs injected into the left x right side interactions:  $F(1,56)= 0.89$ ;  $p > 0.05$ ].

**Only injections into the Cg1:** Figure 6B represents the lack of effects of CoCl<sub>2</sub> (saline or CoCl<sub>2</sub>; factor 1) and AP7 (saline or AP7; factor 2) injected into the left Cg1 and right Cg1 subregion, respectively, on the anxiety-like behavior of mice exposed to the EPM. Two-way ANOVA indicated no significant changes in open-arm exploration [% Entries: factor 1  $F(1,23) = 1.51$ ;  $p > 0.05$ , factor 2  $F(1,23) = 1.14$ ;  $p > 0.05$ , and factor 1 x factor 2 factor interaction  $F(1,23) = 1.42$ ;  $p > 0.05$ ; %Time: factor 1  $F(1,23) = 0.32$ ;  $p > 0.05$ , factor 2  $F(1,23) = 1.03$ ;  $p >$

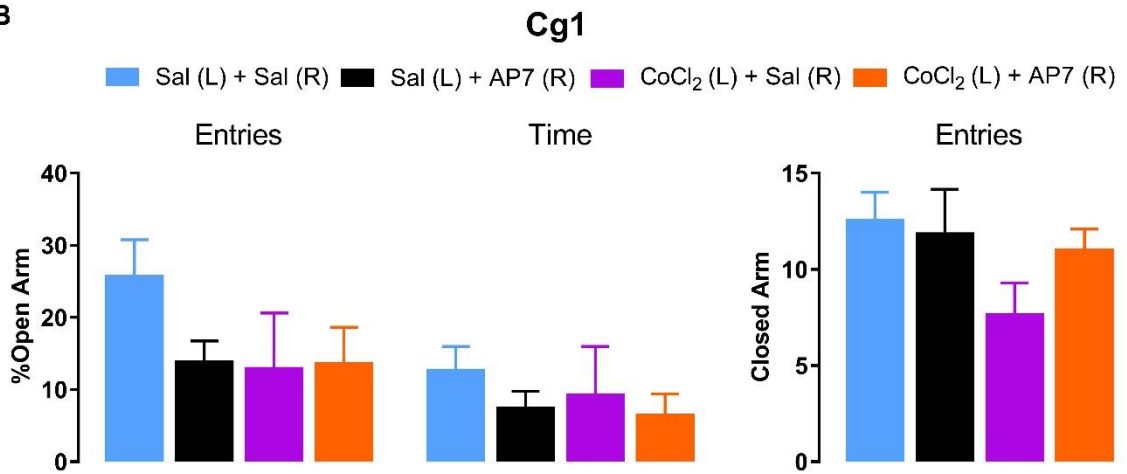
0.05; factor 1 x factor 2 interaction  $F(1,23) = 1.44$ ;  $p > 0.05$ ] and closed-arm entries [factor 1  $F(1,23) = 2.92$ ;  $p > 0.05$ , factor 2  $F(1,23) = 0.60$  ;  $p > 0.05$ , and factor 1 x factor 2 factor interaction  $F(1,23) = 1.44$ ;  $p > 0.05$ ].

**Only injections into the PrL:** Figure 6C represents the effects of  $\text{CoCl}_2$  (saline or  $\text{CoCl}_2$ ; factor 1) and AP7 (saline or AP7; factor 2) injected into the left PrL and right PrL subregion, respectively, on the anxiety-like behavior of mice exposed to the EPM. Two-way ANOVA indicated significant changes in the exploration of the open arms of mice treated with saline or  $\text{CoCl}_2$  into the left PrL and saline or AP7 into the right PrL [%Entries: factor 1:  $F(1,29) = 6.52$ ;  $p < 0.05$ ; factor 2:  $F(1,29) = 0.42$ ;  $p > 0.05$ ; factor 1 x factor 2 interaction  $F(1,29) = 9.72$ ;  $p < 0.05$ ; %Time: factor 1  $F(1,29) = 1.21$ ;  $p > 0.05$ , factor 2:  $F(1,29) = 2.79$ ;  $p > 0.05$ ; and factor 1 x factor 2 interaction:  $F(1,29) = 4.08$ ;  $p = 0.05$ ]. Post hoc test revealed that  $\text{CoCl}_2$  injection reduced both percentage of entries and percentage of time in open arms only in those animals that had received saline into the right PrL. In other words, the injection of AP7 into the right PrL subregion of the mPFC impaired the anxiogenic-like effects produced by the left PrL inhibition. Two-way ANOVA for frequency of closed-arm entries did not reveal significant effects for factor 1 [ $F(1,29) = 0.62$ ;  $p > 0.05$ ] and factor 2 [ $F(1,29) = 1.45$ ;  $p > 0.05$ ], but showed significant effects for factor 1 x factor 2 interaction [ $F(1,29) = 6.21$ ;  $p < 0.05$ ]. Post hoc test revealed that saline + AP7 and  $\text{CoCl}_2$  + saline explored more the closed arms than the saline + saline group.

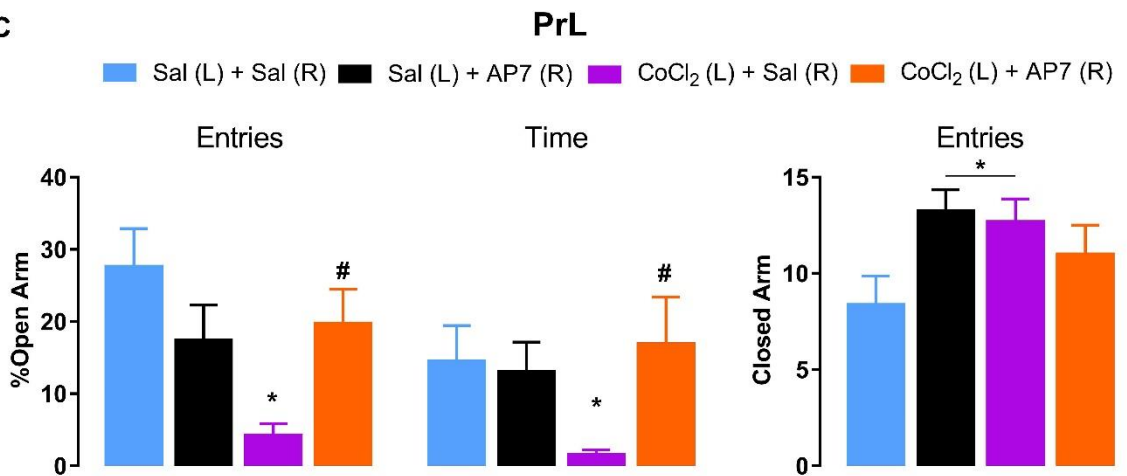
A



B



C



**Figure 6.** Effects of AP7 injected into the RmPFC [AP7 (R)] subsequently to CoCl<sub>2</sub> injection into the LmPFC [CoCl<sub>2</sub> (L)] on behavior of mice exposed to the EPM. **(A)** Grouped Cg1 and PrL analysis on the percentage of open arm entries and percentage of open arm time, and frequency of closed arm entries [Sal (L) + Sal (R) (n=20); Sal (L) + AP7 (R) (n=19); CoCl<sub>2</sub> (L) + Sal (R) (n=21); CoCl<sub>2</sub> (L) + AP7 (R) (n=15)]. **(B)** Cg1 analysis on the percentage of open arm entries and time, and frequency of closed arm entries [Sal (L) + Sal (R) (n=9); Sal (L) + AP7 (R) (n=7); CoCl<sub>2</sub> (L) + Sal (R) (n=6); CoCl<sub>2</sub> (L) + AP7 (R) (n=7)]. **(C)** PrL analysis of the percentage of open arm entries and percentage of open arm time, and frequency of closed arm entries [Sal (L) + Sal (R) (n=7); Sal (L) + AP7 (R) (n=8); CoCl<sub>2</sub> (L) + Sal (R) (n=10); CoCl<sub>2</sub> (L) + AP7 (R) (n=7)]. \*p < 0.05 compared to the Sal (L) + sal (R) group; #p < 0.05 compared to the CoCl<sub>2</sub> (L) + Sal (R) group. L, left; R, right; Sal, saline; Cg1, cingulate cortex, area 1; PrL, prelimbic cortex.

## Discussion

The behavioral results have demonstrated that chronic SDS increases defensive/anxiogenic-like behaviors in mice. In the social interaction test, chronic SDS induced social avoidance behavior. Furthermore, the results indicated that this protocol promoted an expressive decrease of open arms exploration in the EPM, suggesting the anxiogenic-like profile in stressed animals.

The SDS procedure was based on the protocol described by Golden and colleagues (2011), wherein the authors have demonstrated that 10 repeated agonist social confrontations provoke a decrease of the social interaction in the defeated animal. The results from the social interaction and EPM tests corroborate previous studies demonstrating the emotional-like consequence induced by SDS (Warren et al., 2013, 2014; Carnevali et al., 2020). It is important to highlight that these emotional chains of reactions can be attenuated by anxiolytics and antidepressant drugs (Santarelli et al., 2003; Surget et al., 2011; McAllister et al., 2020).

Previous findings have demonstrated the distinct modulation of the mPFC hemispheres in the sustained stress animal models (Sullivan and Gratton, 1999; Radley et al., 2006; Cerqueira et al., 2008). Specifically, Victoriano and colleagues (2020) showed that dorsal but not ventral mPFC plays an important role in the modulation of chronic SDS. Marked functional lateralization of the mPFC in the modulation of defensive-like responses induced by stress has been demonstrated by several investigators (Sullivan and Gratton, 1999; Radley et al., 2006; Cerqueira et al., 2008; Costa et al., 2016; Faria et al., 2020). Here, the immunofluorescence results demonstrated differential changes in the  $\Delta$ FosB expression (a sustained neuronal activity marker) (Perrotti et al., 2004; Nestler, 2013) and  $\Delta$ FosB/CaMKII (the downstream factor following NMDA receptor activation) double-labeling, depending on the mPFC subarea and



hemispheric side. For instance, in the Cg1 area, chronic SDS induced a bilateral rise in the  $\Delta$ FosB expression and  $\Delta$ FosB/CaMKII double labeling, whereas in the PrL stressed animals presented a *decrease* in the left and an *increase* in the right hemisphere of  $\Delta$ FosB. Similar lateralization was observed for  $\Delta$ FosB+CaMKII neurons wherein the increase was detected only on the right side. In the IL, chronic SDS promoted a higher  $\Delta$ FosB expression bilaterally, but the double labeling was accentuated only on the right side.

Interestingly, in naïve mice, the dorsal portions of mPFC (Cg1 and PrL) (Uylings et al., 2003) analyses pointed out a lower expression of  $\Delta$ FosB in the right hemisphere than in the left. These findings corroborate previous studies indicating that, in basal conditions, the left mPFC acts inhibiting tonically the right mPFC (Sullivan, 2004; Cerqueira et al., 2008). If so, present results suggest that this modulation could occur only in the Cg1 and PrL subareas. Furthermore, these reductions were not present in the CaMKII and double-labeled neurons located in the RmPFC, suggesting that the potential tonic inhibition exerted by the LmPFC over the RmPFC would not depend on the glutamatergic neurons.

On the other hand, in those cases where the immunofluorescence analyses were carried out specifically in the PrL, chronic SDS produced opposite effects on  $\Delta$ FosB expression in the left and right hemisphere, i.e., while a decrease of  $\Delta$ FosB labeling was observed in the left PrL, an increase of this neuronal marker was detected in the right PrL in SDS mice. This effect indicates that chronic SDS events lead to a loss of the tonic control of the left side over the right side, which in turn, becomes more active and recruits glutamatergic neurotransmission as shown by the increase of  $\Delta$ FosB + CaMKII double labeling in this hemisphere. Present results corroborate previous studies demonstrating the predominant role of the right mPFC on sustained SDS (Faria et al., 2020; Victoriano et al., 2020), and suggest that the right PrL (but not the Cg1 and IL) subarea is particularly sensitive to the reduction of the left PrL  $\Delta$ FosB

labeling induced by chronic SDS. In this context, previous studies have demonstrated that impairments in the neuronal excitability of mPFC provoked by chronic stress may cause morphological alteration in this area (Radley et al., 2004, 2006, 2008; Gilabert-Juan et al., 2013; McKlveen et al., 2016). Considering that the present results have mostly indicated that the increase of neuronal activity (i.e., raised  $\Delta$ FosB) was followed by the accentuation of  $\Delta$ FosB + CaMKII double labeling, we suggest that the glutamatergic neurons located in the mPFC play an important role in the modulation of the emotional consequences induced by chronic SDS.

Previous studies have demonstrated that the mPFC projects to several limbic areas (e.g., amygdala, hippocampus, hypothalamus, and BNST) that modulate emotional responses (Gabbott et al., 2005; Cerqueira et al., 2008; Kim and Cho, 2017; Ko, 2017; Giannotti et al., 2019). In addition, there is dense intracortical connectivity, indicating subregion integration (McKlveen et al., 2019). On this wise, Marek and colleagues (2018) have demonstrated, using retro-beads and Fos expression techniques, a unidirectional excitatory connection from the PrL to the IL on a fear extinction model. Although in that elegant study the authors did not specify or discuss their results concerning functional laterality, it is reasonable to suggest, considering the findings from our research group (Faria et al., 2020; Victoriano et al., 2020) and the results shown in the present study (Exp. 4), that the left PrL projects to the right side. If so, we suggest that the PrL neurons located in the left mPFC play a direct role in the right mPFC in the modulation of the defensive behavior provoked a stressful situation.

To investigate this functional lateralization of PrL we demonstrated that synaptic inactivation of the left PrL through local injection of  $\text{CoCl}_2$ , an unspecific synaptic inhibitor (Kretz, 1984), produces anxiogenesis (experiments 5 and 6), which is abolished when the NMDA receptors located in the right PrL are blocked with local injection of AP7 (experiment 6). Interestingly,  $\text{CoCl}_2$  injection into the left PrL also increases cFos + CaMKII double labeling

in the contralateral PrL and IL portions, suggesting that the anxiogenesis induced by the inhibition of the left PrL leads to glutamate NMDA receptor activation in the right PrL and IL subareas. These results suggest that the left PrL inactivation triggers glutamate releasing in the RmPFC, which, in turn, provokes anxiogenesis via NMDA receptors activation. Besides the anxiogenic-like effect, left PrL inhibition induces an increase in the cFos expression in neurons of the PrL and IL (but not in the Cg1) of the RmPFC. Taken together, these results show an important interaction between mPFC hemispheres in the modulation of anxiety, wherein the left activity seems to modulate the level of activation of the RmPFC, notably via NMDA glutamate receptors.

While the anxiogenic-like effect induced by intra-LmPFC injection of CoCl<sub>2</sub> had already been demonstrated in mice exposed to the EPM (Costa et al., 2016; Victoriano et al., 2020), the present work brings more accurate data regarding mPFC subareas. Here, we investigated the role of the Cg1 and PrL subregions separately, whereas Costa et al. (2016) considered the effects of CoCl<sub>2</sub> in both Cg1 and PrL subregions (dorsal mPFC). Furthermore, the grouped data (i.e., with CoCl<sub>2</sub> injections into both Cg1 and PrL; Fig. 6A) did not indicate a quite clear effect of the LmPFC chemical inhibition on the anxiety indices. However, when the data were analyzed separately, a clear anxiogenic-like effect was observed with CoCl<sub>2</sub> injection into the left PrL, but not into the Cg1, suggesting a marked role of this subarea in the modulation of anxiety. Interestingly, such an effect disappeared when the contralateral PrL received the NMDA receptor blocker AP7. In such conditions, these animals (CoCl<sub>2</sub> + AP7) explored the aversive area of the EPM similarly to those treated with saline (saline + saline or saline + AP7). It is important to notice that the used dose of AP7 (0.05 nmol) did not change *per se* the anxiety-like measures. Moreover, synaptic inhibition of the left PrL or NMDA blockade of the right PrL changed the frequency of closed arm entries, a widely used measure of general activity

(Cruz et al., 1994; Rodgers and Johnson, 1995). Although we do not have a clear explanation for this effect in the animals that received AP7, it is reasonable to suggest that the increase of closed arm exploration in left PrL inhibited animals may be causally related to the drop off in the open arms exploration provoked by CoCl<sub>2</sub> injection. Taken together, the present results indicate that mPFC subareas do not play a similar role in the modulation of the anxiety of mice exposed to the EPM. Thus, grouping mPFC subregions as one may lead to misinterpretation of an acquired data.

The mPFC is composed of 80-90% of glutamatergic neurons, which are under inhibitory regulation by interneurons, being most of them GABAergic neurons (Harris and Shepherd, 2015; McKlveen et al., 2015). Through an intricate pathway, the flow of local information within the mPFC (that is sent to subcortical structures afterward) is under a complex functional control. In this sense, Cerqueira et al. (2008) have postulated that, in basal conditions, the RmPFC would be under tonic inhibition from its left counterpart; and, after chronic stress situations, there would be a disruption on this control, notably by left dendritic arborization loss (Czéh et al., 2007) (leading to a reduction of the neuronal excitability and synaptic plasticity). The reduced function of the LmPFC would lead to augmented activity of the right side, facilitating hormonal stress response, through HPA (hypothalamic-pituitary-adrenal) axis stimulation. Also, in this scenario, mPFC-amygdala inhibition is decreased, whereas the BNST, as well as the sympathetic tonus, are increased (Cerqueira et al., 2008). Our results strengthen this view about the functional lateralization of the mPFC since chronic social defeat stress altered the pattern of  $\Delta$ FosB and  $\Delta$ FosB+CaMKII double-labeling expression according to the mPFC subarea. Moreover, the left-side inhibition increased the right-side activation, assessed through cFos+CaMKII protein investigation and NMDA receptor blockade. Thus, the attenuation of the left PrL inhibition-induced anxiogenesis produced by injection of AP7 into

the right PrL suggests that the NMDA glutamate receptor located in the RmPFC plays an important role in the mediation of anxiety responses.

Sanacora et al. (2012) suggested that various types of stress promote the release of glutamate in cortical and limbic areas in humans and animals, an effect that has been related to mood and anxiety disorders. Taken present results together, we suggest that left PrL inhibition leads to right PrL disinhibition, (i.e., activation), via NMDA receptor modulation. Thus, the left PrL would project to the RmPFC activating interneurons, which would inhibit PrL, preventing exacerbated responses to aversive stimuli. If so, when the left PrL is inactivated (e.g., through CoCl<sub>2</sub> injection) the following steps might occur: 1) right inhibitory interneurons of the mPFC lose their tonus, 2) glutamate releasing is increased in the RmPFC, and 3) NMDA receptor activation leads to an increase of Fos and CaMKII expression, and, as a consequence, mice exhibit anxiogenic-like behavior.

Finally, our study highlights that (i) the inhibition of left PrL might be used as the tool for inducing behavioral and functional alterations quite similar to those caused by chronic SDS, and (ii) the importance of not considering the functional role of the mPFC as a unitary structure, whether it is related to the dorsoventral division or even to the hemispheric location.

## 5. Conclusion

The present study demonstrates that (i) chronic SDS can induce defensive/anxiogenic-like behaviors and distinct neuronal activation/inhibition of the left and right mPFC subregions, and (ii) left mPFC chemical inhibition also induces anxiety, an effect that is strongest related to the PrL subarea of the mPFC of mice. These findings and the evidence showing that the left mPFC projects directly to the right mPFC suggest that the left PrL modulates the neuronal activity of the right PrL and IL, whose stimulation elicits anxiety in mice exposed to the EPM. The left mPFC seems to play a tonic role in the modulation of anxiety, since its functional inhibition, particularly in the PrL subarea, led mice to avoid the open arms of the EPM. Together, the pharmacological manipulation (injection of AP7) added to the immunofluorescence analyses (Fos + CaMKII double labeling) show the crucial role of the glutamatergic system (through NMDA receptors) in the right PrL and IL subareas in the mediation of anxiogenesis in male mice.

## **Acknowledgments**

This study was supported by São Paulo Research Foundation - FAPESP (Grant: 2017/25409-0). N. Santos-Costa (2016/24568-4) and L. Canto-de-Souza (2016/08665-0) were recipients of the FAPESP scholarship. D. Baptista-de-Souza was recipient of the CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES: 88887.194785/2018-00) scholarship. R. L. Nunes-de-Souza was recipient of CNPq research fellowship (306556/2015-4).

## References

- Alonso, J., Liu, Z., Evans-Lacko, S., Sadikova, E., Sampson, N., Chatterji, S., et al. (2018). Treatment gap for anxiety disorders is global: Results of the World Mental Health Surveys in 21 countries. *Depress. Anxiety*. doi:10.1002/da.22711.
- Ambalavanan, N., Mariani, G., Bulger, A., and Philips, III, J. B. (1999). Role of Nitric Oxide in Regulating Neonatal Porcine Pulmonary Artery Smooth Muscle Cell Proliferation. *Neonatology* 76, 291–300. doi:10.1159/000014171.
- Baptista-de-Souza, D., Tavares-Ferreira, D., Megat, S., Sankaranarayanan, I., Shiers, S., Flores, C. M., et al. (2020). Sex differences in the role of atypical PKC within the basolateral nucleus of the amygdala in a mouse hyperalgesic priming model. *Neurobiol. Pain* 8, 100049. doi:10.1016/j.ynpai.2020.100049.
- Björkqvist, K. (2001). Social defeat as a stressor in humans. *Physiol. Behav.* doi:10.1016/S0031-9384(01)00490-5.
- Blanchard, R. J., Nikulina, J. N., Sakai, R. R., McKittrick, C., McEwen, B., and Blanchard, D. C. (1998). Behavioral and endocrine change following chronic predatory stress. *Physiol. Behav.* doi:10.1016/S0031-9384(97)00508-8.
- Bolger, N., DeLongis, A., Kessler, R. C., and Schilling, E. A. (1989). Effects of Daily Stress on Negative Mood. *J. Pers. Soc. Psychol.* doi:10.1037/0022-3514.57.5.808.
- Brenhouse, H. C., and Stellar, J. R. (2006). c-Fos and  $\Delta$ FosB expression are differentially altered in distinct subregions of the nucleus accumbens shell in cocaine-sensitized rats. *Neuroscience* 137, 773–780. doi:10.1016/j.neuroscience.2005.09.039.
- Burgess, A., Vigneron, S., Brioude, E., Labbé, J.-C., Lorca, T., and Castro, A. (2010). Loss of



- human Greatwall results in G2 arrest and multiple mitotic defects due to deregulation of the cyclin B-Cdc2/PP2A balance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 12564–12569. doi:10.1073/pnas.0914191107.
- Carnevali, L., Montano, N., Tobaldini, E., Thayer, J. F., and Sgoifo, A. (2020). The contagion of social defeat stress: Insights from rodent studies. *Neurosci. Biobehav. Rev.* doi:10.1016/j.neubiorev.2020.01.011.
- Carvajal, F. J., Mattison, H. A., and Cerpa, W. (2016). Role of NMDA Receptor-Mediated Glutamatergic Signaling in Chronic and Acute Neuropathologies. *Neural Plast.* 2016, 1–20. doi:10.1155/2016/2701526.
- Cerqueira, J. J., Almeida, O. F. X., and Sousa, N. (2008). The stressed prefrontal cortex. Left? Right! *Brain. Behav. Immun.* 22, 630–8. doi:10.1016/j.bbi.2008.01.005.
- Charlson, F., van Ommeren, M., Flaxman, A., Cornett, J., Whiteford, H., and Saxena, S. (2019). New WHO prevalence estimates of mental disorders in conflict settings: a systematic review and meta-analysis. *Lancet.* doi:10.1016/S0140-6736(19)30934-1.
- Cooper, M. A., Clinard, C. T., and Morrison, K. E. (2015). Neurobiological mechanisms supporting experience-dependent resistance to social stress. *Neuroscience.* doi:10.1016/j.neuroscience.2015.01.072.
- Costa, N. S., Vicente, M. A., Cipriano, A. C., Miguel, T. T., and Nunes-de-Souza, R. L. (2016). Functional lateralization of the medial prefrontal cortex in the modulation of anxiety in mice: Left or right? *Neuropharmacology* 108, 82–90. doi:10.1016/j.neuropharm.2016.04.011.
- Cruz, A. P., Frei, F., and Graeff, F. G. (1994). Ethopharmacological analysis of rat behavior on

- the elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 49, 171–6. doi:10.1016/0091-3057(94)90472-3.
- Cruz, F. C., Javier Rubio, F., and Hope, B. T. (2015). Using c-fos to study neuronal ensembles in corticostriatal circuitry of addiction. *Brain Res.* 1628, 157–173. doi:10.1016/j.brainres.2014.11.005.
- Czéh, B., Müller-Keuker, J. I. H., Rygula, R., Abumaria, N., Hiemke, C., Domenici, E., et al. (2007). Chronic Social Stress Inhibits Cell Proliferation in the Adult Medial Prefrontal Cortex: Hemispheric Asymmetry and Reversal by Fluoxetine Treatment. *Neuropsychopharmacology* 32, 1490–1503. doi:10.1038/sj.npp.1301275.
- De Koninck, P., and Schulman, H. (1998). Sensitivity of CaM Kinase II to the Frequency of Ca<sup>2+</sup> Oscillations. *Science (80-. )*. 279, 227–230. doi:10.1126/science.279.5348.227.
- Del Carlo, M., and Loeser, R. F. (2002). Nitric oxide-mediated chondrocyte cell death requires the generation of additional reactive oxygen species. *Arthritis Rheum.* 46, 394–403. doi:10.1002/art.10056.
- Diorio, D., Viau, V., and Meaney, M. J. (1993). The role of the medial prefrontal cortex (cingulate gyrus) in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *J. Neurosci.* doi:10.1523/jneurosci.13-09-03839.1993.
- Duncan, G. E., Knapp, D. J., and Breese, G. R. (1996). Neuroanatomical characterization of Fos induction in rat behavioral models of anxiety. *Brain Res.* 713, 79–91. doi:10.1016/0006-8993(95)01486-1.
- Faria, M. P., Laverde, C. F., and Nunes-de-Souza, R. L. (2020). Anxiogenesis induced by social defeat in male mice: Role of nitric oxide, NMDA, and CRF1 receptors in the medial

prefrontal cortex and BNST. *Neuropharmacology*.  
doi:10.1016/j.neuropharm.2020.107973.

Faria, M. P., Miguel, T. T., Gomes, K. S., and Nunes-de-Souza, R. L. (2016). Anxiety-like responses induced by nitric oxide within the BNST in mice: Role of CRF1 and NMDA receptors. *Horm. Behav.* 79, 74–83. doi:10.1016/j.yhbeh.2016.01.002.

Gabbott, P. L. A., Warner, T. A., Jays, P. R. L., Salway, P., and Busby, S. J. (2005). Prefrontal cortex in the rat: Projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. *J. Comp. Neurol.* doi:10.1002/cne.20738.

Giannotti, G., Heinsbroek, J. A., Yue, A. J., Deisseroth, K., and Peters, J. (2019). Prefrontal cortex neuronal ensembles encoding fear drive fear expression during long-term memory retrieval. *Sci. Rep.* doi:10.1038/s41598-019-47095-7.

Gilabert-Juan, J., Castillo-Gomez, E., Guirado, R., Moltó, M. D., and Nacher, J. (2013). Chronic stress alters inhibitory networks in the medial prefrontal cortex of adult mice. *Brain Struct. Funct.* doi:10.1007/s00429-012-0479-1.

Golden, S. A., Covington, H. E., Berton, O., and Russo, S. J. (2011). A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice. *Nat. Protoc.* doi:10.1038/nprot.2011.361.

Gonzalez, L. E., Rujano, M., Tucci, S., Paredes, D., Silva, E., Alba, G., et al. (2000). Medial prefrontal transection enhances social interaction. *Brain Res.* 887, 7–15. doi:10.1016/S0006-8993(00)02931-0.

Hammels, C., Pishva, E., De Vry, J., van den Hove, D. L. A., Prickaerts, J., van Winkel, R., et al. (2015). Defeat stress in rodents: From behavior to molecules. *Neurosci. Biobehav. Rev.* doi:10.1016/j.neubiorev.2015.10.006.

- Harris, K. D., and Shepherd, G. M. G. (2015). The neocortical circuit: themes and variations. *Nat. Neurosci.* 18, 170–181. doi:10.1038/nn.3917.
- Holmes, A., and Wellman, C. L. (2009). Stress-induced prefrontal reorganization and executive dysfunction in rodents. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 33, 773–783. doi:10.1016/j.neubiorev.2008.11.005.
- Jaferi, A., and Bhatnagar, S. (2007). Corticotropin-releasing hormone receptors in the medial prefrontal cortex regulate hypothalamic–pituitary–adrenal activity and anxiety-related behavior regardless of prior stress experience. *Brain Res.* 1186, 212–223. doi:10.1016/j.brainres.2007.07.100.
- Keeney, A. J., and Hogg, S. (1999). Behavioural consequences of repeated social defeat in the mouse: Preliminary evaluation of a potential animal model of depression. *Behav. Pharmacol.* doi:10.1097/00008877-199912000-00007.
- Kim, W. Bin, and Cho, J. H. (2017). Synaptic targeting of double-projecting ventral CA1 hippocampal neurons to the medial prefrontal cortex and basal amygdala. *J. Neurosci.* doi:10.1523/JNEUROSCI.3579-16.2017.
- Ko, J. (2017). Neuroanatomical substrates of rodent social behavior: The medial prefrontal cortex and its projection patterns. *Front. Neural Circuits.* doi:10.3389/fncir.2017.00041.
- Kretz, R. (1984). Local cobalt injection: a method to discriminate presynaptic axonal from postsynaptic neuronal activity. *J. Neurosci. Methods.* doi:10.1016/0165-0270(84)90030-X.
- Lacroix, L., Spinelli, S., Heidbreder, C. A., and Feldon, J. (2000). Differential role of the medial and lateral prefrontal cortices in fear and anxiety. *Behav. Neurosci.* 114, 1119–1130.

doi:10.1037/0735-7044.114.6.1119.

- Lee, E., Hong, J., Park, Y.-G., Chae, S., Kim, Y., and Kim, D. (2015). Left brain cortical activity modulates stress effects on social behavior. *Sci. Rep.* 5, 13342. doi:10.1038/srep13342.
- Linden, A.-M., Baez, M., Bergeron, M., and Schoepp, D. . (2003). Increased c-Fos expression in the centromedial nucleus of the thalamus in metabotropic glutamate 8 receptor knockout mice following the elevated plus maze test. *Neuroscience* 121, 167–178. doi:10.1016/S0306-4522(03)00393-2.
- Lisboa, S. F., Stecchini, M. F., Corrêa, F. M. A., Guimarães, F. S., and Resstel, L. B. M. (2010). Different role of the ventral medial prefrontal cortex on modulation of innate and associative learned fear. *Neuroscience* 171, 760–768. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.09.048.
- Lomber, S. G. (1999). The advantages and limitations of permanent or reversible deactivation techniques in the assessment of neural function. *J. Neurosci. Methods* 86, 109–117. doi:10.1016/S0165-0270(98)00160-5.
- Marek, R., Xu, L., Sullivan, R. K. P., and Sah, P. (2018). Excitatory connections between the prelimbic and infralimbic medial prefrontal cortex show a role for the prelimbic cortex in fear extinction. *Nat. Neurosci.* 21, 654–658. doi:10.1038/s41593-018-0137-x.
- McAllister, B. B., Pochakom, A., Fu, S., and Dyck, R. H. (2020). Effects of social defeat stress and fluoxetine treatment on neurogenesis and behavior in mice that lack zinc transporter 3 (ZnT3) and vesicular zinc. *Hippocampus*. doi:10.1002/hipo.23185.
- McCloy, R. A., Rogers, S., Caldon, C. E., Lorca, T., Castro, A., and Burgess, A. (2014). Partial inhibition of Cdk1 in G2 phase overrides the SAC and decouples mitotic events. *Cell*

*Cycle*. doi:10.4161/cc.28401.

- McKlveen, J. M., Moloney, R. D., Scheimann, J. R., Myers, B., and Herman, J. P. (2019). “Braking” the Prefrontal Cortex: The Role of Glucocorticoids and Interneurons in Stress Adaptation and Pathology. *Biol. Psychiatry* 86, 669–681. doi:10.1016/j.biopsych.2019.04.032.
- McKlveen, J. M., Morano, R. L., Fitzgerald, M., Zoubovsky, S., Cassella, S. N., Scheimann, J. R., et al. (2016). Chronic Stress Increases Prefrontal Inhibition: A Mechanism for Stress-Induced Prefrontal Dysfunction. *Biol. Psychiatry*. doi:10.1016/j.biopsych.2016.03.2101.
- McKlveen, J. M., Myers, B., and Herman, J. P. (2015). The Medial Prefrontal Cortex: Coordinator of Autonomic, Neuroendocrine and Behavioural Responses to Stress. *J. Neuroendocrinol.* 27, 446–456. doi:10.1111/jne.12272.
- McNaughton, N., and Corr, P. J. (2004). A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 28, 285–305. doi:10.1016/j.neubiorev.2004.03.005.
- Miczek, K. A., Thompson, M. L., and Shuster, L. (1982). Opioid-like analgesia in defeated mice. *Science (80- )*. doi:10.1126/science.7199758.
- Morgan, J. I., and Curran, T. (1991). Proto-oncogene transcription factors and epilepsy. *Trends Pharmacol. Sci.* 12, 343–349. doi:10.1016/0165-6147(91)90594-I.
- Myin-Germeys, I., Peeters, F., Havermans, R., Nicolson, N. A., DeVries, M. W., Delespaul, P., et al. (2003). Emotional reactivity to daily life stress in psychosis and affective disorder: An experience sampling study. *Acta Psychiatr. Scand.* doi:10.1034/j.1600-0447.2003.02025.x.

- Nestler, E. J. (2013).  $\Delta$ FosB: a Molecular Switch for Reward. *J. Drug Alcohol Res.* doi:10.4303/jdar/235651.
- Nezlek, J. B., and Plesko, R. M. (2001). Day-to-day relationships among self-concept clarity, self-esteem, daily events, and mood. *Personal. Soc. Psychol. Bull.* doi:10.1177/0146167201272006.
- Pati, S., Sood, A., Mukhopadhyay, S., and Vaidya, V. A. (2018). Acute pharmacogenetic activation of medial prefrontal cortex excitatory neurons regulates anxiety-like behaviour. *J. Biosci.* 43, 85–95. doi:10.1007/s12038-018-9732-y.
- Paxinos, G., and Franklin, K. B. J. (2001). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, 2nd edition. *Acad. Press.*
- Perrotti, L. I., Hadeishi, Y., Ulery, P. G., Barrot, M., Monteggia, L., Duman, R. S., et al. (2004). Induction of  $\Delta$ FosB in reward-related brain structures after chronic stress. *J. Neurosci.* doi:10.1523/JNEUROSCI.2542-04.2004.
- Radley, J. J., Arias, C. M., and Sawchenko, P. E. (2006). Regional differentiation of the medial prefrontal cortex in regulating adaptive responses to acute emotional stress. *J. Neurosci.* doi:10.1523/JNEUROSCI.4297-06.2006.
- Radley, J. J., Rocher, A. B., Rodriguez, A., Ehlenberger, D. B., Dammann, M., McEwen, B. S., et al. (2008). Repeated stress alters dendritic spine morphology in the rat medial prefrontal cortex. *J. Comp. Neurol.* doi:10.1002/cne.21588.
- Radley, J. J., Sisti, H. M., Hao, J., Rocher, A. B., McCall, T., Hof, P. R., et al. (2004). Chronic behavioral stress induces apical dendritic reorganization in pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex. *Neuroscience.* doi:10.1016/j.neuroscience.2004.01.006.

- Reiner, A., Veenman, C. L., Medina, L., Jiao, Y., Del Mar, N., and Honig, M. G. (2000). Pathway tracing using biotinylated dextran amines. *J. Neurosci. Methods*. doi:10.1016/S0165-0270(00)00293-4.
- Resstel, L. B. M., Corrêa, F. M. de A., and Guimarães, F. S. (2008). The expression of contextual fear conditioning involves activation of an NMDA receptor-nitric oxide pathway in the medial prefrontal cortex. *Cereb. Cortex* 18, 2027–35. doi:10.1093/cercor/bhm232.
- Rodgers, R. J., and Cole, J. C. (1993). Anxiety enhancement in the murine elevated plus maze by immediate prior exposure to social stressors. *Physiol. Behav.* doi:10.1016/0031-9384(93)90222-2.
- Rodgers, R. J., and Johnson, N. J. (1995). Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 52, 297–303. doi:10.1016/0091-3057(95)00138-m.
- Saitoh, A., Ohashi, M., Suzuki, S., Tsukagoshi, M., Sugiyama, A., Yamada, M., et al. (2014). Activation of the prelimbic medial prefrontal cortex induces anxiety-like behaviors via N-Methyl-D-aspartate receptor-mediated glutamatergic neurotransmission in mice. *J. Neurosci. Res.* 92, 1044–53. doi:10.1002/jnr.23391.
- Sanacora, G., Treccani, G., and Popoli, M. (2012). Towards a glutamate hypothesis of depression: an emerging frontier of neuropsychopharmacology for mood disorders. *Neuropharmacology* 62, 63–77. doi:10.1016/j.neuropharm.2011.07.036.
- Sanhueza, M., Fernandez-Villalobos, G., Stein, I. S., Kasumova, G., Zhang, P., Bayer, K. U., et al. (2011). Role of the CaMKII/NMDA receptor complex in the maintenance of synaptic



- strength. *J. Neurosci.* 31, 9170–8. doi:10.1523/JNEUROSCI.1250-11.2011.
- Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., Surget, A., Battaglia, F., Dulawa, S., et al. (2003). Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* (80-. ). doi:10.1126/science.1083328.
- Seccia, M., Perugini, C., Albano, E., and Bellomo, G. (1996). Inhibition of Cu<sup>2+</sup>-Induced LDL Oxidation by Nitric Oxide: A Study Using Donors with Different Half-Time of NO Release. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 220, 306–309. doi:10.1006/bbrc.1996.0401.
- Shah, A. A., and Treit, D. (2003). Excitotoxic lesions of the medial prefrontal cortex attenuate fear responses in the elevated-plus maze, social interaction and shock probe burying tests. *Brain Res.* 969, 183–194. doi:10.1016/S0006-8993(03)02299-6.
- Sorregotti, T., Cipriano, A. C., Cruz, F. C., Mascarenhas, D. C., Rodgers, R. J., and Nunes-de-Souza, R. L. (2018). Amygdaloid involvement in the defensive behavior of mice exposed to the open elevated plus-maze. *Behav. Brain Res.* 338, 159–165. doi:10.1016/j.bbr.2017.10.022.
- Stern, C. A. J., Do Monte, F. H. M., Gazarini, L., Carobrez, A. P., and Bertoglio, L. J. (2010). Activity in prelimbic cortex is required for adjusting the anxiety response level during the elevated plus-maze retest. *Neuroscience* 170, 214–222. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.06.080.
- Sullivan, R. M. (2004). Hemispheric asymmetry in stress processing in rat prefrontal cortex and the role of mesocortical dopamine. *Stress.* doi:10.1080/102538900410001679310.
- Sullivan, R. M., and Gratton, A. (1999). Lateralized effects of medial prefrontal cortex lesions on neuroendocrine and autonomic stress responses in rats. *J. Neurosci.* 19, 2834–40.

doi:10.1523/JNEUROSCI.19-07-02834.1999.

Sullivan, R. M., and Gratton, A. (2002). Behavioral effects of excitotoxic lesions of ventral medial prefrontal cortex in the rat are hemisphere-dependent. *Brain Res.* 927, 69–79. doi:10.1016/S0006-8993(01)03328-5.

Surget, A., Tanti, A., Leonardo, E. D., Laugeray, A., Rainer, Q., Touma, C., et al. (2011). Antidepressants recruit new neurons to improve stress response regulation. *Mol. Psychiatry.* doi:10.1038/mp.2011.48.

Suzuki, S., Saitoh, A., Ohashi, M., Yamada, M., Oka, J.-I., and Yamada, M. (2016). The infralimbic and prelimbic medial prefrontal cortices have differential functions in the expression of anxiety-like behaviors in mice. *Behav. Brain Res.* 304, 120–4. doi:10.1016/j.bbr.2016.01.044.

Tejada, J., Chaim, K. T., and Morato, S. (2018). X-PloRat: A Software for Scoring Animal Behavior in Enclosed Spaces. *Psicol. Teor. e Pesqui.* 33. doi:10.1590/0102.3772e3322.

Uylings, H. B. M., Groenewegen, H. J., and Kolb, B. (2003). Do rats have a prefrontal cortex? *Behav. Brain Res.* doi:10.1016/j.bbr.2003.09.028.

Vercelli, A., Repici, M., Garbossa, D., and Grimaldi, A. (2000). Recent techniques for tracing pathways in the central nervous system of developing and adult mammals. *Brain Res. Bull.* doi:10.1016/S0361-9230(99)00229-4.

Vertes, R. P. (2004). Differential Projections of the Infralimbic and Prelimbic Cortex in the Rat. *Synapse.* doi:10.1002/syn.10279.

Victoriano, G., Santos-Costa, N., Mascarenhas, D. C., and Nunes-de-Souza, R. L. (2020). Inhibition of the left medial prefrontal cortex (mPFC) prolongs the social defeat-induced

anxiogenesis in mice: Attenuation by NMDA receptor blockade in the right mPFC. *Behav. Brain Res.* 378, 112312. doi:10.1016/j.bbr.2019.112312.

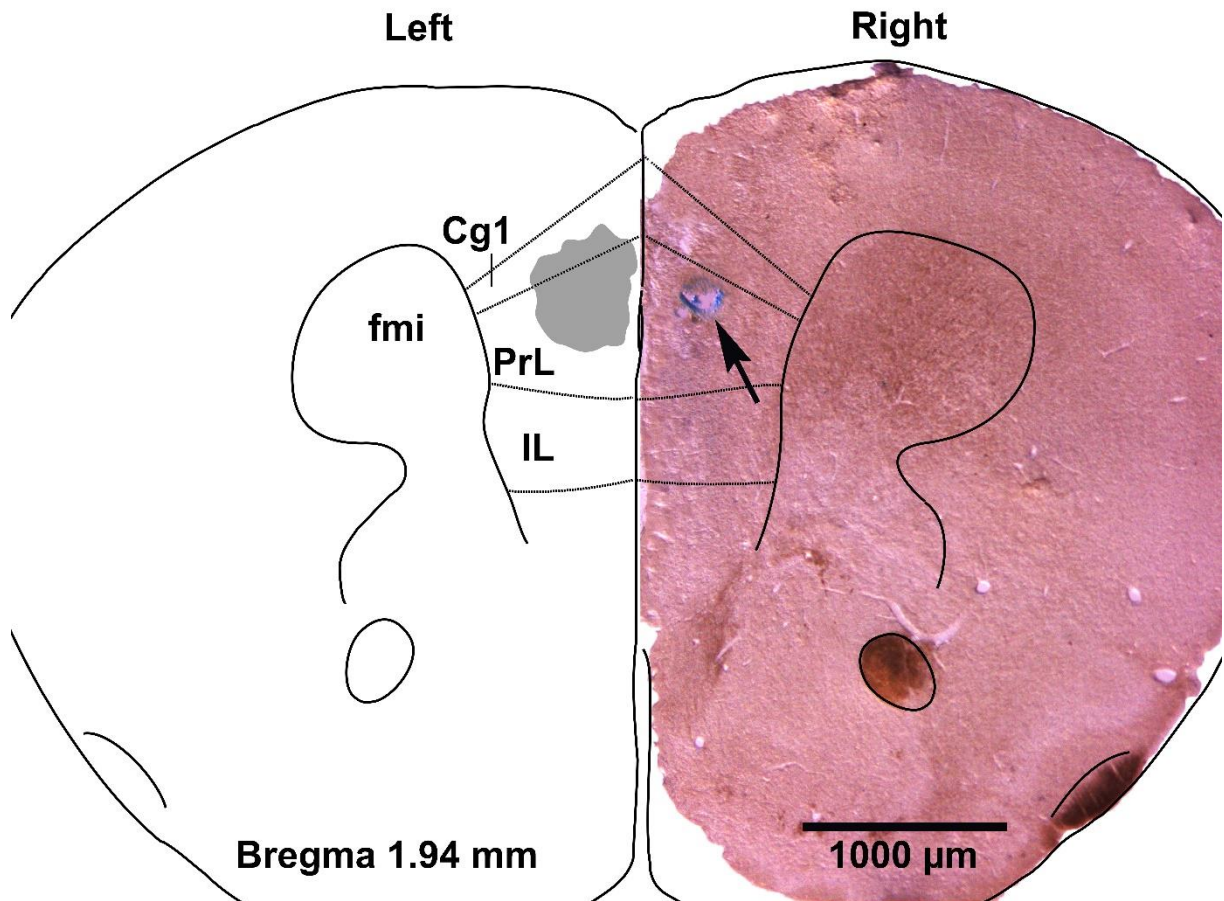
Warren, B. L., Sial, O. K., Alcantara, L. F., Greenwood, M. A., Brewer, J. S., Rozofsky, J. P., et al. (2014). Altered gene expression and spine density in nucleus accumbens of adolescent and adult male mice exposed to emotional and physical stress. *Dev. Neurosci.* doi:10.1159/000362875.

Warren, B. L., Vialou, V. F., Iñiguez, S. D., Alcantara, L. F., Wright, K. N., Feng, J., et al. (2013). Neurobiological sequelae of witnessing stressful events in adult mice. *Biol. Psychiatry*. doi:10.1016/j.biopsych.2012.06.006.

Weele, C. M. Vander, Siciliano, C. A., and Tye, K. M. (2019). Dopamine tunes prefrontal outputs to orchestrate aversive processing. *Brain Res.* 1713, 16–31. doi:10.1016/j.brainres.2018.11.044.

World Health Organisation (2017). Depression and other common mental disorders: global health estimates. *World Heal. Organ.*

## Supplementary Material



**Figure 1.** Schematic diagram (left) and a photomicrograph (right) of a representative microinfusion site (shadow area or black arrow) within the mPFC of the mouse. Section corresponds to 1.94 mm anterior to bregma (Paxinos and Franklin, 2001). Abbreviations: Cg1, cingulate cortex, area 1; PrL, prelimbic cortex; IL, infralimbic cortex; fmi, forceps minor of the corpus callosum.

# REFERÊNCIAS

ANACKER, C. et al. Neuroanatomic Differences Associated with Stress Susceptibility and Resilience. **Biological Psychiatry**, v. 79, n. 10, p. 840–849, 2016.

ANDRADE, L. H. et al. Mental disorders in megacities: Findings from the São Paulo megacity mental health survey, Brazil. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, 2012.

BECHARA, A.; DAMASIO, H., Decision-making and addiction (part 1): impaired activation of somatic states in substance dependent individuals when pondering decisions with negative future consequences. **Neuropsychologia**, v. 40, n. 10, p. 1675-1689, 2002.

BEKRIS, S. et al. Behavioural and neurochemical effects induced by chronic mild stress applied to two different rat strains. **Behavioural Brain Research**, v. 161, n. 1, p. 45–59, 2005.

BELLEAU, E. L.; TREADWAY, M. T.; PIZZAGALLI, D. A. The Impact of Stress and Major Depressive Disorder on Hippocampal and Medial Prefrontal Cortex Morphology. **Biological Psychiatry**, v. 85, n. 6, p. 443–453, 2019.

BLANCO, C. et al. The evidence-based pharmacotherapy of social anxiety disorder. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 16, n. 1, p. 235–249, 2013.

BONADIMAN, C. S. C. et al. A carga dos transtornos mentais e decorrentes do uso de substâncias psicoativas no Brasil: Estudo de Carga Global de Doença, 1990 e 2015. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 20, n. suppl 1, p. 191–204, 2017.

BRANDT, H. M.; APKARIAN, A. V. Biotin-dextran: a sensitive anterograde tracer for neuroanatomic studies in rat and monkey. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 45, n. 1–2, p. 35–40, 1992.

BERTON, O. et al. Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. **Science**, v. 311, n. 5762, p. 864–8, 2006.

BROWNE, C. A. et al. Reversal of Stress-Induced Social Interaction Deficits by Buprenorphine. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 00, n. October, p. 1–11, 2017.

BURES, J.; HUSTON, J. P. Physiological Psychology Research. In: BURES, J.; BURESOVÁ, O.; HUSTON, J. (Ed.). **Techniques and basic experiments for the study of brain and behavior**. 2<sup>nd</sup> ed. Amsterdam: Elsevier, p. 1-73, 1983

CEPEDA, M. S. et al. Finding treatment-resistant depression in real-world data: How a data-driven approach compares with expert-based heuristics. **Depression and Anxiety**, v. 35, n. 3, p. 220–228, 2018.

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.; SOUSA, N., The stressed prefrontal cortex. Left? Right! **Brain Behavioural Immunity**, v. 22, n. 5, p. 630-638, 2008.

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.

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.

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

COVINGTON, H. E. et al. Brief social defeat stress: Long lasting effects on cocaine taking during a binge and zif268 mRNA expression in the amygdala and prefrontal cortex. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, n. 2, p. 310–321, 2005.

COVINGTON, H. E. et al. Antidepressant Effect of Optogenetic Stimulation of the Medial Prefrontal Cortex. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 48, p. 16082–16090, 2010.

CROTEAU, J. D.; SCHULKIN, J.; SHEPARD, J. D. Behavioral Effects of Chronically Elevated Corticosterone in Subregions of the Medial Prefrontal Cortex. **Behavioural Brain Research**, v. 316, p. 82-86, 2017.

CRYAN, J. F.; PAGE, M. E.; LUCKI, I. Differential behavioral effects of the antidepressants reboxetine, fluoxetine, and moclobemide in a modified forced swim test following chronic treatment, **Psychopharmacology**, v. 182, p. 335–344, 2005

CZECH, 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, p. 1490-1503, 2007.

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

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

DEACON, R.M.; PENNY, C.; RAWLINS, J.N.P. Effects of medial prefrontal cortex cytotoxic lesions in mice. **Behavioural Brain Research**, v.139, n. 1-2, p.139-155, 2003.

DEL GIUDICE, M., ELLIS, B.J., SHIRTCLIFF, E.A. The Adaptive Calibration Model of stress responsivity. **Neurosci. Biobehav. Rev.** 35, 1562–1592, 2011.

DE KLOET, E.R., JOËLS, M.; HOLSBOER, F. Stress and the brain: from adaptation to disease. **Nature neuroscience**, v.6, p.463-475, 2005.



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

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. 1057-1070, 2012.

FARIA, M.P.; LAVERDE, C.F.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Anxiogenesis Induced by Social Defeat in Male Mice: Role of Nitric Oxide, NMDA, and CRF 1 Receptors in the Medial Prefrontal Cortex and BNST. **Neuropharmacology**, doi: 10.1016/j.neuropharm.2020.107973. |

FOX, M. E. et al. Dendritic spine density is increased on nucleus accumbens D2 neurons after chronic social defeat. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 12393, 2020.

FRANKLIN, TAMARA B. *et al.* Neural Mechanisms of Stress Resilience and Vulnerability. **Neuron**, v. 75, Issue 5, 747 – 761, 2012.

FRANKLIN, T.B. et al. Prefrontal cortical control of a brainstem social behavior circuit. **Nature Neuroscience**, v. 20, n. 2, p. 260-270, 2017.

GOLD, A. L.; MOREY, R. A.; MCCARTHY, G., Amygdala-prefrontal cortex functional connectivity during threat-induced anxiety and goal distraction. **Biological Psychiatry**, v. 77, n. 4, p. 394-403, 2015.

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

GRUBER, A. J. *et al.* More is less: a disinhibited prefrontal cortex impairs cognitive flexibility. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 50, p. 17102-17110, 2010.

HALARIS, A.; SOHL, E.; WHITHAM, E. A. Treatment-resistant depression revisited: A glimmer of hope. **Journal of Personalized Medicine**, v. 11, n. 2, p. 1–28, 2021.

HEEB, M. M.; YARH, P. Cell-body lesions of the posterodorsal preoptic nucleus or posterodorsal medial amygdala, but not the parvicellular subparafascicular thalamus, disrupt mating in male gerbils. **Physiology and Behavior**, New York, v. 68, n. 3, p. 317-331, 2000.

HEINRICHS, S. C.; KOOB, G.F. Application of experimental stressor in laboratory rodents: basic protocol 6:resident/intruder stressor. In: **Current protocols in neuroscience**, 2006. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471142301.ns0804s34/full>

HEUKELUM, S. VAN et al. Where is Cingulate Cortex? A Cross-Species View. **Trends in Neurosciences**, v. 43, n. 5, p. 285–299, 2020.

JAMES, S. L. et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 Diseases and Injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **The Lancet**, v. 392, n. 10159, p. 1789–1858, 2018.

JETT, J. D. et al. Deficits in cognitive flexibility induced by chronic unpredictable stress are associated with impaired glutamate neurotransmission in the rat medial prefrontal cortex. **Neuroscience**, v. 346, p. 284–297, 2017.

JOHNSTONE *et al.* Top-Down Prefrontal-Subcortical Circuitry in Depression. **Journal of Neuroscience.**, v. 27, n. 33, p.8877–8884, 2007.

KOHLER, C.; SCHWARCZ, R. Comparision of ibotenate and kainite neurotoxicity in rat brain: a histological study. **Neuroscience**, Oxford, v. 8, n. 4, p. 819-835, 1983. apud AVANZI DE LIMA, 2002 apud AVANZI DE LIMA, V. **O núcleo mediano da rafe no medo condicionado: aspectos comportamentais, autonômicos e motores**, 2002. P. 93. Tese (doutorado em Ciências), Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo,

Ribeirão Preto, 2002. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/59/59134/tde-30032003-114936/>

KRISHNAN, V. Defeating the fear: New insights into the neurobiology of stress susceptibility. **Experimental Neurology**, v. 261, p. 412–416, 2014.

LAINE, M. A. et al. Brain activation induced by chronic psychosocial stress in mice. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 15061, 2017.

LANCIEGO, J. L.; WOUTERLOOD, F. G. **Neuroanatomical tract-tracing techniques that did go viral**. [s.l.] Springer Berlin Heidelberg, 2020. v. 225

LAUBACH, M. et al. What, If Anything, Is Rodent Prefrontal Cortex? **eneuro**, v. 5, n. 5, p. ENEURO.0315-18.2018, 2018.

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

LEHMANN, M. L. et al. Chronic social defeat reduces myelination in the mouse medial prefrontal cortex. **Scientific Reports**, v. 7, n. March, p. 1–13, 2017.

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

LISTON, C. et al. Stress-Induced Alterations in Prefrontal Cortical Dendritic Morphology Predict Selective Impairments in Perceptual Attentional Set-Shifting. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 30, p. 7870–7874, 2006.

MACEDO, G. C. DE et al. Consequences of continuous social defeat stress on anxiety- and depressive-like behaviors and ethanol reward in mice. **Hormones and behavior**, v. 97, n. April 2017, p. 154–161, 2017.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Stereological tools in biomedical research. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 74, n. 4, p. 469-486, 2003

MAYBERG, H. S. Targeted electrode-based modulation of neural circuits for depression. *Journal of Clinical Investigation*, v. 119, n. 4, p. 717–725, 2009.

MCEWEN, B. S. Brain on stress: How the social environment gets under the skin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 109, n. Supplement\_2, p. 17180–17185, 2012.

MCEWEN, B. S.; AKIL, H. Revisiting the Stress Concept: Implications for Affective Disorders. *The Journal of Neuroscience*, v. 40, n. 1, p. 12–21, 2020.

MCKLVEEN, J. M., MYERS, B., HERMAN, J. P. The Medial Prefrontal Cortex: Coordinator of Autonomic, Neuroendocrine and Behavioural Responses to Stress *Journal of Neuroendocrinology*, v. 27, p. 446–456, 2015.

McNAUGHTON, N.; CORR, P. A Two-Dimensional Neuropsychology of Defense: fear/anxiety and Defensive Distance. *Neuroscience and Biobehavioral Review*. v.28(3), p. 285-305, 2004.

MICZEK, K.A., THOMPSON, M.L., SHUSTER, L., Opioid-like analgesia in defeated mice. *Science*, v. 215, n. 4539, p. 1520-1522, 1982.

MUL, J. D. et al. Voluntary wheel running promotes resilience to chronic social defeat stress in mice: a role for nucleus accumbens  $\Delta$ FosB. *Neuropsychopharmacology*, v. 43, n. 9, p. 1934–1942, 2018.

MUTLUER, T. et al. Lateralization of Neurobiological Response in Adolescents with Post-Traumatic Stress Disorder Related to Severe Childhood Sexual Abuse: the Tri-Modal Reaction (T-MR) Model of Protection. *Journal of Trauma & Dissociation*, v. 19, n. 1, p. 108–125,

2018.

NEMEROFF, C. B. Prevalence and management of treatment-resistant depression. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 68, n. SUPPL. 8, p. 17–25, 2007.

NESTLER, E. J., KELZ, M. B., J. CHEN.  $\Delta$ FosB: a molecular mediator of long-term neural and behavioral plasticity. **Brain Research**, v. 835, p. 10–17, 1999.

NESTLER, E.J. Transcriptional mechanisms of addiction: role of deltaFosB. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 363, p. 3245–3255, 2008.

NESTLER, E. J.; HYMAN, S.E. Animal models of neuropsychiatric disorders. **Nature Neuroscience**, v.13, p. 1161–1169, 2010.

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

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

PERROTTI, L. I. et al. Induction of deltaFosB in reward-related brain structures after chronic stress. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 24, n. 47, p. 10594–602, 2004.

PETIT-DEMOULIERE, B.; CHENU, F.; BOURIN, M. Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. **Psychopharmacology**, v. 177, p. 245–255, 2005.

PIARDI, L. N. et al. Social stress as a trigger for depressive-like behavior and persistent hyperalgesia in mice: study of the comorbidity between depression and chronic pain. **Journal of Affective Disorders**, v. 274, p. 759–767, 2020.

QUEVEDO, L. DE A. et al. Mental disorders, comorbidities, and suicidality at 30 years of age in a Brazilian birth cohort. **Comprehensive Psychiatry**, v. 102, 2020.

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.

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. 471-482, 2007a *apud* CZÉH, B. *et al.* Chronic stress-induced cellular changes in the medial prefrontal cortex and their potential clinical implications: does hemisphere location matter? **Behavioral Brain Research**, v. 190, n. 1, p. 1-13, 2008.

RAJKOWSKA, G.; MIGUEL-HIDALGO, J. J. Gliogenesis and glial pathology in depression. **CNS Neurological Disorders Drug Targets**, v. 6, n. 3, p. 219-233, 2007b. *apud* CZÉH, B. *et al.* Chronic stress-induced cellular changes in the medial prefrontal cortex and their potential clinical implications: does hemisphere location matter? **Behavioral Brain Research**, v. 190, n. 1, p. 1-13, 2008.

RIZVI, S.J. *et al.* Assessing anhedonia in depression: Potentials and pitfalls, **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 65, p. 21–35, 2016.

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

SELYE, H. The stress of life. **New York: McGraw Hill**, 1984 (publicado originalmente em 1956).

SEAMANS, J. K.; LAPISH, C. C.; DURSTEWITZ, D. Comparing the prefrontal cortex of rats and primates: Insights from electrophysiology. **Neurotoxicity Research**, v. 14, n. 2–3, p. 249–

262, 2008.

SERAFIM, A. P. et al. Exploratory study on the psychological impact of COVID-19 on the general Brazilian population. **PLoS ONE**, v. 16, n. 2 February, p. 1–15, 2021.

SINHA *et al.* Dynamic neural activity during stress signals resilient coping. **PNAS**, vol. 113, no 31, 8837-8842, 2016.

STEEL, ZACHARY *et al.* The global prevalence of common mental disorders: a systematic review and meta-analysis 1980–2013. **International Journal of Epidemiology**, 2014, Vol. 43, No. 2, 476–493

SULLIVANM, R. M.; GRATTON, A. Lateralized effects of medial prefrontal cortex lesions on neuroendocrine and autonomic stress response in rats. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**. v. 19, 2834-2840, 1999.

SUKIKARA *et al.* A role for the peraqueductal gray in switching adaptive behavioural responses. **The Journal of Neuroscience**, Washington DC, v. 26, n. 9, p. 2583-2589, 2006.

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. 120–124, 2016.

VALZELLI, L. (Ed). *Psychobiology of aggression and violence*. New York: Raven Press, 1981.

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.* Prefrontal Cortical Circuit for Depression- and Anxiety- Related behaviors Mediated by Cholecystokinin: Role of  $\Delta$ FosB, **The Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 11, p. 3878–3887, 2014.

VICTORIANO, G. *et al.*, Inhibition of the left medial prefrontal cortex (mPFC) prolongs the social defeat-induced anxiogenesis in mice: Attenuation by NMDA receptor blockade in the right mPFC. **Behavioural Brain Research**, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112312>.

WANG, X. *et al.* Distribution of CaMKII $\alpha$  expression in the brain in vivo, studied by CaMKII $\alpha$ -GFP mice. **Brain Research**, v. 1518, p. 9–25, 2013.

XU, P. *et al.* Medial prefrontal cortex in neurological diseases. **Physiological Genomics**, v. 51, n. 9, p. 432–442, 2019.

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, p. 344–350, 2006.

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

ZHDANAVA, M. *et al.* The Prevalence and National Burden of Treatment-Resistant Depression and Major Depressive Disorder in the United States. **The Journal of Clinical Psychiatry**, v. 82, n. 2, p. 4–5, 2021.





