

PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS – UFSCar/UNESP

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” – UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA
LABORATÓRIO DE NEUROPSICOFARMACOLOGIA

NATHÁLIA SANTOS COSTA

**Papel do cortex pré-frontal medial no comportamento defensivo de camundongos:
avaliação farmacológica da lateralização funcional**

Araraquara, SP
2017

NATHÁLIA SANTOS COSTA

**Papel do cortex pré-frontal medial no comportamento defensivo de camundongos:
avaliação farmacológica da lateralização funcional**

Dissertação apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas – PIPGCF UFSCar/UNESP para a obtenção do título de mestra.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza

Araraquara, SP
2017

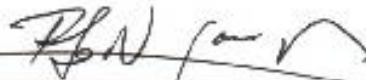


UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS


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

Folha de Aprovação


Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Nathália Santos Costa, realizada em 13/04/2017:



Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza
UNESP



Profa. Dra. Raquel Vecchio Fomari
UFABC



Prof. Dr. Marcelo Tadeu Marín
UNESP

*Dedico esse trabalho à minha família, pelas primeiras, mais fortes, belas e
eternas conexões.*

AGRADECIMENTOS

À minha família, que nas mais diversas e intensas formas de amor, me fortalecem para trilhar meu próprio caminho, mas também me mostram que posso sempre voltar pra casa.

À Alice, por deixar mais leve cada um dos meus dias, pelas risadas, companheirismo e amor.

Aos amigos, que fizeram deste período mais prazeroso e me deram apoio em momentos críticos. Um agradecimento especial à Tatiani Sorregotti, à Ana Cláudia Cipriano e à Bianca dos Santos.

Ao grupo do Laboratório de Neuropsicofarmacologia da FCFAr: vocês fazem o trabalho se “confundir” com diversão! Muito obrigada!

À Rô e à Bete, que sempre exerceram um trabalho excepcional, muito além de reprodução de técnicas. Obrigada pela amizade construída!

À Tirene, pela assitência na Secretaria do PANT e ainda mais pelos abraços!

Aos professores, por toda dedicação e experiência compartilhada.

À minha psicóloga, Paola Bisaccioni.

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 mestrado. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro, essencial para meu desenvolvimento acadêmico e manutenção no curso.

Aos animais utilizados nesse trabalho, que compulsoriamente cederam a vida em prol da ciência.

À oportunidade de participar como membra da CPG e poder entender um pouco mais do funcionamento de um programa de pós-graduação. Obrigada aos docentes, pela experiência proporcionada.

Ao Ricardo, meu orientador, por possibilitar meu crescimento em seu grupo de pesquisa e por compartilhar seus fortes valores éticos!

E à vida, que brilhantemente se forma e se transforma em torno de experiências sensoriais!

RESUMO

O estresse, que pode ser definido como uma condição que perturba o equilíbrio fisiológico e psicológico de um indivíduo, é fator de risco para o desenvolvimento de doenças neuropsiquiátricas, como transtornos de ansiedade. No entanto, nem todos os indivíduos que vivenciam um evento estressor desenvolvem doenças relacionadas a ele. Isto se deve à existência de diferenças na habilidade de se adaptar ao estresse, ou seja, a manifestação dos fenótipos de susceptibilidade ou resiliência. A busca pelo entendimento dos sistemas neurais envolvidos nessas diferenças tem evidenciado um papel importante do Córtex Pré-Frontal medial (CPFm) e, mais recentemente, a sua lateralização funcional vem ganhando especial destaque. Neste sentido, o CPFm Direito (D) parece modular respostas ansiogênicas, enquanto o CPFm Esquerdo (E) atenuaria essas respostas, ajudando o animal a lidar com eventos aversivos. Neste caso, a inibição do CPFmE intensificaria as respostas geradas por situações ameaçadoras. Sob essa hipótese, um dos objetivos do presente trabalho foi investigar se a inibição do CPFmE poderia modular o efeito de dois tipos de estresse (a contenção e a derrota social) sobre a ansiedade. Ainda, esse estudo também investigou se os receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (N-metil-D-aspartato) estariam envolvidos no efeito ansiogênico provocado pela ativação nitrérgica [com injeção local do doador de óxido nítrico (NO), o NOC-9] no CPFmD, haja vista o potencial ansiogênico do glutamato e as interações já conhecidas entre essas neurotransmissões. Para tanto, foram feitos experimentos para (1) caracterizar os efeitos imediatos (após 5 minutos) ou tardios (após 24 horas) do estresse de derrota social e de contenção sobre o comportamento de animais expostos ao labirinto em cruz elevado (LCE); (2) avaliar os efeitos da combinação do estresse de contenção ou de derrota social com a inativação sináptica (através do inibidor inespecífico, CoCl_2) do CPFm E no comportamento defensivo de camundongos expostos ao LCE 24h após o evento estressor; (3) investigar os efeitos do antagonismo *per se* de receptores NMDA e (4) o efeito desse antagonismo sobre a ansiogênese provocada pelo doador de NO sobre o comportamento de animais expostos ao LCE. Os resultados obtidos demonstram que ambos os estressores são ansiogênicos aos 5 minutos, mas a derrota social não provoca aumento de ansiedade 24 h após o estresse. Ainda, a inibição sináptica do CPFmE produz efeito ansiogênico 24 h depois quando associada ao estresse de derrota social (mas não à contenção). Além disso, o bloqueio de receptores NMDA por si provoca efeito ansiolítico e reverte o efeito ansiogênico provocado pelo NO em animais expostos ao LCE. Tomados em conjunto, esses resultados substanciam as evidências sobre a lateralização funcional do CPFm, em que

os hemisférios direito e esquerdo parecem possuir diferentes participações na modulação de eventos aversivos.

Palavras-chave: Ansiedade; Estresse; Lateralização Funcional; Córtex Pré-frontal; NO-Glutamato

ABSTRACT

Stressful situations are risk factors to the development of neuropsychiatric diseases, as anxiety disorders. However, not everyone who experiences stressful events develops stress-related illness. That is due to the existence of differences in the ability to adapt to stress, that is, the manifestation of susceptibility or resilience phenotypes. The search for understanding neural systems involved to these differences has evidenced an important role of the medial Prefrontal Cortex (mPFC), and, recently, its functional lateralization has been highlighted. In this sense, the right mPFC (RmPFC) seems to modulate anxiogenic-like responses, while the left mPFC (LmPFC) would attenuate such responses, thereby facilitating animals to cope with threatening situations. If so, LmPFC inhibition would intensify anxiogenic-like behavior front to aversive stimuli. Under this hypothesis, one of the goals of the present study was to investigate whether the inhibition of the LmPFC could modulate the effect of two types of stress (the restraint and the social defeat) on anxiety. Yet, we also aimed to investigate whether NMDA-glutamate receptor would be involved to the anxiogenic-like effect induced by nitrenergic activation of the RmPFC, given the anxiogenic potential of glutamate and the interaction already known between these neurotransmissions. To reach that, experiments were carried out (1) to characterize the effects of social defeat and restraint stress on animals exposed to elevated plus maze (EPM) 5 minutes or 24 hours later; (2) to evaluate the effects of restraint or social defeat combined to the synaptic inactivation (through nonspecific inhibitor, CoCl_2) of the LmPFC on the defensive behavior of mice exposed to EPM 24 h after stress; (3) to investigate the effects of NMDA receptor antagonism and (4) the effect of that antagonism on anxiogenic-like effects induced by NO donor. The results showed that both restraint and defeat stress are anxiogenic at 5 minutes, but defeated mice do not display anxiety 24 h after stress. Furthermore, the synaptic inhibition produced a clear anxiogenic-like effect in defeated (but not restrained) mice. In addition, the blockade of NMDA receptors produced anxiolytic-like effects and reversed the anxiogenic effect induced by NO injection into the RmPFC. Taken together, these results corroborate previous studies demonstrating the functional lateralization of the mPFC, in which the right and left hemispheres seem to have distinct roles in the modulation of aversive events.

Key-words: anxiety, stress, functional lateralization, medial Prefrontal Cortex, NO-Glutamate

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 OBJETIVO GERAL.....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1 SUJEITOS	18
3.2 FÁRMACOS	18
3.3 CIRURGIA E MICROINJEÇÃO.....	18
3.4 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO E ANÁLISE COMPORTAMENTAL.....	19
3.5 ESCOLHA DE AGRESSORES	20
3.6 PROCEDIMENTOS.....	20
3.7. ANÁLISE HISTOLÓGICA	22
3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	22
4 RESULTADOS	23
4.1 Injeções no CPFm.....	23
4.2 Experimento 1: Efeitos do estresse de contenção ou de derrota social sobre a ansiedade .	23
4.3 Experimento 2: Efeitos da combinação da inibição do CPFm Esquerdo com estresse de derrota social ou de contenção sobre a ansiedade avaliados 24h depois no LCE	26
4.4 Experimento 3. Efeitos da microinjeção de AP7 no CPFm Direito no comportamento defensivo de camundongos expostos ao LCE	28
4.5 Experimento 4. Efeitos do antagonismo de receptores NMDA sobre a ansiogênese induzida por NOC-9 no CPFmD em animais expostos ao LCE	29
Para dar prosseguimento ao experimento 4, foi utilizada a dose de AP7 que não causou qualquer efeito por si sobre a ansiedade (0,05 nmol), obtida no experimento 3.	30
5 DISCUSSÃO.....	31
6 CONCLUSÃO.....	37
REFERÊNCIAS	38
APÊNDICE	46

1 INTRODUÇÃO

Ansiedade: aspetos clínicos e neurobiologia

A ansiedade é um estado emocional subjetivamente qualificado como desagradável e acompanhado por sentimentos de apreensão e insegurança (NUTT, 1990). Ela surge frente à antecipação de um perigo, desencadeando um conjunto de alterações psicofisiológicas, como evitação, aumento de vigília e excitação. Tais respostas relacionadas com a ansiedade foram descritas em diversas espécies animais e compõe um “mecanismo geral de adaptação a situações adversas” (GROSS; HEN, 2004), tendo estreita relação com o desempenho de um indivíduo na execução de uma tarefa. Assim, o aumento de ansiedade causa uma melhora na performance; todavia, níveis muito elevados podem prejudicar o desempenho, tornando-se indesejada ou maladaptativa (Lei de Yerkes-Dodson). Neste sentido, surge a ansiedade patológica, carreando sofrimento e prejuízo nas atividades normais do indivíduo (ZANGROSSI; GRAEFF, 2004).

A ansiedade patológica pode ser classificada em diferentes categorias de transtornos, de modo a facilitar o diagnóstico e escolha de terapias. Nesse sentido, a última edição do Manual de Diagnóstico e Estatística dos Distúrbios Mentais (DSM-5, do inglês *Diagnostic Statistical Manual of Mental Disorders*) categoriza tais transtornos em: transtorno de ansiedade de separação, mutismo seletivo, fobias específicas, transtorno de ansiedade social, transtorno do pânico, agorafobia, o transtorno de ansiedade generalizada, transtorno de ansiedade devido a uma condição médica geral, outros transtornos de ansiedade especificados e o transtorno de ansiedade não especificado (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013). Além disso, de acordo com o DSM-5 (p. 189),

os transtornos de ansiedade incluem transtornos que compartilham características de medo e ansiedade excessivos e perturbações comportamentais relacionados. Medo é a resposta emocional a ameaça iminente real ou percebida, enquanto ansiedade é a antecipação de ameaça futura. Obviamente, esses dois estados se sobrepõem, mas também se diferenciam, com o medo sendo com mais frequência associado a períodos de excitabilidade autonômica aumentada, necessária para luta ou fuga, pensamentos de perigo imediato e comportamentos de fuga, e a ansiedade sendo mais frequentemente associada à tensão muscular e vigilância em preparação para perigo futuro e comportamentos de cautela ou esquiva. Às vezes, o nível de medo ou ansiedade é reduzido por comportamentos constantes de esquiva. Os ataques de pânico se destacam dentro dos transtornos de ansiedade como um tipo particular de resposta ao medo. Não estão limitados aos transtornos de ansiedade e também podem ser vistos em outros transtornos mentais.

Esses transtornos 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) (STEEL et al., 2014). Ainda, dados recentemente publicados pela Organização Mundial de Saúde (OMS), mostram que 264 milhões de pessoas sofrem com transtornos de ansiedade, uma média de 3,6%. O número representa uma alta de 15% em comparação a 2005. Alarmantemente, o Brasil lidera o Ranking na América Latina, com 9,3% da população com algum tipo de transtorno de ansiedade, uma média mais que 3 vezes superior à taxa mundial (O Estado de S. Paulo, 2017)

Evolutivamente, a ansiedade pode ser entendida como fruto da resposta animal frente a situações ameaçadoras, que dão origem às denominadas “reações de defesa”. Ela tem um nítido valor adaptativo, uma vez que prepara o organismo para se defender de estímulos potencialmente perigosos. Essas reações são moduladas por sistemas encefálicos integrados, que compreendem uma série de estruturas hierarquicamente distribuídas no encéfalo e que coordenam o comportamento defensivo (e as emoções associadas).

Do ponto de vista histórico, o estudo sobre essas estruturas na modulação das reações de defesa teve início em meados da década de 1940, quando Hess e Brugger (1943) demonstraram que a estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquetudal (MCP) de gatos eliciava reações intensas e bem estruturadas de luta, fuga e manifestações neurovegetativas, além de reações de defesa afetiva quando da estimulação da amígdala (AM). Desde então, diversos estudos contribuíram para a elaboração de constructos teóricos sobre a neurobiologia do comportamento defensivo. Neste contexto, Jeffrey Gray e Neil McNaughton publicaram em 2000 a segunda edição do livro “Neuropsicologia da ansiedade”, cujos conceitos foram expandidos por McNaughton e Corr em 2004.

Tais conceitos envolvem três sistemas de modulação comportamental integrados: o sistema fuga/luta/congelamento (SFLC), o sistema de aproximação comportamental (SAC) e o sistema de inibição comportamental (SIC). Sucintamente, o SFCL seria responsável por detectar estímulos de punição (fonte de perigo) inatos ou condicionados ou omissão de recompensa (satisfação das necessidades biológicas, como alimento e sexo), os quais direcionam o comportamento para a esquiva. Já o SAC detectaria estímulos inatos ou condicionados de recompensa ou omissão de punição, direcionando o comportamento para a aproximação. A ativação simultânea desses dois sistemas, ou seja, quando o estímulo induz

ambas as tendências, geraria um conflito resultando em ansiedade. Desta maneira, o SIC seria ativado e reponsável por detectar o conflito, inibindo os comportamentos de aproximação ou evitação, além de aumentar a atenção e o alerta, dando origem a comportamentos de avaliação de risco mediados pelo septo-hipocampo. Assim, é proposto que as reações sejam moduladas por estruturas encefálicas distintas, mas inter e intraconectadas. Paralelamente, Blanchard e colaboradores (1993) propuseram os conceitos de distância defensiva, em que as estratégias de defesa eliciadas dependem da fonte de perigo (se real ou potencial) e da rota de fuga [se distante (fuga ou congelamento) ou próxima (luta)]. Neste sentido, McNaughton e Corr (2004) postulam que as estruturas que comandam essas reações de defesa são organizadas hierarquicamente [do córtex pré-frontal (CPF) à MCP], e atuam conforme distância da fonte de perigo. No entanto, todas as estruturas envolvidas participam da modulação de todos os comportamentos, embora estruturas prosencefálicas (como o CPF e AM) modulariam principalmente comportamentos mais sutis, como avaliação de risco (mais relacionados com a ansiedade), ao passo que estruturas mais caudais (como MCP e hipotálamo medial) atuariam principalmente na modulação de comportamentos mais intempestivos (mais relacionados com o medo, como reações de luta e fuga) (CARVALHO-NETTO, 2009). Para revisão detalhada ver Gray; McNaughton, 2000; McNaughton; Corr, 2004.

Contudo, embora diversos estudos relacionem comportamentos defensivos com o medo e a ansiedade (YANG et al., 2004; MARKHAM et al., 2006; LITVIN et al., 2007), ainda existem muitas lacunas para compreensão da função e da importância das vias neurais e neurotransmissores envolvidos na modulação dessas respostas, bem como para o desenvolvimento de intervenções terapêuticas para o tratamento ou prevenção dos distúrbios relacionados.

Labirintito em Cruz Elevado como um teste de ansiedade

A busca pela compreensão dos transtornos de ansiedade resultou no desenvolvimento de modelos animais, dentre os quais destaca-se o labirinto em cruz elevado (LCE), um teste que se baseia na aversão natural de roedores a espaços abertos. Resumidamente, o teste consiste em avaliar a atividade exploratória do animal nos ambientes protegidos (braços fechados) e desprotegidos (braços abertos) do aparato, em que as medidas de ansiedade são dadas pela esquivas aos braços abertos (porcentagem de entradas e do tempo de permanência), além de comportamentos de avaliação de risco. O LCE tem sido muito utilizado para o *screening* de fármacos ansiolíticos e para o estudo das estruturas encefálicas

envolvidas com os comportamentos relacionados à ansiedade (HANDLEY; MITHANI, 1984; LISTER, 1987; PELLOW et al., 1985). Ao receber tratamentos com fármacos ansiolíticos, roedores aumentam a exploração dos braços abertos e, ao contrário, diminuem tal exploração com tratamentos ansiogênicos. Além da facilidade de execução, que inclui rapidez, simplicidade, e economia, o teste é sensível a ambas as direções comportamentais ansiolíticas e ansiogênicas, sem necessidade de seções de condicionamento ou estímulos nocivos como choques ou privação de alimentos, o que justifica seu alto emprego em pesquisas da área (para revisão, ver Carobrez; Bertoglio, 2005).

Transtornos Neuropsiquiátricos e Estresse

O estresse é um fator de risco para o desenvolvimento de diversas dos transtornos mentais citados anteriormente, (e.g. FRANKLIN et al., 2012). Ele pode ser definido como uma resposta geral do organismo frente a estímulos nocivos que desencadeiam respostas fisiológicas e comportamentais. Selye, um pesquisador que popularizou o termo “estresse” entre as ciências médicas, agrupou essas respostas em três estágios ou fases, aos quais ele chamou de "Síndrome Geral de Adaptação", sendo elas: (1) fase de alarme, respostas que visam proteger o organismo, preparando-o para se defender do estressor; se caracteriza por alterações de fluxo sanguíneo e permeabilidade de membranas, levando a alteração de pressão arterial, além de liberação de hormônios (e.g. hormônio adrenocorticotrófico - ACTH, glicocorticoides, adrenalina). Todavia, se o estímulo aversivo persiste, o organismo entra na (2) fase de resistência, em que desaparecem as respostas anteriores e o organismo tenta se reequilibrar, se adaptando ao estímulo estressor. Por fim, se as estratégias não forem bem sucedidas, e o estímulo estressor continuar ou aumentar sua intensidade, pode haver sobrecarga ao indivíduo, que entra na chamada (3) fase de exaustão, sendo esta relacionada com aparecimento de patologias e morte (SELYE, 1950; 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 susceptibilidade, 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 susceptíveis) desenvolvem respostas psicofisiológicas adaptativas, se recuperando das alterações induzidas pelo estresse (DEL GIUDICE; ELLIS; SHIRTCLIFF, 2011). Em outras palavras, parece que existem diferentes

mecanismos de enfrentamento ao estresse, que podem levar ou não o indivíduo a atingir a "fase de exaustão". Assim, diversos estudos têm objetivado identificar quais são esses mecanismos, com destaque para os processos neurais pelos quais o estresse induz sintomas mal adaptativos.

Existem diversas estratégias que vêm possibilitando a pesquisa sobre as alterações psicofisiológicas induzidas pelo estresse. Dentre elas, surge o estresse de derrota social (EDS), modelo que se destaca por conta de suas características etológicas. Ele se baseia no conflito social, em que um animal dominante (residente) ataca um coespecífico (intruso), desencadeando uma série de alterações comportamentais, endócrinas e fisiológicas no animal agredido, o que permite sua utilização para o estudo de desordens relacionadas ao estresse (ex.: depressão, ansiedade e abuso de drogas) (BJÖRKQVIST, 2001; KEENEY; HOGG, 1999; LAVIOLA et al., 1999; STEIN; BOUWER, 1997). Além do EDS, outro modelo amplamente utilizado é o estresse de contenção, um modelo simples, indolor e não causa debilitações físicas no animal. Trata-se de colocar o animal em um tubo com dimensões que restrinjam seus movimentos, sendo, portanto, um estresse físico e psicológico por conta da imobilidade e confinamento (BUYNITSKY; MOSTOFISKY, 2009).

Vários estudos têm enfatizado os efeitos de estressores no funcionamento encefálico, indicando assim que algumas estruturas são particularmente afetadas pelo estresse agudo e crônico (e.g., GEE; CASEY, 2015). Nesse contexto, o Córtex Pré-Frontal medial (CPFm) está intimamente relacionado com o preparo de respostas emocionais ao estresse (VERMETTEN; BREMNER, 2002; GOLD et al., 2015; MAREN; HOLMES, 2016).

O CPFm é uma estrutura prosencefálica e límbica, que pode ser dividida em cíngulados (Cg) 1 e 2, pré-límbico (PrL) e infra-límbico (IL) (PAXINOS; FRANKLIN, 2001). Funcionalmente, o CPF 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 [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).

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 predizer um nível maior de comportamentos mal-adaptativos (SINHA et al., 2016). Ainda, diversos estudos têm evidenciado seu papel no controle das respostas comportamental e neuroendócrina ao estresse, contudo, embora sejam conhecidas diferenças funcionais entre as subdivisões dorso-ventrais (e.g. SUZUKI et al., 2016), uma crescente linha de evidências vem demonstrando a lateralização funcional do CPFm na modulação dessas respostas. Neste sentido, Sullivan e Granton (1999) demonstraram que lesões bilaterais ou do CPFm Direito (CPFmD) (mas não apenas do esquerdo) de ratos diminuem o pico de corticosterona induzida por estresse de contenção, causando resistência ao estresse. Ainda, quando submetido ao estresse crônico, o CPFm Esquerdo (CPFmE) sofre perda estrutural, refletindo em diminuição volumétrica (CZEH, 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 *postmortem* 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 recente de nosso laboratório demonstrou a lateralização funcional do CPFm nos comportamentos relacionados à ansiedade (COSTA, 2014). 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 uni (no CPFmE) ou bilateralmente nesta estrutura. Além disso, a inativação temporária com cloreto de cobalto (CoCl_2 , um bloqueador sináptico) do CPFmD e CPFmE promove efeitos ansiolíticos e ansiogênicos, respectivamente. Juntos, esses resultados evidenciam que a ativação nitrérgica no CPFmE facilitaria camundongos a lidar (*coping*) com situações aversivas, as quais, por sua vez, aumentariam a liberação de NO no CPFmD. Neste caso, a inibição do CPFmE deve dificultar

a habilidade dos animais em lidar com situações ameaçadoras. Frente a essa hipótese, um dos objetivos do presente trabalho foi investigar se a inibição do CPFmE poderia modular o efeito de dois tipos de estresse (a contenção e a derrota social) sobre a ansiedade. Ainda, outro fator que merece ser investigado é o mecanismo pelo qual o NO promove efeitos ansiogênicos no CPFmD.

O óxido nítrico é um gás inorgânico incolor, representado pela fórmula NO (nitrogênio e oxigênio), altamente reativo por possuir um elétron desemparelhado em sua órbita externa, tendendo a reagir rapidamente com diversas moléculas biológicas como outros radicais livres e O₂ (GUIX et al., 2005). Amplamente distribuído no organismo, o NO possui diversas funções fisiológicas (ex.: relaxamento de músculo liso e vasodilatação, ação microbicida no sistema imunológico, etc.), e, devido às suas características físico-químicas é classificado, no sistema nervoso central (SNC), como neurotransmissor atípico (GALLY et al., 1990). Entre tais características destacam-se a alta difusibilidade, o que permite que atravesse facilmente as membranas biológicas, promovendo ação fisiológica em até certa distância de onde foi liberado. Além disso, ele não é armazenado em vesículas, sendo produzido quando necessário e rapidamente degradado, devido a sua curta meia-vida (SCHEIGHOFER; FERRIOL, 2000).

O NO é produzido pela enzima óxido nítrico sintase (NOS - do inglês, *nitric oxide synthase*), mediante conversão de L-arginina a L-citrulina, e tem como co-fatores fosfato de dinucleotídeos de nicotinamida adenina (NADPH) e Ca²⁺ (MAYER et al., 1991; LOHSE et al., 1998). O NO pode atuar ativando a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), que, por sua vez, catalisa a conversão de trifosfato de guanosina (GTP) em monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), formando o complexo NO/GMPc. A ligação do NO ao grupo heme dessa enzima provoca uma alteração conformacional que aumenta em até 200 vezes a taxa catalítica de conversão do GTP em GMPc (FRIEBE; KOESLING, 2003). Esse aumento de GMPc induzido pelo NO pode desencadear uma série de reações intracelulares, como alteração direta da permeabilidade de canais iônicos sensíveis a esse composto (KAUPP, 1991; NAKAMURA; GOLD, 1987), modificar a atividade de fosfodiesterases (PDE) dependentes de GMPc, seja estimulando ou inibindo, dependendo da família da PDE (CHARBONNEAU, 1990), ou ainda ativar proteínas quinases dependentes de GMPc (PKG - FRIEBE; KOESLING, 2003; KRUMENACKER; HANAFY; MURAD, 2004; SCHMIDT; LOHMANN; WALTER, 1993; SCHUMAN et al., 1994). Outros estudos indicam ser o NO um mensageiro retrógrado (difunde-se da célula pós-sináptica para a pré-sináptica) o qual provoca retro-alimentação positiva na liberação de glutamato, através de um mecanismo

GMPc dependente (NOWICKY; BINDMAN, 1993). Neste sentido, estudos anteriores têm sugerido que a produção de NO resulta em liberação de glutamato: Faria e colaboradores (2016) demonstraram recentemente que injeções de AP7 (ácido 2-amino-7-fosfo-heptanóico), um antagonista de receptores NMDA, bloqueia os efeitos ansiogênicos induzidos pela infusão local de NOC-9, sugerindo que a produção de NO poderia estar aumentando a liberação de glutamato nessa região.

O glutamato é o principal aminoácido excitatório e ubíquo no SNC; ele ativa receptores ionotrópicos do tipo NMDA (N-metil-D-Aspartato), AMPA e CAINATO (HERESCO-LEVY, 2003; OZAWA et al., 1998; HUNTLEY et al., 1994; SEEBURG, 1993) e receptores metabotrópicos (acoplados a proteína G). Tais receptores são amplamente distribuídos no SNC e diversos estudos demonstram a presença e participação de receptores do tipo NMDA em estruturas relacionadas com respostas de medo e ansiedade como a MCP e o CPFm (MIGUEL; NUNES-DE-SOUZA, 2008; RESSTEL, 2008). A ativação destes receptores leva ao influxo celular de cálcio, o que desencadeia uma cascata de eventos celulares excitatórios, incluindo ativação da NOS. Assim, a outra hipótese deste estudo foi de que o efeito ansiogênico promovido pela injeção de doador de NO (NOC-9; COSTA, 2014) no CPFmD de camundongos esteja relacionado com liberação de GLU e sua atuação em receptores NMDA, e, portanto, o bloqueio de tais receptores (através de tratamento prévio com AP7, um antagonista NMDA) reverteria esse efeito.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a participação CPFmE na modulação do comportamento defensivo induzido pelo estresse agudo de derrota social ou de contenção, bem como a participação de receptores do tipo NMDA no efeito ansiogênico do NO no CPFmD.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Investigar os efeitos do estresse de contenção e de derrota social nos comportamento defensivo de camundongos expostos ao LCE 5 minutos ou 24 horas após o evento estressor.

2. Investigar os efeitos da combinação do estresse de contenção ou de derrota social com a inativação sináptica do CPFm E no comportamento defensivo de camundongos expostos ao LCE 24h após o evento estressor.

3. Investigar os efeitos do bloqueio de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA do CPFmD no comportamento defensivo de camundongos expostos ao LCE.

4. Investigar os efeitos do bloqueio de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA sobre o efeito ansiogênico do NO no CPFm D de camundongos expostos ao LCE.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 SUJEITOS

Foram utilizados camundongos Suíços albinos machos (25-35g) provenientes do biotério central da Universidade Estadual Paulista – UNESP. Os animais foram alojados em grupos de 10 em gaiolas-moradia (41x34x16cm) e mantidos em condições controladas de temperatura (23 ± 2 °C) e luz (ciclo de 12/12 horas, luzes acesas às 07:00 a.m.) e tiveram livre acesso ao alimento e água, exceto durante os curtos períodos de teste. Todos os animais eram *naive* no começo dos experimentos e foram utilizados apenas uma vez.

Todos os procedimentos envolvendo o uso de animais neste estudo tiveram início após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista, protocolo CEUA/FCF/Car nº 17/2012 e nº 39/2016.

3.2 FÁRMACOS

Os fármacos utilizados foram: Cloreto de Cobalto (CoCl_2 – bloqueador sináptico inespecífico – 1,0 mM/0,2 μL dissolvido em solução salina fisiológica 0,9%); NOC-9 [6-(2-hidroxi-1-metil-2-nitrosohidrazino)-N-metil-1-hexanamina – doador de NO – 37,5 nmol/0,2 μL – dissolvido em veículo (solução Tris-HCl 1 M, pH 10) para prevenir liberação de NO antes de atingir o tecido encefálico] e AP7 (ácido 2-amino-7-fosfo-heptanóico, um antagonista NMDA; 0,05, 0,1 e 0,2 nmol/0,2 μL). As doses foram baseadas em estudos anteriores (COSTA, 2014, MIGUEL; GOMES; NUNES-DE-SOUZA, 2012; FARIA, 2016) ou experimentos pilotos.

3.3 CIRURGIA E MICROINJEÇÃO

Para receber injeções intra-CPFm, os animais passaram por cirurgia estereotáxica para implante intracraniano de cânula-guia de 7 mm de comprimento (26 gauge; Insight Equipamentos Científicos), após anestesia com a associação de anestésico + relaxante muscular (cetamina 100 mg/Kg + xilazina 10 mg/Kg, i.p.). As cânulas foram fixadas no crânio comacrílico dental e parafusos. Ao término da cirurgia, os camundongos receberam uma injeção intramuscular de penicilina-G benzatina (Pentabiótico, 56,7 mg/kg em um

volume de 0,1 mL) e uma injeção subcutânea do analgésico anti-inflamatório Banamine (flunixinina meglumina, 3,5 mg/kg em um volume de 0,3 mL). As coordenadas estereotáxicas baseadas no Atlas de Paxinos e Franklin (2001) foram 1,7 mm anterior ao bregma, + e/ou – 0,3 mm lateral à sutura sagital para os hemisférios esquerdo e direito, respectivamente e 1,9 mm ventral à superfície craniana. Cinco a sete dias após a cirurgia, as soluções (ver seção “fármacos”) foram injetadas no CPFm através da inserção de uma agulha (33 gauge) de 8,0 mm de comprimento no interior da cânula guia. Esta agulha era conectada, por meio de um tubo de polietileno (PE-10), a uma microseringa da marca Hamilton, com a qual foram feitas as injeções. O movimento de uma pequena bolha de ar no tubo de polietileno durante as injeções confirmava o fluxo da solução.

3.4 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO E ANÁLISE COMPORTAMENTAL

O labirinto em cruz elevado (LCE) padrão é um aparato composto de madeira (piso e suporte) e vidro (paredes) e consiste de dois braços abertos (30 x 5 x 0,25 cm) e dois braços fechados (30 x 5 x 15 cm), conectados por uma plataforma central (5 x 5 cm) e elevados a 38,5 cm do chão.

O teste consiste em posicionar um animal na plataforma central (encarando um braço aberto) e a sessão tem duração de 5 minutos, tempo em que o sujeito fica livre para explorar todo o aparato. Todos os experimentos foram conduzidos durante a fase clara do ciclo de luz, sob iluminação normal (1 x 60 W – lâmpada incandescente amarela posicionada aproximadamente 1,80 m sobre o piso do LCE). As sessões foram filmadas por um sistema de câmera e gravador de DVD para posterior análise através do software “X-Plo-Rat 2005”, desenvolvido pelo grupo do Professor Doutor Silvio Morato, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP, Brasil (o download do programa pode ser feito livremente através do link <http://scotty.ffclrp.usp.br/X-Plo-Rat.html>). Os comportamentos analisados foram os parâmetros convencionais de ansiedade (medidas espaço-temporais): frequência de entradas nos braços abertos e fechados (definida pelo cruzamento com as 4 patas para dentro do braço) e duração do tempo gastos nestes compartimentos. Esses dados foram utilizados para o cálculo da porcentagem de entradas (%EBA) e do tempo de permanências nos braços abertos (%TBA) [%entradas: (aberto/total)x100; %tempo: (tempo no compartimento/300)x100).

3.5 ESCOLHA DE AGRESSORES

Após a chegada ao biotério local do Laboratório de Neuropsicofarmacologia, os animais foram alojados em gaiolas-moradia (ver item “Sujeitos”). No período de habituação às condições locais, um observador identificou os camundongos dominantes de cada gaiola (definido como o sujeito que exibe comportamentos espontâneos de agressão aos demais da gaiola), que foram isolados em gaiolas individuais (28 x 17 x 12 cm) por, no mínimo, 4 semanas, para intensificar o comportamento agressivo (VALZELLI, 1981).

3.6 PROCEDIMENTOS

3.6.1. Experimento 1: Efeitos do estresse de contenção ou de derrota social sobre a ansiedade

Os efeitos imediatos (5 minutos) ou tardios (24h) do estresse de contenção ou de derrota social sobre os comportamentos relacionados à ansiedade foram avaliados em camundongos expostos ao LCE.

O estresse de contenção consistiu em colocar um camundongo dentro de um tubo cilíndrico de plástico (PVC; diâmetro interno de 2,8 cm e 11,5 cm de comprimento) por um período de 30 minutos. Após, os animais retornaram para suas gaiolas-moradia por 5 minutos (n = 10) ou 24h (n = 9). Para o estresse de derrota social, os camundongos (intrusos) foram colocados individualmente na gaiola-moradia de um coespecífico dominante e agressor (residente), que foi previamente isolado socialmente (item 3.5). A interação agressiva ocorreu até o animal intruso exibir a postura de submissão, denominada levantar defensivo (elevação do corpo sobre as patas traseiras, patas dianteiras estendidas em direção ao agressor, cabeça retraída e orelhas arqueadas; MICZEK et al., 1982) por pelo menos 3 segundos ou por pelo menos 5 minutos [o que ocorresse primeiro (YAP et al., 2006)]. Após a interação, os animais foram colocados de volta em sua gaiola-moradia por 5 minutos (n = 12) ou 24h (n = 12). Após, os animais foram expostos ao LCE por 5 minutos para posterior avaliação das medidas de ansiedade (item 3.4). O grupo controle consistiu de animais expostos a um camundongo familiar não agressor por 5 minutos e retornaram para a gaiola-moradia. Estes grupos também foram expostos ao LCE 5 min (n = 12) ou 24h (n = 13) após a interação não agressiva.

3.6.2. Experimento 2: Efeitos da combinação da inibição do CPFm Esquerdo com estresse de derrota social ou de contenção sobre a ansiedade avaliados 24h depois no LCE

Cinco a sete dias após a cirurgia estereotáxica, os animais foram levados para uma sala onde receberam as injeções intra-CPFm (de acordo com o item 3.3). Dez minutos após a microinjeção de salina ou CoCl_2 (1mM; volume 0,2 μL) no CPFmE, os camundongos foram submetidos ao estresse de contenção (salina: n=13; CoCl_2 : n = 7) ou de derrota social (salina: n=12; CoCl_2 : n = 14), como descrito no experimento 1. Logo após, os animais retornaram para a gaiola-moradia e, 24h depois, cada sujeito foi exposto individualmente ao LCE para a avaliação dos índices de ansiedade (%EBA e %TBA) e de locomoção (EBF) por cinco minutos. Os grupos controle também receberam injeção de salina (n = 10) ou de CoCl_2 (n = 11) no CPFmE, mas foram expostos a um camundongo familiar não agressivo e retornaram para a gaiola-moradia por 24h antes de serem expostos ao LCE.

3.6.3. Experimento 3. Efeitos da microinjeção de AP7 no CPFm Direito no comportamento defensivo de camundongos expostos ao LCE

Cinco a sete dias após a cirurgia estereotáxica, os animais foram levados para uma sala onde receberam as injeções intra-CPFm (de acordo com o item 3.3). Dez minutos após a microinjeção de salina (n=12) ou AP7 [doses: 0,05 (n = 6); 0,1 (n = 8) e 0,2 nmol/0,2 μL (n = 7)] no CPFmD, os animais foram individualmente expostos ao LCE para posterior avaliação dos índices de ansiedade (item 3.4) e de locomoção por 5 minutos.

3.6.4. Experimento 4. Efeitos do antagonismo de receptores NMDA sobre a ansiogênese induzida por NOC-9 no CPFmD de camundongos expostos ao LCE

Cinco a sete dias após a cirurgia estereotáxica os animais receberam microinjeção intra-CPFmD de salina ou AP7 (0,05 nmol/0,2 μL , dose sem efeito por si, de acordo com o experimento 3) e, 10 minutos depois, uma injeção de NOC-9 (37,5 nmol/0,2 μL – dose ansiogênica) ou veículo (TRIS). Após 5 minutos, cada animal foi exposto ao LCE para posterior avaliação dos índices de ansiedade (item 3.4) e de locomoção por 5 minutos. Os grupos então foram: salina + tris (n = 10), AP7 + tris (n = 10), salina + NOC-9 (n = 9), AP7 + NOC-9 (n = 9).

3.7. ANÁLISE HISTOLÓGICA

Ao final dos experimentos, os camundongos que passaram por tratamento farmacológico receberam injeção intra-CPFm de 0,2 µL corante azul de Evans a 1%, por meio do mesmo procedimento descrito para microinjeção de fármaco. Após, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂, seus encéfalos foram removidos e acomodados em recipientes contendo solução formalina (10%) por pelo menos 24h antes de sofrerem seções coronais ao longo do trajeto da cânula com o auxílio de um criostato (LEICA CM 1850). As seções foram inspecionadas com o uso de uma lupa (LEICA DM LB) e a visualização da dispersão do corante indicou o local da injeção. Foram consideradas positivas as injeções que acertaram as sub-regiões Cingulado e Pré-límbico do CPFm. Animais que tiveram sítio de injeção em outras estruturas foram excluídos do estudo.

3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados foram inicialmente submetidos ao teste de homogeneidade de variância de Levene. Após, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) bi-fatorial [Experimento 1: fator 1 – estresse; fator 2 – tempo; e experimento 2: fator 1 – tratamento; fator 2 – condição de estresse; Experimento 4: fator 1 – pré-tratamento (salina ou AP7); fator 2 – tratamento (Tris ou NOC-9)] ou monofatorial (Experimento 3) seguida pelo teste *post hoc* Duncan. Em todos os casos, uma diferença com valor de $p \leq 0,05$ foi considerado como significativa. Nas figuras (seção resultados) as barras representam as médias (\pm EPM). As análises foram feitas através do software *Statistica*®

4 RESULTADOS

4.1 Injeções no CPFm

A figura 1 mostra um diagrama esquemático (esquerda) e uma fotomicrografia representativa (direita) do sítio de infusão no CPFm de camundongo (PAXINOS AND FRANKLIN, 2001). Embora o CPFm possa ser dividido em cíngulo (Cg1), pré-límbico (PRL) e infra-límbico (IL), no presente estudo, as injeções foram consideradas positivas nas sub-regiões dorsais (Cg1 e PrL).

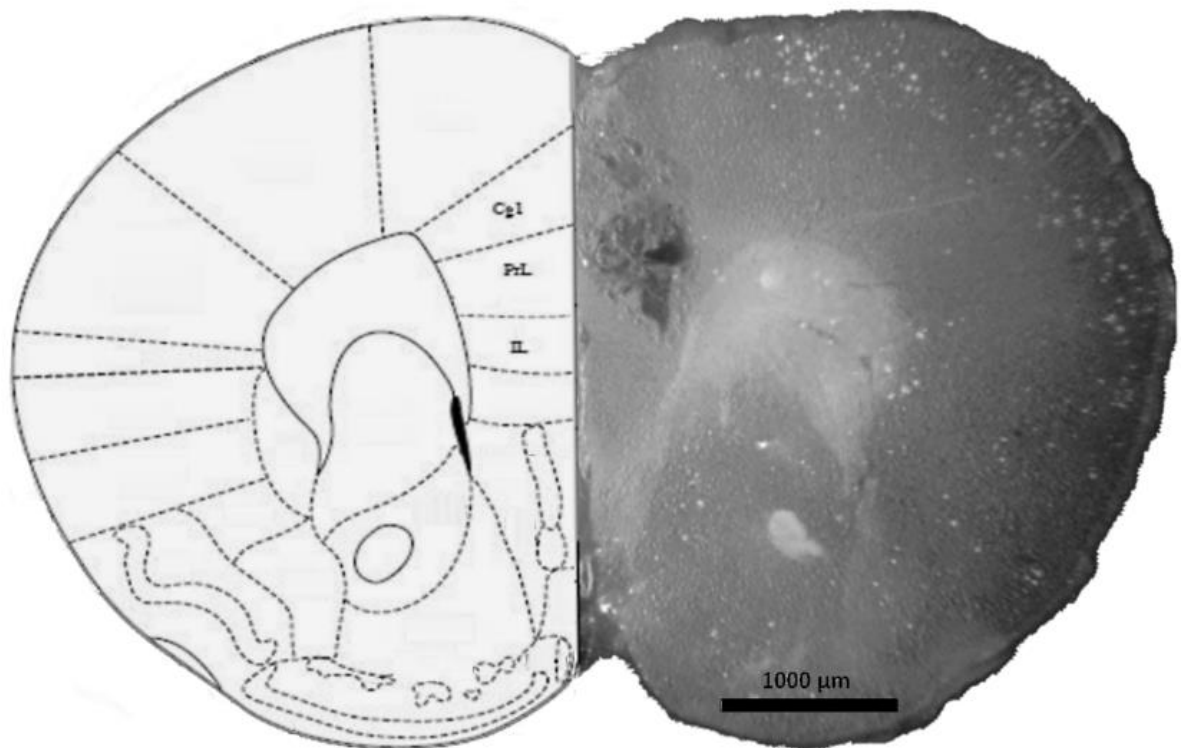


Figura 1. Diagrama esquemático (esquerda) e fotomicrográfico (direita) de um sítio de microinfusão representativo no CPFm de camundongo. A seção corresponde a 1,70 mm anterior ao bregma (Paxinos; Franklin, 2001). Abreviações: Cg1 – córtex cingulado área 1; IL – córtex infralímbico; PrL – córtex pré-límbico.

4.2 Experimento 1: Efeitos do estresse de contenção ou de derrota social sobre a ansiedade

Os efeitos imediatos (5 minutos) e tardios (24h) do estresse de contenção ou de derrota social sobre o comportamento de camundongos expostos ao LCE podem ser vistos na figura 2.

A análise estatística, ANOVA bifatorial, das medidas clássicas de ansiedade, revelou um efeito do fator “estresse” [$F(2,62) = 4,27$; $p < 0,02$], do fator “tempo” [$F(1,62) = 5,96$; $p < 0,02$] e da interação “estresse x tempo” [$F(2,62) = 3,07$; $p = 0,05$] na porcentagem de entradas nos braços abertos (%EBA). Com relação à porcentagem de tempo nos braços abertos (%TBA), a ANOVA bifatorial revelou um efeito significativo do fator “tempo” [$F(1,62) = 4,97$; $p < 0,03$] e tendência (efeitos *borderline*) do fator “estresse” [$F(2,62) = 2,44$; $p = 0,09$] e da interação “estresse x tempo” [$F(2,62) = 2,71$; $p = 0,07$]. O teste post hoc Duncan revelou que a derrota social diminuiu ambas as porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos ($p \leq 0,05$) quando os animais foram expostos ao LCE 5 minutos após o estresse, enquanto o estresse de contenção reduziu significativamente apenas a %EBA ($p < 0,05$). Contudo, apenas a contenção foi capaz de reduzir a %EBA 24h após o estresse ($p < 0,05$). É importante destacar que, embora a %EBA e a %TBA exibidas pelos animais derrotados não tenham sido diferentes do grupo controle 24h após o estresse, ambas as variáveis foram maiores que aquelas exibidas pelos camundongos derrotados e imediatamente expostos ao LCE. Com respeito às entradas nos braços fechados, a ANOVA bifatorial revelou um efeito apenas do fator “estresse” [estresse: $F(2,62) = 3,78$; $p < 0,03$]; fator tempo: $F(1,62) = 1,52$; $p > 0,05$; interação estresse x tempo: $F(2,62) = 1,11$; $p > 0,05$]. No entanto, o teste post hoc mostrou que o estresse de contenção causou uma redução na locomoção ($p < 0,05$) em comparação com o grupo derrotado, mas não com o grupo controle.

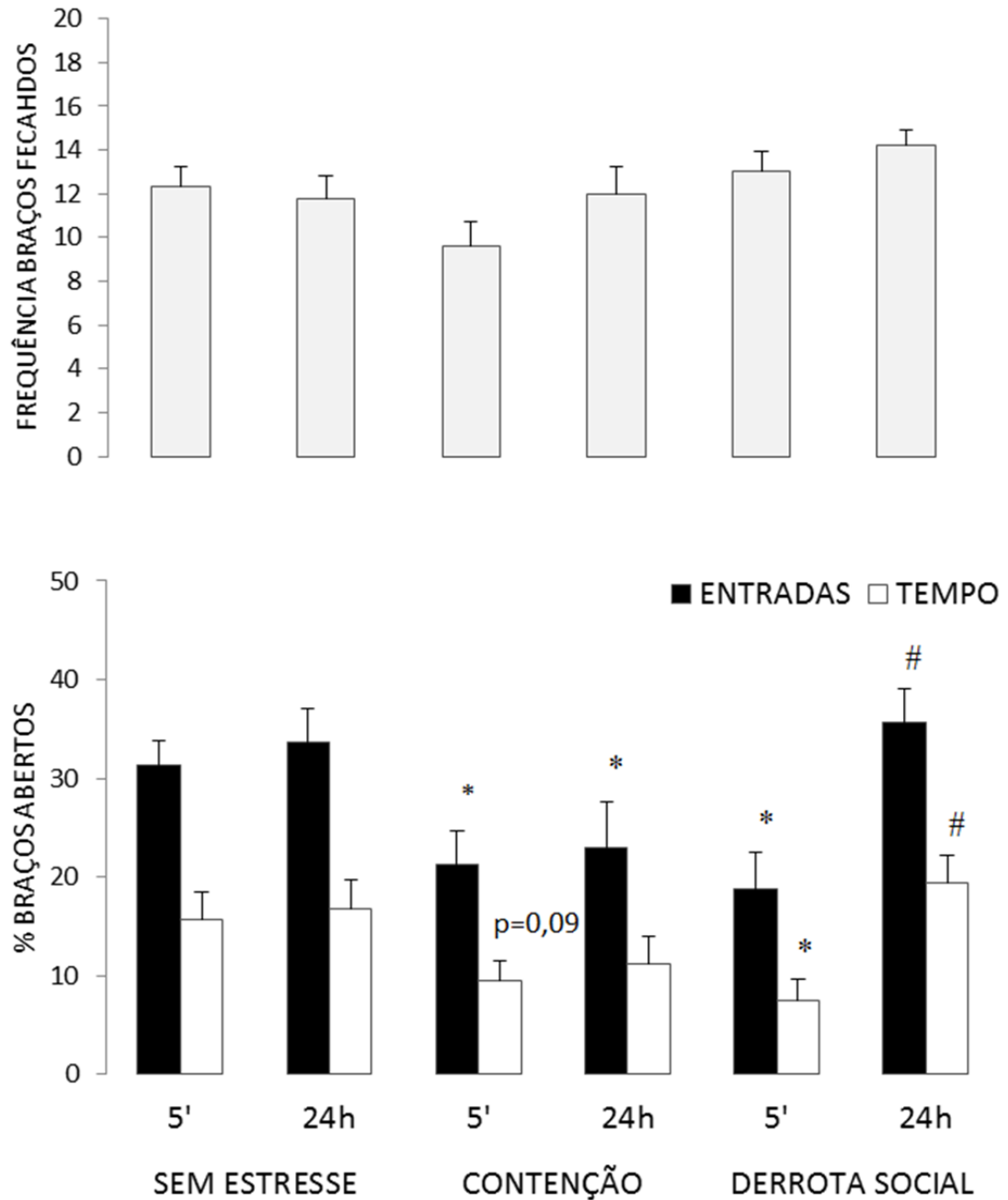


Figura 2. Efeitos ansiogênicos induzidos pela contenção ou derrota social em camundongos expostos ao LCE 5 minutos ou 24h após o estresse. Painel superior: frequência de entradas nos braços fechados. Painel inferior: porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos. N 9-13; * $p \leq 0,05$ em comparação com grupo controle sem estresse; # $\leq 0,05$ em comparação com o grupo socialmente derrotado e expostos ao LCE 5 min após.

4.3 Experimento 2: Efeitos da combinação da inibição do CPFm Esquerdo com estresse de derrota social ou de contenção sobre a ansiedade avaliados 24h depois no LCE

O comportamento exibido por camundongos no LCE 24h após receberem injeção de salina ou CoCl_2 no CPFmE e serem expostos ao estresse de contenção ou de derrota social está mostrado na figura 3.

A ANOVA bifatorial não mostrou qualquer efeito dos fatores tratamento [$F(1,61) = 1.88$; $p = 0,17$] ou estresse [$F(2,61) = 1.29$; $p = 0,28$], mas evidenciou um efeito da interação tratamento x estresse ($F(2,61) = 3,88$; $p = 0,03$) na %EBA. Um perfil muito semelhante foi revelado pelo mesmo teste para a %TBA [fator tratamento: $F(1,61) = 3,41$; $p = 0,07$; fator estresse: $F(2,61) = 1,50$; $p = 0,23$; interação tratamento x tempo: $F(2,61) = 4,23$; $p = 0,02$]. O post hoc Duncan mostrou que a injeção de CoCl_2 intra-CPFmE reduziu ambas as porcentagem de entrada e de tempo nos braços abertos, mas apenas para os camundongos socialmente derrotados em comparação com todos os grupos (%EBA: $p \leq 0,04$; %TBA: $p \leq 0,02$). Com relação à frequência de entradas nos braços fechados, a ANOVA bifatorial revelou um efeito significativo do fator estresse [$F(2,61) = 3,87$; $p = 0,03$] mas não do fator tratamento [$F(1,61) = 1,89$; $p = 0,17$] ou da interação dos dois fatores [$F(2,61) = 1,08$; $p = 0,34$]. Comparações *post hoc* mostraram que o camundongos derrotados tiveram uma menor frequência de entradas nos braços fechados que os animais que passaram pela contenção ou que não foram estressados ($p < 0,05$)

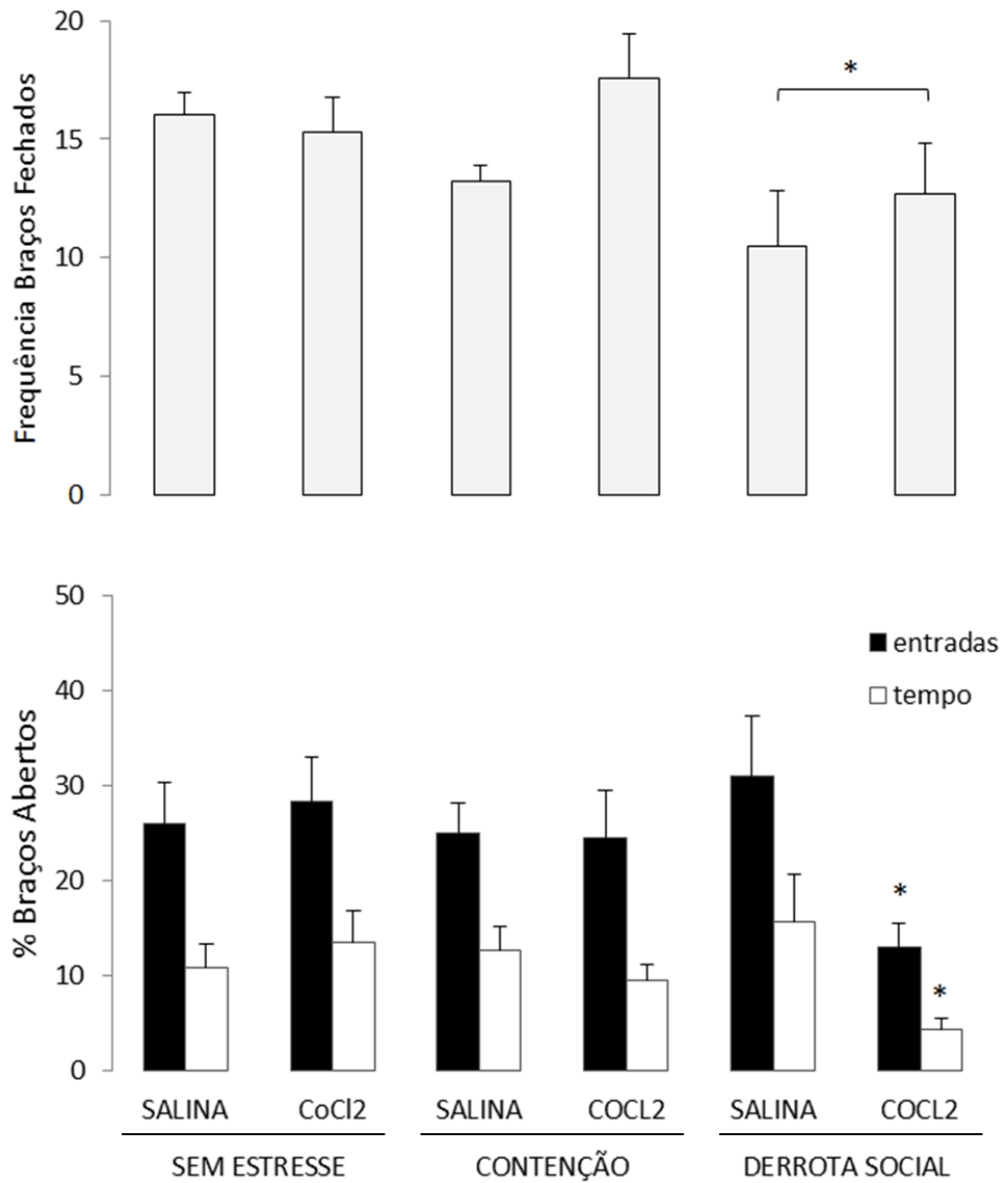


Figura 3. Efeitos da injeção de CoCl_2 (0 ou 1 mM) no CPFmE em combinação com derrota social ou contenção sobre a frequência de entradas nos braços fechados (painel superior), porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos (painel inferior) em camundongos expostos ao LCE 24 h após o estresse. $N = 7-14$ por grupo. * $p < 0,05$ em comparação a todos os grupos.

4.4 Experimento 3. Efeitos da microinjeção de AP7 no CPFm Direito no comportamento defensivo de camundongos expostos ao LCE

Os efeitos das microinjeções de AP7 intra-CPFm Direito de camundongos sobre o comportamento defensivo exibido no LCE estão mostrados na figura 4.

A análise de variância ANOVA monofatorial seguida pelo teste post hoc Duncan revelou que a injeção de AP7 intra-CPFmD provocou um efeito do tipo ansiolítico, aumentando %EBA (nas doses 0,1 e 0,2 nmol) [$F(3,29) = 4,09$; $p < 0,05$] e %TBA (apenas na dose 0,1 nmol) [$F(3,29) = 2,62$; $p = 0,05$], sem alterar a exploração dos braços fechados [$F(3,29) = 1,46$; $p > 0,05$], indicando ausência de efeitos sobre a atividade locomotora. É válido destacar que a microinjeção de AP7 na dose de 0,05 nmol não provocou qualquer efeito seja sobre os comportamentos relacionados à ansiedade, seja na locomoção.

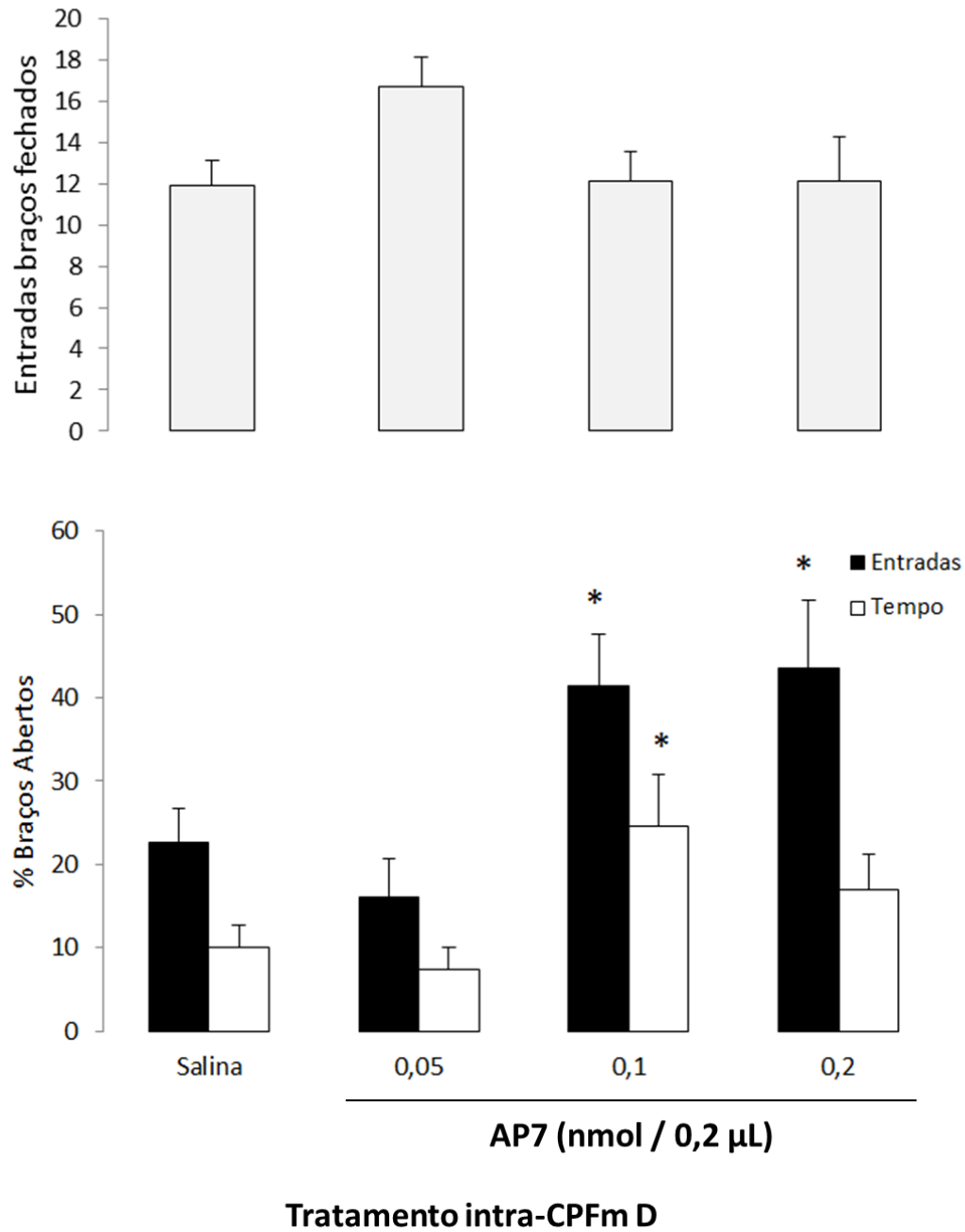


Figura 4. Efeitos da injeção de AP7 (0,05; 0,1 ou 0,2 nmol) no CPFmD sobre a frequência de entradas nos braços fechados (painel superior), porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos (painel inferior) em camundongos expostos ao LCE. N: 6-12; *p < 0,05 comparado ao grupo controle.

4.5 Experimento 4. Efeitos do antagonismo de receptores NMDA sobre a ansiogênese induzida por NOC-9 no CPFmD em animais expostos ao LCE

Para dar prosseguimento ao experimento 4, foi utilizada a dose de AP7 que não causou qualquer efeito por si sobre a ansiedade (0,05 nmol), obtida no experimento 3.

O comportamento de camundongos que passaram pelo tratamento intra-CPFmD com NOC-9 ou seu veículo após receberem injeção de AP7 ou salina podem ser observados na figura 5.

A ANOVA bifatorial [fator 1 – pré-tratamento (salina ou AP7); fator 2 – tratamento (Tris ou NOC-9)] revelou efeito de ambos os fatores e da interação na %EBA: $F(1,31) < 11,99$; $p < 0,05$. Com relação ao tempo gasto nos braços abertos, o teste de variância mostrou um efeito *borderline* apenas para o tratamento ($F(1,31) = 2,8$; $p = 0,09$) [fator pré-tratamento: $F(1,31) = 2,55$; $p > 0,1$; interação pré-tratamento x tratamento: $F(1,31) = 1,54$; $p > 0,1$]. As análises post hoc de Duncan revelaram que as injeções de NOC-9 provocaram efeito ansiogênico, com redução da exploração dos braços fechados (%EBA e %TBA; $p \leq 0,05$), mas apenas em animais não pré-tratados com AP7. Em outras palavras, houve reversão do efeito pró-aversivo induzido pelo NOC-9. Com relação à atividade locomotora, nenhuma intervenção alterou a exploração dos braços fechados [$F(1,31) \leq 0,87$; $p \geq 0,35$].

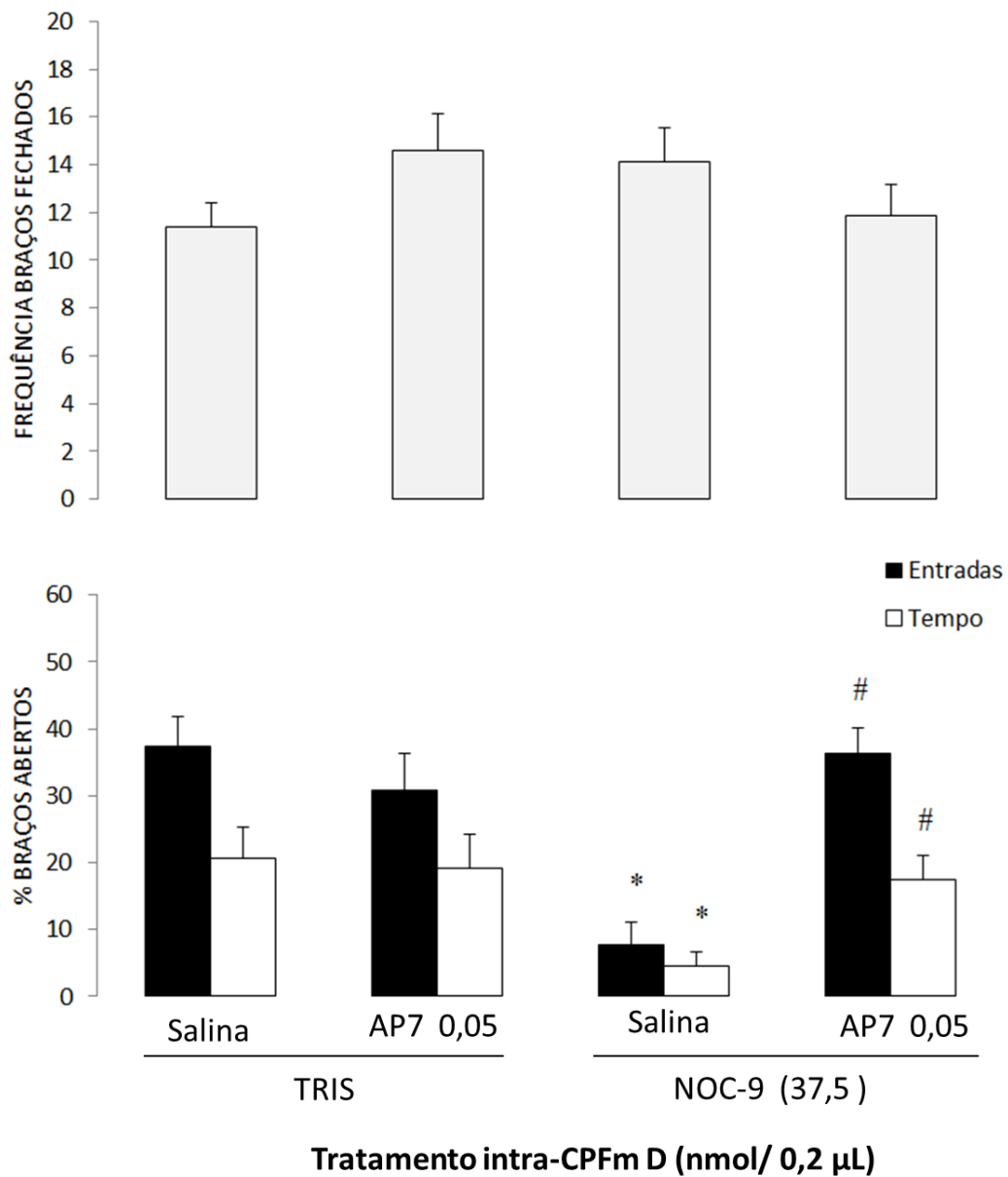


Figura 5. Efeitos do bloqueio de receptores NMDA (AP7: 0,05 nmol) injetado no CPFmD sobre os efeitos ansiogênicos produzidos por doador de NO (NOC-9; 37,5 nmol) em camundongos expostos ao LCE. Painel superior: frequência de entradas nos braços fechados. Painel inferior: porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos. N= 9-10; *p <0,05 comparado ao grupo controle; #p <0,05 comparado ao grupo SAL+NOC-9

5 DISCUSSÃO

Os experimentos desenvolvidos neste estudo tiveram por base a busca por aumentar a compreensão sobre a lateralização funcional do córtex pré-frontal medial e seu papel na modulação de respostas comportamentais desencadeadas por estímulos aversivos.

Resultados anteriores de nosso grupo de pesquisa mostraram que a facilitação nitrérgica (através do NOC-9, doador de NO) do CPFm Direito promove efeitos ansiogênicos, enquanto a mesma facilitação concomitante no CPFm Esquerdo impede que tais efeitos apareçam. Além disso, a inativação temporária (através do bloqueador sináptico CoCl_2) do CPFm direito ou esquerdo promove, respectivamente, efeitos ansiolítico e ansiogênico (COSTA, 2014). Assim, parece que a ativação nitrérgica 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. Baseados nessas evidências, investigamos se a inibição do CPFmE poderia modular o efeito de dois tipos de estresse (a contenção e a derrota social) sobre a ansiedade. Para isso, primeiro foram investigados os efeitos desses dois estressores nos comportamentos relacionados à ansiedade de camundongos expostos ao LCE 5 minutos ou 24 h após o estresse. Assim, ambos os estressores produziram um efeito do tipo ansiogênico agudo, que resultou em diminuição da exploração dos braços abertos pelos animais expostos ao LCE 5 minutos após o estresse. No entanto, os efeitos da contenção ou da derrota social em camundongos expostos ao LCE 24h após não foram claros. De fato, embora o estresse de contenção tenha produzido um fraco efeito ansiogênico (i.e., reduzindo apenas a %EBA), a derrota social não alterou os índices de ansiedade 24 h após o estresse, podendo ser sugerido que esses dois tipos de estressores não provocam efeitos ansiogênicos duradouros. Em outras palavras, em 24 h após a exposição ao estresse, os animais exibem resiliência ao efeito ansiogênico induzido, particularmente, pela derrota social.

No experimento 2, foi investigado se o CPFmE teria um papel na habilidade dos animais em lidar (do inglês, *cope*) com os efeitos aversivos do estresse. Como mostrado na figura 3, a inibição do CPFmE seguida pelo estresse de derrota social resultou em efeitos ansiogênicos em camundongos expostos ao LCE 24h depois. O estresse de derrota social também levou a uma diminuição na locomoção geral, representada pelas baixas frequências nas entradas nos braços fechados, um efeito independente da injeção de fármaco. Juntos, estes

resultados sugerem que o efeito ansiogênico induzido pela derrota social 24 h após o estressor depende da inibição química do CPFmE. De modo interessante, o tratamento com CoCl_2 no CPFmE não alterou os índices de ansiedade em animais não estressados ou que passaram pelo estresse de contenção. A ausência de efeitos observada com a inibição do CPFmE na ansiedade de animais não estressados era esperada, uma vez que (I) o efeito inibidor deste bloqueador sináptico dura por aproximadamente 30-60 min (LOMBER, 1999) e (II) o teste no LCE foi conduzido apenas 24 h após a inibição do CPFmE. De modo contrário, não há, ainda, uma explicação clara para a ausência de efeitos da combinação da inibição do CPFmE com o estresse de contenção sobre a ansiedade dos camundongos expostos ao LCE. Todavia, um estudo recente publicado por Motta e Canteras (2015) demonstrou que o padrão de ativação neural pode ser diferente para animais que passaram por estresse de contenção do que para os que passam pela derrota social. Embora esse estudo tenha também descrito que a contenção e a derrota social apresentem semelhanças na ativação neural, isto é, expressão de FOS, em regiões do circuito hipotalâmico de defesa, seus autores destacaram que ratos socialmente derrotados (mas não os que passaram pela contenção) recrutam elementos do circuito hipotalâmico medial relacionado com responsividade a coespecíficos, o qual também está envolvido em outras formas de interação social (CANTERAS, 2012). Deste modo, parece ser crucial que a lateralização dessa estrutura límbica deve ser considerada.

Sullivan e Gratton (1999) enfatizaram que o CPFm tem uma função lateralizada na modulação de respostas induzidas pelo estresse em ratos. De acordo com eles, o CPFmD tem um papel na modulação das respostas fisiológicas induzidas pelo estresse (i.e. ativação do eixo HPA). Além disso, Cerqueira et al. (2008) postularam que embora o CPFmE coordene funções motoras, o CPFmD modula respostas afetivas e emocionais ao estresse repetido. Ainda, de acordo com Czéh et al. (2008), o CPFm apresenta assimetria celular intrínseca, e seu hemisfério esquerdo exerce um papel dominante no controle da resposta ao estresse em ratos. Neste mesmo sentido, Sullivan e Gratton (2002) sugerem que o CPFmE está mais envolvido na regulação do controle imediato ao estresse, otimizando os cuidados e comportamentos adaptativos em situações potencialmente ameaçadoras. Os resultados apresentados por Costa (2014), parecem corroborar essas observações, uma vez que mostram que a ativação nitrérgica do CPFmD, mas não de ambos CPFm direito e esquerdo, é ansiogênica. As respostas observadas no experimento 2, particularmente no que diz respeito ao estresse de derrota social, convergem com essa linha de evidência, uma vez que a inibição do CPFmE no momento do estresse resulta em aumento de comportamentos relacionados à

ansiedade 24h depois. Em outras palavras, parece que a integridade funcional do CPFmE é crucial para que o indivíduo se recupere de respostas negativas desencadeadas por situações aversivas (e.g. aumento de ansiedade) 24 h após o estresse, o que pôde ser observado nos animais que passaram pelo estresse sem a inibição cortical (grupo salina + derrota social, experimento 2 – figura 3; grupo derrota social 24h experimento 1 – figura 2). Neste mesmo sentido, Lee e colaboradores (2015) demonstraram (através de um protocolo que permite classificar camundongos quanto à resiliência x susceptibilidade ao confronto agonístico) que os animais susceptíveis ao estresse de derrota social (i.e. diminuição de interação social) voltam a interagir socialmente quando é feita fotoativação de neurônios do CPFmE e, por outro lado, a fotoinativação desses neurônios induz evitação social em animais resilientes às agressões do oponente. Ainda, Cerqueira et al. (2008) discutem que o estresse crônico leva à atrofia dendrítica do CPFm esquerdo, culminando no aparecimento de efeitos comportamentais negativos. Sendo assim, é racional sugerir que além da atividade do CPFmE ser determinante para a habilidade de se recuperar de eventos estressores agudos, é possível que a inibição do CPFmE no momento do estresse (exp. 2) tenha mimetizado os efeitos do estresse prolongado, causando o aumento dos índices de ansiedade no LCE.

Os experimentos 3 e 4 visaram investigar o mecanismo pelo qual a facilitação nitrérgica no CPFmD promove o aumento de ansiedade, com enfoque na participação de receptores do tipo NMDA do glutamato. Para tanto, inicialmente foi feita a microinjeção intra-CPFmD de AP7, antagonista de receptores NMDA, em diferentes doses: 0,05, 0,1 e 0,2 nmol (experimento 3). Os resultados deste experimento mostraram um perfil ansiolítico promovido pelo bloqueio dos receptores glutamatérgicos, com a dose intermediária (0,1 nmol) produzindo o maior efeito observado (aumento da exploração dos braços abertos em porcentagem de entradas e tempo de permanência). Esses resultados vão ao encontro de diversos trabalhos que demonstram que a inibição aguda da neurotransmissão glutamatérgica promove efeitos ansiolíticos no CPFm (e.g. RESSTEL, 2008; LISBOA 2011) e em outras estruturas relacionadas com a ansiedade [como BNST (FARIA, 2016) e PAG (GUIMARÃES, 1994)]. Todavia, na maioria dos trabalhos encontrados relacionados ao CPFm, as intervenções são aplicadas bilateralmente, sem especificar os hemisférios D e/ou E, sendo este um diferencial do presente estudo. Nossos resultados sugerem que o glutamato tenha um papel tônico na modulação da ansiedade, por meio da ação em receptores NMDA localizados no CPFm D.

A menor dose de AP7 utilizada no estudo, 0,05 nmol, não alterou os comportamentos relacionados à ansiedade e, por esse motivo, foi escolhida para a investigação dos efeitos do bloqueio de receptores NMDA sobre o aumento de comportamentos defensivos eliciados pelo tratamento intra-CPFmD de NOC-9 (doador de NO; 37,5 nmol), no experimento 4. Conforme foi demonstrado anteriormente (COSTA, 2014), a microinjeção de NOC-9 no CPFmD provocou diminuição da exploração das áreas desprotegidas do LCE, reproduzindo o efeito ansiogênico já esperado. No entanto, quando injetado antes do NOC-9, o AP7 (0,05 nmol), reverteu os efeitos ansiogênicos induzidos pelo doador de NO em animais expostos ao LCE, sugerindo assim que a produção de NO estimula a liberação de glutamato, o que leva ao aumento dos comportamentos defensivos. De maneira semelhante, recentemente, Faria e colaboradores (2016) demonstraram que o tratamento com AP7 atenuou os efeitos ansiogênicos induzidos pelo NO em outra estrutura relacionada à ansiedade, o BNST. Todavia, tais efeitos também foram atenuados pelo bloqueio de receptores de CRF1, sugerindo que, além do glutamato, o NO pode recrutar outros neurotransmissores na modulação das reações defensivas. Esse mecanismo merece ser investigado no CPFm, sobretudo porque já foi demonstrado um papel do CRF na modulação tônica da ansiedade no CPFm (MIGUEL; GOMES; NUNES DE SOUZA, 2014). Além disso, deve ser considerado que o NO também interfere na liberação de outros neurotransmissores, como acetilcolina, dopamina, serotonina e GABA (de Oliveira et al., 2000; Moreira and Guimarães, 2004; Moreira et al., 2004), os quais são potenciais candidatos para a modulação da ansiedade.

Sabe-se, porém, 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 importante relação entre alterações nessa neurotransmissão e a fisiopatologia de transtornos de ansiedade e de humor, sobretudo no que diz respeito à função dos receptores NMDA (para revisão, ver SANACORA TRECCANI; POPOLI, 2012). Ainda, diferentes estressores aumentam a liberação de glutamato 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). Dessa maneira, considerando todos os resultados do presente estudo, é possível que a hipofuncionalidade do CPFmE, de alguma forma (direta ou indiretamente), leve a uma desregulação da neurotransmissão glutamatérgica no CPFmD, promovendo um descontrole comportamental

frente a situações aversivas. Se realmente assim, novos estudos são necessários para o melhor entendimento desses processos.

6 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram que a exposição aguda ao estresse de derrota social ou ao de contenção promove efeitos ansiogênicos a curto prazo (imediatamente após o estresse), mas não é capaz de gerar efeitos duradouros (i.e. 24 h após o estresse). Ainda, a integridade do CPFmE no momento do evento estressor parece ser crucial para os animais lidarem (*coping*) com a situação e restaurarem os níveis basais de ansiedade 24 h depois, uma vez que a inativação concomitante ao estresse culmina em aumento dos comportamentos defensivos, particularmente se os animais forem expostos à derrota social (mas não ao estresse de contenção).

Pode-se concluir também que o glutamato, através de receptores do tipo NMDA do CPFmD, exerce um papel tônico na modulação da ansiedade, uma vez que o antagonismo NMDA promove efeitos ansiolíticos. Ainda, tais receptores participam do efeito ansiogênico promovido pela facilitação nitrérgica nessa estrutura, sugerindo que o NO promove a liberação de GLU durante eventos aversivos (e.g., LCE).

Finalmente, os resultados obtidos substanciam a hipótese da lateralização funcional do CPFm, em que os hemisférios direito e esquerdo parecem possuir diferentes participações na modulação de eventos aversivos. Contudo, faz-se necessário aprofundar os estudos sobre o envolvimento dessas estruturas (CPFmD e E) nas alterações induzidas pelo estresse.

REFERÊNCIAS

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

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.

BJÖRKQVIST, K. Social defeat as a stressor in humans. **Physiology & Behavior**, v. 73, n. 3, p. 435-442, 2001.

BLANCHARD, R. J. et al. Defensive system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. **Behavioral Brain Research**, v. 58, n. 1-2, p. 155-65, 1993.

BUYNITSKY, T.; MOSTOFSKY, D.I. Restraint stress in biobehavioral research: recent developments. **Neuroscience Biobehavioral Reviews**, v. 33, n. 7, p. 1089-98, 2009

CANTERAS, N.S. Hypothalamic goal-directed behavior digestive, reproductive and defensive. In: WATSON, C., PAXINOS, G., PUELLES, L. (Eds.), **The Mouse Nervous System**. Academic Press, Sidney, p. 539-562. 2012

CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxietylike behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. **Neuroscience Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 8, p. 1193-1205, 2005.

CARVALHO-NETO, E. F. Medo e Ansiedade: aspectos comportamentais e neuroanatômicos. **Arquivos médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo**, v. 54(2), p. 62-5, 2009

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.

CHADE, J. Brasil é o país mais depressivo da América Latina, diz OMS. **O Estado de S. Paulo**, São Paulo. 23 fev. 2017. Disponível em: <http://saude.estadao.com.br/noticias/geral,brasil-e-o-pais-que-mais-sofre-com-depressao-na-america-latina,70001676638> Acesso em: 25 fev. 2017.

CHARBONNEAU, H. et al. Identification of a noncatalytic cGMP-binding domain conserved in both the cGMP-stimulated and photoreceptor cyclic nucleotide phosphodiesterases.

Proceedings of the National Academy of Sciences U S A, v. 87, n. 1, p. 288-92, Jan 1990. ISSN 0027-8424 (Print)

COSTA, N. S. **Avaliação farmacológica do papel do córtex pré-frontal medial no comportamento defensivo de camundongos**. 2014. 49 fl. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Araraquara, 2014.

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

CZEH, 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.

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

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

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

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

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

FRANKLIN, T. B. et al. Neural mechanisms of stress resilience and vulnerability. **Neuron**, v. 75, n. 5, p. 747–61, 2012.

FRIEBE, A.; KOESLING, D. Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. **Circulation Research**, v. 93, n. 2, p. 96-105, 2003.

GALLY, J.A. et al. The NO hypothesis: possible effects of a short-lived, rapidly diffusible signal in the development and function of the nervous system. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.87, p. 3547-51, 1990.

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

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.

GRAY, J.A.; McNAUGHTON, N. The Neuropsychology of Anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system, **2a Ed. Oxford: Oxford University Press**, 2000.

GROSS, C.; REN, H. The developmental origin of anxiety. **Nature Reviews Neuroscience**, v.5, p. 646-62, 2004.

GRUBER, A. J. et al. More is less: a disinhibited prefrontal cortex impairs cognitive flexibility. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 50, p. 17102-10, 2010.

GUIMARÃES, F. S. et al. Anxiolytic effect in the elevated plus-maze of the NMDA receptor antagonist AP7 microinjected into the dorsal periaqueductal grey. **Psychopharmacology**, v. 113, p. 565-569, 1994.

GUIX, F. X. et al. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. **Progress in Neurobiology**, v. 76, n. 2, p. 126-52, 2005.

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

HERESCO-LEVY, U. Glutamatergic neurotransmission modulation and the mechanisms of antipsychotic atypicality. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 27, n. 7, p. 1113-23, 2003

HESS, W.R.; BRÜGGER, M. Das subkortikale zentrum der affectiven abwerreaktion. **Helvetica Physiologica et Pharmacologica Acta**, v.1, p. 33-52, 1943

HUNTLEY, G. W.; VICKERS, J.C.; MORRISSON, J.H. Cellular and synaptic localization of NMDA and non-NMDA receptor subunits in neocortex: organizational features related to cortical circuitry, function and disease. **Trends in Neuroscience**, v. 17, n. 12, p. 536–543, 1994

GRAY, J. A.; MCNAUGHTON, N. **The Neuropsychology of Anxiety: An Enquiry into the Functions of the Septo-Hippocampal System**. Second ed. New York: Oxford University Press, 2000.

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

KAUPP, U. B. The cyclic nucleotide-gated channels of vertebrate photoreceptors and olfactory epithelium. **Trends in Neuroscience**, v. 14, n. 4, p. 150-7, 1991.

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

KRUMENACKER, J.S.; HANAFY, K.A.; MURAD, F. Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase. **Brain Research Bulletin**, v. 62, p. 505-15, 2004.

LAVIOLA, G. et al. Psychobiological risk factors for vulnerability to psychostimulants in human adolescents and animal models. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, n. 7, p.993-1010, 1999.

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

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

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

LITVIN, Y. et al. CRF type 1 receptors in the dorsal periaqueductal gray modulate anxiety-induced defensive behaviors. **Hormones and Behavior**, v. 52, n. 2, p. 244-51, 2007

LOHSE, M. J.; FORSTERMANN, U.; SCHMIDT, H. H. Pharmacology of NO:cGMP signal transduction. **Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology**, v. 358, n. 1, p. 111-2, 1998

LOMBER, S.G. The advantages and limitations of permanent or reversible deactivation techniques in the assessment of neural function. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 86, n. 2, p. 109-117, 1999.

MAREN, S.; HOLMES, A. Stress and fear extinction. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 1, p. 58-79, 2016. doi:10.1038/npp.2015.180; published online 29 July 2015

MAYER, B. et al. Brain nitric oxide synthase is a bipterin- and flavin-containing multifunctional oxide-reductase. **FEBS Letters**, v. 288, n. 1-2, p. 187-91, 1991.

MARKHAM, C. M. et al. Effects of D-amphetamine on defensive behaviors related to fear and anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 83, n. 4, p. 490-9, 2006.

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. 17180–85, 2012.

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.J. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.28, 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

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

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

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

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

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

MOTTA, S.C., CANTERAS, N.S. Restraint stress and social defeat: what they have in common. **Physiology and Behavior**, v. 146, p. 105-110, 2015

NAKAMURA, T.; GOLD, G. H. A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. **Nature**, v. 325, n. 6103, p. 442-4, 1987

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

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

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

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

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

RESSTEL, L.B., CORRÊA, F.M., GUIMARÃES, F.S. The expression of contextual fear conditioning involves activation of an NMDA receptor-nitric oxide pathway in the medial prefrontal cortex. **Cerebral Cortex**, v. 18, n. 9, p. 2027-2035, 2008

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.

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

SCHEIGHOFER, N., FERRIOL, G., Diffusion of nitric oxide can facilitate cerebellar learning: a simulation study. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.97, p.10661–10665, 2000.

SCHMIDT, H. H.; LOHMANN, S. M.; WALTER, U. The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1178, n. 2, p. 153-75, 1993.

SCHUMAN, E.M., et al. An ADP-ribosyltransferase as a potential target for nitric oxide action in hippocampal long-term potentiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.91, p.11958-62, 1994.

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

SELYE, H. Stress and the general adaptation syndrome. **British Medical Journal**, v. 1 (4667), p. 1383-1392, 1950.

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

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

STEEL, Z. et al. The global prevalence of common mental disorders: a systematic review and meta-analysis 1980–2013. **International Journal of Epidemiology**, 2014, v. 43, n. 2, p. 476–493, 2014

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.

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

SUZUKI, S. et al. The infralimbic and prelimbic medial prefrontal cortices have differential functions in the expression of anxiety-like behaviors in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 304, p. 120–124, 2016.

VALZELLI, L (Ed.). **Psychobiology of aggression and violence**, New York: Raven Press, 1981. 262 p.

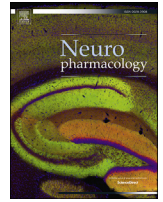
VERMETTEN, E.; BREMNER, J.D. Circuits and systems in stress. II. Applications to neurobiology and treatment in posttraumatic stress disorder. **Depression and Anxiety**, v. 16, n. 1, p. 14-38, 2002.

YANG, M. et al. The rat exposure test: a model of mouse defensive behaviors. **Physiology and Behavior**, v. 81, n. 3, p. 465-73, 2004.

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.

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

APÊNDICE



Functional lateralization of the medial prefrontal cortex in the modulation of anxiety in mice: Left or right?



N.S. Costa^{a, c}, M.A. Vicente^a, A.C. Cipriano^{a, c}, T.T. Miguel^{a, b}, R.L. Nunes-de-Souza^{a, c, *}

^a Lab. Pharmacology, School of Pharmaceutical Sciences, Univ. Estadual Paulista, UNESP, Araraquara, SP, 14801-902, Brazil

^b Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Uberlândia (UFU), Uberlândia, MG, Brazil

^c Joint UFSCar-UNESP Graduate Program in Physiological Sciences, Araraquara, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 December 2015

Received in revised form

4 April 2016

Accepted 10 April 2016

Available online 11 April 2016

Keywords:

Anxiety

Functional lateralization

Mice

mPFC

Stress

ABSTRACT

It has been suggested that the left medial prefrontal cortex (LmPFC) has an inhibitory role in controlling the right mPFC (RmPFC), thereby reducing the deleterious effects of stressors on emotional states. Here, we investigated the effects on anxiety of bilateral or unilateral injections of NOC-9 [a nitric oxide (NO) donor] and cobalt chloride (CoCl₂; a synaptic inhibitor) into the mPFC of mice exposed to the elevated plus-maze (Experiments 1 and 2). The effects of restraint or social defeat on anxiety in undrugged mice were recorded at 5 min or 24 h after exposure to the stress (Experiment 3). Experiment 4 investigated the effects of LmPFC injection of CoCl₂ combined with restraint or social defeat on anxiety, which was recorded 24 h later. Although intra-RmPFC NOC-9 produced anxiogenesis, its injection into the LmPFC, or bilaterally, did not change anxiety. Intra-RmPFC or -LmPFC injection of CoCl₂ produced anxiolytic- and anxiogenic-like effects, respectively. Both restraint and social defeat produced anxiogenesis at 5 min, but defeated mice did not display anxiety 24 h after the stress. Although intra-LmPFC CoCl₂ did not change anxiety, which was recorded 24 h later in non-stressed mice, this synaptic inhibitor produced a clear, anxiogenic-like effect in defeated (but not restrained) mice. These results suggest that (i) nitric oxide activation of the RmPFC increases anxiety, which in turn is inhibited by NO production within the LmPFC; (ii) neuronal inhibition of the RmPFC or LmPFC elicits anxiolysis and anxiogenesis, respectively; and (iii) inactivation of the LmPFC results in recrudescence of anxiety induced by social defeat stress.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Dysfunctions of the medial prefrontal cortex (mPFC) have long been related to psychiatric disorders, such as depression and anxiety. This limbic area is involved in memory (Euston et al., 2012), decision-making (Bechara and Damasio, 2002), cognitive flexibility (Gruber et al., 2010), executive cognition (Yuan and Raz, 2014), social interaction and emotional processing (Damasio, 2000). The mPFC shows dense reciprocal connections with other areas [e.g., amygdala, hippocampus, hypothalamus, dorsal raphe, and midbrain periaqueductal gray (e.g., Euston et al., 2012)], which facilitates its ability to modulate fear and anxiety states (Courtin et al., 2013; Gold et al., 2015). Previous studies have shown that a lesion of the mPFC decreases anxiety-related behavior in rats

exposed to the elevated plus maze (EPM) (Gonzalez et al., 2000; Lacroix et al., 2000; Shah and Treite, 2003) and increases social interaction (Gonzalez et al., 2000; Shah and Treite, 2003). These results have emphasized the importance of the mPFC as a potential target for the effects of anti-anxiety drugs (e.g., McNaughton and Corr, 2004; Jaferi and Bhatnagar, 2007; Holmes and Wellman, 2009).

It has been reported that hemispheric lateralization of the PFC is involved in the control of emotional processing in humans (Davidson, 1998). Studies have shown that the mPFC has a lateralized role in the modulation of neuroendocrine and autonomic responses to stress in various mammals. For instance, right or bilateral (but not left) lesions of the mPFC reduce the corticosterone peak induced by restraint stress in rats (Sullivan and Gratton, 1999). In addition, chronic stress situations have been related to volumetric and functional alterations of the mPFC, which appears to be lateralized, with hyperactivation of the right mPFC and decreased left mPFC activity (Cerqueira et al., 2008; Davidson, 1998; Johnstone et al., 2007). Moreover, the left mPFC has inhibitory control over the

* Corresponding author. Lab. Farmacologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Rodovia Araraquara-Jaú, Km 01, 14800-903 Araraquara, SP, Brazil.

E-mail addresses: souzarn@fcar.unesp.br, ricardo.souza@pq.cnpq.br (R.L. Nunes-de-Souza).

right mPFC under basal conditions. According to [Cerqueira et al. \(2007\)](#), dysfunction of the mPFC can be related to the loss of resilience, thereby contributing to the triggering of maladaptive responses. This finding suggests that understanding the underlying mechanisms of these mPFC hemispheric specializations would be useful for understanding how other potential treatments function (e.g., repetitive transcranial magnetic stimulation over left or right frontal cortex).

Several neurotransmitters (e.g., monoamines, GABA, glutamate, and endocannabinoids) are involved in the modulation of anxiety-related responses (e.g., [Carobrez et al., 2001](#); [Fogaça et al., 2012](#); [Molchanov and Guimarães, 2002](#); [Vianna et al., 2001](#)). Additionally, the atypical neurotransmitter nitric oxide (NO) has been shown to be an important pro-aversive gas in areas of the brain defense system (for a review, see [Guimarães et al., 2005](#)). NO is produced by the nitric oxide synthase (NOS) enzyme, through the conversion of L-arginine to L-citrulline, using nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) and Ca^{2+} as co-factors ([Mayer et al., 1991](#); [Lohse et al., 1998](#)). Sympathetic (“fight or flight”) reactions have been demonstrated after injection of NO donors [e.g., SIN-1 (3-morpholino-sylnomine hydrochloride) and NOC-9 (6-(2-Hydroxy-1-methyl-2-nitrosohydrazino)-N-methyl-1-hexanamine)] into the midbrain periaqueductal gray (PAG) in rats ([Guimarães et al., 2005](#)) and mice ([Miguel et al., 2012](#)) and into the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) in mice ([Faria et al., 2016](#)). Unlike SIN-1, which produces peroxynitrite, thereby provoking cytotoxic effects and causing other NO-independent cellular effects ([Del Carlo and Loeser, 2002](#); [Morot Gaudry-Talarmain et al., 1997](#)), NOC-9 is relatively stable at an alkaline pH (>10.0) and produces NO at a physiological pH (7.4), without producing peroxynitrite ([Ambalavanan et al., 1999](#); [Del Carlo and Loeser, 2002](#); [Seccia et al., 1996](#)).

In addition to nitroergic activation, electrolytic and chemical lesions have been extensively used to investigate the role of a brain area in the modulation of emotional responses. However, many of these procedures produce more permanent damage to a structure. To avoid this problem, several studies have used cobalt chloride (CoCl_2) as a chemical tool to investigate the role of a selected brain structure in the modulation of various emotional responses (e.g., [Crestani et al., 2009, 2010](#); [Scopinho et al., 2010](#); [Tavares and Corrêa, 2006](#)). CoCl_2 reduces presynaptic calcium influx by competing with this bivalent cation, thereby inhibiting reversible neurotransmitter release ([Kretz, 1984](#)). The duration of action of CoCl_2 is relatively short (approximately 30–60 min) and this synaptic inhibitor does not alter the function of the fibers of passage ([Lomber, 1999](#)), which results in a more accurate evaluation of a specific brain structure function.

Thus, using intracerebral injections of NOC-9 or CoCl_2 , the present study investigated the role of the mPFC in anxiety in mice exposed to the EPM. The effects of nitroergic activation of the mPFC were observed after unilateral (into the right or left mPFC) and bilateral injections of the NO donor (experiment one). In experiment two, we investigated whether the right or left mPFC inhibition would change the basal levels of anxiety. Then, in experiment three, the influence of the two types of stressors (restraint and social defeat) on anxiety was evaluated at 5 min or 24 h after stress exposure. Finally, the effect of restraint or social defeat stress, in combination with left mPFC inhibition, on anxiety was investigated at 24 h in mice exposed to the EPM (experiment four).

2. Materials and methods

2.1. Subjects

Two hundred and fifty one male Swiss mice (Univ. Estadual Paulista — UNESP, SP, Brazil) weighing 25–35 g at testing were

used in this study. Mice were housed in groups of 10 per cage (size: $41 \times 34 \times 16$ cm) and maintained under a normal 12-h light cycle (lights on at 7:00 a.m.) in a temperature-controlled environment (23 ± 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 Science/UNESP, which complies with Brazilian and international guidelines for animal use and welfare.

2.2. Drugs

The following drugs were used: Cobalt chloride (CoCl_2 – nonspecific synaptic blocker – 1.0 mM/0.2 μL -dissolved in 0.9% physiological saline solution); NOC-9 [6-(2-hydroxy-1-methyl-2-nitrosohydrazino)-N-methyl-1-hexanamine – NO donor – 9.37, 18.75, 37.5 or 75 nmol/0.2 μL - dissolved in vehicle (1 M Tris-HCl solution, pH 10), to prevent NO release before it reaches brain tissue]. Doses were based on previous studies ([Miguel et al., 2012](#); [Resstel et al., 2004](#)).

2.3. Surgery and microinjection

Each mouse was bilateral or unilaterally implanted with a 7 mm stainless steel guide cannulae (26 gauge; Insight Equipamentos Científicos Ltd., Brazil) into the mPFC under anesthesia induced by intraperitoneal injection of ketamine (100 mg/kg) plus xylazine (10 mg/kg). Guide cannulae were fixed to the skull with dental acrylic and jeweler's screws. Stereotaxic coordinates ([Paxinos and Franklin, 2001](#)) for the mPFC were, respectively, 1.7 mm anterior to bregma, + and/or – 0.3 mm lateral to the midline for left and right hemispheres, respectively, and 2.1 mm ventral to the skull surface, with the guide cannulae in the vertical position. 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 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 μL 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 μL . The successful procedure was verified by monitoring the movement of a small air bubble in the PE-10 tubing.

2.4. 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 (5×5 cm). The apparatus was constructed from wood (floor) and transparent glass (clear walls) and was raised to a height of 38.5 cm above floor level. After drug injection (see Experiments 1, 2 and 4 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 normal laboratory illumination (1 × 60 W yellow incandescent lamp positioned approximately 1.80 m above the EPM floor), during the light phase of the light–dark cycle. All sessions were recorded by a vertically mounted camera linked to a monitor and DVD recorder. Test DVDs were scored using the software “X-plo-rat 2005”, developed by Dr. Morato's group at Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, USP at Ribeirão Preto, Brazil (the software can be freely downloaded at <http://scotty.ffclrp.usp.br/X-Plo-Rat.html>). Behavioral parameters comprised conventional spatiotemporal measures: frequencies of open and closed-arm entries (CE: entry = all four paws into an arm) and the time spent in the open arm of the maze. These data were used to calculate percentage of open-arm entries [(%OE) – (open/total) × 100] and percentage of time (%OT) (Rodgers and Johnson, 1995).

2.5. General procedure

2.5.1. Experiment 1: effects on behavior of NOC-9 injected bi- or unilaterally (the right or left) into the mPFC of mice exposed to the EPM

Five to seven days after surgery, mice were transported to the experimental room and left undisturbed for at least 30 min prior to testing. Vehicle (n = 14) or NOC-9 were injected into the right [9.37 (n = 11), 18.75 (n = 10), or 37.5 (n = 8) nmol/0.2 μL; Experiment 1A], bilaterally [vehicle (n = 11), 37.5 (n = 8) or 75 (n = 9) nmol/0.2 μL; Experiment 1B] or left [vehicle (n = 12), 37.5 (n = 9) or 75 (n = 10) nmol/0.2 μL; Experiment 1C] mPFC and, 5 min later, each animal was placed on the EPM to record the anxiety indices (%OE and %OT) and locomotion (CE) for a 5-min period.

2.5.2. Experiment 2: effects of CoCl₂ injected into the RmPFC or LmPFC on behavior of mice exposed to the EPM

Five to seven days after surgery, mice were transported to the experimental room and left undisturbed for at least 30 min prior to testing. Then, saline or CoCl₂ (1 mM, 0.2 μL) were injected into the LmPFC [Experiment 2A (saline: n = 10; CoCl₂: n = 11)] or RmPFC [Experiment 2B (saline: n = 12; CoCl₂: n = 12)] and, 10 min later, each mouse was exposed to the EPM to record the anxiety indices (%OE and %OT) and locomotion (CE) for a 5-min period.

2.5.3. Experiment 3: effects of restraint or social defeat on anxiety in mice exposed to the EPM at 5 min or 24 h after stress

Restraint stress consisted of placing a mouse in a plastic cylindrical restraining tube (2.8 cm inner diameter and 11.5 cm long) for a single 30-min period. Then, animals were returned to their home cages for a 5-min (n = 10) or 24-h (n = 9) period. During social defeat stress, mice (intruders) were individually placed into the home cage of an aggressive and dominant conspecific mouse (resident), which had previously been socially isolated for at least four weeks. The experimenter interrupted the resident mouse's attacks against the intruder mouse when the intruder mouse displayed a submissive posture [i.e., defensive upright posture: elevation of the body on its hind legs, front legs extended toward the aggressor, retracted head and arched ears (Miczek, 1982)] for at least 3 s. After that, each mouse was returned to its home cage for a 5-min (n = 12) or 24-h (n = 12) period. Both restrained and defeated mice were then individually exposed to the EPM. Then, anxiety indices (%OE and %OT) and locomotion (CE) were recorded during a 5-min test. Control groups included mice exposed to a familiar, non-aggressive mouse for a 5-min period before being

returned to their home cages. These groups were exposed to the EPM at 5 min (n = 12) or 24 h (n = 13) after the non-aggressive interaction.

2.5.4. Experiment 4: effects of combined intra-LmPFC injection of CoCl₂ and restraint or social defeat stress on anxiety-related behavior assessed 24 h later in mice exposed to the EPM

Ten minutes after microinjection of saline or CoCl₂ (0.2 μL) into the LmPFC, mice were subjected to restraint (saline: n = 13; CoCl₂: n = 7) or social defeat (saline: n = 12; CoCl₂: n = 14) stress, as described above (see experiment three). Then, animals were returned to their home cages and, 24 h later, each mouse was placed on the EPM to record anxiety indices (%OE and %OT) and locomotion (CE) for a 5-min period. Control groups also received saline (n = 10) or CoCl₂ (n = 11) in the LmPFC, but were exposed to a familiar, non-aggressive mouse for a 5-min period before being returned to their home cages for a 24-h period and exposure to the EPM.

2.6. Histological analysis

At the end of testing, all animals received an intra-mPFC infusion of 0.2 μL of 1% Evans blue using the same microinjection procedure as for the drugs. Animals were then sacrificed in a CO₂ chamber, their brains were removed, and the injection sites were viewed histologically by referencing the Atlas of Paxinos and Franklin (2001). Microinjections were considered valid when the injection units reached the pre-limbic or the Cg1 portions of the mPFC. Data from animals with injection sites outside these dorsal portions of the mPFC were excluded from the study.

2.7. Statistical analysis

All results were initially subjected to Levene's test for homogeneity of variance. Where Levene's test indicated significant heterogeneity, results were transformed to their log and then confirmed for homogeneity of variance before being subjected to Student *t*-test for independent samples (Experiment 2), one- (Experiments 1A–C) or two-way [Experiments 3 (factor 1: stress; factor 2: time) and 4 (factor 1: treatment; factor 2: stress condition)] analysis of variance (ANOVA) followed the post hoc Duncan test. In all cases, a difference with a *p* value ≤ 0.05 was accepted as significant. In Figs. 2–5 (see Results section), bars represent means (± SEM).

3. Results

3.1. Injections into the mPFC

Fig. 1 shows a schematic diagram (left) and a representative photomicrograph (right) of the micro-infusion sites within the mPFC of the mouse (Paxinos and Franklin, 2001). Although the mPFC is subdivided into cingulate (Cg1), prelimbic (PrL) and infralimbic (IL) portions (Paxinos and Franklin, 2001), in the present study, the injection sites were positively confirmed in the dorsal portion of the mPFC (Cg1 and PrL).

3.2. Experiments 1A–C: nitrgenic facilitation of the mPFC

3.2.1. Experiment 1A: anxiogenic-like effects of NOC-9 injected into the RmPFC

Fig. 2A shows the effects of intra-RmPFC injections of NOC-9 (0, 9.37, 18.75 or 37.5 nmol) on frequency of closed-arm entries (upper panel) and anxiety-like indices (lower panel) of mice exposed to the EPM for a 5-min period. One-way ANOVA followed by Duncan's

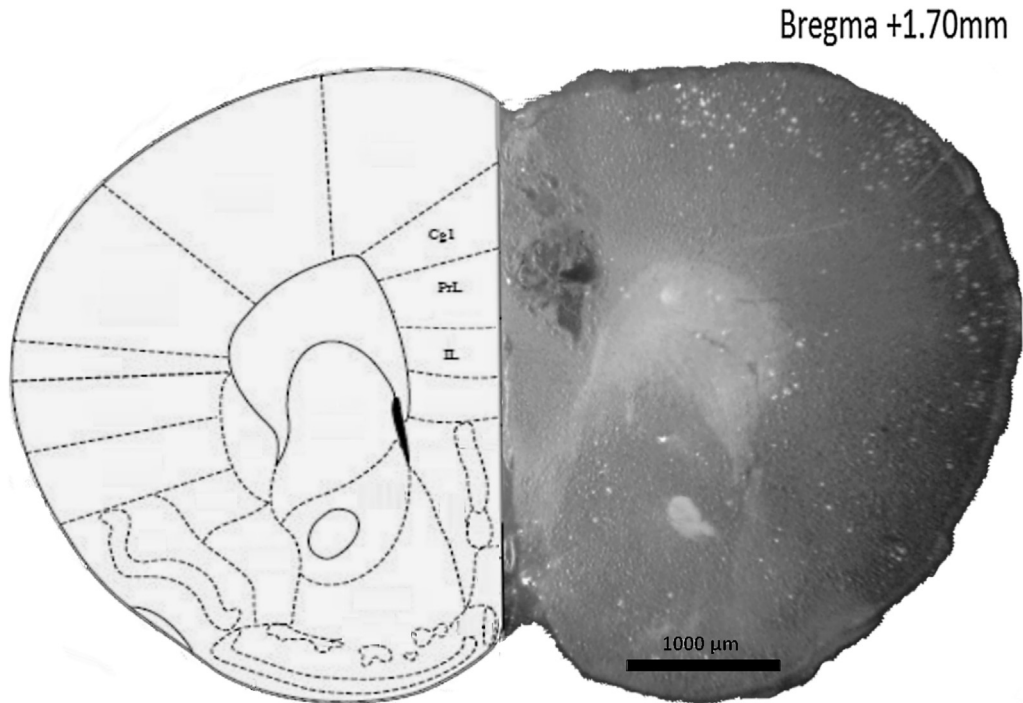


Fig. 1. Schematic diagram (left) and a photomicrograph (right) of a representative microinfusion site within the mPFC of the mouse. Section corresponds to 1.70 mm anterior to bregma (Paxinos and Franklin, 2001). Abbreviations: Cg1, cingulate cortex, area 1; IL, infralimbic cortex; PrL, prelimbic cortex.

test revealed that NOC-9 (all doses) decreased the %OT [$F(3,39) = 3.25$; $p < 0.05$]. NOC-9 (37.5 nmol) also reduced %OE [$F(3,39) = 2.91$; $p < 0.05$]. Nitroergic activation of the RmPFC did not change the frequency of closed-arm entries [$F(3,39) = 0.41$; $p > 0.05$].

3.2.2. Experiment 1B: No effects on anxiety of bilateral NOC-9 injection into the mPFC

Through bilateral injections of NOC-9 in the mPFC, we hypothesized a more robust, anxiogenic-like effect. However, bilateral injections of this NO donor in the mPFC did not change the anxiety

of mice exposed to the EPM. One-way ANOVA failed to show significant effects of bilateral injection of NOC-9 (0, 37.5 or 75 nmol) into the mPFC on anxiety indices [%OE: $F(2,25) = 0.26$; $p = 0.76$; %OT: $F(2,25) = 0.20$; $p = 0.81$] or general locomotor activity [CE: $F(2,25) = 0.40$; $p = 0.67$] in mice exposed to the EPM (Fig. 2B).

3.2.3. Experiment 1C: No effects on anxiety of NOC-9 injected into the LmPFC

The hypothesis that NO release exclusively in the LmPFC might reduce (rather than increase) anxiety was tested through NOC-9 injection into the LmPFC. Fig. 2C shows that intra-LmPFC

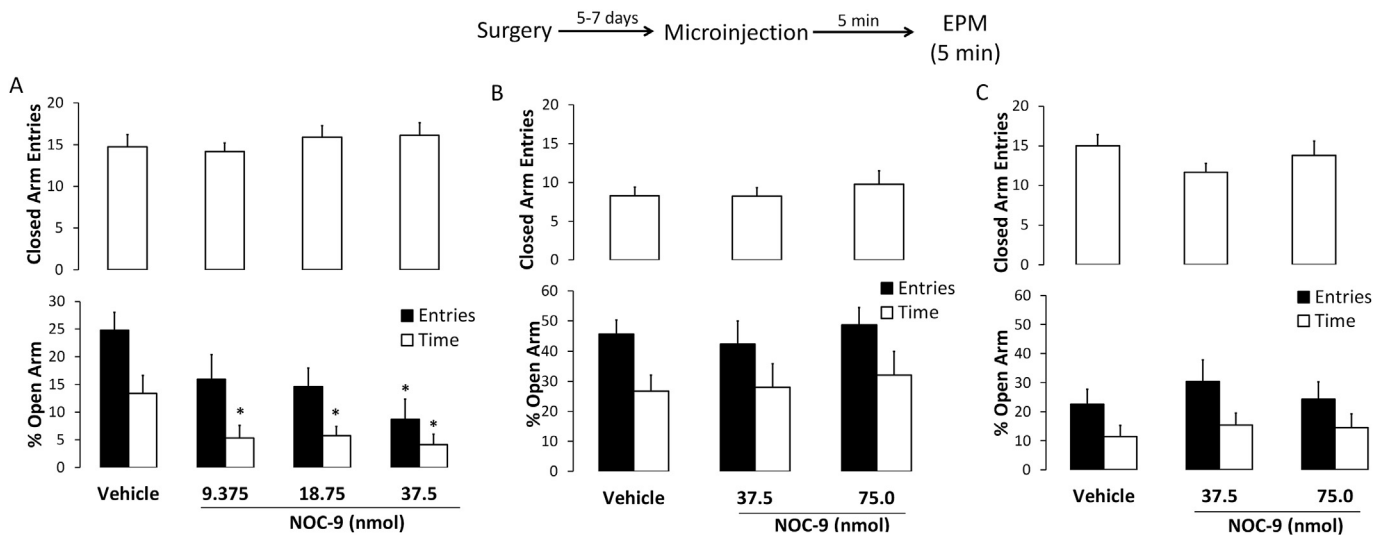


Fig. 2. Differential effects of NOC-9 injection into the right, left or bilateral mPFC on anxiety-like behavior of mice exposed to the EPM. NOC-9 provokes anxiogenesis in the RmPFC (A; $n = 8-14$) but not in the R/LmPFC (B; $n = 8-11$) or LmPFC (C, $n = 9-12$). (A–C) Upper panel: frequency of closed-arm entries; lower panel: percentage of open-arm entries and percentage of open-arm time. * $p < 0.05$ in comparison to vehicle group.

injections of NOC-9 (0, 37.5 or 75 nmol) did not change anxiety indices [%OE: $F(2,28) = 1.12$; $p = 0.34$; %OT: $F(2,28) = 0.21$; $p = 0.80$] or general locomotor activity [CE: $F(2,28) = 0.94$; $p = 0.40$] in mice exposed to the EPM.

3.3. Experiment 2: anxiogenic- and anxiolytic-like effects produced by injection of CoCl_2 into the LmPFC and the RmPFC, respectively

Fig. 3 shows the effects of CoCl_2 (0 or 1 mM) injection into the LmPFC (A) or RmPFC (B) on the behavior of mice exposed to the EPM. Student's t -test revealed that mice that received injections of CoCl_2 into the LmPFC explored the open arms less extensively than did saline-treated animals [%OE ($t_{(32)} = 2.34$; $p < 0.05$) and %OT ($t_{(32)} = 2.35$; $p < 0.05$)]. CoCl_2 did not change the frequency of closed-arm entries (CE: $t_{(32)} = 0.36$; $p > 0.05$) (Fig. 3A). Regarding the RmPFC, Student's t -test revealed that mice treated with CoCl_2 explored the open arms more extensively than did saline-treated animals [%OE ($t_{(32)} = 3.36$; $p = 0.002$) and %OT ($t_{(32)} = 2.30$; $p = 0.03$)]. Student's t -test did not reveal a significant effect of CoCl_2 on the frequency of closed-arm entries (CE: $t_{(32)} = 0.26$; $p > 0.05$) (Fig. 3B).

3.4. Experiment 3: short-lasting anxiogenic-like effects induced by restraint or social defeat stress

The immediate (5 min) and late (24 h) effects of restraint or social defeat stress on the behavior of mice exposed to the EPM are shown in Fig. 4. Two-way ANOVA revealed an effect of the stress factor [$F(2,62) = 4.27$; $p < 0.02$], the time factor [$F(1,62) = 5.96$; $p < 0.02$] and of the stress \times time interaction [$F(2,62) = 3.07$; $p = 0.05$] on percentage of open-arm entries. Regarding the percentage of open-arm time, a two-way ANOVA revealed a significant effect of the time factor [$F(1,62) = 4.97$; $p < 0.03$] and borderline effects of the stress factor [$F(2,62) = 2.44$; $p = 0.09$] and of the stress \times time interaction [$F(2,62) = 2.71$; $p = 0.07$]. Duncan post hoc test revealed that social defeat reduced both %OE and %OT ($p \leq 0.05$) when exposed to the EPM at 5 min after stress, whereas restraint stress significantly decreased only %OE ($p < 0.05$). However, only restraint was able to reduce percentage of open-arm entries at 24 h after stress ($p < 0.05$).

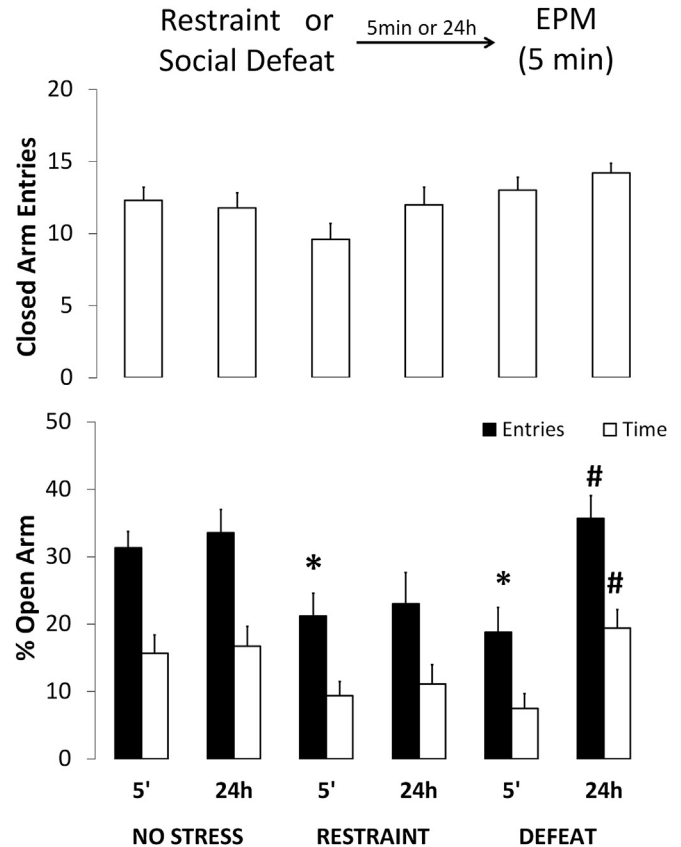


Fig. 4. Anxiogenic-like effects induced by restraint and social defeat in mice exposed to the EPM at 5 min or 24 h after stress. Upper panel: Frequency of closed-arm entries; lower panel: percentage of open-arm entries and percentage of open-arm time. $n = (9-13)$; * $p < 0.05$ in comparison to the control group; # $p < 0.05$ in comparison to the socially defeated group at 5-min.

Importantly, although the %OE and %OT exhibited by socially defeated mice did not differ from those of the control group at 24 h after stress, both variables were higher than those displayed

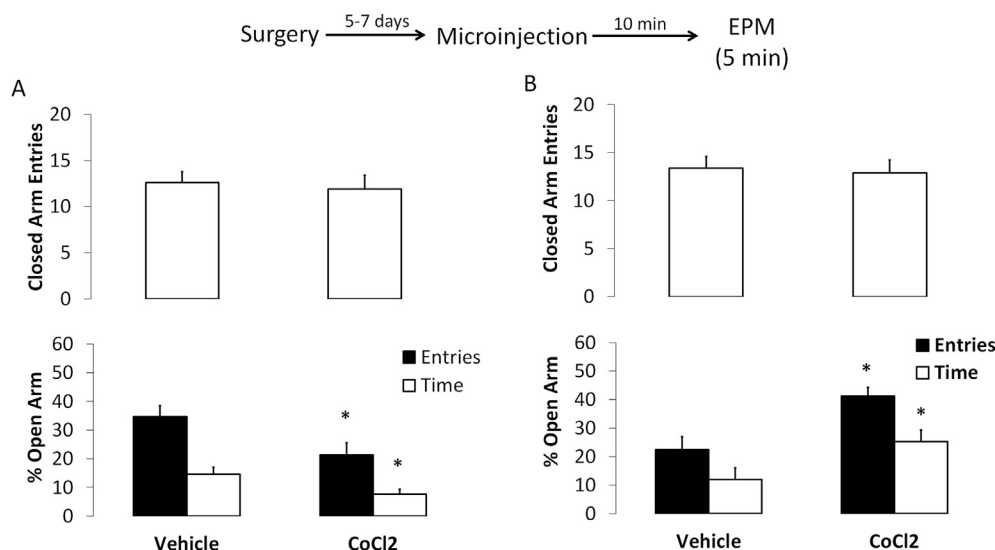


Fig. 3. Effects of CoCl_2 (0 or 1 mM) injection into the LmPFC (A) and RmPFC (B) on the frequency of closed-arm entries (upper panel), percentage of open-arm entries and percentage of open-arm time (lower panel) in mice exposed to the EPM. * $p < 0.05$ in comparison to the vehicle group.

by the socially defeated mice at 5 min post-stress. Regarding the closed-arm entries, a two-way ANOVA revealed an effect of only the stress factor [stress $F(2,62) = 3.78$; $p < 0.03$]; time factor $F(1,62) = 1.52$; $p > 0.05$; stress \times time interaction $F(2,62) = 1.11$; $p > 0.05$]. However, post hoc test showed that restraint stress reduced general locomotion ($p < 0.05$) in comparison to the social defeat group but not the control group.

3.5. Experiment 4: inhibition of the LmPFC leads to recrudescence of anxiety induced by social defeat (but not by restraint) stress

Fig. 5 shows the behavior exhibited by mice in the EPM at 24 h after receiving saline or CoCl_2 injections into the LmPFC and being exposed to restraint or social defeat. Two-way ANOVA did not reveal any effect of treatment [$F(1,61) = 1.88$; $p = 0.17$] or of stress [$F(2,61) = 1.29$; $p = 0.28$] factors but showed an effect of treatment \times stress interaction ($F(2,61) = 3.88$; $p = 0.03$) on the percentage of open-arm entries. A quite similar profile was revealed by a two-way ANOVA for the percentage of open-arm time [treatment factor: $F(1,61) = 3.41$; $p = 0.07$; stress factor: $F(2,61) = 1.50$; $p = 0.23$; treatment \times stress interaction: $F(2,61) = 4.23$; $p = 0.02$]. Post hoc Duncan's test showed that intra-LmPFC injection of CoCl_2 reduced both %OE and %OT but only for socially defeated mice compared to all groups (%OE: $p \leq 0.04$; %OT: $p \leq 0.02$). Regarding the frequency of closed-arm entries, a two-way ANOVA revealed a significant effect of stress factor [$F(2,61) = 3.87$; $p = 0.03$] but not of treatment factor [$F(1,61) = 1.89$; $p = 0.17$] or of the treatment \times stress interaction [$F(2,61) = 1.08$; $p = 0.34$]. Post hoc comparisons revealed that defeated mice showed a lower frequency of closed-arm entries than non-stressed and restrained animals ($p < 0.05$).

4. Discussion

The main results of the present study showed that although nitrenergic activation of the right mPFC produces robust anxiogenic-like effects, bilateral or unilateral (into the left mPFC) injections of NOC-9, an NO donor, do not change the anxiety of mice exposed to the EPM, thereby suggesting that nitrenergic production in the left mPFC somehow inhibits the anxiogenic-like effect induced by NO in the right mPFC. Interestingly, while chemical inhibition of the right mPFC, through the local injection of CoCl_2 , attenuated the anxiety indices in the EPM, injection of this synaptic inhibitor into the left mPFC produced anxiogenesis, thereby suggesting that the right mPFC and left mPFC have distinct roles in the modulation of the basal levels of anxiety in mice. Moreover, the left mPFC seems to be important in modulating some types of stress-induced anxiety because its temporary inactivation, in combination with the exposure to social defeat, resulted in anxiety recrudescence in mice.

Nitrenergic activation of the RmPFC produced a dose-related and selective anxiogenic-like effect in mice exposed to the EPM. Evidence that NOC-9 produces anxiogenic effects in mice exposed to the EPM were previously shown through local injections of this NO donor into the midbrain periaqueductal gray (PAG) and bed nucleus of the stria terminalis (BNST) (e.g., Braga et al., 2009; Miguel et al., 2012; Faria et al., 2016). However, intra-PAG injections of NOC-9 elicited explosive motor behaviors (e.g., jumping and running) followed by freezing (Miguel et al., 2012), whereas infusion of this NO donor into the BNST produced only freezing (i.e., no jumps and running) followed by anxiety-related behaviors in mice exposed to the EPM (Faria et al., 2016). Although we did not record systematic jumping, running or freezing behavior in the present study,

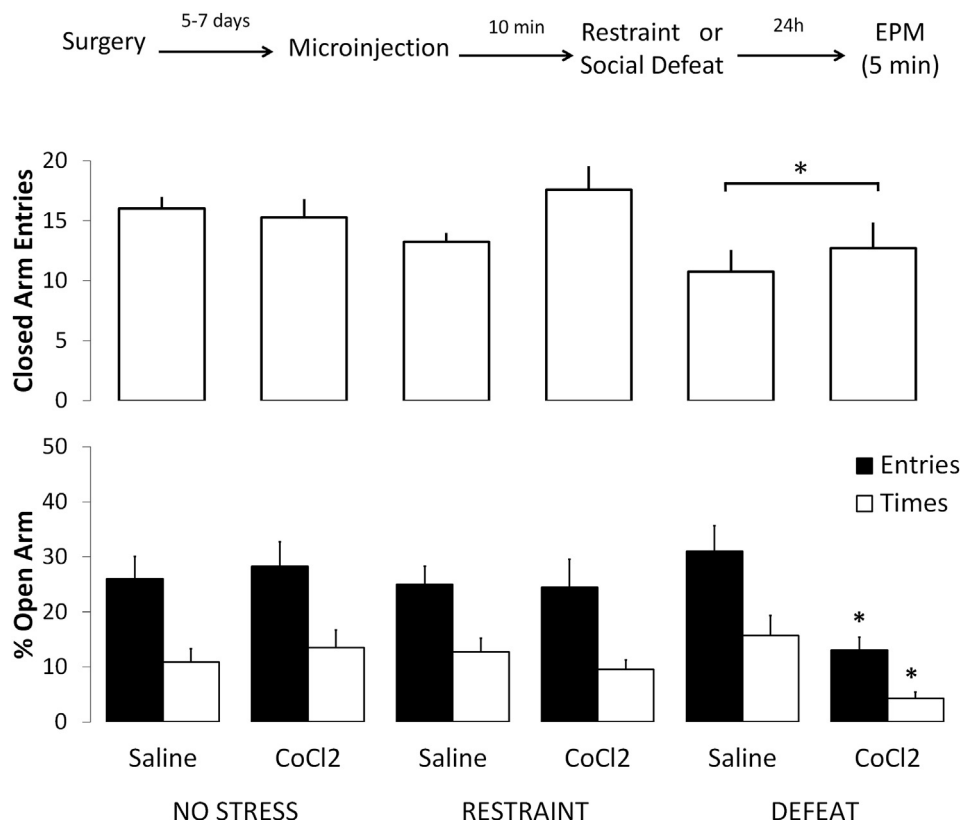


Fig. 5. Effects of CoCl_2 (0 or 1 mM) injection into the LmPFC, in combination with restraint or social defeat, on the frequency of closed-arm entries (upper panel), percentage of open-arm entries and percentage of open-arm time (lower panel) in mice exposed to the EPM at 24 h after stress. $n = 7-14$ per group. * $p < 0.05$ in comparison to all groups.

experimenters did not observe such sudden and intense behavioral responses following intra-mPFC injections of the NO donor. However, robust anxiogenic-like effects of intra-RmPFC NOC-9 were recorded in mice exposed to the EPM. An aversive role of NO in the prefrontal cortex has been previously noted in studies showing that local injections of Nw-propyl-L-arginine, an NO synthase inhibitor (Zhang et al., 1997), or carboxi-PTIO, an NO scavenger (e.g., Pfeiffer et al., 1997), impair avoidance acquisition in the Vogel conflict test (Lisboa et al., 2010) and contextual fear conditioning (Resstel et al., 2008), respectively. Together, the present results corroborate previous evidence that indicates that anxiety and fear behaviors are coordinated by a hierarchical brain defensive system (McNaughton and Corr, 2004). These authors have argued that although the anxiety state is mediated mainly by forebrain structures (e.g., prefrontal dorsal stream, posterior cingulate, septo-hipocampal system and amygdala), the fear state involves more caudal structures (e.g., medial hypothalamus and periaqueductal gray). Although it would be expected that both rostral and caudal limbic structures play a role in the modulation of anxiety and fear, the mPFC seems to be a forebrain area involved in the modulation of more subtle defensive behaviors.

Regarding the mechanisms by which NO produces anxiogenic-like effects in the mPFC, the neurotransmissions mediated by the excitatory amino acid glutamate and/or the neuropeptide corticotrophin releasing factor (CRF) seem to be strong candidates. In this context, previous studies have suggested that NO production results in the release of glutamate in the PAG (Moreira et al., 2004) and CRF in the amygdala and hypothalamus (Raber et al., 1995). In addition, intra-mPFC injections of L-NOARG, a non-selective NO synthase inhibitor, decreased the release of glutamate induced by glutamate NMDA receptor activation in cells of the cerebral cortex (Montague et al., 1994), thereby suggesting that the glutamatergic action on this limbic structure is NO-dependent. Regarding CRF neurotransmission, Miguel et al. (2014) have recently demonstrated that intra-mPFC injection of the neuropeptide CRF and the selective CRF1 receptor antagonist, CP376395, increased and attenuated, respectively, anxiety-related behaviors of mice exposed to the EPM. Moreover, there is evidence that indicates that the anxiogenic effects of NOC-9 are blocked with prior injection of CRF1 antagonists in the mouse PAG (Miguel et al., 2012) and BNST (Faria et al., 2016). In addition, intra-BNST injection of AP-7, a glutamate NMDA receptor antagonist, also blocked the anxiogenic effects of local infusions of NOC-9 (Faria et al., 2016), thereby suggesting that NO production could be increasing CRF and glutamate release within these brain areas. However, it is notable that NO interferes with the release of other neurotransmitters (e.g., acetylcholine, dopamine, serotonin and GABA) that are potential candidates for modulating anxiety (de Oliveira et al., 2000; Moreira and Guimarães, 2004; Moreira et al., 2004).

An impressive result of the present study is the lack of effects on anxiety of injection of NOC-9 into either the bilateral or left mPFC. Given that intra-RmPFC NOC-9 increases anxiety, the lack of effects on anxiety after bilateral nitrenergic activation suggests that NO release within the LmPFC somehow impairs the anxiogenic-like effect produced by NO in the RmPFC. However, as shown in the present study (Fig. 2C), intra-LmPFC injections of NOC-9 failed to alter anxiety indices. In other words, these results suggest that NO production in the mPFC localized to the left hemisphere does not produce anxiolytic-like effects. Together, these results are suggestive that nitrenergic activation in the LmPFC could facilitate the coping of mice with aversive situations that are NO-dependent in the RmPFC. If so, inhibition of the LmPFC would impair the ability of animals to cope with threatening situations.

In this context, Experiment 2 revealed that chemical inactivation of the LmPFC through the local injection of CoCl₂, an unspecific

synaptic inhibitor (Kretz, 1984), produced anxiogenic-like effects (i.e., mice reduced their exploration of the open arms of the EPM). In contrast, when injected into the RmPFC, CoCl₂ attenuated both indices of anxiety (%OE and %OT; i.e., mice increased their exploration of the potentially aversive area of the EPM). Importantly, inhibition of the RmPFC or of the LmPFC did not change the general activity because the frequency of closed-arm entries remained unaltered in both cases. Furthermore, the anxiogenic-like effects induced by intra-LmPFC injection of CoCl₂ are quite similar to those observed with intra-RmPFC injection of NOC-9 (Fig. 2A). Together, the results of Experiments 1 and 2 are suggestive that the mPFC has a lateralized function in the control of anxiety of mice confronting threatening situations. Although the RmPFC would normally be integrated into active, pro-aversive behavioral action (i.e., its nitrenergic activation results in mice avoiding or escaping from the open arms), the LmPFC attenuates the behavioral consequences triggered by a potentially aversive situation, which were represented, in the present study, by the open arms of the EPM.

Several studies have highlighted the effects of various stressors on brain functioning, thereby indicating that some brain areas are particularly affected by acute and chronic stress (e.g., Gee and Casey, 2015). In this context, the mPFC is closely related to the preparation of emotional responses to stress (Vermetten and Bremner, 2002; Gold et al., 2015; Maren and Holmes, 2015). Based on this evidence and the results of Experiments 1 and 2 of the present study, we investigated whether the inhibition of LmPFC could modulate the effect of two types of stress (the restraint and the social defeat) on anxiety. To that end, we first investigated the effects of these two stressors on anxiety-like behavior in control mice exposed to the EPM at 5 min or 24 h after stress. Thus, both stressors elicited acute anxiogenic-like behavior, which resulted in decreased open-arm exploration of mice exposed to the EPM at 5 min after stress. However, the effects of restraint and social defeat on anxiety in mice exposed to the EPM 24 h later were not clear. Actually, although restraint produced a weak anxiogenic effect (i.e., it reduced only %OE), social defeat did not change anxiety indices 24 h post-stress, thereby suggesting that these two types of stressors do not provoke long-lasting anxiogenic-like effects. Namely, at 24 h after exposure to stress, animals display resilience to the anxiogenic effects induced, in particular, by social defeat.

In Experiment 4, we investigated whether the LmPFC would play a role in the ability of animals to cope with the aversive effects of stress. As shown in Fig. 5, the inhibition of LmPFC followed by social defeat stress resulted in anxiogenic-like effects in mice exposed to EPM 24 h later. Social defeat stress also led to a reduction in general locomotion, as represented by lower frequencies of closed-arm entries, an effect that did not depend upon drug injection. Together these results strongly suggest that the anxiogenic-like effects induced by social defeat depend upon the chemical inhibition of the LmPFC. Interestingly, intra-LmPFC injection of CoCl₂ did not change anxiety indices in non-stressed or restrained animals. The lack of effects observed with LmPFC inhibition on the anxiety of non-stressed animals was an expected result, particularly if (i) the inhibitory effect of this synaptic blocker persists for approximately 30–60 min (Lomber, 1999) and (ii) the test on the EPM was conducted only 24 h after LmPFC inhibition. Conversely, we do not have a clear explanation for the lack of effects of the combined intra-LmPFC CoCl₂ injection and restraint stress on anxiety in mice exposed to the EPM. A speculative explanation of these intriguing results is reflected in the recent study by Motta and Canteras (2015), which demonstrated that the pattern of neuronal activation may be different for animals that were immobilized (restrained) than for those that experienced social defeat. Although this study described that immobilization and social defeat show commonalities in neuronal Fos activation in regions of the hypothalamic circuit of

defense, the study also found that socially defeated rats, but not restrained rats, recruited elements of the medial hypothalamic conspecific-responsive circuit, which is also involved in other forms of social interaction (Canteras, 2012). Thus, the ability of the restraint stress to induce distinct neuronal mechanisms in the mPFC in comparison to those induced by social defeat in mice requires further investigation. Therefore, it seems imperative that the functional lateralization of this limbic structure must be considered.

Sullivan and Gratton (1999) emphasized that the mPFC has a lateralized function in the modulation of stress-induced responses in rats. According to them, the RmPFC plays a role in the modulation of physiological responses induced by stress. Moreover, Cerqueira et al. (2008) postulated that although the LmPFC coordinates motor functions, the RmPFC modulates affective and emotional responses to repeated stress. In addition, according to Czéh et al. (2008), the mPFC has an intrinsic cellular asymmetry, and the LmPFC exerts a dominant role in the control of stress responses in rats. Additionally, Sullivan and Gratton (2002) suggested that the LmPFC is more involved in the regulation of immediate stress control, thereby optimizing cautions and adaptive behavior in potentially threatening situations. If so, the present results seem to corroborate these observations, which show that nitrenergic activation of the RmPFC, but not of both the LmPCF and RmPCF, is anxiogenic. Moreover, in basal levels of anxiety (e.g., during an exposure to the EPM), nitrenergic activation of the LmPFC seems to control the emotional response elicited by the potentially threatening situation as it neither attenuated nor intensified the avoidance of the open arms. However, inhibition of the LmPFC appears to mimic the behavioral effects of chronic stress, which leads to dendritic atrophy (Cerqueira et al., 2008), thereby causing an enhancement of anxiety indices in the EPM, as shown in the present study (Fig. 3A).

Several studies have highlighted the role of the PFC as a key structure involved in resilience and vulnerability to stress (McEwen and Morrison, 2013; Van den Hove et al., 2013). For instance, Maier and Watkins (2010) suggested that mPFC activation is crucial for detecting environmental clues and for enabling behavioral control, which, in turn, modulates vulnerability and resistance/resilience to aversive situations. Although these findings have not been localized in a particular hemisphere (i.e., right versus left), the present results following LmPFC inhibition seem to be consistent with the study of Maier and Watkins. Thus, synaptic inhibition of the LmPFC immediately before social defeat stress resulted in the recrudescence of anxiety-like behavior when recorded 24 h later. Notably, no anxiety-related behavior was observed 24 h after the social conflict in LmPFC-intact mice or in non-stressed mice that had received intra-LmPFC injection of CoCl₂ one day earlier.

5. Conclusion

The present study demonstrates that the mPFC has a lateralized function in the modulation of anxiety of mice exposed to the EPM. NO neurotransmission located within the mPFC, particularly in its right hemisphere, has a notable role in this process. In addition, although this brain structure is located in the right hemisphere and appears to exert a tonic role in the control of anxiety-like responses, the left side appears to modulate the aversiveness of a given environmental context (e.g., the EPM). Moreover, the functional integrity of the LmPFC also contributes to the ability of mice to cope with the anxiogenic effects induced by social defeat.

Acknowledgements

We thank Elisabete Z.P. Lepera and Rosana F.P. Silva for their technical assistance. This study was supported by FAPESP (2013/

01383-6), CNPq (478696/2013-2) and CAPES (2053/2013). N.S. Costa, A.C. Cipriano, T.T. Miguel and M.A. Vicente received, respectively, CNPq (161440/2014-2), FAPESP (2011/04561-1), CAPES-PNPD (2748/2010) and CAPES-PNPD (2053/2013) scholarships, and R. L. Nunes-de-Souza a CNPq (305597/2012-4) fellowship.

References

- Ambalavanan, N., Mariani, G., Bulger, A., Philips III, J.B., 1999. Role of nitric oxide in regulating neonatal porcine pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. *Biol. Neonate* 76 (5), 291–300.
- Bechara, A., Damasio, H., 2002. Decision-making and addiction (part I): impaired activation of somatic states in substance dependent individuals when pondering decisions with negative future consequences. *Neuropsychologia* 40 (10), 1675–1689.
- Braga, A.A., Aguiar, D.C., Guimarães, F.S., 2009. NOC-9, a selective nitric oxide donor, induces flight reactions in the dorsolateral periaqueductal gray of rats by activating soluble guanylate cyclase. *Neurosci. Lett.* 459 (2), 79–83.
- Canteras, N.S., 2012. Hypothalamic goal-directed behavior — ingestive, reproductive and defensive. In: Watson, C., Paxinos, G., Puelles, L. (Eds.), *The Mouse Nervous System*. Academic Press, Sidney, pp. 539–562.
- Carobrez, A.P., Teixeira, K.V., Graeff, F.G., 2001. Modulation of defensive behavior by periaqueductal gray NMDA/glycine-B receptor. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 25 (7–8), 697–709.
- Cerqueira, J.J., Almeida, O.F., Sousa, N., 2008. The stressed prefrontal cortex. *Left? Right! Brain Behav. Immun.* 22 (5), 630–638.
- Cerqueira, J.J., Mailliet, F., Almeida, O.F., Jay, T.M., Sousa, N., 2007. The prefrontal cortex as a key target of the maladaptive response to stress. *J. Neurosci.* 27 (11), 2781–2787.
- Courtin, J., Bienvenu, T.C., Einarsson EÖ, Herry C., 2013. Medial prefrontal cortex neuronal circuits in fear behavior. *Neuroscience* 240, 219–242.
- Crestani, C.C., Alves, F.H., Correa, F.M., Guimarães, F.S., Joca, S.R., 2010. Acute reversible inactivation of the bed nucleus of stria terminalis induces antidepressant-like effect in the rat forced swimming test. *Behav. Brain Funct.* 1 (6), 30.
- Crestani, C.C., Alves, F.H., Tavares, R.F., Corrêa, F.M., 2009. Role of the bed nucleus of the stria terminalis in the cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. *Stress* 12 (3), 268–278.
- Czéh, B., Perez-Cruz, C., Fuchs, E., Flügge, G., 2008. Chronic stress-induced cellular changes in the medial prefrontal cortex and their potential clinical implications: does hemisphere location matter? *Behav. Brain Res.* 190 (1), 1–13.
- Ariens Kappers Lecture Damasio, A.R., Eighth, C.U., 2000. The fabric of the mind: a neurobiological perspective. *Prog. Brain Res.* 126, 457–467.
- Davidson, R.J., 1998. Cerebral asymmetry, emotions and affective style. In: Davidson, R.J., Hugdahl, K. (Eds.), *Brain Asymmetry*. MIT Press, Cambridge, pp. 361–387.
- de Oliveira, R.M., Del Bel, E.A., Mamede-Rosa, M.L., Padovan, C.M., Deakin, J.F., Guimarães, F.S., 2000. Expression of neuronal nitric oxide synthase mRNA in stress-related brain areas after restraint in rats. *Neurosci. Lett.* 289, 123–126.
- Del Carlo Jr., M., Loeser, R.F., 2002. Nitric oxide-mediated chondrocyte cell death requires the generation of additional reactive oxygen species. *Arthritis Rheum.* 46 (2), 394–403.
- Euston, D.R., Gruber, A.J., McNaughton, B.L., 2012. The role of medial prefrontal cortex in memory and decision making. *Neuron* 76 (6), 1057–1070.
- Faria, M.P., Miguel, T.T., Gomes, K.S., Nunes-de-Souza, R.L., 2016. Anxiety-like responses induced by nitric oxide within the BNST in mice: role of CRF1 and NMDA receptors. *Hormon. Behav.* 79, 74–83.
- Fogaça, M.V., Aguiar, D.C., Moreira, F.A., Guimarães, F.S., 2012. The endocannabinoid and endovanilloid systems interact in the rat prelimbic medial prefrontal cortex to control anxiety-like behavior. *Neuropharmacology* 63 (2), 202–210.
- Gee, D.G., Casey, B.J., 2015. The impact of developmental timing for stress and recovery. *Neurobiol. Stress* 1, 184–194.
- Gold, A.L., Morey, R.A., McCarthy, G., 2015. Amygdala-prefrontal cortex functional connectivity during threat-induced anxiety and goal distraction. *Biol. Psychiatry* 77 (4), 394–403.
- Gonzalez, L.E., Rujano, M., Tucci, S., Paredes, D., Silva, E., Alba, G., Hernandez, L., 2000. Medial prefrontal transection enhances social interaction. I: behavioral studies. *Brain Res.* 887 (1), 7–15.
- Gruber, A.J., Calhoon, G.G., Shusterman, I., Schoenbaum, G., Roesch, M.R., O'Donnell, P., 2010. More is less: a disinhibited prefrontal cortex impairs cognitive flexibility. *J. Neurosci.* 30 (50), 17102–17110.
- Guimarães, F.S., Bejjani, V., Moreira, F.A., Aguiar, D.C., de Lucca, A.C., 2005. Role of nitric oxide in brain regions related to defensive reactions. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29 (8), 1313–1322.
- Holmes, A., Wellman, C.L., 2009. Stress-induced prefrontal reorganization and executive dysfunction in rodents. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 33 (6), 773–783.
- Jaferi, A., 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.
- Johnstone, T., van Reekum, C.M., Urry, H.L., Kalin, N.H., Davidson, R.J., 2007. Failure

- to regulate: counterproductive recruitment of top-down prefrontal-subcortical circuitry in major depression. *J. Neurosci.* 27 (33), 8877–8884.
- Kretz, R., 1984. Local cobalt injection: a method to discriminate presynaptic axonal from postsynaptic neuronal activity. *J. Neurosci. Methods* 11 (2), 129–135.
- Lacroix, L., Spinelli, S., Heidbreder, C.A., Feldon, J., 2000. Differential role of the medial and lateral prefrontal cortices in fear and anxiety. *Behav. Neurosci.* 114 (6), 1119–1130.
- Lisboa, S.F., Stecchini, M.F., Corrêa, F.M., Guimarães, F.S., Resstel, L.B., 2010. Different role of the ventral medial prefrontal cortex on modulation of innate and associative learned fear. *Neuroscience* 171 (3), 760–768.
- Lohse, M.J., Förstermann, U., Schmidt, H.H., 1998. Pharmacology of NO:cGMP signal transduction. *Naunyn Schmiedeb. Arch. Pharmacol.* 358 (1), 111–112.
- Lomber, S.G., 1999. The advantages and limitations of permanent or reversible deactivation techniques in the assessment of neural function. *J. Neurosci. Methods* 86 (2), 109–117. Review.
- Maier, S.F., Watkins, L.R., 2010. Role of the medial prefrontal cortex in coping and resilience. *Brain Res.* 1355, 52–60.
- Maren, S., Holmes, A., 2016. Stress and fear extinction. *Neuropsychopharmacology* 41 (1), 58–79. <http://dx.doi.org/10.1038/npp.2015.180>.
- Mayer, B., John, M., Heinzel, B., Werner, E.R., Wachter, H., Schultz, G., Bohme, E., 1991. Brain nitric oxide synthase is a bipterin- and flavin-containing multi-functional oxido-reductase. *FEBS Lett.* 288, 187–191.
- McEwen, B.S., Morrison, J.H., 2013. The brain on stress: vulnerability and plasticity of the prefrontal cortex over the life course. *Neuron* 79 (1), 16–29. Review.
- McNaughton, N., Corr, P.J., 2004. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 28 (3), 285–305. Review.
- Miguel, T.T., Gomes, K.S., Nunes-de-Souza, R.L., 2012. Contrasting effects of nitric oxide and corticotropin-releasing factor within the dorsal periaqueductal gray on defensive behavior and nociception in mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 45 (4), 299–307.
- Miguel, T.T., Gomes, K.S., Nunes-de-Souza, R.L., 2014. Tonic modulation of anxiety-like behavior by corticotropin-releasing factor (CRF) type 1 receptor (CRF1) within the medial prefrontal cortex (mPFC) in male mice: role of protein kinase A (PKA). *Horm. Behav.* 66 (2), 247–256.
- Molchanov, M.L., Guimarães, F.S., 2002. Anxiolytic-like effects of AP7 injected into the dorsolateral or ventrolateral columns of the periaqueductal gray of rats. *Psychopharmacol. Berl.* 160 (1), 30–38.
- Montague, P.R., Gancayco, C.D., Winn, M.J., Marchase, R.B., Friedlander, M.J., 1994. Role of NO production in NMDA receptor-mediated neurotransmitter release in cerebral cortex. *Science* 263 (5149), 973–977.
- Moreira, F.A., Guimarães, F.S., 2004. Benzodiazepine receptor and serotonin 2A receptor modulate the aversive-like effects of nitric oxide in the dorsolateral periaqueductal gray of rats. *Psychopharmacol. Berl.* 176 (3–4), 362–368.
- Moreira, F.A., Molchanov, M.L., Guimarães, F.S., 2004. Ionotropic glutamate-receptor antagonists inhibit the aversive effects of nitric oxide donor injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats. *Psychopharmacol. Berl.* 171 (2), 199–203.
- Morot Gaudry-Talarmain, Y., Moulian, N., Meunier, F.A., Blanchard, B., Angaut-Petit, D., Faille, L., Ducrocq, C., 1997. Nitric oxide and peroxynitrite affect differently acetylcholine release, choline acetyltransferase activity, synthesis, and compartmentation of newly formed acetylcholine in Torpedo marmorata synaptosomes. *Nitric Oxide* 1 (4), 330–345.
- Motta, S.C., Canteras, N.S., 2015. Restraint stress and social defeat: what they have in common. *Physiol. Behav.* 146, 105–110.
- Miczek, K.A., Thompson, M.L., Shuster, L., 1982. Opioid-like analgesia in defeated mice. *Science* 215 (4539), 1520–1522.
- Paxinos, G., Franklin, K.B.J., 2001. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, California, USA.
- Pfeiffer, S., Leopold, E., Hemmens, B., Schmidt, K., Werner, E.R., Mayer, B., 1997. Interference of carboxy-PTIO with nitric oxide- and peroxynitrite-mediated reactions. *Free Radic. Biol. Med.* 22 (5), 787–794.
- Raber, J., Koob, G.F., Bloom, F.E., 1995. Interleukin-2 (IL-2) induces corticotropin-releasing factor (CRF) release from the amygdala and involves a nitric oxide-mediated signaling; comparison with the hypothalamic response. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 272 (2), 815–824.
- Resstel, L.B., Corrêa, F.M., 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 (9), 2027–2035.
- Resstel, L.B., Fernandes, K.B., Corrêa, F.M., 2004. Medial prefrontal cortex modulation of the baroreflex parasympathetic component in the rat. *Brain Res.* 1015 (1–2), 136–144.
- Rodgers, R.J., Johnson, N.J., 1995. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 52 (2), 297–303.
- Scopinho, A.A., Scopinho, M., Lisboa, S.F., Correa, F.M., Guimarães, F.S., Joca, S.R., 2010. Acute reversible inactivation of the ventral medial prefrontal cortex induces antidepressant-like effects in rats. *Behav. Brain Res.* 214 (2), 437–442.
- Seccia, M., Perugini, C., Albano, E., Bellomo, G., 1996. Inhibition of Cu²⁺-induced LDL oxidation by nitric oxide: a study using donors with different half-time of NO release. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 220 (2), 306–309.
- Shah, A.A., Treite, D., 2003. Excitotoxic lesions of the medial pfc attenuate fear responses in the epm, social interaction and shock probe burying tests. *Brain Res.* 969, 183–194.
- Sullivan, R.M., Gratton, A., 1999. Lateralized effects of medial prefrontal cortex lesions on neuroendocrine and autonomic stress responses in rats. *J. Neurosci.* 19 (7), 2834–2840.
- Sullivan, R.M., Gratton, A., 2002. Behavioral effects of excitotoxic lesions of ventral medial prefrontal cortex in the rat are hemisphere-dependent. *Brain Res.* 927 (1), 69–79.
- Tavares, R.F., Corrêa, F.M., 2006. Role of the medial prefrontal cortex in cardiovascular responses to acute restraint in rats. *Neuroscience* 143 (1), 231–240.
- Van den Hove, D.L., Kenis, G., Brass, A., Opstelten, R., Rutten, B.P., Bruschetti, M., Blanco, C.E., Lesch, K.P., Steinbusch, H.W., Prickaerts, J., 2013. Vulnerability versus resilience to prenatal stress in male and female rats; implications from gene expression profiles in the hippocampus and frontal cortex. *Eur. Neuropharmacol.* 23 (10), 1226–1246.
- Vermetten, E., Bremner, J.D., 2002. Circuits and systems in stress. II. Applications to neurobiology and treatment in posttraumatic stress disorder. *Depress Anxiety* 16 (1), 14–38. Review.
- Vianna, D.M., Graeff, F.G., Landeira-Fernandez, J., Brandao, M.L., 2001. Lesion of the ventral periaqueductal gray reduces conditioned fear but does not change freezing induced by stimulation of the dorsal periaqueductal gray. *Learn Mem.* 8, 164–169.
- Yuan, P., Raz, N., 2014. Prefrontal cortex and executive functions in healthy adults: a meta-analysis of structural neuroimaging studies. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 42, 180–192. Review.
- Zhang, H.Q., Fast, W., Marletta, M.A., Martasek, P., Silverman, R.B., 1997. Potent and selective inhibition of neuronal nitric oxide synthase by N omega-propyl-L-arginine. *J. Med. Chem.* 40 (24), 3869–3870.