

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

NATALIA BONETTI BERTAGNA

AVALIAÇÃO DO HIPOCAMPO NAS RESPOSTAS
COMPORTAMENTAIS E CELULARES DE CAMUNDONGOS
SUBMETIDOS A MODELOS DE ANSIEDADE

UBERLÂNDIA
2018

NATALIA BONETTI BERTAGNA

AVALIAÇÃO DO HIPOCAMPO NAS RESPOSTAS
COMPORTAMENTAIS E CELULARES DE CAMUNDONGOS
SUBMETIDOS A MODELOS DE ANSIEDADE

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biologia Celular e
Estrutural Aplicadas da Universidade
Federal de Uberlândia como requisito
parcial à obtenção do título de mestre em
Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Tarciso Tadeu Miguel

Co-Orientador: Prof. Dr. Fábio Cardoso
Cruz

Uberlândia-MG

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

B536a
2018 Bertagna, Natalia Bonetti, 1993
Avaliação do hipocampo nas respostas comportamentais e celulares de camundongos submetidos a modelos de ansiedade [recurso eletrônico] / Natalia Bonetti Bertagna. - 2018.

Orientador: Tarciso Tadeu Miguel.

Coorientador: Fábio Cardoso Cruz.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.817>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Citologia. 2. Ansiedade. 3. Receptores da corticotropina. 4. Hipocampo. I. Miguel, Tarciso Tadeu, (Orient.). II. Cruz, Fábio Cardoso, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. IV. Título.

CDU: 576.3

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Silze e Odair, que sempre fizeram o melhor que podiam para nunca deixarem faltar nada para nós duas, principalmente amor e carinho. Obrigada por toda dedicação, cuidado, preocupação e paciência durante esses anos, pelo apoio dado diante das nossas escolhas, pelos conselhos, ensinamentos, “puxões de orelha” e acima de tudo, obrigada por confiarem em minha capacidade, incentivando-me.

À minha irmã, Letícia, pelas risadas, companheirismo, amizade e cumplicidade. Tenho muito orgulho da pessoa que você é.

Aos meus avós, que sempre cuidaram de mim e minha irmã com tanto carinho. Vocês são meus grandes exemplos de determinação, caráter, bondade e humildade.

Aos meus tios, Silmara e Wilson, por também terem me apoiado e sempre estarem dispostos a ajudar. Obrigada por serem alegria.

A Yuri Cassiolato, que enfrentou com muita paciência minhas constantes variações de humor e momentos de estresse ao longo desses quase quatro anos. Obrigada por ter tentado entender meus momentos de ausência, por ter me apoiado, por sempre me colocar “pra cima” e me fazer rir. Obrigada também pela companhia para ver todos os filmes de super-heróis no cinema.

Ao Prof. Dr. Tarciso Tadeu Miguel, pela orientação ao longo destes últimos anos de maneira tão dedicada. Agradeço por ter me proporcionado novos conhecimentos e oportunidades, pela paciência em me ensinar e por ter acreditado em minha capacidade dentro da pesquisa e da neurociência. Espero dar muito orgulho ainda.

Ao Prof. Dr. Fábio Cardoso Cruz, pela co-orientação, por gentilmente ter aberto as portas de seu laboratório e me ensinado muitas coisas novas.

Ao Prof. Dr. Luiz Bispo. Obrigada por ter me ensinado não só sobre Farmacologia, mas por inúmeros outros assuntos, sempre com conversas animadas. Você é uma pessoa iluminada que admiro muito.

Aos meus professores do curso de Fisioterapia. Eu não teria chegado até aqui sem os ensinamentos de cada um.

À Rafaella Queiroz. Obrigada pela amizade que construímos, pela confiança, apoio, por ter dividido tantos momentos comigo, pela disposição em ajudar quando necessário, e por me ensinar tantas coisas, sempre com paciência e gentileza. Eu te admiro muito.

A Gustavo Juliate, que me “pentelhou” ao longo desses anos, mas também foi luz, paz e equilíbrio. Obrigada por ser essa pessoa de coração tão bom, que sempre se dispôs a ajudar, me apoiou, acreditou na minha capacidade, ouviu pacientemente minhas reclamações e me deu conselhos. Obrigada por todas as conversas, risadas e cervejas também. Admiro a pessoa que é e agradeço por nossos caminhos terem se encontrado.

Aos amigos de laboratório: Ingrid, Victor, Maria Vitória, Bruna, Luana, Paulla, Juliana Milan, Felipe Furlan, com quem tive o privilégio de dividir muitos momentos e por isso fizeram meus dias serem mais leves e divertidos.

Aos meus amigos de Rio Claro, em especial Yasmin, Nathalie, Vitória e Thais, pela alegria dos reencontros e por permanecerem ao meu lado, mesmo com tantos momentos de ausência.

Aos amigos da FEELT, que me acolheram e me proporcionaram tantos bons momentos, de muitas risadas.

À Bateria Virulenta, em especial os meninos do “team surdo”, Louis, Luquinhas, Vinícius e Gustavo. Obrigada por terem me deixado participar, mesmo que por tão pouco tempo, da história de vocês, por terem compartilhado esse sentimento tão bonito de amor e união que vou guardar no coração com muito orgulho, e por me darem motivação em um dos momentos que mais precisei.

A todos que de alguma forma contribuíram para que eu chegasse até aqui.

À banca examinadora pela atenção dispensada na leitura deste trabalho e contribuições.

A Deus, por sempre ter se feito presente e não ter me desamparado nos momentos de dificuldade e incerteza.

RESUMO

Os transtornos de ansiedade envolvem diversas reações comportamentais e autonômicas relacionadas às reações de defesa frente aos estímulos aversivos que possam trazer ameaça à vida. Essas respostas são moduladas por diferentes neurotransmissores e moduladores neurais em estruturas do sistema límbico, como o hipocampo. Dentre os neurotransmissores envolvidos, tem sido atribuído ao fator liberador de corticotrofina (CRF) um importante papel na modulação de comportamentos defensivos relacionados à ansiedade, uma vez que foi identificada a presença de neurônios CRFérgicos e receptores para CRF em sítios extrahipolâmicos. A ligação com esses receptores acoplados à proteína Gs deflagra uma cascata de reações intracelulares que envolvem a ativação da via do AMPc/PKA. Este trabalho teve como objetivo avaliar o papel do neurotransmissor CRF e da PKA no hipocampo de camundongos nas respostas comportamentais relacionadas à ansiedade quando expostos ao labirinto em cruz elevado (LCE), através dos efeitos da microinjeção de H-89, inibidor de PKA, e de CP 376395, antagonista de CRF1 e ao teste de exposição ao rato (TER), através da expressão nuclear de proteína Fos e efeitos da microinjeção de CP 376395. A partir dos resultados obtidos com a exposição ao LCE, foi possível verificar que o tratamento com CP 376395 intra-hipocampo ventral (HV) elevou o tempo de permanência em braços abertos do LCE na dose 3,0nmol, porém, a dose de 6,0nmol aumentou o número de mergulhos desprotegidos quando injetada no hipocampo dorsal (HD) e o número de mergulhos protegidos quando injetada em HV. Nenhuma das doses promoveu alterações nos comportamentos de esticadas e chegadas ao final do braço aberto. A microinjeção do composto H-89 a 2,5nmol no HV, mas não no HD aumentou o tempo de permanência e número de entradas nos braços abertos, mas a dose de 5,0nmol elevou o número de entradas em braços fechados. Ambas as doses reduziram a expressão do comportamento de mergulho protegido para a mesma sub-região. Quando expostos ao TER, houve apenas diminuição do número de células Fos-positivas no HD de camundongos expostos repetidamente ao rato e relação ao grupo exposto a pelúcia. Em contrapartida, no HV, houve aumento da expressão de Fos nos grupos expostos ao rato de maneira única e repetida, em relação aos grupos controle e exposição ao brinquedo. A avaliação dos comportamentos desses animais revelou que a exposição repetida ao rato diminuiu o tempo de permanência na superfície do aparato, bem como o tempo de contato com a tela e escalada. A exposição única ao rato também diminuiu o tempo de escalada na tela e aumentou o número de esticadas. A microinjeção de CP 376395 nas doses 3,0 e 6,0nmol em HV aumentou o tempo de permanência na superfície do TER, mas só a dose de 6,0nmol foi capaz de exercer esse efeito em HD. Quanto aos comportamentos complementares, apenas a dose de 3,0nmol, injetada em HV, diminuiu o número de esticadas. Assim, esse estudo demonstrou participação do CRF principalmente no HV comparado ao HD na mediação de comportamentos relacionados à ansiedade e, além disso, que a via do AMPc/PKA no HV também parece mediar tais efeitos.

Palavras chaves: Ansiedade. Fator Liberador de Corticotrofina. Proteína Quinase A. Hipocampo. Labirinto em Cruz Elevado. Teste de Exposição ao Rato.

ABSTRACT

Anxiety disorders involve several behavioral and autonomic reactions in face of aversive stimuli that may threaten life. These responses are modulated by different neurotransmitters and neural modulators in limbic system structures, such as hippocampus. Among the neurotransmitters involved, it has been attributed to corticotrophin releasing factor (CRF) an important role in regulating anxiety-related defensive behaviors, since the presence of CRFergic neurons and CRF receptors in extrahypothalamic sites has been identified. When CRF binds to these Gs-protein coupled receptors it triggers a cascade of intracellular reactions involving the activation of the cAMP/Protein Kinase A (PKA) pathway. This study aimed to evaluate the role of the CRF neurotransmitter and PKA in the hippocampus of mice in anxiety-related behavioral responses when exposed to the Elevated Plus Maze (EPM) through the effects of CP 376395, CRF1 antagonist, and H-89 microinjection, a PKA inhibitor, and rat exposure test (RET), through nuclear expression of Fos protein and effects CP 376395 microinjection. From EPM exposure results, it was possible to verify that the intra-ventral hippocampus (VH) treatment with CP 376395 increased the time in the open arms of the EPM at 3.0nmol dose, however, the 6.0nmol dose increased the number of unprotected head dipping when injected into the dorsal hippocampus (DH) and the number of protected head dipping when injected into VH. None of the doses promoted changes in the stretched-attend posture (SAP) behavior and arrival at the end of the open arms. Microinjection of H-89 at 2.5nmol dose in VH, but not in DH increased the time and number of entries in the open arms, but the 5.0nmol dose increased the number of entries in closed arms. Both doses reduced the expression of protected head dipping behavior on the same subregion. When exposed to RET, there was a decrease only in the number of Fos-positive cells in DH from mice repeatedly exposed to the rat in relation to the toy exposed group. On the other hand, in VH, there was an increase in Fos expression in the groups exposed to the rat in a single or repeated way, in relation to the control and toy exposed groups. The behavioral analysis of these animals revealed that the repeated exposure to the rat decreased the time spent on the surface of the apparatus, as well as the time of contact with the screen and climbing. The single exposure to rat also decreased the time climbing on the screen and increased the number of SAP. Microinjection of CP 376395 at 3.0 and 6.0nmol doses in VH increased the residence time on the surface of the RET, but only the dose of 6.0nmol was able to exert this effect in DH. In relation to the complementary behaviors, only the 3.0nmol dose, injected in VH, decreased the number of SAP. Thus, this study has demonstrated a CRF participation mainly in the VH, in the mediation of anxiety-like behaviors and, moreover, that cAMP/PKA pathway is also involved in the mediation of these effects.

Key words: Anxiety. Corticotropin Releasing Factor. Protein Kinase A. Hippocampus. Elevated Plus Maze. Rat Exposure Test.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Representação esquemática do hipocampo e suas sub-regiões.	19
Figura 2: Representação da distribuição de receptores CRF1 e CRF2 no encéfalo de rato....	22
Figura 3: Aparato do Labirinto em Cruz Elevado (LCE).....	30
Figura 4: Aparato do Teste de Exposição ao Rato (TER).....	32
Figura 5: Sítios de microinjeção no hipocampo dorsal (HD).....	37
Figura 6: Sítios de microinjeção no hipocampo ventral (HV)	38
Figura 7: Medidas espaço-temporais no LCE para microinjeção de CP 376395 no HD e HV	39
Figura 8: Comportamento complementar de mergulho no LCE para microinjeção de CP 376395 no HD e HV	40
Figura 9: Comportamento complementar de esticada no LCE para microinjeção de CP 376395 no HD e HV	41
Figura 10: Comportamento complementar de chegada ao final dos braços abertos do LCE para microinjeção de CP 376395 no HD e HV	42
Figura 11: Medidas espaço-temporais no LCE para microinjeção de H-89 em HV e HD.....	43
Figura 12: Comportamento complementar de mergulho no LCE para microinjeção de H-89 no HD e HV	44
Figura 13: Comportamento complementar de esticada no LCE para microinjeção de H-89 no HD e HV	45
Figura 14: Comportamento complementar de chegada ao final dos braços abertos do LCE para microinjeção de H-89 no HD e HV	45
Figura 15: Fotomicrografias da expressão de proteínas Fos no HD.	46
Figura 16: Efeito da exposição única ou repetida de camundongos ao rato de brinquedo ou ao rato no número de células que expressaram Fos no HD.....	47
Figura 17: Fotomicrografias da expressão de proteínas Fos no HV	48
Figura 18: Efeito da exposição única ou repetida de camundongos ao rato de pelúcia ou ao rato no número de células que expressaram Fos no HV	48
Figura 19: Medidas espaço-temporais para a exposição única ou repetida de camundongos ao rato de brinquedo ou ao rato no TER	49
Figura 20: Comportamentos complementares para a exposição única ou repetida de camundongos ao rato de brinquedo ou ao rato no TER	50
Figura 21: Medidas espaço-temporais no TER para a micro injeção de CP 376395 no HD e HV	52
Figura 22: Comportamento compementar de contato com a tela no TER para a microinjeção de CP 376395 no HD e HV	53
Figura 23: Comportamento complementar de escalada na tela no TER para microinjeção de CP 376395 no HD e HV.....	53
Figura 24: Comportamento complementar de esticadas no TER para microinjeção de CP 376395 no HD e HV.....	54

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ACTH	<i>Adrenocorticotropic Hormon</i> Hormônio Adrenocorticotrófico
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
BNST	<i>Bed Nucleus of Stria Terminalis</i> Núcleo intersticial da estria terminal
CP 376395	[N-(1-ethylpropyl)-3,6-dimethyl-2-(2,4,6-trimethylphenoxy)-4-pyridinamine hydrochloride (doses: 0; 3,0 e 6,0 µL)
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i> Proteína de ligação do elemento de resposta ao AMP cíclico
CRF	<i>Corticotrophin Releasing Factor</i> Fator Liberador de Corticotrofina
CRF1	<i>Corticotrophin-releasing factor receptor type 1</i> Receptor do Fator Liberador de Corticotrofina tipo 1
CRF2	<i>Corticotrophin-releasing factor receptor type 2</i> Receptor do Fator Liberador de Corticotrofina tipo 2
DSM-V	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders V</i> Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais V
GABA	<i>Gamma-AminoButyric Acid</i> Ácido Gama-aminobutírico
GDP	Guanosina difosfato
GTP	Guanosina trifosfato
H-89	dihidrocloreto de (N-[2-(p-Bromocinamilamino) etil]-5-isoquinolinesulfonamida)
HD	Hipocampo Dorsal
HPA	Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
HV	Hipocampo Ventral
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
LTP	<i>Long-Term Potentiation</i> Potenciação de Longa Duração

MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i> Proteína Quinase Mitógeno Ativada
MCP	Matéria Cinzenta Periaquedutal
PGs	Proteína G estimulatória
PKA	Proteína Kinase A
PKC	Proteína Kinase C
RNA_m	<i>Ribonucleic Acid</i> Ácido Ribonucleico Mensageiro
TER	Teste de Exposição ao Rato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Transtornos de ansiedade e reações de defesa	12
1.2 Neuroanatomia envolvida nas reações de defesa	16
1.3 Envolvimento do Fator Liberador de Corticotrofina (CRF) na neurobiologia das reações de defesa	20
1.4 Modelos animais	23
2 JUSTIFICATIVA	26
3 OBJETIVOS	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 Sujeitos	28
4.2 Drogas	28
4.3 Cirurgia estereotáxica e administração de fármacos no hipocampo	28
4.4 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)	29
4.5 Teste de Exposição ao Rato (TER)	31
4.5.1 Fase 1 - Habituação	32
4.5.2 Fase 2 - Teste de Exposição	32
4.6 Análise histológica	33
4.7 Análise imuno-histoquímica para expressão de proteína Fos	33
4.8 Delineamento experimental	35
4.8.1 Experimento 1 – Avaliação do efeito da microinjeção de CP 376395 no HD e HV sobre as reações de defesa de camundongos expostos ao LCE	35
4.8.2 Experimento 2 – Avaliação do efeito da microinjeção de H-89 no HD e HV sobre as reações de defesa de camundongos expostos ao LCE	35
4.8.3 Experimento 3 – Avaliação da expressão nuclear de proteína Fos em neurônios ativados do HD e HV nas reações de defesa de camundongos expostos ao TER	36
4.8.4 Experimento 4 - Avaliação da microinjeção de CP 376395 no HD e HV sobre as reações de defesa de camundongos expostos ao TER	36
4.9 Análise estatística	36
4.10 Ética	36
5 RESULTADOS	37
5.1 Sítios da microinjeção	37
5.2 Experimento 1 – Avaliação do efeito da microinjeção de CP 376395 no HD e HV sobre as reações de defesa de camundongos expostos ao LCE	38

5.2.1	Análise das medidas espaço-temporais	38
5.2.2	Análise das medidas complementares	39
5.3	Experimento 2 – Avaliação do efeito da microinjeção de H-89 no HD e HV nas reações de defesa e ansiedade	42
5.3.1	Análise das medidas espaço-temporais	42
5.3.2	Análise das medidas complementares para microinjeção de H-89 no HD e HV	43
5.4	Experimento 3 – Avaliação da expressão nuclear de proteína Fos em neurônios ativados do HD e HV nas reações de defesa de camundongos expostos ao TER.....	46
5.4.1	Expressão nuclear de proteína Fos em neurônios do HD.....	46
5.4.2	Expressão nuclear de proteína Fos em neurônios do HV.....	47
5.4.3	Avaliação dos comportamentos defensivos exibidos por camundongos após exposição ao TER.....	49
5.4.4	Análise das medidas complementares dos animais expostos ao TER	50
5.5	Experimento 4 – Avaliação do efeito da microinjeção de CP 376395 no HD e HV nas reações de defesa e ansiedade de camundongos expostos ao TER.....	51
5.5.1	Análise das medidas espaço-temporais para microinjeção de CP 376395 no HD e HV no TER	51
5.5.2	Análise das medidas complementares para microinjeção de CP 376395 no HD e HV no TER	52
6	DISCUSSÃO	55
7	CONCLUSÃO.....	65
	REFERÊNCIAS	66
	ANEXO I.....	77

1 INTRODUÇÃO

1.1 Transtornos de ansiedade e reações de defesa

O medo e a ansiedade são emoções que desencadeiam respostas adaptativas naturais do organismo do ser humano e de outros animais. Diante de situações de perigo tais respostas podem ser expressas através de comportamentos movidos por reações de defesa, como luta e/ou fuga, imobilidade, entre outros (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2008; LANG; DAVIS; OHMAN, 2000; GARNER et al., 2009; SALUM et al. 2013).

Para Grinde (2005), estas respostas ocorrem diante de uma situação aversiva em razão de aumentar as chances de sobrevivência do animal, permitindo que ele fuja, se a fuga for possível, se esconda ou mesmo apresente outros comportamentos defensivos quando não houver possibilidade de fuga. Outra resposta relatada por Lang, Davis e Ohman (2000) é a agressão como forma de defesa por parte do indivíduo e/ou animal que está sob uma situação de ameaça explícita, a qual é denominada agressão defensiva.

Ansiedade e medo são emoções importantes experienciadas regularmente, dentro de um repertório de respostas emocionais aos eventos cotidianos, e podem ser observadas em todas as culturas humanas e em diferentes espécies de animais. Entretanto, são facilmente confundidas devido sua similaridade psicológica e por induzir reações fisiológicas, em muitos casos, semelhantes (WIEDEMANN, 2015).

O medo é a expressão de uma emoção negativa evocado na presença de um estímulo aversivo, capaz de gerar algum dano imediato ao exposto. Sua principal função é proteger e/ou ensinar, tanto animais quanto seres humanos, sobre as circunstâncias de perigo que possam trazer riscos à vida (SALUM et al., 2013). Apesar de ser considerado uma emoção desagradável, a ausência do medo pode causar prejuízos ao indivíduo (GRINDE, 2005), uma vez que o torna mais vulnerável a ameaças que podem lhe custar a vida.

O termo ansiedade é geralmente designado a um estado de apreensão e tensão, cujas causas não produzem necessariamente o medo, mas uma expectativa por algo que acontecerá em um futuro próximo, nem sempre ruim (LENT, 2005). No entanto, assim como o medo, tal emoção é fundamental para a adaptação e sobrevivência do indivíduo ao meio no qual está inserido, preparando-o para enfrentar os desafios do cotidiano (GRINDE, 2005; BEAR; CONNORS; PARADISO, 2008, SALUM et al., 2013).

A ansiedade é um mecanismo de resposta que foi desenvolvido e aprimorado ao longo da evolução e funciona como uma espécie de “alarme” quando uma ameaça em potencial é reconhecida, permitindo que o organismo possa se preparar para responder de maneira apropriada ao estímulo estressor. (GRINDE, 2005; OHL; ARNDT; VAN DER STAAY, 2008; HIGGINS; GEORGE, 2010).

Assim, as manifestações de ansiedade são consideradas reações normais até o ponto que começam a provocar sofrimento no indivíduo (LENT, 2005), o que indica a má adaptação, muitas vezes devido a alterações neurais originadas por diversas causas. Neste caso, já não se trata de ansiedade normal e sim, patológica.

Segundo o Manual Diagnóstico e Estatístico das Desordens Mentais, 5ª edição (DSM-V) (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION [APA], 2013), os transtornos de ansiedade compreendem um grupo heterogêneo de distúrbios que possuem etiologias distintas, mas compartilham características de medo, ansiedade e preocupação associadas as alterações comportamentais e fisiológicas (APA, 2013; WIEDEMANN, 2015).

Estes diferem da ansiedade transitória por serem estados persistentes, com duração típica de seis meses ou mais, tornando-os manifestações patológicas (APA, 2013). Os indivíduos que desenvolvem esses transtornos podem apresentar comportamentos como afeto negativo, apreensão, sensação de medo, inquietação, preocupação excessiva com acontecimentos reais ou inexistentes, antecipação de uma situação de perigo ou que traga algum tipo de desconforto, entre outras (RACHMAN, 2004).

As manifestações fisiológicas relacionadas aos distúrbios de ansiedade podem variar entre os indivíduos, sendo fracas para alguns e nítidas para outros. Também podem influenciar diversos órgãos e sistemas do corpo, como os sistemas cardiovascular, respiratório, digestivo, endócrino e imunológico (LENT, 2005). O indivíduo pode apresentar sintomas como tensão muscular, sudorese, náuseas, diarreia, falta de ar, taquicardia, tonturas, alterações hormonais e outros (APA, 2013).

Os transtornos de ansiedade se desenvolvem gradualmente e podem iniciar em qualquer estágio de vida, podendo persistir caso não sejam tratados (APA, 2013). As experiências específicas vividas por cada indivíduo possuem um papel crítico como fator de risco no desenvolvimento dos transtornos de ansiedade (KENDLER et al., 1992 a). Eventos sociais, psicológicos, físicos e ambientais são considerados importantes fatores de risco e por esse motivo, essas desordens possuem origens complexas (WIEDEMANN, 2015).

Estudos realizados por Kendler e colaboradores (1992a; 1992b) evidenciaram as manifestações genéticas como outro potencial fator de risco na etiologia dos transtornos de ansiedade, sugerindo maior suscetibilidade do indivíduo para o desenvolvimento desses transtornos.

Os transtornos de ansiedade se referem a um conjunto de patologias distintas, que se diferenciam entre si a partir de sua etiologia, do estímulo considerado estressor e os comportamentos expressos pelos indivíduos frente esse estímulo. Dentre eles estão o transtorno do pânico, transtorno de ansiedade generalizada, transtorno de ansiedade social e fobias (GARNER, 2009).

Já os transtornos de estresse pós-traumático e obsessivo-compulsivo não são mais incluídos, pois os indivíduos que os desenvolvem exibem características clínicas disfóricas e anedônicas, podem externalizar agressividade e outros sintomas que não são baseados totalmente na ansiedade e por isso, são agrupados na categoria de transtornos relacionados ao trauma e estresse (APA, 2013; WIEDEMANN, 2015).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que a prevalência dos transtornos de ansiedade é alta. Alonso et al. (2004) identificaram que 13,6% da população de seis países europeus relatou a presença de um desses transtornos ao longo da vida. Da mesma maneira, Kessler et al. (2005) identificaram que as desordens de ansiedade são as mais prevalentes (28,8%) ao longo da vida da população americana, sendo a idade média de início a partir dos onze anos. Tal patologia é diagnosticada com mais frequência no sexo feminino, sendo elas até duas vezes mais propensas a experimentar os transtornos de ansiedade quando comparadas ao sexo masculino (ALONSO et al., 2004; KESSLER et al., 2005). Cerca de 24 milhões de brasileiros sofrem com esse tipo de patologia (MACHADO et al., 2012), incluindo casos entre crianças e adolescentes, que mesmo em idade jovem, podem apresentar tais características psicopatológicas (JATOBÁ; BASTOS, 2007).

O DSM-V (APA, 2013) descreve que os ataques de pânico são ondas abruptas de medo ou desconforto intensos que atingem seu pico em minutos, e durante o qual podem ocorrer quatro ou mais sintomas de caráter físico ou cognitivo: palpitações ou taquicardia, sudorese, tremores, dispneia, dores no peito, náuseas ou desconfortos abdominais, tonturas, parestesias, medo de perder o controle e medo de morrer. Eles podem se desenvolver a partir de um estado de calma ou mesmo de um estado de ansiedade.

Johnson, Federici e Shekhar (2014) e o DSM-V (APA, 2013) classificam os ataques de pânico em dois tipos: (1) inesperado ou espontâneo, que ocorre sem razão aparente, na ausência

de uma situação-gatilho externa identificada pelo indivíduo ou (2) esperado, que ocorre em resposta à um contexto estressor ou estímulo já temido e que esteja associado à indução do ataque de pânico.

Na desordem do pânico, ataques inesperados e recorrentes são experienciados pelo indivíduo que também sofre com uma preocupação persistente sobre ter ataques de pânico adicionais. Portanto, muitos pacientes com esse distúrbio sofrem com ansiedade antecipatória e mudanças cognitivas e comportamentais mal adaptativas, resultando em evitação fóbica. Essas mudanças representam as tentativas de minimizar os ataques de pânico e suas consequências, como por exemplo, constrangimentos ou medo de ser julgado de maneira negativa por sintomas visíveis (APA, 2013; SOBANSKI; WAGNER, 2017).

Estudos epidemiológicos realizados nos Estados Unidos estimam que sua prevalência ao longo da vida é de aproximadamente 6,8% da população em geral (KESSLER et al, 2014). A ocorrência dos transtornos de pânico antes dos 14 anos de idade é baixa, mas durante a adolescência essa taxa pode aumentar gradualmente, atingindo seu pico na idade adulta. Apesar de incomum, o início do transtorno de pânico após os 45 anos de idade pode ocorrer (APA, 2013).

O transtorno de ansiedade generalizada é caracterizado por excessiva ansiedade e preocupação sobre diversos eventos e atividades, de difícil controle pelo indivíduo, cuja duração é de pelo menos 6 meses. A ansiedade e preocupação vem acompanhadas de 3 ou mais dos sintomas: inquietação, fadiga, falta de concentração ou memória, tensão muscular, irritabilidade e distúrbios do sono (APA, 2013; WIEDEMANN, 2015). A idade média de início do transtorno de ansiedade generalizada é por volta dos 30 anos e raramente se desenvolve antes da adolescência (KESSLER et al, 2014).

1.2 Neuroanatomia envolvida nas reações de defesa

Blanchard, Flannelly e Blanchard (1986) conduziram experimentos etológicos de modo a entender as estratégias de defesa exibidas por ratos selvagens frente a uma ameaça predatória. A partir desse estudo, três níveis de comportamentos de defesa foram distinguidos, baseados na presença ou não de um estímulo aversivo, bem como na distância que o mesmo se encontrava: (1) frente a uma ameaça em potencial, foi identificada a avaliação de risco, com exploração cautelosa do ambiente e orientação para origem do estímulo, (2) frente a uma ameaça distal, quando o perigo estava a uma distância segura, verificou-se aumento de tensão muscular e imobilidade (congelamento), de maneira que pudessem se preparar para uma defesa ativa e (3) frente a uma ameaça proximal, em que são exibidas reações de fuga e luta, como saltos precedidos de vocalização e exibição dos dentes.

Estudos em espécies animais têm fornecido evidências consideráveis sobre os comportamentos de defesa (SHUHAMA et al., 2016) e, embora os comportamentos emocionais e alguns distúrbios da ansiedade pareçam ser específicos para seres humanos, grande parte dos processos afetivos pode ser estudada em animais (JOACHIM et al., 2003).

Imagens de ressonância magnética funcional têm sido utilizadas em pesquisas que objetivam entender a neuroanatomia dos comportamentos de defesa e ajudam a estabelecer uma comparação entre o processamento neural de animais e humanos. Shuhama e colaboradores (2016) realizaram um estudo onde foi avaliada a resposta subjetiva de indivíduos ao imaginar cenários de ameaça iminente ou potencial e cenários neutros ou agradáveis, utilizando imagens de ressonância magnética para análise das áreas encefálicas ativadas durante a atividade. Os pesquisadores perceberam que durante a antecipação de um evento aversivo, no cenário de ameaça potencial, havia aumento da atividade cerebral do hipocampo, hipotálamo, amígdala e principalmente a parte ventro-medial do córtex pré-frontal, que parecem estar relacionado a reunião de informações contextuais. Entretanto, quando a ameaça se tornava proximal e intensa, havia aumento da ativação da matéria cinzenta periaquedutal (MCP).

As diferenças entre os transtornos do pânico e de ansiedade generalizada, descritos previamente, indicam que cada uma das desordens tem seu substrato neural (GRAEFF; DELBEN, 2008) e o conhecimento sobre a neurobiologia dos comportamentos defensivos é importante para entender as desordens mentais, em particular os transtornos de ansiedade (SHUHAMA et al., 2016).

As regiões envolvidas com a expressão emocional são reunidas em um conjunto de estruturas corticais e subcorticais denominadas de lobo límbico, situado em regiões mediais do encéfalo (LENT, 2005).

As tentativas de entender os sistemas efetores que atuam no controle do comportamento emocional são de longa data. James Papez, em 1937, propôs pela primeira vez uma circuitaria específica no encéfalo dedicada à experiência emocional e sua manifestação, o lobo límbico. Dentre as estruturas dessa região, duas se destacavam na expressão das emoções: o giro cingulado e o hipocampo (PURVES et al., 2005). Posteriormente, esse circuito foi revisado e ao lobo límbico foram incluídas outras estruturas, como o hipotálamo e a amígdala (FERNANDEZ-DE-MOLINA; HUNSPERGER, 1959; FERNANDEZ-DE-MOLINA; HUNSPERGER, 1962), que possuem conexões com diversas estruturas através de projeções aferentes e eferentes, o córtex pré-frontal, gânglios da base, tálamo e amígdala (PURVES et al., 2005).

Dentre os componentes do sistema límbico, uma estrutura localizada na superfície ântero-medial do lobo temporal se destaca como “botão” de disparo das emoções, a amígdala, acionada principalmente pelos estímulos causadores de medo. (LENT, 2005; PURVES et al., 2005). Também conhecida como “complexo amidaloide”, do qual também fazem parte núcleos como o BNST (núcleo intersticial da estria terminal, do inglês: bed nucleus of stria terminalis), este complexo nuclear desempenha um papel crítico na determinação do significado emocional de estímulos sensoriais e a produção de respostas relacionadas ao medo (MARTINEZ et al., 2011).

Além da amígdala, o hipotálamo também é uma importante área envolvida na circuitaria defensiva, não somente pela sua modulação endócrina, mas também pelas importantes conexões tanto por vias aferentes quanto eferentes com estruturas efetoras e moduladoras do comportamento.

O sistema hipotalâmico medial defensivo é uma circuitaria proposta por Canteras (2002), que possui papel central na integração e iniciação de respostas defensivas inatas frente a um estímulo ameaçador, como por exemplo um predador. Este circuito, formado pelos núcleos hipotalâmicos anterior, ventromedial e a parte dorsal do núcleo pré-mamilar, parece estar preservado entre as espécies e parte dele também pode estar presente nos humanos, organizando as respostas defensivas. Suas projeções são enviadas para a porção dorsolateral da MCP e a sua estimulação deflagra respostas defensivas de caráter autonômico e comportamental específicas de cada espécie (CANTERAS et al., 2010; CANTERAS;

GRAEFF, 2014). Entretanto, o tipo de resposta mediada pela MCP depende do tipo e da proximidade da ameaça e também de seu grau de ativação, sendo congelamento e fuga para ameaças próximas, com maior ativação da região dorsolateral da estrutura, e comportamentos de avaliação de risco para as situações ambíguas, com menor ativação desse sítio encefálico (CANTERAS; GRAEFF, 2014).

O córtex pré-frontal é a parte anterior do encéfalo de mamíferos e parece estar envolvido na modulação dos comportamentos defensivos através de sua porção medial, que se conecta, reciprocamente, com estruturas do sistema límbico e também com outras diversas regiões corticais (CANTERAS et al., 2010). Evidências sugerem que seu envolvimento nas reações de defesa possa estar mais relacionado com detectar as ameaças remotas, reunir informações contextuais e coordenar essas respostas fisiológicas e autonômicas relacionadas a ansiedade. (CANTERAS et al., 2010; MOON; JEONG, 2015; MOON et al., 2016).

Outra estrutura que atualmente tem demonstrado estar envolvida na mediação das respostas de defesa relacionadas à ansiedade é o hipocampo. O termo “Hipocampo” é empregado de maneira ampla, fazendo referência ao conjunto de quatro divisões principais: a área entorrinal, o complexo subicular, o giro denteado e o Corno de Ammon, o hipocampo propriamente dito. Essas estruturas são interconectadas por uma grande quantidade de vias de associação, e por esse motivo compõem a unidade morfofuncional conhecida por Formação Hipocampal, posicionada medialmente no lobo temporal, atrás do complexo amigdalóide (LENT, 2008).

O hipocampo é a parte primitiva do córtex cerebral, uma eminência alongada que se curva para dentro e para cima. Situa-se nas faces mediais de cada lobo temporal, acima do assoalho do corno inferior dos ventrículos laterais e acima do giro para-hipocampal, ao qual se funde ao longo de suas bordas (GUYTON, 2008; MACHADO, 2004). Quando visto em cortes sagitais, o hipocampo assume a forma de um “C” invertido e que pode ser subdividido em três regiões em roedores (CA1 a CA3) (LENT, 2008). O hipocampo pode ser funcionalmente dividido nas regiões ventral e dorsal (PENTKOWSKI et al., 2006), diferenciações utilizadas nos experimentos deste trabalho, sendo considerado hipocampo dorsal, a região CA1 e o hipocampo ventral, a região do subículo ventral. (Figura 1).

O hipocampo está envolvido na orientação espacial, bem como no aprendizado e memória (PENTKOWSKI et al., 2006). É conhecido por sua importante ação na construção das memórias de longa duração onde, dentre as subdivisões desta área, a CA1 tem papel fundamental. Esta região, por estar intercomunicada com diversas regiões do encéfalo, recebe

as aferências provenientes de estruturas encarregadas de processar as informações do ambiente e através de eventos bioquímicos envolvidos no processo conhecido por Potenciação de Longa Duração (LTP, do inglês: Long-Term Potentiation), permite que a nova informação fique permanentemente armazenada no córtex cerebral (LENT, 2008).

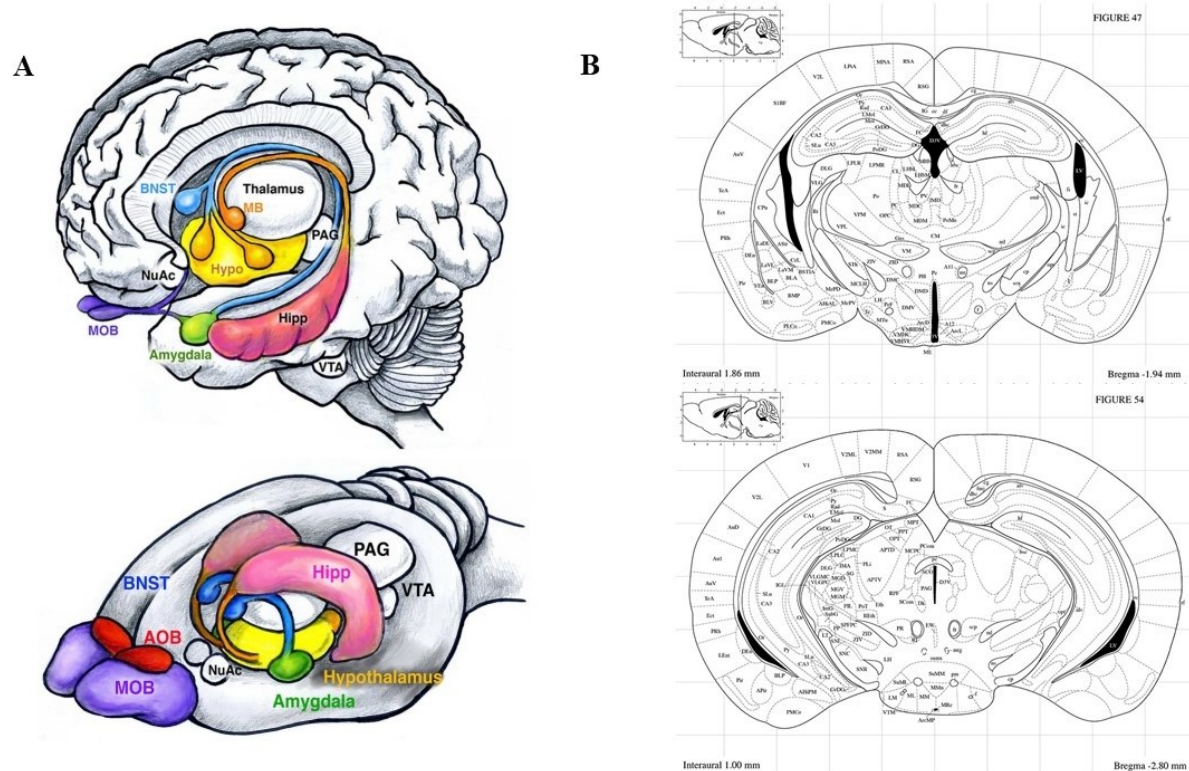


Figura 1: A. Representação esquemática comparando as principais estruturas do sistema límbico de humanos (acima) e roedores (abaixo). Destaque para o hipocampo (Hipp), em rosa. Fonte: adaptada (SOKOLOWSKI; CORBIN, 2012). B. Representação esquemática das sub-regiões hipocampo dorsal (acima) e hipocampo ventral (abaixo). Fonte: adaptada (PAXINOS; FRANKLIN, 2001).

Tem se tornado cada vez mais evidente a atuação do hipocampo na expressão dos comportamentos defensivos (PENTKOWSKI et al., 2006). As várias conexões estabelecidas com áreas distintas do córtex e estruturas do sistema límbico faz com que quase todo tipo de experiência sensorial cause ativação de pelo menos uma de suas divisões e ele, por sua vez, distribui sinais eferentes para o tálamo, hipotálamo e outras formações do sistema límbico (GUYTON; HALL, 2006; GUYTON, 2008).

A região septo-hipocámpal relaciona diretamente com o sistema de defesa hipotalâmico medial, descrita anteriormente. Por este motivo, o hipocampo pode ser capaz de controlar as respostas defensivas frente a situação aversiva. Essa região modula reações do tipo ansiosas em resposta às situações de conflito, inibindo imediatamente os programas motores que estão em

curso de execução, inibindo assim, os comportamentos. Ao mesmo tempo, o hipocampo aumenta os níveis de atenção e vigilância para melhorar a reunião de informações ambientais e da ameaça (CANTERAS et al., 2010; CANTERAS; GRAEFF, 2014).

Além de suas funções bem estabelecidas, o hipocampo parece desempenhar um papel relacionado a análise de contexto de um determinado ambiente, uma vez que ameaças potenciais podem provocar comportamentos conflituosos, como tendência a aproximação ou evitação (CANTERAS et al., 2010; CANTERAS; GRAEFF, 2014).

Detendo a tarefa de análise do contexto, o hipocampo pode modular a atividade motora adaptativa em resposta aos eventos sensoriais do meio ambiente. Segundo McNaughton e Corr (2004), esse sistema é denominado Sistema de Inibição Comportamental e está ativado persistentemente em situações de ansiedade.

Desse modo, a ansiedade parece não depender apenas de estruturas encefálicas específicas que exercem funções únicas, mas sim de regiões do encéfalo que interagem entre si. Essas estruturas devem trabalhar em conjunto, ativando a circuitaria ideal de acordo com a demanda pelo processamento cognitivo da informação. As desordens de ansiedade podem se desenvolver caso ocorram quaisquer alterações nos circuitos neurais envolvidos na modulação dos comportamentos emocionais (CANTERAS et al., 2010).

1.3 Envolvimento do Fator Liberador de Corticotrofina (CRF) na modulação das reações de defesa

A participação de neurotransmissores na mediação das reações de defesa tem sido alvo de muita pesquisa e nesse sentido, trabalhos têm indicado a participação da serotonina (GRAEFF, 2004; GRAEFF, 2017), gaba (REIMER; OLIVEIRA; BRANDÃO, 2008), glutamato (MIGUEL; NUNES-DE-SOUSA, 2008) e outros neurotransmissores. Dentre eles, o nosso estudo direcionou à tentativa de um melhor entendimento do fator liberador de corticotrofina (do inglês, Corticotropin Releasing Factor, CRF), cuja participação já foi observada em outros sítios límbicos como o complexo amigdalóide, matéria cinzenta periaquedutal, córtex pré-frontal medial e outros.

Desde sua descoberta em 1981 (VALE et al., 1981), tem sido atribuído ao CRF um importante papel na regulação das respostas fisiológicas e psicológicas frente ao estresse (REUL; HOLSBOER, 2002; BALE; VALE, 2004; ROSEBOOM et al., 2005; WANG et al., 2011). O CRF, portanto, está envolvido em diversas funções e por isso é capaz de mediar diversos recursos comportamentais, autonômicos, neuroendócrinos e imunológicos do

organismo, criando respostas ao medo e ansiedade induzidos pelo estímulo estressor (ROSEBOOM et al., 2002; BALE; VALE, 2004; BORELLI et al., 2013; DE FRANCESCO et al., 2015).

O CRF é um peptídeo de 41 aminoácidos conhecido por ser o principal mediador neuroendócrino da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, conhecido por eixo HPA (hipotálamo-pituitária-adrenal), resultando na liberação de glicocorticoides frente ao estímulo aversivo (CARVALHO-NETTO et al., 2007; MIGUEL; NUNES-DE-SOUZA, 2011; WANG et al., 2011).

O estresse é capaz de promover a ativação do sistema CRFérgico, resultando na regulação do eixo HPA. As situações de ameaça e estresse são conduzidas pelo Sistema Nervoso Central e podem ser integradas também no hipotálamo, onde ativam os neurônios do núcleo paraventricular desta estrutura a secretar o CRF. O CRF é transportado pela circulação-porta hipofisária para a hipófise anterior e estimula a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). A secreção deste hormônio resulta na síntese e secreção de glicocorticoides pelas glândulas adrenais (ARTZ; HOLSBOER, 2006; ROSEBOOM et al., 2002; BALE; VALE, 2004).

Além de sua atuação no eixo HPA, o Sistema Nervoso Central possui neurônios CRFérgicos e receptores para CRF em vários outros sítios anatômicos extra-hipotalâmicos, como demonstram os estudos anatômicos que utilizaram anticorpos para CRF e RNA-m (MERCHENTHALER, 1984; SWANSON et al, 1983; VAN PETT et al, 2000). Desta forma, foi identificada a presença de concentrações elevadas de neurônios CRFérgicos e RNA-m codificadores para receptores de CRF em diversas áreas encefálicas incluindo a amígdala, núcleo intersticial da estria terminal (BNST), núcleo acumbens, córtex cerebral, matéria cinzenta periaquedutal, hipocampo, *Locus Coeruleus*, núcleos da rafe, entre outras.

A família do CRF exerce sua ação biológica através da ligação a receptores pertencentes à classe de receptores transmembrana acoplados à proteína G, em especial à proteína Gs. Os receptores CRF1 e CRF2, por onde a o neuropeptídeo CRF exerce sua ação, estão representados na figura 2 (TAKAHASHI et al, 2001; BALE; VALE, 2004). A ligação com tais receptores desencadeia uma série de sinalizações intracelulares (ARTZ; HOLSBOER, 2006).

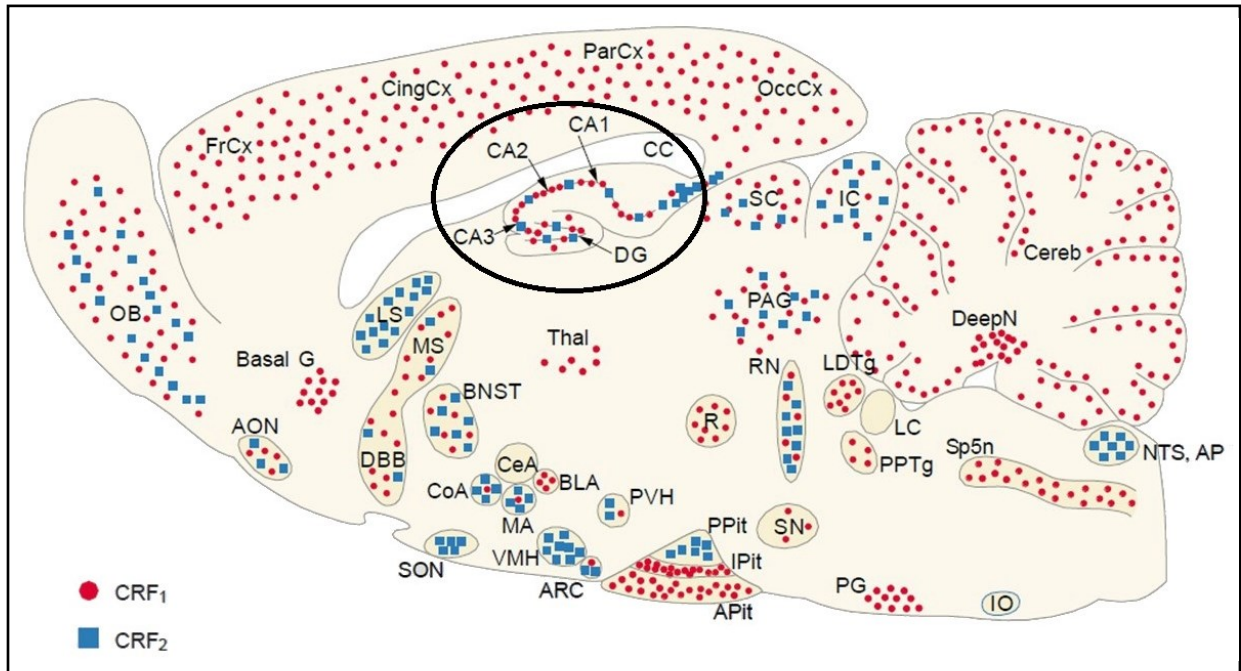


Figura 2: Representação esquemática da distribuição dos receptores CRF1 e CRF2 em uma seção sagital do encéfalo de rato. Os círculos representam a distribuição dos receptores CRF1 e os quadrados ilustram a distribuição dos receptores CRF2. A representação do hipocampo está circulado. Fonte: adaptada (REUL; HOLLSBOER, 2002).

Acredita-se que as respostas comportamentais, endócrinas e autonômicas provocadas pela ação do CRF frente a estímulos estressores envolvem os receptores CRF do tipo 1, devido à alta afinidade do neuropeptídeo a esse receptor (ZORRILLA; KOOB, 2010). Em contraste, o papel dos receptores CRF do tipo 2 nas reações de defesa relacionadas a ansiedade está menos esclarecido, uma vez que os resultados obtidos durante as pesquisas são contraditórios (TAKAHASHI et al, 2001).

Quando ocorre a ligação do CRF, há mudança da conformação do receptor, com separação das subunidades que compõem a proteína Gs. A troca de GDP por GTP determina a ativação da subunidade responsável por deflagrar a cascata de reações. Através do processo descrito, a enzima adenilato ciclase aumenta sua concentração no meio intracelular e catalisa a formação do AMPc, que por sua vez determina a ativação da proteína quinase dependente de AMPc, a PKA (MOURA; VIDAL, 2011). A PKA participa da via de transdução de sinais desencadeada pelo CRF. Sua função é ativar fatores de transcrição através da fosforilação, resultando na ativação de tais proteínas que determinam as respostas específicas do estímulo dado pelo CRF ao se ligar em seus receptores (MOURA; VIDAL, 2011; BARANOVA, 2013).

Um exemplo clássico de mecanismo de ativação dos fatores de transcrição mediado pela PKA é a fosforilação de CREB (Proteína de Ligação do Elemento de Resposta ao AMPc), que a torna uma proteína ativada (MOURA; VIDAL, 2011). O CREB é um fator que se encontra

em níveis elevados diante das situações que provocam estresse e ansiedade, como demonstrou o estudo de Adamec, Berton e Razek (2009), onde a expressão do CREB reproduziu mudanças comportamentais, cerebrais e moleculares similares aos efeitos observados em ratos que sofreram estresse por predador.

Entretanto, Stern e colaboradores (2011) em seu estudo sobre as vias de ativação do CREB, demonstraram que a fosforilação desta proteína ocorre também por uma via independente da sinalização pela PKA e AMPc induzida pelo CRF. Por outro lado, Artz e Holsboer (2006), descreveram, em sua revisão sobre a sinalização do CRF, o achado de uma via distinta daquela proposta inicialmente, mas que também é acionada a partir da ligação do neurotransmissor ao seu receptor CRF1. Ambos os estudos caracterizam uma cascata de sinalização mediada pela ativação da MAPK (Proteína Quinase Mitógeno Ativada), que também resultam na fosforilação e ativação do CREB (ARTZ; HOLSBOER, 2006; STERN et al., 2011).

Além das duas vias de fosforilação do CREB descritas anteriormente, Blank et al. (2003) demonstraram, através de técnicas eletrofisiológicas, um terceiro caminho de sinalização no hipocampo de camundongos, intermediado pela PKC a partir da ativação da proteína Gq, com aumento da ativação da subunidade Beta-Gama da proteína G, diferente do que ocorre com a ativação da PKA. A participação da subunidade Beta-Gama no mecanismo de fosforilação do CREB induzida pelo CRF também foi relatada nas pesquisas de Stern e colaboradores (2011). Nesse sentido, o hipocampo é um importante sítio de ação do CRF, bem como das diferentes vias fosforilativas de CREB.

1.4 Modelos animais

Os entraves éticos decorrentes do estudo em humanos que permitem o melhor entendimento da fisiopatologia dos transtornos psiquiátricos e o desenvolvimento de novas alternativas de tratamento psicofarmacológico, levaram a maior demanda por modelos animais destinados ao estudo das reações de defesa (DA MATTA, 2010; NUNES; HALLAK, 2014).

Os modelos animais tornaram-se ferramentas fundamentais para o estudo das psicopatologias humanas, uma vez que permitem a análise de suas múltiplas causas: ambientais, farmacológicas ou genéticas, além da análise da fisiopatologia dos comportamentos relacionados a investigação detalhada dos processos neurobiológicos envolvidos (BOURIN et al., 2007). Dessa forma, torna-se clara a contribuição dos modelos animais para o entendimento

dos mecanismos subjacentes aos transtornos de ansiedade, bem como o desenvolvimento de novas terapias farmacológicas (JOACHIM et al., 2003; BOURIN et al., 2007) e, embora alguns distúrbios da ansiedade pareçam ser específicos para seres humanos, grande parte dos processos afetivos pode ser estudada em animais (JOACHIM et al., 2003).

Os roedores possuem papel chave no campo das pesquisas com animais, incluindo aquelas relacionadas à neurobiologia das emoções, como o medo e a ansiedade. Um número crescente de pesquisas tem enfatizado o uso de camundongos na investigação de tais comportamentos, uma vez que apresentam características particulares relevantes quanto a intensidade de expressão do comportamento defensivo e estratégia de enfrentamento das ameaças (CAMPOS et al., 2013). Além disso, com o aumento significativo de técnicas genéticas e animais geneticamente modificados para pesquisa, os camundongos se tornaram uma espécie mamífera muito importante para as tais pesquisas (BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2001).

Assim, partindo da observação de que camundongos têm se mostrado adequados para a pesquisa dos distúrbios de ansiedade, dentre todos os modelos etológicos utilizados, como transição claro-escuro e campo aberto, escolhemos o Labirinto em Cruz Elevado (LCE) e o mais recente Teste de Exposição ao Rato (TER).

O Labirinto em Cruz Elevado é um modelo etológico desenvolvido a partir do modelo em Y elevado utilizado por Montgomery, em 1958, para demonstrar que a exposição aos braços abertos evocava comportamentos do tipo ansiosos em ratos, consideravelmente mais evidentes que quando expostos ao braço fechado do labirinto (PELLOW et al., 1985). Somente em 1984 foi descrito o Labirinto em Cruz Elevado por Handley e Mithani, onde utilizaram dois braços fechados e dois braços abertos para identificar comportamentos ansiosos (PELLOW et al., 1985).

O LCE é um teste rápido, baseado na aversão natural dos roedores por espaços abertos, e leva em consideração o comportamento espontâneo do animal, sem que o mesmo seja treinado. Por estes motivos oferece vantagens sobre os outros modelos utilizados para estudar a ansiedade (LISTER, 1987).

O modelo LCE também foi validado para estudo dos comportamentos aversivos em camundongos em 1987, por Lister, que notou que os animais que não receberam tratamento com drogas ansiolíticas tinham preferência pelos braços fechados do labirinto, preferência que se mostrava maior nos camundongos que recebiam agentes ansiogênicos, mas que diminuía quando eram administrados compostos ansiolíticos (LISTER, 1987).

O Teste de Exposição ao Rato (TER) é um modelo etológico mais recente baseado na interação entre presa-predador e foi desenvolvido pelo grupo dos Blanchard, na Universidade do Havaí, em 2004, na tentativa de criar uma situação que permite uma descrição detalhada da atividade de avaliação de risco e seu papel nas reações de defesa (YANG et al., 2004).

O modelo consiste em um aparato com uma câmara de exposição de acrílico com tampa, dividida igualmente em dois compartimentos através de uma tela de arame, sendo um compartimento para o predador, e o outro, a superfície (área desprotegida), para o camundongo. Além disso, há uma toca (área protegida) acoplada a superfície por um túnel (YANG et al., 2004). As características estruturais do TER estão descritas em seção posterior (item 4.4).

Tem sido observado, tanto na natureza quanto no laboratório, que ratos são predadores de camundongos e estes, por sua vez, quando confrontados por um rato demonstram comportamentos defensivos inatos, como fuga, esquiva, congelamento e aumento na expressão de comportamentos de avaliação de risco (AMARAL; GOMES; NUNES-DE-SOUZA, 2009).

O modelo tem sido usado satisfatoriamente para investigar os efeitos dos compostos ansiolíticos e ansiogênicos nos comportamentos defensivos em camundongos. O estudo realizado por Amaral, Gomes e Nunes-de-Souza, 2009 demonstrou que quando expostos ao TER, camundongos tenderam a apresentar aumento nos níveis de corticosterona circulante, além de encontrar altos níveis de comportamentos de avaliação de risco.

Yang e colaboradores (2004) conduziram estudos para validação do modelo utilizando diferentes linhagens de camundongos e estes demonstraram altos níveis de expressão de comportamentos de avaliação de risco.

Diante de tais exemplos, o TER se torna um modelo promissor para a investigação das interações entre presa e predador, demonstrados no trabalho de Campos e colaboradores (2013), onde o modelo se mostrou sensível ao uso de agentes ansiolíticos como benzodiazepínicos e, além disso, demonstrou-se adequado para estudos dos mecanismos neuroquímicos e da funcionalidade dos comportamentos de defesa (YANG et al., 2004).

2 JUSTIFICATIVA

Os transtornos de ansiedade são debilitantes e a longo prazo podem desencadear diversos efeitos, especialmente se não tratados, como perda da produtividade, da qualidade de vida e do bem-estar, além da grande demanda por recursos. Por esse motivo, estes transtornos têm se tornado um crescente problema de saúde pública (JATOBÁ; BASTOS 2007; ASSOCIAÇÃO MÉDICA BRASILEIRA, 2012). Pesquisas realizadas pelo Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (USP), demonstraram que 12% da população apresentam transtornos de ansiedade (MACHADO et al., 2012). Para Almeida-Filho et al. (1997), cerca de 9% a 18% da população brasileira apresenta pelo menos um episódio relacionado aos transtornos de ansiedade durante toda a vida.

Os pacientes que desenvolvem este tipo de transtorno também podem sofrer com o abuso de drogas psicoativas, além de comorbidades psiquiátricas, incluindo a depressão, e comorbidades clínicas, como hipertensão arterial, desordens funcionais do trato gastrointestinal, asma, doenças cardiovasculares e dor crônica (ROY-BYRNE, 2008; HARTER; CONWAY; MERIKANGAS, 2003; APA, 2013.). Estes pacientes, muitas vezes, procuram atendimento em serviços clínicos de emergência ou de especialistas de acordo com suas queixas somáticas antes de receber o diagnóstico correto. Por esse motivo, o diagnóstico e o tratamento adequados, quando precoces, tornam-se importantes para reduzir a tendência de se tornar uma patologia crônica e a possibilidade de desenvolvimento de uma comorbidade (ASSOCIAÇÃO MÉDICA BRASILEIRA, 2012; VALENÇA, 2013).

O consumo de medicamentos psicotrópicos tem se destacado no tratamento das desordens mentais. Os fármacos benzodiazepínicos são as substâncias de escolha para o manejo da ansiedade, por apresentarem propriedades ansiolíticas (CARVALHO; COSTA; FAGUNDES, 2006). Dentre seus principais efeitos estão incluídos: redução da ansiedade, indução do sono, sedação, redução de tônus muscular, entre outros. Entretanto, essas substâncias apresentam diversos efeitos colaterais, ainda frequentemente subestimados. O uso prolongado pode levar ao desenvolvimento de tolerância ao medicamento e dependência do indivíduo (CARVALHO; COSTA; FAGUNDES, 2006).

Assim, o entendimento dos mecanismos subjacentes aos transtornos de ansiedade pode contribuir sobremaneira para a compreensão da complexa rede neural envolvida e consequentemente, para o desenvolvimento de novas terapias.

3 OBJETIVOS

Gerais

Avaliar o envolvimento do neurotransmissor CRF e da Proteína Quinase A (PKA) na modulação de respostas comportamentais de defesa relacionadas à ansiedade, na região encefálica hipocampo de camundongos expostos ao Labirinto em Cruz Elevado (LCE) e ao Teste de Exposição ao Rato (TER).

Específicos

Avaliar o efeito da microinjeção de CP 376395, um antagonista do receptor CRF1, no hipocampo dorsal (HD) e hipocampo ventral (HV) nas respostas comportamentais de defesa relacionadas à ansiedade exibidos durante a exposição no Labirinto em Cruz Elevado.

Avaliar o efeito da microinjeção de H-89, um inibidor de Proteína Quinase A, no HD e HV nas respostas comportamentais de defesa relacionadas à ansiedade exibidos durante a exposição no Labirinto em Cruz Elevado.

Avaliar a participação das sub-regiões HD e HV nas respostas comportamentais relacionadas à ansiedade de camundongos expostos ao Teste de Exposição ao Rato, de maneira única e maneira repetida, através da expressão de proteína Fos, um marcador nuclear de atividade neuronal.

Avaliar o efeito da microinjeção de CP 376395 no HD e HV nas respostas comportamentais de defesa e ansiedade exibidos durante a exposição ao Teste de Exposição ao Rato.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Sujeitos

Foram utilizados camundongos Suíços machos e para o Teste de Exposição ao Rato, também foram utilizados ratos da linhagem Long-Evans. Todos os animais foram mantidos no biotério da Área de Ciências Fisiológicas (ARFIS) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia durante o período experimental, sob condições controladas de temperatura ($23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e luz (ciclo de 12h/12h com luzes apagadas às 19h), com livre acesso a água e alimento, exceto durante a realização dos experimentos.

4.2 Drogas

Ao longo do experimento foram utilizadas as seguintes drogas:

Inibidor de Proteína quinase A (PKA): H-89 (dihidrocloreto de (N-[2-(p-Bromocinamilamino) etil]-5-isoquinolinesulfonamida] (doses: 2,5nmol/0,1µl e 5,0nmol/0,2 µl)

Antagonista de CRF1: CP 376395376395 [N-(1-ethylpropyl)-3,6-dimethyl-2-(2,4,6-trimethylphenoxy)-4-pyridinamine hydrochloride (doses: 3,0nmol/0,1µl e 6,0nmol/0,2µl)

Anestésicos: Cetamina e Xilazina (100 mg/kg e 10 mg/kg) e Tiopental (160mg/kg).

Anti-inflamatório: Meloxicam (2,0 mg/kg)

4.3 Cirurgia estereotáxica e administração de fármacos no hipocampo

A cirurgia para canulação consistiu na implantação intracraniana de duas cânulas-guia de aço (26 gauge) com 7,0 mm de comprimento (uma em cada hemisfério) no encéfalo dos camundongos direcionadas para o hipocampo, uma estrutura bilateral. Para isso, os animais foram anestesiados previamente por uma injeção intraperitoneal com a combinação de Cetamina a 100 mg/kg, um antagonista glutamatérgico e Xilazina a 10 mg/kg, agonista de receptores alfa-2. Após a confirmação da anestesia, foi feita a tricotomia, limpeza do local com álcool iodado e uma pequena incisão na pele, de modo a deixar o crânio exposto.

Com o camundongo já posicionado no aparato estereotáxico, a região do bregma (encontro das suturas cranianas sagital e coronal) foi identificada, pois esta é a área de referência para a localização das estruturas avaliadas neste estudo. A implantação das cânulas-guia seguiu

as coordenadas estereotáxicas do Atlas de Anatomia do Encéfalo de Camundongos de Paxinos e Franklin (2001), bem como estudos realizados anteriormente por Canto-de-Souza et al (2015). Foram utilizados grupos independentes de camundongos para estudo específico do hipocampo ventral e para estudo do hipocampo dorsal.

Assim que as cânulas-guia foram posicionadas nas devidas regiões, foram fixadas com cimento acrílico. Os animais, ainda anestesiados, receberam uma injeção intramuscular de anti-inflamatório Meloxicam (2mg/kg) e foram colocados de volta em suas caixas moradia com livre acesso a água e ração e retornaram ao biotério da ARFIS, onde foram observados devido a possíveis intercorrências após a cirurgia. Nos raros casos que isso ocorreu, o animal foi sacrificado com o intuito de não provocar o sofrimento.

Os experimentos foram iniciados quatro a cinco dias após as cirurgias estereotáxicas. Para a administração do fármaco nas sub-regiões do hipocampo, uma agulha de 8 mm foi introduzida no interior da cânula guia, após sua limpeza, enquanto sua outra extremidade estava conectada a uma microseringa de vidro (marca Hamilton) de 2µl através de um tubo de polietileno (PE-10). A agulha permanecia no interior da cânula após o final da microinjeção por trinta segundos, até a movimentação de uma pequena bolha de ar no tubo, confirmando o fluxo da solução. Durante todo o procedimento, o animal foi contido manualmente pelo experimentador com auxílio de uma flanela.

4.4 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O labirinto em cruz elevado (Figura 3) se assemelha àquele descrito por Lister (1987). O aparato, feito de acrílico, possui dois braços abertos de 30 x 5 x 0,25 cm e dois braços fechados 30 x 5 x 15 cm, que se unem através de uma plataforma central de 5 x 5 cm. O labirinto se eleva do solo por um suporte de madeira de 38,5 cm. Após receberem a microinjeção da droga ou salina no hipocampo, conforme descrito no item 4.3, os camundongos foram mantidos em uma caixa moradia de espera durante dez minutos e em seguida, expostos ao LCE.

Cada animal foi colocado sobre a plataforma central com a cabeça voltada para um dos braços abertos, permitindo que explorassem livremente o labirinto durante cinco minutos. Os testes foram realizados durante a fase clara do ciclo de luz e a atividade de cada camundongo

no labirinto foi documentada em filmagens através de um circuito filmadora-computador para posterior análise por um observador treinado.

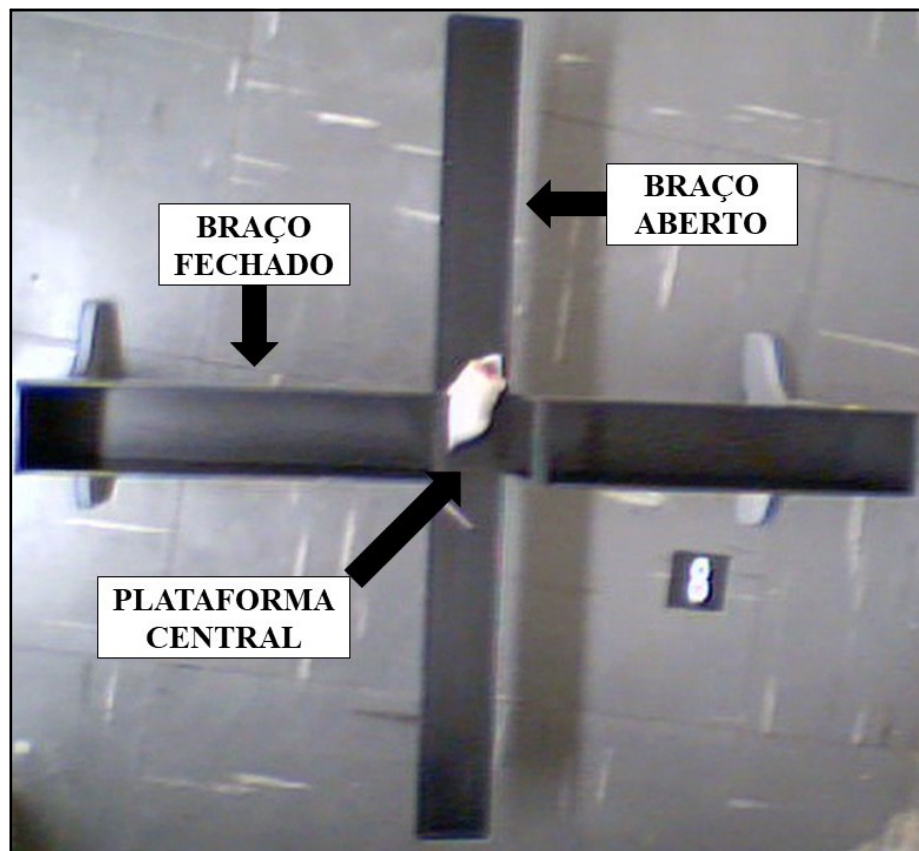


Figura 3: Aparato do Labirinto em Cruz Elevado (LCE). Fonte: Laboratório de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia.

Os comportamentos analisados envolveram os parâmetros espaço-temporais: frequência de entradas nos braços abertos e fechados, sendo a entrada em um braço definida como o cruzamento com as quatro patas para dentro do braço, e o tempo gasto nesses compartimentos, bem como na plataforma central. A partir dos dados obtidos na análise, foram realizados os cálculos de porcentagem de entradas e tempo de permanência nos braços abertos (Entrada: $[\text{aberto} / \text{total de entradas em braços abertos e fechados}] \times 100$; Tempo: $[\text{tempo no braço aberto} / 300] \times 100$).

Além dos comportamentos espaço-temporais, a frequência de medidas complementares referentes à avaliação de risco também foram analisadas: mergulho desprotegido (movimento exploratório onde o camundongo direciona seu olhar e focinho para o solo, fazendo com que sua cabeça ultrapasse o assoalho do braço aberto do labirinto), mergulho protegido (semelhante ao anterior, entretanto, é realizado com pelo menos duas patas em um dos braços fechados ou plataforma central), esticada desprotegida (postura exploratória realizada em braços abertos,

onde o animal estica seu corpo para frente, mantendo as patas traseiras fixas e então retorna à posição inicial), esticada protegida (semelhante ao parâmetro anterior, porém, são mantidas pelo menos duas patas nos braços fechados ou plataforma central) e exploração da extremidade dos braços abertos (número de vezes que o animal chega até o final dos braços abertos, a região mais aversiva do aparato).

A relação comportamento x estado de ansiedade é importante para corroborar os resultados espaço-temporais. A elevação da expressão de mergulho e esticada protegidos, demonstra efeito ansiogênico, já que o animal realizou mais o comportamento em área protegida, o que indica excesso de cautela e vigilância consistentes com a ansiedade. Por outro lado, a diminuição desses comportamentos significa ansiólise, pois há diminuição da avaliação do risco. Com relação ao mergulho e a esticada desprotegidos, pelo fato de serem realizados em áreas mais aversivas (braços abertos) expressam diminuição da ansiedade, uma vez que é o indicativo de que o animal está explorando um ambiente hostil. Por fim, quanto mais o animal frequenta as extremidades dos braços abertos menos ansiedade parece ser expressa, pois, essa região consiste na parte mais aversiva do aparato.

Conforme descrito no item 4.6, após os experimentos, os encéfalos foram removidos para posterior análise histológica.

4.5 Teste de Exposição ao Rato (TER)

O Teste de Exposição ao Rato (Figura 4) se assemelha àquele proposto/descrito por Yang e colaboradores (2004) e Amaral, Gomes e Nunes-de-Souza (2010). O aparato consiste de uma gaiola de polycarbonato de dimensões 46 x 24 x 21 cm, chamada de câmara de exposição, coberta por uma tampa de polycarbonato escura.

A câmara de exposição é dividida em dois compartimentos de tamanhos iguais, através de uma tela de arame. Um dos compartimentos é destinado ao predador e o outro, denominado superfície, é destinado à exposição do camundongo. Ligado à superfície de exposição existe um compartimento denominado toca, com as dimensões 7 x 7 x 12 cm, confeccionado com acrílico preto em três lados e acrílico transparente no lado restante para facilitar a filmagem dos experimentos. A toca é ligada à câmara de exposição por um túnel de Plexiglas claro de 4,4 cm de diâmetro e 13 cm de comprimento, elevado a 1,5 cm do solo.

Os experimentos foram realizados na fase clara do ciclo claro-escuro e consistem de duas fases: habituação e teste, descritos a seguir.

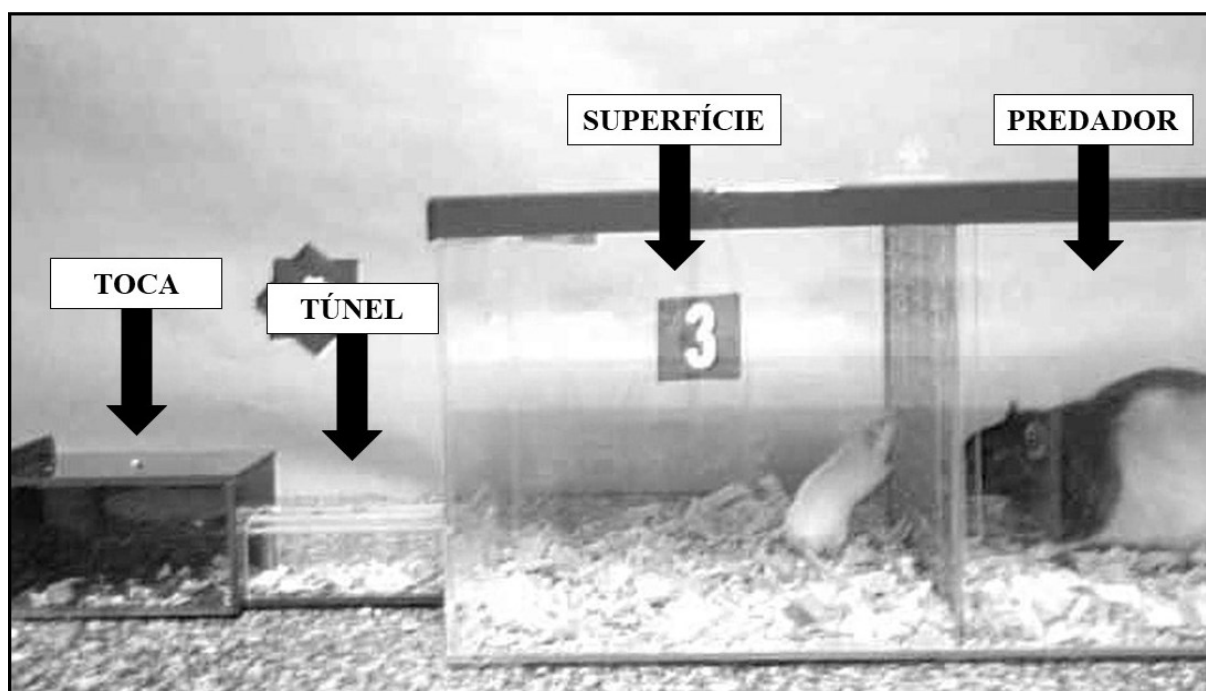


Figura 4: Aparato do Teste de Exposição ao Rato (TER). Fonte: Laboratório de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia.

4.5.1 Fase 1 - Habituação

Para a fase de habituação, os animais foram transportados para uma sala adjacente à sala de experimentos, cerca de uma hora antes do início do teste, para ambientação. Em seguida, cada camundongo foi colocado no centro da superfície do aparato para que pudesse explorá-lo livremente durante dez minutos na ausência de rato. A maravalha da caixa moradia de cada animal foi colocada na superfície e na toca para facilitar a habituação.

4.5.2 Fase 2 - Teste de Exposição

Vinte e quatro horas após o teste de habituação, os animais foram alocados em diferentes grupos, de acordo com o tratamento farmacológico, e submetidos a microinjeção previamente ao início dos testes. Após receberam a microinjeção dos fármacos (CP 376395 ou H-89) ou veículo em HD ou HV, os animais foram colados em uma caixa moradia de espera durante dez minutos. Em seguida, cada animal foi introduzido no centro da superfície do TER, voltados

para o predador. Um rato macho da linhagem Long-Evans pesando em torno de 400-500 gramas, foi acomodado no compartimento do predador, atrás da tela de arame, o que impede que o rato ataque o camundongo. A exposição ao rato teve duração de dez minutos para cada camundongo.

A atividade de cada camundongo também foi documentada através de filmagens utilizando um circuito filmadora-computador para análise posterior por um observador treinado.

Os parâmetros envolvidos na análise comportamental foram as medidas espaço-temporais de frequência de entradas e o tempo gasto em área desprotegida (superfície de exposição), o tempo gasto em contato com a tela de arame (quando o animal apoia uma ou duas patas na mesma) e o tempo gasto com a escalada na barreira de arame (quando está com as quatro patas na tela). Além das medidas espaço-temporais, foi realizada avaliação da medida complementar número de exposições da postura exploratória de esticada (SAP). Conforme descrito no item 4.6, a seguir, após os experimentos, os encéfalos foram removidos para posterior análise histológica..

4.6 Análise histológica

Após a exposição ao LCE e ao TER, foi injetado solução de 1% de azul de Evans através das cânulas de todos os camundongos submetidos aos testes, de acordo com o procedimento descrito para injeção das drogas no item 4.3. Os animais foram anestesiados por uma sobredose intraperitoneal de Tiopental (160mg/kg) e em seguida, foram submetidos a eutanásia. Seus encéfalos foram removidos e acomodados em recipientes contendo solução de formalina (10%). Com a ajuda de um criostato, foram feitas secções coronais de 60µm de espessura ao longo do trajeto das cânulas. As secções foram inspecionadas através de um microscópio óptico e visualização da dispersão do azul de Evans foi considerada indicativa do local da injeção. Os animais cujas injeções apontavam para o HD ou HV dentro dos respectivos grupos de sujeitos experimentais, foram utilizados neste estudo.

4.7 Análise imuno-histoquímica para expressão de proteína Fos

A expressão nuclear da proteína Fos é utilizada como indicador da atividade neuronal, por este motivo, foi utilizada como um marcador celular para verificar a responsividade do hipocampo à exposição ao TER.

Os animais foram alocados em dois grupos principais: um destinado a exposição aguda e outro destinado a exposição repetida. Dentro de cada grupo foram formados três subgrupos, com doze animais cada: grupo controle, grupo de exposição ao rato de pelúcia (rato de brinquedo) e grupo de exposição ao rato. Os animais do teste agudo foram expostos uma única vez ao predador ou ao rato de pelúcia, durante dez minutos após a habituação. Já os animais submetidos ao teste de maneira repetida, foram expostos durante cinco dias intercalados ao predador ou ao rato de pelúcia, também durante dez minutos, 24 horas após a habituação. Os grupos controles: exposição aguda e exposição repetida, não foram submetidos aos testes e permaneceram em suas caixas moradias no biotério da ARFIS até o dia da perfusão transcardíaca.

Após a última exposição ao TER, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal contendo a combinação de Cetamina a 100 mg/kg e Xilasina a 10 mg/kg e perfundidos transcardiacamente com solução salina seguida de solução de paraformaldeído 4%. Os encéfalos foram retirados, mantidos por 2 horas em paraformaldeído 4% e transferidos para sacarose 30% em tampão fosfato de sódio (0,1 M) por 48h a 4°C, para promover a desidratação do tecido. Os encéfalos foram então armazenados a -80°C até a análise imuno-histoquímica.

Fatias coronais (30µm) foram cortadas em criostato (-20°C) e coletadas em tampão PBS (0,025 M Tris, 0,5 M NaCl, pH 7,5). As fatias de interesse compreendendo as sub-regiões do hipocampo (HD e HV) do encéfalo dos camundongos, foram selecionadas de acordo com o atlas de Paxinos e Franklin (2001) e foram armazenadas a -20°C em solução crioprotetora até o início do protocolo de imuno-histoquímica para expressão de proteína Fos.

As fatias foram lavadas em PBS 0,1M 1x por 3 vezes de 10 minutos cada, no agitador. Após, foram incubadas em solução bloqueio contendo 3% de soro de cabra normal (NGS), 0,25% de Triton X-100 e PBS 1x durante uma hora no agitador. As fatias, então, foram incubadas durante a noite a 4°C em solução com os anticorpos primários c-Fos sc-52 anti-coelho (Santa Cruz Biotechnology).

No dia seguinte, após a lavagem com PBS 0,1M 1x, as fatias foram incubadas, por duas horas, em solução contendo anticorpos secundários IgG anti-coelho biotinilado (H + L) feito em cabra (BA 1000, Vector Labs). A concentração dos anticorpos primários e secundários foi determinada em testes preliminares de padronização.

Ao final do tempo de incubação com os anticorpos secundários, as fatias foram lavadas em PBS 0,1M 1x e incubadas com a solução ABC (0,1M 1x, 0,25% de Triton X-100, duas gotas

do composto A e 2 gotas do composto B para cada 5 mL de PBS 1x, totalizando 40 mL de solução), durante uma hora. Em seguida, foram lavadas novamente com PBS 0,1M 1x.

O passo seguinte foi a preparação da solução DAB (diaminobenzidina). Para isso, foi utilizado 100 ml de PBS 1x, 35 mg de DAB e 40µl de peróxido de hidrogênio 30%. As amostras foram transferidas para poços contendo DAB e após atingirem tempo e coloração adequados, foram transferidos imediatamente para PBS 0,1M 1x e lavadas para impedir a reação com DAB.

Após montagem e secagem das lâminas em temperatura ambiente, o último passo do protocolo foi desidratar os cortes nas lâminas com água destilada, etanol nas concentrações 30%, 60%, 90%, 95% e 100% e xilol. Imediatamente após o último banho de Xilol, foi pingado *permount* nas lâminas, de modo a cobri-las com as lamínulas e foram deixadas para secar em temperatura ambiente por pelo menos 24 horas.

As imagens das sub-regiões hipocâmpais (HD e HV) foram capturadas utilizando microscópio de captura Leica ICC50 e as células positivas para a expressão nuclear de proteína Fos foram quantificadas a partir do Software Image J.

4.8 Delineamento experimental

4.8.1 Experimento 1 – Avaliação do efeito da microinjeção de CP 376395 no HD e HV sobre as reações de defesa de camundongos expostos ao LCE. Cada animal recebeu microinjeção bilateral e sequencial intra-hipocampo de CP 376395, um antagonista de receptor CRF1 (doses 3,0nmol/0,1µl ou 6,0nmol/0,2µl), ou veículo (salina 0,9%). Dez minutos após, foram expostos ao LCE para registro dos comportamentos descritos no item 4.4.

4.8.2 Experimento 2 – Avaliação do efeito da microinjeção de H-89 no HD e HV sobre as reações de defesa de camundongos expostos ao LCE. Cada animal recebeu microinjeção bilateral e sequencial intra-hipocampo de H-89, um inibidor da PKA (doses 2,5nmol/0,1µl ou 5,0nmol/0,2µl) ou veículo (salina 0,9%). Dez minutos após, foram expostos ao LCE para registro dos comportamentos descritos no item 4.4.

4.8.3 Experimento 3 – Avaliação da expressão nuclear de proteína Fos em neurônios ativados do HD e HV nas reações de defesa de camundongos expostos ao TER.

Os animais foram submetidos a exposição ao aparato de maneira aguda e repetida. Após a última exposição, os animais foram perfundidos transcardiacamente e as amostras encefálicas coletadas. As amostras foram processadas de acordo com o protocolo para imuno-histoquímica descrito no item 4.7. O comportamento de cada animal submetido ao teste também foi analisado de acordo com o item 4.5.2.

4.8.4 Experimento 4 - Avaliação da microinjeção de CP 376395 no HD e HV sobre as reações de defesa de camundongos expostos ao TER. Cada animal recebeu microinjeção bilateral e sequencial intra-hipocampo de CP 376395 (doses 3,0nmol/0,1µl ou 6,0nmol/0,2µl) ou veículo. Dez minutos após, foram expostos ao TER para registro dos comportamentos descritos no item 4.5.2.

4.9 Análise estatística

Os resultados foram analisados através do Teste ANOVA monofatorial seguido de post hoc de Duncan para amostras independentes, exceto para a análise de proteína Fos, onde foi utilizada ANOVA bifatorial seguida de post hoc de Bonferroni, sendo considerado o Fator 1 controle, exposição ao brinquedo e ao rato e o Fator 2, exposições única ou repetida. Para a análise comportamental dos camundongos que tiveram seus encéfalos submetidos a imuno-histoquímica foi utilizado o teste *t* Student.

As amostras foram consideradas homogêneas, se em nenhum caso o teste de homogeneidade de Levene apontar significância. Os casos em que o teste de Levene apresentou significância, os resultados foram analisados através do teste de Kruskal-Wallis com post hoc de Dunn. As alterações significativas foram consideradas quando $p < 0,05$.

4.10 Ética

Todos os experimentos foram executados estão de acordo com a legislação brasileira que regulamenta a utilização de animais para pesquisa e aprovados pelo comitê local da Universidade Federal de Uberlândia (Comissão de Ética na Utilização de Animais - CEUA/UFU), protocolo número 100/14 (ANEXO I).

5 RESULTADOS

5.1 Sítios da microinjeção

As figuras 5 e 6 demonstram a representação esquemática e uma fotomicrografia histológica dos sítios de microinjeção no HD e no HV, respectivamente, utilizadas nos experimentos descritos a seguir.

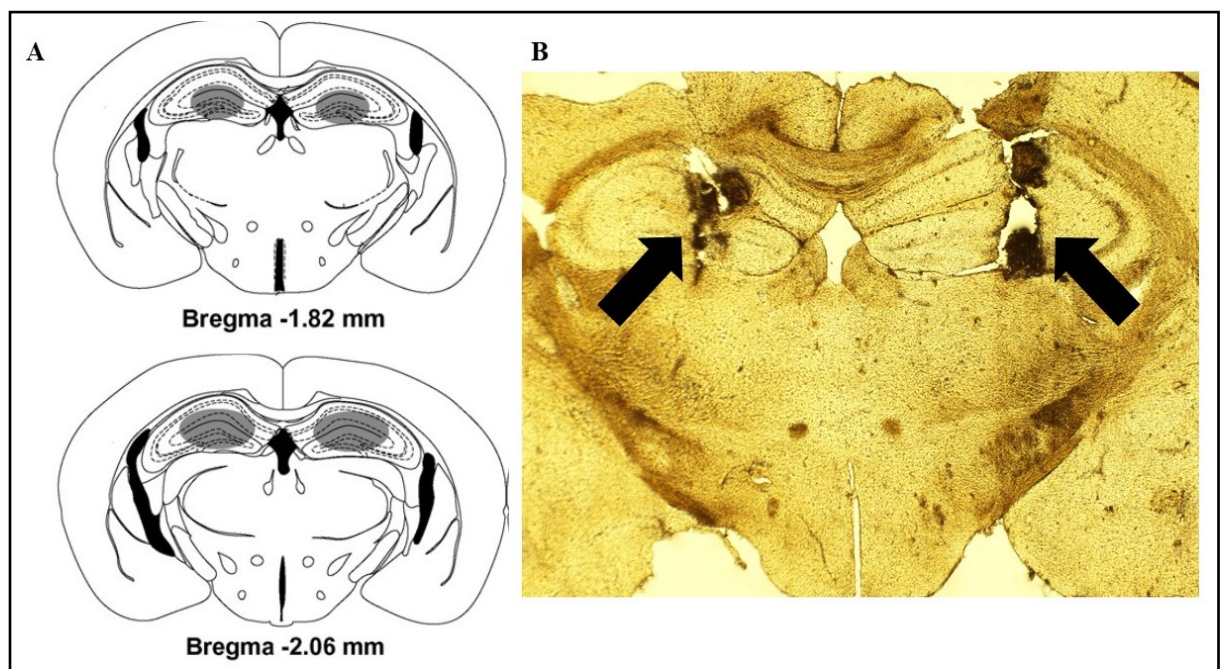


Figura 5: A. Representação esquemática dos sítios de microinjeção dentro do hipocampo dorsal (HD). Fonte: adaptada (CORNÉLIO; NUNES-DE-SOUZA, 2007). B. Fotomicrografia histológica do HD de um camundongo. As setas apontam a marcação por corante Azul de Evans, demonstrando os locais onde foram feitas as microinjeções, sendo positivas para o HD. Fonte: Autor.

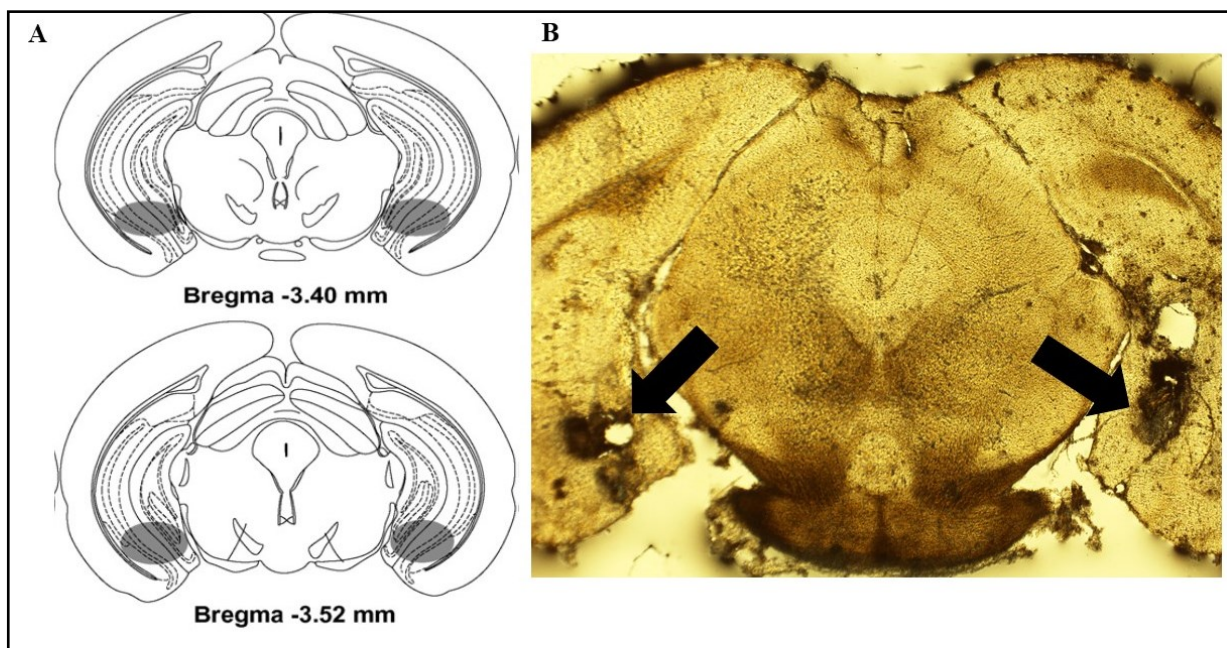


Figura 6: **A.** Representação esquemática dos sítios de microinjeção dentro do hipocampo ventral (HV). Fonte: adaptada (CORNELIO; NUNES-DE-SOUZA, 2007). **B.** Fotomicrografia histológica do HV de um camundongo. As setas apontam a marcação por corante Azul de Evans, demonstrando os locais onde foram feitas as microinjeções, sendo positivas para o HV. Fonte: Autor.

5.2 Experimento 1 – Avaliação do efeito da microinjeção de CP 376395 no HD e HV sobre as reações de defesa de camundongos expostos ao LCE

5.2.1 Análise das medidas espaço-temporais

A figura 7 ilustra as medidas espaço-temporais de porcentagem de entradas e tempo de permanência nos braços abertos (áreas desprotegidas) do labirinto e o índice de locomoção (frequência de entradas em braços fechados, protegidos), avaliados em animais submetidos ao LCE, após receberem a injeção intra-HD e intra-HV de CP 376395 nas doses 0, 3,0nmol ou 6,0nmol.

Na figura 7A, a microinjeção de CP 376395 intra-HD, nas doses de 3,0 e 6,0nmol, não alterou significativamente as porcentagens de entradas ($F_{2,21} = 0,595$; $p = 0,560$) e de tempo ($F_{2,21} = 0,711$; $p = 0,502$) gasto em braços abertos do LCE em relação ao grupo controle (veículo). Ainda, não revelou diferença significativa para a frequência de entrada em braços fechados ($F_{2,21} = 1,97$; $p = 0,164$).

Na figura 7B a microinjeção de CP 376395 intra-HV, nas doses de 3,0 e 6,0nmol, não alterou significativamente a porcentagem de entradas em braços abertos ($F_{2,18} = 0,99$; $p = 0,39$).

Entretanto, a dose de CP 376395 3,0nmol foi eficaz em elevar significativamente o tempo de permanência em braços abertos em comparação ao grupo controle (veículo) e ao grupo que recebeu a microinjeção de CP 376395 6,0nmol ($F_{2,18} = 5,01$; $p = 0,018$).

Ainda, o teste para medidas não-paramétricas Kruskal-Wallis com pós teste Dunn, não revelou diferença significativa para a frequência de entrada em braços fechados ($H = 3,51$; $p = 0,18$).

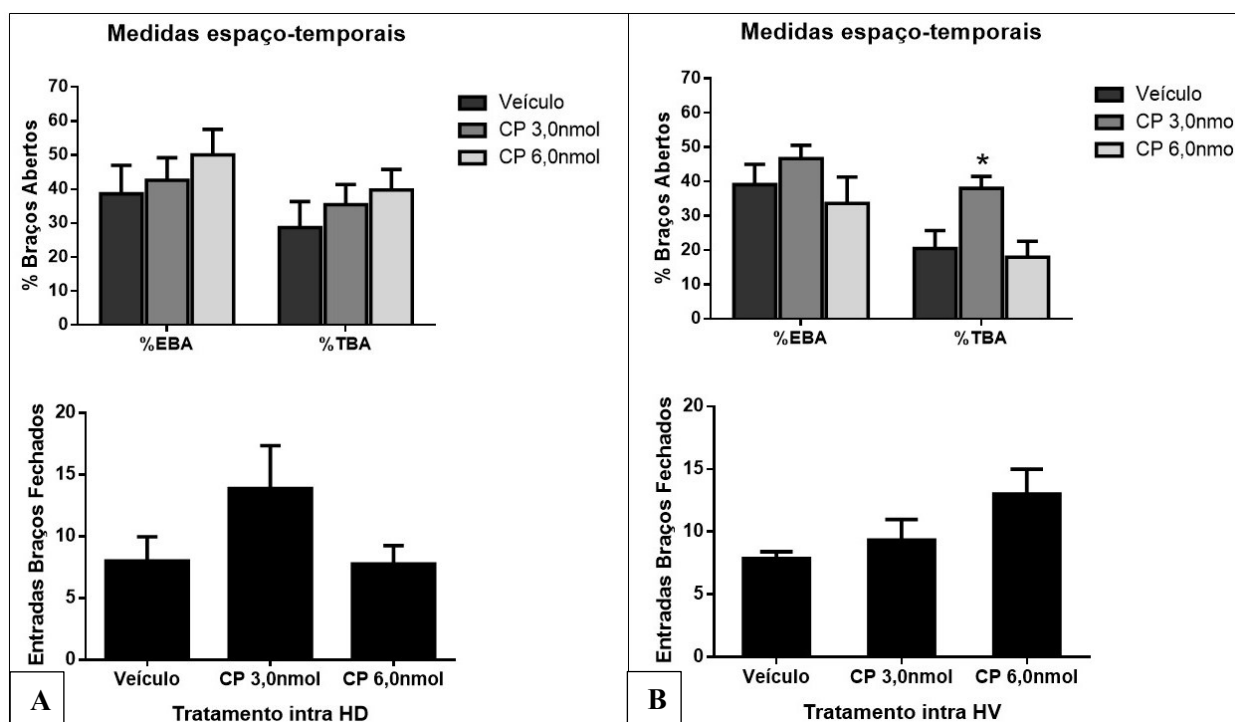


Figura 7: Efeito da microinjeção de CP 376395 (0, 3,0nmol ou 6,0nmol) no hipocampo dorsal (HD) (A) e hipocampo ventral (HV) (B) de camundongos sobre as porcentagens de tempo de permanência e entradas em braços abertos e frequência de entradas em braços fechados. %EBA: Porcentagem de entrada em braços abertos, %TBA: Porcentagem de tempo em braços abertos. As colunas representam as médias (\pm EPM). N = 6-8 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo veículo. Teste ANOVA monofatorial e Kruskal-Wallis.

5.2.2 Análise das medidas complementares

5.2.2.1 Análise da exibição do comportamento de mergulho

A Figura 8 ilustra os comportamentos de mergulho protegido (realizado na plataforma central) e mergulho desprotegido (realizado em braços abertos), avaliados em animais submetidos ao LCE após receberem a injeção intra-HD e intra-HV de CP 376395 nas doses 0, 3,0nmol ou 6,0nmol.

Na figura 8A houve tendência a diminuição do comportamento de mergulho protegido na dose de CP 376395 6,0nmol ($F_{2,21} = 6,95$; $p = 0,07$) e diferença significativa para o

comportamento de mergulho desprotegido na mesma dose ($F_{2,21} = 4,93$; $p = 0,018$) em relação ao grupo controle (veículo), quando injetado em HD.

Já na figura 8B, a dose de CP 376395 6,0nmol aumentou significativamente o número de exposições dos comportamentos de mergulho protegido ($F_{2,18} = 4,97$; $p = 0,019$) em relação ao grupo controle (veículo), quando injetado em HV, mas não demonstrou diferença significativa para as doses de CP 376395 3,0 e 6,0nmol em relação ao veículo no comportamento de mergulho desprotegido ($F_{2,18} = 1,96$; $p = 0,17$).

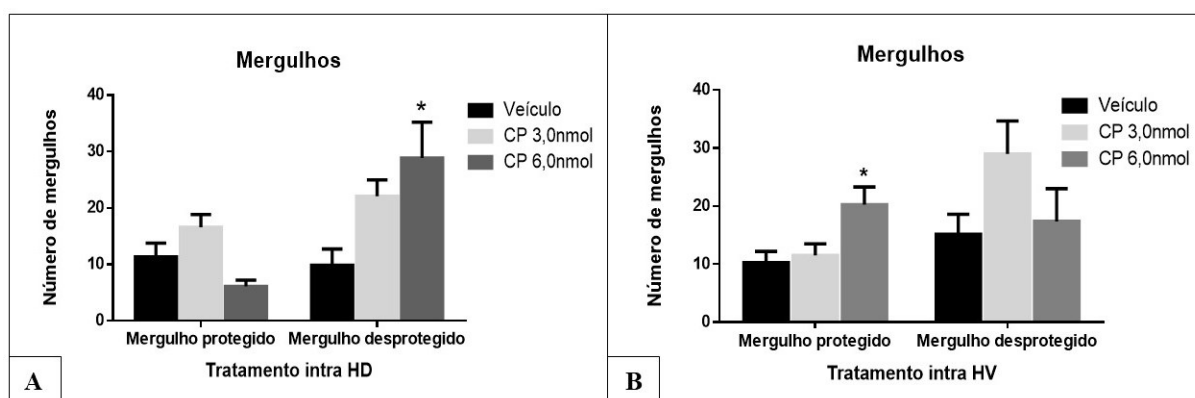


Figura 8: Efeito da microinjeção de CP 376395 (0, 3,0nmol ou 6,0nmol) no hipocampo dorsal (HD) (A) e hipocampo ventral (HV) (B) de camundongos sobre os comportamentos de mergulho protegido e desprotegidos. As colunas representam as médias (\pm EPM). As colunas representam as médias (\pm EPM). N= 6-8 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo veículo. Teste ANOVA monofatorial e post hoc Duncan.

5.2.2.2 Análise da exibição do comportamento de esticada

A Figura 9 ilustra os comportamentos de esticada protegida (realizado na plataforma central e braços fechados) e esticada desprotegida (realizado em braços abertos), avaliados em animais submetidos ao LCE após receberem a injeção intra-HD e intra-HV de CP 376395 (0, 3,0nmol ou 6,0nmol).

Na Figura 9A, a microinjeção de CP 376395 intra-HD, em ambas as doses (3,0 e 6,0nmol) não alterou significativamente o número de esticadas protegidas ($F_{2,21} = 2,14$; $p = 0,14$) e esticadas desprotegidas ($F_{2,21} = 0,64$; $p = 0,53$) em relação ao grupo controle (veículo).

Já a figura 9B mostra que houve tendência ao aumento de esticadas protegidas na dose de CP 376395 6,0nmol, com relação ao grupo controle ($F_{2,18} = 5,74$; $p = 0,07$). Para o comportamento de esticada desprotegida, o teste de Kruskal-Wallis para medidas não-paramétricas, seguido de pós-teste de Dunn, revelou que ambas as doses de CP 376395 (3,0 e

6,0nmol) não alteraram significativamente tal comportamento em relação ao grupo controle (veículo) ($H=1,49$; $p=0,49$).

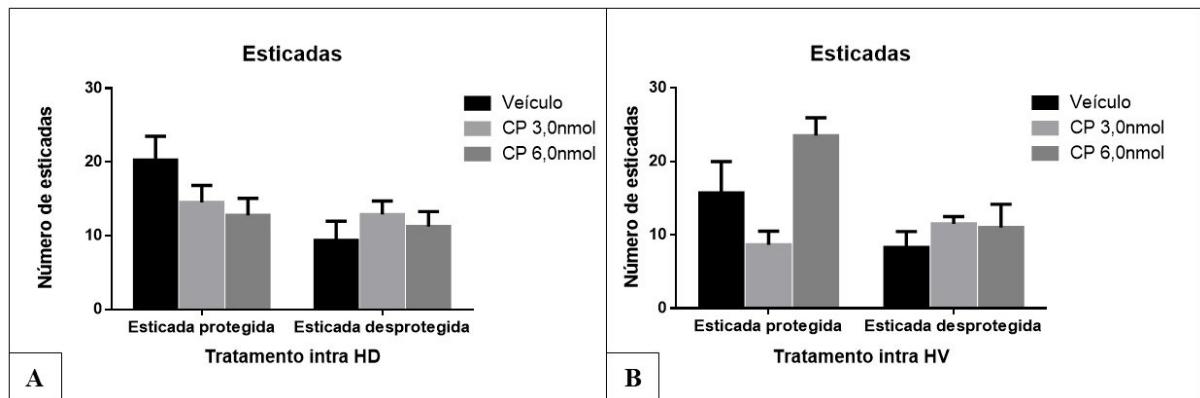


Figura 9: Efeito da microinjeção de CP 376395 (0, 3,0nmol ou 6,0nmol) no hipocampo dorsal (HD) (A) e hipocampo ventral (B) de camundongos sobre os comportamentos de esticada protegida e desprotegida. As colunas representam as médias (\pm EPM) $N=6-8$ animais por grupo. Teste ANOVA monofatorial e Kruskal-Wallis.

5.2.2.3 Análise da exibição do comportamento de exploração da extremidade final dos braços abertos

A Figura 10 ilustra o comportamento de exploração da extremidade final dos braços abertos (áreas consideradas aversivas), avaliados em animais submetidos ao LCE após receberem a injeção intra-HD e intra-HV de CP 376395 (0, 3,0nmol ou 6,0nmol).

A figura 10A demonstra que não houve diferença significativa entre os grupos tratados com as doses de CP 376395 3,0nmol ou 6,0nmol, intra-HD, em relação ao grupo controle (veículo) ($F_{2,21}=2,02$; $p=0,16$). Na figura 10B, também não houveram diferenças significativas no número de chegadas ao final dos braços abertos entre os grupos tratados com CP 376395 nas doses 3,0nmol ou 6,0nmol e grupo controle (veículo) ($F_{2,18}=1,57$; $p=0,23$).

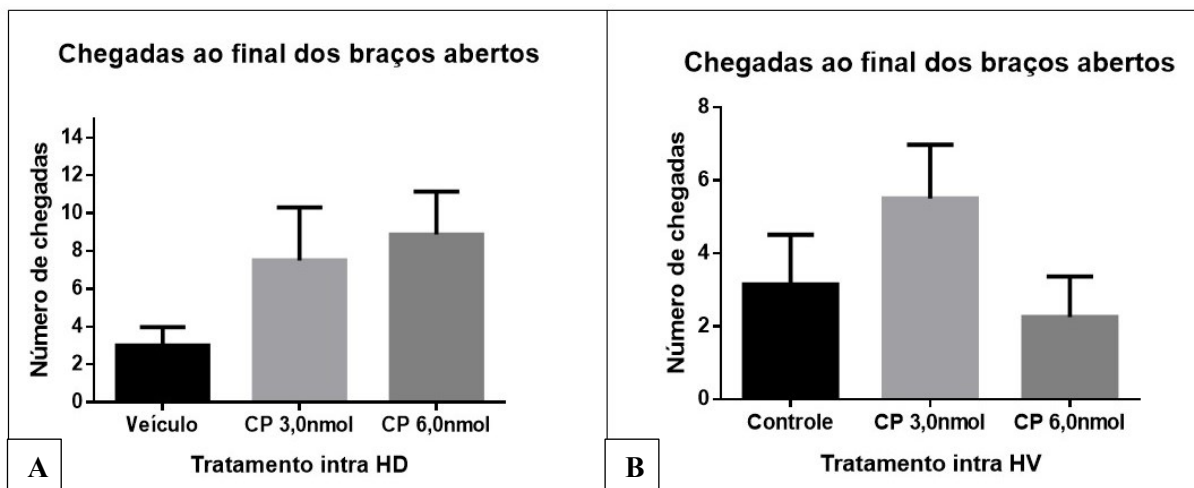


Figura 10: Efeito da microinjeção de CP 376395 (0, 3,0nmol ou 6,0nmol) no hipocampo dorsal (HD) (A) e hipocampo ventral (B) de camundongos sobre o número de chegadas ao final dos braços abertos. As colunas representam as médias (\pm EPM) N= 6-8 animais por grupo. Teste ANOVA monofatorial e post hoc Duncan.

5.3 Experimento 2 – Avaliação do efeito da microinjeção de H-89 no HD e HV nas reações de defesa de camundongos expostos ao LCE

5.3.1 Análise das medidas espaço-temporais

A Figura 11 ilustra as medidas espaço-temporais de porcentagem de entradas e tempo de permanência nos braços abertos do labirinto e o índice de locomoção, avaliados em animais submetidos ao LCE após receberem a injeção intra-HD e intra-HV de H-89 nas doses 0, 2,5nmol ou 5,0nmol.

Na figura 11A, a microinjeção de H-89 nas doses de 2,5 e 5,0nmol, intra-HD, não alterou significativamente as porcentagens de entradas ($F_{2,18} = 0,63$; $p = 0,54$) e de tempo ($F_{2,18} = 1,42$; $p = 0,27$) gasto em braços abertos do LCE em relação ao grupo controle (veículo). Ainda, não foi revelada diferença significativa para a frequência de entrada em braços fechados entre as doses de 2,5 e 5,0nmol em relação ao grupo controle ($F_{2,18} = 1,96$; $p = 1,64$).

Na figura 11B, a microinjeção de H-89, intra-HV, na dose de 2,5nmol aumentou significativamente a porcentagem de entradas em braços abertos ($F_{2,20} = 4,66$; $p = 0,02$), e também a porcentagem de tempo de permanência ($F_{2,20} = 5,43$; $p = 0,01$) em braços abertos do LCE em relação ao grupo controle (veículo). Ainda, foi revelada diferença significativa (aumento) para a frequência de entrada em braços fechados na dose de 5,0nmol em relação a dose de 2,5nmol de H-89 ($F_{2,20} = 6,67$; $p = 0,006$).

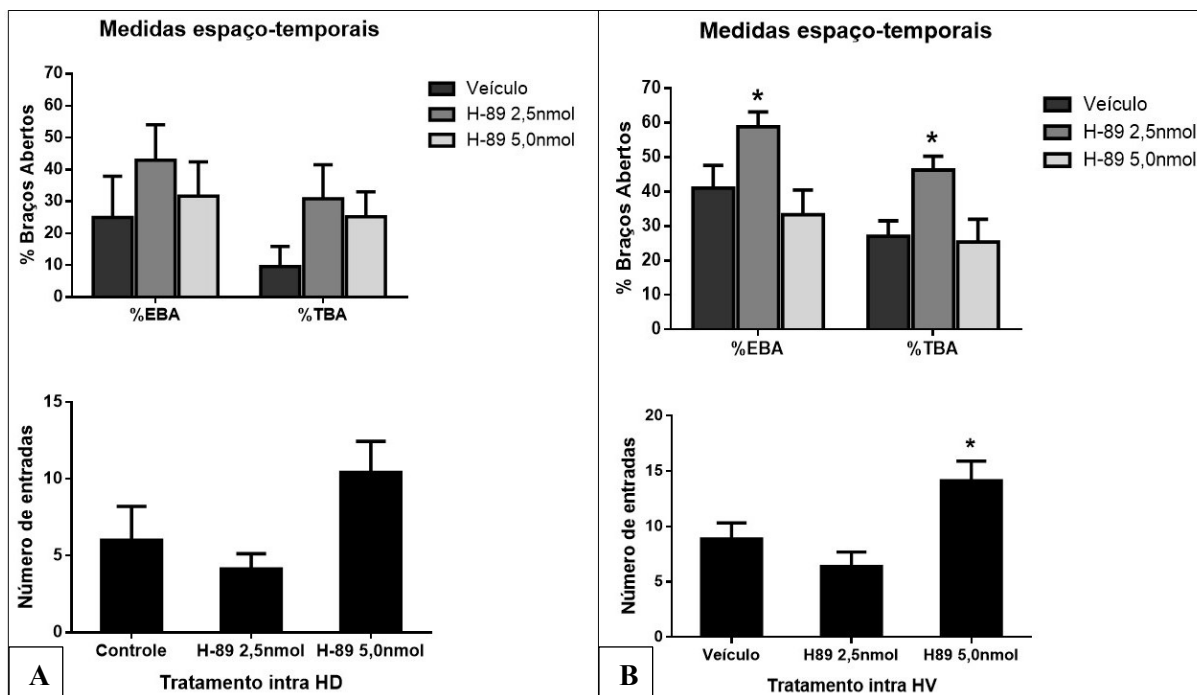


Figura 11: Efeito da microinjeção de H-89 (0, 2,5nmol ou 5,0nmol) no hipocampo dorsal (HD) (A) e hipocampo ventral (HV) (B) de camundongos sobre as porcentagens de tempo de permanência e entradas em braços abertos e frequência de entradas em braços fechados. %EBA: Porcentagem de entradas em braços abertos. %TBA: Porcentagem de tempo em braços abertos. As colunas representam as médias (\pm EPM). N = 6-8 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo veículo. Teste ANOVA monofatorial e teste post hoc Duncan.

5.3.2 Análise das medidas complementares para microinjeção de H-89 no HD e HV

5.3.2.1 Análise da exibição do comportamento de mergulho

A figura 12 ilustra os comportamentos de mergulho protegido e mergulho desprotegido, avaliados em animais submetidos ao LCE após receberem a injeção intra-HD e intra-HV de H-89 nas doses 0, 2,5nmol ou 5,0nmol.

A figura 12A mostra que não houve diferença significativa para os comportamentos de mergulho protegido ($F_{2,18} = 1,29$; $p = 0,29$) e desprotegido ($F_{2,18} = 1,27$; $p = 0,30$), após a injeção intra-HD do composto H-89, para ambas as doses. A figura 12B mostra diminuição significativa do comportamento de mergulho protegido para ambas as doses do composto H-89, quando injetado intra-HV ($F_{2,20} = 3,48$; $p = 0,05$), mas não para o comportamento de mergulho desprotegido ($F_{2,20} = 0,20$; $p = 0,82$), comparado com o grupo veículo.

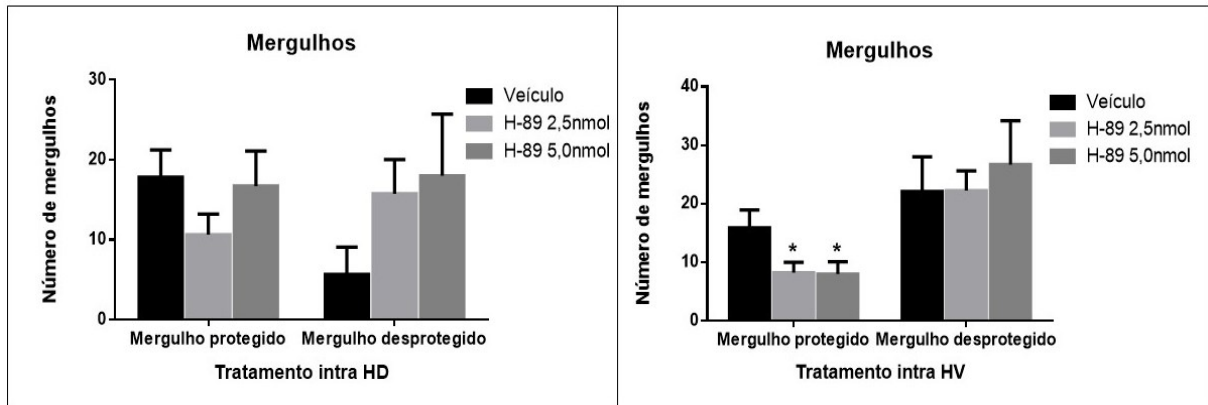


Figura 12: Efeito da microinjeção de H-89 (0, 2,5nmol ou 5,0nmol) no hipocampo dorsal (HD) (A) e hipocampo ventral (HV) (B) de camundongos sobre os comportamentos de mergulho protegido e desprotegidos. As colunas representam as médias (\pm EPM) N= 8 animais por grupo. As colunas representam as médias (\pm EPM). N= 6-8 animais por grupo. *p< 0,05 comparado ao grupo veículo. Teste ANOVA monofatorial e teste post hoc Duncan.

5.3.2.2 Análise da exibição do comportamento de esticada

A Figura 13 ilustra os comportamentos de esticada protegida e esticada desprotegida, avaliados em animais submetidos ao LCE após receberem a injeção intra-HD e intra-HV de H-89 (0, 2,5nmol ou 5,0nmol).

Na Figura 13A, a microinjeção de H-89, intra-HD, nas doses de 2,5 e 5,0nmol não alterou significativamente o número tanto de esticadas protegidas ($F_{2,18} = 0,39$; $p = 0,68$) quanto de esticadas desprotegidas ($F_{2,18} = 0,49$; $p = 0,62$) em relação ao grupo controle. Já a figura 13B, revelou que a microinjeção de H-89 em ambas as doses (2,5 e 5,0nmol), intra-HV, não alterou significativamente o número de esticadas protegidas ($F_{2,20} = 0,82$; $p = 0,45$) e esticadas desprotegidas ($F_{2,20} = 1,62$; $p = 0,22$) em relação ao grupo controle (veículo).

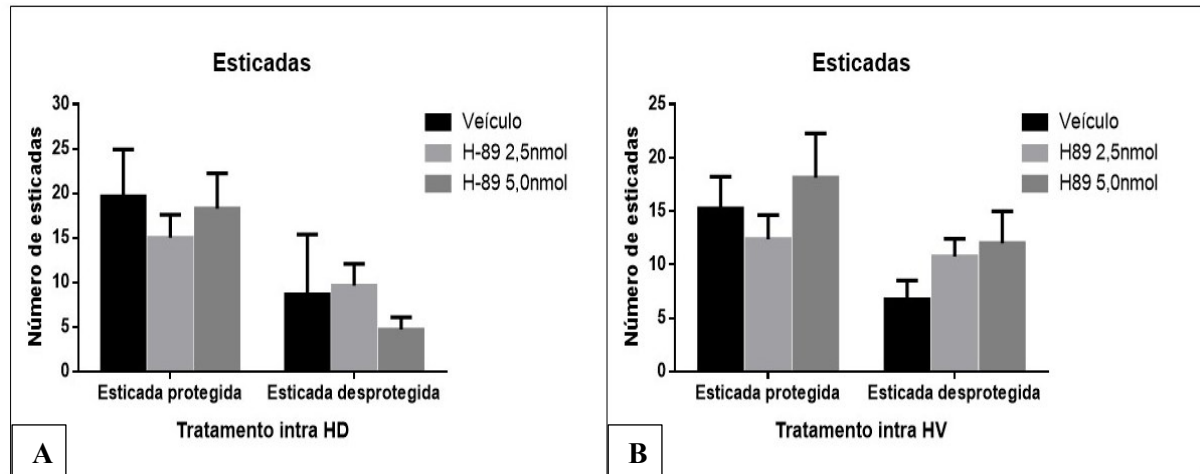


Figura 13: Efeito da microinjeção de H-89 (0, 2,5nmol ou 5,0nmol) no hipocampo dorsal (HD) (A) e hipocampo ventral (B) de camundongos sobre os comportamentos de esticada protegida e desprotegida. As colunas representam as médias (\pm EPM). N = 6-8 animais por grupo. Teste ANOVA monofatorial e post hoc Duncan.

5.3.2.3 Análise da exibição do comportamento de exploração da extremidade final dos braços abertos

A Figura 14 ilustra o comportamento de exploração da extremidade final dos braços abertos (áreas consideradas aversivas), avaliados em animais submetidos ao LCE após receberem a injeção intra-HD e intra-HV de H-89 (0, 2,5nmol ou 5,0nmol).

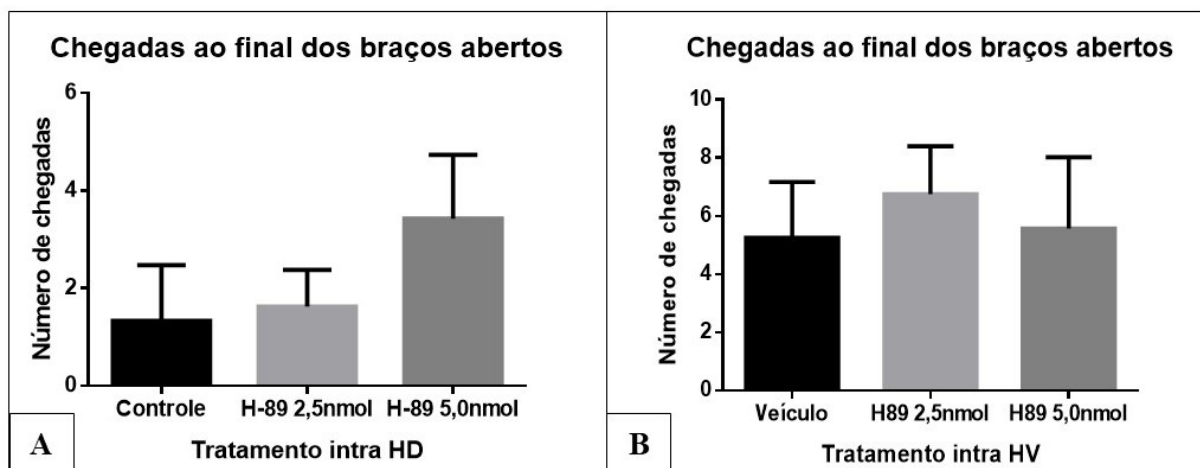


Figura 14: Efeito da microinjeção de H-89 (0, 2,5nmol ou 5,0nmol) no hipocampo dorsal (HD) (A) e hipocampo ventral (B) de camundongos sobre o número de chegadas ao final dos braços abertos. As colunas representam as médias (\pm EPM) N= 6-8 animais por grupo. Teste ANOVA monofatorial e post hoc Duncan.

A figura 14A demonstra que não houve diferença significativa entre os grupos tratados com as doses de H-89 2,5 nmol ou 5,0 nmol em relação ao grupo controle (veículo) ($F_{2,18} = 1,11$; $p = 0,35$), quando injetado intra-HD. A figura 14B também não revelou diferenças significativas

no número de chegadas ao final dos braços abertos entre os grupos tratados com H-89 nas doses 2,5nmol ou 5,0nmol e grupo controle (veículo) ($F_{2,20} = 0,16$; $p = 0,85$), quando injetadas intra-HV.

5.4 Experimento 3 – Avaliação da expressão nuclear de proteína Fos em neurônios ativados do HD e HV nas reações de defesa de camundongos expostos ao TER

5.4.1 Expressão nuclear de proteína Fos em neurônios do HD

A figura 15 mostra fotomicrografias de secções coronais da região encefálica hipocampo dorsal.



Figura 15: Fotomicrografias representativas do hipocampo dorsal (HD). Preparação imuno-histoquímica para expressão de proteína Fos em secções coronais de HD de camundongos não expostos ao Teste de Exposição ao Rato (controle), expostos ao rato de pelúcia ou expostos ao rato, de maneira única ou repetida. Fonte: Autor.

A figura 16 ilustra o número médio de células que expressam a proteína Fos no HD de camundongos não expostos (Controle) e expostos, de maneira única ou repetida, ao rato de pelúcia ou ao rato.

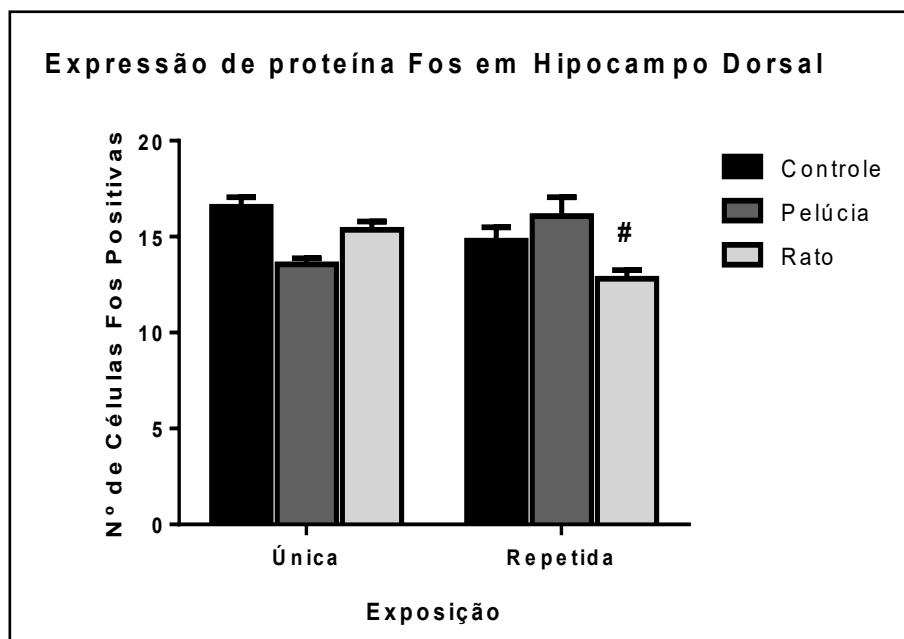


Figura 16: Efeito da exposição única ou repetida de camundongos expostos ao rato de brinquedo (pelúcia) ou ao rato no número de células que expressam a proteína Fos em HD. As barras representam a média±EPM (N=4-6 animais/grupo). # $p < 0,05$ comparado ao grupo rato de pelúcia. Teste ANOVA bifatorial e teste post hoc Bonferroni.

A ANOVA bifatorial (Fator 1: controle, exposição ao brinquedo e ao rato e Fator 2: exposição única ou repetida), seguida do teste de comparações múltiplas Bonferroni revelou que os animais expostos ao rato de pelúcia não apresentaram aumento significativo na expressão de células Fos-positivas no HD em relação ao grupo controle, tanto para a exposição única. O teste também revelou que houve diminuição significativa da expressão de células Fos-positivas no HD de camundongos expostos ao rato em relação aos camundongos expostos ao rato de pelúcia, para a exposição repetida ($F_{2,25} = 8,97$, $p = 0,001$).

5.4.2 Expressão nuclear de proteína Fos em neurônios do HV

A figura 17 mostra fotomicrografias de secções coronais da região encefálica hipocampo ventral.

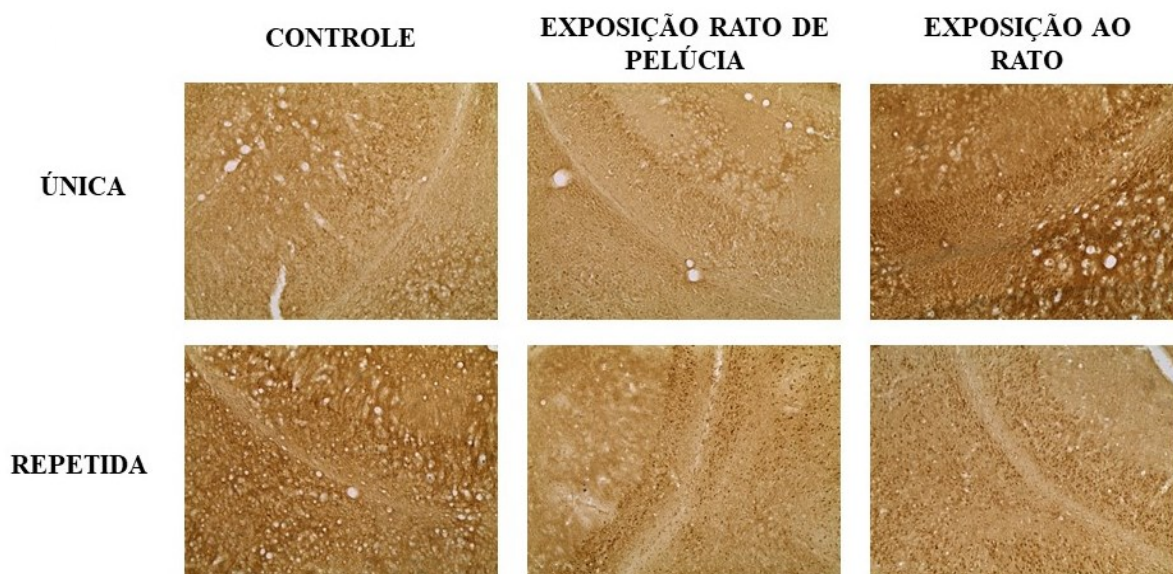


Figura 17: Fotomicrografias representativas do hipocampo ventral (HV). Preparação imuno-histoquímica para expressão de proteína Fos em secções coronais de HV de camundongos não expostos ao Teste de Exposição ao Rato (controle), expostos ao rato de pelúcia ou expostos ao rato, de maneira única ou repetida. Fonte: Autor.

A figura 18 ilustra o número médio de células que expressam a proteína Fos no HV de camundongos não expostos (controle) e expostos, de maneira única ou repetida, ao rato de pelúcia ou ao rato.

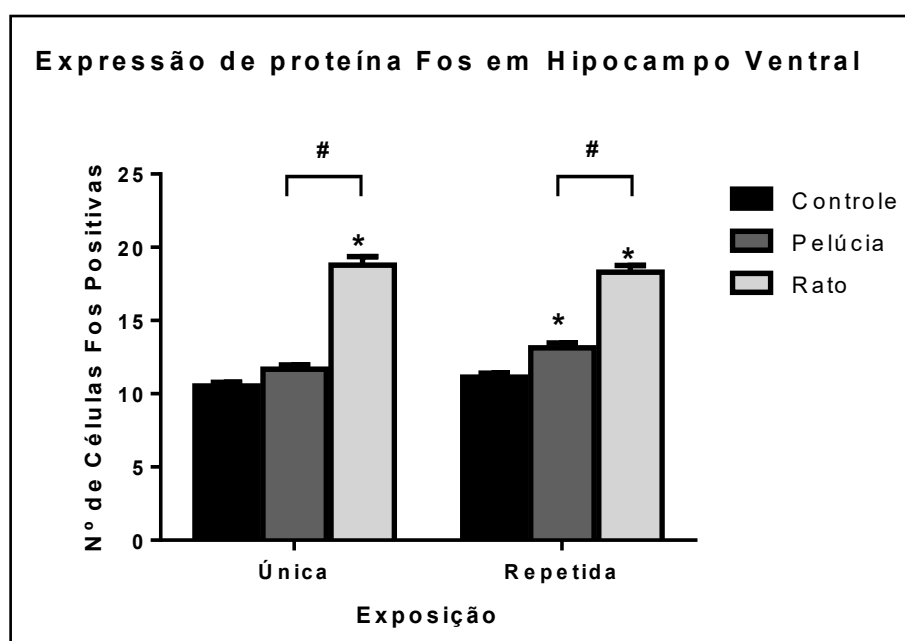


Figura 18: Efeito da exposição única ou repetida de camundongos expostos ao rato de pelúcia ou ao rato no número de células que expressam a proteína Fos em HV. As barras representam a média±EPM (N=8-9 animais/grupo). * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle e # $p < 0,05$ comparado ao grupo rato de pelúcia. Teste ANOVA bifatorial e teste post hoc Bonferroni.

A ANOVA bifatorial (Fator 1: controle, exposição ao brinquedo e ao rato e Fator 2: exposição única ou repetida), seguida do teste de comparações múltiplas Bonferroni, revelou que os animais expostos ao rato tiveram aumento significativo na expressão de células Fos-positivas no HV em relação ao grupo controle, tanto para a exposição única quanto para a exposição repetida. Além disso, o teste revelou que durante a exposição repetida, o grupo exposto ao rato de pelúcia também apresentou aumento significativo da expressão de células Fos-positivas em relação ao grupo controle. A ANOVA bifatorial também revelou que houve aumento significativo da expressão de células Fos-positivas no HV de camundongos expostos ao rato em relação aos camundongos expostos ao rato de pelúcia, tanto para a exposição única, quanto para a exposição repetida ($F_{2,45} = 3,25$; $p = 0,048$).

5.4.3 Avaliação dos comportamentos defensivos exibidos por camundongos após exposição ao TER

A Figura 19 ilustra as medidas espaço-temporais de tempo de permanência e número de entradas em área desprotegida (superfície), parâmetros de ansiedade avaliados em animais expostos ao rato de pelúcia ou ao rato, de maneira única e repetida, no TER.

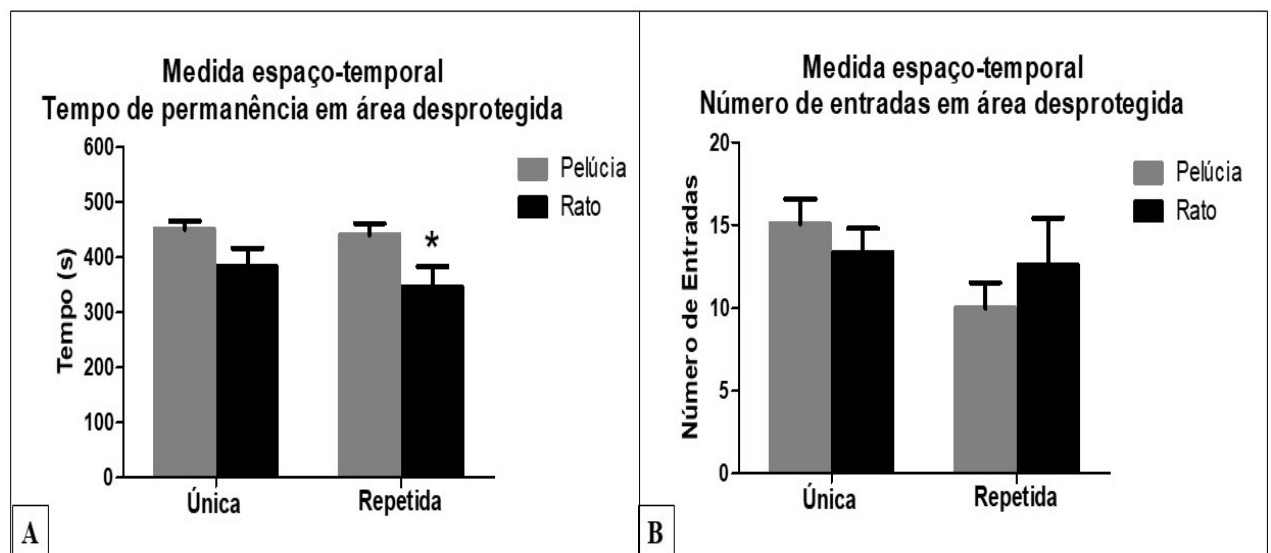


Figura 19: Efeito da exposição única ou repetida de camundongos expostos ao rato de pelúcia ou rato sobre o tempo de permanência (A) e número de entradas (B) na área desprotegida do aparato RET. As barras representam a média±EPM (N= 9-10 animais/grupo). * $p < 0,05$ comparado ao grupo exposto ao rato de pelúcia. Teste t Student.

Na figura 19A, o teste t demonstrou redução no tempo de permanência em área desprotegida de camundongos expostos ao rato, em comparação ao grupo exposto ao rato de pelúcia, durante os testes repetidos ($t_{(1,8)} = -2,15$; $p=0,04$), mas não na exposição única ($t_{(1,7)} = -1,90$; $p=0,07$), embora uma tendência ($p=0,07$) tenha sido observada. Já na figura B, o número de entradas em área desprotegida não foi alterado em nenhum dos tipos de exposição (Única: $t_{(1,7)} = 0,85$; $p=0,40$; Repetida: $t_{(1,8)} = 0,38$; $p=0,70$).

5.4.4 Análise das medidas complementares dos animais expostos ao TER

A Figura 20 ilustra as medidas complementares de contato com a tela, escalada na tela e número de esticadas, realizadas por animais expostos ao rato de pelúcia ou ao rato, de maneira única e repetida, no TER.

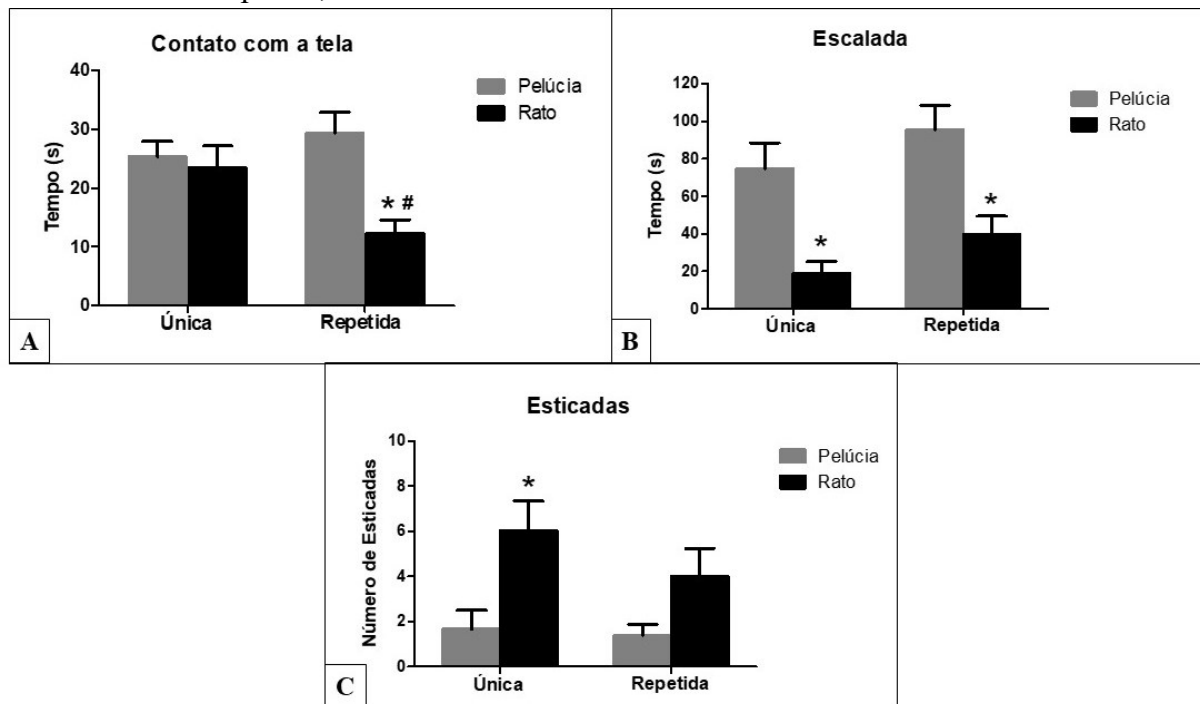


Figura 20: Efeito da exposição única ou repetida de camundongos expostos ao rato de pelúcia ou rato, sobre os comportamentos de contato com a tela (A), escalada na tela (B) e número de esticadas (C). As barras representam a média±EPM (N= 9-10 animais/grupo). * $p<0,05$ comparado ao grupo exposto a pelúcia. Teste t Student.

Na figura 20A, camundongos expostos ao rato repetidamente permaneceram menos tempo em contato com a tela em comparação com o grupo exposto ao rato de pelúcia de maneira repetida ($t_{(1,7)} = -4,08$; $p= 0,0006$) e também em comparação com o grupo exposto ao rato de maneira única ($t_{(1,7)} = 2,60$; $p= 0,01$). O grupo de exposição única não demonstrou diferenças significativas entre si ($t_{(1,7)} = -0,41$; $p= 0,68$).

Na figura 20B, houve redução significativa no tempo de escalada na tela de arame de camundongos expostos ao rato, tanto de maneira única ($t_{(1,7)} = -3,71$; $p = 0,001$) quanto repetida ($t_{(1,8)} = -3,42$; $p = 0,002$), em comparação com o grupo exposto ao rato de pelúcia.

Na figura 20C, houve diferença significativa para o aumento do número de esticadas de camundongos expostos ao rato de maneira única, apenas ($t_{(1,7)} = 2,37$; $p = 0,03$). Houve tendência para aumentar o número de esticadas na exposição repetida ($t_{(1,8)} = 1,94$; $p = 0,06$).

5.5 Experimento 4 – Avaliação do efeito da microinjeção de CP 376395 no HD e HV nas reações de defesa de camundongos expostos ao TER.

5.5.1 Análise das medidas espaço-temporais para microinjeção de CP 376395 no HD e HV no TER

A Figura 21 ilustra as medidas espaço-temporais de número de entradas e tempo de permanência nas áreas desprotegidas do TER, após receberem a injeção intra-HD e intra-HV de CP 376395 nas doses 0, 3,0nmol ou 6,0nmol.

Na figura 21A, a microinjeção de CP 376395, intra-HD, nas doses de 3,0 e 6,0nmol, intra-HD, não alterou significativamente o número de entradas ($F_{2,18} = 2,709$; $p = 0,088$) na área desprotegida, porém houve o aumento significativo no tempo permanecido na área desprotegida apenas na dose 6,0nmol ($F_{2,18} = 3,879$; $p = 0,024$) em relação ao grupo controle (veículo).

Já na figura 21B, a microinjeção de CP 376395 intra-HV promoveu aumento do tempo de permanência na superfície ($F_{2,18} = 3,01$; $p = 0,04$) em ambas as doses, mas para o número de entradas na superfície, não revelou diferenças significativas ($F_{2,18} = 0,62$; $p = 0,55$).

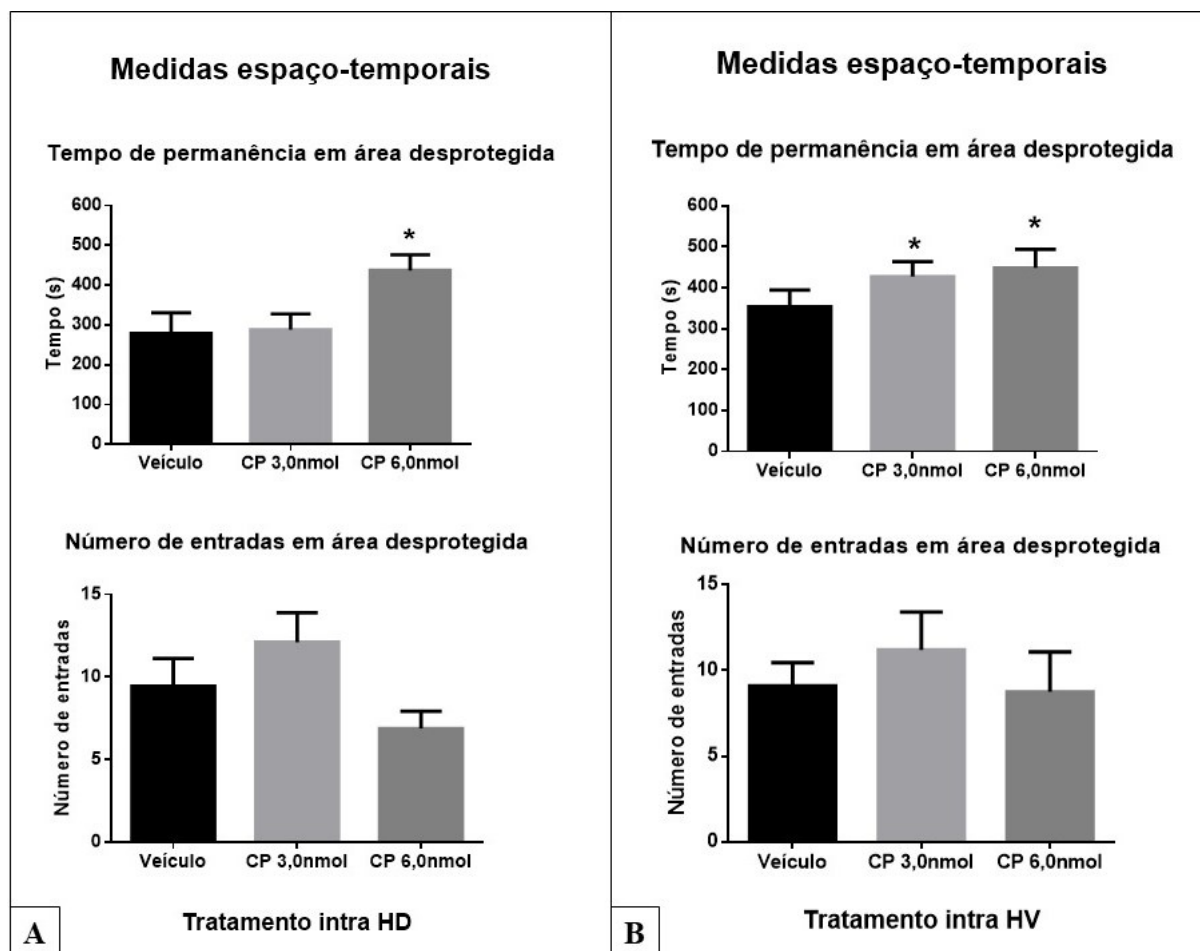


Figura 21: Efeito da microinjeção de CP 376395 (0, 3,0nmol/0,1μL ou 6,0nmol/0,2μL) no hipocampo dorsal (HD) (A) e hipocampo ventral (HV) (B) de camundongos sobre o tempo de permanência e entradas na superfície do TER. As colunas representam as médias (\pm EPM). N = 8-9 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo veículo. Teste ANOVA monofatorial e teste post hoc Duncan.

5.5.2 Análise das medidas complementares para microinjeção de CP 376395 no HD e HV no TER

5.5.2.1 Análise da exibição do comportamento de contato com a tela

A Figura 22 ilustra os comportamentos de contato com a tela (duas ou três patas na tela), avaliados em animais submetidos ao TER após receberem injeção intra-HD e intra-HV de CP 376395 (0, 3,0nmol ou 6,0nmol).

Na figura 22A, houve tendência ao aumento do comportamento de contato com a tela para a dose de 6,0nmol, em relação ao grupo veículo ($F_{2,23} = 2.813$; $p = 0,08$). Já na figura 22B,

a microinjeção de CP 376395 intra-HV, nas doses de 3,0nmol e de 6,0nmol, não alterou significativamente o comportamento de contato com a tela ($F_{2,25} = 1,56$; $p = 0,23$).

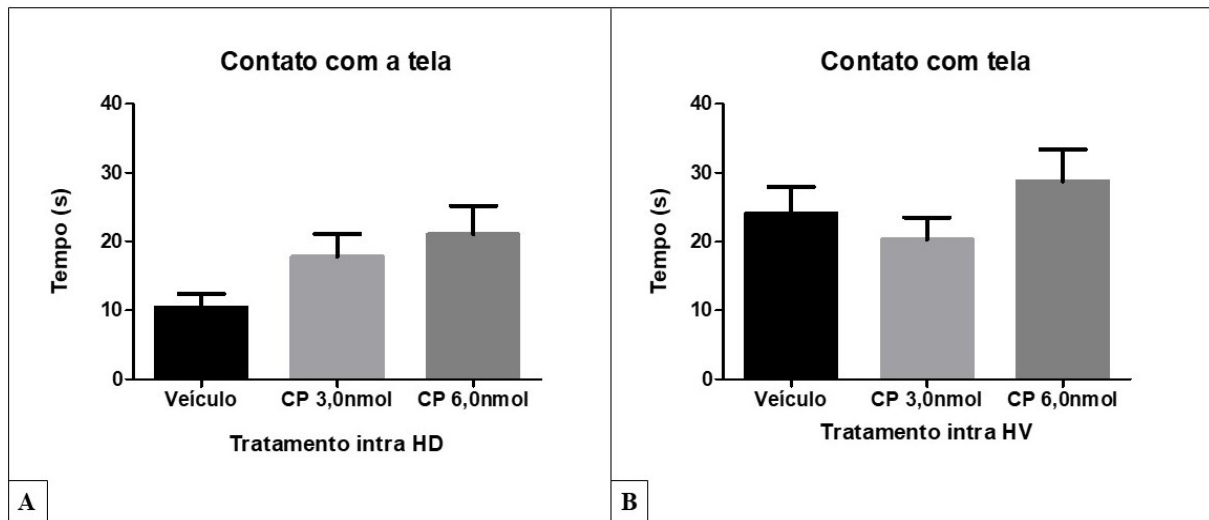


Figura 22: Efeito da microinjeção de CP 376395 (0, 3,0nmol/0,1μL ou 6,0nmol/0,2μL) no hipocampo dorsal (HD) (A) e hipocampo ventral (B) de camundongos sobre o tempo de contato com a tela. As colunas representam as médias (\pm EPM). N = 8-9 animais por grupo. Teste ANOVA monofatorial e post hoc Duncan.

5.5.2.2 Análise da exibição do comportamento de escalada na tela

Figura 23 ilustra o comportamento de escalada na tela, avaliados em animais submetidos ao TER após receberem injeção intra-HD e intra-HV de CP 376395 (0, 3,0nmol ou 6,0nmol).

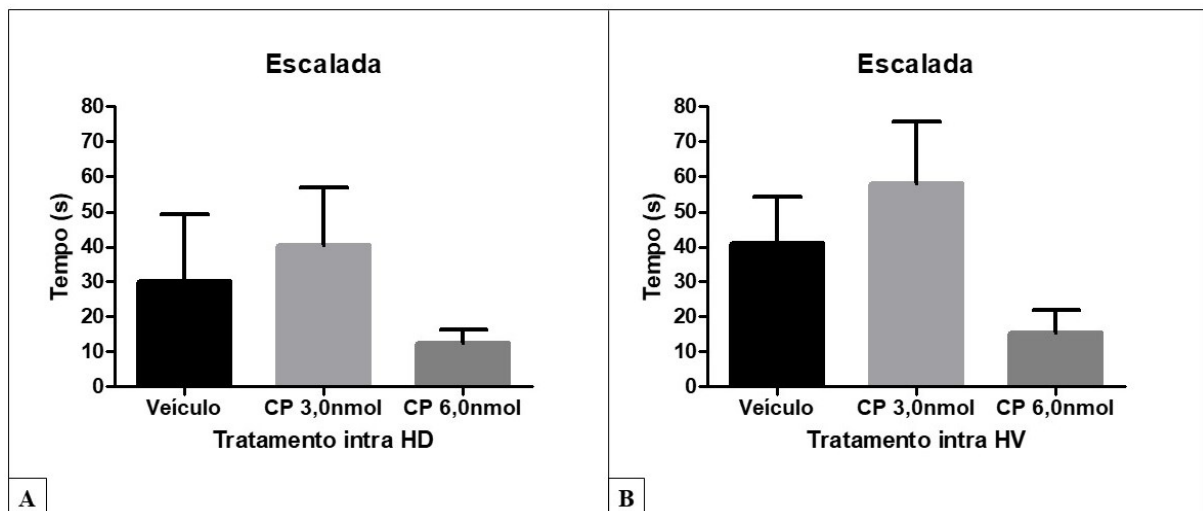


Figura 23: Efeito da microinjeção de CP 376395 (0, 3,0nmol/0,1μL ou 6,0nmol/0,2μL) no hipocampo dorsal (HD) (A) e hipocampo ventral (B) de camundongos sobre o tempo de escalada na tela. As colunas representam as médias (\pm EPM). N = 8-9 animais por grupo. Teste ANOVA monofatorial e post hoc Duncan.

Na figura 23A, a microinjeção de CP 376395 nas doses de 3,0 e 6,0nmol não alterou significativamente o comportamento de escalada na tela ($F_{2,23}= 0,84$; $p= 0,44$). Na figura 23B, também não houveram diferenças significativas entre as doses e o grupo veículo ($F_{2,25}= 2,55$; $p= 0,09$).

5.5.2.3 Análise da exibição do comportamento de esticadas

A figura 24 ilustra o comportamento de esticadas, avaliados em animais submetidos ao TER após receberem injeção intra-HD e intra-HV de CP 376395 (0, 3,0nmol ou 6,0nmol).

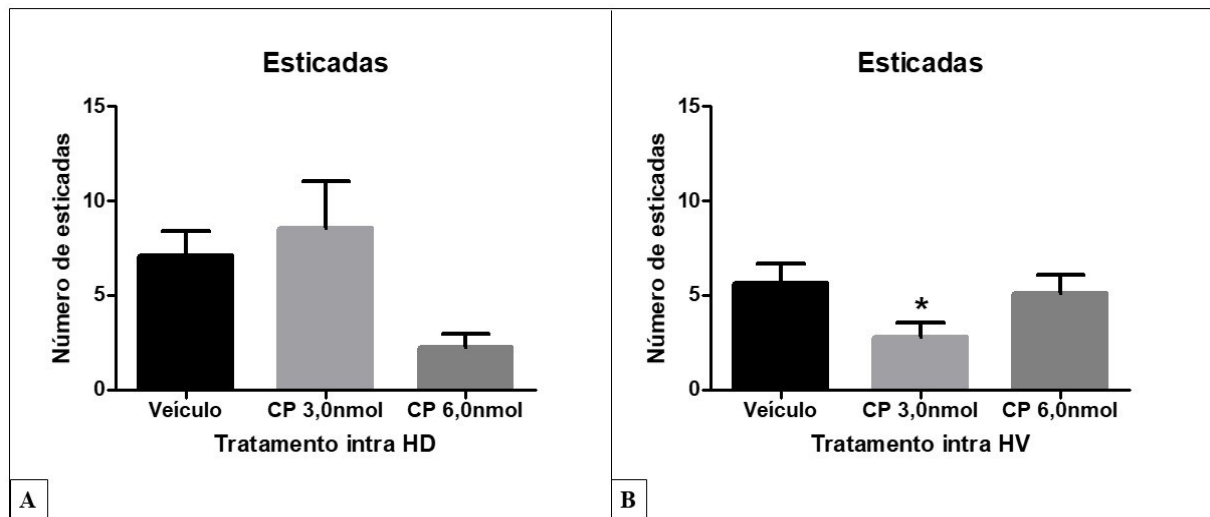


Figura 24: Efeito da microinjeção de CP 376395 (0, 3,0nmol/0,1μL ou 6,0nmol/0,2μL) no hipocampo dorsal (HD) (A) e hipocampo ventral (B) de camundongos sobre o tempo de esticadas. As colunas representam as médias (\pm EPM). N = 8-9 animais por grupo. Teste ANOVA monofatorial e post hoc Duncan.

Na figura 24A, a microinjeção de CP 376395 intra-HD, nas doses de 3,0nmol e de 6,0nmol, não alterou significativamente os comportamentos de esticada ($F_{2,23}= 3,52$; $p= 0,04$), houve apenas uma forte tendência ($p=0,05$) para diminuição deste comportamento na dose de 6,0nmol, em relação ao grupo veículo. Já na figura 24B, a dose de CP 376395 3,0nmol foi capaz de diminuir os comportamentos de esticada em relação ao grupo veículo ($F_{2,25}= 3,10$; $p= 0,04$).

6 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos a partir da exposição ao labirinto em cruz elevado demonstraram o possível envolvimento da neurotransmissão CRFérgica hipocampal na mediação tônica dos comportamentos induzidos por tal aparato. Entretanto, essa afirmação pode ser aplicada a sub-área hipocampo ventral, mas não ao hipocampo dorsal, uma vez que a microinjeção do composto CP 376395, antagonista de receptores CRF1, na porção ventral, elevou a porcentagem de tempo de permanência em braços abertos e revelou efeito ansiolítico que não foi observado com o tratamento intra-hipocampo dorsal da mesma substância.

Nossos resultados corroboram os achados de Bertoglio, Joca e Guimarães (2006), onde a injeção de lidocaína no hipocampo ventral de ratos, prévia a exposição ao LCE, revelou aumento na exploração dos braços abertos do aparato, através do aumento do número de entradas em tais compartimentos, considerados regiões aversivas aos animais. Entretanto, quando o mesmo tipo de tratamento foi aplicado ao hipocampo dorsal, não foram observadas diferenças significativas.

Com o objetivo de entender melhor o envolvimento da modulação CRFérgica no hipocampo ventral de ratos em comportamentos defensivos, Pentkowski et al. (2009) microinjetaram CRF ovino (oCRF), agonista de receptores CRF1 e CRF2 dez vezes mais potente que o CRF humano/rato na estrutura em questão. Como resultado, observou-se aumento na expressão de comportamentos defensivos em testes cuja ameaça era potencial, como labirinto em cruz elevado, teste de exposição ao odor do gato e ao contexto do odor do gato. Por outro lado, a injeção de um antagonista desses receptores reduziu as respostas do tipo ansiosas diante destes testes, demonstrando propriedade ansiogênica do neurotransmissor CRF.

Estudos do nosso grupo de laboratório (CABRAL-DOS-SANTOS; MIGUEL, 2018, não publicado) também indicam o envolvimento do hipocampo ventral na modulação da ansiedade, uma vez que a inibição dessa sub-área de camundongos pela microinjeção de cloreto de cobalto (CoCl_2), um bloqueador de canais de cálcio, aumentou tanto a porcentagem de entradas quanto de tempo de permanência em braços abertos do LCE. Por outro lado, o mesmo tratamento intra-hipocampo dorsal, não revelou diferenças significativas em relação as medidas espaço-temporais supracitadas.

O hipocampo possui um papel bem estabelecido na regulação dos processos de memória e aprendizagem espacial, e, também tem sido considerado na modulação dos comportamentos defensivos relacionados a ansiedade. No entanto, o entendimento do envolvimento preciso de suas sub-divisões dorsal e ventral nestas modulações ainda está pouco esclarecido e requer

estudos adicionais (BERTOGLIO; JOCA; GUIMARÃES, 2006). Resultados incongruentes e às vezes até mesmo contraditórios quanto à participação dessas porções têm sido evidenciados.

Demonstrando o fato acima, de que os resultados nem sempre apontam para uma igualdade, Canto-de-Souza et al (2015), investigou o sistema histaminérgico na ansiedade e memória emocional de camundongos submetidos ao LCE, e indicou a participação do hipocampo dorsal nos comportamentos relacionados a ansiedade e memória emocional. Ainda, Cornélio e Nunes-de-Souza (2007), ao pesquisarem sobre a ação do mCPP, um agonista de receptores 5-HT_{2B/2C} para serotonina capaz de induzir ansiedade, observaram que composto não produziram efeitos sobre a expressão de comportamentos defensivos quando injetado tanto no hipocampo ventral quanto no hipocampo dorsal.

Embora contrastantes, estes resultados, em conjunto com outros na literatura, indicam o crescente interesse de se estudar essa área e suas subdivisões na modulação das reações comportamentais da ansiedade e reações de defesa. Nesse sentido, embora ainda sejam necessários muitos estudos, a existência de uma mediação da circuitaria hipocampal nesses comportamentos é consenso e objetivo de pesquisa na comunidade científica.

Além das medidas espaço-temporais avaliadas anteriormente, que indicam o efeito ansiolítico do composto CP 376395 na dose 3,0nmol e também a modulação tônica do CRF dos comportamentos do tipo ansiosos, a frequência das medidas complementares também foram analisadas.

A injeção de CP 376395 na dose de 6,0nmol no hipocampo dorsal produziu aumento na frequência de realização de mergulhos desprotegidos, realizados nos braços abertos, considerados um indicativo de ação ansiolítica. Na tentativa de entender como ocorre tal mecanismo de ação ansiolítica, uma vez que tal efeito nos intrigou pelo motivo de que não foi observado nenhum outro efeito do tipo no LCE com relação ao HD, foi levantada a hipótese de que a neurotransmissão glutamatérgica também poderia estar envolvida na modulação desse tipo de comportamento, além do próprio efeito excitatório produzido pela ativação dos receptores de CRF.

Receptores do tipo CRF1 são co-expressos em neurônios glutamatérgicos e sua ativação tem demonstrado aumento da propagação da atividade neuronal, uma vez que o glutamato é um neurotransmissor excitatório, do giro denteado até a porção CA1 do hipocampo (REFOJO et al., 2011; HENCKENS; DEUSSING; CHEN, 2016). Sendo assim, pode ser que a dose de 6,0nmol do CP 376395, o antagonista para receptor CRF1, tenha sido o suficiente para produzir o antagonismo dos receptores CRF1 em neurônios glutamatérgicos, diminuindo a ação do

neurotransmissor glutamato e promovendo o efeito ansiolítico (aumento de mergulhos protegidos) observado no tratamento intra-HD.

No hipocampo ventral (HV) foi observado que o CP 376395 6,0nmol aumentou a frequência de mergulhos protegidos, realizados na plataforma central, indicativo de efeito ansiogênico,

Este indicativo observado em nossos resultados foi algo inesperado mesmo para nós, uma vez que a dose mais baixa foi eficaz em induzir efeito do tipo ansiolítico nas medidas espaço-temporais e, além disso, essa dose mais alta não demonstrou efeito algum nos outros parâmetros analisados. Dessa forma, não podemos descartar a possibilidade desse resultado tratar de um efeito inespecífico do composto CP 376395. Porém, para não considerar apenas a hipótese de um efeito inespecífico, tentamos entender melhor o que pode ter acontecido, uma vez que essa dose não provocou qualquer outro efeito.

Esse fato é de difícil entendimento visto que, o CP 376395 é um antagonista altamente seletivo, o que exclui o fato de que doses mais elevadas poderiam provocar ligações menos específicas, já que os receptores CRF1 estariam ligados e, portanto, produziria efeito diferente de dose mais baixa que se ligariam preferencialmente em CRF1.

Ainda procurando entender esse efeito, foi levantada a hipótese da neurotransmissão GABAérgica poder modular tal resposta. Sabe-se que a hiperatividade do hipocampo está relacionada à exibição de comportamentos do tipo ansiosos exibidos em diferentes modelos de ansiedade, devido a ativação do sistema de inibição comportamental, do qual o hipocampo faz parte. O GABA, assim, funcionaria como um agente ansiolítico por diminuir a taxa de despolarização neuronal e consequentemente, a atividade dessa região (McNAUGHTON; CORR 2004).

Nesse sentido, foram verificados trabalhos na literatura (DEGROOT; KASHLUBA; TREIT, 2001; CHEN et al., 2012; KOROTKOVA, 2006) que demonstram receptores CRF1 co-expressos em neurônios que produzem, armazenam e secretam o neurotransmissor GABA, em diferentes estruturas encefálicas, como núcleos da rafe e área tegmentar ventral. Se isso também ocorrer no hipocampo ventral, os receptores CRF1, estimulatórios por estarem acoplados a proteína Gs, ao serem estimulados pelo CRF, levarão a liberação de GABA e inibição da propagação da atividade neuronal, promovendo efeitos ansiolíticos.

Entretanto, o antagonismo de tais receptores promovido pelo composto CP 376395 na dose de 6,0nmol, poderia ser suficiente para produzir efeitos ansiogênicos, ainda que leves, como o aumento de mergulhos protegidos, uma vez que a dose em excesso poderia antagonizar

os receptores CRF1 de neurônios GABAérgicos, além daqueles expressos nos neurônios CRFérgicos. Assim, a liberação do GABA seria inibida e perderia sua ação ansiolítica.

Uma vez evidenciado o efeito ansiolítico do CP 376395 3,0nmol no hipocampo ventral e, portanto, uma possível participação tônica do CRF na mediação de comportamentos relacionados à ansiedade, pesquisar seu mecanismo de ação foi o passo seguinte na tentativa de melhor compreender a circuitaria neural que envolve a ansiedade.

O CRF, a partir de sua ligação com seus receptores, age através da ativação da Proteína Gs e consequentemente da via AMPc/PKA. Por isso, tornou-se relevante pesquisar o efeito da proteína quinase A em tais respostas mediadas pelo hipocampo, através da microinjeção de H-89, inibidor de PKA.

Os resultados das microinjeções de H-89 realizadas no hipocampo dorsal não revelaram efeitos significativos tanto para as medidas espaço-temporais quanto para os comportamentos complementares.

Por outro lado, as microinjeções de H-89 no hipocampo ventral dos camundongos indicaram uma importante participação da via do AMPc/PKA na mediação dos comportamentos relacionados à ansiedade no LCE, uma vez que produziu elevação significativa do tempo de permanência e da frequência de entradas nos braços abertos do LCE. Estes resultados corroboram os achados de Miguel, Gomes e Nunes-de-Souza (2014), onde a infusão deste inibidor de PKA, no córtex pré-frontal medial, foi capaz de aumento do tempo de permanência nos braços abertos do aparato, bem como a frequência de comportamentos complementares (mergulho e esticada desprotegidos e chegada ao final dos braços abertos), indicando efeito ansiolítico do composto, porém em sua dose de 5,0nmol, e não de 2,5nmol, como ocorreu neste trabalho.

Nesse sentido, deparamos mais uma vez com a curva em “U” invertido (a primeira foi com o CP 376395, onde a dose de 3,0nmol foi mais eficaz que a dose de 6,0nmol), na qual a dose mais elevada acaba perdendo o efeito observado na dose mais baixa. Diferentemente do CP 376395, o H-89 tem sido demonstrado menos específico para seu alvo, a PKA, sendo possível, em doses mais altas atuar também em outros alvos, como outras quinases e MAPK, podendo, nesse caso, ser o motivo da perda do efeito na dose mais elevada, pelo menos no hipocampo ventral (LOCHNER; MOOLMAN, 2006; TOCRIS, 2018)

Entretanto, apesar de ineficaz *per se* no córtex pré-frontal, a dose de 2,5nmol de H-89 previamente a injeção de CRF foi capaz de reduzir respostas ansiogênicas deste

neurotransmissor, demonstrando o envolvimento da via AMPc/PKA na cascata deflagrada pela ativação dos receptores CRF1 (MIGUEL; NUNES-DE-SOUZA, 2014).

O fato da injeção de H-89 produzir efeito ansiolítico no LCE, quando injetado no HV, pode indicar uma possível mediação do CRF através da via AMPc/PKA. Entretanto, esse fato não pode ser totalmente relacionado ao efeito do CRF, uma vez que ativar a cascata do AMPc/PKA é característica de vários outros neurotransmissores, além do CRF, que agem através de receptores acoplados a PGs e que também estão presentes no Hipocampo Ventral, como 5HT4 para serotonina e Beta-adrenérgico para noradrenalina, entre outros (GOLAN et al., 2014). Dessa forma, um importante desdobramento futuro para este estudo seria realizar a injeção do composto H-89 antes da injeção do CRF para verificar se neste caso e no HV, o CRF atuaria através dessa via.

Outro fato inesperado neste trabalho foi o aumento do número de entradas nos braços fechados exibidos pelos camundongos tratados com a dose de 5,0nmol de H-89. Este parâmetro pode ser utilizado para avaliar o índice de atividade locomotora e, embora a dose de 5,0nmol tenha aumentado a locomoção, este efeito parece se tratar de um efeito pontual, e não relevante, uma vez que a dose que apresentou efeito ansiolítico não foi a mesma que elevou a frequência de entradas nos braços fechados. Assim, o efeito ansiolítico da dose de 2,5nmol caracteriza sim um efeito ansiolítico puro.

Além disso, esse fato pode estar relacionado a alguma alteração ao longo do processo de experimentação ou ambiental não percebida pelo experimentador.

Em conjunto, os resultados obtidos dos experimentos com o LCE indicam que a ativação dos receptores CRF1 pelo peptídeo ou agonista pode levar a ativação da cascata intracelular que envolve a via do AMPc/PKA e possível fosforilação do CREB. Entretanto, não podemos descartar que outros estudos na literatura têm demonstrado ser o CRF capaz de ativar outras vias independentes da via da PKA, as quais também culminarão com efeitos cruciais como a fosforilação de CREB. Dentre elas podemos destacar a via da fosfolipase C e PKC (BLANK et al., 2003; STERN et al., 2011), a via das MEK/MAPK (HAUGER et al., 2011; STERN et al., 2011) e a via da ativação de sintase de óxido nítrico (NO)/GMPc (HILLHOUSE; GRAMMATOPOULOS, 2006) entre outras e para melhor compreensão, estudos adicionais envolvendo essas outras vias possíveis deverão ser realizados.

Os resultados obtidos no experimento de imuno-histoquímica para expressão da proteína Fos demonstraram que no HD o grupo que foi exposto ao rato de brinquedo (pelúcia)

não demonstrou alterações significativas na expressão de proteína Fos em comparação com o grupo controle, mantido na caixa moradia, tanto na exposição aguda quanto repetida.

Entretanto, de modo inesperado, foi observado que a expressão de Fos diminuiu significativamente no HD de camundongos expostos ao rato em comparação ao grupo exposto ao rato de pelúcia de maneira repetida. Esse fato pode ter ocorrido devido a um processo adaptativo envolvendo processos mnemônicos que sabidamente recrutam a mediação do hipocampo dorsal. Como o HD parece estar envolvido com processamento de memória (BERTOGLIO, JOCA, GUIMARÃES, 2006), é compreensível que o mesmo não se ative ou até diminua sua atividade após sucessivas exposições a um mesmo estímulo, ainda que seja de natureza aversiva, demonstrando adaptação, pois o animal pode guardar a informação relacionada às dicas ambientais e orientação espacial, requerendo cada vez menos atividades de neurônios que se ativariam para guardar essas informações cognitivas.

Com relação ao HV, os resultados revelaram que o teste de exposição ao rato se mostrou eficaz como um estímulo aversivo por si só, e o HV parece estar envolvido na modulação de respostas induzidas nesse aparato, uma vez que tanto para a exposição única quanto para a exposição repetida, o grupo exposto ao rato apresentou aumento significativo de expressão de proteína Fos em relação ao grupo controle e também ao grupo exposto ao rato de brinquedo, fato que demonstra a aversão do camundongo apenas pelo seu predador (rato) e não por algo que esteja no outro compartimento (brinquedo).

No experimento de exposições repetidas o grupo exposto ao rato de pelúcia demonstrou aumento da expressão de Fos em relação ao grupo controle. Este último fato pode estar relacionado com a maior frequência de manipulação dos animais pelo experimentador.

Campeau e colaboradores (2001) obtiveram dados semelhantes aos apresentados nesse trabalho, em que observaram aumento da expressão do gene c-Fos ao expor de maneira repetida ratos a gaiolas experimentais, em tese estímulos não aversivos. Os autores acreditam que essa ativação do hipocampo captada pela ferramenta experimental possa estar relacionada às suas outras funções, como formação da memória ou orientação espacial, a partir dos estímulos ambientais percebidos, mas não relacionadas com funções que envolvem processos aversivos, como exibição de comportamentos do tipo ansiosos ou medo condicionado.

Entretanto, os resultados da avaliação comportamental realizada com os mesmos animais que tiveram seus encéfalos submetidos a imuno-histoquímica podem corroborar o envolvimento do HV na modulação dos comportamentos de defesa frente a um estímulo aversivo. Estes resultados demonstraram que os camundongos expostos ao rato de maneira

repetida permaneceram menos tempo na superfície do aparato (área desprotegida) que o grupo exposto ao brinquedo, e o grupo exposto ao rato de maneira única demonstraram uma tendência a diminuir esse tempo também.

Ambos os grupos expostos ao rato (única e repetidamente) demonstraram diminuição do tempo de escalada na tela em comparação aos grupos brinquedo. Este fato é justificável, uma vez que essa é a região mais aversiva do aparato pela maior proximidade ao predador.

Quanto ao número de esticadas, apenas o grupo exposto uma única vez ao rato apresentou aumento nesse comportamento de avaliação de risco, fato que pode ser justificado pelo aumento na atenção e orientação para pesquisa e escaneamento do ambiente. Talvez esse efeito não tenha perdurado nos grupos de exposições repetidas porque não se tratava mais de escaneamento ambiental uma vez que o animal já se dava conta da presença do predador.

Tomados em conjunto, os resultados referentes a imuno-histoquímica demonstram uma importante ativação do hipocampo ventral, mas não dorsal durante a exposição de camundongos ao TER, e aqui a exemplo do LCE, parece existir uma mediação mais clara do HV comparado ao HD nas reações de defesa e comportamentos relacionados a ansiedade.

Os resultados obtidos no experimento de microinjeção de CP 376395 no HD, na dose de 6,0nmol, mostraram aumento no tempo de permanência na área aversiva, indicativo de efeito do tipo ansiolítico. Com relação as medidas complementares, a mesma dose de 6,0nmol foi capaz apenas de reduzir o número de esticadas, um comportamento exploratório indicador de ansiedade, demonstrando o efeito ansiolítico do composto.

Quando injetado no hipocampo ventral, o composto CP 376395 foi capaz de produzir alterações significativas nas medidas espaço-temporais em ambas as doses em comparação ao grupo veículo, denotando também efeito ansiolítico, e, no caso mais pronunciado que no HD, visto que nesta região somente a dose mais elevada foi eficaz, entretanto no HV tanto a dose mais baixa quanto a mais alta foram eficazes em elevar a permanência na área aversiva.

Esses resultados contradizem parcialmente os achados de Pentkowski et al (2006) que demonstraram, a partir de lesões em ambas sub-áreas, que o hipocampo ventral, mas não o dorsal, contribui para a modulação dos comportamentos defensivos condicionados e não-condicionados durante testes de ansiedade que envolvem um estímulo aversivo predatório, como os testes de exposição ao odor do gato e ao gato vivo.

O fato de ser parcial a contradição é que, embora tenha aparecido um efeito na dose mais alta de CP 376395, o HD não demonstrou envolvimento robusto no LCE e agora no TER, o efeito maior é do HV, pois no HD somente se conseguiu efeito com a dose mais elevada.

Sendo assim, não podemos descartar que este trabalho sugere um envolvimento maior do HV que do HD na mediação dos efeitos tanto no LCE quanto no TER, sendo esse último endossado pelo aumento na expressão de Fos no HV, mas não no HD de camundongos expostos ao modelo.

Outro estudo realizado por Pentkowski e colaboradores (2009), demonstrou que a ativação dos receptores hipocampais para CRF, após a microinjeção do oCRF intra-HV, aumentou os comportamentos defensivos de ratos durante a exposição ao odor do gato e ao contexto de exposição ao odor do gato, consideradas situações de ameaça potencial. O antagonista, por sua vez, também promoveu efeitos significativos, diminuindo a ansiedade nesses mesmos testes, porém, quando testado durante a exposição direta ao gato (predador), o antagonismo desses receptores não produziu efeitos.

Os pesquisadores acreditam que para este último teste, a falta de efeitos produzidos pelo antagonismo sugere que os receptores CRF1 presentes no hipocampo ventral modulam os comportamentos defensivos sensíveis a testes de ansiedade, onde a ameaça é potencial, mas não afetam comportamentos responsivos a testes de medo, ou seja, quando a ameaça é imediata, sendo estas respostas possivelmente sustentadas por outros mecanismos neurais (PENTKOWSKI et al., 2009).

Esse fato é corroborado parcialmente nos nossos resultados, sendo a parte correspondente os resultados no LCE (ameaça potencial) e a dissonante os resultados no TER (exposição direta ao predador), uma vez que há diferença na natureza do experimento. Essa diferença também pode ser observada entre o TER e a bateria de teste de defesa em camundongos (MDTB do inglês: mouse defense test battery), desenvolvido pelo grupo dos Blanchard (BLANCHARD, GRIEBEL, BLANCHARD, 2003), o rato (anestesiado) é apresentado diretamente ao camundongo pelo experimentador que processa uma perseguição ao camundongo, eliciando reações distintas e mais intensas que o TER. Ambos envolvem uma ameaça direta e presencial, entretanto, o recrutamento neural e as respostas exibidas podem ser diferentes.

Em resumo, embora tenham sido observados alguns efeitos, ainda que leves no HD, nossos resultados apontam para uma possível modulação mais sítio-seletiva das respostas defensivas apresentadas durante a exposição dos camundongos ao LCE, uma vez que apenas o hipocampo ventral, mas não o dorsal, demonstrou estar envolvido e também a participação do neurotransmissor CRF e da via AMPc/PKA nessas respostas. Em relação ao TER, o composto CP 376395 promoveu efeito ansiolítico mais sutil quando injetado no HD (apenas a dose mais

elevada foi ansiolítica), porém efeito importante no HV (ambas as doses foram ansiolíticas e observou-se redução de avaliação de risco).

Apesar de sua função cognitiva conhecida e bem estabelecida, que envolve a memória e aprendizado, há um número crescente de evidências demonstrando outra função do hipocampo ligada às emoções, capaz de regular respostas diante de estímulos estressores e cuja alteração pode resultar em psicopatologias (FANSELOW; DONG, 2011).

Entretanto, os estudos objetivando entender o envolvimento do hipocampo nos transtornos de ansiedade e reações de defesa ainda são poucos e como pôde ser visto ao longo dessa discussão, ainda muito contraditórios e inconsistentes, e um dos possíveis motivos é que se trata de uma estrutura complexa, que apresenta diferenças anatômicas, funcionais e de conexões sinápticas entre suas sub-regiões (FANSELOW; DONG, 2011). Por estes motivos, destaca-se relevância em se estudar as divisões dorsal e ventral para melhor entender essa complexa modulação.

Baseados nos estudos presentes na literatura, acredita-se que a modulação dos comportamentos defensivos possa estar relacionada principalmente com a porção ventral do hipocampo, uma vez que estudos tem demonstrado maior envolvimento desta sub-área (BLANCHARD et al., 2005; BERTOGLIO; JOCA; GUIMARÃES, 2006; PENTKOWSKI et al., 2006; PENTKOWSKI et al., 2009; CABRAL-DOS-SANTOS; MIGUEL, 2018, não publicado), e que vão ao encontro com alguns dos achados deste trabalho.

O mecanismo pelo qual o HV pode regular tais respostas pode ser através de suas conexões que, dentre elas o córtex pré-frontal, amígdala e hipotálamo, regiões sabidamente envolvidas com as emoções. Por outro lado, o HD pode estar associado a processos cognitivos, uma vez que recebe informações de áreas corticais sensoriais primárias (BERTOGLIO; JOCA; GUIMARÃES, 2006).

Por estabelecer conexões sinápticas com o hipotálamo, o hipocampo ventral pode modular os comportamentos defensivos incondicionados através de projeções para o sistema de defesa hipotalâmico medial, descrito na introdução deste trabalho. Essas projeções ocorrem de duas maneiras: (1) pelo septo lateral, que envia projeções para o núcleo hipotalâmico anterior e núcleo pré-mamilar dorsal, ou (2) através de projeções para os núcleos da amígdala e projeta, via BNST, para os núcleos ventromedial e anterior do hipotálamo. Esta segunda via recebe aferências do córtex olfatório e pré-frontal (CANTERAS, 2002; PENTKOWSKI et al, 2006; PENTKOWSKI et al., 2009), estruturas relacionadas com exibição de comportamentos frente a ameaças potenciais.

Outro possível mecanismo pelo qual o hipocampo pode modular os comportamentos defensivos também foi apresentado na introdução deste trabalho. Esta estrutura parece estar envolvida com a análise de contexto de uma ameaça, onde frente a uma situação de conflito, é capaz de gerar comportamentos do tipo ansiosos, como aumento de vigilância e atenção a fontes potenciais de perigo, e também inibir atividades motoras correntes e comportamentos relacionados a fuga ou luta, visando proteger o organismo de possível dano, o chamado sistema de inibição comportamental (McNAUGHTON E CORR, 2004; CANTERAS et al., 2010; GRAEFF; GUIMARÃES, 2012).

Sabe-se que o CRF, como descrito na introdução deste trabalho, é capaz de atuar através de dois tipos de receptores, CRF1 e CRF2. A opção pelo antagonista de CRF1, e não de CRF2, em nosso estudo se deu pela expressão predominante do primeiro no hipocampo (VAN PETT et al., 2000). Além disso, a sua participação em comportamentos relacionados à ansiedade é mais estabelecida, enquanto que, com relação ao CRF2 os resultados são inconsistentes, sugerindo modulação dos comportamentos do tipo ansiosos (BALE et al., 2000; BALE et al., 2002; HENCKENS; DEUSSING; CHEN, 2016) ou sua não participação (SAHUQUE et al., 2006; MIGUEL; NUNES-DE-SOUZA, 2011).

Desta maneira, mesmo intrigados em pesquisar a ação do CRF1 na ansiedade através de modelos como o LCE e o TER, não devemos descartar a ação do CRF2.

Esses resultados representam uma pequena parte de um universo que é a complexa modulação das reações de defesa. O próximo passo que este trabalho conduz será a realização dos experimentos que investigam a ativação da via AMPc/PKA frente a exposição de camundongos ao Teste de Exposição ao Rato.

Apesar da necessidade de experimentos adicionais, conforme previamente discutido, os resultados deste trabalho contribuem com a tentativa cada vez mais crescente de melhor entender os intrigantes circuitos neurais envolvidos na neurobiologia das reações de defesa e da ansiedade.

7 CONCLUSÃO

Concluindo, tomados em conjunto, os nossos resultados suportam a proposta que o CRF faz parte do grupo de neurotransmissores envolvidos na mediação das reações de defesa frente a estímulos aversivos, através de sua ligação com o receptor CRF1, com ação predominante no hipocampo ventral de camundongos, comparado ao hipocampo dorsal. Além disso, indicam uma participação da via do AMPc/PKA na modulação dessas reações. Esses resultados abrem futuras perspectivas como a investigação da relação do CRF com a via da PKA, a via clássica, ou outra via como a da PKC, MEK/MAPK e GMPc/PKG nessa estrutura encefálica que, atualmente tem despertado interesse na pesquisa das vias neurais relacionadas na mediação das respostas relacionadas à ansiedade.

REFERÊNCIAS

ADAMEC, R.; BERTON, O.; RAZEC, W. A. Viral Vector Induction of CREB Expression in the Periaqueductal Gray Induces a Predator Stress-Like Pattern of Changes in pCREB Expression, Neuroplasticity, and Anxiety in Rodents. **Neural Plast**, v. 2009, 2009.

ALMEIDA-FILHO, N. et al. Brazilian multicentric study of psychiatric Morbidity: Methodological features and prevalence estimates. **Br J Psychiatry**, v. 171, p. 524-529, 1997.
<https://doi.org/10.1192/bjp.171.6.524>

ALONSO, J. et al. Prevalence of mental disorders in Europe: results from the European Study of the Epidemiology of Mental Disorders (ESEMeD) project. **Acta Psychiatr Scand**, v.109 (Suppl. 420), p. 21–27, 2004.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0047.2004.00325.x>

AMARAL, V. C. S.; GOMES, K. S.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Increased corticosterone levels in mice subjected to the rat exposure test. **Hormones and Behavior**, v. 57, p. 128-133, 2010.
<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2009.09.018>

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**. 5ed. Washington, DC, 2013.

ARTZ, E.; HOLSBOER, F. CRF signaling: molecular specificity for drug targeting in the CNS. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.27, n.10, p.531-538, 2006.
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2006.08.007>

ASSOCIAÇÃO MÉDICA BRASILEIRA. Transtorno do pânico: diagnóstico. **Projeto Diretrizes**. São Paulo. 2012.

BALE, T. L. et al. Mice deficient for corticotropin-releasing hormone receptor-2 display anxiety-like behaviour and are hypersensitive to stress. **Nature Genetics**, v. 24, n. 4, p. 410-414, 2000.
<https://doi.org/10.1038/74263>

BALE, T. L. et al. Mice Deficient for Both Corticotropin-Releasing Factor Receptor 1 (CRFR1) and CRFR2 Have an Impaired Stress Response and Display Sexually Dichotomous Anxiety-Like Behavior. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 1, p. 193-199, 2002.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-01-00193.2002>

BALE, T. L.; VALE, W. W. CRF and CRF receptors: Role in Stress Responsivity and Other Behaviors. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 44, p. 525-557, 2004.
<https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121410>

BARANOVA, K. A et al. The Adaptive Role of the CREB and NF- κ B Neuronal Transcription Factors in Post-Stress Psychopathology Models in Rats. **Neurochemical Journal**, v. 8, n. 1, p. 17-23, 2014.

BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **Neurociências: desvendando o Sistema Nervoso**. 3ed, Porto Alegre: Artmed, 2008.

BERTOGLIO, L. J.; JOCA, S. R. L.; GUIMARÃES, F. S. Further evidence that anxiety and memory are regionally dissociated within hippocampus. **Behavioural Brain Research**, v. 175, p. 183-188, 2006.

<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.08.021>

BLANCHARD, D. C. et al. Lesions of structures showing Fos expression to cat presentation: Effects on responsivity to a cat, cat odor, and nonpredator threat. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, p. 1243-1253, 2005.

<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.04.019>

BLANCHARD, D.C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R.J. Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. **Neurosci and Biobehav Rev**, v.25, n.3, p. 205-218, 2001.

[https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(01\)00009-4](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(01)00009-4)

BLANCHARD, D.C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R.J. The mouse defense test battery: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 463, p.97-116, 2003.

[https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)01276-7](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01276-7)

BLANCHARD, R. J.; FLANELLY, K. J.; BLANCHARD, D. C. Defensive behaviors of laboratory and wild *Rattus norvegicus*. **Journal of Comparative Psychology**, v.100, n. 2, p. 101-107, 1986.

<https://doi.org/10.1037/0735-7036.100.2.101>

BLANK, T et al. Corticotropin-Releasing Factor Receptors Couple to Multiple G-Proteins to Activate Diverse Intracellular Signaling Pathways in Mouse Hippocampus: Role in Neuronal Excitability and Associative Learning. **The Journal of Neuroscience**, v. 23, n.2, p. 700-707, 2003.

<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-02-00700.2003>

BORELLI, K. G. et al. Conditioned fear is modulated by CRF mechanisms in the periaqueductal gray columns. **Hormones and Behavior**, v. 63, p. 791-799, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2013.04.001>

BOURIN, M. et al. Animal models of anxiety in mice. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v.21, p.567–574, 2007.

<https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2007.00526.x>

CABRAL-DOS-SANTOS, P. G.; MIGUEL, T. T. **Verificação da participação do hipocampo ventral e dorsal nas respostas comportamentais exibidas no labirinto em cruz elevado (LCE)**. Uberlândia, 2018. 28p. Trabalho de Conclusão de Curso. Departamento de Farmacologia – Universidade Federal de Uberlândia, não publicado.

CAMPEAU, S. et al. Elicitation and reduction of fear: behavioural and neuroendocrine índices and brain induction of immediate-early gene c-Fos. **Neuroscience**, v. 78, n.4, p. 1087-1104, 1997.

[https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(96\)00632-X](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(96)00632-X)

CAMPOS, K.F.C.; AMARAL, V.C.; RICO, J.L.; MIGUEL, T.T.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Ethopharmacological evaluation of the rat exposure test: A prey–predator interaction test. **Behav Brain Res**, v. 240, p.160– 170, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.11.023>

CANTERAS, N. S. The medial hypothalamic defensive system: Hodological Organization and functional implications. **Pharmacology, biochemistry and behavior**, v. 71, p. 481-491, 2002.

[https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(01\)00685-2](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(01)00685-2)

CANTERAS, N. S. et al. Neuroanatomy of Anxiety in STEIN, M. B; STECKLER, T. **Behavioral Neurobiology of Anxiety and Its Treatment**. Springer, 2010, p. 79-93.

CANTERAS, N. S.; GRAEFF, F. G. Executive and modulatory neural circuits of defensive reactions: Implications for panic disorder. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 46, p. 352-364, 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.03.020>

CANTO-DE-SOUZA, L. et al. Dorsal hippocampal microinjection of chlorpheniramine reverses the anxiolytic-like effects of l-histidine and impairs emotional memory in mice. **Neuroscience Letters**, v. 587, p. 11-16, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.12.020>

CARVALHO, A. L.; COSTA, M. R.; FAGUNDES, H. Uso racional de psicofármacos. **Coordenação de Programas de Saúde Mental, CP 376395SM/SMS-RIO**, v. 1, abr-jun 2006.

CARVALHO-NETTO, E. F. et al. Effects of intra-PAG infusion of ovine CRF on defensive behaviors in Swiss-Webster mice. **Behavioural Brain Research**, v. 176, p. 222-229, 2007.

<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.10.003>

CHEN, Y. et al. Tuning synaptic transmission in the hippocampus by stress: the CRH system. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 5, 2012.

CORNÉLIO, A.M.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Anxiogenic-like effects of mCPP microinfusions into the amygdala (but not dorsal or ventral hippocampus) in mice exposed to elevated plus-maze. **Behavioral Brain Research**, 178, p. 82-89, 2007.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.12.003>

DA MATTA, R. A. Modelos animais na pesquisa biomédica. **Scientia Medica**, v. 20, n. 3, p. 210-211, 2010.

DEGROOT, A.; KASHLUBA, S.; TREIT, D. Septal GABAergic and hippocampal cholinergic systems modulate anxiety in the plus-maze and shock-probe tests. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 69, p. 391-399, 2001.
[https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(01\)00541-X](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(01)00541-X)

DE FRANCESCO, P. N. Et al. Neuroanatomical and functional characterization of CRF neurons of the amygdala using a novel transgenic mouse model. **Neuroscience**, v. 289, p. 153–165, 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.01.006>

FANSELOW, M. S.; DONG, H. W. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? **Neuron**, v. 65, n. 1, p. 7-19, 2010.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.11.031>

FERNANDEZ-DE-MOLINA, A.; HUNSPERGER, R. W. Central representation of affective reactions in forebrain and brainstem: electrical stimulation of amygdala, stria terminalis, and adjacent structures. **J. Physiol**, v. 145, p. 251-265, 1959.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1959.sp006140>

FERNANDEZ-DE-MOLINA, A.; HUNSPERGER, R. W. Organization of subcortical system governing defense and flight reactions in the cat. **J. Physiol**, v. 160, p. 200-213, 1962.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1962.sp006841>

GARNER, M. et al. Research in anxiety disorders: from the bench to the bedside. **European Neuropsychopharmacology**, v. 19, p. 381-390, 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2009.01.011>

GOLAN, D. E. et al. **Princípios de Farmacologia: a base fisiopatológica da farmacologia**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

GRAEFF, F. G; DEL-BEN, M. C. Neurobiology of panic disorder: From animal models to brain neuroimaging. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 32, p. 1326-1335, 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2008.05.017>

GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. S. **Fundamentos da Psicofarmacologia**. 2ed. São Paulo: Atheneu, 2012.

GRAEFF, F. G. Serotonin, the periaqueductal gray, and panic. **Neuroci. Biobehav. Rev.**, v. 239-259, 2004.

GRAEFF, F. G. Translational approach to the pathophysiology of panic disorder: Focus on serotonin and endogenous opioids. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 76, p. 48-55, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.10.013>

GRINDE, B. An approach to the prevention of anxiety-related disorders based on evolutionary medicine. **Preventive Medicine**, v. 40, p. 904–909, 2005.

<https://doi.org/10.1016/j.ypmed.2004.08.001>

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

GUYTON, A. C. **Neurociência Básica: Anatomia e Fisiologia**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

HARTER, M. C.; CONWAY, K. P.; MERIKANGAS, K. R. Associations between anxiety disorders and physical illness. **Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci**, v. 253, p. 313–320, 2003.

<https://doi.org/10.1007/s00406-003-0449-y>

HAUGER, R. L. et al. Role of CRF Receptor Signaling in Stress Vulnerability, Anxiety, and Depression. **Ann N Y Acad Sci**, 2011.

HENCKENS, M. J. A. G; DEUSSING, J. .M; CHEN, A. Region-specific roles of the corticotropin-releasing factor-urocortin system in stress. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 17, n. 10, p. 636-651, 2016.

<https://doi.org/10.1038/nrn.2016.94>

HIGGINS, E. S.; GEORGE, M. S. **Neurociências para Psiquiatria Clínica: A fisiopatologia do comportamento e da doença mental**. Porto Alegre: Artmed, 2010.

HILLHOUSE, E. W.; GRAMMATOPOULOS, D. K. The molecular mechanisms underlying the regulation of the biological activity of corticotrophin releasing hormone receptors: implications for physiology and pathophysiology. **Endocr. Rev.** v.27, n. 3, p.260–286, 2006.

<https://doi.org/10.1210/er.2005-0034>

JATOBÁ, J. D. V. N.; BASTOS, O. Depressão e ansiedade em adolescentes de escolas públicas e privadas. **J Bras Psiquiatr**, v. 56, n. 3, p. 171-179, 2007.

<https://doi.org/10.1590/S0047-20852007000300003>

JOACHIM, D. K. et al. Animal models of anxiety disorders. **Current Psychiatry Reports**, v. 5, p. 274-281, 2003.

<https://doi.org/10.1007/s11920-003-0056-7>

JOHNSON, P. L.; FEDERICI, L. M.; SHEKHAR, A. Etiology, triggers and neurochemical circuits associated with unexpected, expected, and laboratory-induced panic attacks. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.46, p. 429-454, 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.07.027>

KENDLER, K. S. et al (a). Generalized Anxiety Disorder in Women A Population-Based Twin Study. **Arch Gen Psychiatry**, v. 49, Abril 1992.

<https://doi.org/10.1001/archpsyc.1992.01820040019002>

KENDLER, K. S. et al (b). Major Depression and Generalized Anxiety Disorder: Same Genes, (Partly) Different Environments? **Arch Gen Psychiatry**, v. 49, p. 716-722, 1992.

<https://doi.org/10.1001/archpsyc.1992.01820090044008>

KESSLER, R. C. et al. Lifetime Prevalence and Age-of-Onset Distributions of DSM-IV Disorders in the National Comorbidity Survey Replication. **Arch Gen Psychiatry**, v. 62, p. 593-602, 2005.

<https://doi.org/10.1001/archpsyc.62.6.593>

KESSLER, R. C. et al. Twelve-month and lifetime prevalence and lifetime morbid risk of anxiety and mood disorders in the United States. **Int J Methods Psychiatr Res**, v.21, n. 3, p. 169-184, 2014.

<https://doi.org/10.1002/mpr.1359>

KOROTKOVA, T.M et al. Effects of arousal- and feeding-related neuropeptides on dopaminergic and GABAergic neurons in the ventral tegmental area of te rat. **Eur. J. Neurosci**. v. 23, n. 12, p.3407, 2006.

<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04977.x>

LANG, P. J.; DAVIS, M.; OHMAN, A. Fear and anxiety: animal models and human cognitive psychophysiology. **Journal of Affective Disorders**. v. 61, p.137–159, 2000.

[https://doi.org/10.1016/S0165-0327\(00\)00343-8](https://doi.org/10.1016/S0165-0327(00)00343-8)

LENT, R. **Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociências**. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

LENT, R. **Neurociência da Mente e do Comportamento**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

LISTER, R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, p. 180-185, 1987.
<https://doi.org/10.1007/BF00177912>

LOCHNER, A.; MOOLMAN, J.A. The many faces of H89: A review. **Cardiovascular Drug Reviews**, v. 24, n. 3-4, p. 261-274.
<https://doi.org/10.1111/j.1527-3466.2006.00261.x>

MACHADO, A. **Neuroanatomia Funcional**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

MACHADO, S. et al. Eletricidade para curar o cérebro. **Neurociência: mente e cérebro**, p. 61-65, março 2012.

MARTINEZ, R. C. et al. Amygdalar roles during exposure to a live predator and to a predator-associated context. **Neuroscience**, v. 172, p. 314–328, 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.10.033>

MCNAUGHTON, N. CORR, P.J. A two-dimensional Neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 28, p. 285-305, 2004.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.03.005>

MERCHENTHALER, I. Corticotropin Releasing factor (CRF)-Like Immunoreactivity in the Rat Central Nervous System. Extrahypothalamic Distribution. **Peptides**, v. 5, Suppl. 1, p. 53-69, 1984.
[https://doi.org/10.1016/0196-9781\(84\)90265-1](https://doi.org/10.1016/0196-9781(84)90265-1)

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. **Hormones and Behavior**, v. 1240, p. 39-46, 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.08.068>

MIGUEL, T. T.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Anxiogenic and antinociceptive effects induced by corticotropin-releasing factor (CRF) injections into the periaqueductal gray are modulated by CRF1 receptor in mice. **Hormones and Behavior**, v. 60, p.292-300, 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2011.06.004>

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, p. 247-256, 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2014.05.003>

MOON, C. M et al. Functional neuroanatomy associated with the interaction between emotion and cognition in explicit memory tasks in patients with generalized anxiety disorder. **Acta Radiol**, v. 1, p. 1-9, 2016.

MOON, C. M; JEONG, G. W. Functional neuroanatomy on the working memory under emotional distraction in patients with generalized anxiety disorder. **Psychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 69, p. 609-619, 2015.

<https://doi.org/10.1111/pcn.12295>

MOURA, P. R.; VIDAL, F. A. P. Transdução de sinais: uma revisão sobre proteína G. **Scientia Medica**, v. 21, n. 1, p. 31-36, Porto Alegre, 2011.

NUNES, E. A.; HALLAK, J. E. C. Modelos animais em psiquiatria: avanços e desafios. **Rev. Latinoam. Psicopat. Fund.**, v. 17, n. 3, p. 528-543, set. 2014.

<https://doi.org/10.1590/1415-4714.2014v17n3p528-10>

OHL, F.; ARNDT, S. S.; VAN DER STAAY, F. J. Pathological anxiety in animals. **The Veterinary Journal**, v. 175, p. 18-26, 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2006.12.013>

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

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v.14, p. 149-167, 1985.

[https://doi.org/10.1016/0165-0270\(85\)90031-7](https://doi.org/10.1016/0165-0270(85)90031-7)

PENTKOWSKI, N. S. et al. Effects of lesions to the dorsal and ventral hippocampus on defensive behaviors in rats. **European Journal of Neuroscience**, v. 23, p. 2185-2196, 2006.

<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04754.x>

PENTKOWSKI, N. S. et al. Effects of acidic-astressin and ovine-CRF microinfusions into the ventral hippocampus on defensive behaviors in rats. **Hormones and Behavior**, v. 56, p. 35-43, 2009.

<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2009.02.007>

PURVES, D. et al. **Neurociências**. 2ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

RACHMAN, S. Anxiety. **Psychology Press: Taylor e Francis Group**, 1994.

REFOJO, D. et al. Glutamatergic and dopaminergic neurons mediate anxiogenic and anxiolytic effects of CRHR1. **Science**, v. 333, p. 1903-1907, 2011.
<https://doi.org/10.1126/science.1202107>

REIMER, A. E.; OLIVEIRA, A. R.; BRANDÃO, M. L. Selective involvement of GABAergic mechanisms of the dorsal periaqueductal gray and inferior colliculus on the memory of the contextual fear as assessed by the fear potentiated startle test. **Brain Res Bull.**, v. 5, p. 545-50, 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2008.03.011>

REUL, J.M. H.M; HOLSBOER, F. Corticotropin-releasing factor receptors 1 and 2 in anxiety and depression. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 2, n.1, p. 23-33, Feb 2002.
[https://doi.org/10.1016/S1471-4892\(01\)00117-5](https://doi.org/10.1016/S1471-4892(01)00117-5)

ROSEBOOM, P.H. et al. Molecular regulation of the CRF system. **Handbook of Stress and the Brain**, v. 15, 2005.
[https://doi.org/10.1016/S0921-0709\(05\)80011-2](https://doi.org/10.1016/S0921-0709(05)80011-2)

ROY-BYRNE, P. P. et al. Anxiety disorders and comorbid medical illness. **General Hospital Psychiatry**, v. 30, p. 208–225, 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.genhosppsych.2007.12.006>

SAHUQUE, L. L. et al. Anxiogenic and aversive effects of corticotropin-releasing factor (CRF) in the bed nucleus of the stria terminalis in the rat: role of CRF receptor subtypes. **Psychopharmacology (Berl)** v. 86, n. 1, p.122-32, 2006.
<https://doi.org/10.1007/s00213-006-0362-y>

SALUM, G. A. et al. Pediatric anxiety disorders: from neuroscience to evidence-based clinical practice. **Rev Bras Psiquiatr.** v. 35, suppl 1, 2013.

SHUHAMA, R. et al. Behavioral and neuroimaging responses induced by mental imagery of threatening scenarios. **Behavioural Brain Research**, v. 313, p. 358-369, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.06.059>

SOBANSKI, T.; WAGNER, G. Functional neuroanatomy in panic disorder: Status quo of the research. **World Journal of Psychiatry**, v. 7, n. 1, p. 12-33, 2017.

<https://doi.org/10.5498/wjp.v7.i1.12>

SOKOLOWSKI, K.; CORBIN, J.G. Wired for behaviors: from development to function of innate limbic system circuitry. *Frontiers in molecular neuroscience*, v. 5, 2012.

STERN, C. M. et al. Corticotropin Releasing Factor-Induced CREB Activation in Striatal Neurons Occurs via a Novel Gbc Signaling Pathway. **PLoS ONE**, v. 6, n. 3, March 2011.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018114>

SWANSON, L. W. et al. Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroendocrinology*, v. 36, p. 165-186, 1983.
<https://doi.org/10.1159/000123454>

TAKAHASHI, L. K. et al. Antagonism of CRF 2 receptors produces anxiolytic behavior in animal models of anxiety. **Brain Research**, v. 902, p. 135-142, 2001.
[https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)02405-2](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)02405-2)

TOCRIS. **H 89 dihydrochloride – Biological Activity**. Disponível em: <https://www.tocris.com/products/h-89-dihydrochloride_2910#product-details>. Acesso em: 13 de agosto de 2018.

VALE, W. et al. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. **Science**, v. 213, p. 1394-1397, 1981.
<https://doi.org/10.1126/science.6267699>

VALENÇA, A. M. Transtorno de pânico: aspectos psicopatológicos e fenomenológicos. **Revista Debates em Psiquiatria**, v. 3, n. 4, p. 6-13, 2013.

VAN PETT, K. et al. Distribution of mRNAs Encoding CRF Receptors in Brain and Pituitary of Rat and Mouse. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 428, p. 191-212, 2000.
[https://doi.org/10.1002/1096-9861\(20001211\)428:2<191::AID-CNE1>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/1096-9861(20001211)428:2<191::AID-CNE1>3.0.CO;2-U)

WANG, H. et al. Blockade of CRF1 and CCK2 receptors attenuated the elevated anxiety-like behavior induced by immobilization stress. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.98, p.362–368, 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.pbb.2011.01.022>

WIEDEMANN, K. Anxiety and anxiety disorders. **International Encyclopedia of the Social & Behavioral Sciences**, v. 1, 2 ed, 2015.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-097086-8.27006-2>

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

<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.02.010>

ZORILLA, E. P.; KOOB, G. F. Progress in corticotropin-releasing factor-1 antagonist development. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 9/10, 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2010.02.011>

ANEXO I



Universidade Federal de Uberlândia
– Comissão de Ética na Utilização de Animais –



CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 100/14, sobre o projeto de pesquisa intitulado "Avaliação comportamental e farmacológica da mediação do CRF (fator de liberação de corticotropina) sobre as reações de defesa em camundongos: papel do óxido nítrico e da proteína quinase A (PKA) sobre os efeitos do CRF em áreas encefálicas relacionadas – Matéria Cinzenta Periaquedutal e Hipocampo", sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Tarciso Tadeu Miguel** está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal conforme regulamentações do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) – UFU em reunião de **09 de janeiro de 2015**.

(We certify that the protocol nº 100/14, about "Avaliação comportamental e farmacológica da mediação do CRF (fator de liberação de corticotropina) sobre as reações de defesa em camundongos: papel do óxido nítrico e da proteína quinase A (PKA) sobre os efeitos do CRF em áreas encefálicas relacionadas – Matéria Cinzenta Periaquedutal e Hipocampo" agrees with the ETHICAL PRINCIPLES ON ANIMAL RESEARCH as regulations of National Advice of Control and Animal Experimentation (CONCEA) and approved by Ethics Commission on Use of Animals (CEUA) – Federal University of Uberlândia in 09/01/2015).

Uberlândia, 21 de janeiro de 2015.

Prof. Dr. César Augusto Garcia
Coordenador da CEUA/UFU