

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

**Avaliação do efeito da exposição de camundongos ao Teste de
Exposição ao Rato sobre as respostas celulares e comportamentos
relacionados a dependência de etanol**

Gustavo Juliate Damaceno Fernandes

Uberlândia - MG

2019

GUSTAVO JULIATE DAMACENO FERNANDES

**Avaliação do efeito da exposição de camundongos ao Teste de
Exposição ao Rato sobre as respostas celulares e comportamentos
relacionados a dependência de etanol**

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Tarciso Tadeu Miguel

Uberlândia - MG

2019

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

F363a Fernandes, Gustavo Juliate Damaceno, 1994
2019 Avaliação do efeito da exposição de camundongos ao teste de
exposição ao rato sobre as respostas celulares e comportamentos
relacionados a dependência de etanol [recurso eletrônico] / Gustavo
Juliate Damaceno Fernandes. - 2019.

Orientador: Tarciso Tadeu Miguel.

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

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2021.5009>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Citologia. I. Miguel, Tarciso Tadeu, 1974, (Orient.). II.
Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. III. Título.

CDU:576.3

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural
 Aplicadas
 Rua Piauí, Bloco 2B, Sala 2B218 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: 34 3225-8484 - ppgbc@icbim.ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Biologia Celular e Estrutural Aplicadas				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico VIRTUAL, número 008/2019, do PPGBC				
Data:	13/12/2019	Hora de início:	09:10	Hora de encerramento:	13:00
Matrícula do Discente:	11722BCE002				
Nome do Discente:	Gustavo Juliate Damaceno Fernandes				
Título do Trabalho:	Avaliação do Teste de Exposição ao Rato em respostas celulares e em diferentes comportamentos relacionados a dependência de etanol				
Área de concentração:	Biologia Celular				
Linha de pesquisa:	Mecanismos de Reparo e Plasticidade Tecidual				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Sistema hierárquico de defesa no camundongo: modulação pelo fator de liberação de corticotropina (CRF)				

Reuniu-se no Laboratório de Práticas Virtuais, Bloco 2A, Campus Umuarama, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, assim composta: Professores Doutores: **Rodrigo Molini Leão** - UFU; **Azair Liane Matos do canto de Souza** - UFSCar e **Tarciso Tadeu Miguel** orientador(a) do(a) candidato(a). **Ressalte-se que a Profa. Dra. Azair Liane Matos do canto de Souza participou da Banca de Defesa remotamente, compondo-a de forma virtual.**

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a). **Tarciso Tadeu Miguel**, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

[A]provado(a).

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Tarciso Tadeu Miguel, Professor(a) do Magistério Superior**, em 13/12/2019, às 13:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Molini Leão, Professor(a) do Magistério Superior**, em 13/12/2019, às 13:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **AZAIR LIANE MATOS DO CANTO DE SOUZA, Usuário Externo**, em 13/12/2019, às 18:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1670223** e o código CRC **DA12594B**.

Referência: Processo nº 23117.096431/2019-70

SEI nº 1670223

Criado por [regiembinsky](#), versão 8 por [Tarciso.miguel](#) em 13/12/2019 13:04:09.

AGRADECIMENTOS

A meu orientador, Prof. Tarciso Tadeu Miguel pelos anos de convivência e por todo ensinamento.

Ao Prof. Fabio Cardoso Cruz por me acolher em seu laboratório e sempre ser muito prestativo a me ajudar com os experimentos.

A meus pais Anair Aparecida Damacena Fernandes e Orozimbo Gomes Fernandes por me apoiar na decisão de continuar na carreira acadêmica.

A todos meus amigos, por aguentar minhas chatices, só tenho uma coisa a dizer: Obrigado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais pelo apoio financeiro para realizar o projeto.

A todos sujeitos que participaram dos experimentos.

Resumo

Os transtornos relacionados ao estresse e ansiedade envolvem diferentes comportamentos defensivos expressos frente a estímulos aversivos proximais ou potenciais e que possam ameaçar a vida. Esses transtornos são fatores de risco para o início e a manutenção do uso de substâncias psicoativas, como o etanol. O sistema límbico é responsável por coordenar as repostas frente a essas emoções. Entre as regiões do sistema límbico, pode-se citar como muito importante a amígdala estendida, que compreende os núcleos da amígdala e o Núcleo Intersticial da Estria Terminal, entre outras regiões. Dentre os neurotransmissores envolvidos está o neuropeptídeo Fator Liberador de Corticotrofina (CRF) e o sistema canabinoide. Partindo dessas informações, este trabalho teve como objetivo analisar o efeito do estresse de exposição controlada a um predador em relação às repostas celulares e comportamentais relacionadas a ansiedade e a dependência ao etanol. Os modelos utilizados para avaliar diferentes aspectos da ansiedade foram o Campo Aberto (CA) e o Labirinto em Cruz Elevado (LCE) e da dependência foram a Preferência Condicionada por Lugar (PCL), que avalia a relação entre o ambiente onde a droga foi administrada e o efeito reforçador que ele exerce; e a Autoadministração operante de etanol, onde foi avaliado o comportamento de busca pela droga. Foi analisada a resposta celular através da expressão de um marcador de atividade neuronal, a proteína Fos, e mudanças na expressão de RNAm dos receptores canabinoide CB1 e crfêrgico CRFr1. Os resultados desse trabalho apontam o envolvimento do núcleo central da amígdala através do aumento de sua ativação após o estresse, assim como uma diminuição da expressão de receptores CRF1 e o aumento da expressão do CB1 na região da amígdala central. Nos testes comportamentais, os animais estressados exibiam comportamentos do tipo ansiolíticos no CA evidenciados pelo aumento do tempo de permanência no centro do aparato e do tipo ansiogênico no LCE, evidenciado pelo aumento na realização de avaliação de risco. Além disso, os animais estressados, se mostraram mais responsivos na autoadministração de etanol, onde houve maior busca pela droga. Na PCL, os animais apesar de desenvolverem a preferência por lugar, tal efeito não foi intensificado pelo estresse, pois todos os grupos, inclusive os não estressados, desenvolveram tal preferência.

Palavras-chave: Etanol. Estresse. Dependência

Abstract

The mental disorders involving stress and anxiety evokes different defensive behaviors against proximal or potential aversive stimuli to life. These disorders are risk factors to beginning and maintenance of abuse of drugs such as ethanol. Limbic system is responsible for coordinating these emotional responses. One of the main limbic system region is the extended amygdala, which contain central nucleus of amygdala and the bed nucleus of stria terminalis. Between the neurotransmitters involved, there are the neuropeptide Corticotrophin releasing factor (CRF) and cannabinoid system. Based on this information, this study aimed to analyze the effect of controlled exposure stress to a predator in relation to cellular and behavioral responses related to anxiety and ethanol seeking behaviors. The different models used to analyze anxiety was the Open Field Test (OFT) and the Elevated Plus Maze (EPM). On drug seeking behaviors, we used the Conditioned Place Preference (CPP), which evaluate the relationship between the place where the drug was administrated and its reinforcement; and the Operant Ethanol self-administration protocol, which evaluate the motivation to ethanol intake. The cellular response was measured by Fos protein a neuronal activation marker, and relative expression of CB1 and CRF1 receptors were measured by its mRNA in the amygdala. The results suggest that Central Amygdala neurons are more active after the stress exposition, as well as there are lower levels of CRF1 receptors expression and an increase in the CB1 receptors in the amygdala. In the behavioral tests, stressed animals exhibit anxiolytic effect on the CA, shown by higher time spent on the center of the apparatus and anxiogenic effect on EPM, shown by higher risk assessment behavior. Moreover, the same group showed up to be more responsive to the self-administration protocol, as the animals were more motivated to self-administrate ethanol. In the CPP experiment, although the animals developed the place preference, this effect was not intensified by stress, because all groups, even the non-stressed, developed the preference.

Keywords: Ethanol. Stress. Addiction

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Aparato do Teste de Exposição ao Rato (TER).....	27
Figura 2: Aparato do Campo Aberto (CA).....	30
Figura 3: Aparato do Labirinto em Cruz Elevado (LCE).....	31
Figura 4: Aparato de Preferência Condicionada por Lugar.....	33
Figura 5: Aparato de Autoadministração operante.. ..	37
Figura 6: Delineamento experimental para Imunohistoquímica.....	40
Figura 7: Delineamento experimental para avaliação de comportamentos relacionados à ansiedade.	41
Figura 8: Delineamento experimental para o protocolo de Preferência Condicionada por Lugar.....	42
Figura 9: Delineamento experimental para o protocolo de Autoadministração.....	43
Figura 10: Delineamento experimental para o protocolo de RT-PCR em tempo real (RT-qPCR).....	43
Figura 11: Número de células Fos-positivas por mm ² expressos por camundongos Suíços após a exposição única ou repetida a um rato ou um brinquedo. Barras representam média (± EPM). ANOVA monofatorial com post hoc de Duncan. * p<0,05 em relação ao grupo controle repetido.	45
Figura 12: Número de células Fos-positivas por mm ² expressos por camundongos C57BL/6 após a exposição única ou repetida a um rato ou um brinquedo. Barras representam média (± EPM). ANOVA monofatorial com post hoc de Duncan. *p<0,05 em relação aos grupos controle e brinquedo repetido.	46
Figura 13: Comportamentos Espaço-Temporais e complementares dos camundongos no CA. A: Tempo gasto no Centro do aparato; B: O número total de cruzamentos dos quadrantes e; C: a distância total percorrida. N = 8-9 animais por grupo. Barras representam média (± EPM). *p<0,05 comparado ao grupo controle. ANOVA monofatorial com post hoc de Duncan.....	47
Figura 14: Comportamentos Espaço-Temporais dos camundongos no LCE. % de Entradas nos Braços abertos, % Entrada nos Braços Abertos e Número de Entrada nos Braços Fechados. N = 8-9 animais por grupo. Barras representam média (± EPM). ANOVA monofatorial.....	48

Figura 15: Comportamentos complementares exibidos por camundongos no LCE após a exposição ao protocolo de TER. **A, B:** Número de mergulhos protegidos e desprotegidos, respectivamente. **C, D:** Número de esticadas protegidas e desprotegidas, respectivamente. **E:** Número de entradas no final do braço aberto. N = 8-9 animais por grupo. Barras representam média (\pm EPM). * $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo controle. ANOVA monofatorial com post hoc de Duncan. 49

Figura 16: Comparação do tempo gasto no compartimento pareado versus o tempo gasto no compartimento de preferência natural. Barras representam média (\pm EPM). * $p < 0,05$ comparado ao respectivo pré-teste. Teste T de Student e ANOVA monofatorial. 50

Figura 17: Número de reforços recebidos pelos animais durante a fase de aquisição do comportamento de autoadministrar etanol. Diferentes fases do aprendizado, Razão Fixa 1 (RF1), Razão Fixa 3 (RF3) e Razão Fixa 5 (RF5). Os dados representam a média e o erro de cada grupo, em cada um dos dias do treinamento. ANOVA monofatorial..... 51

Figura 18: Comportamentos exibidos pelos camundongos durante a semana de razão progressiva do protocolo de autoadministração. **A:** Representação da última razão alcançada durante a razão progressiva 3; **B:** Número de vezes que os animais acionaram o Nose Poke ativo, e; **C:** Número de reforços obtidos durante a semana. Barras representam média (\pm EPM). * $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo controle. ANOVA monofatorial com post hoc de Duncan..... 52

Figura 19: Número de reforços obtidos durante a sessão de binge de 4h de duração. Barras representam média (\pm EPM). * $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo controle. ANOVA monofatorial com post hoc de Duncan. 53

Figura 20: Expressão relativa dos genes analisados pela rt-PCR, os resultados estão expressos em quantas vezes os grupos tratados foram diferentes do grupo controle. **A:** Gene CB1; **B:** Gene CRFR1. Barras representam média (\pm EPM). * $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo controle. ANOVA monofatorial com post hoc de Duncan. 54

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- 1 °C – Graus Celsius
- 2 µm – Micrômetro
- 3 2AG – 2-araquidonoilglicerol
- 4 AA – Autoadministração Operante de Etanol
- 5 ACTH – Hormônio Adrenocorticotrófico
- 6 AMPA – Alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
- 7 AMPc – AMP cíclico
- 8 ANOVA – Análise de Variância
- 9 BLA – Amígdala Basolateral
- 10 BNST – Núcleo Intersticial da Estria Terminal
- 11 BP – *Breaking Point*; Ponto de ruptura
- 12 CP-55,940 - (-)-cis-3-[2-Hydroxy-4-(1,1-dimethylheptyl) phenyl]-trans-4-(3-hydroxypropyl) cyclohexanol
- 13 CA – Teste de Campo Aberto
- 14 CB – Canabinoide
- 15 cDNA – Ácido Desoxirribonucleico Complementar
- 16 CeA – Amígdala Central
- 17 CEUA – Comitê de Ética para Uso de Animais
- 18 cm – Centímetros
- 19 CREB – proteína de ligação do elemento de resposta ao AMPc
- 20 CRF – Fator Liberador de Corticotrofina
- 21 CRFR – Receptor do Fator Liberador de Corticotrofina
- 22 CT – Threshold Cycle
- 23 DAB – 3,3'-diaminobenzidina
- 24 dB - Decibéis
- 25 DiD – “Drink in the Dark”; beber no escuro
- 26 DSM V – Diagnostic and statistical manual of mental disorders V; Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais V
- 27 EBA – Entradas no Braço Aberto
- 28 EBF – Entradas no Braço Fechado
- 29 ECB – Sistema Endocanabinoide

- 30 ED – Esticada Desprotegida
- 31 EFBA –Entrada no Final do Braço Aberto
- 32 EP – Esticada Protegida
- 33 EPM – Erro Padrão da Média
- 34 g – Gramas
- 35 GABA – Ácido Gama-aminobutírico
- 36 h – Hora
- 37 HHA – Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
- 38 Hz – Hertz
- 39 i.p. – Intraperitoneal
- 40 INPAD – Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas do
Álcool e Outras Drogas
- 41 kg – Quilogramas
- 42 LaNCOM – Laboratório de Neurociências e Comportamento
- 43 LCE – Labirinto em Cruz Elevado
- 44 LENAD II – Segundo Levantamento Nacional de Álcool e Drogas
- 45 M – Molar
- 46 MD – Mergulho Desprotegido
- 47 mg – Miligramas
- 48 mL – Mililitros
- 49 mm – Milímetros
- 50 MP – Mergulho Protegido
- 51 MAPK – Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
- 52 mRNA – RNA Mensageiro
- 53 n – Número de Indivíduos que Compõem a Amostra
- 54 NMDA – N-metil D-Aspartato
- 55 p - Probabilidade de Significância
- 56 PAG – Matéria Cinzenta Periaquedutal
- 57 PBS – Tampão Fosfato de Sódio
- 58 PCL – Preferência Condicionada por Lugar
- 59 *Pde10a* – Gene da Fosfodiesterase 10A
- 60 PFA – Paraformaldeído
- 61 PKA – Proteína Quinase A

- 62 PKC – Proteína Quinase C
- 63 PGi – Proteína G inibitória
- 64 qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase Semiquantitativa
- 65 REBIR – UFU – Rede de Biotérios da UFU
- 66 RF – Razão Fixa
- 67 mGluR1 - Receptor metabotrópico de glutamato tipo 1
- 68 mGluR8 - Receptor metabotrópico de glutamato tipo 8
- 69 RNA – Ácido Ribonucleico
- 70 RT – Transcrição Reversa
- 71 s – Segundos
- 72 SNC – Sistema Nervoso Central
- 73 TAG – Transtornos de Ansiedade Generalizada
- 74 TBA – Tempo no Braço aberto (TBA)
- 75 TER – Teste de Exposição ao Rato
- 76 UFU – Universidade Federal de Uberlândia
- 77 UNESP – Universidade Estadual Paulista
- 78 UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo
- 79 W – Watts

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Estresse, ansiedade e dependência	14
1.2	Respostas Defensivas ao Estresse	18
1.3	Modelos Etológicos.....	22
2	OBJETIVOS	24
2.1	Objetivo geral.....	24
2.2	Objetivos específicos.....	24
3	MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1	Animais.....	25
3.2	Substâncias	25
3.3	Teste de Exposição ao Rato (TER)	26
3.3.1	Habituação	27
3.3.2	Teste de exposição	27
3.4	Imunohistoquímica para marcação de Fos	28
3.5	Teste de Campo Aberto (CA)	29
3.5.1	Análise Comportamental do CA	30
3.6	Labirinto em Cruz Elevado (LCE).....	30
3.6.1	Análise Comportamental do LCE	31
3.7	Preferência Condicionada por Lugar (PCL).....	32
3.7.1	Habituação	33
3.7.2	Pré-Teste	33
3.7.3	Pareamento.....	34
3.7.4	Teste.....	34
3.8	Autoadministração Operante de Etanol (AA).....	35
3.8.1	Análise Comportamental da AA	37

3.9	Extração de RNA, Síntese do cDNA e RT-PCR em tempo real (RT-qPCR).....	37
3.9.1	Extração de RNA total e Síntese de cDNA.....	38
3.9.2	Análise por RT-qPCR.....	38
3.10	Delineamento experimental	39
3.10.1	Experimento I – Análise da ativação da Amígdala Central após exposição ao TER: Comparação entre a expressão de Fos em camundongos Suíços e camundongos C57BL/6	39
3.10.2	Experimento II – Avaliação de comportamentos relacionados a ansiedade após exposição ao TER através do Campo Aberto e do Labirinto em Cruz Elevado.....	40
3.10.3	Experimento III - Preferência Condicionada por Lugar (PCL) induzida por etanol em camundongos submetidos ao TER.....	41
3.10.4	Experimento IV – Autoadministração Operante de etanol em camundongos submetidos ao TER.....	42
3.10.5	Experimento V – Análise das mudanças na expressão gênica de CB1 e CRF1 na amígdala por RT-PCR em tempo real (RT-qPCR).....	43
3.11	Análises Estatísticas.....	43
3.12	ÉTICA.....	44
4	RESULTADOS.....	45
4.1	Análise da ativação da Amígdala Central após a exposição ao TER: Comparação entre a expressão de Fos em camundongos Suíços e camundongos C57BL/6.....	45
4.2	Avaliação de comportamentos relacionados a ansiedade após a exposição ao TER através do Campo Aberto e do Labirinto em Cruz Elevado	47
4.2.1	Comportamentos exibidos durante a exposição do Campo Aberto	47
4.2.2	Comportamentos exibidos durante o LCE.....	48
4.3	Preferência Condicionada por Lugar (PCL) induzida por etanol em animais submetidos ao TER	49

4.4	Autoadministração Operante de etanol em camundongos submetidos ao TER.....	50
4.5	Análise das mudanças na expressão gênica de CB1 e CRFR1 na amígdala por RT-PCR tempo real (RT-qPCR).....	53
5	DISCUSSÃO	55
6	CONCLUSÃO	63
	REFERÊNCIAS	64
	ANEXO A – Certificado de aprovação do comitê de ética.	75

1 INTRODUÇÃO

1.1 Estresse, ansiedade e dependência

Estresse, resumidamente, pode ser definido como a percepção de uma situação imposta, ou percebida, pelo ambiente que altera a homeostase do organismo (GOLBIDI et al., 2015; MORENA et al., 2016). Essa alteração leva a uma série de mudanças autonômicas, neuroendócrinas e comportamentais que, inicialmente são direcionadas para reestabelecer o equilíbrio ou preparar para uma resposta (MORENA et al., 2016).

Dentre as mudanças autonômicas que ocorrem podemos incluir a liberação de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) tanto no sistema nervoso central (SNC), quanto na periferia (MICALE; DRAGO, 2018), acarretando alteração na função de diversos órgãos, como o aumento da frequência cardíaca; dilatação da pupila; vasodilatação no tecido muscular estriado esquelético, em detrimento a vasoconstrição de outros vasos, assim aumentando a atividade respiratória e capacidade dos músculos e diminuindo a atividade do sistema gástrico; aumento da liberação de renina; dentre outras (BACHION, 1998) que preparam o corpo para uma situação de luta e/ou fuga.

Dentre os diferentes ajustes neuroendócrinos a um agente estressor, está também a liberação do Fator Liberador de Corticotrofina (CRF, do inglês *Corticotrophin Releasing Factor*) pelo Hipotálamo que estimula a produção e liberação do Hormônio Adrenocorticotrófico (ACTH, do inglês *Adrenocorticotropic hormone*) pela glândula Hipófise anterior, que, por sua vez, estimulará a produção e liberação de glicocorticoides (cortisol em humanos, e corticosterona em roedores) pelo córtex da glândula adrenal no sangue (JOSEPH; WHIRLEDGE, 2017; BALE; VALE, 2004; BLANK et al., 2003). Este hormônio influenciará na função de diferentes órgãos, de maneira que pode colaborar e potencializar as mudanças autonômicas induzidas pela situação estressora (BACHION, 1998). Essa cascata de eventos é chamada de eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA), comumente ativo em pacientes de transtorno de ansiedade.

A ansiedade pode ser entendida como uma condição de expectativa de acontecimentos futuros que podem afetar o organismo de maneira fisiológica, quando em baixos níveis, ou

pode se caracterizar patológica, quando em níveis exacerbados, gerando alta expressão de tensão e apreensão, e, desencadeando sintomas físicos, como taquicardia, sudorese, náuseas e problemas gástricos, alteração na pressão arterial e frequência de batimentos cardíacos, falta de ar; e mentais, como, pensamento acelerado, falta de concentração, hipervigilância, preocupação excessiva, medo, sensação de tragédia eminente, dentre outros (BACHION et al., 1998; GENTIL; NETO, 1996; LENT, 2001).

Quando a ansiedade tem caráter motivador e impulsiona a realização das tarefas diárias, ela pode ser considerada fisiológica e normal. Porém, quando não se tem um motivo aparente para estar ansioso ou existe um motivo, mas a intensidade da resposta não é proporcional para tal motivo, o quadro patológico da ansiedade se torna presente (CASTILLO et al., 2000).

A falta de identificação e tratamento do transtorno acarreta em prejuízos nas várias etapas da vida, podendo causar sofrimento mental e somático, isolamento social, depressão, hipertensão arterial, interrupções nas atividades acadêmicas e laborais, indução ao uso abusivo de álcool (conhecido por efeitos ansiolíticos) e entorpecentes, tentativa de suicídio, aumento da violência, baixo rendimento ocupacional e acadêmico dentre outros problemas (GONÇALVES; KAPCZINSKI, 2008).

O estresse e a ansiedade são fatores importantes para desencadear o início e também na manutenção do uso abusivo de álcool (CRUZ et al., 2008); outra situação muito problemática e atualmente caracterizada como doença que possui por denominação “Transtornos mentais e comportamentais devido ao uso de álcool (CID 10 F10)”, e que cada vez mais afeta a sociedade contemporânea mundial. O etanol acaba por ter uma relação com a ansiedade desde a antiguidade, uma vez que a ele sempre foram associados efeitos ansiolíticos. Muitos estudos têm mostrado correlação entre a vivência de situações estressantes e o aumento de consumo de etanol, tanto em humanos quanto em modelos etológicos (BAHI, 2013; CRUZ et al., 2008; MANJOCH et al., 2016; BECKER; LOPEZ; DOREMUS-FITZWATER, 2011).

Machado e colaboradores (2012) realizaram uma pesquisa no Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da USP (IP-HC/USP) na qual foi demonstrada que o índice de pessoas que possuem ansiedade patológica chega a 12% da população brasileira, ou seja, aproximadamente 24 milhões de pessoas. A ocorrência desse transtorno psicológico é

levemente maior em mulheres do que em homens, sendo que aproximadamente 55% a 60% das pessoas que sofrem esses transtornos são do sexo feminino (DSM V) (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION [APA], 2013).

Em 2002, Andrade e colaboradores (2002) analisaram 1.464 homens e mulheres na cidade de São Paulo e observaram que, ao passo que as mulheres têm maior prevalência de ansiedade e depressão, os homens têm maior prevalência de uso abusivo e dependência de drogas, incluindo etanol e tabaco. O estudo ainda mostra que 46,3% de mulheres e 45,3% dos homens apresentaram qualquer tipo de transtorno psiquiátrico.

Estudos realizados na América do Norte apontaram baixo índice de prevalência de transtornos de ansiedade generalizada (TAG) em crianças e adolescentes, variando entre 2 e 4% (VIANNA; CAMPOS; LANDEIRA-FERNANDEZ, 2009). Já no Brasil um estudo realizado em escolas na cidade de Taubaté-SP, onde 1.251 crianças entre 7 e 14 anos foram avaliadas, houve 12,7% de prevalência para qualquer tipo de transtorno psiquiátrico, já a prevalência de qualquer tipo de ansiedade foi de 5,2% (FLEITLICH-BILYK; GOODMAN, 2004).

Estima-se que 40% da população mundial, acima da idade de 15 anos, faça uso de bebidas alcoólicas todo ano, essa porcentagem corresponde a 2 bilhões de pessoas, das quais morrem cerca de 2 a 2,5 milhões devido ao uso dessa droga a cada ano (ANDRADE; ANTHONY; SILVEIRA, 2009). O Segundo Levantamento Nacional de Álcool e Drogas (LENAD II), realizado em 2012 pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas do Álcool e Outras Drogas (INPAD) (LARANJEIRA et al., 2014), mostrou que em 3,25% da população masculina e 0,62% da feminina fazia uso abusivo de no último ano, e 10,48% dos homens e 3,63% das mulheres eram dependentes nesse mesmo período. Este mesmo estudo mostrou que 59% da população brasileira que consumiu álcool no período de um ano, teve pelo menos um episódio onde ingeriu mais que o limite aceitável (5 doses para homens, e 4 doses para mulheres) no período de duas horas, caracterizando um episódio de risco para a saúde.

O álcool é encontrado em diversos drinques e cervejas, na forma de etanol, sendo uma molécula de baixo peso molecular, com cargas hidrofílicas e hidrofóbicas possuindo capacidade de se difundir por todo o organismo, incluindo a passagem pela barreira

hematoencefálica. Essa substância no cérebro pode causar diversas mudanças comportamentais, visto que este é um conhecido depressor do SNC (COSTARDI et al, 2014).

Esta droga é usada desde as primeiras civilizações, onde fazia parte de diferentes situações, como rituais, festas, como forma de fugir da realidade, dentre outras (NUNES; JÓLLUSKIN, 2007). Hoje no Brasil o etanol não é reconhecido como uma droga de abuso, e tem seu uso liberado para toda a população acima de 18 anos.

Entre os vários efeitos que o álcool pode causar no Sistema Nervoso Central (SNC) um dos mais recorrentes equivale às alterações causadas nos lobos frontais, mais especificadamente no córtex pré-frontal, onde as funções alteradas levam a diminuição da glicose e fluxo sanguíneo (BENTO, 2015).

Os efeitos comportamentais ocorrem, geralmente, a partir da desinibição comportamental, que ocorre devido a inibição do sistema de inibição comportamental, visto que, ao inibir o sistema inibidor, ocorre maior expressão de comportamentos. Dessa forma, as pessoas começam a ter maior capacidade de interação social, maior facilidade de comunicação, dentre outros efeitos (VOGEL-SPROTT et al., 2001; RANG et al., 2015).

O etanol estimula a transmissão GABAérgica e da glicina, através da ativação dos receptores GABA_A, de GABA (ácido gama-aminobutírico); e inibe a transmissão glutamatérgica, através de seus receptores ionotrópicos, como o e NMDA, AMPA e cainato de glutamato; e metabotrópicos, mGluR1, mGluR8 de glutamato (VENGELIENE et al., 2008; COSTARDI et al., 2015).

Assim como todas as drogas de abuso, o álcool também tem a capacidade de desenvolver dependência em seus usuários, que pode ser caracterizada pela mudança de um padrão de uso ocasional, para o uso abusivo, sendo que os indivíduos mantem o uso da droga mesmo com todas as consequências negativas. Essa doença tem caráter multifatorial, e envolve o próprio indivíduo, todo o contexto no qual se usa a droga, e também a própria droga. A dependência pode ser caracterizada pela compulsão pela busca e uso da droga; pela perda de controle da quantidade ingerida; e ainda pelo surgimento de sintomas negativos quando na abstinência do uso da droga (chamado de crise de abstinência).

Essa doença se estabelece pela capacidade das drogas de alterar a neurocircuitaria do prazer, onde principalmente, ocorre alta liberação de dopamina no núcleo accumbens durante o uso, caracterizando os efeitos reforçadores positivos para a manutenção do uso da droga.

Os pesquisadores Wise e Bozarth (1987) propuseram que ao produzir um efeito prazeroso, as drogas conseguiram agir como reforço positivo para a manutenção do seu uso, pois as pessoas buscariam a droga para sentir o prazer proporcionado. Assim, teoria do reforço positivo, foi postulada e descreve os motivos pelos quais as pessoas iniciam e mantem o uso de drogas; o efeito prazeroso relacionado ao uso. Porém, essa teoria não explica o motivo da manutenção da dependência após o reconhecimento dos efeitos negativos relacionado ao uso da droga.

Em 1990, o pesquisador Jaffe, descreveu a teoria do reforço negativo, onde ele postulou que na abstinência do uso da droga, o efeito negativo causado por essa privação gera nos usuários um grande mal-estar, que é cessado apenas pelo uso da substancia. A partir desse ponto, a droga é usada não pelo efeito prazeroso, e sim para evitar os efeitos negativos relacionados à abstinência.

O uso das drogas é perigoso pois elas têm alta capacidade de causar plasticidades neurais ao longo do tempo, após repetidos usos. Essas alterações, podem levar à tolerância ou sensibilização, pois, ao ativar seus receptores por diversas vezes, o organismo pode aumentar a expressão daqueles receptores (sensibilização), ou diminuir a expressão desses receptores (tolerância). A curva dose-resposta para cada efeito da droga é diferente, e pode sofrer diferentes alterações, por exemplo, um organismo após diversos usos de uma mesma droga, pode se tornar tolerante ao efeito hedônico, precisando de maiores doses da droga para sentir tal efeito, enquanto que a curva dose-resposta da toxicidade da droga esteja inalterada ou sensibilizada, ou seja, menores doses são tóxicas (BERKE; HYMAN, 2000) Nesse exemplo, o indivíduo poderia ter uma dose letal antes que percebesse os efeitos prazerosos da droga.

1.2 Respostas Defensivas ao Estresse

Ao longo da evolução, os animais desenvolveram mecanismos de sobrevivência para melhor responder a situações de estresse e ameaça à vida. Esses mecanismos são chamados de respostas defensivas e podem ser entendidos como comportamentos característicos expressos frente a uma situação de perigo real ou potencial. As respostas defensivas dependem da distância, e da natureza da ameaça, e para cada emoção, o organismo possui um conjunto de adaptações, que são realizadas para melhor lidar com as diferentes situações (MCNAUGHTON; CORR, 2004; HILL et al., 2006). As emoções no geral, contém três aspectos, sendo, um sentimento, uma ação e o devido ajuste fisiológico (LENT, 2001). O sentimento pode adquirir caráter positivo ou negativo, dependendo da sua natureza, e a ação apresentada é expressa por manifestações motoras simples e estereotipadas (movimentos involuntários) ou com movimentos complexos e elaborados e os ajustes fisiológicos podem ser apresentados pelos sistemas cardiovascular, respiratório, digestório, urinário, endócrino e imune, e dessa maneira, envolve todo o organismo (LENT, 2001).

As regiões encefálicas envolvidas nas respostas defensivas estão agrupadas em um conjunto chamado sistema límbico, que reúne regiões corticais e subcorticais situadas nos setores mais mediais do encéfalo (LENT, 2001; MIGUEL; NUNES-DE-SOUZA, 2011; MIGUEL; GOMES; NUNES-DE-SOUZA, 2014). As principais estruturas encefálicas que compõem o sistema límbico são a Área Tegmental Ventral, Núcleo Acumbens, Tubérculo Olfativo, a Amígdala e seu complexo do qual faz parte o Núcleo Intersticial da Estria Terminal (BNST, do inglês *bed nucleus of the stria terminalis*), o Córtex Frontal e Límbico, a Matéria Cinzenta Periaquedutal (PAG, do inglês *periaqueductal gray*), o Hipotálamo, entre outras estruturas (PLANETA et al., 2007; WISE; BOZARTH, 1987).

No Lobo Temporal existe uma região que se comporta como “botão de disparo” emocional, a amígdala (envolvendo o complexo amígdala estendida). A amígdala se comporta de tal maneira que as áreas associativas visuais e auditivas dos lobos occipital e temporal, áreas associativas multissensoriais do lobo parietal possam enviar informações sensoriais. O complexo também recebe projeções do tálamo auditivo e visual. E através dessas aferências, os diferentes núcleos da amígdala, como central (CeA), e basolateral (BLA) conseguem receber os impulsos gerados pelos estímulos causadores do medo. Após decidir a natureza da emoção (positiva ou negativa) a amígdala (núcleo basolateral) pode enviar projeções para núcleo acumbens gerados por situações positivas ou pode também enviar sinais para o núcleo central (da amígdala) e outros sítios como hipotálamo e PAG, quando tratar de estímulos

aversivos. Dessa forma temos a realização dos ajustes fisiológicos e comportamentais adequados a cada emoção (LENT, 2001). A amígdala central está intimamente ligada às respostas de medo, como mostrado na revisão de DAVIS & SHI, 1999, onde eles citam trabalhos que evidenciam a relação entre a CeA e respostas defensivas frente a estímulos aversivos de curta duração.

Além da sua função no eixo HHA, já foi observado que o CRF também pode agir como neurotransmissor e é sintetizado nos próprios neurônios CRFérgicos, agindo em dois receptores, o CRF1 e CRF2, os quais possuem funções diferentes e estão situados em diversas regiões no Sistema Nervoso Central (MIGUEL; NUNES-DE-SOUZA, 2011; REUL; HOLSBOER, 2002). Os receptores de CRF estão ligados à proteína G e mostraram agir ativando a via do AMP cíclico (AMPC)/Proteína Quinase A (PKA) (MIGUEL; NUNES-DE-SOUZA, 2011). Quando o CRF1 está ausente em animais geneticamente modificados, os animais são menos ansiosos e, antagonistas específicos para o CRF1 causam efeitos ansiolíticos, inibindo a ação ansiogênica do CRF, de forma que, a hiperativação desse mesmo receptor está relacionada à resposta frente um grande estresse (NIE et al., 2004). Estudos mostram que o CRF pode ativar além da via da PKA, diferentes vias de sinalização a partir desse mesmo receptor CRF1 em diferentes partes do encéfalo, como amígdala, hipocampo, matéria cinzenta periaquedutal (ARZT; HOLSBOER, 2006).

A via de sinalização da PKA, quando ativada produz, após passos sequenciais, a fosforilação da proteína de ligação do elemento de resposta ao AMPC (CREB, do inglês *cAMP response element binding protein*). O CREB é o principal fator de transcrição ativado pela PKA e vai regular a expressão de diversos genes (ARZT; HOLSBOER, 2006; DE MOURA; VIDAL, 2011). Estudos realizados por ADAMEC e colaboradores (2009), mostraram que o CREB é encontrado em altas concentrações no encéfalo de ratos expostos ao predador (gato) e estão relacionados aos comportamentos defensivos relacionados ao estresse e ansiedade mesmo após vários dias depois do teste.

Apesar da importância de se entender, a função da amígdala e suas subpartes nessas respostas desencadeadas pela exposição a estímulos aversivos ainda não está bem esclarecida e têm-se encontrado diferentes resultados na literatura.

Nesse sentido, Marino Jr, (1975) relata em seu livro “Fisiologia das emoções” que a estimulação nos grupos central e medial da amígdala de gatos levou a comportamentos de

raiva, aumento na motilidade gástrica e respostas sexuais, mas quando a área estimulada era o grupo lateral, havia inibição de comportamentos de raiva desencadeados por estimulação do hipotálamo, mostrando provável função da amígdala medial de produzir comportamentos de raiva e a parte lateral de inibir esses comportamentos.

A amígdala central está relacionada com o estresse, mas por vias que carecem maior entendimento e essa região possui abundante presença de receptores CRF1 (KOOB; NESTLER, 1997). Na amígdala central também estão presentes neurônios gabaérgicos, onde se acredita que haja interação, ainda não muito clara, entre a síntese de CRF e estes neurônios (NIE et al., 2004). Estudos realizados por ROBERTS; COLE; KOOB (1996) demonstraram que injeções de agonistas de receptores GABA_A na amígdala central levava a diminuição da autoadministração de drogas de abuso em ratos dependentes de drogas, que pode ser um indicativo de menor nível de estresse e ansiedade.

Também na CeA, estão presentes altas concentrações de receptores canabinoides do tipo CB1, esses receptores estão presentes nos neurônios pré-sinápticos de glutamato e GABA, e por estarem acoplados a proteína G_i, tem efeito inibitório na liberação dos neurotransmissores (MICALE; DRAGO, 2018). A neurotransmissão canabinoide envolve agonistas endógenos como a anandamida e o 2AG (araquidonoilglicerol), derivados do ácido araquidônico. Esses ligantes endógenos, bem como os exógenos delta-9-tetrahydrocannabinol e canabidiol se ligam aos receptores CB1 (muito presentes no SNC) e CB2 periféricos ativando a via da PGi, e, portanto, inibindo a via AMPc/PKA e seus efeitos (MORENA et al., 2016; MICALE; DRAGO, 2018).

Não apenas restrito a esses neurotransmissores, e suas vias, a ativação de receptores de CRF1 no sistema límbico está ligada a situações de estresse, e a desregulação desse sistema está evidente após administração crônica de todas as drogas capazes de causar dependência, ou uso abusivo. A concentração de CRF na amígdala central se relaciona às emoções negativas experimentadas durante as crises de abstinência (KOOB & VOLKOW, 2016).

O gene c-fos é responsável pela síntese da proteína Fos, que é utilizada extensamente como um dos principais marcadores de atividade neuronal, e existem diversos motivos para sua escolha, pois, como é um gene de expressão imediata, ele é expresso de maneira rápida e transiente em respostas a estímulos do ambiente. Dentre as vantagens de se usar o gene c-fos para marcação de atividade neuronal, pode-se citar que tem baixa expressão em níveis basais.

Ele é expresso em situações de estresse e exposição a drogas, tem resposta transiente a esses estímulos, e a sua detecção de expressão por RNA mensageiro e pela proteína Fos não é complexa, entre outros fatores (HERRERA & ROBERTSON, 1996; KOVÁCS, 2008).

1.3 Modelos Etológicos

Com o intuito de compreender melhor a ansiedade e seus transtornos e consequências e como ocorre a modulação de comportamentos relacionados a dependência a substâncias psicoativas, a ciência lança mão em observar modelos animais em laboratórios como meio de estudo e pesquisa para entender melhor as reações de defesa diante ao agente estressor. A semelhança entre as emoções dos homens e os animais começou a ser observada desde Charles Darwin na sua obra “*A expressão das emoções nos homens e nos animais*” onde ele analisava as expressões faciais e comportamentais de diferentes animais, e detectou que as emoções sempre remetiam a padrões de comportamentos específicos e esses comportamentos evoluíam juntamente com todas as outras características. Logo, teriam valor adaptativo e seriam essenciais para garantir a sobrevivência da espécie (LENT, 2001). As respostas emocionais defensivas geralmente são facilmente observáveis em animais quando os mesmos são expostos a agentes estressores (DE CARVALHO-NETTO, 2018).

O Teste de Exposição ao Rato (TER) foi utilizado nesse estudo para desencadear reações de defesa no camundongo (presa), em relação ao rato (predador), e assim podermos avaliar alterações na área encefálica de escolha para este trabalho que foi a amígdala. Além disso, o TER também foi ferramenta para analisar diferentes aspectos da dependência ao etanol em animais submetidos ao estresse e compará-los com aqueles que não foram submetidos, avaliando assim se existe ou não interferência desse tipo de estresse no comportamento relacionado a dependência de etanol.

Estudos mostram que o rato preda camundongos na vida selvagem, e essa característica pode ser explorada em laboratórios de modo controlado (CAMPOS et al., 2013; BLANCHARD et al., 2005). Partindo dessa situação, o TER apresenta-se como um bom modelo de ansiedade, mas que pode desencadear estresse do tipo presa-predador. O aparato

foi desenvolvido pelo grupo dos pesquisadores Blanchards da Universidade do Havaí (EUA) e pode ser observada uma breve descrição na metodologia (YANG et al., 2004).

Os modelos que relacionam comportamentos exibidos pelos animais com o desenvolvimento da dependência por drogas de abuso ou, no caso desse trabalho, de etanol, também ganharam muito destaque nos últimos anos e dentre os diferentes modelos já testados e validados, usamos o modelo animal de preferência condicionada por lugar (PCL), onde o animal é pareado com o contexto de onde a droga foi administrada, para avaliar a capacidade do efeito reforçador do álcool no animal (BAHI; DREYER, 2012; BAHI, 2013) buscando evocar características de dependência relacionadas ao ambiente onde é realizado o consumo da droga, demonstrando que o contexto do uso pode ser relevante para o desenvolvimento da dependência (SANCHIS-SEGURA; SPANAGEL, 2006). Mais informações sobre esse modelo também utilizado neste estudo podem ser observadas na metodologia. Além da PCL, usamos também o modelo de autoadministração operante de etanol no qual o animal realiza uma tarefa para obter o reforço que no nosso caso era uma dose pré-determinada e padronizada de etanol. Esses modelos foram estudados para verificar a interação do estresse (TER) no comportamento relacionado a busca de etanol (BLEGEN et al. 2018).

Devido à grande necessidade de se entender os mecanismos neurobiológicos de como o estresse e a dependência de substâncias psicoativas, como o etanol, são processados e influenciados a partir de um estímulo aversivo, buscamos entender como a neurotransmissão CRFérgica e a neurotransmissão canabinoide, podem estar envolvidas na mediação da ansiedade, estresse e dependência, bem como suas cascatas de sinalização intracelular na amígdala (com ênfase na CeA), uma região fundamental na modulação da ansiedade, mediando reações de defesa. Assim, entender melhor como funcionam os mecanismos da ansiedade-dependência no encéfalo pode ser uma importante ferramenta para auxiliar no desenvolvimento de tratamentos e medicamentos para um campo carente de tratamentos eficazes.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo geral analisar a mediação das respostas defensivas ao estresse induzido pela exposição de camundongos ao Teste de Exposição ao Rato (TER).

2.2 Objetivos específicos

- Analisar a ativação da amígdala central nos animais expostos agudamente e repetidamente ao TER: comparação da ativação da amígdala central em duas linhagens de camundongos (Suíços e C57BL/6).

- Analisar a influência do estresse de exposição aguda e repetida ao TER sobre comportamentos relacionados a ansiedade.

- Analisar a influência do estresse de exposição aguda e repetida ao TER sobre comportamentos relacionados a dependência de etanol através dos modelos de Preferência Condicionada por Lugar e Autoadministração Operante.

- Analisar a resposta induzida na expressão gênica dos receptores CRF1 e CB1 na amígdala de animais expostos ao TER e submetidos a Autoadministração Operante.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizadas duas linhagens camundongos: C57BL/6 (n = 107) e Suíços (n = 31), sendo todos os animais machos, mantidos no biotério central da Rede de Biotérios da UFU (REBIR – UFU) para os experimentos realizados na UFU e no biotério setorial da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), para os experimentos realizados na UNIFESP, no mínimo 7 dias antes do início dos experimentos. Os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e luz (ciclo 12/12 h, luzes apagadas às 18h, exceto no experimento de autoadministração, onde os animais permaneceram em regime de ciclo invertido, com luzes acesas às 20h) com livre acesso a alimento e água, exceto durante a realização dos testes. Os camundongos Suíços foram usados no experimento de Imunohistoquímica para proteína Fos (Experimento I), e os camundongos C57BL/6 para os demais experimentos. Os animais que passaram pelo protocolo de autoadministração Operante (Experimento IV) foram mantidos no Biotério da UNIFESP.

Foram usados ratos Long Evans (n = 7) machos pesando entre 400~600g como estímulo aversivo nos testes de exposição ao rato.

3.2 Substâncias

O etanol utilizado para as diluições nos experimentos foi:

- Álcool Etílico Absoluto 99,8% (CROMOLINE).

Os anestésicos utilizados para foram:

- Tiopental sódico: para eutanásia (160 mg/kg).
- Cetamina (100mg/kg)
- Xilazina (10mg/kg)

Uma associação de Cetamina e Xilazina foi usado para anestésiar os animais antes da perfusão.

3.3 Teste de Exposição ao Rato (TER)

O Teste de exposição ao rato (TER), além de ser usado como um modelo animal de ansiedade, nesse trabalho, foi também utilizado com a finalidade de ser um fator estressante, para que fosse possível avaliar as diferentes consequências de um estresse, quer seja uma única vez, quer sejam repetidas vezes. Esse modelo animal se baseia na interação presa-predador, onde a presa (camundongo) permanece na presença de um predador (rato) separados por uma tela de arame, o que provoca respostas defensivas no primeiro. O TER é um modelo desenvolvido no laboratório dos pesquisadores Robert e Caroline Blanchard (YANG et al., 2004) e padronizado no laboratório de Neuropsicofarmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/UNESP (CAMPOS et al., 2013) com a finalidade de mensurar comportamentos de avaliação de risco em camundongos.

O aparato é composto por uma caixa de acrílico transparente medindo 46 (comprimento) x 24 (largura) x 21 (altura) centímetros (caixa de exposição) coberta por uma tampa de acrílico preto. A caixa de exposição é dividida em dois compartimentos de igual tamanho (superfície e compartimento do predador) por uma tela de arame. Além disso, uma toca medindo 12 x (comprimento) x 7 (largura) x 7 (altura) centímetros, confeccionada de acrílico preto em três faces e de acrílico transparente em uma face (para permitir a filmagem) foi conectada à superfície através de um túnel de acrílico transparente (4,4 cm diâmetro, 13 cm comprimento). Um rato macho Long-Evans (predador) foi introduzido no compartimento do predador. Os camundongos eram introduzidos na superfície, compartimento que o separa do rato apenas pela tela de arame. Em todos os experimentos, os animais foram separados em três grupos, sendo um grupo exposto apenas uma única vez ao rato, chamado de grupo “único”, um grupo onde os camundongos eram expostos cinco vezes ao rato, em dias alternados, e chamado de grupo “repetido”, e o grupo “controle” (naive), que foram os animais que não passaram pela exposição ao rato e permaneceram em suas caixas moradias. A duração da exposição ao rato foi de 10 minutos.

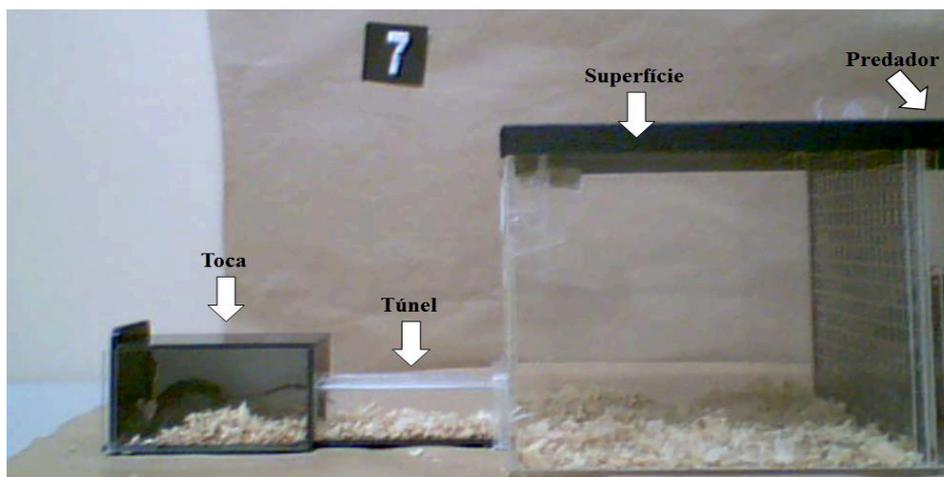


Figura 1: Aparato do Teste de Exposição ao Rato (TER). Fonte: Laboratório de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia.

3.3.1 Habituação

Nos dois dias anteriores ao experimento, todos os animais foram submetidos à habituação. Cada camundongo foi transportado com auxílio de uma gaiola individual até a sala experimental e, colocado na superfície do aparato (compartimento que o separa do rato) por um período de 10 minutos para livre exploração, sem a presença do rato. A maravalha usada no aparato foi a mesma da caixa moradia de cada animal.

O grupo controle (naive) permaneceu em suas caixas moradias sem alguma manipulação.

3.3.2 Teste de exposição

Vinte e quatro horas após o segundo dia de habituação, na sala de experimentação, foi introduzido no compartimento do predador do TER um rato macho Long Evans.

Em seguida, os camundongos foram introduzidos um a um na superfície do aparato TER. Ao final da exposição, os animais retornaram a suas caixas moradias.

O TER foi padronizado para a linhagem C57BL/6 no Laboratório de Neurociências e Comportamento da UNIFESP (LaNCOM-UNIFESP), uma vez que até então somente era realizado em animais da linhagem Swiss (Suíços), entendemos que era necessário observar se camundondos C57BL/6J também exibiam comportamentos defensivos frente ao rato Long Evans. Foram observados comportamentos de evitação da região aversiva denominada superfície da mesma forma que nos Suíços (Swiss), denotando tratar de estímulo aversivo também para a linhagem C57BL/6J. Os resultados não estão publicados (BERTAGNA et al., 2018).

3.4 Imunohistoquímica para marcação de Fos

A imunomarcação da proteína Fos é considerada um marcador de ativação neural (MATTSON et al., 2007). Para realizar tal marcação é necessário realizar uma perfusão transcardíaca nos animais no período em que a produção dessa proteína atinge seu pico, ou seja, duas horas após a realização do experimento

Para realizar tal perfusão, os sujeitos foram anestesiados com combinação de Cetamina a 100 mg/kg e Xilazina a 20 mg/kg e após anestesiados, foram levados até a sala de experimentação onde foi realizada a perfusão, com 10mL de tampão fosfato de sódio 0,1M (PBS) e posteriormente 60 mL de paraformaldeído 4% (PFA).

Os encéfalos dos sujeitos foram retirados após o final da perfusão e permaneceram em solução de PFA 4% por 2h em temperatura ambiente. Após esse período, os encéfalos foram colocados em solução 30% de sacarose diluído em PBS para desidratação por 2 dias à 4°C. Após desidratação, os encéfalos foram congelados rapidamente em gelo seco, e armazenados em ultrafreezer -80°C.

As fatias coronais (30µm) foram cortadas em criostado (-20°C) e teve como foco cortes contendo a região cerebral de interesse, CeA, com base no atlas de Paxinos e Franklin (2001). Essas fatias foram lavadas 3 vezes com tampão PBS e em seguida incubadas com solução bloqueadora (soro de cabra 3%; Triton X-100 0,25% dissolvidos em PBS) por uma hora à temperatura ambiente. Após o bloqueio, as fatias foram incubadas com anticorpo

primário (c-Fos; coelho; sc-52, Santa Cruz biotechnology) diluído em solução bloqueadora por 24 horas a 4°C.

Após essa incubação, as fatias foram lavadas com PBS, por 3 vezes, e incubadas com um anticorpo secundário (anti-coelho biotilado, BA 1000; Vector Labs, diluído 1:600) em PBSTx (Triton X-100 0,25%) e soro de cabra 3%, por 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida elas foram lavadas com PBS por 3 vezes e incubadas por 1 hora em solução de avidina-biotina-peroxidase (ABC Elite kit, catalog #PK-6100, Vector Laboratories), preparada em PBS contendo Triton X-100; 0,5%. Finalmente, as fatias foram lavadas por 3 vezes e incubadas em 3,3'-diaminobenzidina (DAB) por aproximadamente 2 minutos, tempo suficiente para marcação das células. Em sequência, foram lavadas 5 vezes e transferidas para solução de PBS e montadas em lâminas gelatinizadas com gelatina e alumínio crômico.

Quando secas, as lâminas foram desidratadas, utilizando um gradiente seriado de titulações crescentes de etanol (água destilada; etanol: 30%, 60%, 90%; 95% e 100%) e Xilol e, finalmente, foram cobertas com Permount e lamínulas. A imunomarcação de Fos foi capturada através de uma câmera acoplada a um microscópio (Leica ICC50).

3.5 Teste de Campo Aberto (CA)

O aparato de CA consiste em uma caixa de madeira de forma circular com raio de 39,5cm e paredes de 47cm de altura. Um quadrante central onde os animais foram colocados, com oito quadrantes ao redor deste central, os quais foram chamados de parte central do aparato. Dezesesseis quadrantes circundam os quadrantes centrais e foram considerados como periferia no aparato.

Após o TER, todos os animais foram submetidos ao campo aberto, o qual foi utilizado para avaliar a deambulação dos animais e também para avaliar comportamentos relacionados a ansiedade, pois camundongos tendem a não permanecerem em locais abertos, como o centro do aparato.

Os testes foram realizados durante a fase clara do ciclo de luz e tiveram duração de 10 minutos.

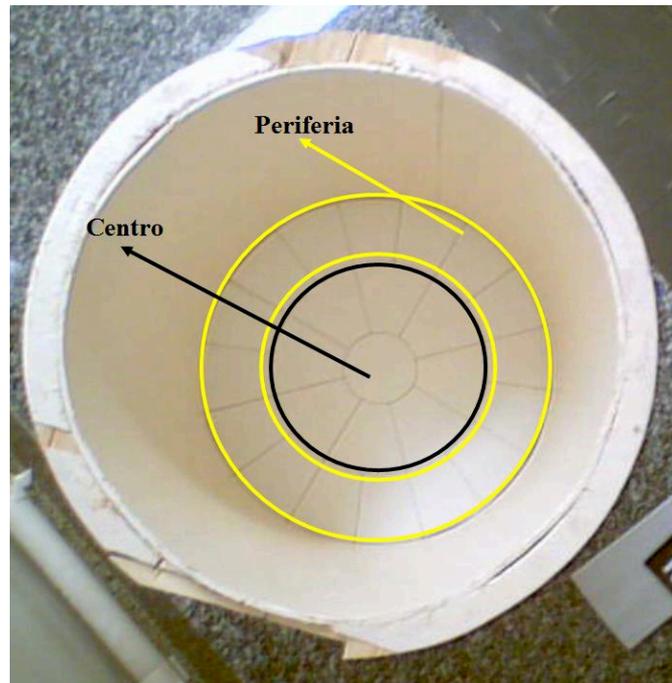


Figura 2: Aparato do Campo Aberto (CA). Fonte: Laboratório de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia.

3.5.1 Análise Comportamental do CA

O campo aberto foi realizado após a exposição única ou repetida ao TER para que fosse possível comparar a deambulação entre os grupos testados e nesse modelo foi analisado Tempo de permanência no Centro do aparato, número de linhas cruzadas e distância total percorrida.

3.6 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O labirinto em cruz elevado foi descrito por Lister (1987). O aparato, feito de acrílico escuro, 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 plástico de 38,5 cm. Os camundongos foram 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 5 minutos. Os testes foram realizados durante a fase clara do ciclo de luz.



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

3.6.1 Análise Comportamental do LCE

O LCE foi realizado 4h após o camundongo ter passado pelo teste do campo aberto e de maneira semelhante, foi utilizado para mensurar comportamentos do tipo-ansiedade.

Os comportamentos analisados foram de duas naturezas, sendo eles espaço-temporais, ou complementares. Os espaços-temporais foram o número de Entradas no Braço Aberto (EBA), Tempo no Braço aberto (TBA), e como parâmetro para analisar a deambulação do camundongo no aparato, foi analisado o número de Entradas no Braço Fechado (EBF). Para melhor expressar os resultados de entrada e tempo no braço aberto, esses dados foram convertidos em %EBA e %TBA, onde a % é feita a partir da EBA, ou TBA dividido pelo número total de entrada nos braços, ou tempo total no aparato (300s), respectivamente.

Os comportamentos complementares analisados foram Mergulho Protegido (MP, ato do camundongo olhar para fora e, normalmente para baixo do aparato, enquanto está no centro do mesmo), Mergulho Desprotegido (MD, semelhante ao MP, porém, ocorre quando o camundongo está em um dos braços abertos), Esticada Protegida (EP, ocorre quando o animal permanece com a parte posterior do tronco no mesmo lugar, ou seja sem dar o passo a frente e estica o corpo para frente, explorando o local, ocorre no centro ou nos braços fechados do aparato), Esticada Desprotegida (ED, semelhante ao EP, porém, ocorre quando o camundongo está em um dos braços abertos) e Entrada no Final do Braço Aberto (EFBA, o braço aberto foi dividido em três partes, onde foi contabilizada a entrada do animal no último terço do braço aberto, área mais aversiva).

3.7 Preferência Condicionada por Lugar (PCL)

O aparato para PCL consiste em uma caixa de acrílico com dois compartimentos de tamanhos iguais (16x13x12cm), e um compartimento central cinza (10x13x12cm), que separa os outros dois compartimentos por portas do tipo guilhotina. Cada compartimento possui características diferentes entre si, sendo um compartimento com paredes brancas e assoalho de tela quadriculada e outro compartimento de paredes pretas com chão em barras. Entre os dois compartimentos existe uma área cinza central que constitui o compartimento “neutro” e possui chão cinza liso.

O protocolo de PCL durou 31 dias e consistiu das seguintes fases: habituação ao biotério, adaptação de manejo e injeção de salina, habituação ao aparato, pré teste, pareamento e teste. Método similar e adaptado de BHUTADA et al. (2012).



Figura 4: Aparato de Preferência Condicionada por Lugar. Fonte: Laboratório de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia.

3.7.1 Habituação

Antes do início do protocolo, os animais passaram por pelo menos 7 dias no biotério. Após este período, passaram por mais 7 dias de adaptação à manipulação e injeção intraperitoneal de salina (0,9%, i.p.) para atenuação do estresse associado à manipulação e injeções.

Nos dois dias seguintes, os camundongos foram alocados no compartimento neutro do aparato de PCL, as portas foram abertas e eles tiveram livre acesso a todos os compartimentos do aparato por 10 minutos, para exploração e habituação ao aparato.

3.7.2 Pré-Teste

Os animais foram alocados no compartimento neutro, e as portas foram abertas para permitir livre acesso por todo o aparato durante 15 minutos. O experimento foi filmado e o tempo gasto em cada compartimento foi registrado através de um observador cego para as condições experimentais. A partir destes dados foi definida a alocação dos animais nos

diferentes grupos experimentais, de acordo com a preferência natural dos animais pelos compartimentos.

Após o pré-teste, os animais foram separados em grupo de (i) única ou (ii) repetidas exposições ao TER e (iii) controle (não exposto) e foram expostos ao TER. Vinte e quatro horas após a última (ou única) exposição, os animais realizaram o Teste de Campo Aberto (CA) pela manhã e o Labirinto em Cruz Elevado (LCE) quatro horas após o final do campo aberto (ver itens 3.5 e 3.6).

3.7.3 Pareamento

Os animais foram submetidos a 8 sessões diárias subsequentes de pareamento, com duração de 5 minutos cada, começando no dia seguinte à exposição ao CA e LCE. Antes do pareamento, os animais receberam injeções intraperitoneais de etanol (2,0g/kg) ou salina 0,9%.

Para diminuir a possibilidade de associação dos efeitos aversivos da injeção de etanol, após sua administração, os animais retornaram para suas caixas moradias e permaneceram por 5 minutos. Passados os 5 minutos, cada animal foi individualmente pareado com etanol no compartimento que apresentou menor preferência natural e com salina no compartimento que apresentou maior preferência natural, durante mais 5 minutos. A sequência de pareamentos foi sucessiva e sempre intercalando etanol e salina, em diferentes dias. Foi realizado apenas um pareamento por dia.

A câmara neutra não foi utilizada durante o condicionamento e permaneceu com as portas bloqueadas.

3.7.4 Teste

O teste foi realizado 24h após a última sessão de pareamento. Cada animal foi colocado no compartimento neutro com as portas fechada e começou a gravação do

experimento e em seguida as portas dos compartimentos foram abertas para livre acesso do animal por todo aparato. O tempo total do experimento foi de 15 minutos. A partir desse tempo total foi realizada a análise de tempo gasto em cada compartimento e foi verificada a eficácia do pareamento anteriormente realizado.

No dia do teste os animais não receberam nenhum tipo de tratamento farmacológico.

3.8 Autoadministração Operante de Etanol (AA)

A caixa de AA operante (Master One, Ribeirão Preto-Brasil) consiste em uma caixa feita de alumínio com portas de acrílico (170 X 150 X 200 mm). No centro da parede lateral direita, a 45 mm do chão fica o bebedouro onde são apresentados os reforços de etanol 20%. Ao lado do bebedouro existem dois sensores que reconhecem o focinho do animal, estes sensores são chamados de sensores de *nose poke* (do inglês). O primeiro sensor é chamado de “ativo”, e tem este nome, pois quando ocorre a interrupção de dois feixes infravermelhos consecutivos pelo focinho do animal, é liberado um reforço no bebedouro. Quando o sensor “ativo” é acionado, juntamente com a liberação do reforço, são apresentadas ao animal duas dicas, para que ocorra a associação da disponibilidade do reforço. Essas dicas são: um som (900 Hz; 20 dB) e uma luz vermelha (7.5W) que acende na caixa. Ambas as dicas duram três segundos. O segundo sensor de *nose poke* é chamado de sensor “inativo”, nome este devido ao fato de que quando ativado, de maneira semelhante ao outro sensor, não há liberação de reforço no bebedouro, nem dicas associativas. Toda vez que o sensor “ativo” é acionado, o sistema que controla a AA deflagra o *time out*, que é um tempo de segurança de 10 segundos, onde não é possível ocorrer a liberação de um novo reforço, mesmo que o animal realize o *nose poke* no sensor “ativo”. Esse período de *time out* é importante para evitar ingestão excessiva e gerar intoxicação do animal.

Todo reforço liberado pela caixa de AA é controlado por um software que disponibiliza no bebedouro 0,1 mL de etanol 20% a cada ativação, ao pressionar uma seringa que está conectada ao bebedouro por um tubo de polietileno. A seringa está acoplada a uma bomba de infusão (Razel, Stamford®, CT, EUA) que aperta seu êmbolo por 3 segundos com

15 rpm. Todo o experimento é registrado por um software (AVS_PC) instalado em um computador, que controla todas as caixas de AA, bem como as bombas de infusão.

As caixas de autoadministração são colocadas individualmente dentro de um armário de madeira que possui isolamento acústico e ventilação.

O método utilizado é adaptado de Blegen et al. (2018). Para acostumar o paladar dos camundongos ao sabor do etanol, antes de começar a AA propriamente dita, todos os animais foram separados individualmente e durante três semanas (5 dias por semana) e as garrafas de água foram substituídas por garrafas de etanol 20% durante 4h. A troca acontecia depois de pelo menos 2h após o início da fase de escuro do ciclo claro/escuro. Esta fase do protocolo é chamada de *Drink in the Dark* (DiD, beber no escuro), onde o animal poderia consumir livremente a solução.

Após o DiD, os animais foram treinados para aquisição da autoadministração. Esta nova fase foi chamada de “Fase de Treino” e consistiu em 3 semanas com 5 sessões semanais (apenas uma sessão diária) de 1 hora de duração. Na primeira semana, o software foi programado para trabalhar em uma razão fixa de 1 (RF1), onde era necessário apenas um nose poke para ativar o sensor “ativo”. Na segunda semana, o software foi configurado para precisar de 3 acionamentos no sensor “ativo” para entregar um reforço, processo chamado de razão fixa 3 (RF3). Na terceira semana, foi utilizada uma razão fixa de 5 (RF5), seguindo a mesma lógica.

Uma vez que os animais aprenderam a autoadministrar o etanol, processo chamado de aquisição, eles foram submetidos ao protocolo da Razão Progressiva que consistiu em uma semana de exposições diárias (também de 1h cada) intercalando entre uma razão progressiva 3 (RP3, onde a cada vez que um reforço é liberado, é necessário um esforço maior para que seja liberado o próximo reforço da ordem de 1 ativação= primeiro reforço, depois, 4 ativações para o segundo reforço, e assim por diante, 7, 10, 13...) e uma RF5. Essa semana foi chamada de semana da razão progressiva, onde é avaliado o *breaking point* ou ponto de ruptura, que é indicativo da motivação do animal ao buscar a droga, no caso o etanol. Quanto mais razões completadas, mais motivado para o consumo o animal estará, uma vez que para alcançar o novo reforço cada vez ele precisará fazer mais o comportamento de *nose poke*. Esse ponto de ruptura é a pontuação que mostra a última razão alcançada pelo animal na RP3. Após a semana da razão progressiva, todos animais passaram por uma única sessão de *binge*, que é o

consumo liberado, a qual teve duração de quatro horas e os animais tinham livre acesso ao etanol na programação de RF5.



Figura 5: Aparato de Autoadministração operante. Fonte: Laboratório de Neurociências e Comportamento da UNIFESP (LaNCOM-UNIFESP).

3.8.1 Análise Comportamental da AA

A ingestão de etanol na fase de treino das razões fixas, *breaking point* e *binge* foi determinada pela subtração do volume restante no bebedouro pelo volume gasto da seringa.

Foi analisado também o número de vezes em que foi ativado o sensor “ativo” e “inativo”, bem como o número de reforços liberados no bebedouro.

Na semana de razão progressiva, foi calculada a média do ponto de ruptura das três sessões de RP3 de cada animal para que fosse feita a análise estatística.

3.9 Extração de RNA, Síntese do cDNA e RT-PCR em tempo real (RT-qPCR)

3.9.1 Extração de RNA total e Síntese de cDNA

Após o término do protocolo de AA, os animais foram anestesiados e seus encéfalos foram retirados e armazenados congelados em ultrafreezer -80°C. Posteriormente foram fatiados no criostato sob temperatura de -20°C, seguindo-se as coordenadas estereotáxicas para camundongos do atlas de Paxinos e Franklin (2001). A região de interesse, amígdala central (CeA), foi dissecada por meio de agulhas de ponta chata de 14 -16 gauge, e colocada em tubos criogênicos. Os tubos foram congelados em gelo seco e conduzidos para extração de RNA total. Como a quantidade de RNA total em cada animal era muito pequena, foi realizado *Pool* entre animais do mesmo grupo. *Pool* é a junção da amostra de 2 animais para aumentar a concentração de RNA total.

A extração do RNA mensageiro foi realizada utilizando-se o *Kit PicoPure RNA isolation* (Cellco), de acordo com as recomendações do fabricante. Em seguida, fitas simples de cDNA foram sintetizadas com o *Kit Superscript III first strand cDNA synthesis* (Invitrogen, Life Technologies), seguindo as orientações do fabricante. As amostras foram colocadas no termociclador (Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700®) e ao término do procedimento o cDNA sintetizado foi armazenado à -20°C.

3.9.2 Análise por RT-qPCR

O ensaio de RT-qPCR foi realizado em duplicata utilizando-se as amostras de cDNA. Uma sonda específica para cada gene alvo (marcada com *Fam*); uma sonda para o gene controle (*Pde10a*), marcada com *Vic*; além do kit *TaqMan Advanced Fast PCR Master Mix* (Life Technologies). Ao final, as misturas foram pipetadas em placas de 96 *wells*, para o processo de amplificação, no equipamento para PCR semiquantitativo em tempo real, Applied Biosystem 7500 Real-Time PCR System.

Os genes alvos foram: receptor CB1, CRFR1.

Os resultados de amplificação gênica foram normalizados em relação aos resultados do gene controle *Pde10a*. A análise da expressão gênica foi semiquantitativa (método delta delta CT), como descrito por Livak e Schmittgen (2001).

O valor de CT (*threshold cycle*) representou o momento da reação de PCR em que a fluorescência de determinada amostra foi detectada inequivocamente acima do ruído de fundo (*background*). Sendo o resultado expresso em unidades arbitrárias ($\Delta\Delta CT$). O modelo matemático utilizado para a obtenção das unidades arbitrárias para essa análise foi:

- 1- Subtração do valor de CT do gene alvo pelo CT do gene *Pde10a* (ΔCT);
- 2- Média do ΔCT do grupo controle para cada gene;
- 3- ΔCT de cada amostra dividido pela média do ΔCT controle ($\Delta\Delta CT$);

3.10 Delineamento experimental

3.10.1 Experimento I – Análise da ativação da Amígdala Central após exposição ao TER: Comparação entre a expressão de Fos em camundongos Suíços e camundongos C57BL/6

Para realização da imunohistoquímica, os animais foram separados em seis diferentes grupos, onde primeiro foi denominado exposição única, repetida ou não exposto, e posteriormente foram subdivididos em exposição a um rato de pelúcia (brinquedo) ou a um rato Long Evans (rato) e seus controles não expostos.

Os grupos experimentais de camundongos Suíços (n = 4-6/grupo) foram:

- Exposição Única
 - Rato (n = 5)
 - Brinquedo (n = 5)
 - Controle (n = 4)
- Exposição Repetida

- Rato (n = 6)
- Brinquedo (n = 6)
- Controle (n = 5)

Os grupos experimentais de camundongos C57BL/6 (n = 3-5/grupo) foram:

- Exposição Única
 - Rato (n = 5)
 - Brinquedo (n = 5)
 - Controle (n = 4)
- Exposição Repetida
 - Rato (n = 3)
 - Brinquedo (n = 5)
 - Controle (n = 4)

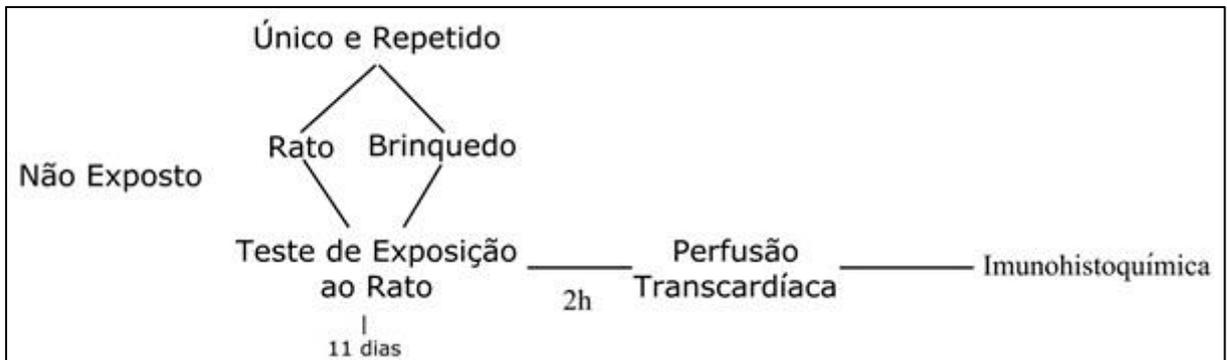


Figura 6: Delineamento experimental para Imunohistoquímica.

3.10.2 Experimento II – Avaliação de comportamentos relacionados a ansiedade após exposição ao TER através do Campo Aberto e do Labirinto em Cruz Elevado

Após a exposição ao TER e antes do protocolo de pareamento do experimento de preferência condicionada por lugar, todos os animais passaram por dois modelos comportamentais: Campo Aberto e Labirinto em Cruz Elevado. Eles foram submetidos a

esses modelos vinte e quatro horas após a exposição ao TER agudo ou a última exposição repetida, e os grupos experimentais foram:

Os grupos experimentais (n = 17-19/grupo) foram:

- Animais expostos uma vez ao TER (único; n=17)
- Animais expostos repetidas (5) vezes ao TER (repetido; n=19)
- Animais não expostos ao TER (controle; n=17)



Figura 7: Delineamento experimental para avaliação de comportamentos relacionados à ansiedade.

3.10.3 Experimento III - Preferência Condicionada por Lugar (PCL) induzida por etanol em camundongos submetidos ao TER

Nesse experimento os animais passaram pela habituação e pré-teste na caixa de PCL e antes de começarem o pareamento, eles passaram pelo protocolo do TER. Vinte e quatro horas após a última exposição repetida (e a exposição única, que aconteceu no mesmo dia) os animais passaram para o protocolo do PCL e passaram pelo pareamento e teste. Avaliação da preferência condicionada por lugar em animais que receberam injeção intraperitoneal de etanol na concentração 2g/kg.

Os grupos experimentais (n = 8-10/grupo) foram:

- Animais expostos uma vez ao TER (único):
 - Salina (n = 8)
 - Etanol (n = 9)
- Animais expostos repetidas (5) vezes ao TER (repetido)

- Salina (n = 9)
- Etanol (n = 10)
- Animais não expostos ao TER (controle)
 - Salina (n = 8)
 - Etanol (n = 9)



Figura 8: Delineamento experimental para o protocolo de Preferência Condicionada por Lugar.

3.10.4 Experimento IV – Autoadministração Operante de etanol em camundongos submetidos ao TER

Os animais foram expostos ao TER e após o término da última exposição repetida (e também a única), eles passaram por três semanas de treinamento DiD e depois pela semana de treinamento de razões fixas, para aprender a autoadministrar o etanol na caixa operante. Após terem aprendido a autoadministrar, os mesmos passaram pela semana da razão progressiva, onde foi avaliado a motivação do animal em buscar a droga. Depois dessa fase, os animais passaram por um teste *binge*, onde durante quatro horas eles tinham acesso livre na razão RF5.

Os grupos experimentais (n = 8/grupo) foram:

- Animais expostos uma vez ao TER (único; n = 8)
- Animais expostos repetidas (5) vezes ao TER (repetido; n = 8)
- Animais não expostos ao TER (controle; n = 8)

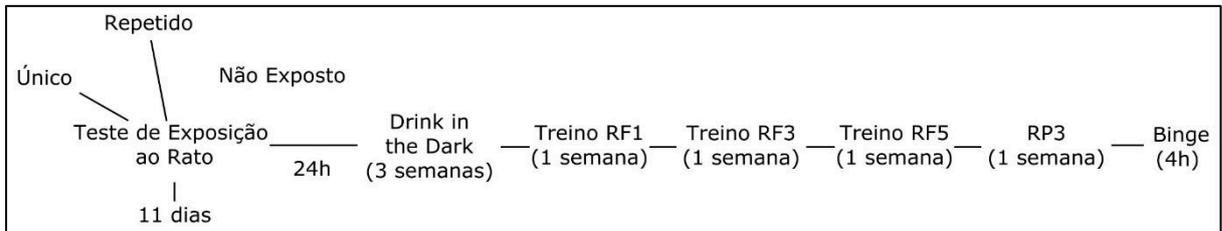


Figura 9: Delineamento experimental para o protocolo de Autoadministração.

3.10.5 Experimento V – Análise das mudanças na expressão gênica de CB1 e CRF1 na amígdala por RT-PCR em tempo real (RT-qPCR)

Após o protocolo do experimento IV, todos os animais tiveram seus encéfalos removidos para extração de RNAm total da região de interesse: Amígdala, conforme protocolo descrito no item 3.9.2.

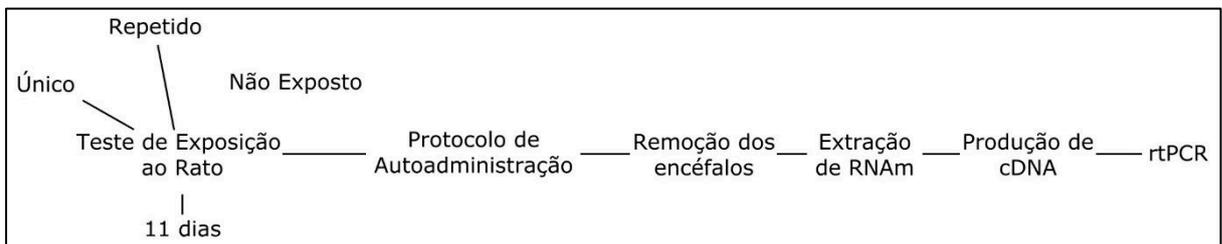


Figura 10: Delineamento experimental para o protocolo de RT-PCR em tempo real (RT-qPCR).

3.11 Análises Estatísticas

Os resultados comportamentais foram analisados primeiramente pelo teste Levene e/ou pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, para avaliar homogeneidade de parâmetros comportamentais entre os grupos, seguido de ANOVA monofatorial ou bifatorial; ou teste T de Student conforme o desenho experimental, para avaliar diferenças significativas quando os dados foram homogêneos. Após isso, foi realizado testes post hoc Duncan para identificar em

quais grupos houve essa diferença. Os resultados foram expressos em média e erro padrão médio sendo considerados significativos quando o valor de P era menor ou igual a 0,05.

3.12 ÉTICA

Os experimentos realizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética para uso de animais desta universidade (CEUA-UFU), protocolo número 107/15 (anexo A).

4 RESULTADOS

4.1 Análise da ativação da Amídala Central após a exposição ao TER: Comparação entre a expressão de Fos em camundongos Suíços e camundongos C57BL/6

A figura 11 mostra a média de células positivas para a expressão de Fos na Amídala Central (CeA) de camundongos Suíços após a exposição única ou repetida ao Teste de Exposição ao Rato, com estímulo aversivo presente sendo o próprio rato, ou um estímulo neutro, um rato de brinquedo. Os grupos controles não foram expostos ao TER.

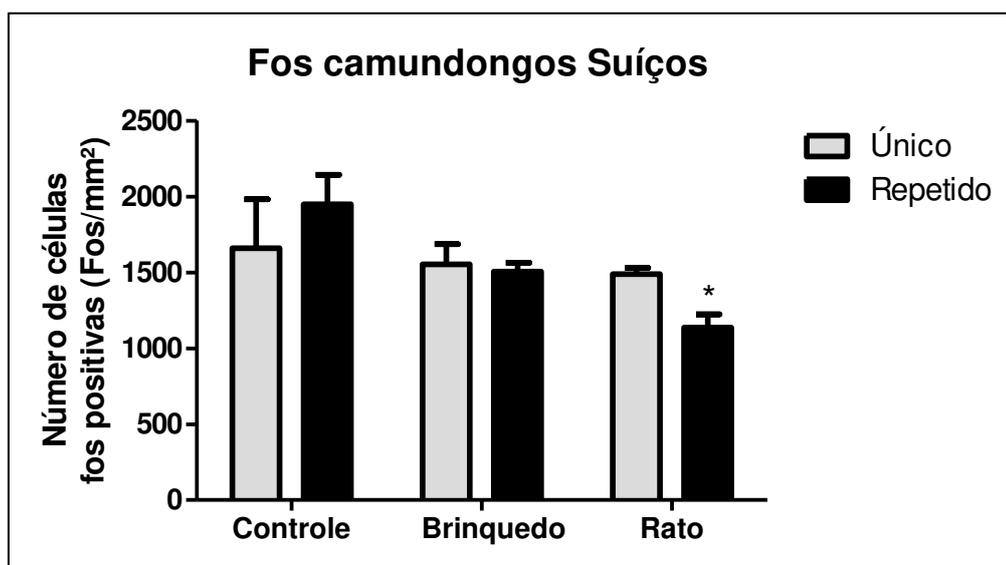


Figura 11: Número de células Fos-positivas por mm² expressos por camundongos Suíços após a exposição única ou repetida a um rato ou um brinquedo. Barras representam média (± EPM). ANOVA monofatorial com post hoc de Duncan. * p<0,05 em relação ao grupo controle repetido.

ANOVA bifatorial (fator 1: Tipo de exposição: Controle, Rato ou Brinquedo; fator 2: Duração da exposição: única ou repetida) mostrou efeito geral ($F_{2,25} = 5,41$; $p < 0,01$) e o pós teste de Duncan revelou diminuição de expressão no grupo rato repetido comparado ao seu grupo controle repetido.

A figura 12 mostra a média de células positivas para a expressão de Fos na CeA de camundongos C57BL/6 após a exposição única ou repetida ao Teste de Exposição ao Rato, com estímulo aversivo presente sendo o próprio rato, ou um estímulo neutro um rato de brinquedo. Os grupos controles não foram expostos ao TER.

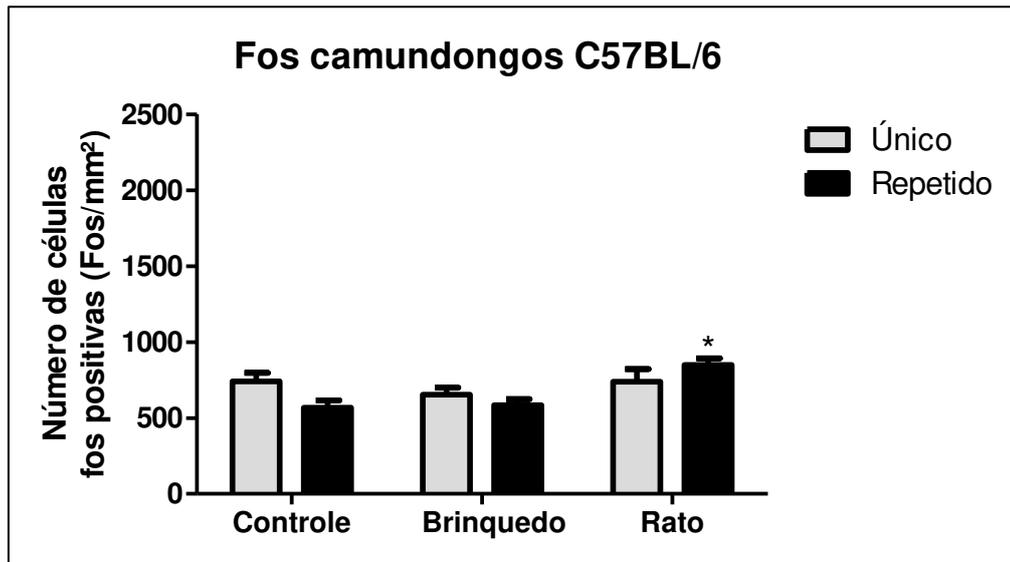


Figura 12: Número de células Fos-positivas por mm² expressos por camundongos C57BL/6 após a exposição única ou repetida a um rato ou um brinquedo. Barras representam média (\pm EPM). ANOVA monofatorial com post hoc de Duncan. * $p < 0,05$ em relação aos grupos controle e brinquedo repetido.

A ANOVA bifatorial mostrou diferença na expressão ($F_{2,9} = 11,67$; $p < 0,01$) e o pós teste mostrou quando comparados os grupos controle e brinquedo repetido com o grupo exposto ao rato repetidas vezes houve aumento na expressão de Fos. ANOVA bifatorial fator 1: Tipo de exposição: Controle, Rato ou Brinquedo; fator 2: Duração da exposição: única ou repetida.

Para comparar se há diferença na expressão de Fos entre camundongos Suíços e C57BL/6. Submetemos os dados a uma ANOVA de três vias (fator 1: Linhagem: Suíço ou C57BL/6; fator 2: Tipo de exposição: Rato, Brinquedo; fator 3: Duração da exposição: única, repetida ou não exposto) o que mostrou que no geral os camundongos Suíços expressaram mais Fos em todos os grupos equivalentes comparados, exceto o grupo exposto ao rato repetidamente do Suíço comparado ao seu equivalente (rato repetido) do C57BL/6, que não foram estatisticamente diferentes.

Assim, podemos reportar que camundongos Suíços no geral expressam mais Fos após uma exposição ao rato quando comparados aos camundongos C57BL/6 sob mesmas condições de exposição.

4.2 Avaliação de comportamentos relacionados a ansiedade após a exposição ao TER através do Campo Aberto e do Labirinto em Cruz Elevado

4.2.1 Comportamentos exibidos durante a exposição do Campo Aberto

A figura 13 mostra os comportamentos Espaço-Temporais e complementares dos animais durante o teste do Campo Aberto após a exposição única ou repetida ao Teste de Exposição ao Rato; O grupo controle não foi exposto ao TER.

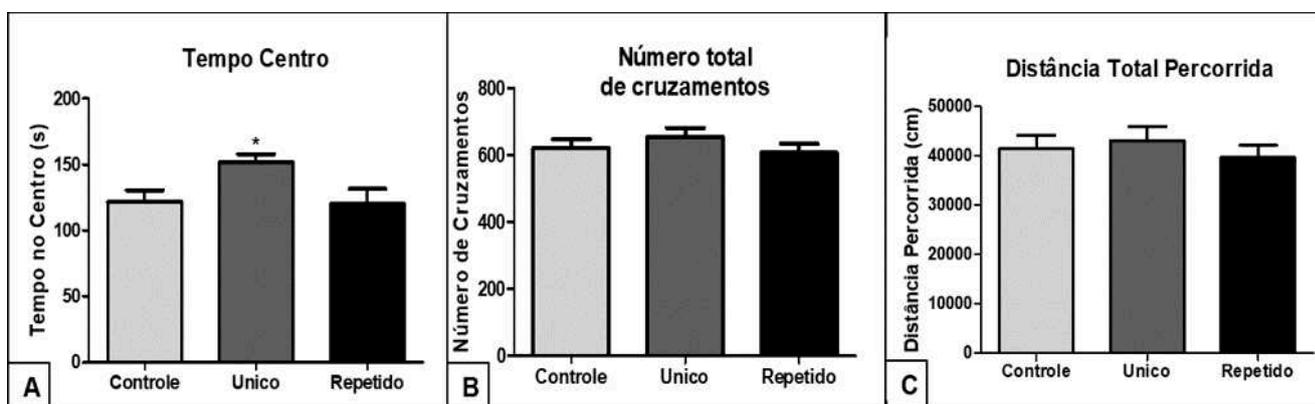


Figura 13: Comportamentos Espaço-Temporais e complementares dos camundongos no CA. **A:** Tempo gasto no Centro do aparato; **B:** O número total de cruzamentos dos quadrantes e; **C:** a distância total percorrida. N = 8-9 animais por grupo. Barras representam média (\pm EPM). * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. ANOVA monofatorial com post hoc de Duncan.

A ANOVA monofatorial com post hoc de Duncan mostrou que o tempo no centro aumentou quando os grupos único e controle ($F_{2,50} = 3,57$; $p < 0,05$) foram comparados. Já para o número total de cruzamentos ($F_{2,50} = 0,79$; $p > 0,05$) e a distancia total percorrida ($F_{2,50} = 0,4$;

$p > 0,05$) a ANOVA monofatorial não mostrou diferença estatística dos grupos estressados em relação ao grupo não estressado.

4.2.2 Comportamentos exibidos durante o LCE

A figura 14 mostra os comportamentos Espaço-Temporais dos camundongos que passaram pelo LCE após a exposição única ou repetida ao Teste de Exposição ao Rato; O grupo controle não foi exposto ao TER.

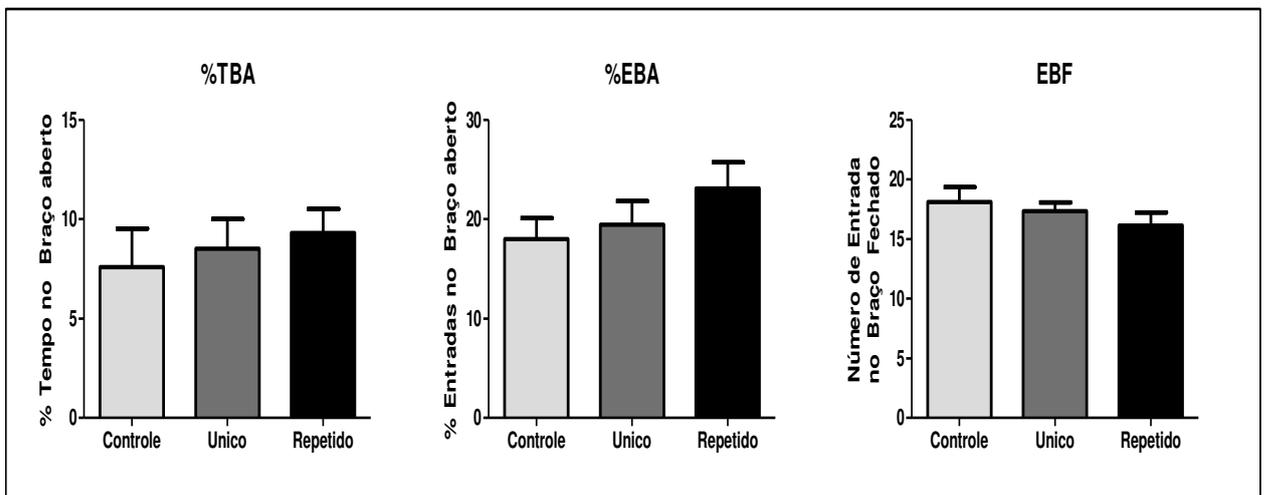


Figura 14: Comportamentos Espaço-Temporais dos camundongos no LCE. % de Entradas nos Braços abertos, % Entrada nos Braços Abertos e Número de Entrada nos Braços Fechados. N = 8-9 animais por grupo. Barras representam média (\pm EPM). ANOVA monofatorial.

ANOVA monofatorial mostrou que não houve diferença em nenhum dos comportamentos Espaço-Temporais. %TBA ($F_{2,50} = 0,30$; $p > 0,05$); %EBA ($F_{2,50} = 1,23$; $p > 0,05$); EBF ($F_{2,50} = 0,4$; $p > 0,05$). Onde %TBA e %EBA mostram comportamentos do tipo ansiedade. O Comportamento EBF foi mensurado para mostrar que não houve diferença na deambulação dos animais.

A figura 15 mostra os comportamentos complementares dos camundongos que passaram pelo LCE após a exposição única ou repetida ao Teste de Exposição ao Rato; Controle não foi exposto ao TER.

A ANOVA monofatorial com post hoc de Duncan, mostrou que o número de mergulhos protegidos foi maior no grupo exposto uma única vez, quando comparado com o controle ($F_{2,50} = 3,29$; $p < 0,05$). Os outros comportamentos complementares não apresentaram diferença significativa.

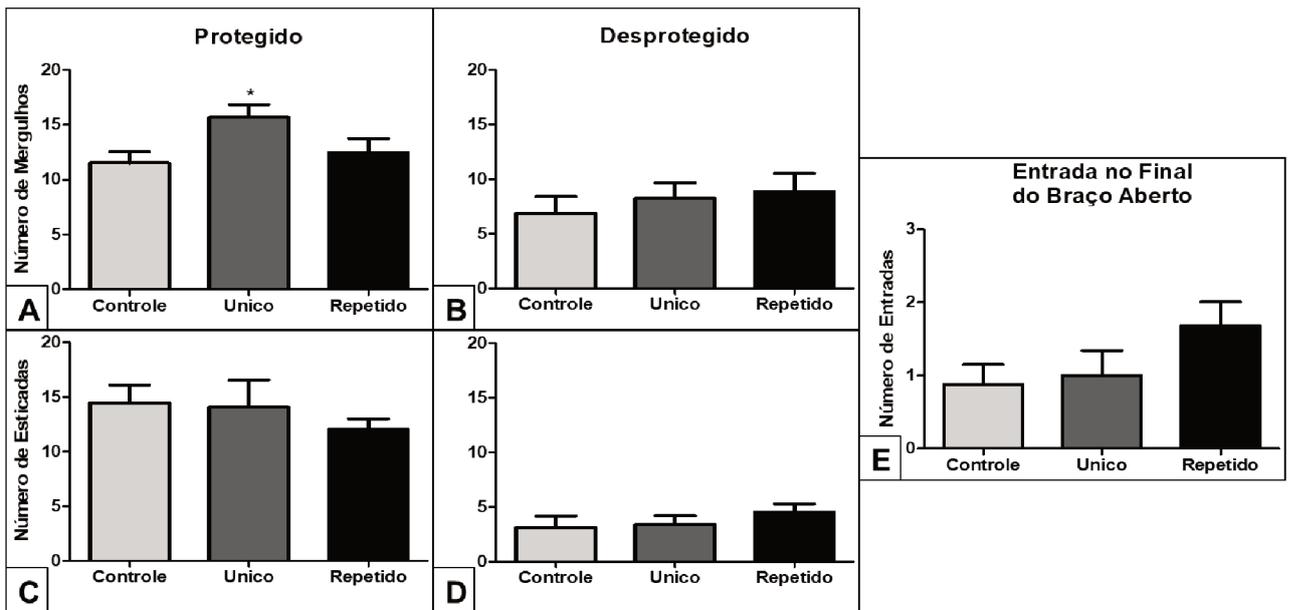


Figura 15: Comportamentos complementares exibidos por camundongos no LCE após a exposição ao protocolo de TER. **A, B:** Número de mergulhos protegidos e desprotegidos, respectivamente. **C, D:** Número de esticadas protegidas e desprotegidas, respectivamente. **E:** Número de entradas no final do braço aberto. $N = 8-9$ animais por grupo. Barras representam média (\pm EPM). * $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo controle. ANOVA monofatorial com post hoc de Duncan.

4.3 Preferência Condicionada por Lugar (PCL) induzida por etanol em animais submetidos ao TER

A figura 16 mostra o efeito do pareamento com etanol na PCL, após a exposição única ou repetida ao Teste de Exposição ao Rato; Controle não foi exposto ao TER.

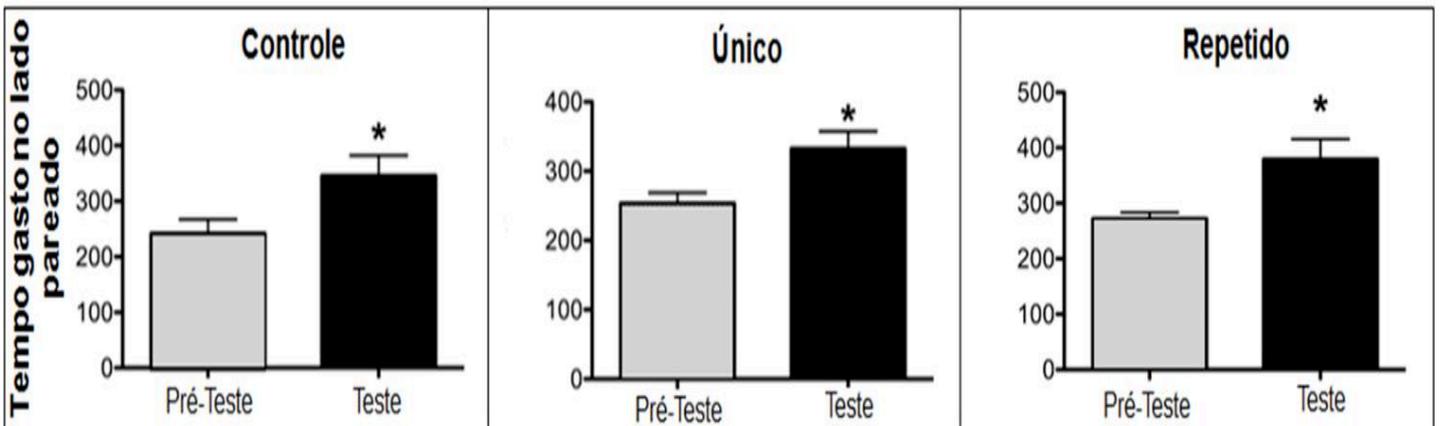


Figura 16: Comparação do tempo gasto no compartimento pareado versus o tempo gasto no compartimento de preferência natural. Barras representam média (\pm EPM). * $p < 0,05$ comparado ao respectivo pré-teste. Teste T de Student e ANOVA monofatorial.

O teste T de Student, mostrou que todos os grupos desenvolveram a preferência condicionada por lugar ($T_{1,8} = 2,30$; $p < 0,05$), porém não houve diferença na preferência entre os grupos controle x exposição única x exposições repetidas ($F_{2,50} = 0,52$; $p > 0,05$).

4.4 Autoadministração Operante de etanol em camundongos submetidos ao TER

A figura 17 mostra a quantidade de reforços obtidos nas três primeiras semanas dos animais na caixa de autoadministração operante, chamada de fase de aquisição.

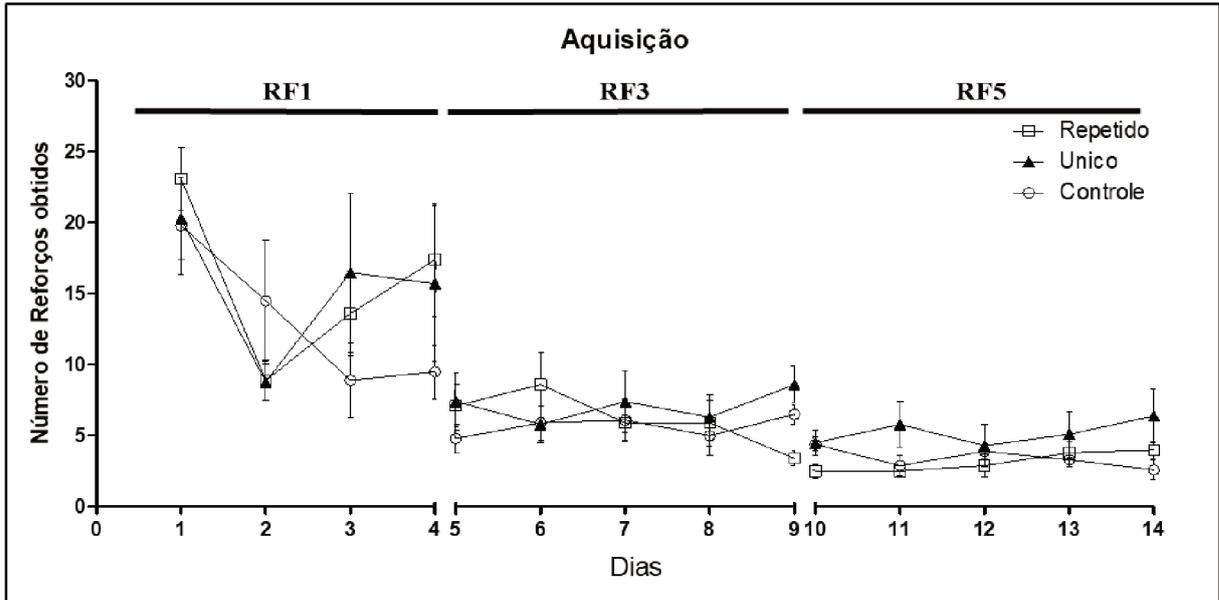


Figura 17: Número de reforços recebidos pelos animais durante a fase de aquisição do comportamento de autoadministrar etanol. Diferentes fases do aprendizado, Razão Fixa 1 (RF1), Razão Fixa 3 (RF3) e Razão Fixa 5 (RF5). Os dados representam a média e o erro de cada grupo, em cada um dos dias do treinamento. ANOVA monofatorial.

Durante a fase de aquisição não houve diferença entre os grupos no número de reforços recebidos, em nenhum dos dias, como mostrado pela ANOVA monofatorial ($F_{2,21} = 2,42$; $p > 0,05$), mostrando que os animais de todos os três grupos adquiriram o comportamento de ingestão de etanol.

A figura 18 mostra o *breaking point* (ponto de ruptura, A), dado mensurado a partir do último reforço obtido, mostra também o número de vezes que o *nose poke* ativo foi acionado (B) e número de reforços obtidos (C) durante as sessões de RP3.

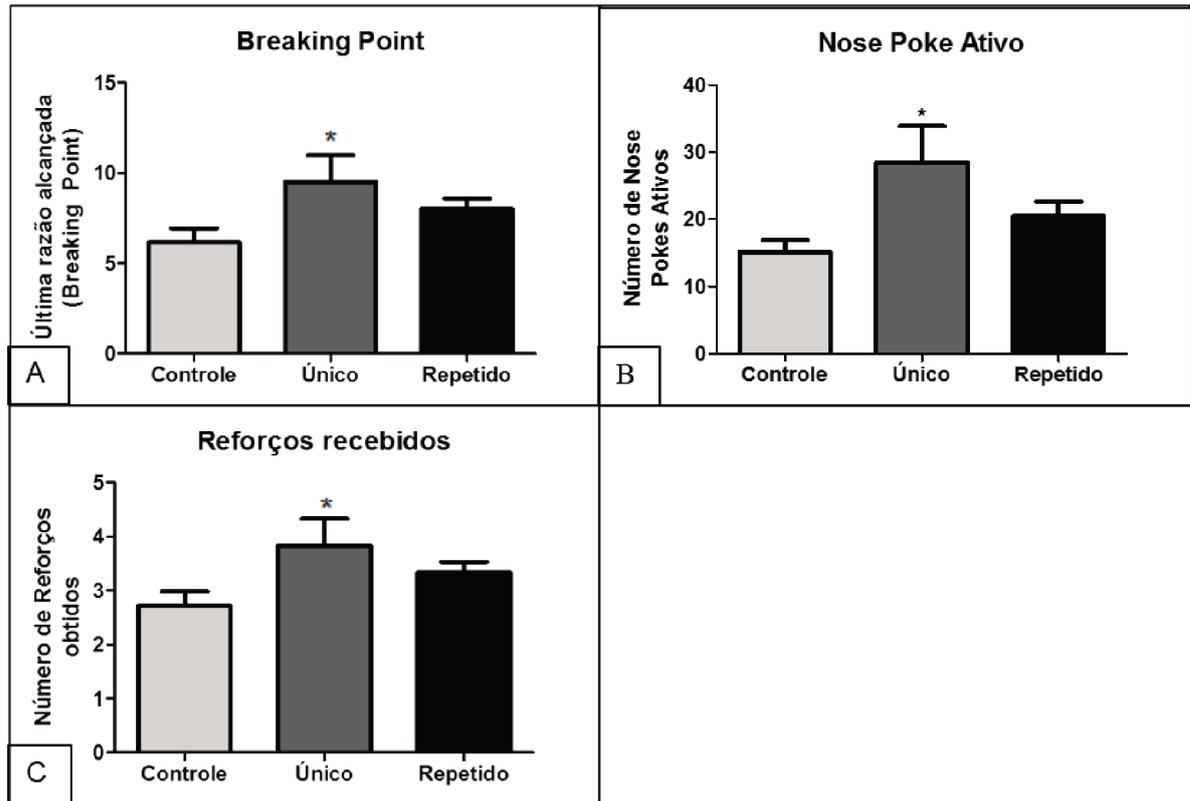


Figura 18: Comportamentos exibidos pelos camundongos durante a semana de razão progressiva do protocolo de autoadministração. **A:** Representação da última razão alcançada durante a razão progressiva 3; **B:** Número de vezes que os animais acionaram o *Nose Poke* ativo, e; **C:** Número de reforços obtidos durante a semana. Barras representam média (\pm EPM). * $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo controle. ANOVA monofatorial com post hoc de Duncan.

O *Breaking Point* aumentou no grupo estressado uma única vez em comparação com o grupo controle ($F_{2,20} = 2,49$; $p < 0,05$). Houve aumento também no número de *nose pokes* ativos realizados pelos animais do grupo único comparado com o controle ($F_{2,20} = 3,36$; $p < 0,05$). O número de reforços obtidos também foi maior no grupo único comparado ao grupo controle ($F_{2,20} = 2,49$; $p < 0,05$).

A figura 19 mostra a quantidade de reforços obtidos na sessão de quatro horas de *binge*.

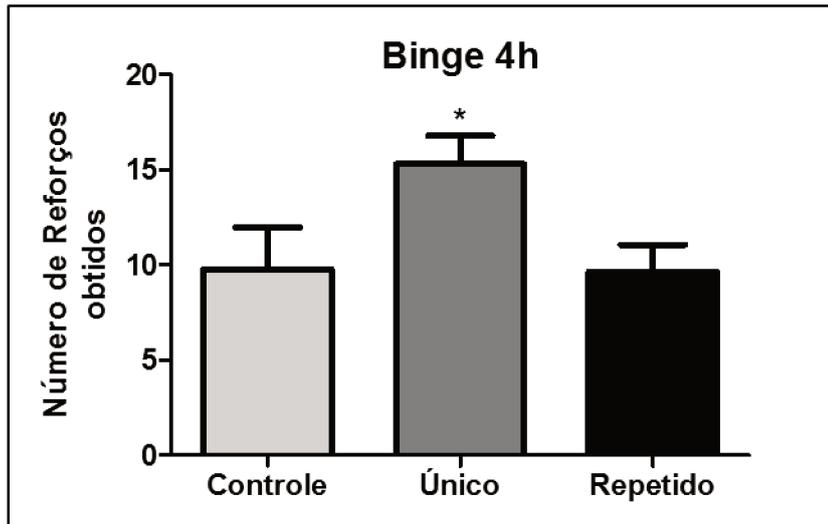


Figura 19: Número de reforços obtidos durante a sessão de *binge* de 4h de duração. Barras representam média (\pm EPM). * $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo controle. ANOVA monofatorial com post hoc de Duncan.

A ANOVA monofatorial com post hoc de Duncan mostrou que houve aumento na quantidade de reforços obtidos na sessão de *binge* pelo grupo único quando comparado ao grupo controle ($F_{2,20} = 3,13$; $p < 0,05$).

4.5 Análise das mudanças na expressão gênica de CB1 e CRFR1 na amídala por RT-PCR tempo real (RT-qPCR)

A figura 20 mostra a diferença relativa na expressão do gene que codifica o receptor CB1 (A) e o receptor CRF1 (B) através da detecção de seus RNAs mensageiros na Amídala de animais expostos ao TER seguidos do protocolo de AA.

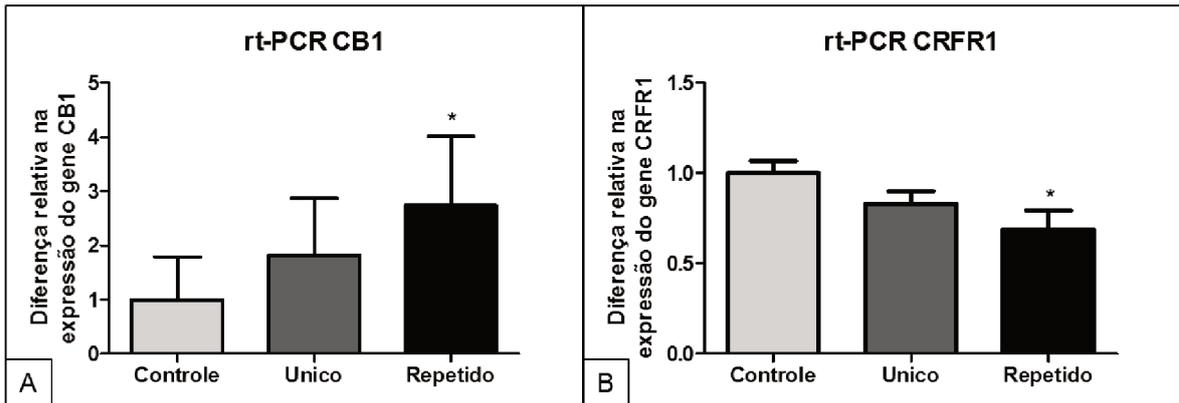


Figura 20: Expressão relativa dos genes analisados pela rt-PCR, os resultados estão expressos em quantas vezes os grupos tratados foram diferentes do grupo controle. **A:** Gene CB1; **B:** Gene CRFR1. Barras representam média (\pm EPM). * $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo controle. ANOVA monofatorial com post hoc de Duncan.

A ANOVA monofatorial com post hoc de Duncan mostrou que o grupo estressado repetidamente aumentou 2,73 vezes a expressão do gene CB1 em relação ao controle ($F_{2,10} = 2,69$; $p < 0,05$). Com relação ao gene CRFR1, o mesmo teve sua expressão 0,68 vezes menor no grupo repetido comparado ao controle ($F_{2,10} = 3,5$; $p < 0,05$).

5 DISCUSSÃO

De acordo com nossos resultados, os animais da linhagem Swiss (Suíços) demonstraram que quando estressados repetidamente através da exposição a um rato de verdade, o nível de células positivas para Fos na CeA é menor quando comparado aos grupos não expostos. Esse resultado talvez não esperado, pode ser um indicativo de um possível efeito adaptativo ao estresse, pois o menor número de células Fos-positivas significa menor ativação neuronal avaliada após a última das cinco exposições. Apesar disso, nosso trabalho corrobora os resultados já publicados de Hoffman et al., (2013), onde ratos Sprague-Dawley machos que passaram por dois dias de estresse de restrição, apresentaram menor número de células positivas para Fos na CeA comparados aos seus controles não estressados. Não é fácil explicar como ocorre, do ponto de vista neural tal resposta, contudo é sabido que esse núcleo amígdalar recebe dentre as muitas, projeções neuronais GABAérgicas (NIE et al., 2004), e, se assim, a liberação maciça de GABA após sucessivas exposições poderiam desencadear a diminuição da atividade neural devido a já sabida atividade inibitória do GABA.

De modo surpreendente, os camundongos da linhagem C57BL/6, apresentaram resposta oposta aos Suíços. O grupo exposto ao rato de verdade repetidas vezes apresentou maior expressão de Fos na CeA comparado ao seu Controle (grupo não exposto repetido). Do ponto de vista estímulo aversivo x ativação da amígdala, talvez esse resultado seria o mais esperado, uma vez que o núcleo central da amígdala está, sabidamente, muito relacionado com a mediação das respostas frente a estímulos aversivos como aquelas do tipo medo e, por isso poderíamos esperar que os animais exibissem maior ativação dessa região como ocorreu com os da linhagem C57BL/6. Esse resultado corrobora os trabalhos de Skórzewska et al., (2015) e Kovács et al., (2018) que mostraram que ratos Wistar estressados por contenção ou por condicionamento de choque na pata, exibiram maior expressão de células Fos-positivas na CeA, sendo que, no último, a expressão de Fos foi revertida com a administração aguda de midazolam, um fármaco benzodiazepínico com atividade ansiolítica/sedativa bastante conhecida.

Quando comparadas as duas linhagens (Suíços e C57BL/6), os camundongos Suíços apresentaram uma taxa basal de expressão de Fos maior que nos camundongos C57BL/6, dado esse que mostra provável menor limiar para ativação dessa região, se mostrando então,

mais reativo ao TER. Interessantemente, por ocorrer menor expressão de Fos nos camundongos suíços quando expostos repetidas vezes ao rato e um aumento na expressão nesse mesmo grupo (exposto repetido) na linhagem C57BL/6, esses dois grupos foram os únicos que não apresentaram diferença significativa entre as linhagens.

Uma vez que observamos que os animais da linhagem C57BL/6 exibiram elevação da expressão de Fos na CeA e também devido à necessidade local, onde tivemos problemas de suprimento de camundongos Suíços pelo biotério local, prosseguimos os demais experimentos com os animais C57BL/6. Contudo, antes foram feitos testes no TER para verificar se os camundongos dessa linhagem também tinham o rato Long Evans como estímulo aversivo. Esses testes preliminares foram realizados por Bertagna et al., 2018 (dados não publicados) e foi demonstrado que os animais C57BL/6 também evitavam a área desprotegida do TER, mostrando que, para esses animais o rato Long Evans também era um estímulo aversivo.

Com relação aos comportamentos relacionados a ansiedade, os animais estressados, ou seja, expostos ao TER, bem como seus controles (não expostos) foram submetidos a dois conhecidos testes de ansiedade, o Campo Aberto (CA) e o Labirinto em Cruz Elevado (LCE), 24 horas após a última (repetido) ou a única exposição.

No campo aberto, os animais expostos uma única vez ao rato, quando comparado ao grupo não exposto, exibiram maior tempo de permanência no centro do campo aberto, denotando um comportamento do tipo ansiolítico. Este dado obtido é contraditório com o esperado, visto que os animais estressados permaneceram mais tempo no lugar mais aversivo desse aparato.

Os estudos de Sturman et al., 2018 feito com camundongos C57BL/6J machos mostraram que quando os animais foram estressados por nado forçado, eles permaneceram menos tempo no centro quando comparado com os controles, porém nesse mesmo estudo, tais autores realizaram um estresse de contenção e não houve diferença no tempo de permanência no centro do aparato, mostrando que os diferentes tipos de estresse podem influenciar de modo diferente na expressão de comportamentos relacionados a ansiedade.

No trabalho de Kuniishi et al., (2017), os pesquisadores observaram que o estresse de privação precoce em ratos Sprague-Dawley não alterou o tempo de permanência no centro do

campo aberto, mais uma vez, mostrando que esse comportamento responde de maneira diferente aos diferentes tipos de estressores.

Apesar de encontrarmos resultados contraditórios na literatura, temos consciência que, no caso desse trabalho, o resultado foi diferente, ou seja, em linhas gerais, a exposição ao TER produziu no animal comportamentos do tipo ansiolítico no Campo Aberto. Esse resultado é de difícil analogia e explicação, mas pode indicar que talvez o TER não seja um estresse tão intenso a ponto de induzir resposta do tipo ansiosa como ocorre com outros estressores. Contudo, o fato aqui é que não somente não houve resposta tipo ansiosa como houve do tipo ansiolítica, e isso sim torna a compreensão ainda mais complexa. Outra situação que poderia ser levantada é que o estresse no TER poderia ter aumentado a locomoção do animal e essa estar influenciando no resultado. Contudo observamos que não houve alterações nos cruzamentos e na deambulação total em nenhum grupo o que invalida a suposição acima. Um fato que deve ser pontuado é que tal efeito ocorreu somente na exposição única ao rato e não na repetida e, além disso, a resposta ocorreu somente em um modelo, o CA e não no LCE, o que enfraquece a ideia de que esse estímulo, o TER, é gerador de resposta do tipo ansiolítica, até porque no LCE foi observada resposta, embora leve, tipo ansiogênica (aumento de avaliação de risco, discutido posteriormente).

Devido a esse resultado conflituoso, esse experimento deverá ser repetido no laboratório futuramente para uma verificação mais apurada a fim de que se verifique se corresponde a um efeito pontual isolado, ou um efeito que se repetirá e, caso isso ocorra, serão necessários mais estudos para melhor compreender esse inesperado, porém muito curioso efeito.

Os outros parâmetros analisados no CA, número de cruzamentos dos quadrantes e distância total percorrida, revelaram que não houve diferença na deambulação dos animais estressados comparados ao controle. O resultado da distância total percorrida é corroborado em outros trabalhos, como o de Kuniishi et al., (2017), e no estresse de contenção do trabalho de Sturman et al., (2018), porém no estresse de nado forçado, os ratos percorreram menores distâncias.

No modelo do Labirinto em Cruz Elevado, os animais não mostraram nenhuma diferença nos comportamentos espaço-temporais (%EBA e %TBA). Esses comportamentos são comumente utilizados como indicadores de ansiedade nos animais, pois são o número de

entradas e o tempo gasto na região mais aversiva do aparato que compreende os braços abertos. Os animais submetidos ao TER, não aumentaram esses parâmetros (%EBA e %TBA), mas por outro lado, também não diminuíram como o esperado, pois animais mais estressados, buscam explorar menos as regiões que apresentam possível ameaça. Ortolani et al., (2014) em seu estudo com ratos Wistar, obtiveram resultados mostrando que os animais evitavam os braços abertos do aparato após estresse crônico imprevisível. Além disso, Korczeniewska et al., (2017) demonstraram no trabalho com ratos Sprague-Dawley que o estresse de restrição crônico não alterou o tempo de permanência no braço aberto, porém aumentou o número de entradas comparado com animais não estressados, demonstrando também neste trabalho o discrepante resultado do estresse aumentando o número de entradas nos braços abertos (efeito ansiolítico), como ocorreu no nosso trabalho, com a diferença que a resposta discrepante foi no CA e não no LCE

. Embora não tenha sido observada alteração nos parâmetros espaço-temporais, dentro dos comportamentos complementares, foi sim observada uma significativa elevação na expressão de mergulho protegido no grupo exposto uma única vez ao rato no TER. Esse comportamento de mergulho realizado na plataforma central é um sinal de maior expressão de avaliação de risco, sinalizando elevação do estado de ansiedade, ou seja, os animais expostos uma vez ao rato expressaram mais esse comportamento tipo ansiogênico. Diferentemente do observado no CA, esse resultado era mais esperado, o que seria um indicativo de que o TER agudamente, ou seja, uma vez, é capaz de induzir efeito tipo ansiogênico, ainda que leve, devido ao não efeito nas medidas espaço-temporais, mas nas complementares. O fato de não ter esse efeito na exposição repetida é curioso, porém pode ser devido ao fato que as exposições repetidas podem ter tirado o efeito aversivo agudo, uma vez que o camundongo poderia observar que o rato apesar de presente não o atacava devido a tela.

Nos estudos em que avaliamos o efeito do TER sobre os comportamentos relacionados a dependência ao etanol, no modelo da Preferência Condicionada por Lugar (PCL), foi avaliado o papel do ambiente na associação ao estímulo relacionado ao etanol através do estabelecimento da preferência condicionada por lugar induzida pelo etanol, e nesse experimento foi observado como resultado que todos os grupos aumentaram a preferência pelo local onde previamente tinham sido pareados com etanol. Entretanto, não houve diferença entre os diferentes grupos (não exposto, exposição única e exposição repetida), denotando uma incapacidade do estresse presa-predador em aumentar a busca pela droga

quando comparado com animais não estressados. Esse resultado é semelhante ao de Manjoch et al., 2016, onde o estresse de exposição ao odor da urina do predador não foi capaz de aumentar a preferência por lugar induzida por etanol.

Quando se fala de estresse influenciando uso abusivo e dependência de drogas de abuso, ainda não é explicado exatamente na literatura como os diferentes tipos de estressores modulam os comportamentos frente às drogas. Por exemplo, o estresse de separação materna pode aumentar ou diminuir o consumo de etanol baseado no sexo, duração da separação e na concentração da solução oferecida (CRUZ et al., 2008). É sabido que o etanol possui propriedades ansiolíticas, então estressores teriam capacidade de aumentar o consumo dessa substância com a finalidade de diminuir a ansiedade causada por eles. Contudo, o consumo de etanol também pode ativar o eixo HHA e outras vias de estresse, podendo então ser um estressor por si mesmo (BECKER; LOPEZ; DOREMUS-FITZWATER, 2011), e assim regular negativamente o comportamento de uso e dependência de drogas de abuso, como o etanol.

Esse efeito contraditório de diferentes tipos de estressores está presente também em outras drogas, como o estresse de derrota social, que pode diminuir o consumo de etanol, e intensificar o comportamento de autoadministração de cocaína (BOYSSON et al., 2011) mas sem alterar a autoadministração de heroína (CRUZ et al., 2011).

Nesse trabalho, os camundongos foram expostos uma única ou 5 vezes ao rato, e talvez a intensidade desse estresse não foi capaz de alterar a busca pelo etanol no modelo da PCL, seja por um processo adaptativo a esse tipo de estresse durante as repetidas exposições ou apesar da exposição a um predador ser intensa, não seja capaz de aumentar o consumo de etanol. Por esses motivos, realizamos outro modelo que avalia aspectos do uso abusivo do etanol, no qual envolve a autoadministração do mesmo.

Na autoadministração operante de etanol, todos os animais aprenderam o comportamento de autoadministrar o etanol através da ativação do *nose poke* ativo, durante a fase de aquisição. Na semana da razão progressiva, os animais foram testados quanto ao número do *breaking point* (BP), que determina a última razão alcançada; ao número de *nose poke* ativo acionados; e ao número de reforços obtidos. Os animais que foram estressados apenas uma vez mostraram maior BP quando comparado ao controle, comportamento que denota maior busca pela droga, visto que a cada razão durante a RP3, mais difícil é obter outro reforço. O trabalho de Norman et al., 2015 mostrou que um estresse moderado (trinta

ataques) de derrota social também aumentou o BP atingido quando comparado com o controle. Nossos resultados também mostram que os animais estressados uma vez aumentaram o número de *nose poke* ativos, quando comparado ao controle, parâmetro que mostra que eles buscaram mais receber a droga. Esse resultado se assemelha ao de Gondré-Lewis et al., (2016), onde ratos que passaram por protocolo de separação materna (um estresse logo no início da vida) também aumentaram o número de respostas quando treinados na autoadministração operante. O número de reforços obtidos também foi maior para o grupo único versus o controle. Esse último dado, mostra que eles conseguiram ganhar mais reforços mesmo tendo que trabalhar mais para obtê-los. O grupo estressado repetidas vezes não mudou o padrão de autoadministração quando comparado com o controle.

Durante a sessão de consumo em *binge*, os animais estressados uma única vez novamente aumentaram o número de reforços obtidos quando comparado com o grupo controle, mostrando realmente que a exposição única ao TER tem maior impacto na autoadministração de etanol. A exposição repetida, de um modo intrigante, não provocou qualquer efeito na autoadministração. Na tentativa de explicar tal resultado, emerge a possibilidade de uma adaptação emocional após as sucessivas exposições o que diminuiria a aversão e se menos aversivo, menos indução de autoadministração de etanol. Outro ponto que não pode ser descartado, já discutido acima para o modelo da PCL é que talvez o número de exposições pode não ter sido o ideal para influenciar no comportamento, embora aqui essa justificativa do número seja enfraquecida, já que uma única exposição provocou resultados robustos na autoadministração. Robustos devido ao fato de que se repetem em diversos parâmetros.

Com relação ao experimento de RT-qPCR, foi observado que, para o gene do receptor CRF1, houve uma diminuição significativa da expressão (na faixa de 0,68 vezes) no grupo exposto repetido quando comparado ao controle (não exposto). Assim, observamos que a neurocircuitaria que envolve a neurotransmissão CRFérgica, mais propriamente a que diz respeito a expressão de seu receptor tipo CRF1, estaria menos ativada nos animais que sofreram exposição repetida, uma vez que tem menos receptores expressos. Aqui também pode-se sugerir tal efeito como consequência de um possível processo adaptativo que teria o objetivo de proteger os animais que foram expostos diversas vezes ao estresse, tornando-os menos responsivos a esse evento. Se tentarmos associar esse resultado com o resultado de autoadministração, poderíamos sugerir que esse processo de adaptação observado aqui pela

queda na expressão de receptores CRF1 poderia justificar a ausência de efeitos da exposição repetida sobre a autoadministração fortalecendo, ainda que necessários estudos adicionais, a ideia de que a exposição repetida induziria uma adaptação e não intensificação do efeito aversivo. Além da evidência apontada por nossos resultados de que a CeA é um sítio importante, outros estudos também corroboram o fato, como os de Cohen et al., (2016) que mostrou que o bloqueio de receptores CRF1 na CeA diminuiu a expressão dos comportamentos do tipo ansiosos induzidos pela abstinência de nicotina, e também a hiperalgesia causada pelo uso crônico de nicotina. Esses resultados mostram que uma diminuição na ativação desse sistema (CRFérgico) pode diminuir a expressão de comportamentos associados a dependência ou relacionados às suas consequências.

Ainda relacionado ao experimento de RT-qPCR, foi observado aumento significativo na expressão do receptor canabinoide CB1 (na faixa de 2,7 vezes) no grupo exposto repetido ao rato comparado ao controle. Dessa forma, observamos que a neurocircuitaria que envolve a neurotransmissão canabinoide, mais propriamente a que diz respeito a expressão de seu receptor tipo CB1, estaria mais ativada nos animais que sofreram exposição repetida, uma vez que exibem mais receptores expressos. Esse resultado foi-nos surpreendente, mas caminha talvez, na mesma direção dos resultados acima. Se aqui também tentarmos relacionar com os resultados acima de expressão de receptor CRF1 e de autoadministração, podemos sugerir que a exposição repetida induziu aumento na expressão de receptores CB1. A atuação/ativação de receptores CB1 na amígdala central tem efeito de diminuir a ansiedade, assim como Zarrindast et al., (2008) mostra em seu trabalho com ratos Wistar, que ao usar um agonista específico para CB1 na CeA diminuiu comportamentos do tipo ansiogênico, e assim, ao diminuir a ansiedade deixamos de ter efeito sobre a autoadministração de etanol. No trabalho de Getachew et al., (2011), ratas foram treinadas para autoadministrar etanol e passaram por um processo de extinção e por final um teste de recaída, onde os animais que foram tratados com alta dose de um agonista desse receptor (30µg/kg de CP-55,940) apresentaram menos buscas pelo etanol nesse último teste. Esse resultado também é corroborado ao nosso, visto que um sistema canabinoide mais responsivo dificulta a expressão de comportamentos de autoadministração de etanol.

Assim, o efeito da exposição aguda ter aumentado a autoadministração mas a repetida ter falhado em induzir tal aumento, pode se dever ao fato que as sucessivas exposições ao TER induziram o aumento da expressão de receptores CB1 e a concomitante diminuição da

expressão de receptores CRF1, o que, em conjunto diminuiria a aversão diminuindo, então, seu efeito sobre a procura por etanol. Essa sugestão é reforçada pelos resultados encontrados com relação a expressão gênica de CB1 e CRF1. Nesse sentido, o aumento do RNAm para o CB1 estaria associado a resposta de ansiólise, já que, tendo mais receptor teremos mais ativação que no caso de CB1 levaria a tal efeito. Por outro lado, a diminuição do RNAm para o CRF1 também associaria a uma resposta de ansiólise, visto que, tendo menos receptor teremos menos ativação que no caso do CRF1 diminuiria a ansiedade, já que sua ativação tem efeito ansiogênico.

Em síntese, os resultados desse estudo nos permite inferir que a exposição ao predador, no caso camundongo ao rato, tem efeito comportamental na exposição única, ao aumentar a autoadministração de etanol em um modelo operante, e aumentar comportamentos de avaliação de risco no LCE, um efeito ansiogênico brando, além de inesperadamente e aumentar a expressão de comportamentos do tipo ansiolítico no CA, resultado esse que não aconteceu na exposição repetida. Interessantemente, nos resultados celulares, ou biomoleculares, a exposição repetida se mostra mais responsiva do que a aguda, ao aumentar o número de células fos positivas na CeA de camundongos da linhagem C57BL/6 (usada em todos os experimentos) e modular a expressão de genes (CB1 e CRF1) na amígdala de camundongos após a exposição ao TER e a autoadministração de etanol.

6 CONCLUSÃO

Todos resultados tomados em conjunto, permite-nos sugerir que o TER pode gerar ao camundongo exposto, respostas consistentes de alterações comportamentais e celulares induzidas por eventos estressores. Apesar disso, estudos adicionais precisam ser realizados, abrindo uma ampla possibilidade de estudos futuros em neurociências.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, A. G. D.; ANTHONY, J. C.; SILVEIRA, C. M. Álcool e suas consequências: uma abordagem multiconceitual. Barueri (SP): Minha Editora, 2009.

ANDRADE, L.; WALTERS, E.E.; GENTIL, V.; LAURENTI R. Prevalence of ICD-10 mental disorders in a catchment area in the city of São Paulo, Brazil. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol.* Jul;37(7):316-25. , 2002.

<https://doi.org/10.1007/s00127-002-0551-x>

ADAMEC, R.; BERTON, O.; ABDUL RAZEK, W. 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 plasticity*, 2009.

<https://doi.org/10.1155/2009/904568>

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (APA). Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-5®). American Psychiatric Pub, 2013.

<https://doi.org/10.1176/appi.books.9780890425596>

ARZT, 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>

BACHION, M. M. et al. Estresse, ansiedade e coping: uma revisão dos conceitos, medidas e estratégias de intervenção voltadas para a prática de enfermagem. *Revista mineira de enfermagem*, v. 2, n. 1, p. 33-39, 1998.

BAHI, A.; DREYER J.L. Involvement of tissue plasminogen activator "tPA" in ethanol-induced locomotor sensitization and conditioned-place preference. *Behav Brain Res.* Jan 1;226(1):250-8, 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.09.024>

BAHI A. Increased anxiety, voluntary alcohol consumption and ethanol-induced place preference in mice following chronic psychosocial stress. *Stress*. Jul;16(4):441-51, 2013.

<https://doi.org/10.3109/10253890.2012.754419>

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>

BENTO, B.R.N.T. et al. Impacto dos PEC's na reabilitação de alcoólicos crônicos. Dissertação de Mestrado. 2015

BECKER, H.C.; LOPEZ, M.F.; DOREMUS-FITZWATER, T.L. Effects of stress on alcohol drinking: a review of animal studies. *Psychopharmacology*, v. 218, n. 1, p. 131, 2011.

<https://doi.org/10.1007/s00213-011-2443-9>

BERKE, J.D.; HYMAN, S.E. Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory. *Neuron*, v. 25, n. 3, p. 515-532, 2000.

[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)81056-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81056-9)

BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J.; GRIEBEL, G. Defensive responses to predator threat in the rat and mouse. *Curr Protoc Neurosci. Feb*; Chapter 8:Unit 8.19, 2005.

<https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0819s30>

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>

BLEGEN, M.B.; DA SILVA E SILVA, D.; BOCK, R.; MORISOT, N.; RON, D.; ALVAREZ, V.A. Alcohol operant self-administration: Investigating how alcohol-seeking behaviors predict drinking in mice using two operant approaches. *Alcohol. Mar*;67:23-36, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2017.08.008>

BHUTADA, P.S.; MUNDHADA, Y.R.; GHODKI, Y.R.; CHAWARE, P.; DIXIT, P.V.; JAIN, K.S.; UMATHE, S.N. Influence of sigma-1 receptor modulators on ethanol-induced conditioned place preference in the extinction-reinstatement model. *Behav Pharmacol. Feb*;23(1):25-33, 2012.

<https://doi.org/10.1097/FBP.0b013e32834eafe6>

BOYSON, C.O. et al. Prevention of social stress-escalated cocaine self-administration by CRF-R1 antagonist in the rat VTA. *Psychopharmacology*, v. 218, n. 1, p. 257-269, 2011.

<https://doi.org/10.1007/s00213-011-2266-8>

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

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

CASTILLO, A.R.G.L. et al. Transtornos de ansiedade. *Rev. Bras. Psiquiatr.*, São Paulo, v. 22, supl. 2, p. 20-23, Dec. 2000.

<https://doi.org/10.1590/S1516-44462000000600006>

COHEN, A.; TREWEEK, J.; EDWARDS, S.; LEÃO, R.M.; SCHULTEIS, G.; KOOB, G.F.; GEORGE, O. Extended access to nicotine leads to a CRF1 receptor dependent increase in anxiety-like behavior and hyperalgesia in rats. *Addict Biol.* Jan;20(1):56-68, 2015.

<https://doi.org/10.1111/adb.12077>

COSTARDI, J.V.V. et al. Revista da associação médica brasileira, v. 61, n. 4, p. 381-387, 2015.

<https://doi.org/10.1590/1806-9282.61.04.381>

CRUZ, F.C.; QUADROS, I.M.; PLANETA, C.S.; MICZEK, K.A. Maternal separation stress in male mice: long-term increases in alcohol intake. *Psychopharmacology (Berl)*. Dec;201(3):459-68, 2008.

<https://doi.org/10.1007/s00213-008-1307-4>

CRUZ, F.C. et al. Social defeat stress in rats: escalation of cocaine and "speedball" binge self-administration, but not heroin. *Psychopharmacology*, v. 215, n. 1, p. 165-175, 2011.

<https://doi.org/10.1007/s00213-010-2139-6>

DAVIS, M.; SHI, C. The extended amygdala: are the central nucleus of the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis differentially involved in fear versus anxiety?. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 877, n. 1, p. 281-291, 1999.

<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb09273.x>

DE CARVALHO-NETTO, E. F. Medo e ansiedade: Aspectos comportamentais e neuroanatômicos. *Arquivos Médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo*, v. 54, n. 2, p. 62-65, 2018.

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

FLEITLICH-BILYK, B.; GOODMAN, R. Prevalence of child and adolescent psychiatric disorders in southeast Brazil. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. Jun;43(6):727-34, 2004.

<https://doi.org/10.1097/01.chi.0000120021.14101.ca>

GENTIL, V.; NETO, F. L. Pânico, fobias e obsessões: a experiência do projeto AMBAN. Edusp, 1996.

GETACHEW, B.; HAUSER, S.R.; DHAHER, R.; KATNER, S.N.; BELL, R.L.; OSTER, S.M.; MCBRIDE, W.J.; RODD, Z.A. CB1 receptors regulate alcohol-seeking behavior and alcohol self-administration of alcohol-preferring (P) rats. *Pharmacol Biochem Behav.* Feb;97(4):669-75, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.pbb.2010.11.006>

GOLBIDI, S.; FRISBEE, J.C.; LAHER, I. Chronic stress impacts the cardiovascular system: animal models and clinical outcomes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Jun 15;308(12):H1476-98, 2015.

<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00859.2014>

GONÇALVES, D. M.; KAPCZINSKI, F. P. Prevalência de transtornos mentais em indivíduos de uma unidade de referência para Programa Saúde da Família em Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil. *Cadernos de saúde pública.* Rio de Janeiro. Vol. 24, n. 9, p. 2043-2053, 2008.

<https://doi.org/10.1590/S0102-311X2008000900010>

GONDRÉ-LEWIS, M.C.; WARNOCK, K.T.; WANG, H.; JUNE, H.L.JR.; BELL, K.A.; RABE, H.; TIRUVEEDHULA, V.V.; COOK, J.; LÜDDENS, H.; AURELIAN, L.; JUNE, H.L.SR. Early life stress is a risk factor for excessive alcohol drinking and impulsivity in adults and is mediated via a CRF/GABA(A) mechanism. *Stress.* 19(2):235-47, 2016.

<https://doi.org/10.3109/10253890.2016.1160280>

HERRERA, D.G.; ROBERTSON, H.A. Activation of c-fos in the brain. *Prog Neurobiol.* Oct;50(2-3):83-107, 1996.

[https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(96\)00021-4](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(96)00021-4)

HILL, M.N.; KAMBO, J.S.; SUN, J.C.; GORZALKA, B.B.; GALEA, L.A. Endocannabinoids modulate stress-induced suppression of hippocampal cell

proliferation and activation of defensive behaviours. *Eur J Neurosci.* Oct;24(7):1845-9, 2006.

<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05061.x>

HOFFMAN, A.N.; ANOUTI, D.P.; LACAGNINA, M.J.; NIKULINA, E.M.; HAMMER, R.P.JR.; CONRAD, C.D. Experience-dependent effects of context and restraint stress on corticolimbic c-Fos expression. *Stress.* Sep;16(5):587-91, 2013.

<https://doi.org/10.3109/10253890.2013.804505>

JAFFE, J.H. Drug addiction and drug abuse. In: GILMAN, A. G.; RALL, T. W.; NIES, A.S.; TAYLOR, P. (Eds.). *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics.* 8.ed. New York: Pergamon Press, 1990. p. 523-573.

JOSEPH, D.N.; WHIRLEDGE, S. Stress and the Axis: Balancing Homeostasis and Fertility. *Int J Mol Sci.* Oct 24;18(10), 2017.

<https://doi.org/10.3390/ijms18102224>

KOOB, G. F.; NESTLER, E. J. The neurobiology of drug addiction. *Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, v. 9, n. 3, p. 482-497, Sum 1997.

<https://doi.org/10.1176/jnp.9.3.482>

KOOB, G. F.; VOLKOW, N. D. Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. *The Lancet Psychiatry*, v. 3, n. 8, p. 760-773, 2016.

[https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(16\)00104-8](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(16)00104-8)

KORCZENIEWSKA, O. et al. Effects of Sex and Stress on Trigeminal Neuropathic Pain-Like Behavior in Rats. *Journal of Oral & Facial Pain & Headache*, v. 31, n. 4, 2017.

<https://doi.org/10.11607/ofph.1807>

KOVÁCS, K.J. Measurement of immediate-early gene activation- c-fos and beyond. *J. Neuroendocrinol.* Jun;20(6):665-72, 2008.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01734.x>

KOVÁCS, L.Á.; SCHIESSL, J.A.; NAFZ, A.E.; CSERNUS, V.; GASZNER, B. Both Basal and Acute Restraint Stress-Induced c-Fos Expression Is Influenced by Age in the Extended Amygdala and Brainstem Stress Centers in Male Rats. *Front Aging Neurosci.* 22;10:248, 2018.

<https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00248>

KUNIISHI, H. et al. Early deprivation increases high-leaning behavior, a novel anxiety-like behavior, in the open field test in rats. *Neuroscience research*, v. 123, p. 27-35, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.neures.2017.04.012>

LARANJEIRA, R. et al. II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas (LENAD) - 2012. São Paulo: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas de Álcool e Outras Drogas (INPAD), UNIFESP. 2014

LENT, R. Cem Bilhões de Neurônios? Conceitos Fundamentais de Neurociência-2ª edição. Brasil: Editora Atheneu, 2001.

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>

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* Dec;25(4):402-8, 2001.

<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

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

MANJOCH, H. et al. Predator-scent stress, ethanol consumption and the opioid system in an animal model of PTSD. *Behavioural brain research*, v. 306, p. 91-105, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.03.009>

MARINO, R.Jr. *Fisiologia das Emoções: introdução a neurologia do comportamento, anatomia e funções do sistema límbico*. Sarvier, 1975.

MATTSON, B. J. et al. Repeated amphetamine administration outside the home cage enhances drug-induced Fos expression in rat nucleus accumbens. *Behavioural brain research*, v. 185, n. 2, p. 88-98, 2007.

<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.07.024>

MCNAUGHTON, N.; CORR, P.J. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. *Neurosci Biobehav Rev*. May;28(3):285-305, 2004.

<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.03.005>

MICALE, V.; DRAGO, F. Endocannabinoid system, stress and HPA axis. *Eur J Pharmacol*. Sep 5;834:230-239, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.07.039>

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

<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 behaviors by corticotropin-releasing factor (CRF) type 1 receptor (CRF1) within the medial prefrontal cortex (mPFC) in 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>

MORENA, M.; PATEL, S.; BAINS, J.S.; HILL, M.N. Neurobiological Interactions Between Stress and the Endocannabinoid System. *Neuropsychopharmacology*. Jan;41(1):80-102, 2016.

<https://doi.org/10.1038/npp.2015.166>

NIE, Z. et al. Ethanol augments GABAergic transmission in the central amygdala via CRF1 receptors. *Science*, v. 303, n. 5663, p. 1512-1514, 2004.

<https://doi.org/10.1126/science.1092550>

NORMAN, K.J.; SEIDEN, J.A.; KLINKSTEIN, J.A.; HAN, X.; HWA, L.S.; DEBOLD, J.F.; MICZEK, K.A. Social stress and escalated drug self-administration in mice I. Alcohol and corticosterone. *Psychopharmacology (Berl)*. 2015

<https://doi.org/10.1007/s00213-014-3733-9>

NUNES, L.M.; JÓLLUSKIN, G. O uso de drogas: breve análise histórica e social. *FCHS*, n.4. 2007.

ORTOLANI, D. et al. Stress-induced endocrine response and anxiety: the effects of comfort food in rats. *Stress*, v. 17, n. 3, p. 211-218, 2014.

<https://doi.org/10.3109/10253890.2014.898059>

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

PLANETA, C.S., et al. Ontogênese, estresse e dependência de substâncias psicoativas. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 43, n. 3, 2007.

<https://doi.org/10.1590/S1516-93322007000300003>

RANG, M. et al., Rang et al. *Rang & Dale Farmacologia*. Elsevier Brasil, 8º Ed. 2015.

REUL, J. 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, 2002.
[https://doi.org/10.1016/S1471-4892\(01\)00117-5](https://doi.org/10.1016/S1471-4892(01)00117-5)

ROBERTS, A. J.; COLE, M.; KOOB, G. F. Intra-amygdala muscimol decreases operant ethanol self-administration in dependent rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, v. 20, n. 7, p. 1289-1298, 1996.
<https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1996.tb01125.x>

SANCHIS-SEGURA, C; SPANAGEL, R. Behavioural assessment of drug reinforcement and
addictive features in rodents: an overview. *Addict Biol.* 2006 Mar;11(1):2-38.
<https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2006.00012.x>

SKÓRZEWSKA, A.; LEHNER, M.; WISŁOWSKA-STANEK, A.;
TURZYŃSKA, D.; SOBOLEWSKA, A.; KRZAŚCIK, P.; PŁAŻNIK, A. GABAergic control of the activity of the central nucleus of the amygdala in low- and high-anxiety rats. *Neuropharmacology*. Dec;99:566-76, 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.08.039>

STURMAN, O.; GERMAIN, P.L.; BOHACEK, J. Exploratory rearing: a context- and stress-sensitive behavior recorded in the open-field test. *Stress*. Sep;21(5):443-452, 2018.
<https://doi.org/10.1080/10253890.2018.1438405>

VENGELIENE, V.; BILBAO, A.; MOLANDER, A.; SPANAGEL, R. Neuropharmacology of alcohol addiction. *Br J Pharmacol*. May;154(2):299-315, 2008.
<https://doi.org/10.1038/bjp.2008.30>

VIANNA, R. R. A. B.; CAMPOS, A. A.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Transtornos de ansiedade na infância e adolescência: uma revisão. *Revista Brasileira de Terapias Cognitivas*, v. 5, n. 1, p. 46-61, 2009.

<https://doi.org/10.5935/1808-5687.20090005>

VOGEL-SPROTT, M. et al. Alcohol and behavioral control: cognitive and neural mechanisms. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, v. 25, n. 1, p. 117-121, 2001.

<https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2001.tb02135.x>

WISE, R. A.; BOZARTH, M. A. A psychomotor stimulant theory of addiction. *Psychological review*, v. 94, n. 4, p. 469, 1987.

<https://doi.org/10.1037/0033-295X.94.4.469>

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

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

ZARRINDAST, M.R.; SARAHROODI, S.; ARZI, A.; KHODAYAR, M.J.; TAHERI-SHALMANI, S.; REZAYOF, A. Cannabinoid CB1 receptors of the rat central amygdala mediate anxiety-like behavior: interaction with the opioid system. *Behav Pharmacol. Oct;19(7):716-23*, 2008.

<https://doi.org/10.1097/FBP.0b013e3283123c83>

ANEXO A – Certificado de aprovação do comitê de ética.



Universidade Federal de Uberlândia

– Comissão de Ética na Utilização de Animais –



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto 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 ao Complexo Amígdaloide e subnúcleos da Amígdala”, protocolo nº 107/15, sob a responsabilidade de **Tarciso Tadeu Miguel** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião de **18 de março de 2016**.

(We certify that the project entitled "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 ao Complexo Amígdaloide e subnúcleos da Amígdala", protocol 107/15, under the responsibility of Tarciso Tadeu Miguel - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of March 18th, 2016).

Vigência do Projeto	Início: 02/04/2016 Término: 02/04/2019
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	<i>Mus musculus</i> / Swiss - Long Evans
Número de animais	624 - 10
Peso / Idade	30- 40g / Adulto - 300-500g/ Adulto
Sexo	Machos
Origem / Local	Biotério Central da UFU
Número da Autorização SISBIO	-
Atividade(s)	-

Uberlândia, 22 de março de 2016.

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