

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS-ICBIM
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

PAULLA GIOVANNA CABRAL DOS SANTOS

VERIFICAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO HIPOCAMPO VENTRAL E
DORSAL NAS RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS EXIBIDAS NO
LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE)

UBERLÂNDIA

2018

PAULLA GIOVANNA CABRAL DOS SANTOS

VERIFICAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO HIPOCAMPO VENTRAL E
DORSAL NAS RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS EXIBIDAS NO
LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE)

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à disciplina de TCC II como
requisito parcial para obtenção do título de
Bacharel em Biomedicina pela
Universidade Federal de Uberlândia, sob a
orientação do Professor Doutor Tarciso
Tadeu Miguel.

UBERLÂNDIA

2018

AGRADECIMENTOS

Estou feliz por chegar até aqui e poder comemorar esta tão grande e sonhada conquista. Ela só foi possível com muito esforço e apoio de pessoas queridas.

Agradeço primeiramente a Deus, por sempre estar ao meu lado, me dando forças e me sustentando nessa longa caminhada.

Esse momento foi único e de grande aprendizado e crescimento, só sendo possível pelo amparo de vocês: Mãe Luzi, meu pai George, Josy, Rodrigo e todos familiares que torcem por mim. Essa vitória também é de vocês, e “até aqui o Senhor nos ajudou, e por isso estamos alegres!”

Agradeço meus amigos de faculdade por compartilharem comigo cada experiência, por acreditarem muito mais em mim do que eu mesma. Vocês são os melhores e a todo instante me impulsionaram para esse grandioso final, em especial Amelie, Anne, Natalia, Rafaella e Victor.

Aos meus amigos de laboratório, “o espetáculo” só acontece, porque atrás dos bastidores existem muitas pessoas trabalhando, então sem vocês eu não conseguiria realizar os experimentos, escrever o trabalho, e além do mais, vocês foram meu suporte mental e psicológico também, espero sempre encontrar pessoas como vocês em meu caminho Gustavo Damaceno, Natália Bertagna e Rafaella Queiroz, vocês são grandes exemplos em minha vida.

Ao meu professor e orientador Tarciso, obrigado por me acolher e trazer ideias para o meu desenvolvimento intelectual, você deixará em mim a marca de ter contribuído para minha formação, e também por me acolher, e ser mais do que um orientador, um colega que nos mostra o lado bom dessa caminhada difícil chamada docência!

Aos meus professores em geral eu deixo o meu muito obrigado, vocês foram únicos e essenciais em seus ensinamentos, levarei todos com muito carinho em meu coração.

Amo todos vocês, e deixo um textinho do meu agrado:

“... percorri milhas e milhas antes de dormir, eu não cochilei. Os mais belos montes eu escalei, nas noites escuras de frio chorei. A vida ensina e o tempo traz o tom, pra nascer uma canção, com a fé no dia a dia encontro a solução!”

RESUMO

O controle das emoções é feito pelo sistema límbico, um sistema complexo, o qual envolve estruturas como hipocampo, hipotálamo, regiões do córtex cerebral, entre outras. Dentre as emoções, o medo é importante no processo adaptativo, pois prepara o organismo quando há um perigo iminente através das reações de luta e/ou fuga. O estresse e a ansiedade estão relacionados ao medo, ainda mais que a dentro dos transtornos de ansiedade temos reações características do medo, sem que haja algum estímulo, ou quando o mesmo existe há uma resposta mal adaptada, sendo ela inadequada ou constante e persistente. Esses eventos estressantes alteram a homeostase fisiológica, levando a consequências em todo o organismo, caracterizando a ansiedade patológica, com manifestações somáticas, psíquicas e comportamentais. O hipocampo é alvo dos efeitos deletérios causados pela estresse e ansiedade, e por isso o seu estudo se faz importante. Esse trabalho teve como objetivo avaliar as respostas defensivas comportamentais em camundongos expostos ao labirinto em cruz elevado (LCE), tratados com microinjeção de cloreto de cobalto, o qual inibe a área de estudo: hipocampo ventral (HV) ou hipocampo dorsal (HD). Os animais controles foram tratados com microinjeção de salina nos mesmos sítios. A partir dos resultados obtidos, foi possível verificar que o tratamento com cloreto de cobalto no HV de forma significativa aumentou a % de tempo dos animais nos braços abertos do LCE, assim como a frequência de entradas nesses mesmos braços; e nas medidas complementares houve menor esticada na área protegida, e maior chegada ao final do braço aberto em relação ao grupo controle. Tomados em conjunto, esses resultados demonstram comportamento do tipo ansiolítico. O tratamento com cloreto de cobalto no HD não provocou nenhuma diferença significativa em relação ao grupo controle. Assim, esse estudo demonstrou uma participação do hipocampo ventral nas respostas relacionadas a ansiedade, pelo menos no modelo do labirinto em cruz elevado, mas não do hipocampo dorsal o qual não demonstrou estar envolvido nas respostas relacionadas a ansiedade.

Palavras chaves: Ansiedade, Cloreto de Cobalto, Hipocampo Ventral, Hipocampo Dorsal, Labirinto em Cruz Elevado.

ABSTRACT

The control of the emotion is carried out by the limbic system, a complex system, which involves structures such as the hippocampus, hypothalamus, frontal cortex, among others. Fear is an important emotion in the adaptive process, because it prepares the organism when there is an imminent danger through of fight or flight reaction. Stress and anxiety are related to fear and the anxiety is the description of fear without stimuli, or when it exists, there is a bad adaptive answer, making it inadequate or constant and persistent. These stressors events change the brain homeostasis, producing consequences in the organism, leading the pathological anxiety with somatic manifestation, psychic and behavioral. The hippocampus is one of the targets of deleterious effects caused by the stress and anxiety, performing its study important. This work had the objective to evaluate the participation of dorsal hippocampus and ventral hippocampus in the modulation of the defensive behavior in mice exposed to elevated plus maze (EPM), through the use of the microinjection of cobalt chloride, which inhibits brain area microinjected: ventral hippocampus (VH) or dorsal hippocampus (DH). Defensive behavioral response in mice exposed to EPM were assessed. Results showed that treatment with cobalt chloride in the VH significantly increased the % of time in animals into the open arm and also increased frequency of entries into the same arms. Regarding complementary measures, animals performed less stretched attend posture (SAP) in the protected area and increased the number of arrival at the open arm end of in comparison to control group. Therefore, this study demonstrated participation of the ventral hippocampus in the anxiety-like behaviors in the EPM, but not dorsal hippocampus.

Keys words: Anxiety, Cobalt chloride, hippocampus, Elevated plus maze.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
1.1. Transtornos de Ansiedade e Neurobiologia das Reações de Defesa.....	9
1.2. Estruturas Encefálicas.....	10
1.3. Labirinto em Cruz Elevado.....	11
2. JUSTIFICATIVA.....	12
3. OBJETIVOS.....	13
3.1. Geral.....	13
3.2. Específico.....	13
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
4.1. Animais.....	13
4.2. Fármacos Utilizados.....	13
4.3. Cirurgia e Administração de Fármacos no Hipocampo.....	14
4.4. Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE).....	14
4.5. Análises Histológicas.....	15
4.6. Análise Estatística.....	15
4.7. Ética.....	15
4.8. Delineamento Experimental.....	15
4.8.1. Experimento 1 - Avaliação do efeito da microinjeção de Cloreto de Cobalto (CoCl ₂) no Hipocampo Ventral (HV) em animais expostos ao LCE.....	15
4.8.2. Experimento 2 - Avaliação do efeito da microinjeção do Cloreto de Cobalto no Hipocampo Dorsal (HD) em animais expostos ao LCE.....	16
5. RESULTADOS.....	16
5.1. Avaliação do efeito da microinjeção de Cloreto de Cobalto (CoCl ₂) no Hipocampo Ventral (HV) em animais expostos ao LCE.....	16
5.1.1. Análise das medidas espaço-temporais.....	16
5.1.2. Análise dos comportamentos complementares.....	17
5.1.2.1. Frequência de exibição do comportamento de esticadas.....	17

5.1.2.2. Frequência de exibição do comportamento de mergulho.....	17
5.1.2.3. Frequência do comportamento de chegada à extremidade dos braços abertos.....	18
5.1.2.4. Frequência da exibição do comportamento de levantamento.....	18
5.2. Avaliação do efeito da microinjeção do Cloreto de Cobalto no Hipocampo Dorsal (HD) em animais expostos ao LCE.....	19
5.2.1. Análise das medidas espaço-temporais.....	19
5.2.2. Análise dos comportamentos complementares.....	20
5.2.2.1. Frequência de exibição do comportamento de esticadas.....	20
5.2.2.2. Frequência de exibição do comportamento de mergulho.....	20
5.2.2.3. Frequência do comportamento de chegada à extremidade dos braços abertos.....	21
5.2.2.4. Frequência da exibição do comportamento de levantamento.....	21
6. DISCUSSÃO.....	22
7. CONCLUSÃO.....	24
8. REFERÊNCIAS.....	24
9. ANEXOS.....	28

Lista de Siglas

CBEA	Centro de Bioterismo e Experimentação Animal
CoCl₂	Cloreto de Cobalto
DSM V	Manual de Diagnóstico e Estatística dos Transtornos Mentais 5. ^a edição
HD	Hipocampo Dorsal
HIP	Hipocampo
HV	Hipocampo Ventral
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
PFC	Córtex Pré Frontal
TAG	Transtorno de Ansiedade Generalizada
TEPT	Transtorno de Estresse Pós Traumático
TER	Teste de Exposição ao Rato
TOC	Transtorno Obsessivo Compulsivo
TP	Transtorno de Pânico
USP-HC	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

1. INTRODUÇÃO

1.1 Transtornos de Ansiedade e Neurobiologia das Reações de Defesa

As emoções envolvem sensações únicas do indivíduo e que podem ocorrer em resposta a um estímulo, geralmente externo, podendo ser: raiva, medo, amor, tristeza, alegria, solidão, excitação e outros. O conjunto de estruturas encefálicas responsável pelas emoções se chama sistema límbico, um sistema complexo relacionado ao córtex cerebral, estruturas subcorticais, e outras (MARINO, 1975).

O medo é uma emoção de elevada importância para o organismo, uma vez que ele prepara o corpo para os momentos de perigo através das reações de luta e/ou de fuga, bem como outras respostas apropriadas, mediadas pelo sistema límbico e a comunicação deste com o sistema nervoso autônomo. O medo pode estar relacionado ao estresse e à ansiedade, a ansiedade pode ser a caracterização do medo, ainda que mais brando, sem que haja um estímulo externo, ou mesmo que haja, existe um padrão mal adaptado de resposta, ou seja, inadequado ou constante e persistente. Nesse sentido, essa ansiedade poderá progredir para uma ansiedade patológica (WRIGHT, 2015).

A ansiedade não patológica é uma resposta defensiva normal do ser humano, antes de um acontecimento diferente, como uma viagem, uma entrevista ou mudança de emprego, bem como uma série de desafios ou tarefas, sendo útil para adaptação e sobrevivência. Porém, se torna patológica quando, apresenta intensidade, duração e interferência desproporcionais ao esperado, fato que ao invés de ajudar se torna um grande problema na vida do indivíduo portador (BLANCHARD et al., 1993).

Esse evento estressante intenso, sendo ele motivado pelo o medo ou pela a ansiedade, altera a fisiologia humana, interferindo na homeostase do corpo, podendo levar a consequências não esperadas no metabolismo, crescimento, circulação, reprodução e resposta imune (GUNNAR; QUEVEDO, 2007; ALBRECHT et al., 2017).

Os transtornos de ansiedade são caracterizados por manifestações somáticas como alterações cardiovasculares, cefaleia, desconforto epigástrico, insônia, tensão muscular; manifestações comportamentais como inquietação, afeto negativo, hipervigilância e preocupações excessivas sobre as incertezas futuras, com base em acontecimentos reais ou imaginários; e manifestações psíquicas como agressividade, pânico, sensação de perigo iminente, prejuízo na atenção/concentração, entre outros sintomas intensos e persistentes, que afetam o estado de saúde na qualidade de vida e no rendimento do indivíduo (BARLOW, 2000; MIGUEL, 2010).

Clinicamente os transtornos de ansiedade devem ser diagnosticados e tratados conforme as características da sua classificação segundo o DSM V (2013 - Quinta Edição do Manual de Diagnóstico e Estatística de Doenças Mentais da Sociedade Americana de Psiquiatria) sendo transtornos de ansiedade: transtorno de Pânico (TP) e agorafobia, fobias específicas e fobia social, a qual se tem preferido denominar transtorno de ansiedade social, transtorno de ansiedade generalizada (TAG) e transtornos associados à ansiedade: transtorno obsessivo compulsivo (TOC) e transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) (DSM V, 2013).

Os transtornos mentais também geram impactos sociais, pela comorbidade, custos de saúde e produtividade econômica; atribuindo a estes transtornos e seus agravamentos. Estima-se que 21,5% da população brasileira é acometida por toda sua vida. Isso pode ter como consequência longos períodos de incapacidade (GONÇALVES et al., 2014).

Segundo achados epidemiológicos, transtornos de ansiedade são muito prevalentes ao longo da vida (13,6 - 28,8% dos indivíduos, dependendo de fatores como região, sexo e outros), mesmo em idade mais precoce (a partir de 11 anos) (ALONSO et al., 2004). No Brasil, de acordo com do Instituto de Psiquiatria do HC (USP), aproximadamente 12% da população sofre de ansiedade, o que representa quase 24 milhões de brasileiros com ansiedade patológica (MACHADO; SILVA; NARDI, 2012).

1.2 Estruturas Encefálicas

Dentre as estruturas sabidamente envolvidas na neurobiologia da ansiedade e das reações de defesa, temos aquelas pertencentes ao sistema límbico como a substância cinzenta periaquedutal, o hipocampo, a amígdala e seus subnúcleos e o complexo amigdalóide que envolvem estruturas como o núcleo intersticial da estria terminal (BNST – do inglês “bed nucleus of stria terminalis”) e estruturas mais anteriores como o córtex frontal sobretudo o pré-frontal medial.

De acordo com Brandão (2004), o hipocampo constitui uma área do encéfalo localizada no lóbulo temporal medial, composto por duas massas neurais, uma em cada hemisfério, encurvadas e mergulhadas nas proximidades do córtex temporal. Em suas trajetórias no sentido ventral, elas se conectam na linha mediana através das comissuras hipocâmpais e projetam-se na área septal, através do giro supra-caloso. O hipocampo está principalmente associado à formação da memória declarativa e informação espacial, aprendizagem, e cada vez mais está sendo evidenciado a sua participação na regulação do estresse (BRANDÃO, 2004; MCEWEN; GIANAROS, 2011).

De fato, o hipocampo é alvo de efeitos deletérios causados pelo estresse. Estudos indicam que a exposição do hipocampo ao excesso de cortisol, uma substância cuja liberação é aumentada pela exposição ao estresse, leva a alterações nos dendritos dos neurônios hipocâmpais, levando a sua atrofia causada pela perda de plasticidade e destruição dos dendritos, que, por consequência leva a falhas na comunicação interneuronal, ocasionando a perda ou diminuição de sinapses excitatórias pequenas e potentes para a potencialização à longo prazo, desvendando o motivo das falhas de memória durante o estresse. Estudos relacionados mostram a diminuição da neurogênese no local, devido ao estresse (MCEWEN, 1999; CHEN et al., 2013; MCGINN; PAHNG, 2017).

Com relação a resposta ao estresse, a amígdala, uma estrutura sub-cortical do lobo temporal, é responsável pela reação instintiva frente às ameaças, e por isso é chamada de “via rápida de resposta” e sua ativação é importante para a recuperação e análise emocional de informações relevantes do agente estressor. Ainda nesse sentido, o hipocampo é responsável por fazer a percepção e avaliação dos estímulos, e recuperar a memória, e por isso é chamado de “via lenta de resposta” do sistema límbico (CARRASCO; VAN DE KAR, 2003). Embora pareçam simples, essas vias são complexas e possuem conexões diferentes com áreas diferentes, mas um fato importante é que ambas participam da modulação de transtornos psicológicos como ansiedade.

1.3 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

Os modelos animais são importantes ferramentas no estudo da neurobiologia e farmacologia das psicopatologias, pois os animais são submetidos a diferentes esquemas de exposição e produzem alterações comportamentais que mimetizam ou associam aos sintomas centrais dos transtornos de humor, ansiedade e outros (CZÉH et al., 2016). O estudo em humanos de processos psicofisiológicos e psicopatológicos possui um entrave nos conceitos éticos, metodológicos e econômicos, o que leva a busca por modelos, como em roedores, os quais contribuem para o entendimento da neurobiologia de diversos distúrbios mentais/emocionais (CAMPOS et al., 2013). Nesse sentido, testes como o labirinto em cruz elevado (LCE), campo aberto, teste de exposição ao rato (TER), teste de transição claro-escuro e outros são utilizados como ferramentas importantes para estudar comportamentos relacionados a ansiedade podendo colaborar tanto no entendimento da fisiopatologia da doença, como na pesquisa de novos agentes farmacológicos para o tratamento (HANDLEY; MITHANI, 1984; PELLOW et al, 1985; LISTER, 1990).

O LCE foi desenvolvido por Handley e Mithani (1984) como um modelo para estudo da ansiedade, o qual consegue avaliar efeitos comportamentais, fisiológicos e farmacológicos; e é um dos principais modelos animais utilizados.

Através dele é possível avaliar o comportamento do animal com efeitos do tipo ansiolítico/ansiogênico, e/ou medo, bem como fármacos que alteram esses estados. Seu surgimento se deu nos anos 50, em um labirinto em Y elevado, onde observou que o animal se deparava com o estímulo de um ambiente novo, que iria provocar conflito entre o medo e a curiosidade, assim tendo uma tendência à esquivas e aproximação (MORATO, 2006).

Através dos braços abertos e fechados é possível analisar a frequência de entradas e o tempo gasto em cada braço, assim como levantamento, esticada e chegada ao final do braço aberto. Em situação fisiológica o animal irá explorar os dois tipos de braços, porém irá entrar e permanecer a maior parte do tempo nos braços fechados, devido ao efeito do tipo medo e ansiedade causado pelo aparato, assim quanto maior for o nível de ansiedade, menor será a porcentagem de entradas e tempo gasto nos braços abertos, e quanto menor ansiedade, maior será o tempo nos mesmos braços (DE REZENDE, 2012).

O motivo da aversão tem sido explicado por várias hipóteses, como a esquivas natural dos roedores em relação a novidade (MONTGOMERY, 1955), ou pelo medo da altura e/ou espaços abertos (BARNETT, 1975; PELLOW, 1986), a impossibilidade do animal em permanecer com o corpo próximo ou em contato com a superfícies verticais (TREIT; FUNDYTUS, 1989), ou estratégia evolutiva para evitar predadores, sobretudo os aéreos (GROSSEN; KELLY, 1972).

2. JUSTIFICATIVA

Os transtornos de ansiedade podem oprimir e interferir de forma evidente na qualidade de vida das pessoas. Há uma associação dos pacientes que sofrem de transtornos de ansiedade com o abuso de substâncias psicoativas e outras comorbidades, incluindo não apenas os transtornos psiquiátricos, como depressão, mas também condições médicas, incluindo doenças funcionais gastrointestinais, asma, doenças cardiovasculares, câncer, dor crônica, hipertensão e enxaqueca (HARTER; CONWAY; MERIKANGAS, 2003; ROY-BYRNE et al., 2008). Mesmo com a existência de tratamentos para ansiedade, a sua eficácia é limitada e os fatores causais, etiologia e os seus mecanismos subjacentes são mal compreendidos. Assim, o entendimento mais profundo dos mecanismos mediadores pode contribuir sobremaneira para o desenvolvimento

de novas abordagens para o tratamento, bem como da compreensão da complexa rede neural envolvida (BATESON; BRILOT; NETTLE, 2011).

3. OBJETIVO

3.1. Geral

Avaliar a participação do hipocampo ventral e dorsal na modulação das respostas defensivas comportamentais em camundongos expostos ao Labirinto em Cruz Elevado (LCE).

3.2 Específicos

Avaliar o efeito da microinjeção de Cloreto de Cobalto (CoCl_2) no Hipocampo Ventral (HV) em animais expostos ao LCE;

Avaliar o efeito da microinjeção do Cloreto de Cobalto (CoCl_2) no Hipocampo Dorsal (HD) em animais expostos ao LCE

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos (25-40g) disponibilizados pelo Centro de Bioterismo e Experimentos Animais (CBEA), os quais eram mantidos no biotério da Área de Ciências Fisiológicas no mínimo 7 dias antes do início dos experimentos e preservados sob condições controladas de temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e luz (ciclo 12/12 h, luzes apagadas às 19h) com livre acesso a alimento e água, exceto durante a realização dos testes.

4.2. Fármacos utilizados

Durante os experimentos foram utilizadas as seguintes substâncias:
 CoCl_2 (1,0 mMol/0.2 μL): bloqueador da neurotransmissão sináptica dependente de cálcio. Para avaliar a participação da área em questão foi utilizado um agente que inibe a neurotransmissão. Ele atua na transmissão sináptica, reduzindo o influxo pré-sináptico de cálcio, causando uma inibição da liberação de neurotransmissores via exocitose, com um consequente bloqueio sináptico. (KRETZ, 1984).

Cetamina (100mg/Kg) e Xilazina (10mg/Kg): anestésicos combinados

Meloxicam (2,0 mg/Kg): anti-inflamatório

Tiopental: barbitúrico depressor do sistema nervoso central, utilizado em superdose (160mg/Kg), para sacrifício dos animais, de forma indolor.

4.3. Cirurgia e administração de fármacos no hipocampo

Camundongos receberam implantação intracraniana de cânulas guias bilaterais (26 gauge) de 7,0 mm de comprimento, após anestesia com a combinação de cetamina e xilazina (100 mg/kg e 10 mg/kg, i.p.) objetivando o Hipocampo ventral ou dorsal como alvo. As cânulas foram fixadas no crânio do animal com cimento acrílico. As coordenadas estereotáxicas para implantação das cânulas guias foram baseadas em estudos anteriores (BARBALHO; NUNES-DE-SOUZA; CANTO-DE-SOUZA, 2009; MIGUEL; NUNES-DE-SOUZA, 2011), bem como no Atlas de Anatomia do Encéfalo de Camundongos de Paxinos e Franklin (2001). As pontas das cânulas guias foram posicionadas + 1,0 mm dorsal à estrutura alvo. A injeção das soluções foi feita através da inserção de uma agulha (33 gauge) de 8,0 mm de comprimento no interior das cânulas guias. A agulha de injeção foi conectada, por meio de um tubo de polietileno (PE-10), a uma microseringa Hamilton de 1 ou 2 µl. Após a microinjeção, a agulha de injeção permaneceu por mais 45 segundos no interior da cânula guia e durante todo o procedimento o animal foi contido manualmente pelo experimentador com uso de uma flanela. O movimento de uma pequena bolha de ar no tubo de polietileno durante as injeções confirmava o fluxo da solução.

4.4. Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O aparato no qual os testes foram conduzidos é feito em acrílico com revestimento de tinta óleo cinza que se constitui de dois braços abertos e opostos, medindo 31x6 cm, e dois fechados em suas três faces externas por paredes de 16,5 cm de altura, e as plataformas com a mesma medida dos braços abertos, cruzando-o perpendicularmente, o que delimita uma área central de 36 cm quadrados. O aparelho dista 30 cm do solo e a iluminação era a da sala de experimento proveniente de lâmpada branca de 60 watts, situada 200 cm acima do mesmo. Os braços abertos possuem bordas de 0,25 cm.

O animal foi posicionado na plataforma central de frente para um dos braços abertos e observado durante 5 minutos. Os comportamentos registrados foram: número de entradas nos braços abertos; número de entradas nos braços fechados; tempo de permanência nos braços abertos; número de levantamentos; número de esticadas (do inglês *stretched attend posture*, SAP) nos braços fechados; número de esticadas nos braços abertos; número de mergulhos com a cabeça (do inglês *head dipping*) nos braços abertos e número de mergulhos com a cabeça na

plataforma central. A partir destes parâmetros serão calculados: % de tempo nos braços abertos $[= (\text{tempo no aberto} \times 100)/300]$; número total de entradas $\{= \text{entradas fechado} + \text{entradas no aberto}\}$; % entradas nos braços abertos $[=(\text{número de entradas no aberto} \times 100)/ \text{número total de entradas}]$; e tempo de permanência na plataforma central $[=300 - (\text{tempo no aberto} + \text{tempo no fechado})]$.

4.5. Análises Histológicas

Após o término dos experimentos foi injetado solução de 1% de azul de Evans através das cânulas implantadas no hipocampo dorsal e ventral de todos os camundongos, de acordo com o procedimento descrito para injeção das drogas no item 4.2. Os animais foram anestesiados por uma dose excessiva intraperitoneal de Tiopental com concentração de 160mg/Kg e em seguida, sacrificados e tiveram seus encéfalos removidos. Os encéfalos foram acomodados em recipientes contendo solução de formol (10%). Posteriormente, com a ajuda de um criostato, foram feitas secções coronais de 60 μ m de espessura ao longo do trajeto das cânulas. As secções foram inspecionadas através de um microscópio e a visualização da dispersão do azul de Evans foi considerada indicativa do local da injeção.

4.6. Análise Estatística

Os resultados foram analisados por teste T de Student. Alterações significativas foram consideradas com $p < 0,05$.

4.7. Ética

Todos os experimentos foram executados de acordo com a ética e aprovados pelo o comitê local da Universidade Federal de Uberlândia (Comissão de Ética da Utilização de Animais – CEUA/UFU), protocolo número 046/2016.

4.8. Delineamento experimental

4.8.1. Experimento 1 - Avaliação do efeito da microinjeção de Cloreto de Cobalto (CoCl₂) no Hipocampo Ventral (HV) em animais expostos ao LCE

Os camundongos receberam microinjeção intra-estrutura encefálica de Cloreto de Cobalto ou veículo. Dez minutos após, cada animal foi exposto ao LCE para o registro dos comportamentos descritos no item 4.4

4.8.2. Experimento 2 - Avaliação do efeito da microinjeção do Cloreto de Cobalto no Hipocampo Dorsal (HD) em animais expostos ao LCE

Os camundongos receberam microinjeção intra-estrutura encefálica de Cloreto de Cobalto ou veículo. Dez minutos após, cada animal foi exposto ao LCE para o registro dos comportamentos descritos no item 4.4.

5. RESULTADOS

5.1 Experimento 1 - Avaliação do efeito da microinjeção de Cloreto de Cobalto (CoCl₂) no Hipocampo Ventral (HV) em animais expostos ao LCE

5.1.1 Análise de medidas espaço-temporais

A Figura 1 ilustra as medidas espaço-temporais de porcentagem de entradas e tempo de permanência nos braços abertos (desprotegidos) do labirinto, avaliados em animais submetidos ao LCE após receberem a microinjeção intra hipocampo ventral de CoCl₂.

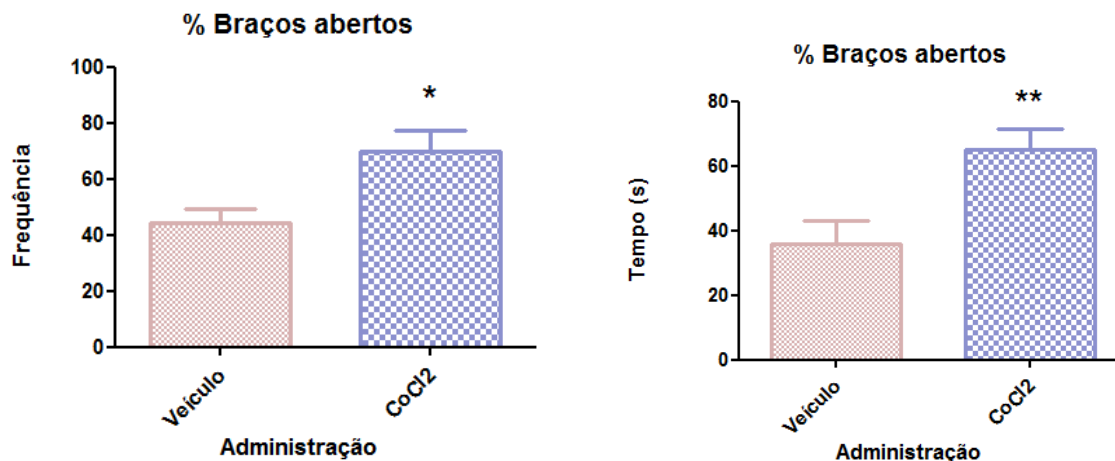


Figura 1 - Efeito da microinjeção de CoCl₂ no HV de camundongos sobre a porcentagem de entrada e de tempo de permanência nos braços abertos. As colunas representam as médias (+/- EPM). N = 9-10 animais por grupo. *p < 0,05 comparado ao grupo veículo e **p < 0,01. Teste t de Student.

O teste t de Student apontou diferenças significativas como descrito a seguir. Para o índice de porcentagem de entradas nos braços abertos, foi revelado que a microinjeção de CoCl₂ aumentou a frequência de entradas nos braços abertos [t=2.731; p < 0,0142]. Para o índice de porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos, foi revelado que a microinjeção de CoCl₂ elevou significativamente o tempo de permanência nos braços abertos do LCE [t=3.066; p < 0,0070]; evidenciando de forma dupla o efeito ansiolítico do composto.

5.1.2 Análise dos comportamentos complementares

5.1.2.1 Frequência da exibição do comportamento de esticadas

A Figura 2 ilustra o comportamento de esticada protegida (realizada no braço fechado ou plataforma central) e desprotegida (realizada nos braços abertos), avaliado em animais submetidos ao LCE após receberem microinjeção intra HV de CoCl_2 (1,0 nmol/0,2 μL)

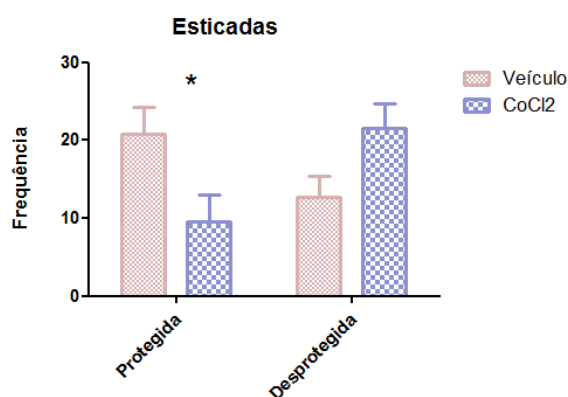


Figura 2 – Efeito da microinjeção de CoCl_2 (1,0 nmol/ 0,2 μL) no HV de camundongos sobre o comportamento esticada. As colunas apresentam a média (+/- EPM). N = 9-10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo veículo. Teste t de Student.

O teste revelou diferença significativa da microinjeção de CoCl_2 (1,0 nmol/ 0,2 μL) no HV sobre o comportamento de esticada protegida [$t = 2,496$; $p < 0,05$], mas não indicou diferença significativa no comportamento de esticada desprotegida [$t = 1,995$; $p > 0,05$].

5.1.2.2 Frequência da exibição do comportamento de mergulho

A figura 3 ilustra o comportamento de mergulho avaliado em animais submetidos ao LCE após receberem microinjeção intra HV de CoCl_2 (1,0 nmol/ 0,2 μL).

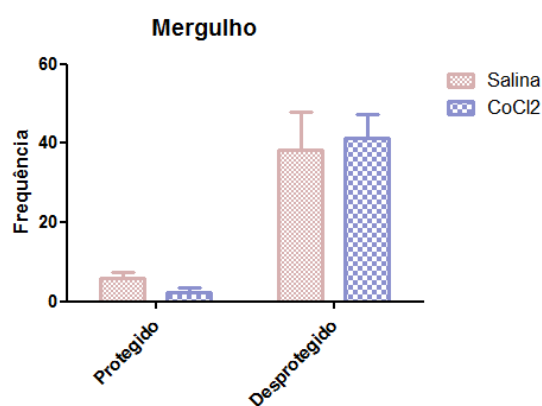


Figura 3 – Efeito da microinjeção de CoCl_2 (1,0 nmol/ 0,2 μL) no HV de camundongos sobre o comportamento mergulho. As colunas apresentam a média (+/- EPM). N = 9-10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo veículo. Teste t de Student.

O teste t para medidas independentes não demonstrou diferença significativa para mergulho desprotegido (realizado nos braços abertos do aparato) [$t = 0,3791$; $p > 0,05$] e mergulho protegido (realizado na plataforma central) [$t = 0,4617$; $p > 0,05$].

5.1.2.3 Frequência da exibição do comportamento de chegada à extremidade dos braços abertos

A figura 4 ilustra o comportamento de chegada à extremidade dos braços abertos avaliados em animais submetidos ao LCE após receberem a micro injeção intra HV de CoCl_2 (1,0 nmol/0,2 μL).

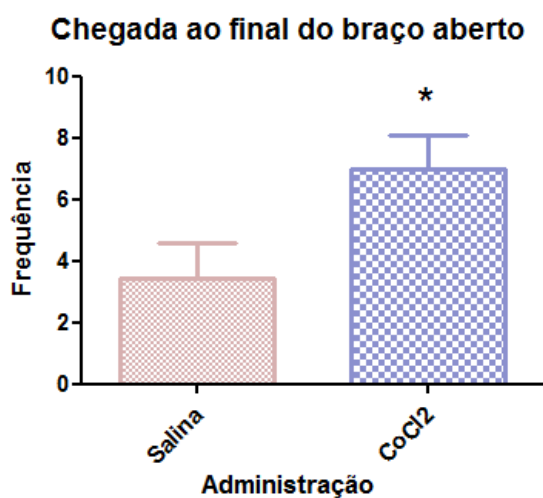


Figura 4 - Efeito da microinjeção de CoCl_2 (1,0 nmol/ 0,2 μL) no HV de camundongos sobre o comportamento de chegada à extremidade dos braços abertos. As colunas apresentam a média (+/- EPM). N = 9-10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo veículo. Teste t de Student.

O teste t para medidas independentes revelou diferença significativa entre os grupos veículo e CoCl_2 (1,0 nmol/ 0,2 μL) [$t = 2,222$; $p = 0,0402$], indicando o efeito ansiolítico causado pelo composto.

5.1.2.4 Frequência da exibição do comportamento de levantamento

A figura 5 ilustra o comportamento de levantamento avaliados em animais submetidos ao LCE após receberem a micro injeção intra HV de CoCl_2 (1,0 nmol/ 0,2 μL).

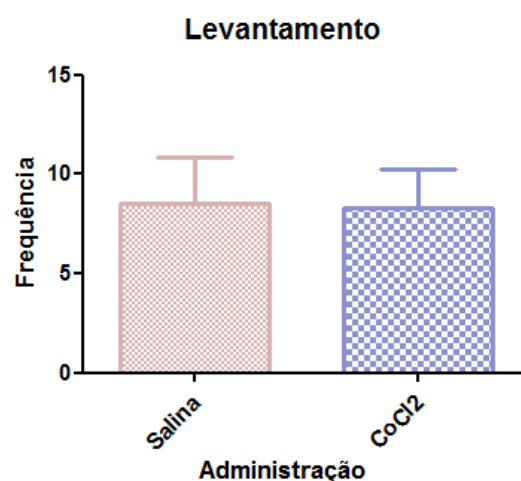


Figura 5 - Efeito da microinjeção de CoCl_2 (1,0 nmol/ 0,2 μL) no HV de camundongos sobre o comportamento de chegada à extremidade dos braços abertos. As colunas apresentam a média (+/- EPM). N = 9-10 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo veículo. Teste t de Student.

O teste T de para medidas independentes não revelou diferença significativa entre os grupos veículo e CoCl_2 (1,0 nmol/ 0,2 μL) [$t = 0,08545$; $p = 0,9329$].

5.2 Experimento 2 - Avaliação do efeito da microinjeção do Cloreto de Cobalto no Hipocampo Dorsal (HD) em animais expostos ao LCE

5.2.1. Análise das medidas espaço-temporais

A Figura 6 ilustra as medidas espaço-temporais de porcentagem de entradas e tempo de permanência nos braços abertos (desprotegidos) do labirinto, avaliados em animais submetidos ao LCE após receberem a microinjeção intra hipocampo dorsal de CoCl_2

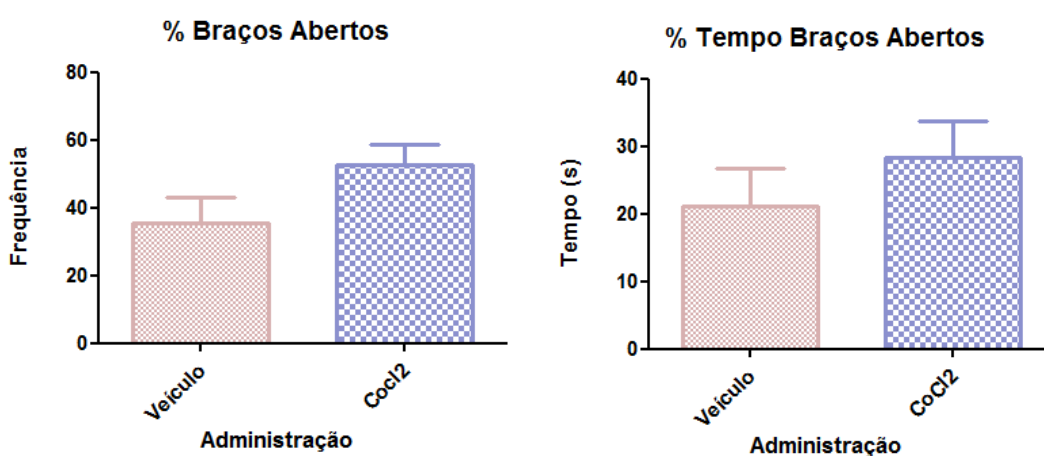


Figura 6 - Efeito da microinjeção de CoCl_2 (1,0 nmol/0,2 μL) no HD de camundongos sobre a porcentagem de entrada e tempo de permanência nos braços abertos. As colunas representam as médias ($\pm$ EPM). N = 9 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo veículo. Teste t de Student.

O teste t de Student para medidas independentes não revelou diferença significativa nem para o índice de porcentagem de entradas nos braços abertos, [$t = 1,812$; $p = 0,0888$] ou para o índice de porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos, [$t = 0,9146$; $p = 0,3740$];

5.2.2 Análise dos comportamentos complementares

5.2.2.1 Análise da frequência do comportamento de esticadas

A Figura 7 ilustra o comportamento de esticada protegida (realizada no braço fechado ou plataforma central) e desprotegida (realizada nos braços abertos), avaliado em animais submetidos ao LCE após receberem microinjeção intra HD de CoCl_2 (1,0 nmol/0,2 μL)

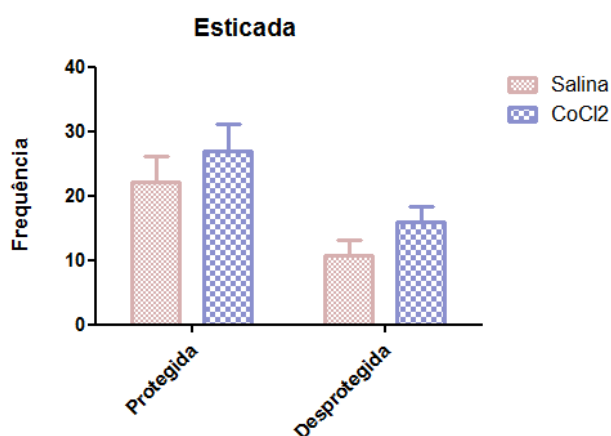


Figura 7 – Efeito da microinjeção de CoCl_2 (1,0 nmol/ 0,2 μL) no HD de camundongos sobre o comportamento esticada. As colunas apresentam a média (+/- EPM). N = 9 animais por grupo. *p < 0,05 comparado ao grupo veículo. Teste t de Student.

O teste não revelou diferença significativa da microinjeção de CoCl_2 (1,0 nmol/0,2 μL) no HD sobre o comportamento de esticada protegida [$t = 1,020$; $p > 0,05$] e esticada desprotegida [$t = 1,091$; $p > 0,05$].

5.2.2.2 Frequência da exibição do comportamento de mergulho

A figura 8 ilustra o comportamento de mergulho avaliado em animais submetidos ao LCE após receberem microinjeção intra HD de CoCl_2 (1,0 nmol/ 0,2 μL).

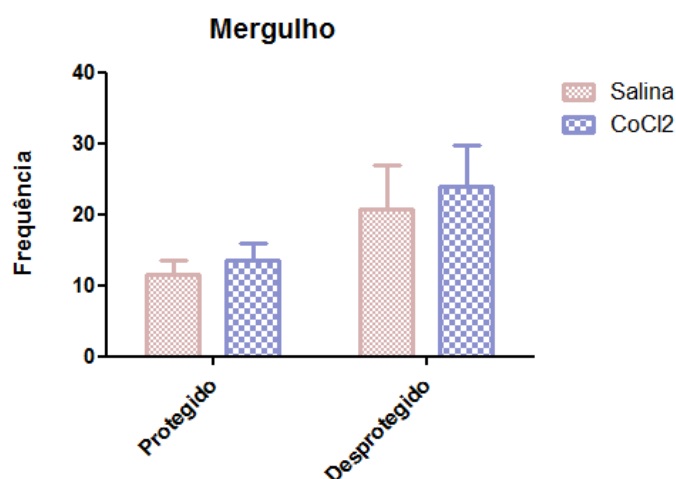


Figura 8 – Efeito da microinjeção de CoCl_2 (1,0 nmol/ 0,2 μL) no HD de camundongos sobre o comportamento mergulho. As colunas apresentam a média (+/- EPM). N = 9 animais por grupo. Teste t de Student.

O teste t para medidas independentes não demonstrou diferença significativa para mergulho desprotegido (realizado nos braços abertos do aparato) [$t = 0,3312$; $p > 0,05$] e mergulho protegido (realizado na plataforma central) [$t = 0,5230$; $p > 0,05$].

5.2.2.3 Frequência da exibição do comportamento de chegada à extremidade dos braços abertos

A figura 9 ilustra o comportamento de chegada à extremidade dos braços abertos avaliados em animais submetidos ao LCE após receberem a micro injeção intra HD de CoCl_2 (1,0 nmol/0,2 μL).

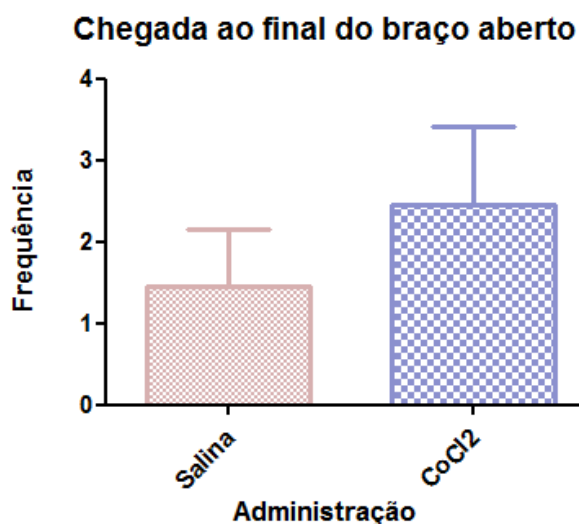


Figura 9 - Efeito da microinjeção de CoCl_2 (1,0 nmol/ 0,2 μL) no HD de camundongos sobre o comportamento de chegada à extremidade dos braços abertos. As colunas apresentam a média (+/- EPM). N = 9 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo veículo. Teste t de Student.

O teste t para medidas independentes não apresentou diferença significativa entre os grupos veículo e CoCl_2 (1,0 nmol/ 0,2 μL) [$t = 0,8303$; $p = 0,4186$].

5.2.2.4 Frequência da exibição do comportamento de levantamento

A figura 10 ilustra o comportamento de levantamento avaliados em animais submetidos ao LCE após receberem a micro injeção intra HD de CoCl_2 (1,0 nmol/ 0,2 μL).

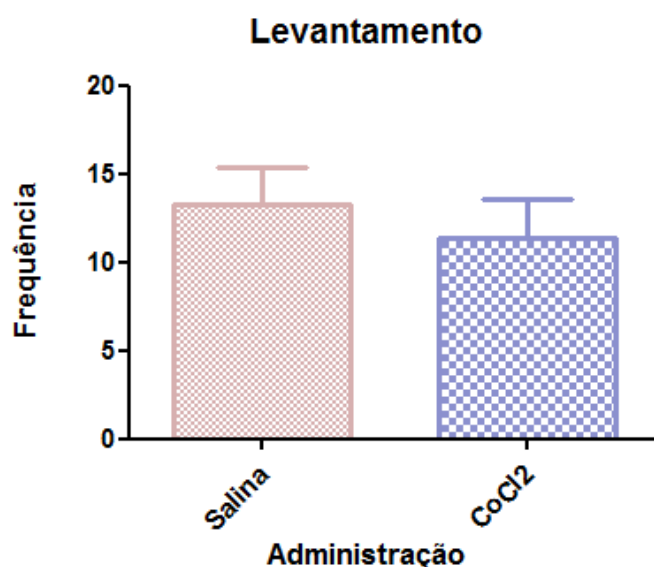


Figura 10 - Efeito da microinjeção de CoCl_2 (1,0 nmol/ 0,2 μL) no HD de camundongos sobre o comportamento de chegada à extremidade dos braços abertos. As colunas apresentam a média (+/- EPM). N = 9 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo veículo. Teste t de Student.

O teste t de para medidas independentes não revelou diferença significativa entre os grupos veículo e CoCl_2 (1,0 nmol/ 0,2 μL) [$t = 0,6130$; $p = 0,5485$].

6. DISCUSSÃO

É possível que o hipocampo possua um efeito modulatório sobre as respostas ao estresse e estudos de neuroimagem têm demonstrado ocorrerem mudanças induzidas pelo estresse excessivo em áreas como o córtex pré-frontal (PFC), amígdala e hipocampo, onde ocorre aumento da densidade no PFC, diminuição do hipocampo e aumento da amígdala (TOTTENHAM; SHERIDAN, 2010; GOLD et al, 2017).

Estudos realizados objetivando entender melhor a participação do hipocampo nas reações de defesa não são muitos e, além disso, têm demonstrado resultados incongruentes e às vezes mesmo contraditórios quanto à participação de suas porções ventral e dorsal. Contudo, sua participação é consenso ficando o entendimento de como acontece um campo aberto em neuropsicofarmacologia. Nesse sentido, o hipocampo participa da circuitaria neural que modula as reações comportamentais da ansiedade e reações de defesa e o nosso estudo objetivou entender melhor com relação às suas subdivisões.

O hipocampo é uma estrutura participante do controle cognitivo envolvida com a memória, mas que também se comporta como um regulador da emoção, e caso haja uma disfunção hipocampal essa poderá levar a psicopatologias. Sendo o hipocampo uma estrutura complexa e subdivida, e sendo suas subdivisões distintas no quesito anatômico, de conexões sinápticas e de vias aferentes e eferentes, torna-se importante avaliar as suas subdivisões: dorsal, intermediário e ventral. Neste estudo por questões de dificuldades na cirurgia e tamanho do encéfalo (usamos camundongos), estudamos duas divisões hipocampais: o hipocampo ventral e o hipocampo dorsal. Ainda nesse sentido, Fanselow (2010) mostrou que o hipocampo dorsal (HD) desempenha principalmente as funções cognitivas e que o hipocampo ventral (HV) está relacionado ao estresse, emoção e afeto, e a área intermediária é a transição entre a área ventral e dorsal.

Testes comportamentais no hipocampo dorsal que avaliam a cognição espacial e memória, como no labirinto aquático de Morris, mostram que a área é importante para aprendizagem de memória ou o processamento da tarefa. (MIYOSHI, 2009). Lesões no HD levam ao déficit na memória espacial, mas lesões no HV não geram alterações (MOSER, 1993; FERBINTEANU; MCDONALD, 2001).

Este estudo corrobora os poucos achados na literatura que pontuam diferenças na mediação de características comportamentais, funcionais e anatômicas entre as subáreas do hipocampo: ventral e dorsal (PENTKOWSKI, 2006), uma vez que foi possível observar diferenças significativas no hipocampo ventral sobre o LCE entre o grupo controle e o grupo

CoCl₂ que foi a nossa ferramenta de inibição reversível da área. Nesse sentido, foram demonstrados efeitos do tipo ansiolíticos causados pela microinjeção da droga através de comportamentos espaço-temporais e complementares. No entanto, os testes realizados com microinjeção da mesma droga no hipocampo dorsal não demonstraram nenhum efeito significativo relacionados aos comportamentos no LCE entre os grupos controle e CoCl₂.

Nossos resultados estão em acordo com os achados de Pentkowski et al (2006) que demonstraram que o hipocampo ventral, mas não o dorsal, contribui para a modulação dos comportamentos defensivos durante testes de ansiedade como os testes de exposição ao odor do gato e ao gato vivo e o teste de choque em ratos. No entanto, há achados de estudos das funções hipocâmpais que não apontam para uma igualdade, e nessa perspectiva, Canto-de-Souza et al (2015), com o objetivo de investigar a importância do sistema histaminérgico na ansiedade e memória emocional de camundongos submetidos ao LCE, indicaram a participação do hipocampo dorsal nos comportamentos relacionados a ansiedade e memória emocional. Ainda, Cornélio e Nunes-de-Souza (2007), ao pesquisarem sobre a ação de um agonista de receptores de serotonina que induz ansiedade, não encontraram resultados significativos tanto para a ação do hipocampo ventral quanto para o hipocampo dorsal. Baseando-se nesses resultados concordantes e divergentes e outros não apontados, pode-se perceber que não existe ainda uma consistência no entendimento das funções dessa estrutura, o que torna ainda mais importante seu estudo.

Certamente há diferenças entre as partes do hipocampo, já que exibem padrões de conectividade neuronais distintos e organizados (DONG et al., 2009), onde segundo estudiosos o complexo dorsal modula processos cognitivos como aprendizagem, memória, navegação e exploração e a conectividade ventral regula o impacto das experiências emocionais e controla os estados afetivos gerais (BAST, 2007; BAST et al., 2009).

Segundo Jung; Wiener; Mcnaughton (1994) uma das justificativas para tais diferenças se dá porque as regiões ventrais estão projetadas para o córtex pré frontal e ligadas à amígdala, sabidamente envolvidos com emoções enquanto as regiões dorsais estão projetadas para o córtex perirhinal, uma região importante para a memória.

Kjelstrup (2002) demonstrou que ratos com grandes lesões no hipocampo ventral exibiram menor neofobia alimentar e menor congelamento induzido por predador, mas evitavam os predadores quando possível fugir, sugerindo que nem todas as reações defensivas dependem do hipocampo ventral.

Muitas funções neuronais foram associadas ao hipocampo, tendo consigo grandes testes e evidências experimentais em estudos farmacológicos, morfológicos, eletrofisiológicos e

moleculares, que inclusive demonstram a sua alteração mediante ao estresse. O desafio a se desvendar se encontra em integrar todas as evidências encontradas e unificá-las para esclarecer o papel do hipocampo, seja ele nos efeitos cognitivos ou no estresse (JOCA; PANDOVAN; GUIMARÃES, 2003).

7. CONCLUSÃO

De acordo com nossos resultados, conclui-se que existe uma mediação hipocampal diferencial nas respostas relacionadas a ansiedade, pelo menos no modelo do labirinto em cruz elevado, no qual temos que o hipocampo ventral, mas não o dorsal estaria envolvido na modulação de comportamentos semelhantes à ansiedade em camundongos expostos ao LCE, uma vez que sua inibição promoveu comportamentos do tipo ansiolíticos.

Uma dúvida relevante que nos instiga a continuar nessa linha é saber se os modelos de ansiedade que envolvem memória como aqueles relacionados a aprendizagem são também modulados diferencialmente ou se nesses casos o hipocampo dorsal teria importância.

8. REFERÊNCIAS

- ALBRECHT, A. et al. Neurobiological consequences of juvenile stress: A GABAergic perspective on risk and resilience. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, 2017.
- ALONSO, J. et al. Prevalence of mental disorders in Europe: results from the European Study of the Epidemiology of Mental Disorders (ESEMeD) project. **Acta Psychiatrica Scand**, v.109 (Suppl. 420), p.
- BARBALHO, C. A.; NUNES-DE-SOUZA, R. L.; CANTO-DE-SOUZA, A. Similar anxiolytic-like effects following intra-amygdala infusions of benzodiazepine receptor agonist and antagonist: evidence for the release of an endogenous benzodiazepine inverse agonist in mice exposed to elevated plus-maze test. **Brain Research**, v. 1267, p. 65-76, 2009.
- BARLOW, D. H. Unraveling the mysteries of anxiety and its disorders from the perspective of emotion theory. **American Psychologist**, v. 55, n. 11, p. 1247, 2000.
- BARNETT, S. A. **The Rat: A Study in Behavior**. Rev. ed. University of Chicago Press, 1975.
- BATESON, M.; BRILOT, B.; NETTLE, D. Anxiety: an evolutionary approach. **The Canadian Journal of Psychiatry**, v. 56, n. 12, p. 707-715, 2011.
- BAST, T. Toward an integrative perspective on hippocampal function: from the rapid encoding of experience to adaptive behavior. **Reviews in the Neurosciences**, v. 18, n. 3-4, p. 253-282, 2007.
- BAST, T. et al. From rapid place learning to behavioral performance: a key role for the intermediate hippocampus. **PLoS biology**, v. 7, n. 4, p. e1000089, 2009.
- BLANCHARD, R. J. et al. Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. **Behavioural brain research**, v. 58, n. 1, p. 155-165, 1993.

- BRANDÃO, M. L. **As bases biológicas do comportamento: introdução à neurociência**. São Paulo: EPU, 2004.
- CAMPOS, A. C. et al. Animal models of anxiety disorders and stress. **Revista brasileira de psiquiatria**, v. 35, p. S101-S111, 2013.
- 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– 170, 2013.
- CANTO-DE-SOUZA, L. et al. Dorsal hippocampal microinjection of chlorpheniramine reverses the anxiolytic-like effects of l-histidine and impairs emotional memory in mice. **Neuroscience Letters**, v. 587, p. 11-16, 2015.
- CARRASCO, G. A.; VAN DE KAR, L. D. Neuroendocrine pharmacology of stress. **European journal of pharmacology**, v. 463, n. 1, p. 235-272, 2003.
- CHEN, Y. et al. Impairment of synaptic plasticity by the stress mediator CRH involves selective destruction of thin dendritic spines via RhoA signaling. **Molecular psychiatry**, v. 18, n. 4, p. 485-496, 2013.
- CORNÉLIO, A.M.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Anxiogenic-like effects of mCPP microinfusions into the amygdala (but not dorsal or ventral hippocampus) in mice exposed to elevated plus-maze. **Behavioural brain research**, v. 178, n. 1, p. 82-89, 2007.
- CZÉH, B. et al. Animal models of major depression and their clinical implications. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 64, p. 293-310, 2016.
- DE REZENDE, W. B. V. et al. Teste de labirinto em cruz elevado: aplicações e contribuições no estudo de doenças neuropsiquiátricas em modelos animais. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**, v. 1, n. 1, p. 102-120, 2012.
- DONG, et al. Genomic–anatomic evidence for distinct functional domains in hippocampal field CA1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 28, p. 11794-11799, 2009.
- DSM-V. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. American Psychiatric Association. 5ed, 2013.
- FANSELOW, M. S.; DONG, H.W. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures?. **Neuron**, v. 65, n. 1, p. 7-19, 2010.
- FERBINTEANU, J.; MCDONALD, R. J. Dorsal/ventral hippocampus, fornix, and conditioned place preference. **Hippocampus**, v. 11, n. 2, p. 187-200, 2001.
- GOLD, A. L. et al. Cortical Thickness and Subcortical Gray Matter Volume in Pediatric Anxiety Disorders. **Neuropsychopharmacology**, 2017.
- GONÇALVES, D. A. et al. Brazilian multicentre study of common mental disorders in primary care: rates and related social and demographic factors. **Cadernos de saude publica**, v. 30, n. 3, p. 623-632, 2014.
- GROSSEN, N. E.; KELLEY, M. J. Species-specific behavior and acquisition of avoidance behavior in rats. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 81, n. 2, p. 307, 1972.
- GUNNAR, M.; QUEVEDO, K. The neurobiology of stress and development. **Annu. Rev. Psychol.**, v. 58, p. 145-173, 2007.

- HANDLEY, S.L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 327, n. 1, p. 1-5, 1984.
- HARTER, M.C.; CONWAY, K.P.; MERIKANGAS, K.R. Associations between anxiety disorders and physical illness. **European archives of psychiatry and clinical neuroscience**, v. 253, n. 6, p. 313-320, 2003.
- JOCA, S.R.L.; PADOVAN, C.M.; GUIMARÃES, F.S. Stress, depression and the hippocampus. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 25, n. Supl II, p. 46-51, 2003.
- JUNG, M.W.; WIENER, S.I.; MCNAUGHTON, B.L. Comparison of spatial firing characteristics of units in dorsal and ventral hippocampus of the rat. **Journal of Neuroscience**, v. 14, n. 12, p. 7347-7356, 1994.
- KJELSTRUP, K.G. et al. Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 16, p. 10825-10830, 2002.
- KRETZ, R. Local cobalt injection: a method to discriminate presynaptic axonal from postsynaptic neuronal activity. **J. Neurosci. Methods**, v. 11 (2), p. 129-35, 1984.
- LISTER, R.G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmacology&therapeutics**, v. 46, n. 3, p. 321-340, 1990.
- MACHADO, S. et al. Eletricidade para curar o cérebro. **Neurociência: mente e cérebro**, p. 61-65, março 2012.
- MARINO JR, R. Fisiologia das emoções. **São Paulo: Sarvier**, v. 2, 1975.
- MCEWEN, B.S. Stress and hippocampal plasticity. **Annual review of neuroscience**, v. 22, n. 1, p. 105-122, 1999.
- MCEWEN, B.S.; GIANAROS, P.J. Stress-and allostasis-induced brain plasticity. **Annual review of medicine**, v. 62, p. 431-445, 2011.
- MCGINN, M.A.; PAHNG, Amanda R. Pathophysiology of affective disorders: functional interaction of stress hormones and hippocampal excitation. **Journalofneurophysiology**, v. 117, n. 2, p. 477-479, 2017.
- MIGUEL, T.T. Papel dos mecanismos mediados pelo fator de liberação de corticotrofina e pelo complexo receptor N-Metil-D-Aspartato-Óxido Nítrico nas reações associadas a estímulos aversivos. 2010.
- MIGUEL, T. T.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Anxiogenic and antinociceptive effects induced by corticotropin-releasing factor (CRF) injections into the periaqueductal gray are modulated by CRF1 receptor in mice. **Hormones and Behavior**, v. 60, p.292-300, 2011.
- MIYOSHI, E. O hipocampo dorsal e o estriado são necessários tanto para a navegação baseada em pistas quanto para a navegação espacial no labirinto aquático de Morris. 2009.
- MONTGOMERY, K. C.; MONKMAN, J.A. The relation between fear and exploratory behavior. **Journal of comparative and physiological psychology**, v. 48, n. 2, p. 132, 1955.
- MORATO, S. O papel da visão na aversão aos espaços abertos no labirinto em cruz elevado. **Psicologia USP**, v. 17, n. 4, p. 159-174, 2006.

MOSER, E.; MOSER, M.B.; ANDERSEN, P. Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. **Journal of Neuroscience**, v. 13, n. 9, p. 3916-3925, 1993.

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

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

PELLOW, S.; FILE, S. Anxiolytic and Anxiogenic Drug Effects on Exploratory Activity in an Elevated Plus-Maze: a Novel Test of Anxiety in the Rat. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, v.24, p. 525-529, 1986.

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

ROY-BYRNE, P. P. et al. Anxiety disorders and comorbid medical illness. **General Hospital Psychiatry**, v. 30, p. 208–225, 2008.

TOTTENHAM, N.; SHERIDAN, M.A. A review of adversity, the amygdala and the hippocampus: a consideration of developmental timing. **Frontiers in human neuroscience**, v. 3, p. 68, 2010.

TREIT, D.; FUNDYTUS, M. Thigmotaxis as a test for anxiolytic activity in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 31, n. 4, p. 959-962, 1988.

WRIGHT, J. D. International encyclopedia of the social and behavioral sciences. 2015.

9. ANEXO

9.1. Certificado de Aprovação do Comitê de Ética de Utilização de Animais



Universidade Federal de Uberlândia

– Comissão de Ética na Utilização de Animais –



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Avaliação comportamental e farmacológica da mediação angiotensinérgica sobre as reações de defesa em camundongos: papel do receptor AT1 e de derivados da Angiotensina II e verificação da participação do óxido nítrico, da proteína quinase C (PKC) e do CRF sobre os efeitos da angiotensina II em áreas encefálicas relacionadas – Substância Cinzenta Periaquedutal e Hipocampo”, protocolo nº 046/16, 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 **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião de **16 de setembro de 2016**.

(We certify that the project entitled "Avaliação comportamental e farmacológica da mediação angiotensinérgica sobre as reações de defesa em camundongos: papel do receptor AT1 e de derivados da Angiotensina II e verificação da participação do óxido nítrico, da proteína quinase C (PKC) e do CRF sobre os efeitos da angiotensina II em áreas encefálicas relacionadas – Substância Cinzenta Periaquedutal e Hipocampo", protocol 046/16, 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 September 16th, 2016).

Vigência do Projeto	Início: 15/10/2016 Término: 15/10/2019
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	Camundongo heterogênico Swiss e Rato heterogênico Long Evans
Número de animais	1005
Peso / Idade	30-40g e 300-500g / Adultos
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem / Local	Depositário de animais da ARFIS
Número da Autorização SISBIO	-
Atividade(s)	-

Uberlândia, 29 de setembro de 2016.

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