



**Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Ciências Biomédicas
Mestrado em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas**

RAFAELLA MISAEL QUEIROZ

**Neurobiologia das reações de defesa: avaliação celular e comportamental de
camundongos submetidos ao Teste de Exposição ao Rato**

**Uberlândia-MG
2017**



**Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Ciências Biomédicas
Mestrado em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas**

RAFAELLA MISAEEL QUEIROZ

**Neurobiologia das reações de defesa: avaliação celular e comportamental de
camundongos submetidos ao Teste de Exposição ao Rato**

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

Orientador: Dr.Tarciso Tadeu Miguel
Co-orientador: Dr.Fabio Cardoso Cruz

**Uberlândia-MG
2017**

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

Q3n
2017

Queiroz, Rafaella Misael, 1990
Neurobiologia das reações de defesa: avaliação celular e comportamental de camundongos submetidos ao Teste de Exposição ao Rato / Rafaella Misael Queiroz. - 2017.
80 f. : il.

Orientador: Tarciso Tadeu Miguel.

Coorientador: Fabio Cardoso Cruz.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.68>

Inclui bibliografia.

1. Citologia - Teses. 2. Substância Cinzenta Periaquedutal - Teses. 3. Ansiedade - Teses. 4. Camundongo - Teses. I. Miguel, Tarciso Tadeu. II. Cruz, Fabio Cardoso. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. IV. Título.

CDU: 581

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela presença constante em minha vida, iluminando meus caminhos e abençoando as minhas escolhas.

A toda minha família por estarem sempre presentes em minha vida, pelo respeito e apoio diante dos caminhos que escolhi.

A toda turma do laboratório: Bruna, Luana, Paulla, Ingrid, Lara, Maria Vitória, Victor Augusto e a todos os profissionais da ARFIS por tornarem essa caminhada tão especial, por todo cuidado e amizade.

Aos companheiros de trabalho Natalia e Gustavo por toda dedicação, cumplicidade e infinita paciência e companheirismo.

Ao meu orientador Dr. Tarciso, pela confiança em mim depositada, pelos ensinamentos, cuidado e paciência.

Ao meu co-orientador Dr. Fabio por todas as oportunidades, ensinamentos e valiosas contribuições à minha formação científica.

A Universidade Federal de Uberlândia e a Universidade Federal de São Paulo pela concessão do espaço físico, equipamentos e materiais necessários para a realização deste trabalho, bem como a todos os envolvidos.

A todos os membros da banca examinadora pelo auxílio e atenção dispensada na leitura desta dissertação.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Amígdala (AMY) e Matéria Cinzenta Periaquedutal (MCP), são importantes estruturas do sistema encefálico aversivo responsável por mediar reações de defesa em animais frente a estímulos aversivos. Sendo assim, objetivo do trabalho foi avaliar a ativação neuronal da área encefálica AMY e MCP, bem como a resposta da inativação da MCP e a atuação do neurotransmissor fator liberador de corticotrofina (CRF – do inglês “corticotropin-releasing factor”) e a via proteína quinase A (PKA) intra MCP nas respostas comportamentais de camundongos Suíços machos (30-40g) - (Comitê de ética: n°100/14/UFU) expostos ao Teste de Exposição ao Rato (TER). Para avaliar a resposta celular intra AMY e MCP verificaram-se as alterações na expressão da proteína Fos, um importante indicador de atividade neuronal. Para isso os animais foram submetidos ao TER por 10 minutos, expostos ao seu predador rato ou brinquedo (rato de pelúcia), por uma vez (protocolo agudo) ou cinco (dias intercalados, protocolo repetido), enquanto o grupo controle não foi exposto. Após o teste, os animais foram sacrificados e os encéfalos processados por imuno-histoquímica para Fos com base no protocolo desenvolvido pelo Laboratório de Neurociências e Comportamento-UNIFESP. O número de células Fos-positivas foi avaliado no software ImageJ e expresso como média±EPM, sendo significativo quando $p < 0,05$. Para avaliar as respostas comportamentais foram implantadas cânulas guias na MCP dos camundongos e, após recuperação, foram realizadas microinjeções de veículo (Salina) ou fármacos, conforme os experimentos realizados. Dessa forma, no primeiro experimento foi utilizado muscimol (agonista GABA A; dose: 0,06nmol) + baclofeno (agonista GABA B; dose: 0,6nmol) - MB, no segundo, o H89 (inibidor da PKA; doses: 2,5nmol ou 5,0nmol) e no terceiro o CP 376395 (antagonista CRF1; doses: 1,5nmol ou 3,0nmol) e expostos ao rato no TER por 10 minutos. Os testes foram gravados, os comportamentos avaliados e expressos como média±EPM, considerando significativo quando $p < 0,05$. Os resultados não indicaram diferença significativa de Fos-positivas intra AMY, considerando seu núcleo basolateral. Contudo, camundongos expostos ao rato apresentaram maior número de células que expressaram Fos intra MCP, porção dorsal, quando comparados ao grupo brinquedo e controle, tanto no teste agudo, quanto no repetido. Além disso, quando comparadas entre si, a exposição repetida induziu maior expressão de Fos que a exposição aguda indicando uma possível diferença na modulação da MCPd frente ao estresse repetido e agudo. A análise do comportamento indicou que os camundongos expostos ao rato apresentaram tendência ($p = 0,09$) à significância na redução do tempo de permanência na área mais aversiva do TER (desprotegida) e expressaram significativamente menor tempo de escalada e contato com a tela no grupo de exposições repetidas e tendência à diminuição do contato no grupo de exposição única ($p = 0,07$). Os números e os tempos de esticadas também foram ou tenderam a ser ($p = 0,06$) alterados quando comparamos exposição ao rato ou brinquedo. O tratamento intra MCP com MB aumentou o tempo de permanência dos camundongos na área mais aversiva do aparato e diminuiu ou tendeu a diminuir a exibição de comportamentos de avaliação de risco. Podemos verificar também que microinjeção de CP intra MCP de camundongos foi ansiolítico, pois houve uma elevação do tempo de permanência dos animais na área desprotegida do TER (dose: 1,5 nmol), efeito observado também com tratamento com H89, na dose de 5,0 nmol. Portanto, os resultados permitem sugerir um envolvimento da MCP, do neurotransmissor CRF e da via PKA na modulação das respostas de defesas em camundongos expostos ao TER. Além disso, parece existir diferença na modulação do estresse repetido e agudo, já que a exposição repetida induziu maior ativação neuronal intra MCPd.

Palavras chaves: Ansiedade. Amígdala. Matéria Cinzenta Periaquedutal. GABA. CRF. PKA. Teste de Exposição ao Rato.

ABSTRACT

Brain areas, such as amygdala (AMY) and periaqueductal gray (PAG), are important structures of the aversive brain system responsible for mediating defense reactions in animals against aversive stimuli. Therefore, the objective of this study was to evaluate the neuronal activation of the AMY and PAG brain area, as well as the importance of inactivation of PAG and the action of neurotransmitter corticotrophin releasing factor (CRF) and the intracellular protein kinase A (PKA) pathway in the behavioral responses of male Swiss mice (30-40g; Ethics Committee: n ° 100/14/UFU) exposed to the Rat Exposure Test (RET). To assess the cellular response within AMY and PAG, we have checked for changes in Fos protein expression, an important indicator of neuronal activity. For this, the animals were submitted to RET for 10 minutes, exposed to their predator rat (alive) or toy rat (plush rat) for once (acute) or five (interleaved days, repeated), while the control group was not exposed. After test, animals were sacrificed and its brains processed by immunohistochemistry for Fos based on the protocol developed by the Laboratory of Neurosciences and Behavior-UNIFESP. The number of Fos-positive cells was evaluated in ImageJ software and expressed as mean $\pm$ SEM, being significant when $p < 0.05$. To evaluate the behavioral responses, guideline cannula were implanted into the PAG of the mice and microinjections of vehicle (Salina) or drugs were carried out according to experiment. Experiment 1, muscimol (agonist GABA A; dose: 0.06nmol) + baclofen (GABA B agonist; dose: 0.6nmol), MB; experiment 2, H89 (PKA inhibitor, doses: 2.5nmol or 5.0nmol) and experiment 3, CP 376395 (CRF1 antagonist; doses: 1.5nmol or 3.0nmol) and exposed to RET for 10minutes. Tests were recorded, behaviors evaluated and expressed as mean $\pm$ SEM, considering significant when $p < 0.05$. Results did not indicate any significant difference of Fos-positive intra AMY. However, mice exhibited higher numbers of cells expressing Fos intra PAG when compared to the toy and control groups, both in the acute and repeated tests. In addition, when compared to each other, repeated exposure induced greater Fos expression than acute exposure indicating a possible difference in PAG modulation against repeated and acute stress. Behavioral analysis indicated that the mice exposed to the rat showed a tendency to the significance in the reduction of the time spent in the most aversive area of the RET (surface, unprotected area), significant less time climbing and contact with wire mesh screen in a group of repeated exposures and a strong tendency to decrease contact in a single exposure group ($p = 0.07$). Frequency and time of stretched attend posture were also altered or strongly tended to be altered ($p = 0.06$) when we compared exposure to the rat or toy rat. Intra PAG mouse treatment with MB increased the time spent on the most aversive area of the apparatus and decreased or tended to decrease the display of risk assessment behaviors. We also verified that microinjection of CP intra PAG of mice promoted anxiolytic-like effect, since there was an increase in the time spent of the animals in the unprotected area of the RET (dose: 1.5 nmol), an effect also observed with treatment with H89, at the dose of 5,0 nmol. Therefore, results suggest an involvement of the PAG, the CRF neurotransmitter and the PKA pathway in the modulation of the defensive responses in mice exposed to the RET. In addition, there seems to be a difference in the modulation of repeated and acute stress, since repeated exposure induced greater neuronal activation within PAG.

Key words: Anxiety. Amygdala. Periaqueductal Gray. GABA. CRF. PKA. Rat Exposure Test.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
AMY	Amídala
CP	376395 [N-(1-ethylpropyl)-3,6-dimethyl-2-(2,4,6-trimethylphenoxy)-4-pyridinamine hydrochloride
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i> Proteína de ligação do elemento de resposta ao AMP cíclico
CRF	<i>Corticotrophin Releasing Factor</i> Fator de liberação de corticotrofina
CRF1	<i>Corticotropin-releasing factor receptor type 1</i> Receptor do fator de liberação de corticotropina tipo 1
CRF2	<i>Corticotropin-releasing factor receptor type 2</i> Receptor do fator de liberação de corticotropina tipo 2
DAG	Diacilglicerol
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
H-89	Dihidrocloreto de (N-[2-(p-Bromocinamilamino) etil]-5-isoquinolinesulfonamida]
HPA	Hipotálamo-pituitária-adrenal
IP3	<i>Inositol trisphosphate</i> 1,4,5 trifosfato de inositol
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
LTE	Labirinto em T Elevado
MCP	Matéria Cinzenta Periaquedutal
PIP2	<i>Phosphatidyl inositol bisphosphate</i> Fosfatidil inositol 4,5 bifosfato
PKA	Proteína kinase A
PKC	Proteína Kinase C
PGs	Proteína G estimulatória
TER	Teste de Exposição ao Rato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
1.1 Transtornos de ansiedade	10
1.2 Testes comportamentais	12
1.3 Neurobiologia das reações de defesa.....	13
2 JUSTIFICATIVA	20
3 OBJETIVOS.....	21
3. 1 Geral	21
3.2 Específicos.....	22
4 MATERIAIS E METODOS.....	22
4.1 Sujeitos	22
4.2 Análise da expressão celular na Amígdala Basolateral (AMYb) e na Matéria Cinzenta Periaquedutal Dorsal (MCPd)	23
4.2.1 Exposição ao TER	23
4.2.2 Teste de Exposição ao Rato.....	24
4.2.2.1Aparato	24
4.2.2.2 Teste	24
4.2.3 Perfusão intracardíaca.....	25
4.2.4 Imuno-histoquímica para marcação da proteína Fos.....	26
4.2.5 Preparo e montagem das lâminas	26
4.2.6 Captura e análise de imagens	26
4.3 Análise do efeito da microinjeção fármacos na MCP – Teste Comportamental.....	27
4.3.1 Cirurgia estereotáxica	27
4.3.2 Administração de fármacos	28
4.3.3 Fármacos utilizados na microinjeção	28
4.3.4 Teste de Exposição ao Rato.....	29
4.3.4.1 Teste	29

4.3.4.2 Análise comportamental	29
4.3.5 Análise histológica dos sítios de injeção	30
4.4 Análise Estatística	30
5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	31
5.1 Estudo 1: Avaliação da ativação neuronal da AMYb e da MCPd, e das respostas comportamentais exibidas por camundongos no TER:	31
5.2 Estudo 2: Avaliação da participação da MCPd, do CRF1 e da PKA intra MCPd nas respostas comportamentais exibidas por camundongos no TER:	31
6 RESULTADOS	32
6.1 ESTUDO 1: AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO NEURONAL DA AMYB E DA MCPD, E DAS RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS EXIBIDAS POR CAMUNDONGOS NO TER:32	
6.1.1 Experimento 1.1 - Avaliação da participação da Amídala basolateral na resposta gerada pela exposição ao TER	33
6.1.1.1 Exposição aguda ao TER.....	33
6.1.1.2 Exposições repetidas ao TER	34
6.1.1.3 Exposição aguda x exposições repetidas ao TER.....	36
1.2 - Avaliação da participação da matéria cinzenta periaquedutal dorsal na resposta gerada pela exposição ao TER	36
6.1.2.1 Exposição aguda ao TER.....	37
6.1.2.2 Exposições repetidas ao TER	38
6.1.2.3 Exposição aguda x exposições repetidas ao TER.....	39
6.1.3 Experimento 1.3 – Avaliação dos comportamentos defensivos de camundongos expostos ao TER.....	40
6.1.3.1 Exposição aguda ao TER.....	40
6.1.3.2 Exposições repetidas ao TER	43
6.1.3.3 Exposição aguda comparada as exposições repetidas ao TER.....	45
6.1.4 DISCUSSÃO	48
6.2 ESTUDO 2: AVALIAÇÃO DO PAPEL DA MCPD, DO CRF E DA PKA INTRA MCPD NAS RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS EXIBIDAS POR CAMUNDONGOS NO TER:54	

6.2.1 Experimento 2.1 - Avaliação dos comportamentos defensivos expressos no TER em camundongos submetidos à inibição da atividade da MCPd, via microinjeção de baclofeno + muscimol, agonistas gabaérgicos:	54
6.2.1.2 Análise das medidas espaço-temporais	55
6.2.1.3 Análise das medidas complementares	56
6.2.2 Experimento 2.2 – Avaliação dos comportamentos defensivos expressos no TER por camundongos que receberam microinjeção de CP, antagonista CRF1, intra MCPd:	58
6.2.2.1 Análise das medidas espaço-temporais	58
6.2.2.2 Análise das medidas complementares	59
6.2.3 Experimento 2.3 – Avaliação dos comportamentos defensivos expressos no TER por camundongos que receberam microinjeção de H89, inibidor da PKA, intra MCPd:.....	60
6.2.3.1 Análise das medidas espaço-temporais	60
6.2.3.2 Análise das medidas complementares	62
6.2.4 DISCUSSÃO	63
7 CONCLUSÃO	69
8 REFERÊNCIAS	70

1 INTRODUÇÃO

1.1 Transtornos de ansiedade

Medo e ansiedade estão relacionados com as reações de defesa que envolvem respostas fisiológicas, comportamentais e emocionais exibidas frente a situações aversivas, seja por um perigo iminente real (medo) ou preocupação de que alguma coisa acontecerá no futuro próximo, um perigo potencial (ansiedade), conforme descrito na quinta edição do manual de diagnóstico de distúrbios mentais (DSM-5, 2013) e por Roberto Lent (2010). Assim, tais emoções envolvem um conjunto de respostas defensivas, exibidas antecedente ou concomitante a um evento distinto que possa tomar característica de aversivo ou desafiador, como um campeonato esportivo ou prova importante, uma entrevista ou mudança de emprego, bem como uma série de desafios ou tarefas cotidianas. Sua expressão é relativamente consistente ao longo da vida, e constitui uma “ferramenta” útil para desenvolvimento pessoal, adaptação e sobrevivência (DSM-5, 2013), desde que expressa dentro de uma normalidade. Entretanto, torna-se patológica se suas manifestações são desproporcionais em intensidade, duração e interferência, o que demonstra uma má adaptação dessas respostas, gerando um ou mais distúrbios do grupo heterogêneo denominado de transtornos de ansiedade (BERNIK; LOTUFO; GENTIL, 1997; BLANCHARD et al., 1993; WIEDEMANN, 2015). Há diversos fatores que colaboram como desenvolvimento desses transtornos tais como fatores genéticos, disfunções neurobiológicas, eventos traumáticos, problemas bioquímicos, como alterações hormonais, uso de substâncias tóxicas intencionalmente (drogas de abuso) ou não intencional (envenenamentos e contaminações), e até mesmo o estilo de vida (KENDLER et al., 1992; KENDLER, 1996; WIEDEMANN, 2015).

O diagnóstico dos transtornos de ansiedade é predominantemente clínico, baseado na presença de sintomas e história pregressa do paciente, e podem ser classificados como fobias, pânico e ansiedade generalizada (DSM-5, 2013; HETEM, 2004).

As respostas durante situações aversivas podem influenciar o sistema nervoso central, autônomo, neuroendócrino, imunológico, gastrointestinal e outros, desencadeando diversos sintomas como: inquietação, afeto negativo, aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial, tensão muscular, distúrbios gastrointestinais, dentre outros; os quais podem afetar a saúde física e psicológica interferindo significativamente na qualidade de vida das pessoas

(BARLOW, 2000; BERNIK et al., 1997; DSM-5, 2013; ESCOCARD, 2008; LINDEN, 2004; RACHMAN, 2004).

Além disso, pacientes que sofrem de transtornos de ansiedade também podem apresentar frequentemente abuso de substâncias psicoativas e outras comorbidades, compreendendo não apenas os transtornos psiquiátricos, como depressão, mas também condições médicas, incluindo doenças funcionais gastrointestinais, respiratórias e cardiovasculares, e até mesmo dor crônica e câncer (KESSLER et al., 2005; LENT, 2010; MERIKANGAS, 2003; ROY-BYRNE et al., 2008).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que os transtornos de ansiedade são prevalentes ao longo da vida (13,6% - 28,8%), mesmo em idade mais precoce (a partir de 11 anos) (ALONSO et al., 2004; KESSLER et al., 2005). Sendo mais frequente em mulheres do que em homens, cerca de 55% a 60% das pessoas com o transtorno são do sexo feminino (DSM-5, 2013). Em torno de 9% a 18% da população brasileira apresenta durante a vida pelo menos um episódio relacionado com transtornos de ansiedade e aproximadamente 12% da população foi diagnosticada, o que representa quase 24 milhões de brasileiros com ansiedade patológica (ALMEIDA-FILHO et al., 1997; MACHADO et al., 2012).

Segundo a Associação Brasileira de Psiquiatria, a depressão e a ansiedade estão em segundo lugar no ranking geral de afastamentos do trabalho, cerca de 200 mil pessoas por ano no Brasil. Só em 2013, os gastos com auxílio-doença e aposentadoria ultrapassaram R\$4 bilhões (ANMP, 2013).

Embora existam tratamentos para os transtornos de ansiedade, estes atualmente apresentam limitações. Estima-se que 50 milhões de pessoas façam uso diário de benzodiazepínicos, uma das classes de medicamentos mais utilizadas para ansiedade (CARVALHO; COSTA; FAGUNDES, 2006). Entretanto o seu uso prolongado está associado à dependência e riscos como: sonolência ao longo do dia, perda parcial da atenção, redução dos reflexos, comprometimento da memória e risco aumentado de quedas e fraturas em idosos, bem como acidentes de trabalho. Também há evidências de que mesmo doses terapêuticas podem prejudicar as funções cognitivas, que pode perdurar após a interrupção do medicamento. Podem ainda ser observados: dermatoses, obstipação intestinal, vertigens, tonturas, distúrbios renais e até mesmo intoxicação quando utilizados concomitante com outros tipos de medicamentos ou drogas como o etanol, e outros depressores do sistema nervoso central, além de risco aumentado de tentativas de suicídio, atitudes antissociais, e síndrome de abstinência quando ocorre pausa na administração (CALAIS; GARCIA, 2013; CARVALHO, 2006; GADANI, 2013; GARCIA et al., 2008). Outro importante grupo de agentes utilizados para

ansiedade são os serotoninérgicos que embora não acarretam tantos problemas como os benzodiazepínicos, podem produzir: tontura, cefaleia, sonolência, distúrbios gastrointestinais e do sono, e problemas sexuais como perda de libido (FERREIRA; SANTOS; FREITAS, 2012).

Os fatores causais e os mecanismos subjacentes relacionados à ansiedade ainda precisam ser muito bem estudados, entretanto a demanda por novos modelos para estudos desses tipos de transtornos tem sido causa de diversos entraves éticos, metodológicos e econômicos decorrentes do estudo em seres humanos de processos psicofisiológicos e psicopatológicos (ZANGROSSI JR; GRAEFF, 2004).

Tendo como base que diferentes espécies de animais compartilham a mesma história evolutiva, estudos de base foram eficientes em demonstrar semelhanças na estrutura anatômica, fisiológica, bem como em traços comportamentais. Embora alguns animais, como roedores, expressem tais traços sob formas mais simples e/ou rudimentares quando comparado com humanos, é possível estabelecer um paralelo fidedigno entre essas manifestações fisiológicas e comportamentais para o estudo da base neurobiológica das emoções (BAUM, 1999; LENT, 2010). Nesse contexto torna-se perceptível a contribuição de modelos animais para a compreensão da neurobiologia dos diversos distúrbios mentais e emocionais (ZANGROSSI JR; GRAEFF, 2004).

1.2 Testes comportamentais

A maior parte dos modelos comportamentais com roedores possui validação farmacológica com medicamentos já utilizados na clínica em humanos. Sendo assim, tais modelos propiciam o estudo dos mecanismos fisiológicos das reações de defesa com potencial aplicabilidade a psicopatologias humanas (BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2001). Embora muitos desses estudos utilizem ratos para análise dos sistemas fisiológicos e farmacológicos relacionados ao comportamento defensivo subjacente, um número crescente de laboratórios tem enfatizado o uso de camundongos para investigar potenciais substratos de distúrbios psiquiátricos, os quais também respondem de modo satisfatório aos diferentes testes comportamentais (BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2003).

Partindo dessa observação, no presente estudo, escolhemos o recente modelo etológico: Teste de Exposição ao Rato, o qual tem sido satisfatoriamente utilizado para investigar os efeitos de diferentes compostos sobre o comportamento defensivo em camundongos, que

podem expressar relação com a psicopatologia do medo e da ansiedade (BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2001; LITVIN et al., 2007).

Com base em estudos que revelam que camundongos parecem reconhecer ratos como perigosos, mesmo sem experiência anterior, apresentando comportamentos defensivos inatos, o grupo dos Blanchards da Universidade do Havaí (2004) desenvolveu um novo modelo animal que estuda a interação presa-predador denominado Teste de Exposição ao Rato (TER). Nesse modelo o camundongo (presa) é exposto a um rato (predador) desencadeando comportamentos defensivos básicos importantes para a preservação da espécie (AMARAL; SANTOS-GOMES; NUNES-DE-SOUZA, 2010; BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; CAMPOS et al., 2013; MISSLIN, 2003; YANG et al., 2004).

Camundongos, de várias linhagens, expostos ao TER expressam mais, em número e intensidade, comportamentos de avaliação de risco quando comparado com outros modelos de ansiedade normalmente utilizados, como o modelo Teste de Claro / Escuro, que consiste em colocar o animal num compartimento altamente iluminado representando uma ameaça natural aos roedores, que são animais de hábitos noturnos, e a Bateria de Testes de Defesa ao Rato, modelo que propõe exposição direta, a diferentes distâncias, entre camundongo (presa) e rato anestesiado (predador) (MORATO, 2006; NETO et al., 2007; YANG et al., 2004; ZANGROSSI; GRAEFF, 2004).

No TER o camundongo expressa comportamentos quantificáveis como tempo de permanência nos diferentes compartimentos do aparato, avaliação de risco evidenciado pela postura de esticar-se, contato com a tela que será menor em presença do rato, escalada da tela entre outros. Indicando, assim, um parâmetro para estudo das respostas relacionadas a ansiedade e ao medo.

1.3 Neurobiologia das reações de defesa

As respostas frente às situações aversivas, normalmente, envolvem três aspectos: (i) um sentimento (geralmente negativo); (ii) os ajustes fisiológicos correspondentes e (iii) o comportamento, que é um conjunto de reações motoras características de cada emoção (LENT, 2010).

Sempre que sentimos, mesmo que discretamente, certas emoções e sensações, o nosso organismo promove alterações, induzindo ajustes fisiológicos no âmbito do sistema nervoso central, autônomo, neuroendócrino e neuroimune, preparando o indivíduo para enfrentar o desafio (DARWIN, ed.2000; LENT, 2010).

Resumidamente, dentre outras respostas, o córtex e o tálamo recebem as informações sensoriais, a amígdala, por sua vez, avalia a natureza emocional, que quando aversiva, recruta um conjunto de estruturas longitudinalmente organizadas e reciprocamente interconectadas (esquematizadas na figura 1). Por exemplo, o córtex pré-frontal medial que, dentre as funções, pode ser responsável pela resposta emocional, o hipotálamo pela resposta fisiológica e a matéria cinzenta periaquedutal desencadeando respostas comportamentais, as quais representam um dos principais substratos neurais para expressão de respostas a estímulos aversivos (GRAEFF, 1981; LENT, 2010; NISHIDA, 2007).

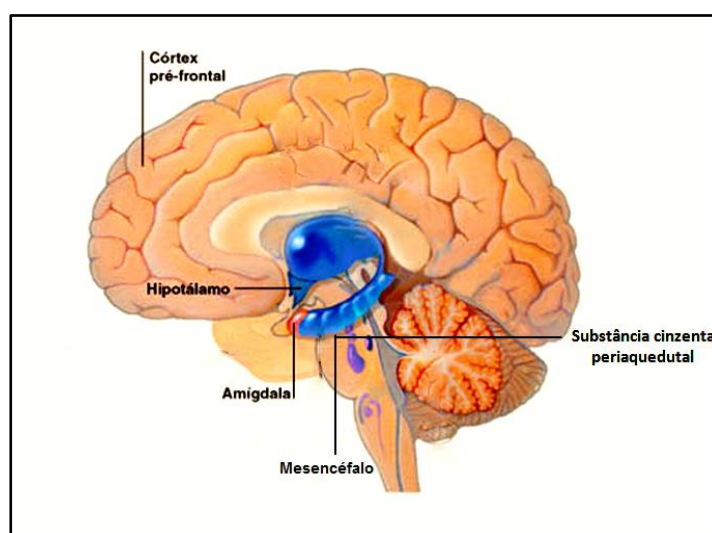


Figura 1. Representação esquemática de um encéfalo com estruturas encefálicas responsáveis pela expressão de respostas a estímulos aversivos. Fonte: adaptada (DONNER, 2005).

Como consequência, direta ou indireta, da ativação dessas áreas, o indivíduo apresenta como resposta emocional, sentimentos como apreensão, aflição e angústia e outros. Como resposta fisiológica, o hipotálamo aciona uma cadeia endócrina característica conhecida como eixo HPA (hipotálamo-pituitária, antigo nome da hipófise-adrenal), ocorrendo também taquicardia e vasoconstrição cutânea, aumentando e redirecionando o fluxo sanguíneo para os músculos e sistema nervoso. A respiração acelera e as vias aéreas se dilatam, resultando em aumento da oxigenação do sangue e dos tecidos, bem como o aumento da produção e acúmulo de glicose disponibilizando, assim, mais fonte de energia (LENT, 2010). Além de respostas comportamentais como avaliação de risco, congelamento, luta e fuga, dependendo do estímulo aversivo e de cada indivíduo.

Na regulação dessas respostas duas áreas encefálicas, além de outras do sistema límbico, que controla as emoções, parecem ter importante envolvimento, e papéis complementares, na

fisiopatologia dos transtornos de ansiedade: a amígdala, pólo rostral, e a matéria cinzenta periaquedutal, pólo caudal.

A amígdala (AMY) também se comporta como “botão de disparo” emocional e está associada a aprendizagem, memória e processamento de respostas de defesa frente a estímulos aversivos (SIOZOPOULOS et al., 2017). Ela consiste de uma estrutura bilateral situada dentro da região antero-ventral do lobo temporal e prosencéfalo basal. A amígdala pode ser dividida em três partes: basolateral, central e corticomedial, contudo, o papel na reatividade a ansiedade e medo parece estar mais correlacionada com a porção basolateral (LENT, 2010; SIOZOPOULOS et al., 2017). Estrutura e divisões demonstradas na figura 2.

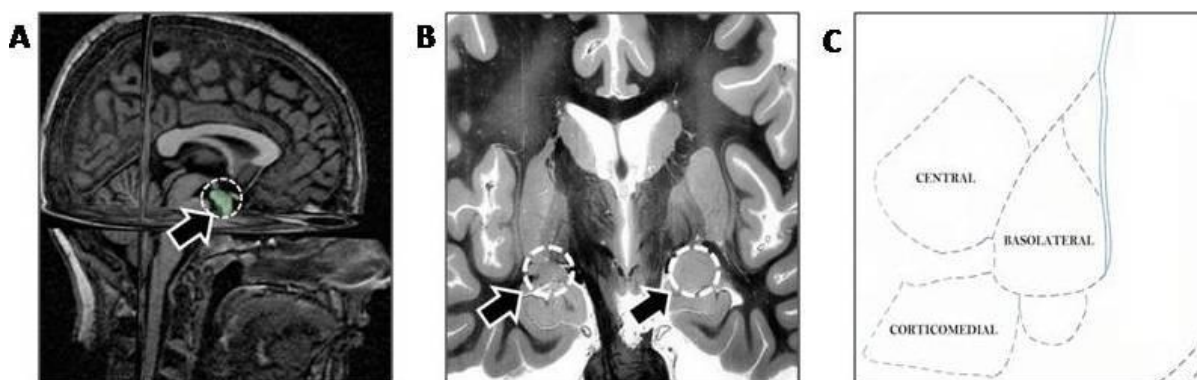


Figura 2. As setas apontam para a amígdala encefálica (circundada) numa imagem em 3 dimensões (3D SLICER software) (A) e em preparo anatômico (B). Fonte: adaptada (SIOZOPOULOS et al., 2017 e Acervo digital do Depto. de Anatomia do IB – UNICAMP, respectivamente). (C) Representação esquemática da AMY e suas subdivisões (basolateral, central e corticomedial). Fonte: adaptada (PAXINOS; FRAKLIN, 2001).

Por outro lado, a matéria cinzenta periaquedutal (MCP) parece ser crucial para a organização de respostas rápidas e eficientes de comportamentos de defesa. Esta estrutura mesencefálica está disposta longitudinalmente ao redor do aqueduto mesencefálico, também chamado de aqueduto de Sylvius, o qual une o terceiro e quarto ventrículos encefálicos (CARLSON, 2002). Na perspectiva de um corte radial a MCP pode ser dividida em 4 regiões: dorsomedial e dorsolateral caracterizando a MCP dorsal (MCPd) e lateral e ventrolateral (BEHBEHANI, 1995; KEAY; BANDLER, 2001). Área encefálica e divisões ilustradas na figura 3. Entretanto, para nosso estudo do processamento do medo e da ansiedade estreitamos enfoque a MCPd, pois tal porção da MCP parece ser crucial para desencadear comportamentos relacionados a ansiedade como comportamentos de luta e/ou fuga explosiva, por exemplo (MCNALLY; PIGG; WEIDEMANN, 2004).

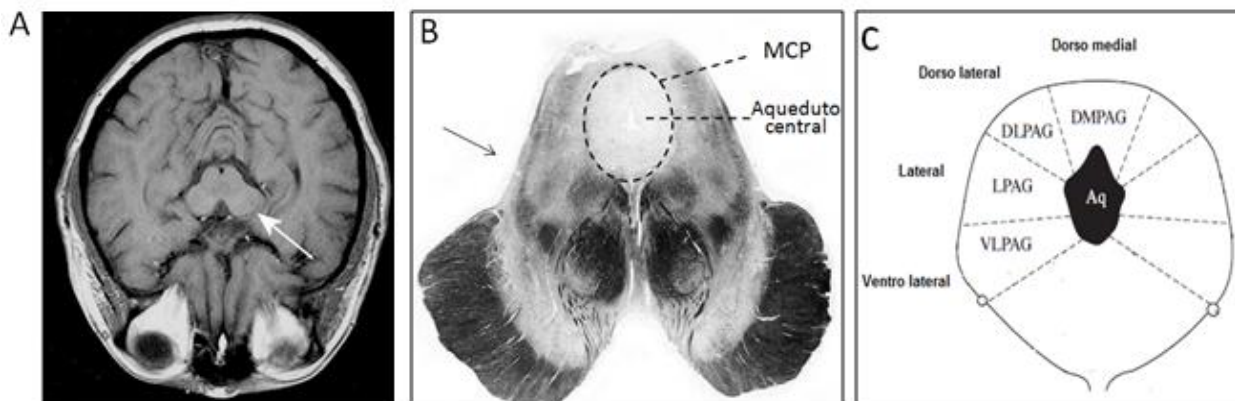


Figura 3. Imagens de cortes transversais do encéfalo. As setas indicam o mesencéfalo em ressonância magnética (A) e em preparo anômico (B). Na imagem (B) os pontilhados indicam a MCP e o aqueduto central. Fonte: adaptada (Acervo digital do Depto. de Anatomia do IB – UNICAMP). (C) Representação esquemática da MCP (na figura PAG, do inglês “periaqueductal gray”) e suas subdivisões (dorsal, lateral e ventrolateral). Fonte: adaptada (PAXINOS; FRAKLIN, 2001).

Alguns estudos envolvendo medo e ansiedade, identificaram ativação de neurônios intra AMY e intra MCP, por meio da expressão local da proteína Fos que, crescentemente, tem sido usada como importante marcador de atividade neuronal (MORGAN; CURRAN, 1991; SILVEIRA, 2001). Esta correlação existe pois, sempre que neurônios são despolarizados ocorre um aumento nos níveis intracelulares de alguns segundos mensageiros, e em resposta, o gene c-fos codifica a proteína nuclear Fos, a qual, com marcação imuno-histoquímica, é possível ser identificada e quantificar sua expressão (SHENG; GREENBERG, 1990).

O aumento significativo no número de neurônios que expressaram Fos correlacionado ao medo e ansiedade foi identificado intra-AMY em ratos expostos ao Teste do Labirinto em T (SILVEIRA et al., 2001), e intra-MCP quando expostos ao teste do Labirinto em Cruz Elevado (SILVEIRA; SANDNER; GRAEFF, 1993), ambos os testes apresentam estímulos aversivos devido ao medo inato de roedores a lugares abertos.

Além disso, o aumento de Fos intra AMY e intra MCP também foi identificado por administração de drogas ansiogênicas (SINGEWALD; SHARP, 2000) e por estimulação elétrica (VIANNA et al., 2004; SANDNER et al., 1992).

Considerando um conjunto de descobertas, dentre alguns neurotransmissores, o ácido gama-aminobutírico (GABA) está envolvido na modulação do medo e da ansiedade (WIEDEMANN, 2015). O agonismo dos receptores GABA A e GABA B é um procedimento que acarreta na diminuição da atividade da região encefálica por serem os receptores inibitórios, os quais promoverão hiperpolarização dos neurônios locais. O receptor GABA A realiza esse efeito por estimular a abertura de um canal de cloreto a ele acoplado que sob influência da ligação do GABA ou agonista como o muscimol, sofrerá uma alteração conformacional permitindo o influxo de cloreto para o interior do neurônio, o qual por possuir

carga negativa deixará o interior ainda mais negativo distanciando a célula do limiar para a despolarização, tornado-a portanto, hiperpolarizada. Por outro lado, o receptor GABA B ao ser ativado, também pelo GABA ou outro agonista como o baclofeno, alterará sua forma e estimulará uma Proteína G inibitória acoplada, a qual inibirá a via da proteína quinase A(PKA)/AMPc inibindo a estimulação neuronal tanto por meio da inativação de cascatas que ativariam a circuitaria nuclear quanto por induzir eventos elétricos hiperpolarizantes como a saída de potássio através da abertura de seu canal e a inibição da entrada de cálcio por inibir a abertura de seu canal, mediada pela PKA.

Reimer e colaboradores (2008) demonstraram que injeções intra MCPd de agonista GABA A produziram efeitos inibitórios nas respostas relacionadas à ansiedade e medo, como o congelamento em resposta ao estímulo aversivo: choque na pata. Enquanto Schmitt e colaboradores (1986) ao administrar antagonistas do receptor GABA A, verificaram comportamentos ansiogênicos como rigoroso comportamento de fuga dos animais tratados.

Além disso, uma variedade crescente de neuropeptídeos tem revelado importante papel na modulação na ansiedade, como o fator liberador de corticotrofina (CRF – do inglês “corticotropin-releasing factor”) (WIEDEMANN, 2015). O CRF surgiu como um neurotransmissor / modulador com um papel central não só na regulação do estresse, mas também na ansiedade, depressão e outras patologias como neurobiologia da dependência de drogas e epilepsia (BOYSON et al., 2011; KURADA et al., 2014; WIEDEMANN, 2015).

O CRF é um peptídeo com 41 aminoácidos, muito conhecido por seu papel neuroendócrino no eixo HPA, que também tem demonstrado um papel pró-aversivo e de excitabilidade neuronal no sistema nervoso central, modulando respostas comportamentais defensivas frente a estímulos aversivos (BALDWIN et al., 1991; BERRIDGE; DUNN, 1989; BOWERS; SWISHER; BEHBEHANI, 2003; MARTINS; MARRAS; GUIMARAES, 1997; MIGUEL; NUNES-DE-SOUZA, 2011).

Estudos anatômicos utilizando anticorpos para CRF identificaram vários sítios no encéfalo de ratos que contêm altas densidades de neurônios CRFérgicos e presença de ácido ribonucleico mensageiro codificadores, incluindo núcleos amigdalóides, hipocampo, núcleo dorsal da rafe, locus coeruleus, córtex pré-frontal medial e na matéria cinzenta periaquedutal (MERCHENTHALER, 1984; SWANSON et al., 1983; VAN PETT et al., 2000).

Estudos comportamentais demonstraram efeitos ansiogênicos do CRF em modelos etológicos, com roedores, observando respostas características de ansiedade, como aversão ao lugar, aumento da atividade locomotora, diminuição da atividade sexual e diminuição de exploração de braços abertos do LCE (CARVALHO-NETTO et al., 2007; MARTINS et al.,

1997; SMITH et al., 2007; STERN et al., 2011). Além disso, camundongos nocautes para receptores CRF apresentam menos comportamento de ansiedade e medo inato (STECKLER; HOLSBOER, 1999).

As ações biológicas dos membros da família de CRF são mediados através da ligação, de alta afinidade específica, a dois subtipos principais de receptores que recentemente tem sido identificados: o receptor de CRF tipo 1 (CRF1) e o receptor de CRF tipo 2 (CRF2 α e CRF2 β) (KAGEYAMA, 2007; SMITH et al., 1998). Ambos os receptores estão presentes em várias áreas encefálicas como exemplificado na figura 4.

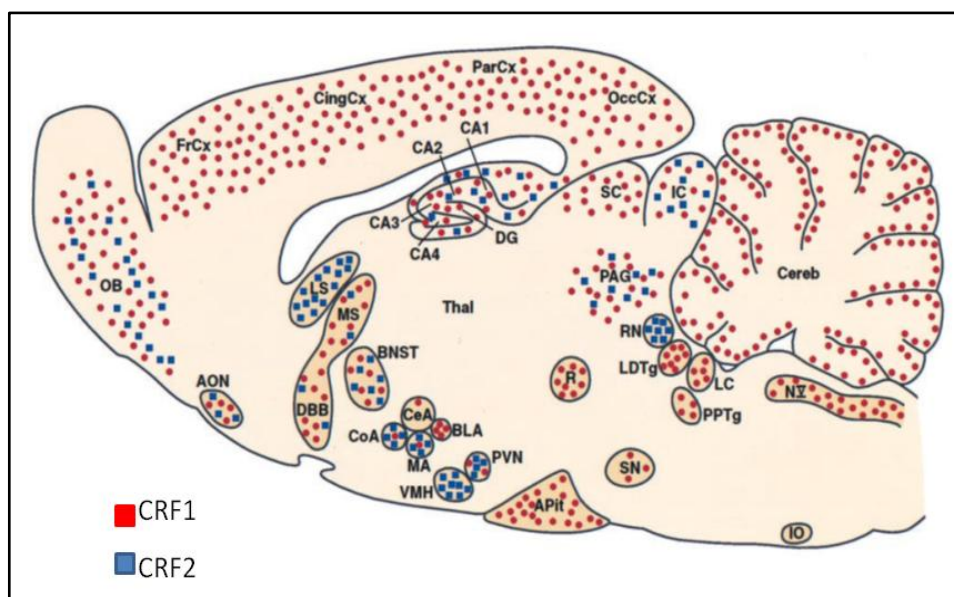


Figura 4. Distribuição de receptores CRF1 e CRF2 no encéfalo de um rato. Fonte: adaptada (STECKLER; HOLSBOER, 1999)

O CRF1 desempenha um papel importante tanto no desenvolvimento de um eixo HPA funcional quanto na mediação de alterações comportamentais associadas à ansiedade e medo (BATESON; BRILOT; NETTLE, 2011). Ações excitatórias mediadas pela estimulação dos receptores CRF1 demonstram aumento significativo na taxa de disparos espontâneos das células na MCP de roedores, desencadeando comportamentos ansiogênicos (BOWERS; SWISHER; BEHBEHANI, 2003).

Quanto ao subtipo CRF2, seu papel nos comportamentos eliciados pela ansiedade ainda não está claro (BOWERS et al., 2003; KISHIMOTO et al., 2000; TAKAHASHI et al., 2001). O mesmo demonstra ter uma correlação mais substancial em distúrbios alimentares e comportamentos sexuais das fêmeas (STECKLER; HOLSBOER, 1999).

Contudo, o aumento induzido por CRF na atividade neuronal não é único motivo para causar ansiedade e medo, mas também uma sequência de ativações ocorrerá em cascata célula-adentro (do inglês downstream) (BLANK et al., 2003).

O CRF1 é do grupo de receptores de membrana acoplados a proteína G estimulatória (PGs) (SMITH et al., 1998). As PGs são proteínas envolvidas na transdução de sinais celulares, que no caso, ativa a adenilato ciclase (enzima intracelular aderida à membrana plasmática) resultando no aumento substancial de um segundo mensageiro: a adenosina 3,5 monofosfato cíclico (AMPC) (MOURA; VIDAL, 2011). O aumento na concentração de AMPC intracelular culmina na ativação da proteína quinase dependente de AMPC (PKA). A PKA tem a função, entre outras, de ativar fatores de transcrição gênica fosforilando, por exemplo, receptores metabotrópicos de glutamato e ativando a proteína ligante ao elemento de resposta do AMPC: o CREB (do inglês cAMP response element-binding) (MOURA; VIDAL, 2011). Por sua vez, o CREB fosforilado interage com a proteína de ligação ao CREB, uma molécula coativadora que participa da ativação do gene alvo via associação com a RNA polimerase II, para dar início ao processo de uma série de fatores de transcrição (NETO; ELKIS, 2007).

CREB é um fator que se encontra em níveis elevados na MCP em situações de ansiedade, provavelmente por sua lista de genes-alvo incluir aqueles que controlam neurotransmissão, transdução de sinal, transcrição e metabolismo, dentre outros (ADAMEC; BERTON; ABDUL RAZEK, 2009; BONNIE; GINTY, 2002).

Entretanto, esta não é a única forma de fosforilação de CREB. Embora pouco entendido, o aumento de disparos neuronais induzidos pelo tratamento com o CRF pode induzir essa fosforilação por uma via independente da via clássica (AMPC/PKA), sendo ativada por uma via acessória (DAG/PKC) em que a transdução é mediada pela proteína Gq (BLANK et al., 2003; STERN et al., 2011).

A proteína Gq está envolvida na ativação da enzima fosfolipase C, que assim como a adenilato ciclase participa da formação de segundos mensageiros. Depois de ativada ela degrada o fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PIP2) presente na membrana em 1,4,5 trifosfato de inositol (IP3) e 1,2 diacilglicerol (DAG). O DAG ativa a proteína quinase C (PKC), uma enzima ligada à membrana plasmática que, então, promove a fosforilação do CREB (BLANK et al., 2003; NELSON; COX, 2006).

Além disso, pesquisas têm demonstrado que o CRF pode induzir a fosforilação de CREB por uma via independente, sendo ativada uma cascata das denominadas MAPK (proteína quinase mitogeno-ativadas) (HAUGER et al., 2011; STERN et al., 2011).

Essa mediação, que segundo pesquisadores pode ser feita por três ou mais vias de transduções diferentes (descritas anteriormente) estão esquematizadas na figura 5.

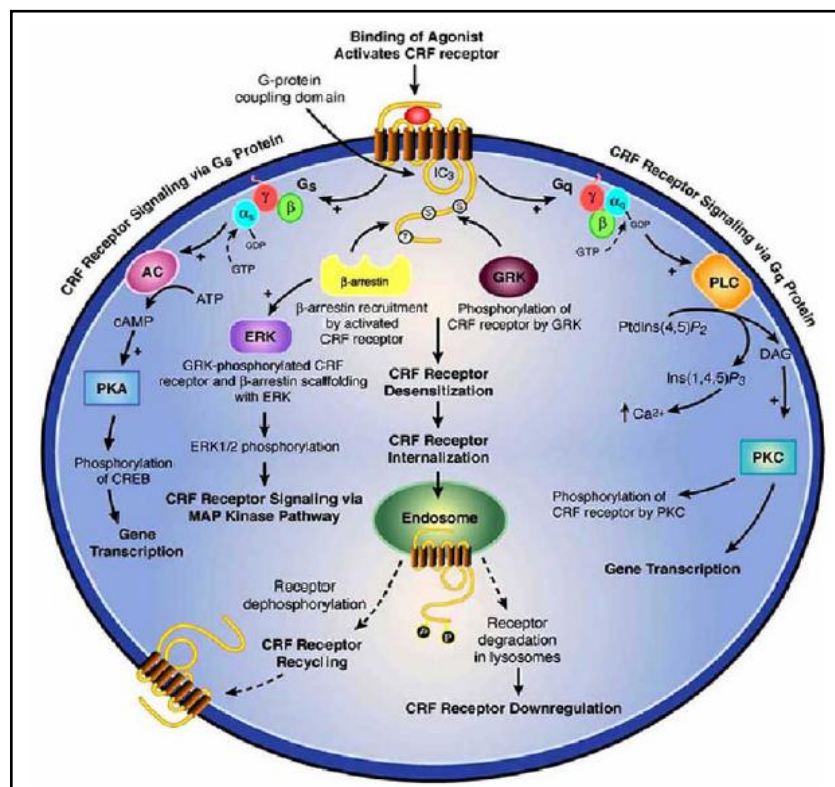


Figura 5. Desenho esquemático das cascatas de sinalização intracelular específicas desencadeadas pela atividade agonista do receptor CRF. Fonte: (HAUGER et al., 2006)

Sendo assim, é possível sugerir um papel intermediário do acoplamento do receptor CRF na estimulação de cascatas de sinalização nas respostas comportamentais e determinação endócrina de cada indivíduo (BLANK et al., 2003).

Por este motivo torna-se relevante a pesquisa do mecanismo de ação ansiogênica do CRF e as cascatas de sinalização intracelulares específicas desencadeadas na modulação do comportamento defensivo relacionado à ansiedade e medo.

2 JUSTIFICATIVA

Os transtornos de ansiedade são um problema de saúde pública e causam intenso sofrimento emocional e danos à saúde do indivíduo, interferindo significativamente na qualidade de vida e no desempenho social e profissional (JATOBÁI; BASTOS, 2007).

Pacientes que sofrem desse transtorno apresentam frequentemente abuso de substâncias psicoativas e outras comorbidades médicas e psiquiátricas, as quais, caso haja um

agravamento pode levar até a morte do paciente (KESSLER et al., 2005; MERIKANGAS, 2003; ROY-BYRNE et al., 2008).

Cerca de 24 milhões de brasileiros sofrem com ansiedade patológica e embora existam tratamentos para transtornos de ansiedade, estes atualmente têm eficácia limitada e estão associados à alta dependência e riscos (CALAIS; GARCIA, 2013; GADANI, 2013; MACHADO et al., 2012).

Além disso, as causas e os mecanismos subjacentes relacionados à ansiedade ainda mantêm-se relativamente mal compreendidos (BATESON et al., 2011).

Nossa proposta de estudo traz pesquisas novas aos estudos da neurobiologia das reações de defesa, objetivando o entendimento mais profundo do papel de áreas encefálicas do sistema límbico, como AMY e MCP, e dos mecanismos de ação desencadeados pela ação ansiogênica do neurotransmissor CRF e suas cascatas de sinalização intracelulares específicas, envolvidas na expressão de alterações comportamentais e sistêmicas em resposta a estímulos aversivos (BALDWIN et al., 1991; BERRIDGE; DUNN, 1989; GRAEFF, 1981; MARTINS et al., 1997; MIGUEL; NUNES-DE-SOUZA, 2011).

Além disso, o perfil de respostas defensivas em roedores foi analisado no recente teste de exposição ao rato, trazendo informações sobre a modulação de neurotransmissores e suas vias de sinalização, na tentativa de entender melhor o tipo de transtorno de ansiedade que mais representa e os mecanismos celulares envolvidos.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a ativação neuronal da área encefálica Amígdala Basolateral (AMYb) e da Matéria Cinzenta Periaquedutal Dorsal (MCPd) e respostas comportamentais em camundongos expostos ao Teste de Exposição ao Rato (TER). Bem como o envolvimento do receptor tipo 1 do Fator Liberador de Corticotrofina (CRF) e da Proteína Quinase A (PKA) na modulação das respostas defensivas comportamentais relacionadas à ansiedade exibidas por camundongos durante o TER;

3.2 Específicos

Estudo 1: Avaliar a ativação neuronal da AMYb e da MCPd e as respostas comportamentais exibidas por camundongos no TER:

- Quantificar o número de células Fos-positivas na AMYb e na MCPd de camundongos expostos ao TER agudamente e repetidamente;
- Avaliar se a exposição repetida induz um aumento da ativação neuronal;
- Analisar os comportamentos defensivos de camundongos expostos ao TER agudamente e repetidamente;
- Avaliar se a exposição repetida intensifica os comportamentos aversivos;

Estudo 2: Avaliar o papel da MCPd, do CRF e da PKA intra MCPd nas respostas comportamentais exibidas por camundongos no TER:

- Analisar os comportamentos defensivos expressos no TER em camundongos submetidos à inibição da atividade da MCPd, via microinjeção de baclofeno + muscimol, agonistas gabaérgicos;
- Analisar os comportamentos defensivos expressos no TER por camundongos que receberam microinjeção de antagonista CRF1 intra MCPd;
- Analisar os comportamentos defensivos expressos no TER por camundongos que receberam inibidor da PKA intra MCPd;

4 MATERIAIS E METODOS

4.1 Sujeitos

Foram utilizados camundongos Suíços machos adultos (Peso: 30-40g) fornecidos pelo Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA-UFU). Durante o teste comportamental denominado teste de exposição ao rato (item 4.4.1), também foram utilizados ratos Long Evans machos adultos (Peso: 300-500g), como estímulo predador, fornecidos pelo Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia (CEDEME-UNIFESP).

Todos os animais foram transferidos para o depósito de animais da Área de Ciências Fisiológicas (ARFIS - UFU) e mantidos 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 ração e água, exceto durante a realização dos testes.

O uso de animais neste trabalho está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal conforme regulamentações do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA) e aprovação da Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA– UFU), protocolo n° 100/14 (ANEXO I).

4.2 Análise da expressão celular na Amígdala Basolateral (AMYb) e na Matéria Cinzenta Periaquedutal Dorsal (MCPd)

4.2.1 Exposição ao TER

Para a realização do Teste de Exposição ao Rato (item 4.2.2) objetivando avaliar a expressão de proteínas Fos por imuno-histoquímica intra AMYb e intra MCPd (considerados conjuntamente os subnúcleos MCP dorsolateral e dorsomedial), camundongos Suíços machos não experimentados foram separados em 6 grupos, sendo estes:

Exposição aguda	Exposição repetida
Grupo 1: Controle agudo	Grupo 4: Controle repetido
Grupo 2: Brinquedo agudo	Grupo 5: Brinquedo repetido
Grupo 3: Rato agudo	Grupo 6: Rato repetido

A exposição aguda consiste em habituação e, após 24 horas, uma única exposição ao rato, ambos com exposição de 10 minutos cada. Enquanto a exposição repetida é feita por habituação, seguida de 5 dias de exposição intercalados, sendo 10 minutos de duração cada exposição.

Os grupos controles não foram expostos ao aparato, os grupos expostos ao brinquedo foram expostos no aparato (4.2.2.1) a um rato de pelúcia e os grupos expostos ao rato foram expostos no aparato ao rato de verdade, o predador, rato Long Evans.

4.2.2 Teste de Exposição ao Rato

4.2.2.1 Aparato

O aparato (figura 6) para realização do Teste de Exposição ao Rato (TER) consiste em uma caixa de acrílico transparente (46cm de comprimento $\times$ 24cm largura $\times$ 21cm altura) denominada câmara de exposição, a qual é dividida por uma tela de malha de arame em dois compartimentos de igual tamanho (a superfície e o compartimento do predador) e coberta com uma tampa negra de policarbonato. Além disso o aparato é constituído da toca (12cm comprimento $\times$ 7cm largura $\times$ 7cm altura) que consiste numa caixa feita de acrílico preto em 3 faces e de acrílico transparente em 1 face lateral para facilitar a filmagem. A toca é ligada a câmara de exposição (superfície) por um túnel de acrílico transparente (4,4cm diâmetro $\times$ 13cm comprimento $\times$ 1,5 cm acima do chão das duas câmaras).

Esta configuração do aparato permite à presa (camundongo) se esquivar para os locais protegidos do TER (toca e túnel) ou se aproximar do predador (rato) na superfície.

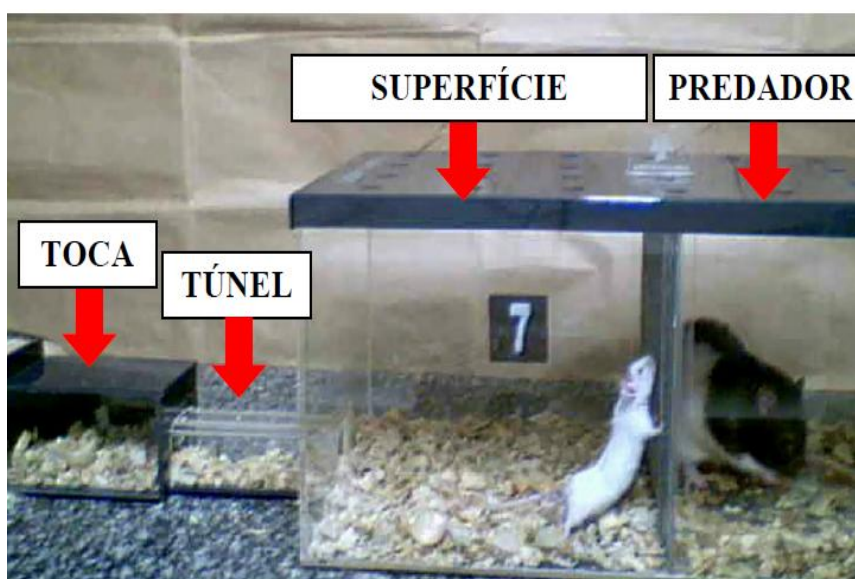


Figura 6 - Aparato do Teste de Exposição ao Rato (TER) pertencente ao Instituto de Ciências Biomédicas – UFU

4.2.2.2 Teste

No dia anterior (24 horas antes do teste de exposição ao rato) foi feita a habituação, que consiste na exposição de cada camundongo ao aparato por um período de 10 minutos para livre exploração, sem a presença do rato.

No dia do teste, um rato de pelúcia (Grupo brinquedo) ou um rato macho Long Evans (Grupo rato) foi introduzido no compartimento do predador do aparato TER.

Em seguida, os camundongos foram introduzidos, individualmente, na superfície de exposição do aparato TER, permanecendo por um período de 10 minutos. Os mesmos não tiveram contato físico com o rato, para evitar danos físicos, sendo assim o contato foi apenas sensorial: visão, olfato e audição.

Ao final de cada exposição, os animais retornaram para a sala adjacente à sala experimental, separados em caixas moradias e mantidos até o final de todo o experimento. No final de cada dia de exposição os camundongos e os ratos retornaram para os respectivos estandes do depósito.

Todas as exposições foram gravadas por um circuito filmadora-notebook, e as medidas comportamentais avaliadas posteriormente.

Ao fim de todo o protocolo experimental, quer seja, o protocolo de exposição aguda ou de exposições repetidas, os camundongos foram sacrificados para avaliar a expressão celular Fos-positivas marcadas por meio da técnica de imuno-histoquímica.

4.2.3 Perfusão intracardiaca

Após 2 horas do término do experimento comportamental, os animais receberam uma solução anestésica excessiva (combinado de cetamina e xilazina: 160mg/kg) e submetidos a um procedimento para inserção intracardiaca de um circuito de soluções através de uma bomba de infusão (bomba de perfusão). A bomba foi utilizada para criar pressão (cerca de 70 e 80 mmHg), levando a solução de interesse para a circulação sistêmica, feita inicialmente com solução PBS 1x (± 200 mL), e posteriormente com paraformaldeído 4% (± 200 mL).

Em seguida, os encéfalos dos camundongos foram removidos e mantidos em solução de formalina 10% por 48 horas e em solução sacarose 30% por mais 48 horas.

Posteriormente, os encéfalos foram seccionados em criostato e fatias com 40 μ m de espessura contendo a região encefálica AMY e MCP foram coletadas e armazenadas em solução anticongelante (Sacarose, etileno glicol e tampão fosfato 0,05M) a -80°C.

4.2.4 Imuno-histoquímica para marcação da proteína Fos

Para realização da imuno-histoquímica para marcação da proteína Fos as fatias contendo a AMY e MCP foram lavadas com PBS 1x e incubadas com solução bloqueadora (soro de cabra 3%; Triton 0,25% dissolvidos em PBS 1x) e, após 1 hora, incubadas durante a noite com anticorpo primário (c-Fos; coelho; sc-52, Santa Cruz biotechnology. Diluído 1:400 em solução bloqueadora).

No outro dia, as fatias foram lavadas e incubadas com anticorpo secundário (anti-coelho biotinilado, BA 1000; Vector Labs. Diluído 1:400 em solução bloqueadora) e após 2 horas, as fatias foram lavadas novamente e incubadas por 1 hora em solução de avidina-biotina-peroxidase (ABC Elite kit, catalog #PK-6100, Vector Laboratories; preparada em solução bloqueadora).

Finalmente, as fatias foram lavadas e incubadas em 3,3'-diaminobenzidina (DAB) por aproximadamente 5 minutos. Imediatamente, foram lavadas e transferidas para solução de PBS 1x até a montagem das lâminas.

4.2.5 Preparo e montagem das lâminas

Para montagem das lâminas, os cortes foram coletados e montados sobre lâminas de vidro gelatinizadas e devidamente identificadas.

No mínimo 18 horas depois, quando já secas, as lâminas foram acopladas em suportes e submetidas a 2 banhos de água destilada (5 minutos cada) e, em seguida, por desidratações, utilizando um gradiente seriado de titulações crescentes de etanol (30%, 60%, 90%; 95% e 100% - 2 minutos cada) e Xilol (10 minutos cada).

4.2.6 Captura e análise de imagens

A captura de imagens foi feita com auxílio de um microscópio de luz (Leica DM500, Microsystems AG, Alemanha) equipado com objetiva 10x acoplada a uma câmera conectada a um computador com o software LAS EZ.

As regiões AMY basolateral e MCP dorsal foram localizadas no microscópio e foi feita a captura de 4 imagens por animal, as quais foram gravadas em formato “.tif”.

As imagens coletadas foram analisadas com auxílio do programa Image J e foi mensurado o número de células que expressaram Fos por mm² ([n° de Fos/área selecionada em µm] *10⁶).

4.3 Análise do efeito da microinjeção fármacos na MCP – Teste Comportamental

4.3.1 Cirurgia estereotáxica

Para administração de fármacos no sistema nervoso central, somente na área de interesse (intra MCP) foram feitas cirurgias estereotáxicas nos encéfalos dos camundongos. Essa técnica consiste de uma intervenção cirúrgica que permite a inserção precisa, com auxílio de um aparelho, de cânulas-guia por meio de coordenadas anatômicas tridimensionais obtidas do Atlas do Encéfalo de Camundongo de Paxinos e Franklin (2001).

Para isso, os animais foram anestesiados com uma solução combinada de cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) intraperitoneal e submetidos a cirurgia para implantação das cânulas guias (cânula de aço inox oca; Largura: 26 gauge; Comprimento: 7,0 mm), as quais foram fixadas no crânio do animal com cimento acrílico.

As coordenadas utilizadas no presente trabalho foram: ântero-posterior -4,1; lateral -1,4; dorso-ventral -2,4; a partir do bregma do animal. Ângulo: 26°; Cânula unilateral. Tais coordenadas 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 (PAXINOS; FRANKLIN, 2001) e tem como orientação o ponto anatômico denominado bregma (ponto de união das suturas sagital e coronal).

Para evitar problemas com obstrução e para reduzir a contaminação foi inserido um oclisor (Material: Fio de aço maciço; Largura: 33 gauge, Comprimento: 7,0 mm) nas cânulas-guia, o qual teve sua extremidade exterior fixada ao crânio com cimento acrílico.

Ao final da cirurgia os animais receberam o anti-inflamatório meloxicam (17 mg/ml) via intramuscular e descansaram para recuperação por um período de quatro a sete dias, em que permaneceram no depositário até o dia do teste.

4.3.2 Administração de fármacos

No dia dos testes, a microinjeção intra-encefálica dos fármacos (veículo ou droga) foi realizada através de uma agulha (Largura: 33 gauge; Comprimento: 8,0 mm) inserida no interior da cânula guia, a qual foi conectada, por meio de um tubo de polietileno (PE-10), a uma micro seringa Hamilton de 2,0 μ L.

Os fármacos foram injetados lentamente (± 60 segundos) e o movimento de uma pequena bolha de ar no tubo de polietileno, durante as injeções, confirmava o fluxo da solução.

Durante todo o procedimento de microinjeção o animal foi contido cuidadosamente pelo experimentador com uso de uma flanela e posteriormente colocado em uma caixa moradia individual até o início do teste comportamental.

4.3.3 Fármacos utilizados na microinjeção

Para microinjeção foram utilizadas as seguintes substâncias:

Antagonista de GABA A:

Muscimol (Dose: 0,06 nmol) - Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA

Antagonista de GABA B:

Baclofeno (Dose: 0,6 nmol) - Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA

Antagonista de CRF1:

CP376395[N-(1-ethylpropyl)-3,6-dimethyl-2-(2,4,6-trimethylphenoxy)-4-pyridinaminehydrochloride (Doses: 1,5; 3,0 e 6,0 nmol) - Tocris Inc., Baldwin, EUA

Inibidor da Proteína Quinase A (PKA):

H-89 (dihidrocloreto de (N-[2-(p-Bromocinamilamino) etil]-5-isoquinolinesulfonamida) (Doses: 2,5 e 5,0 nmol) - Tocris Inc., Baldwin, EUA

Os fármacos foram dissolvidos em solução salina (NaCl 0.9%) e as dosagens baseadas em estudos anteriores (BLACKTOP et al., 2011; CHAN; VON DERWEID, 2003; MIGUEL; NUNES-DE-SOUZA, 2011; XU; KRUKOFF, 2006).

A lista dos reagentes utilizados para as reações de imuno-histoquímica está informada no item que descreve o protocolo.

4.3.4 Teste de Exposição ao Rato

Os animais foram submetidos ao aparato descrito no item 4.2.2.

4.3.4.1 Teste

No dia anterior (24 horas antes do teste de exposição ao rato) os camundongos foram colocados individualmente no aparato, sem a presença do rato, por um período de 10 minutos para livre exploração, procedimento denominado habituação.

No dia do teste, os camundongos receberam microinjeção dos fármacos ou veículo (salina) intra MCPd (procedimento descrito item 4.2.2) e colocados numa caixa moradia individual em espera por 10 ou 15 minutos para início do efeito (dependendo do fármaco utilizado). Em seguida foram introduzidos, individualmente, na superfície de exposição do aparato TER, permitindo-o explorar por 10 minutos, sob a presença de um rato Long Evans no compartimento do predador.

Para evitar danos físicos, os camundongos não tiveram contato físico, sendo assim o contato foi apenas sensorial: visão, olfato e audição. Todas as exposições foram gravadas por um circuito filmadora-notebook, e as medidas comportamentais avaliadas posteriormente.

Ao final de cada exposição, os animais retornaram para a sala adjacente à sala experimental e permaneceram até o final de todo o teste. Posteriormente, todos os camundongos foram sacrificados para análise histológica conforme descrito no item 4.3.5.

4.3.4.2 Análise comportamental

As gravações das exposições no teste foram analisadas manualmente por um observador cego para as condições experimentais (grau de confiança $\geq 0,90$).

Os parâmetros comportamentais analisados nos camundongos foram:

Medidas espaço-temporais:

- Parâmetros de ansiedade: Tempo de permanência dos camundongos nas áreas protegidas (toca e túnel) e desprotegida (superfície);
- Parâmetros de locomoção: Número de entradas dos camundongos nas áreas protegidas (toca e túnel) e desprotegida (superfície);

Medidas complementares:

- Tempo gasto em contato com a tela e escalada na mesma;
- Tempo e número de esticadas (postura exploratória na qual o animal estica o corpo, movimentando se, apenas com as patas dianteiras, sem completar o passo);

4.3.5 Análise histológica dos sítios de injeção

Após o término dos experimentos os camundongos receberam microinjeção intra MCPd de solução corante azul de Evans 1%. Em seguida, os animais receberam dose excessiva de anestésico (Tiopental sódico - 160mg/kg; via intraperitoneal), tiveram seus encéfalos removidos e acomodados em recipientes contendo solução de formalina 10%. Posteriormente, foram feitas secções coronais, de 60µm de espessura, ao longo do trajeto da cânula, com o uso de um criostato. As fatias seccionadas foram inspecionadas com o uso de um microscópio de luz e a visualização da dispersão do azul de Evans 1% foi considerada indicativa do local da injeção. Apenas os animais que indicaram o local de injeção como intra MCPd foram incluídos nas análises comportamentais e estatísticas.

4.4 Análise Estatística

A análise estatística foi feita no software Prism 5.0 ou Statistica e os resultados comportamentais foram analisados primeiramente pelo teste Bartlett's ou Levene para avaliar homogeneidade de parâmetros comportamentais entre os grupos, seguido de ANOVA ou Teste *t* student dependendo da amostra analisada (em alguns casos foi necessário o uso do teste não paramétrico Mann Whitney), avaliando diferenças significativas, consideradas como

$p < 0,05$. Quando significativo a ANOVA foi seguida pelo teste post hoc Newman-keuls ou Duncan para identificar em quais grupos houve essa diferença. Os resultados foram expressos em média $\pm$ EPM e considerados diferenças significativas quando $p < 0,05$.

5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

5.1 Estudo 1: Avaliação da ativação neuronal da AMYb e da MCPd, e das respostas comportamentais exibidas por camundongos no TER:

5.1.1 Experimento 1 - Quantificação do número de células Fos-positivas intra AMYb e intra MCP de análise do comportamento em camundongos expostos ao TER: os camundongos foram expostos ao TER agudamente (1 dia) ou repetidamente (5 dias intercalados). Após o teste, os animais foram sacrificados, os encéfalos retirados e processados para imuno-histoquímica para Fos e foi realizada a análise dos comportamentos gravados. Cabe ressaltar que, embora tenhamos a gravação de todas as exposições, a análise do comportamento para os animais expostos de modo repetido ao TER foi feita do último dia de exposição (quinta exposição).

Os grupos experimentais (N = 4-6/grupo para AMYb e 8/grupo para MCPd) foram:

- Controle agudo
- Brinquedo agudo
- Rato agudo
- Controle repetido
- Brinquedo repetido
- Rato repetido

5.2 Estudo 2: Avaliação da participação da MCPd, do CRF1 e da PKA intra MCPd nas respostas comportamentais exibidas por camundongos no TER:

5.2.2 Experimento 2.1 – Avaliação dos comportamentos defensivos exibidos no TER em camundongos submetidos à inibição da atividade da MCPd, através da microinjeção de baclofeno+muscimol, agonistas gabaérgicos: os camundongos receberam microinjeção intra MCPd com veículo ou muscimol+baclofeno. Quinze minutos após, cada animal foi exposto ao TER para o registro dos comportamentos.

Os grupos experimentais (N = 6-7/grupo) foram:

- Tratados com Salina
- Tratados com muscimol (0,06nmol) + baclofeno (0,6nmol)

5.2.3 Experimento 2.2 – Avaliação dos comportamentos defensivos exibidos no TER por camundongos que receberão microinjeção de CP, antagonista CRF1, intra MCPd: os camundongos receberam microinjeção intra MCPd com veículo ou CP. Dez minutos após, cada animal foi exposto ao TER para o registro dos comportamentos.

Os grupos experimentais (N = 9-10/grupo) foram:

- Tratados com Salina
- Tratados com CP 1,5nmol
- Tratados com CP 3,0nmol

5.2.4 Experimento 2.3 – Avaliação dos comportamentos defensivos exibidos no TER por camundongos que receberão microinjeção de H89, inibidor da PKA, intra MCPd: os camundongos receberam microinjeção intra MCPd de veículo ou H-89. Dez minutos após, cada animal foi exposto ao TER para o registro dos comportamentos.

Os grupos experimentais (N = 9-10/grupo) foram:

- Tratados com Salina
- Tratados com H-89 2,5nmol
- Tratados com H-89 5,0nmol

6 RESULTADOS

6.1 ESTUDO 1: AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO NEURONAL DA AMYB E DA MCPD, E DAS RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS EXIBIDAS POR CAMUNDONGOS NO TER:

6.1.1 Experimento 1.1 - Avaliação da participação da Amígdala basolateral na resposta gerada pela exposição ao TER

A Figura 7 demonstra uma fotomicrografia histológica processada para a técnica de imuno-histoquímica para Fos. Esta representação demonstra a área delimitada que utilizamos para quantificação de Fos na AMYb.



Figura 7 – Fotomicrografia de um preparado imuno-histoquímico para Fos de um corte coronal encefálico da AMY de um dos nossos camundongos. A delimitação em vermelho circunda a AMY basolateral e a seta aponta para algumas células (circundadas) que expressaram a proteína Fos (“pontos escuros”).

6.1.1.1 Exposição aguda ao TER

6.1.1.1.1 Fotomicrografias representativas da AMYb

A Figura 8 demonstra fotomicrografias de cortes coronais encefálicos da AMYb processados para a técnica de imuno-histoquímica para Fos.

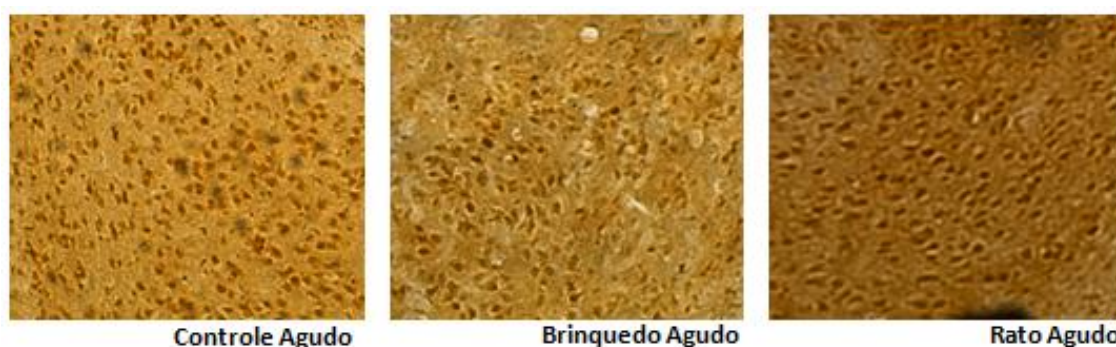


Figura 8– Fotomicrografias de um preparado imuno-histoquímico para Fos de cortes coronais encefálico da AMY de camundongos não expostos (grupo controle), expostos ao rato de pelúcia (grupo brinquedo) ou ao rato (grupo rato) agudamente.

6.1.1.1.2 Quantificação do número de células Fos-positivas

A Figura 9 ilustra a média do número de células que expressaram a proteína Fos na AMYb de camundongos submetidos a exposição aguda ao rato.

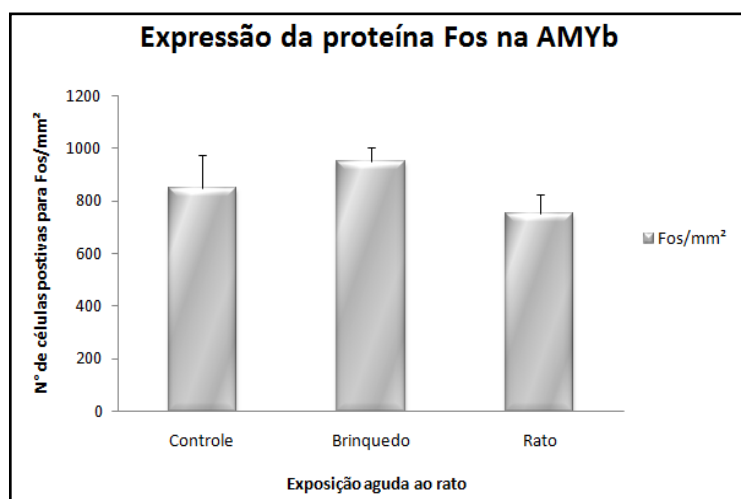


Figura 9 – Avaliação da exposição aguda de camundongos submetidos ao teste de exposição ao rato sobre o número de células que expressaram a proteína Fos. As colunas representam as médias ($\pm$ EPM) de 4-5 animais/grupo. Testes utilizados: ANOVA monofatorial e teste post hoc Newman Keuls.

A ANOVA monofatorial seguida do teste de comparações múltiplas de Newman Keuls revelou que os animais expostos ao rato não apresentaram significativamente mais expressão de células Fos-positivas quando comparado ao grupo brinquedo e controle ($F_{2,12} = 1,30$; $p > 0,05$).

6.1.1.2 Exposições repetidas ao TER

6.1.1.2.1 Fotomicrografias representativas da AMYb

A Figura 10 demonstra fotomicrografias de cortes coronais encefálicos da AMYb processados para técnica de imuno-histoquímica para Fos.

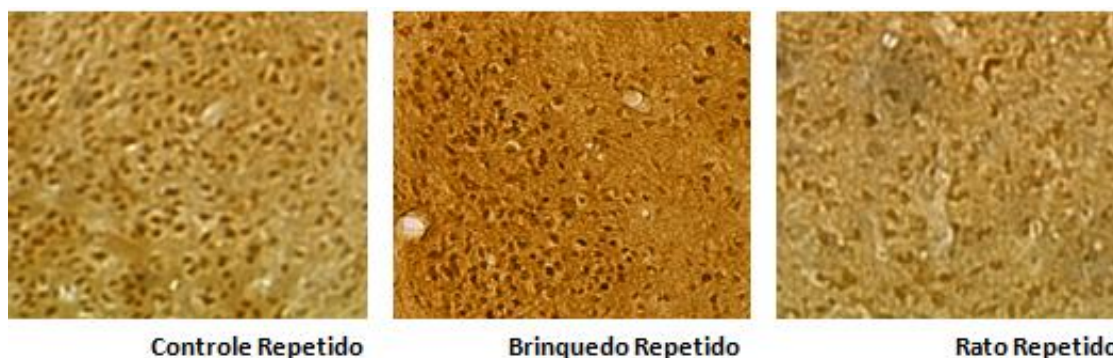


Figura 10 - Fotomicrografias de um preparo imuno-histoquímico para Fos de cortes coronais encefálico da AMY de camundongos não expostos (grupo controle), expostos ao rato de pelúcia (grupo brinquedo) ou ao rato (grupo rato) repetidamente.

6.1.1.2.2 Quantificação do número de células Fos-positivas

A Figura 11 ilustra a média do número de células que expressaram a proteína Fos na AMYb de camundongos submetidos a exposição repetida ao TER.

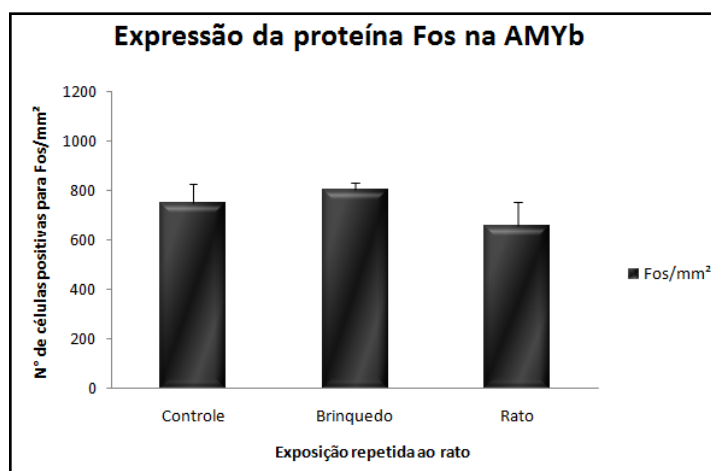


Figura 11 – Avaliação da exposição repetida de camundongos submetidos ao teste de exposição ao rato sobre o número de células que expressaram a proteína Fos. As colunas representam as médias ($\pm$ EPM) de 5-6 animais/grupo. Testes utilizados: ANOVA monofatorial e teste post hoc Newman Keuls.

A ANOVA monofatorial seguida do teste de comparações múltiplas de Newman Keuls revelou que os animais expostos ao rato não apresentaram significativamente mais expressão de células Fos-positivas quando comparado ao grupo brinquedo e controle ($F_{2,15} = 0,99$; $p > 0,05$).

6.1.1.3 Exposição aguda x exposições repetidas ao TER

A Figura 12 ilustra a média do número de células que expressaram a proteína Fos na AMYb de camundongos expostos ao TER agudo comparado ao TER repetido.

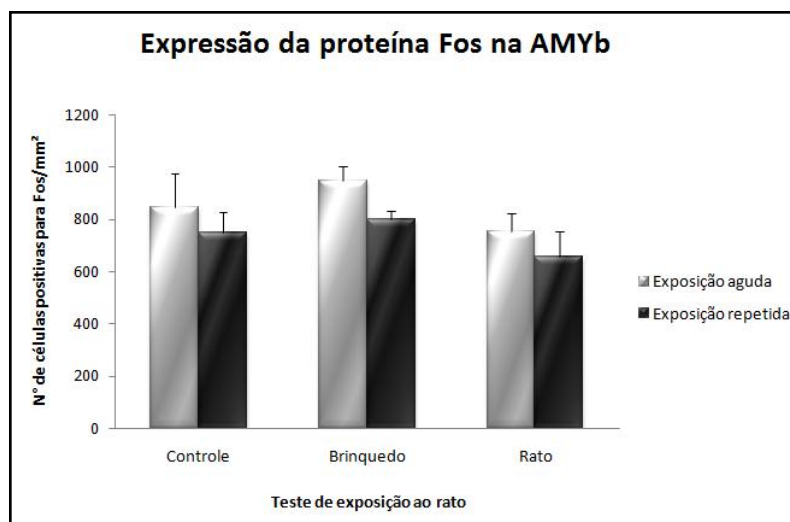


Figura 12 – Avaliação da exposição aguda versus exposição repetida de camundongos submetidos ao teste de exposição ao rato sobre o número de células que expressaram a proteína Fos. As colunas representam as médias ($\pm$ EPM) de 4-6 animais/grupo. Testes utilizados: ANOVA de dois fatores seguida pelo teste post hoc de Duncan.

A ANOVA bifatorial (Fator 1: Exposição ao rato, brinquedo e controle e Fator 2: Exposição aguda e repetida) seguida do teste post hoc de Duncan revelou que quando todos os grupos das exposições aguda e repetida são comparados entre si, não ocorre diferença significativa na expressão de células Fos-positivas.

1.2 - Avaliação da participação da matéria cinzenta periaquedutal dorsal na resposta gerada pela exposição ao TER

A Figura 13 demonstra uma fotomicrografia histológica processada para a técnica de imuno-histoquímica para Fos. Esta representação demonstra a área delimitada que utilizamos para quantificação de Fos na MCPd.

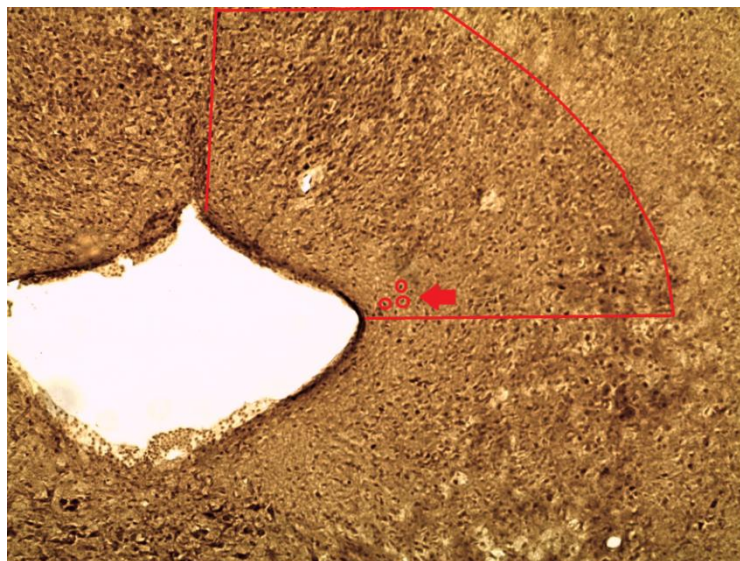


Figura 13 – Fotomicrografia de um preparo imuno-histoquímico para Fos de um corte coronal encefálico da MCPd de um dos nossos camundongos submetidos agudamente ao rato. A delimitação em vermelho circunda a MCPd e a seta aponta para algumas células (circundadas) que expressaram a proteína Fos (“pontos escuros”).

6.1.2.1 Exposição aguda ao TER

6.1.2.1.1 Fotomicrografias representativas da MCPd

A Figura 14 demonstra fotomicrografias de cortes coronais encefálicos da MCPd processados para a técnica de imuno-histoquímica para Fos.

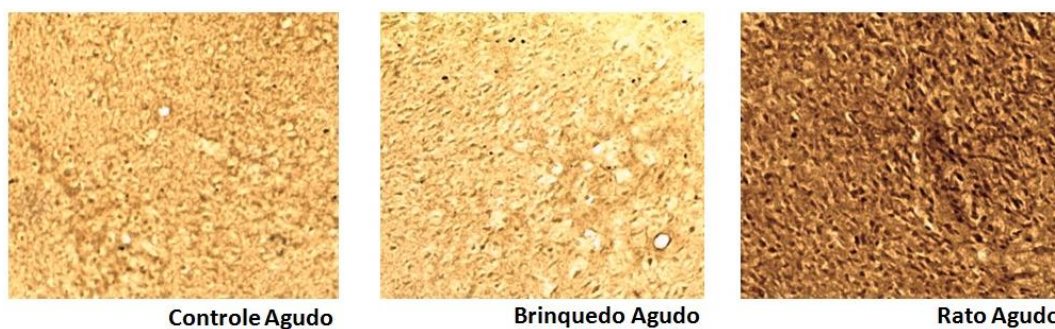


Figura 14– Fotomicrografias de um preparo imuno-histoquímico para Fos de cortes coronais encefálicos da MCPd de camundongos não expostos (grupo controle), expostos ao rato de pelúcia (grupo brinquedo) ou ao rato (grupo rato) agudamente.

6.1.2.1.2 Quantificação do número de células Fos-positivas

A Figura 15 ilustra a média do número de células que expressaram a proteína Fos na MCPd de camundongos submetidos a exposição aguda ao rato.

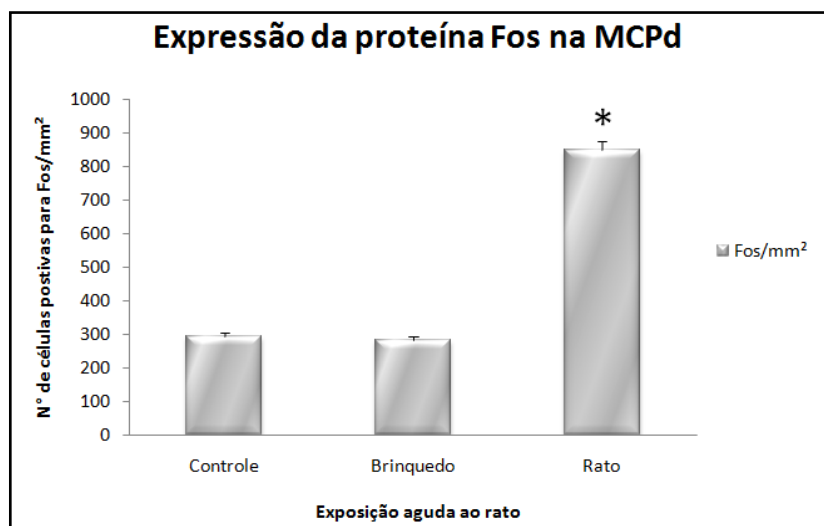


Figura 15 - Avaliação da exposição aguda de camundongos submetidos ao teste de exposição ao rato sobre o número de células que expressaram a proteína Fos. As colunas representam as médias ($\pm$ EPM) de 8 animais/grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle e ao grupo brinquedo. Testes utilizados: ANOVA monofatorial e teste post hoc Newman Keuls.

A ANOVA monofatorial seguida do teste de comparações múltiplas de Newman Keuls revelou que os animais expostos ao rato expressaram significativamente mais células Fos-positivas quando comparado ao grupo brinquedo (exposto ao rato de pelúcia), bem como quando comparado ao grupo controle (não exposto) ($F_{2,21}=416,1$; $p < 0,05$). Enquanto o grupo controle e brinquedo não apresentaram diferença significativa no número de células que expressaram a proteína Fos ($F_{2,21}= 416,1$; $p > 0,05$).

6.1.2.2 Exposições repetidas ao TER

6.1.2.2.1 Fotomicrografias representativas da MCPd

A Figura 16 demonstra fotomicrografias de cortes coronais encefálicos da MCPd processados para técnica de imuno-histoquímica para Fos.

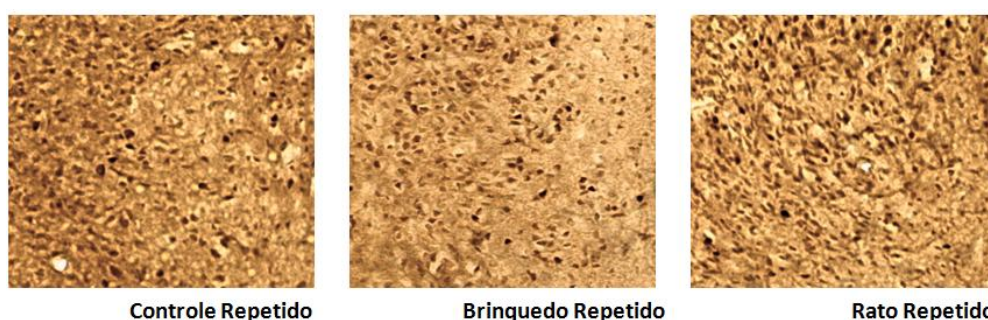


Figura 16 – Fotomicrografias de um preparo imuno-histoquímico para Fos de cortes coronais encefálico da MCP de camundongos não expostos (grupo controle), expostos ao rato de pelúcia (grupo brinquedo) ou ao rato (grupo rato) repetidamente.

6.1.2.2.2 Quantificação do número de células Fos-positivas

A Figura 17 ilustra a média do número de células que expressaram a proteína Fos na MCPd de camundongos submetidos a exposição repetida ao rato.

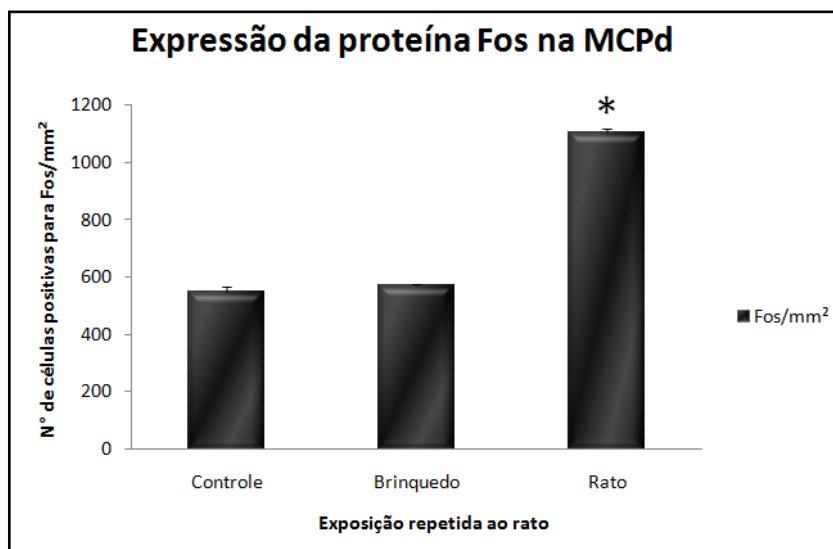


Figura 17 - Avaliação da exposição repetida de camundongos submetidos ao teste de exposição ao rato sobre o número de células que expressaram a proteína Fos. As colunas representam as médias ($\pm$ EPM) de 8 animais/grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle e ao grupo brinquedo. Testes utilizados: ANOVA monofatorial e teste post hoc Newman Keuls.

A ANOVA monofatorial seguida do teste de comparações múltiplas de Newman Keuls revelou que os animais expostos ao rato expressaram significativamente mais células Fos positivas quando comparado ao grupo brinquedo, bem como quando comparado ao grupo controle ($F_{2,21} = 690,7$; $p < 0,05$). Enquanto o grupo controle e brinquedo não apresentaram diferença significativa no número de células que expressaram a proteína Fos ($F_{2,21} = 690,7$; $p > 0,05$).

6.1.2.3 Exposição aguda x exposições repetidas ao TER

A Figura 18 ilustra a média do número de células que expressaram a proteína Fos na MCPd de camundongos expostos ao TER agudo comparado ao TER repetido.

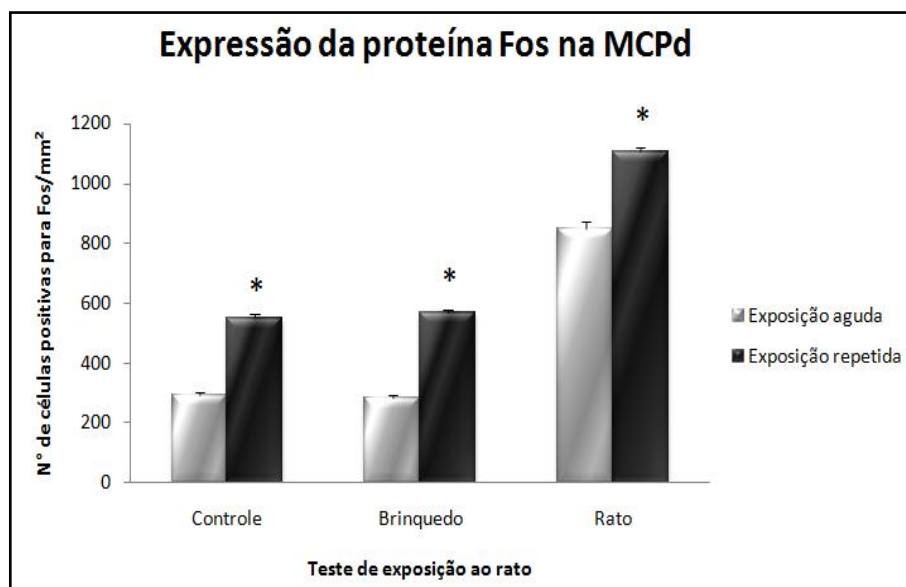


Figura 18 - Avaliação da exposição aguda versus exposição repetida de camundongos submetidos ao teste de exposição ao rato sobre o número de células que expressaram a proteína Fos. As colunas representam as médias ($\pm$ EPM) de 8 animais/grupo. * $p < 0,05$ comparando cada grupo entre exposição aguda e repetida. Testes utilizados: ANOVA bifatorial seguida pelo teste post hoc de Duncan.

A ANOVA bifatorial (Fator 1: Exposição ao rato, brinquedo e controle e Fator 2: Exposição aguda e repetida) seguida do teste post hoc de Duncan revelou que quando todos os grupos das exposições aguda e repetida são comparados entre si, a exposição repetida induziu maior expressão de número de células Fos positivas do que a exposição aguda ($p < 0,05$).

6.1.3 Experimento 1.3 – Avaliação dos comportamentos defensivos de camundongos expostos ao TER

6.1.3.1 Exposição aguda ao TER

6.1.3.1.1 Medidas espaço-temporais

A Figura 19 ilustra as medidas espaço-temporais: tempo de permanência (parâmetros de ansiedade) e número de entradas (parâmetros de locomoção) nas áreas protegidas e desprotegida avaliados em camundongos submetidos à exposição aguda ao brinquedo ou rato.

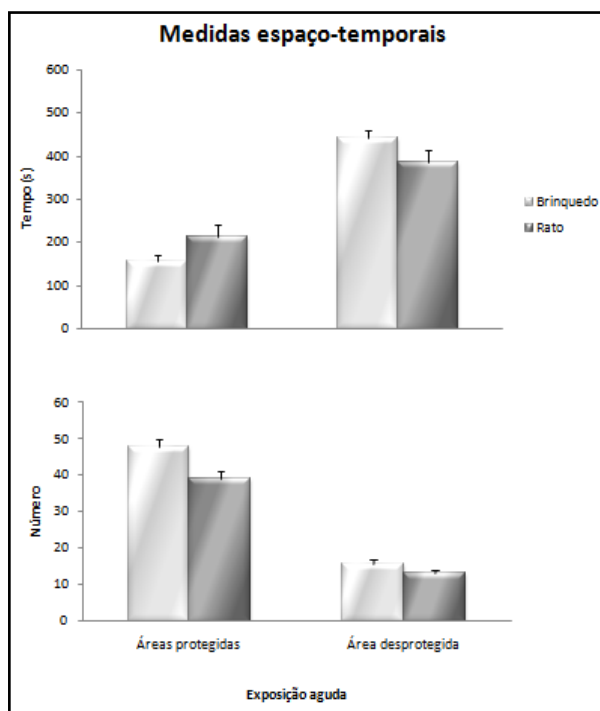


Figura 19 - Avaliação da exposição aguda de camundongos submetidos ao teste de exposição ao rato sobre o tempo de permanência nas áreas protegidas e desprotegida do TER e o número de entradas nessas áreas. As colunas representam as médias $\pm$ EPM de 12 animais/grupo. Teste utilizado: *t* student.

O teste *t* revelou uma tendência à significância na redução do tempo de permanência na área desprotegida dos camundongos expostos ao rato agudamente quando comparado ao brinquedo ($t_{1,10} = 1,75$; $p = 0,09$). Os parâmetros de locomoção não foram alterados, indicado pelo número de entradas, nas áreas protegidas e desprotegida do TER.

6.1.3.1.2 Medidas complementares

6.1.3.1.2.1 Análise do tempo de exibição dos comportamentos de contato e escalada na tela

A Figura 20 ilustra o comportamento de contato e escalada na tela avaliado em camundongos submetidos ao TER agudo.

O teste *t* não indicou significância no aumento em contato com a tela ($t_{1,10}=0,30$; $p = 0,70$) e demonstrou diminuição significativa no tempo de escalada do grupo rato em relação ao brinquedo ($t_{1,10}= 2,16$; $p = 0,04$).

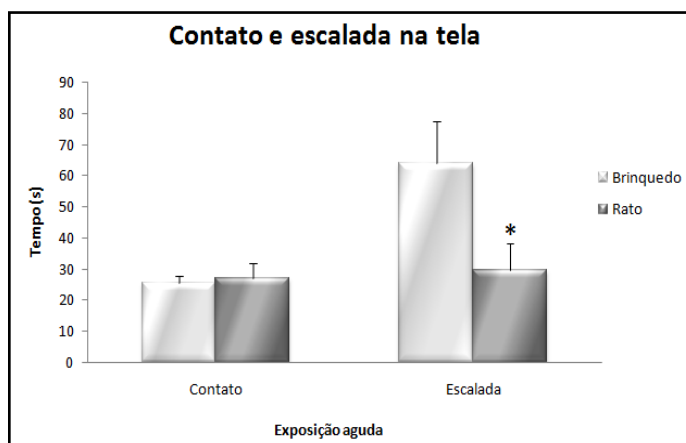


Figura 20 - Avaliação da exposição aguda de camundongos ao TER sobre o tempo de realização do comportamento de contato e escalada na tela. As colunas representam as médias $\pm$ EPM de 12 animais/ grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo brinquedo. Teste *t* student.

6.1.3.1.2.2 Análise do número e tempo de exibição do comportamento de esticada

A Figura 21 ilustra o número e tempo de exibição do comportamento de esticada em camundongos submetidos ao TER agudo.

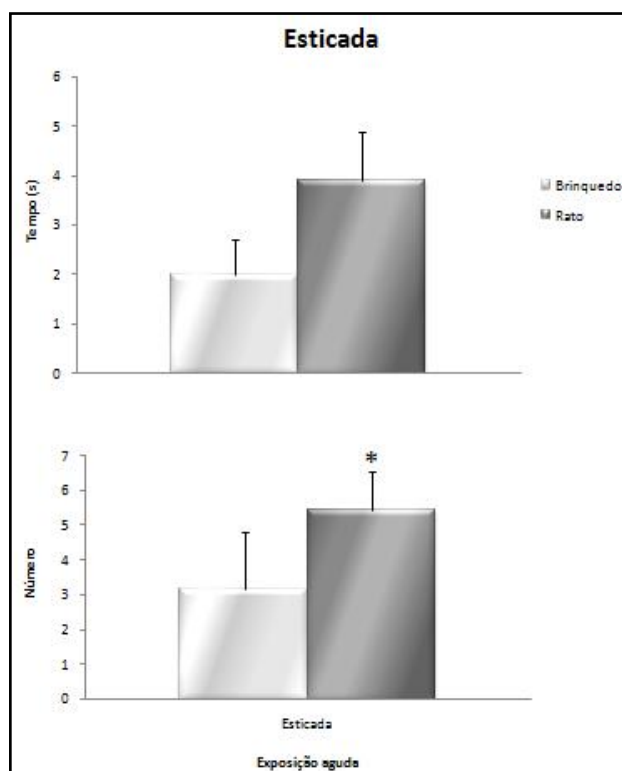


Figura 21 - Avaliação da exposição aguda de camundongos ao TER sobre o número e tempo de realização do comportamento de esticadas. As colunas representam as médias $\pm$ EPM de 12 animais/ grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo brinquedo. Teste Mann Whitney.

O teste não paramétrico Mann Whitney indicou tendência à significância no aumento de tempo ($p = 0,06$) e significativo aumento do número ($p = 0,03$) do comportamento esticado do grupo rato em relação ao brinquedo.

6.1.3.2 Exposições repetidas ao TER

6.1.3.2.1 Medidas espaço-temporais

A Figura 22 ilustra as medidas espaço-temporais: tempo de permanência (parâmetros de ansiedade) e número de entradas (parâmetros de locomoção) nas áreas protegidas e desprotegidas avaliados em camundongos submetidos a exposições repetidas ao brinquedo ou rato.

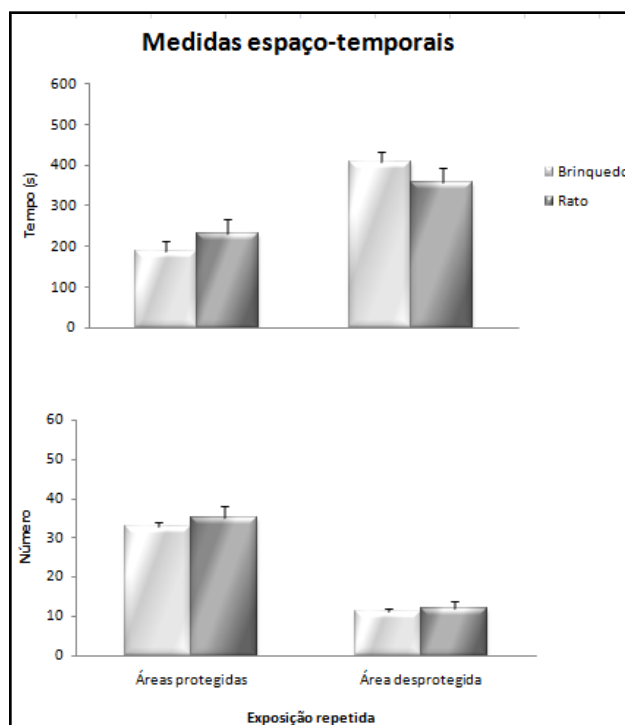


Figura 22 - Avaliação das exposições repetidas de camundongos submetidos ao teste de exposição ao rato sobre o tempo de permanência nas áreas protegidas e desprotegida do TER e o número de entradas nessas áreas. As colunas representam as médias $\pm$ EPM de 12 animais/grupo. Teste utilizado: *t* student.

O teste *t* student revelou uma tendência a significância na redução do tempo de permanência na área desprotegida dos camundongos expostos ao rato repetidamente quando comparado ao brinquedo ($t_{1,10} = 1,84$; $p = 0,08$). Os parâmetros de locomoção não foram alterados, indicado pelo número de entradas, nas áreas protegidas e desprotegida do TER.

6.1.3.2.2 Medidas complementares

6.1.3.2.2.1 Análise do tempo de exibição do comportamento de contato e escalada na tela

A Figura 23 ilustra o comportamento de contato e escalada na tela avaliados em camundongos submetidos ao TER repetidamente.

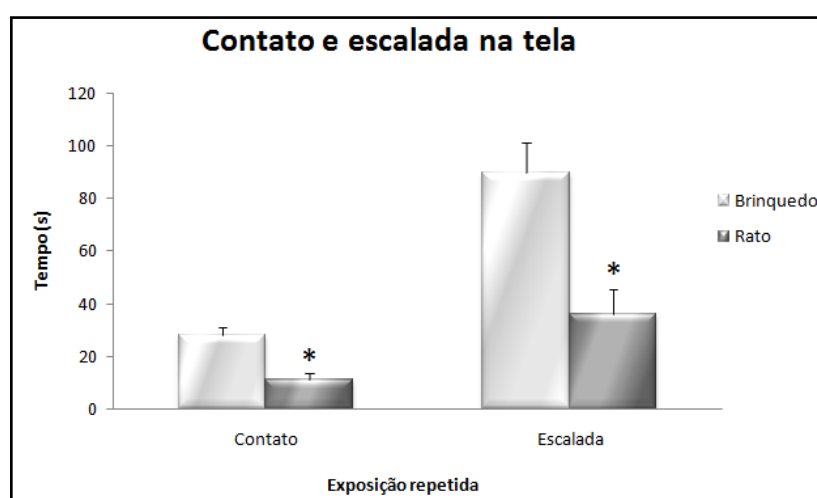


Figura 23 - Avaliação das exposições repetidas de camundongos sobre tempo de realização do comportamento de contato e escalada na tela. As colunas representam as médias $\pm$ EPM de 12 animais/ grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo brinquedo. Teste t student.

O teste t indicou significância na diminuição no tempo em contato ($t_{1,10}=4,45$; $p = 0,0002$) e escalada na tela do grupo rato em relação ao brinquedo ($t_{1,10} = 3,61$; $p = 0,001$).

6.1.3.2.2 Análise do tempo de exibição e número do comportamento de esticada

A Figura 24 ilustra o tempo e número de exibição do comportamento de esticada em camundongos submetidos ao TER repetidamente.

O teste não paramétrico Mann Whitney indicou tendência à significância no aumento de tempo ($p = 0,06$) e do número ($p = 0,07$) do comportamento esticada do grupo rato em relação ao brinquedo.

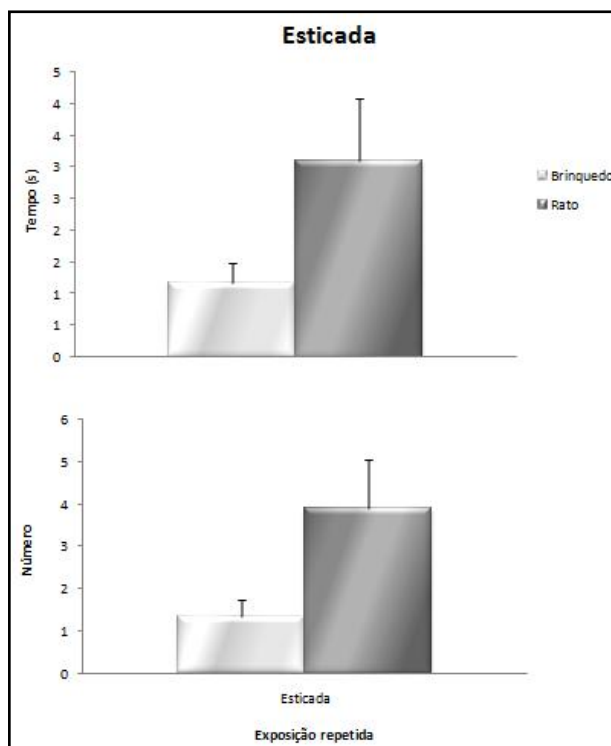


Figura 24 - Avaliação das exposições repetidas de camundongos ao TER sobre o número e tempo de realização do comportamento de esticada. As colunas representam as médias $\pm$ EPM de 12 animais/ grupo. Teste Mann Whitney.

6.1.3.3 Exposição aguda comparada as exposições repetidas ao TER

6.1.3.3.1 Medidas espaço-temporais

A Figura 25 ilustra as medidas espaço-temporais: tempo de permanência (parâmetros de ansiedade) e número de entradas (parâmetros de locomoção) nas áreas protegidas e desprotegidas avaliados em camundongos expostos ao TER agudo comparado ao TER repetido.

A ANOVA bifatorial (Fator 1: Exposição ao rato e brinquedo e Fator 2: Exposição aguda e repetida) seguida do teste post hoc de Duncan revelou que não há diferença significativa no tempo de permanência nas áreas protegidas e desprotegida quando todos os grupos das exposições aguda e repetida são comparados entre si ($p < 0,05$). Os parâmetros de locomoção não foram alterados, indicado pela não significância no número de entradas, nas áreas protegidas e desprotegida do TER.

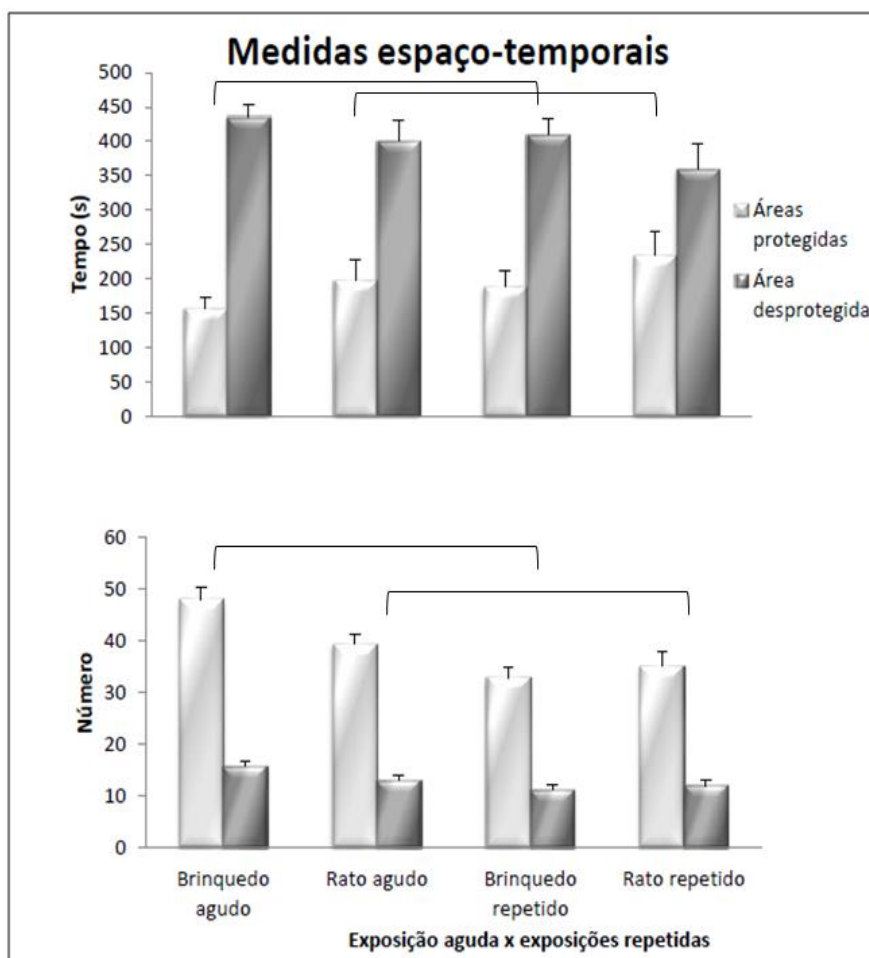


Figura 25 - Avaliação da exposição aguda versus exposições repetidas de camundongos submetidos ao teste de exposição ao rato sobre o tempo de permanência nas áreas protegidas e desprotegida do TER e o número de entradas nessas áreas. As colunas representam as médias $\pm$ EPM de 12 animais/grupo. Teste utilizado: ANOVA bifatorial seguida de post hoc Duncan.

6.1.3.3.2 Medidas complementares

6.1.3.3.2.1 Análise do tempo de exibição do comportamento de contato e escalada na tela

A Figura 26 ilustra o comportamento de contato e escalada na tela avaliado em camundongos submetidos ao TER agudo comparado ao TER repetido.

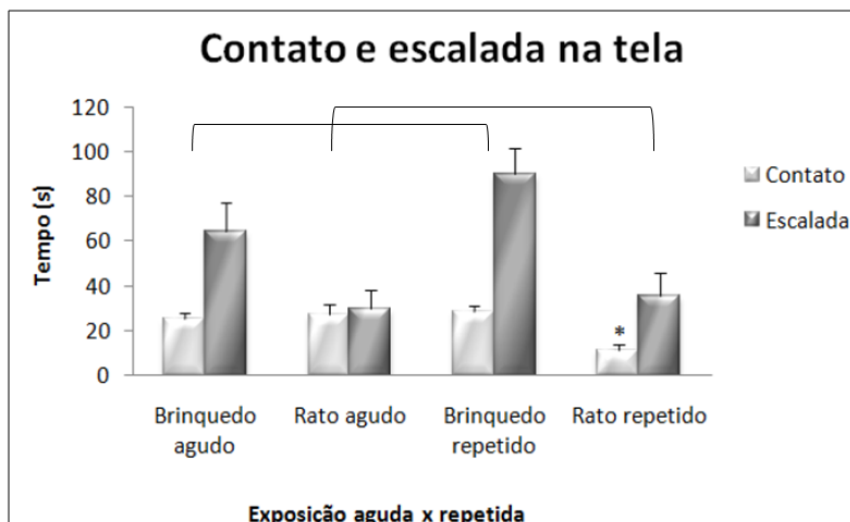


Figura 26 - Avaliação da exposição aguda versus exposições repetidas de camundongos submetidos ao teste de exposição ao rato sobre o tempo de contato e escalada na tela. As colunas representam as médias $\pm$ EPM de 12 animais/grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo brinquedo. Teste utilizado: *t* student.

Quando comparado a exposição aguda com a repetida *t* student indicou diminuição no tempo de permanência em contato com a tela do grupo rato repetido em relação ao grupo rato agudo ($t_{1,10} = 3,09$; $p = 0,005$).

6.1.3.3.2.1 Análise do tempo de exibição e número do comportamento de esticada

A Figura 27 ilustra o número e tempo de exibição do comportamento de esticada em camundongos submetidos ao TER agudo comparado ao TER repetido. Quando comparado a exposição aguda com a repetida nenhum grupo indicou diferença significativa na expressão desse comportamento.

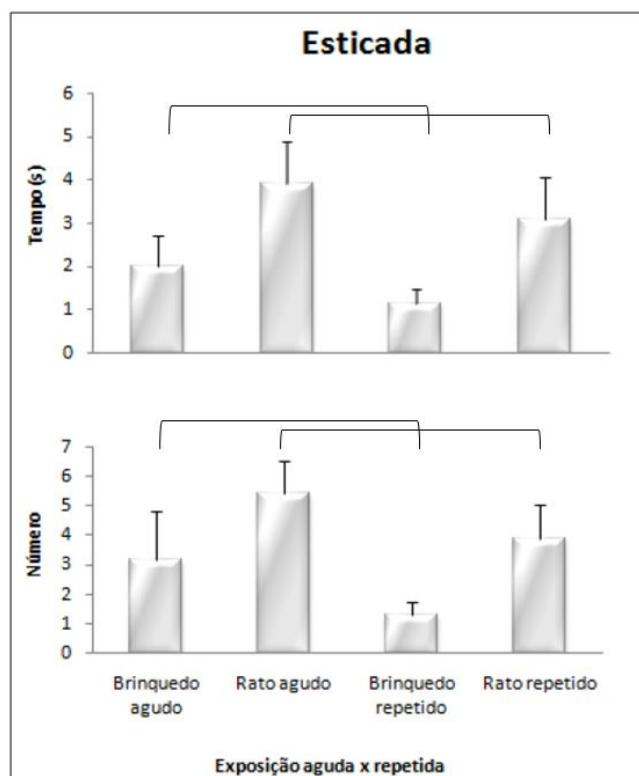


Figura 27 - Avaliação da exposição aguda versus exposições repetidas de camundongos submetidos ao teste de exposição ao rato sobre o comportamento de esticada. As colunas representam as médias $\pm$ EPM de 12 animais/grupo. Teste utilizado: *t* student.

6.1.4 DISCUSSÃO

De acordo com os resultados apresentados sobre a amígdala, pode-se observar que os grupos de camundongos expostos (agudamente ou repetidamente) ao seu predador (rato), quando comparados aos seus respectivos grupos brinquedo e controle, não apresentaram diferença significativa no número de células neuronais que expressaram a proteína Fos intra AMYb indicando que não houve diferença na ativação neuronal.

À primeira vista, esse resultado foi diferente do esperado uma vez que a amígdala possui papel nas respostas defensivas. A amígdala e seus núcleos são recrutados frente a estímulos aversivos potenciais, próximos ou distantes (GRAEFF; GUIMARÃES, 2012), contudo a região da amígdala (central, basolateral e corticomedial) mais ativada em resposta a estímulos parece depender do tipo de ameaça em que o animal é exposto. Silveira e colaboradores (2001) indicaram que a exposição de ratos ao labirinto em T elevado induziu uma maior expressão de células Fos-positivas no núcleo corticomedial quando a tarefa era de esquila, mais representativa de transtorno de ansiedade generalizada, enquanto na tarefa de escape ou

fuga, representativa de pânico, o aumento na imunorreatividade de Fos foi no núcleo basolateral.

Levando-se em consideração que analisamos apenas o núcleo basolateral, podemos inferir que a exposição do camundongo ao seu predador (rato) possa ter ativado outros núcleos como no trabalho de Ducan e colaboradores (1995) que mesmo ao expor ratos a três modelos empíricos de ansiedade como choque na pata, labirinto em cruz elevado ou teste de vocalização ultrassônica, observou que nenhum desses estímulos foi capaz de alterar significativamente a expressão no número de células Fos-positivas na amígdala basolateral, diferença encontrada apenas na amígdala central.

Também é possível que a simples manipulação experimental dos camundongos tenha levado ao efeito teto na marcação da proteína Fos, ou seja, a exposição ao estímulo mais aversivo (rato), não se caracterizou num aumento proporcional na ativação neuronal, visto que o efeito teto já tinha ocorrido. Isso também explicaria o fato da exposição repetida não ter induzido um aumento ainda maior no número de células Fos-positivas como ocorreu na MCPd dos mesmos animais.

Partindo dessas perspectivas, nosso próximo passo será quantificar o número de células que expressaram a proteína Fos nos núcleos central e corticomedial dos camundongos expostos ao TER e, também aumentar o número de amostras, pois devido a perdas durante a histologia e/ou etapas da reação de imuno-histoquímica o número de animais analisados (n experimental) para a amígdala foi baixo e isso pode ter mascarado uma resposta de Fos na amígdala basolateral, levando a um resultado inconclusivo. Porém, cabe ressaltar que o “n” baixo (n=4) foi somente no grupo controle e mesmo assim, os valores de desvio padrão e erro padrão da média foram baixos, fato que sintetiza robustez do resultado obtido mesmo com “n” abaixo do ideal.

Em relação à MCP, de acordo com os resultados apresentados pode-se observar que os grupos de camundongos expostos (agudamente ou repetidamente) ao seu predador (rato), quando comparados aos seus respectivos grupos brinquedo e controle, apresentaram maior ativação neuronal intra MCPd, evidenciada pelo aumento significativo no número de células neuronais que expressaram a proteína Fos.

Embora a investigação da expressão de Fos intra MCPd em camundongos expostos ao TER seja um estudo novo, outros estudos corroboram tal elevação na expressão em animais expostos a outras situações aversivas, que não o TER. Ratos submetidos a estímulos aversivos inatos, como lugares abertos, no teste Labirinto em Cruz Elevado (LCE) ou no Labirinto em T

Elevado (LTE) aumentaram significativamente o número de células Fos-positivas intra MCP (HINKS et al., 1996; SILVEIRA; SANDNER; GRAEFF,1993)

No estudo de Lino-de-Oliveira e colaboradores (2006) foi demonstrado que ratos Wistar submetidos ao estresse por nado forçado apresentaram maior número de Fos-positivas intra MCP e respostas típicas dessa área encefálica como o comportamento de imobilidade. Ainda nesse sentido, outros trabalhos também investigaram a expressão de Fos intra MCPd sob exposição ao predador, mas no caso, ratos foram expostos ao gato, e também aumentaram significativamente a expressão de Fos nessa região (CANTERAS; GOTO; 1999; COMOLI; RIBEIRO-BARBOSA; CANTERAS, 2003).

Segundo nossos resultados, o grupo controle e o grupo brinquedo quando comparados entre si não apresentaram diferença significativa no número de células que expressaram a proteína Fos, reforçando a ideia de que o estímulo aversivo, em nossos estudos, foi, de fato, a presença do predador real. Ou seja, outros fatores como um novo ambiente, o aparato e até mesmo a presença de um rato de pelúcia não alteraram a expressão de células Fos-positivas intra MCPd. Assim como nos estudos de Yang e colaboradores (2004), os quais submeteram diferentes linhagens de camundongos a ratos Long Evans ou a um rato de pelúcia e observaram comportamentos ansiogênicos significativos apenas nos animais que foram expostos ao rato de verdade.

De modo curioso e talvez inesperado, quando os grupos da exposição aguda e repetida são comparados entre si, foi observado que os animais expostos repetidamente expressaram maior número de células Fos-positivas que os animais expostos agudamente demonstrando um efeito do número de exposições sobre a elevação da expressão de Fos.

O fato intrigante é que quando analisados apenas os grupos entre um tipo de exposição (aguda ou repetida), foi demonstrado que a exposição dos camundongos ao rato de pelúcia (grupo brinquedo) não foi aversiva, uma vez que não houve diferença do seu respectivo controle. Sendo assim, esperava-se que, quando comparados os grupos controles da exposição aguda x repetida, e brinquedo da exposição aguda x repetida, os mesmos não expressariam diferença significativa no número de Fos-positivas intra MCP, fato não ocorrido, pois se observarmos na figura 18 está demonstrado que há diferença entre os controles que permaneceram nas suas caixas-viveiro e entre os animais que foram expostos ao brinquedo de modo agudo ou repetido, bem como entre os expostos ao rato de modo agudo e repetido. Esta última diferença pode expressar maior aversão devido à repetição na exposição ao estímulo aversivo. Mesmo a exposição repetida ao animal de pelúcia, embora não esperado pode ter gerado diferença na expressão de Fos possivelmente pela maior manipulação, uma vez que os

animais desse grupo foram expostos e manipulados cinco vezes enquanto o grupo agudo uma vez só.

Embora não esperada, a diferença entre os controles (agudo x repetido) pode também ter ocorrido devido a uma maior manipulação de todos os animais do grupo repetido, já que, com a finalidade de constatar que os camundongos expostos repetidamente ao rato estavam saudáveis, cada animal do grupo foi pesado e o consumo de ração avaliado, com no mínimo, uma hora antes de cada exposição. Para que essa manipulação não alterasse a expressão de Fos entre os grupos da exposição crônica e por padronização, todos os animais passaram pela mesma manipulação, tanto o grupo controle, brinquedo, bem como o grupo rato. Fato que não ocorreu com nenhum camundongo dos grupos da exposição aguda.

A simples retirada das caixas moradias dos animais para outro ambiente e manipulação para pesagem dos camundongos, por mais delicada que seja, pode ser aversiva aos animais, uma vez que os mesmos não estavam habituados. Visto que a MCP pode ser ativada em resposta a estímulos aversivos, essa manipulação pode ter gerado uma expressão de células Fos-positivas intra MCPd, o que de fato ocorreu quando comparado aos grupos agudos. Entretanto essa diferença precisa de estudos adicionais para respostas mais conclusivas e, o fato de ter ocorrido tais diferenças não interferem na sugestão de que a MCP esteja envolvida na resposta gerada pela exposição ao TER já que o grupo exposto ao rato exibiu maior expressão de Fos comparado tanto ao brinquedo quanto ao controle quando analisado apenas os grupos entre um tipo de exposição. Alguns estudos indicam que são necessários ao menos nove dias de manipulação para que a expressão de Fos, em áreas encefálicas relacionadas ao sistema aversivo, não seja significativa (MELIA et al., 1994; RYABININ, WANG; FINN, 1999). Entretanto a manipulação para pesagem dos camundongos foi feita apenas por 5 dias e intercalados e, por esse motivo, estudos adicionais deverão ser realizados para certificar que essa possibilidade seja realmente viável.

Além disso, cabe ressaltar que essa manipulação prévia, seja por nenhum ou vários dias, não interfere na resposta aversiva quando um animal é exposto a um novo estímulo (MELIA, et al., 1994; WATANABE; STONE; MCEWEN, 1994). Ou seja, existindo ou não a manipulação prévia, quando os camundongos foram expostos ao rato, por ser um novo estímulo aversivo, a resposta, naquele momento, foi íntegra e não afetada por outros fatores antecedentes. Talvez por isso, existem diferentes protocolos de manipulação antecedentes a um estímulo aversivo, por exemplo, Silveira e colaboradores (1993) manipularam os animais por 3 a 4 dias antes da exposição dos mesmos ao LCE, em contrapartida, Hinks e

colaboradores (1996) e Duncan e colaboradores (1996) não faziam nenhuma manipulação prévia dos animais antes da exposição ao LCE.

No presente estudo o estímulo aversivo estudado foi à presença do predador, sendo assim, ao analisar os resultados podemos observar que os camundongos expostos repetidamente ao rato expressaram significativamente mais células Fos-positivas quando comparado aos camundongos expostos agudamente.

Trabalhos na literatura indicam que a exposição repetida de animais a algum estímulo aversivo resulta na “habituação” da expressão do gene c-Fos e, portanto, na proteína Fos (ASANUMA, 1992; ASANUMA, OGAWA, 1994). Ou seja, na medida em que o animal é exposto, a resposta neuronal será mais específica para o estímulo aversivo e, portanto, o número de células Fos-positivas tenderia a diminuir. Esse fato, olhado sem maiores análises, contradiz nossos resultados. Mas não podemos deixar de ressaltar que, uma vez que a avaliação de Fos intra MCP no teste de exposição ao rato é inédita, essas discrepâncias podem se dever às diferenças no tipo de estímulo e também ao número de vezes que a exposição foi realizada. Os trabalhos até então publicados analisaram a expressão de Fos em animais submetidos ao LCE, LTE, nado forçado e exposição ao gato, como mencionado anteriormente. O número de exposições utilizado no nosso trabalho baseou-se em outros trabalhos que demonstraram alterações após cinco exposições a estressores como a derrota social. Nesse sentido, Boyson e colaboradores (2011) demonstraram que cinco exposições em dias alternados ao estresse de derrota social, provocava sensibilização cruzada à cocaína e intensificava a autoadministração da mesma. Ou seja, nesse estudo de Boyson, cinco exposições foram suficientemente geradoras de estresse para provocar uma resposta, como, por exemplo, o aumento de autoadministração de uma substância psicoativa, a cocaína. No nosso estudo foi utilizado outro tipo de estresse, a exposição ao rato e, talvez as cinco exposições ao rato e em dias intercalados, realizadas neste trabalho podem não ter sido geradoras de “habituação” da expressão de Fos intra MCP, sendo considerado, ainda, um tipo de exposição não crônica, mas sim subcrônica. Nesse caso a repetição da exposição poderia não gerar habituação resultante de uma adaptação, mas sim uma intensificação do efeito aversivo sobre o animal, gerando uma expressão de Fos ainda maior que aquele que foi exposto somente uma vez. Por esse motivo, serão necessários estudos de novos protocolos para o TER ser, de fato, crônico e discussões adicionais a partir dos resultados encontrados.

No entanto, o fato é que, em nossos estudos, podemos observar que a exposição de camundongos ao seu predador rato, seja por uma vez ou cinco vezes intercaladas, induz um

aumento na ativação neuronal intra MCPd relacionando assim, uma participação dessa área na modulação da resposta gerada pela exposição ao TER.

Contudo, apesar dos resultados da expressão de Fos indicarem ativação neuronal da MCP, um fato inesperado foi que, quando analisamos a resposta comportamental dos mesmos camundongos utilizados para expressão de Fos, expostos (agudamente ou repetidamente) ao seu predador (rato) comparado ao grupo brinquedo (exposto ao rato de pelúcia), observamos apenas uma tendência a significância na queda do tempo que os animais expostos ao rato permaneceram na área desprotegida comparado com os camundongos expostos ao brinquedo.

Devido a perdas durante a histologia e/ou etapas da reação de imuno-histoquímica o animais analisados para quantificação do número de células Fos-positivas na AMYb e MCPd além de serem diferentes, não conseguimos um número de amostras AMYb para adequada estatística comportamental. Por isso optamos, por hora, colocar o comportamento de todos os 12 animais experimentais, embora na imuno-histoquímicas observamos um “n” de 8 para a MCP e 4-6 para a amígdala.

O fato intrigante é que obtivemos diferença na ativação neuronal intra MCPd de camundongos expostos ao rato, e se a MCP parece ser responsável por respostas comportamentais de animais frente estímulos aversivos, esperava-se que os camundongos permanecessem significativamente por menos tempo próximo ao predador (e não tendência) quando comparado aos animais que foram expostos apenas a um rato de pelúcia, resposta observada em trabalhos como o de Campos e colaboradores (2013) e Amaral e colaboradores (2010). Contudo, esse fato não necessariamente é contraditório, visto que a resposta comportamental depende de muitos fatores e envolve uma circuitaria neuronal completa. Além disso, a análise complementar demonstrou sim efeitos aversivos da exposição ao rato comparado com o brinquedo. Nesse sentido destacamos o menor tempo de escalada na tela exibido pelos animais que foram expostos ao rato, além do menor tempo de contato com a tela no grupo de exposições repetidas. Ainda na análise complementar, os números e os tempos de realização do comportamento de esticadas também foram ou tenderam a ser ($p = 0,06$) alterados significativamente quando comparamos exposição ao rato ou brinquedo, demonstrando que na presença do rato esse comportamento de avaliação de risco foi mais exibido. Por esse motivo, embora tenhamos verificado uma tendência ($p = 0,09$ na resposta espaço-temporal), não podemos dizer que não houve aversão devido a essas alterações nas medidas complementares.

Contudo, observado esse paradigma na expressão de Fos e na resposta comportamental, testes adicionais foram feitos em nosso laboratório objetivando verificar se o processo de

habituação poderia estar influenciando nesses resultados. Sucintamente, para melhor entendimento, usamos nesse estudo um dia de habituação, procedimento que foi seguido do estudo de Campos e colaboradores (2013), porém no estudo de Amaral e colaboradores (2010), onde observou-se resposta como elevação dos níveis de corticosterona após a exposição ao TER, a fase de habituação aconteceu em quatro dias e o teste era realizado no quinto dia. Dessa forma testamos e observamos que parece haver maior esquiva da superfície nos animais que foram habituados por dois e três dias comparados aos habituados por somente um dia como nos experimentos aqui apresentados. Embora preliminares, estes testes podem indicar que alterações no protocolo podem ser necessárias.

Contudo, vale ressaltar que a análise celular intra MCPd gerou uma resposta homogênea entre os animais analisados, sendo a taxa de erro de 0,1% e desvio padrão de 0,2%, enquanto a análise comportamental a taxa de erro entre os animais está por volta de 54% e desvio padrão de 9% podendo afetar criticamente a estatística do comportamento. Sendo assim, estudos adicionais deverão ser feitos, bem como um possível aumento no “n” de camundongos para análise comportamental, antes de decidirmos alterações no protocolo de habituação.

6.2 ESTUDO 2: AVALIAÇÃO DO PAPEL DA MCPD, DO CRF E DA PKA INTRA MCPD NAS RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS EXIBIDAS POR CAMUNDONGOS NO TER:

6.2.1 Experimento 2.1 - Avaliação dos comportamentos defensivos expressos no TER em camundongos submetidos à inibição da atividade da MCPd, via microinjeção de baclofeno + muscimol, agonistas gabaérgicos:

6.2.1.1 Sítio de Injeção

A Figura 28 demonstra uma representação esquemática e uma fotomicrografia histológica dos sítios de injeção na MCPd. Esta representação demonstra o sítio utilizado nos experimentos seguintes.

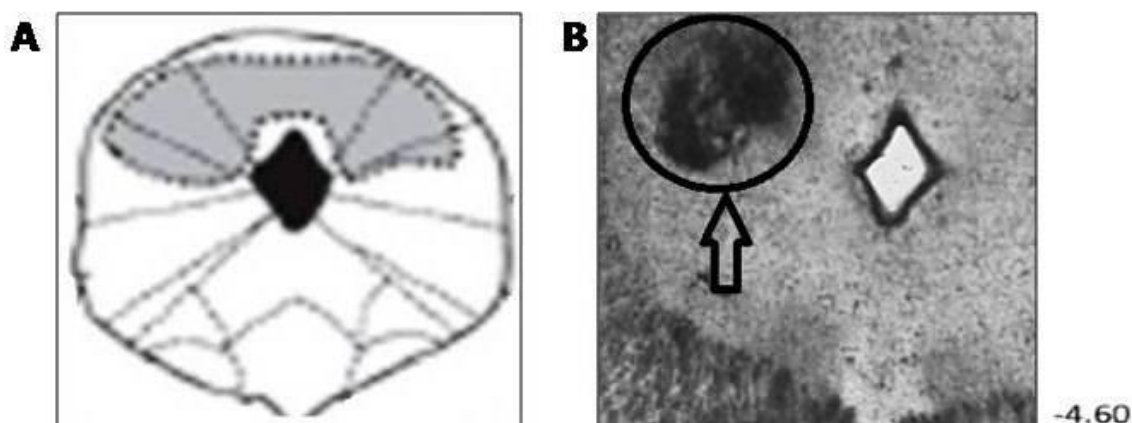


Figura 28 - (A) Representação esquemática MCP em camundongos. A área destacada na cor cinza corresponde aos sítios de microinfusão na região dorsal. Seção corresponde a -4,60mm de bregma. Fonte adaptada: Atlas Paxinos e Fraklin (2001). (B) Fotomicrografia da MCP de um camundongo representativo usado em nosso experimento. A seta aponta para o local (circundado) que foi feita a microinjeção, sendo positiva para MCPd.

6.2.1.2 Análise das medidas espaço-temporais

A Figura 29 ilustra as medidas espaço-temporais: tempo de permanência (parâmetros de ansiedade) e número de entradas (parâmetros de locomoção) nas áreas protegidas e desprotegida avaliados em camundongos tratados, com veículo ou muscimol + baclofeno (MB) intra MCPd, e submetidos ao TER.

O teste *t* revelou que a injeção de MB foi eficaz em elevar o tempo de permanência dos camundongos na área desprotegida (mais aversiva) do aparato, demonstrando efeito ansiolítico de MB quando comparado ao veículo ($t_{1,11} = 2,48$; $p = 0,03$). Enquanto, tal administração de MB intra MCPd não alterou significativamente o número de entradas, dos camundongos expostos ao TER, nem nas áreas protegidas ($t_{1,11} = 0,81$; $p = 0,43$), nem na desprotegida ($t_{1,11} = 1,06$; $p = 0,30$) demonstrando que o tratamento não afetou a locomoção geral dos animais.

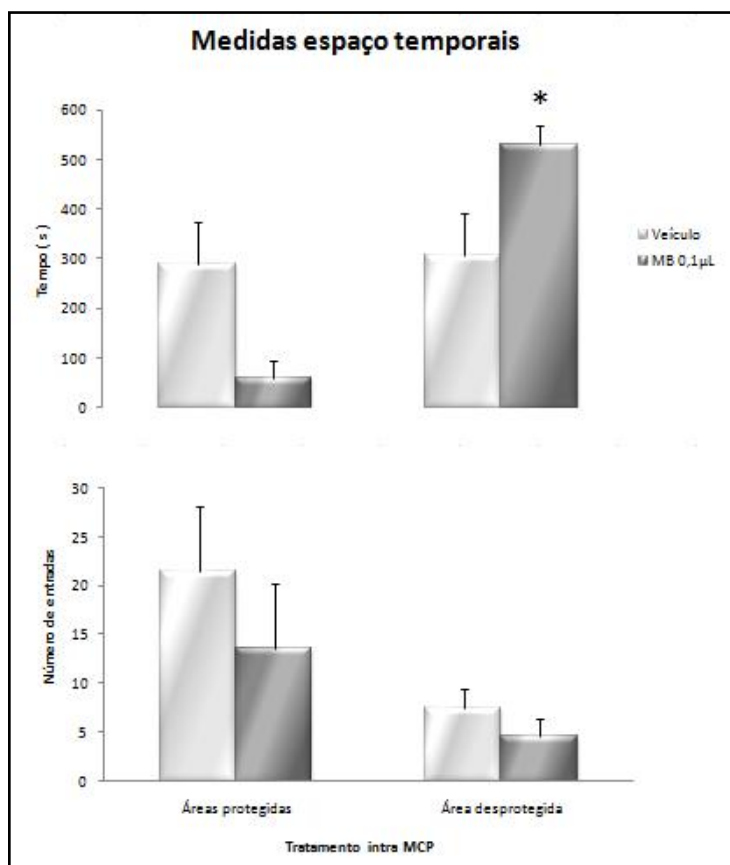


Figura 29 - Avaliação da microinjeção de muscimol (0,06nmol) + baclofeno (0,6nmol) (MB/0,1μL) ou veículo (salina 0,9%/0,1μL) na MCPd de camundongos sobre o tempo de permanência nas áreas protegidas e desprotegida do TER e o número de entradas nessas áreas. As colunas representam as médias $\pm$ EPM de 6-7 animais/grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo veículo. Teste utilizado: *t* student.

6.2.1.3 Análise das medidas complementares

6.2.1.3.1 Análise do tempo de exibição do comportamento de contato e escalada na tela

A Figura 30 ilustra o comportamento de contato e escalada na tela avaliado em camundongos, tratados com veículo ou MB intra MCPd, e submetidos ao TER.

O teste *t* não indicou diferença significativa no tempo em que os camundongos permaneceram em contato com a tela ($t_{1,11} = 0,33$; $p = 0,74$), nem na escalada na mesma ($t_{1,11} = 0,81$; $p = 0,43$) quando comparado ao veículo.

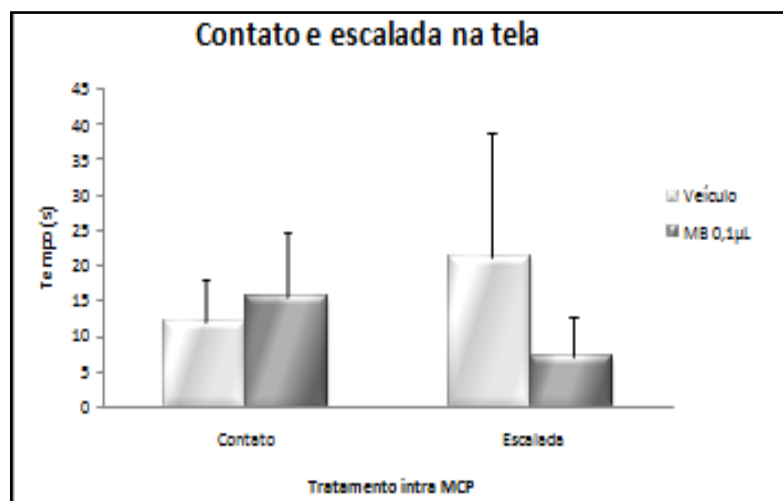


Figura 30 - Avaliação da microinjeção de muscimol (0,06nmol) + baclofeno (0,6nmol) (MB/0,1μL) ou veículo (salina 0,9% / 0,1μL) na MCPd de camundongos sobre o tempo de exibição do comportamento de contato e escalada na tela. As colunas representam as médias $\pm$ EPM de 6-7 animais/grupo. Teste utilizado: *t* student.

6.2.1.3.3 Análise do tempo de exibição do comportamento de esticada

A Figura 31 ilustra o comportamento de esticada avaliado em camundongos, tratados com veículo ou MB intra MCPd, e submetidos ao TER.

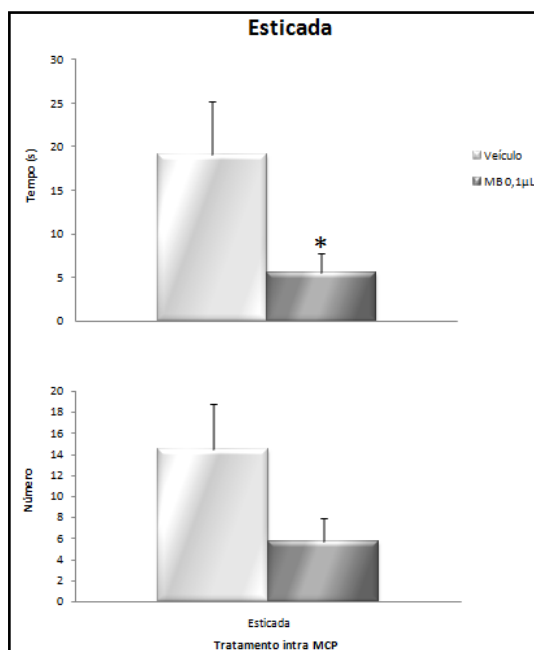


Figura 31 - Avaliação da microinjeção de muscimol (0,06nmol) + baclofeno (0,6nmol) (MB/0,1μL) ou veículo (salina 0,9%/0,1μL) na MCPd de camundongos sobre o tempo de exibição do comportamento de contato e escalada na tela. As colunas representam as médias $\pm$ EPM de 6-7 animais/grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo veículo. Teste utilizado: *t* student.

O teste t indicou que camundongos tratados intra MCP com MB exibiram menos tempo de esticada ($t_{1,11} = 2,23$; $p = 0,04$), bem como tenderam a realizar esse comportamento menos vezes ($t_{1,11} = 1,90$; $p = 0,08$).

6.2.2 Experimento 2.2 – Avaliação dos comportamentos defensivos expressos no TER por camundongos que receberam microinjeção de CP, antagonista CRF1, intra MCPd:

6.2.2.1 Análise das medidas espaço-temporais

A Figura 32 ilustra as medidas espaço-temporais: tempo de permanência (parâmetros de ansiedade) e número de entradas (parâmetros de locomoção) nas áreas protegidas e desprotegida avaliados em camundongos tratados, com veículo ou CP intra MCPd, e submetidos ao TER.

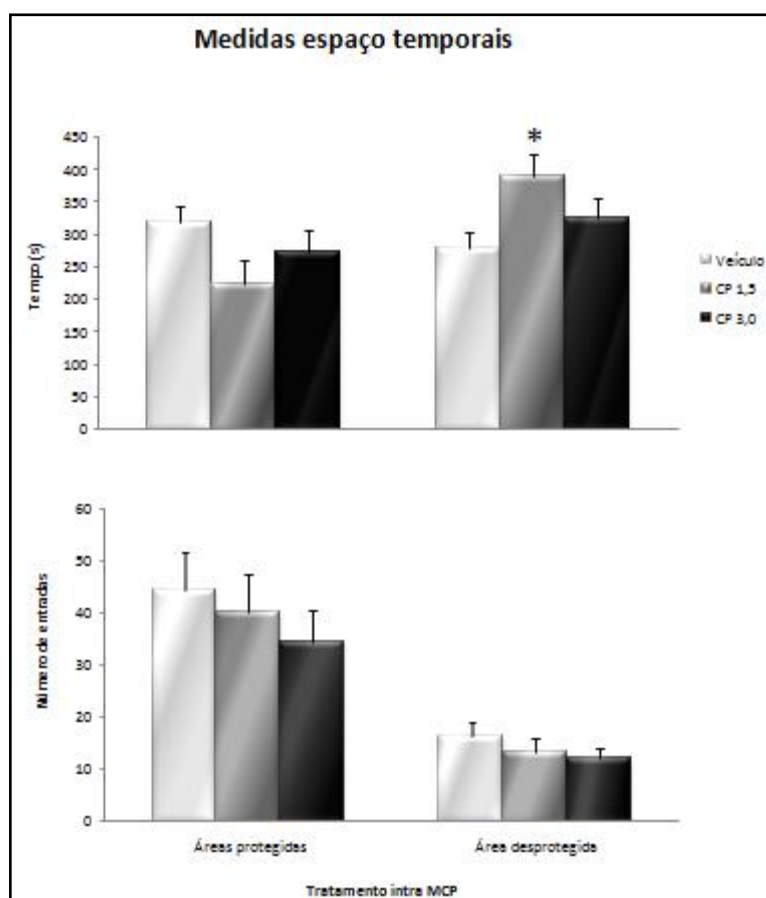


Figura32 - Avaliação da microinjeção de CP (1,5 ou 3,0 nmol/0,1 μ L) ou veículo (salina 0,9% / 0,1 μ L) na MCPd de camundongos sobre o tempo de permanência e o número de entradas nas áreas protegida e desprotegida do TER. As colunas representam as médias $\pm$ EPM de 9-10 animais/grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo veículo. Teste utilizados: ANOVA monofatorial e teste post hoc Newman-keuls.

A ANOVA monofatorial seguida do teste de comparações múltiplas de Newman-keuls revelou que a injeção de CP, na dose de 1,5 nmol (mas não 3,0 nmol) foi eficaz em elevar o tempo de permanência do animal na área desprotegida do aparato denotando efeito ansiolítico de CP ($F_{2,26} = 3,47$; $p < 0,05$) quando comparado ao veículo. Enquanto CP em ambas as doses, não provocou alteração significativa no número de entradas dos camundongos nas áreas protegidas ($F_{2,26} = 0,51$; $p > 0,05$) e desprotegida ($F_{2,26} = 0,82$; $p > 0,05$) demonstrando que os tratamentos não alteraram a locomoção do animal.

6.2.2.2 Análise das medidas complementares

6.2.2.2.2 Análise do tempo de exibição do comportamento de contato e escalada na tela

A Figura 33 ilustra o comportamento de contato e escalada na tela avaliado em camundongos tratados com veículo ou CP intra MCPd, e submetidos ao TER.

ANOVA monofatorial não indicou diferença significativa no contato ($F_{2,26} = 0,08$; $p > 0,05$), nem na escalada na tela ($F_{2,26} = 0,69$; $p > 0,05$) nos diferentes tratamentos com CP (1,5 e 3,0 nmol) em relação ao veículo.

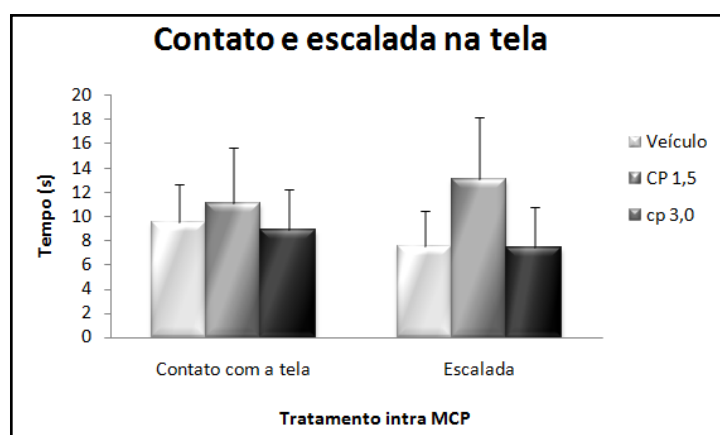


Figura33 - Avaliação da microinjeção de CP (1,5 ou 3,0 nmol/0.1 μ L) ou veículo (salina 0,9% / 0,1 μ L) na MCPd de camundongos sobre tempo de realização do comportamento de contato e escalada na tela. As colunas representam as médias $\pm$ EPM de 9-10 animais/ grupo. Teste ANOVA monofatorial.

6.2.2.2.3 Análise do tempo de exibição e número do comportamento de esticada

A Figura 34 ilustra o comportamento de esticada avaliado em camundongos tratados com veículo ou CP intra MCPd, e submetidos ao TER.

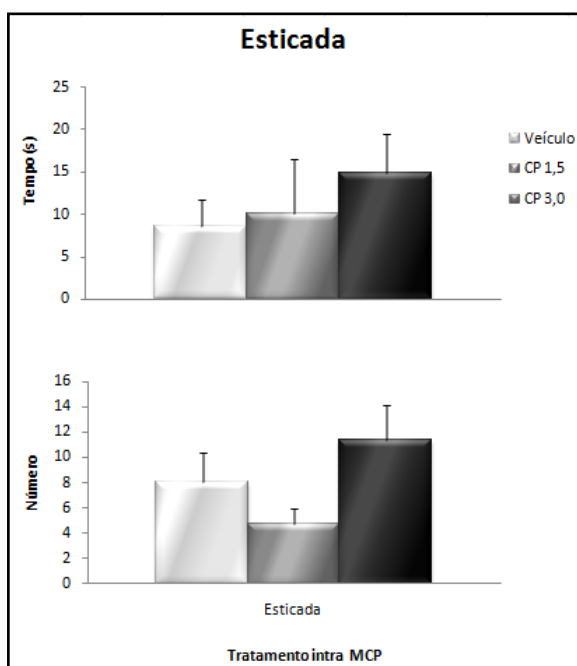


Figura34 - Avaliação da microinjeção de CP (1,5 ou 3,0 nmol/0,1 µL) ou veículo (salina 0,9% / 0,1 µL) na MCPd de camundongos sobre o comportamento de esticada. As colunas representam as médias $\pm$ EPM de 9-10 animais/ grupo. Teste ANOVA monofatorial.

ANOVA monofatorial não indicou diferença significativa no tempo de exibição do comportamento de esticada ($F_{2,26} = 0,41$; $p > 0,05$) em nenhuma das doses (1,5 e 3,0nmol) quando comparada ao veículo. Entretanto indicou uma tendência a significância no aumento do número de esticadas ($F_{2,26} = 2,15$; $0,05 < p < 0,1$).

6.2.3 Experimento 2.3 – Avaliação dos comportamentos defensivos expressos no TER por camundongos que receberam microinjeção de H89, inibidor da PKA, intra MCPd:

6.2.3.1 Análise das medidas espaço-temporais

A Figura 35 ilustra as medidas espaço-temporais: tempo de permanência (parâmetros de ansiedade) e número de entradas (parâmetros de locomoção) nas áreas protegidas e

desprotegida avaliados em camundongos tratados, com veículo ou H89 intra MCPd, e submetidos ao TER.

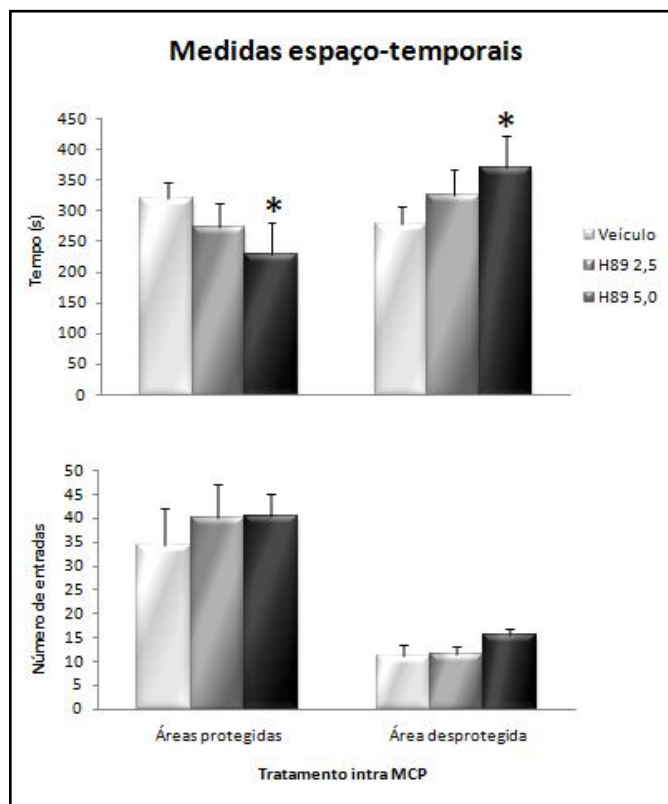


Figura 35- Avaliação da microinjeção de H89 (2,5 ou 5,0 nmol/0,1 μ L) ou veículo (salina 0,9% / 0,1 μ L) na MCPd de camundongos sobre o tempo de permanência e o número de entradas nas áreas protegidas e desprotegida do TER. As colunas representam as médias $\pm$ EPM de 9-10 animais/grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo veículo. Teste utilizados: ANOVA monofatorial e teste post hoc Newman-keuls.

A ANOVA monofatorial seguida do teste de comparações múltiplas de Duncan revelou que a injeção de H89, na dose de 5,0 nmol, foi eficaz em elevar o tempo de permanência do animal na área desprotegida do aparato denotando efeito ansiolítico do H89 ($F_{2,24} = 3,0$; $p = 0,02$) em comparação ao grupo veículo.

Enquanto que a injeção de H89, em ambas as doses (2,5 e 5,0 nmol), não provocou alteração significativa no número de entradas dos camundongos nas áreas protegidas ($F_{2,24} = 0,3$; $p > 0,05$) e desprotegida ($F_{2,26} = 0,13$; $p > 0,05$) demonstrando que os tratamentos não alteraram a locomoção do animal.

6.2.3.2 Análise das medidas complementares

6.2.3.2.2 Análise do tempo de exibição do comportamento de contato e escalada na tela

A Figura 36 ilustra o comportamento de contato e escalada na tela avaliado em camundongos tratados, com veículo ou H89 intra MCPd, e submetidos ao TER.

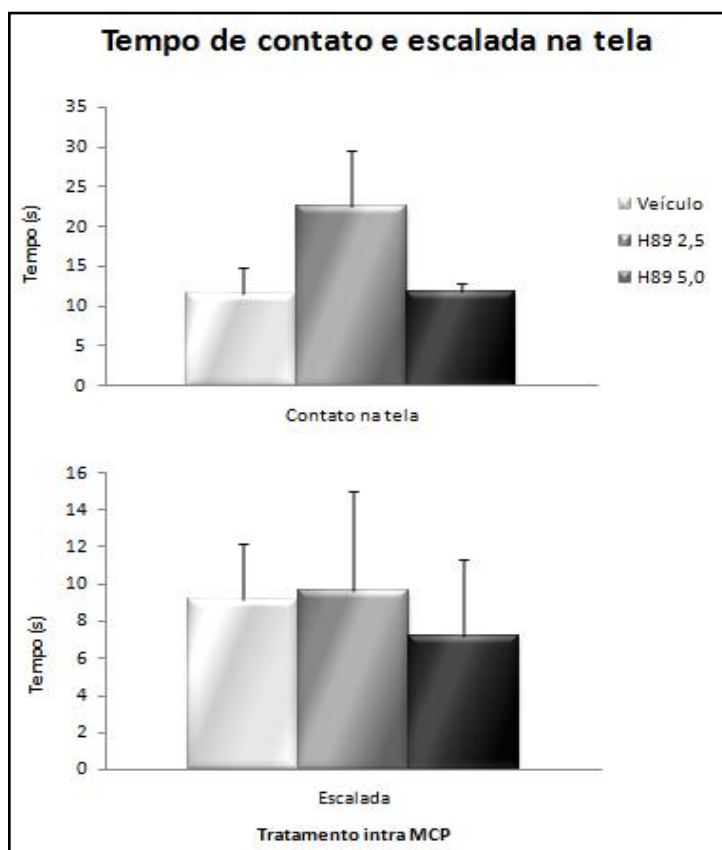


Figura 36- Avaliação da microinjeção de H89 (2,5 ou 5,0 nmol/0,1 μ L) ou veículo (salina 0,9% / 0,1 μ L) intra MCPd de camundongos sobre o contato e escalada na tela. As colunas representam as médias $\pm$ EPM de 9-10 animais/grupo. Teste utilizados: ANOVA monofatorial e teste post hoc Newman-keuls.

ANOVA monofatorial não indicou diferença significativa no contato ($F_{2,26} = 0,08$; $p > 0,05$), nem na escalada na tela ($F_{2,26} = 0,69$; $p > 0,05$) no tratamento com nenhuma das doses de H89 (2,5 e 5,0 nmol) em relação ao veículo.

6.2.3.2.3 Análise do tempo de exibição e número do comportamento de esticada

A Figura 37 ilustra o comportamento de esticada avaliado em camundongos tratados, com veículo ou H89 intra MCPd, e submetidos ao TER.

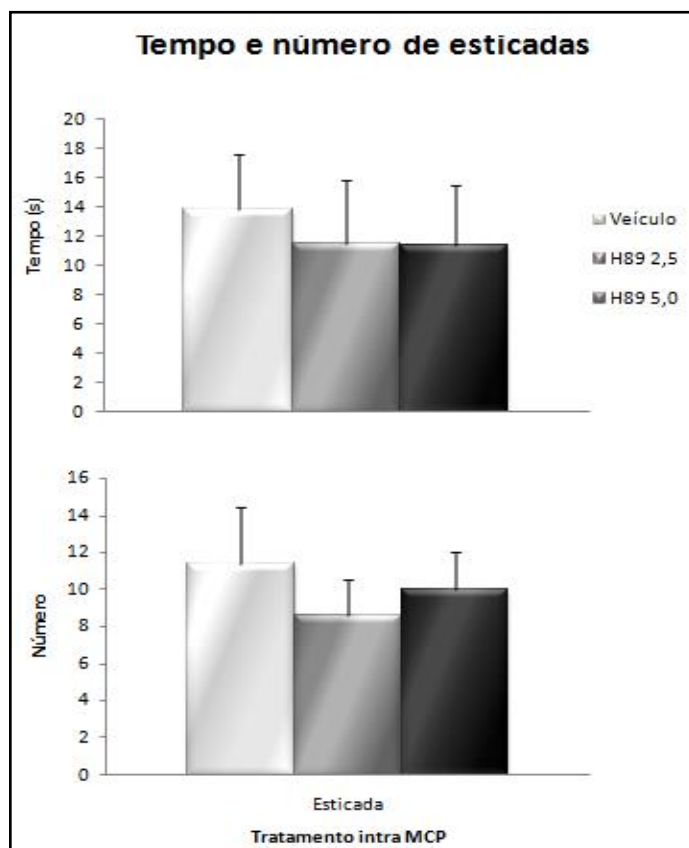


Figura 37- Avaliação da microinjeção de H89 (2,5 ou 5,0 nmol/0,1 μ L) ou veículo (salina 0,9% / 0,1 μ L) intra MCPd de camundongos sobre o comportamento de esticada. As colunas representam as médias $\pm$ EPM de 9-10 animais/grupo. Teste utilizados: ANOVA monofatorial e teste post hoc Newman-keuls.

ANOVA monofatorial não indicou diferença significativa no tempo e número de exibição do comportamento de esticada ($F_{2,26} = 0,41$; $p > 0,05$) em nenhuma das doses (2,5 e 5,0nmol) quando comparada ao veículo.

6.2.4 DISCUSSÃO

De acordo com os resultados apresentados no estudo 2, ao ativar receptores gabaérgicos, sabidamente inibitórios, intra MCPd, por meio da associação de muscimol (agonista de receptores GABA A) e baclofeno (agonista GABA B) foi observado o aumento na exibição de comportamentos do tipo ansiolíticos como o maior tempo de permanência dos

camundongos na área desprotegida do TER. Bem como menos tempo realizando avaliação de risco, aqui registradas através do comportamento de esticar.

O agonismo dos receptores GABA A e GABA B é um procedimento que acarreta na diminuição da atividade da região encefálica em questão por serem os receptores de caráter inibitório, os quais promoverão hiperpolarização dos neurônios locais. Sendo assim, a administração de um agente como o muscimol, já bastante utilizado em outros modelos, associado ao baclofeno, menos utilizado, consiste em uma forma eficiente de bloquear a atividade da nossa área de estudo (MCPd) e, portanto, verificar a participação da mesma nos comportamentos gerados pela exposição ao TER. Assim, devido a alteração de parâmetros comportamentais dos nossos animais pós inibição da MCPd, nossos resultados indicam um importante papel da MCP em resposta ao estímulo aversivo no TER.

Entretanto, agonistas gabaérgicos além de serem usados como ferramentas para estudo da área em questão, no nosso caso também pode ser útil para avaliar o papel de neurotransmissores, neste caso o neurotransmissor GABA intra MCP, na regulação do medo e da ansiedade, visto que diversos estudos apontam para o envolvimento do GABA em resposta a estímulos aversivos (SANDFORD, ARGYROPOULOS, NUTT, 2000; WIEDEMANN, 2015). O pesquisador Goddard e colaboradores (2001) relataram diminuição dos níveis de GABA cortical, analisado por espectroscopia de ressonância magnética, em pacientes com transtorno de pânico. Efeitos centrais de agonistas gabaérgicos e de moduladores positivos como o Diazepam tem efeitos panicolíticos (ROY-BIRNE et al., 1990) enquanto o bloqueio dos receptores centrais de GABA A, por pentilenotetrazol, foi relatado por pacientes clínicos produzir ansiedade extrema (revisado em KALUEFF, NUTT, 1997).

A exposição do animal a um estímulo aversivo, neste caso o predador (rato), e a concomitante ativação farmacológica da via do GABA na MCPd, através da ativação de dois dos seus receptores, inibiu a expressão de comportamentos relacionados à ansiedade. Quais sejam a esquiva da área aversiva, denominada desprotegida neste trabalho e a realização de comportamentos de avaliação de risco.

Corroborando nossos resultados, Reimer e colaboradores (2008) demonstraram que injeções intra MCPd de agonista GABA A produziram efeitos inibitórios nas respostas relacionadas à ansiedade e medo, como o congelamento em resposta ao estímulo aversivo, no caso o choque na pata. Schmitz e colaboradores (1986) ao administrar em antagonistas do receptor GABA A intra MCP observaram que os animais apresentaram rigoroso comportamento de fuga.

Portanto, nossos resultados creditam a MCPd um importante papel nos comportamentos relacionados à ansiedade em camundongos expostos ao seu predador (rato) no TER, e ao neurotransmissor GABA uma participação na atenuação de tais comportamentos.

Contudo, é importante questionarmos que apesar do TER ser um teste já validado e importante ferramenta para estudo da neurobiologia da ansiedade e medo, ainda não se sabe qual tipo ou tipos de transtorno(s) de ansiedade o teste possa induzir nos animais expostos.

Levando-se em consideração que o TER por se constituir uma exposição a um estímulo muito aversivo e proximal poderíamos dizer que o teste possa ser mais próximo para expressar o pânico, um tipo de transtorno de ansiedade, que a ansiedade generalizada, geralmente expressa frente a um estímulo não tão proximal. Entretanto isso é algo que ainda necessita de muita discussão e experimentos para melhor se entender esse paradigma.

Quando comparamos estudos do TER e do clássico Labirinto em Cruz Elevado - LCE (LISTER, 1987), de fato o estímulo rato é mais proximal que a exposição ao ambiente aberto do LCE onde pode ou não concretizar a ameaça e o perigo. Entretanto, comparando ao modelo também proposto por Blanchard e Blanchard (2004), a bateria de testes defensivos em camundongos (MDTB, do inglês “mouse defense test battery”), o TER é menos proximal e talvez menos aversivo, uma vez que no MDTB o camundongo é perseguido de modo inescapável por um rato anestesiado em uma arena. Já no TER, o camundongo está protegido pela tela e tem a opção de permanecer em áreas protegidas e mais distais do seu predador, conforme descrito no item 4.3.4.2 em material e métodos.

Diante disso, analisando estudos com tratamentos farmacológicos podemos observar uma resposta, talvez mais direcionada, no tipo de transtorno de ansiedade que o TER possa induzir. Pesquisas empregando o tratamento com benzodiazepínicos, medicamentos entre os mais utilizados em transtornos de ansiedade, demonstraram uma tendência a separação na modulação da resposta de pânico e ansiedade generalizada. Por exemplo, o diazepam, um clássico ansiolítico, bastante utilizado para ansiedade generalizada, não altera a resposta no TER quando injetado no camundongo de modo sistêmico (CAMPOS et al., 2013). Por outro lado, o alprazolam, também benzodiazepínico, porém eficaz no tratamento do pânico, foi eficaz em diminuir a expressão de comportamentos relacionados a ansiedade como a postura de esticar e a elevada permanência na região protegida no TER (CAMPOS et al., 2013).

Dentro desse item, surge ainda uma nova pergunta que é se a resposta seria diferente caso o agonismo fosse somente de GABA A ou somente de GABA B. Essa pergunta torna-se relevante a partir dos achados de Laufer e Weizman (1999), os quais indicaram que o valproato de sódio, um aticonvulsivante com diferentes mecanismos de ação e que dentre eles,

descobriu-se atuar como agonista tanto no receptor GABA A quanto GABA B, revelou-se eficaz no tratamento de transtorno do pânico. Por outro lado, segundo o mesmo estudo (LAUFER; WEIZMAN, 1999), a carbamazepina, também anticonvulsivante, com mecanismo de ação relacionado ao bloqueio de canais de sódio, mas que possui por atividade asséssoria a atuação de agonista somente em GABA B, não demonstra efeito no pânico. Embora os próprios autores admitem que tal fato seja algo não esclarecido e permita especulações, essa informação nos faz entender relevante a realização de experimentos com os agonistas separadamente microinjetados na MCP, um sítio onde ambos os receptores estão expressos (BOWERY, 1987). Sendo assim, isso poderia fornecer maiores esclarecimentos a respeito dessa intrigante circuitaria neuronal que envolve os diferentes transtornos e modelos animais de ansiedade.

Cabe ressaltar que a MCP tem sido destacada em diferentes modelos de ansiedade e devido ao fato de que o TER é um modelo novo, verificar a participação da mesma torna-se relevante. E, uma vez verificada, aqui em nossos experimentos, a participação da sua região dorsal nos comportamentos exibidos durante a exposição ao TER, os experimentos seguintes objetivaram a verificação da importância do fator liberador de corticotrofina (CRF) da proteína quinase A (PKA) na MCPd sob o mesmo teste.

Estudos recentes em outras áreas do sistema límbico indicam o CRF com papel ansiogênico (MIGUEL; NUNES-DE-SOUZA, 2011; MIGUEL; GOMES; NUNES-DE-SOUZA, 2014; SAHUQUE et al., 2006) e a presença de receptores para este neurotransmissor na MCPd nos leva a pesquisar sua atuação em nossa área de estudo, bem como a participação da via intracelular da cascata da PKA/AMPC.

Assim, de acordo com os resultados apresentados no experimento 6.2.2, ao bloquear os receptores de CRF1 intra MCPd, pelo tratamento com a microinjeção de CP, podemos observar que a dose mais elevada (CP 3,0nmol) não alterou os parâmetros comportamentais dos camundongos quando expostos ao TER. Entretanto, a dose mais baixa (CP 1,5nmol) produziu um efeito do tipo ansiolítico, evidenciado pelo aumento no tempo em que os camundongos permaneceram na área desprotegida do TER, área mais próxima ao rato (predador), portanto mais aversiva ao camundongo (presa). Efeito evidenciado também por uma tendência a significância na diminuição do número de esticadas, parâmetro de avaliação de risco, sendo assim, indicativo de que os animais podem estar menos ansiosos.

Tais parâmetros permite-nos sugerir uma modulação tônica do CRF sobre a ansiedade. Sendo assim, pode-se pensar que a exposição de camundongos ao TER provocaria a liberação de CRF intra encefálico, como descrito também em outras situações de estresse (ALBECK et

al., 1997; PLOTSKY; MEANEY, 1993; RODAROS et al., 2007). Além disso, essa liberação de CRF provavelmente ocorreu na MCP, uma vez que o antagonismo do receptor CRFérgico, pelo menos o subtipo CRF1, provocou diminuição da expressão dos comportamentos relacionados à ansiedade e medo, reforçando a ideia de uma ação tônica do CRF na MCP.

Apesar de relatos de injeção de antagonistas CRFérgicos na MCP em animais submetidos ao TER serem inéditos, a literatura apresenta estudos em relação aos efeitos da microinjeção intra MCPd do agonista o-CRF (CRF de ovinos) em camundongos expostos ao TER (CARVALHO-NETTO et al., 2007). Nessa condição, infusões de o-CRF intensificaram a exibição de comportamentos de defesa em camundongos, sugerindo um papel do CRF intra MCP nas respostas a ansiedade e medo, corroborando nossos resultados.

A opção pelo uso do antagonista de CRF1 e não CRF2 em nosso estudo foi pelo fato de que a participação do CRF1 em comportamentos relacionados à ansiedade é mais estabelecida, enquanto que, com relação ao CRF2 os resultados são inconsistentes ou sugerem não participação (SAHUQUE et al., 2006; MIGUEL; NUNES-DE-SOUZA, 2011). Entretanto, a vasta expressão de receptores CRF2, além de CRF1, na MCP (MERCHENTHALER, 1984; STECKLER; HOLLSBOER, 1999) intriga-nos a pesquisar o mesmo na mediação de comportamentos expressos em outros modelos como o TER e, por este motivo, será alvo de estudos futuros.

Um fato intrigante é que a dose ansiolítica no TER foi à dose mais baixa (1,5 nmol), mas não a dose mais elevada (3,0 nmol). O surgimento dessa resposta na forma de “U” invertido é de difícil esclarecimento uma vez que não se conhece nenhuma ligação cruzada do antagonista empregado (CP) em outros receptores que poderiam justificar tal fato. Contudo, trabalhos como de Korotkova e colaboradores (2006) indicaram presença de receptores CRF1 em neurônios GABAérgicos em áreas do sistema límbico como área tegmental ventral e núcleo acúmbens. Isso, se ocorrer na MCP, poderia auxiliar no entendimento sugerindo que doses mais elevadas do antagonista poderiam bloquear esses receptores localizados em neurônios GABAérgicos. Como descrito anteriormente, o GABA é sabidamente um agente ansiolítico na MCP por diminuir a taxa de despolarização neuronal, o que diminui a atividade dessa região, cuja hiperatividade está relacionada à exibição de comportamentos ansiosos nos diferentes modelos de ansiedade (GRAEFF et al., 1986; REIMER et al., 2008). Como o receptor CRF1 é estimulatório acoplado à proteína Gs, se localizado em neurônio GABAérgico irá estimular a liberação de GABA e seu antagonismo, por outro lado, iria inibir a liberação do mesmo. Partindo desse pressuposto, o CP em excesso poderia, além de bloquear os receptores CRF1 dos neurônios CRFérgicos “puros”, poderia bloquear também

receptores CRF1 de neurônios GABAérgicos, fato que inibiria a liberação de GABA gerando perda da ação ansiolítica do mesmo. No entanto, apesar de ser uma possibilidade, estudos adicionais para verificar a real possibilidade do proposto são necessários.

Apesar dessas respostas não esperadas levantadas acima, o fato é que o antagonismo de CRF1 proporcionou a diminuição da ansiedade quando o camundongo (presa) foi exposto ao rato (predador) denotando um efeito importante do CRF na mediação dos comportamentos relacionados à ansiedade.

Uma vez evidenciado o efeito do CP e, portanto, a participação do CRF na mediação de comportamentos relacionados à ansiedade, pesquisar seu mecanismo de ação é o passo seguinte na tentativa de melhor compreender a intrigante circuitaria neural que envolve a ansiedade e medo. O CRF pode agir através de seus receptores CRF1 e CRF2, conforme discutido anteriormente, e apesar de bem estabelecido seu modo de ação via ativação da Proteína Gs e consequentemente da via AMPc/PKA, estudos na literatura têm demonstrado ser o CRF capaz de ativar outras vias independente da via da PKA, as quais também culminarão com efeitos cruciais como a fosforilação de CREB. Dentre elas podemos destacar a via da fosfolipase C e PKC (BLANK et al., 2003; STERN et al., 2011), a via das MEK/MAPK (HAUGER et al., 2011; STERN et al., 2011) e a via da ativação de sintase de óxido nítrico / GMPc (HILLHOUSE; GRAMATOPOULOS, 2006) entre outras. Assim, tornou-se relevante pesquisar o efeito da proteína quinase em tais respostas e, caso alguma resposta ocorresse, o que foi visto em nosso trabalho, estudos adicionais deverão ser conduzidos na intenção de relacioná-la com a transmissão CRFérgica (será realizado em outros estudos do laboratório).

Nesse sentido, nossos resultados também apontaram para uma importante participação da via do AMPc/PKA na mediação dos comportamentos relacionados à ansiedade e medo no TER, uma vez que a administração de H89 (inibidor da PKA) na maior dose (5nmol) utilizada foi eficaz em elevar significativamente o tempo de exploração da superfície, a área mais próxima ao predador, sem alterar a atividade locomotora do animal evidenciado pela distribuição regular do número de entradas nos diferentes compartimentos do aparato. Uma vez que, o aumento no tempo de permanência do animal nesta região considerada a mais aversiva para o animal indica menor grau de ansiedade e medo.

Embora esse estudo seja inédito no TER, esses resultados estão na mesma linha do estudo de Miguel e Nunes-de-Souza (2014) onde foi observado um efeito ansiolítico “leve” para o inibidor de PKA quando injetado em outra região límbica, o córtex pré-frontal medial de camundongos submetidos ao outro modelo animal, o LCE.

Embora interessante, o fato de a injeção de H89 produzir efeito ansiolítico no TER, não pode ser relacionado ao efeito do CRF, uma vez que ativar a cascata do AMPc/PKA é característica de vários outros neurotransmissores que agem através de receptores que também estão presentes na MCP como os beta-adrenérgico de noradrenalina, dentre outros. Por esse motivo, o próximo passo que esse trabalho conduz será a realização de um experimento no qual se investigará o efeito da prévia injeção de H89 sobre o efeito ansiogênico da injeção de CRF na MCPd. Com estes resultados poderemos de fato, sugerir ou não a participação da via da PKA na ação do CRF.

Neste sentido, apesar da necessidade de experimentos adicionais, conforme acima discutido, os resultados deste trabalho contribuem com a tentativa cada vez mais crescente por parte da comunidade neurocientífica, de melhor entender esse arcabouço intrigante que é a circuitaria envolvida na neurobiologia das reações de defesa e da ansiedade.

7 CONCLUSÃO

Concluindo, embora não obtivemos resultados que envolvam o núcleo basolateral da amígdala, essa estrutura não será descartada de estudos futuros sendo avaliados seus outros subnúcleos e um acréscimo de animais para o núcleo basolateral, a fim de um melhor entendimento de sua participação na modulação dos comportamentos exibidos no TER. Além disso, e, talvez o ponto mais destacável do trabalho é que tomados em conjunto, nossos resultados suportam a proposta de que a MCP está envolvida em respostas comportamentais em camundongos expostos ao seu predador (rato) no TER e que o GABA e o CRF fazem parte do grupo de neurotransmissores intra MCP envolvidos na modulação dos comportamentos expressos no TER, bem como parece haver uma participação da via do AMPc/PKA na modulação dessas reações.

Esses resultados abrem futuras perspectivas como a investigação da atuação separadamente do GABA A e do GABA B, a verificação da relação do CRF com a via da PKA, a via clássica de atuação de um receptor acoplado a PGs, bem como a sua relação com possíveis outras vias como a da PKC, MEK/MAPK e GMPc/PKG na MCP de camundongos expostos ao TER; e a verificação da atividade de proteínas e fatores relacionados a atividade neuronal e de neurotransmissores como o CREB, ERK e outros fatores.

8 REFERÊNCIAS

ALBECK, D.S., et al. Chronic social stress alters levels of corticotropin-releasing factor and arginine vasopressin mRNA in rat brain. **J. Neurosci.**, v.17, n.12, p.4895-903, 1997.

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 Plast**, v. 2009, p. 904568, 2009. <https://doi.org/10.1155/2009/904568>

ALMEIDA-FILHO, N. et al. Brazilian multicentric study of psychiatric morbidity. **British Journal of Psychiatry**, n. 171, p. 524-529, 1997.

ALONSO, J. et al. Prevalence of mental disorders in Europe: results from the European Study of the Epidemiology of Mental Disorders (ESEMeD) project. **Acta Psychiatr Scand Suppl**, n. 420, p. 21-7, 2004.

AMARAL, V. C.; SANTOS GOMES, K.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Increased corticosterone levels in mice subjected to the rat exposure test. **Horm Behav**, v. 57, n. 2, p. 128-33, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2009.09.018>

ANMP. Associação Nacional dos Médicos Peritos da Previdência Social – ANMP. 2013.

ASANUMA, M.; OGAWA, N. Pitfalls in assessment of c-fos mRNA expression in the brain: effects of animal handling. **Rev. Neurosci.**, v.5, p. 171-178, 1994. <https://doi.org/10.1515/REVNEURO.1994.5.2.171>

ASANUMA, et al. Opposite effects of rough and gentle handling with repeated saline administration on c-fos mRNA expression in the rat brain. **J. Neural Transm.**, v.90, p.163-169, 1992. <https://doi.org/10.1007/BF01250958>

BALDWIN, H. A. et al. CRF antagonist reverses the "anxiogenic" response to ethanol withdrawal in the rat. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 103, n. 2, p. 227-32, 1991. <https://doi.org/10.1007/BF02244208>

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 Res**, v. 1267, p. 65-76, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.02.042>

BARLOW, D. H. Unraveling the mysteries of anxiety and its disorders from the perspective of emotion theory. **Am Psychol**, v. 55, n. 11, p. 1247-63, Nov 2000. <https://doi.org/10.1037/0003-066X.55.11.1247>

BATESON, M.; BRILOT, B.; NETTLE, D. Anxiety: an evolutionary approach. **Can J Psychiatry**, v. 56, n. 12, p. 707-15, 2011. <https://doi.org/10.1177/070674371105601202>

BAUM, W. M. Compreender o behaviorismo: ciência, comportamento e cultura. In: ARTMED (Ed.), p.25-26, 1999.

BEHBEHANI, M. M. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. **Prog Neurobiol**, v. 46, n. 6, p. 575-605, 1995. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(95\)00009](https://doi.org/10.1016/0301-0082(95)00009)

BERNIK, M. A.; LOTUFO, F. N.; GENTIL, V. Pânico, Fobias e Obsessões. **São Paulo, EDUSP**, 1997.

BERRIDGE, C. W.; DUNN, A. J. CRF and restraint-stress decrease exploratory behavior in hypophysectomized mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 34, n. 3, p. 517-9, 1989. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(89\)90551-0](https://doi.org/10.1016/0091-3057(89)90551-0)

BLACKTOP, J. M. et al. Augmented cocaine seeking in response to stress or CRF delivered into the ventral tegmental area following long-access self-administration is mediated by CRF receptor type 1 but not CRF receptor type 2. **Neurosci Biobehav Rev**, 2011.

BLANCHARD et al. Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. **Behav Brain Res**, v. 58, n. 1-2, p. 155-65, Dec 20 1993.

BLANCHARD, D. C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R. J. Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 25, n. 3, p. 205-18, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(01\)00009-4](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(01)00009-4)

BLANCHARD, D. C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R. J. Conditioning and residual emotionality effects of predator stimuli: some reflections on stress and emotion. **Progress in Neuro- Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 27, p. 1177-1185, 2003. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2003.09.012>

BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. **Annual Review of Psychology**, v. v.39, p. p.43-68, 1988. <https://doi.org/10.1146/annurev.ps.39.020188.000355>

BLANCHARD, R. J. et al. Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. **Behav Brain Res**, v. 58, n. 1-2, p. 155-65, 1993. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(93\)90100-5](https://doi.org/10.1016/0166-4328(93)90100-5)

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. **J Neurosci**, v. 23, n. 2, p. 7-700, 2003.

BONNIE, E.; GINTY, D. D. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. **Neuron**, n. 35, p. 605 - 23, 2002.

BORELLI, K.G.; BRANDÃO, M.L. Effects of ovine CRF injections into the dorsomedial, dorsolateral and lateral columns of the periaqueductal gray: a functional role for the dorsomedial column. **Horm. Behav.** v.53, ed.1,p. 40-50, 2008.

BOWERS, L. K.; SWISHER, C. B.; BEHBEHANI, M. M. Membrane and synaptic effects of corticotropin-releasing factor on periaqueductal gray neurons of the rat. **Brain Res**, v. 981, n. 1-2, p. 52-7, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(03\)02886-5](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(03)02886-5)

BOYSON, C.O. et al. Prevention of social stress-escalated cocaine self-administration by CRF-R1 antagonist in the rat VTA. **Psychopharmacology (Berl)**. v.218, ed.1, p. 69-257, 2011.

CALAIS, G. S. P.; GARCIA, G. C. Transtornos de ansiedade. **Saúde e economia**, v. 5, n. 10, 2013.

CAMPOS, K.F.; AMARAL, V.C.; RICO, J.L.; MIGUEL, T.T.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Ethopharmacological evaluation of the rat exposure test: a prey-predator interaction test. **Behav Brain Res**. v.1, ed. 240, p. 70-160, 2003.

CANTERAS, N.S., GOTO, M. Fos-like immunoreactivity in the periaqueductal gray of rats exposed to a natural predator. **NeuroReport**. v. 10, p.413–418, 1999. <https://doi.org/10.1097/00001756-199902050-00037>

CARLSON, N. **Psychology of behavior**. Manole Ltda, 2002.

CARVALHO-NETTO, E. F. et al. Effects of intra-PAG infusion of ovine CRF on defensive behaviors in Swiss-Webster mice. **Behav Brain Res**, v. 176, n. 2, p. 222-9, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.10.003>

CARVALHO, A. L.; COSTA, M. R.; FAGUNDES, H. Uso racional de psicofármacos. **programas de saúde mental**, v. 1, 2006.

CARVALHO, A. L.; COSTA, M. R.; FAGUNDES, H. 2006- O ano da promoção do Uso Racional de Benzodiazepínicos. **Uso Racional de Psicofármacos**, a.1, v. 1, p.1-6, 2006

CHAN, A. K.; VON DERWEID, P. Y. 5-HT decreases contractile and electrical activities in lymphatic vessels of the guinea-pig mesentery: role of 5-HT₇-receptors. **Br. J. Pharmacol.**, v. 2, p. 243–254, 2003. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705264>

COMOLI, E; Ribeiro-Barbosa, E.R.; CANTERAS, N.S. Predatory hunting and exposure to a live predator induce opposite patterns of Fos immunoreactivity in the PAG, **Behav. Brain Res**. v.138, p.17–28, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(02\)00197-3](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(02)00197-3)

DARWIN, C. A Expressão das emoções no homem e nos animais. In: LETRAS, C. D. (Ed.), 2000. p.323-335, 2000.

DUCAN, G. E.; KNAPP, D. J.; BREESE, G. R. Neuroanatomical characterization of Fos induction in rat behavioral models of anxiety. **Brain Res.**, v.713, p.79-91, 1996. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)01486-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)01486-1)

DSM-5. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders**. American Psychiatric Association. Arlington, VA. 2013.

ESCOCARD, M. R. Propriedades psicométricas da Escala de Sensibilidade à Ansiedade Revisada. **Psicol. clin.**, v. 20, n. 1, p. 217-217, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0103-56652008000100016>

FERREIRA-NETTO, C., BORELLI, K.G.; BRANDÃO, M. L. Neural segregation of Fos-protein distribution in the brain following freezing and escape behaviors induced by injections of either glutamate or NMDA into the dorsal periaqueductal gray of rats. **Brain research**. v.1031. p.151-163, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.10.044>

FERREIRA, P.B.; SANTOS, I.M.S; FREITAS, R. M. Aspectos farmacológicos, efeitos anticonvulsivantes e neuroprotetores da bupiriona. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**v.33, ed.2, p. 171-179, 2012.

GADANI, J. A. A. B. PSICOFARMACOLOGIA. **CENTRO UNIVERSITÁRIO DA GRANDE DOURADOS - UNIGRAN**, 2013.

GARCIA, J. O.; MACEDO, K. M. P.; GARCIA, F. A. O.; NEVES, S. A. **Uso indevido de benzodiazepínicos**. Faculdade de Ciências Aplicadas Dr. LeãoSampaio; Juazeiro do Norte, 2008.

GODDARD, et al. Reductions in occipital cortex GABA levels in panic disorder detected with 1h-magnetic resonance spectroscopy. **Arch Gen Psychiatry.**, v. 58, p.556-561, 2001. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.58.6.556>

GRAEFF, F.G.; GUIMARÃES, F.S. **Fundamentos da psicofarmacologia**. São Paulo: Editora Atheneu.ed.2, p.171, 2012.

GRAEFF, F. G. Minor tranquilizers and brain defense system. **Braz J Med Biol Res**, n. 14, p. 239-265, 1981.

GRAEFF, F.G., et al.Modulation of the brain aversive system by GABAergic and serotonergic mechanisms.**Behav Brain Res.** v.2, p. 80-173, 1986. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(86\)90061-6](https://doi.org/10.1016/0166-4328(86)90061-6)

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

HETEM, L. A. B. **Diagnóstico diferencial**. In: HETEM, L.A.B.; GRAEFF,F.G. p.191-195, 2004.

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

HINKS et al. The anxiolytics CI-988 and chlórdiazepoxide fail to reduce immediate early gene mRNA stimulation following exposure to the rat elevated X-maze. **Eur. J. Pharmacol.**, v.312, p. 153-161, 1996. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(96\)00471-2](https://doi.org/10.1016/0014-2999(96)00471-2)

JATOBÁI, J. D. V. N.; BASTOS, O. Depression and anxiety in adolescents from public and private schools. **J. bras. psiquiatr.** , v. 56, n. 3, 2007.

KALUEFF, A. NUTT, D.J. Role of GABA in memory and anxiety. **Depression and Anxiety**, v.4, p.100-110, 1997. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6394\(1996\)4:3<100::AID-DA2>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6394(1996)4:3<100::AID-DA2>3.0.CO;2-K)

KAGEYAMA, K. Differential regulation of CREB and ERK phosphorylation through corticotropin-releasing factor receptors type 1 and 2 in AtT-20 and A7r5 cells. **Mol. Cell Endocrinol.**, v. 263(1-2), p. 90-102, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2006.08.011>

KEAY, K. A.; BANDLER, R. Parallel circuits mediating distinct emotional coping reactions to different types of stress. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 25, n. 7-8, p. 669-78, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(01\)00049-5](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(01)00049-5)

KENDLER, K. S. Major depression and generalized anxiety disorder. Same genes, (partly) different environments-revisited. **Br J Psychiatry**, n. 30, p. 68-75, 1996.

KENDLER, K. S. et al. Generalized anxiety disorder in women. A population-based twin study. **Arch Gen Psychiatry**, v. 4, p. 267-72, 1992. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1992.01820040019002>

KESSLER, R. C. et al. Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. **Arch Gen Psychiatry**, v. 62, n. 6, p. 593-602, 2005. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.62.6.593>

KISHIMOTO, T. et al. Deletion of crhr2 reveals an anxiolytic role for corticotropin-releasing hormone receptor-2. **Nat Genet**, v. 24, n. 4, p. 415-9, 2000. <https://doi.org/10.1038/74271>

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

KURADA, L., YANG, C., LEI, S. Corticotropin-releasing factor facilitates epileptiform activity in the entorhinal cortex: roles of CRF2 receptors and PKA pathway. **PLoS One**, v.9, ed.2, 2014.

LAUFER, N.; WEIZMAN, A. Other drug treatments and augmentation therapies for panic disorder. *Clinical Diagnosis*. London: Martin Dunitz. p. 179-202, 1999.

LENT, R. Cem bilhões de neurônios? Conceitos fundamentais de Neurociência. **Atheneu**, n. 2, p. 713-745, 2010.

LINDEN, M. Mental disorders in primary care. **Adv Psychosom Med**, v. 26, p. 52-65, 2004. <https://doi.org/10.1159/000079760>

LINO-DE-OLIVEIRA et al. Antidepressant treatment reduces Fos-like immunoreactivity induced by swim stress in different columns of the periaqueductal gray matter. **Brain Research Bulletin**, v. 70, p.414-421, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2006.07.007>

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

LITVIN, Y. et al. CRF type 1 receptors in the dorsal periaqueductal gray modulate anxiety-induced defensive behaviors. **Horm Behav**, v. 52, n. 2, p. 244-51, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2007.04.012>

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

MARQUES, M.J. et al. **Acervo digital do Depto. de Anatomia do IB – UNICAMP**. Disponível em: http://www.ib.unicamp.br/dep_bef/sites/www.ib.unicamp.br.site.dep_bef/files/atlas/neuroan_atnotas.html>. Acesso em 11 de Abril de 2017.

MARTINS, A. P.; MARRAS, R. A.; GUIMARAES, F. S. Anxiogenic effect of corticotropin-releasing hormone in the dorsal periaqueductal grey. **Neuroreport**, v. 8, n. 16, p. 3601-4, 1997. <https://doi.org/10.1097/00001756-199711100-00036>

MCNALLY, G. P.; PIGG, M.; WEIDEMANN, G. Opioid receptors in the midbrain periaqueductal gray regulate extinction of pavlovian fear conditioning. **J Neurosci**, v. 24, n. 31, p. 6912-9, 2004. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1828-04.2004>

MERCHENTHALER, I. Corticotropin releasing factor (CRF)-like immunoreactivity in the rat central nervous system. Extrahypothalamic distribution. **Peptides**, v. 5 Suppl 1, p. 53-69, 1984. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(84\)90265-1](https://doi.org/10.1016/0196-9781(84)90265-1)

MERIKANGAS, K. R. Implications of genomics for public health: the role of genetic epidemiology. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, v. 68, p. 359-64, 2003. <https://doi.org/10.1101/sqb.2003.68.359>

MIGUEL, T.T.; GOMES, K.S.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Tonic modulation of anxiety-like behavior by corticotropin-releasing factor (CRF) type 1 receptor (CRF1) within the medial prefrontal cortex (mPFC) in male mice: role of protein kinase A (PKA). **Horm Behav**. v.66, ed.2, p.56-247, 2014.

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. **Horm Behav**. v.60, ed.3, p.292-300, 2011.

MISSLIN, R. The defense system of fear: behavior and neurocircuitry. **Neurophysiol Clin**, v. 33, n. 2, p. 55-66, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0987-7053\(03\)00009-1](https://doi.org/10.1016/S0987-7053(03)00009-1)

MORATO, S. **O papel da visão na aversão aos espaços abertos no labirinto em cruz elevado**. São Paulo: Psicol. USP, 2006.

MORGAN, J.L.; CURRAN, T. Stimulus-transcription coupling In the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. **Annu. Rev. Neurosci.** v.14, p.421-451, 1991. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.14.030191.002225>

MELIA, K. R.; et al. Induction and habituation of immediate early gene expression in rat brain by acute and repeated restraint stress. **J. Neurosci.**, v.14, n.10, p.5929-5938, 1994.

MOURA, P. R. D.; VIDAL, F. A. P. Signal transduction: a review about G protein. **Scientia Medica**, v. 21, n. 1, p. 31-36, 2011.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 4°. São Paulo: 2006.

NETO, E. F. D. C. **Estudo da participação da matéria cinzenta periaquedutal dorsal no comportamento defensivo de camundongos através do emprego de diferentes modelos animais de ansiedade: a estimulação química e a exposição ao predador**. Psicologia e Educação, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. Psiquiatria Básica. **ARTMED**, v. 2, p. 434, 2007.

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

PLOTSKY, P.M.; MEANEY, M.J. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. **Mol. Brain Res.**, v.18,n.3, p.195-200, 1993. [https://doi.org/10.1016/0169-328X\(93\)90189-V](https://doi.org/10.1016/0169-328X(93)90189-V)

RACHMAN, S. T. Anxiety, Psychology Press: New York Reid GM (1994) Maternal sex-stereotyping of newborns. **Psychol Rep.**, v. 75, p. 1443–1450, 2004.

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

RODAROS, D. et al. Corticotropin-releasing factor projections from limbic forebrain and paraventricular nucleus of the hypothalamus to the region of the ventral tegmental area. **Neuroscience**, v.150, p.8-13, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.09.043>

ROY-BYRNER, P.P. et al. Reduced benzodiazepine sensitivity in panic disorder. **Archives of General Psychiatry**, v.47, p.534-538, 1990.

ROY-BYRNE, P. P. et al. Anxiety disorders and comorbid medical illness. **Gen Hosp Psychiatry**, v. 30, n. 3, p. 208-25, 2008. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1990.01810180034006>

RYABININ, A. E.; WANG, Y. M.; FINN, D. A. Different levels of Fos immunoreactivity after repeated handling and injection stress in two inbred strains of mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.63, n.1, p.143-151, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(98\)00239-1](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(98)00239-1)

SANDFORD, J.J., ARGYROPOULOS, S.V., NUTT, D.J. The psychobiology of anxiolytic drugs. Part 1: **Basic neurobiology**. **Pharmacol.** v.88, p. 197–212, 2000.

SHENG, M.; GREENBERG, M.E. The Regulation and Function of c-fos and Other Immediate Early Genes in the Nervous System. **Neuron**, v. 4, p.477-485, 1990. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(90\)90106-P](https://doi.org/10.1016/0896-6273(90)90106-P)

SILVEIRA; SANDNER; GRAEFF Induction of Fos immunoreactivity in brain by exposure to the elevated plus-maze. **Behav. Brain Res.**, v.56, p.115-118, 1993. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(93\)90028-O](https://doi.org/10.1016/0166-4328(93)90028-O)

SILVEIRA, et al. Differential expression of Fos protein in the rat brain induced by performance of avoidance or escape in the elevated T-maze. **Behav.Brain Res.**, v.126, p.13-21, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(01\)00233-9](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(01)00233-9)

SINGEWALD, N.; SHARP, T. Neuroanatomical targets of anxiogenic drugs in the hindbrain as revealed by Fos immunocytochemistry. **Neurosci.**, v.98, n.4, p.759-770, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(00\)00177-9](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(00)00177-9)

STECKLER, T., HOLSBOER, F. Corticotropin-releasing hormone receptor subtypes and emotion. **Biological Psychiatry**, v.46, p.1480–1508, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(99\)00170-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(99)00170-5)

SANDNER, G. et al. c-FOS immunoreactivity in the brain following unilateral electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray in freely moving rats. **Brain Res.**, v.573, p.276-283, 1992. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)90773-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)90773-3)

SAHUQUE, L.L., et al. Anxiogenic and aversive effects of corticotropin-releasing factor (CRF) in the bed nucleus of the stria terminalis in the rat: role of CRF receptor subtypes. **Psychopharmacology (Berl)**, v.186, n.1, p.122-32, 2006. <https://doi.org/10.1007/s00213-006-0362-y>

SCHMITT, P., et al. A neuropharmacological study of the periventricular neural substrate involved in flight, **Behav. Brain Res.**,v.22, p. 181-190, 1986. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(86\)90039-2](https://doi.org/10.1016/0166-4328(86)90039-2)

SCHLITZ, M.T.B. ; AGUIAR, J.C.; GRAEFF, F.G. Anti-aversive role of serotonin on the dorsal periaqueductal grey matter. **Psychopharmacology**, v. 85, p.340-345, 1985. <https://doi.org/10.1007/BF00428199>

SILVEIRA, M.C.L.; SANDNER,G.; GRAEFF, F.G. Induction of Fos immunoreactivity in the brain by exposure to the elevated plus-maze.**Behavioural Brain Research**, v.56, p. 115-118, 1993. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(93\)90028-O](https://doi.org/10.1016/0166-4328(93)90028-O)

SMITH, C. A. et al. Time-courses of Fos expression in rat hippocampus and neocortex following acquisition and recall of a socially transmitted food preference. **Neurobiol Learn Mem**, v. 88, n. 1, p. 65-74, Jul 2007. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2007.03.001>

SMITH, G. W. et al. Corticotropin releasing factor receptor 1-deficient mice display decreased anxiety, impaired stress response, and aberrant neuroendocrine development. **Neuron**, v. 20, n. 6, p. 1093-102, Jun 1998. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80491-2](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80491-2)

STECKLER, T.; HOLSBOER, F. Enhanced conditioned approach responses in transgenic mice with impaired glucocorticoid receptor function. **Behav. Brain Res.**, v.102, p.151-63, 1999.

STECKLER, T.; HOLSBOER, H. Corticotropin-releasing hormone receptor subtypes and emotion. **Biol Psychiatry**, v.46, ed. 11, p.1480-508, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(99\)00003-0](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(99)00003-0)

STERN, C. M. et al. Corticotropin releasing factor-induced CREB activation in striatal neurons occurs via a novel Gbetagamma signaling pathway. **PLoS One**, v. 6, n. 3, p.18114, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018114>

SWANSON, L. W. et al. Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. **Neuroendocrinology**, v. 36, n. 3, p. 165-86, 1983. <https://doi.org/10.1159/000123454>

TAKAHASHI, L. K. et al. Antagonism of CRF(2) receptors produces anxiolytic behavior in animal models of anxiety. **Brain Res**, v. 902, n. 2, p. 135-42, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)02405-2](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)02405-2)

VAN PETT, K. et al. Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse. **J Comp Neurol**, v. 428, n. 2, p. 191-212, Dec 11 2000. [https://doi.org/10.1002/1096-9861\(20001211\)428:2<191::AID-CNE1>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/1096-9861(20001211)428:2<191::AID-CNE1>3.0.CO;2-U)

VIANNA, D.M. et al. Fos-like immunoreactive neurons following electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray at freezing and escape thresholds. **Brain Res Bull**, v.30, ed. 62, p. 89-179, 2003

XU, Y.; KRUKOFF, T. L. Adrenomedullin in the rostral ventrolateral medulla inhibits baroreflex control of heart rate: a role for protein kinase A. **Br. J. Pharmacol.**, v. 1, p. 70–77, 2006. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706698>

YANG, M. et al. The rat exposure test: a model of mouse defensive behaviors. **Physiol Behav**, v. 81, n. 3, p. 465-73, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.02.010>

ZANGROSSI JR, H.; GRAEFF, F. G. Modelos Animais. **Transtornos de Ansiedade**, v. 1, n. 1, p. 55-73, 2004.

WATANABE, Y.; STONE, E.; McEWEN, B. S. Induction and habituation of c-fos and zif/268 by acute and repeated stressors. **Neuroreport**, v.5, p.1321-1324, 1994.

WIEDEMANN, K. Anxiety and Anxiety Disorders. **International Encyclopedia of the Social & Behavioral Sciences**, ed. 2, v.1, p.804-810, 2015. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-097086-8.27006-2>

ANEXO I



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



CERTIFICADO

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

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

Uberlândia, 21 de janeiro de 2015.

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