



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS UFSCar/UNESP**

**EFEITO DO BLOQUEIO DOS RECEPTORES  
MINERALOCORTICOIDES DA REGIÃO INFRA-LÍMBICA DO  
CÓRTEX PRÉ-FRONTAL MEDIAL SOBRE A TOLERÂNCIA AOS  
EFEITOS DO MIDAZOLAM EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO  
PROTOCOLO DE TESTE E RETESTE NO LABIRINTO EM CRUZ  
ELEVADO**

Kairo Alan Albernaz Mariano

São Carlos, SP  
2017



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS UFSCar/UNESP**

**EFEITO DO BLOQUEIO DOS RECEPTORES  
MINERALOCORTICÓIDES DA REGIÃO INFRA-LÍMBICA DO  
CÓRTEX PRÉ-FRONTAL MEDIAL SOBRE A TOLERÂNCIA AOS  
EFEITOS DO MIDAZOLAM EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO  
PROTOCOLO DE TESTE E RETESTE NO LABIRINTO EM CRUZ  
ELEVADO**

Kairo Alan Albernaz Mariano

Dissertação apresentada ao Programa  
Interinstitucional de Pós-Graduação em  
Ciências Fisiológicas UFSCar/UNESP,  
para obtenção do título de mestre em  
Ciências Fisiológicas

Orientação: Profa. Dra. Azair Liane  
Matos do Canto de Souza

São Carlos, SP  
2017



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

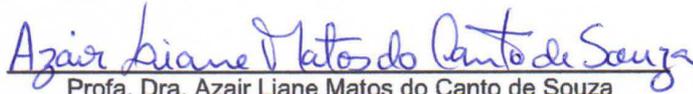
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

---

**Folha de Aprovação**

---

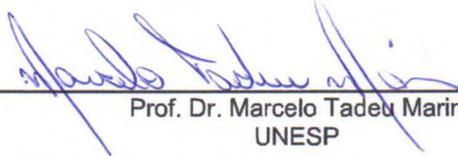
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Kairo Alan Albernaz Mariano, realizada em 25/05/2017:



Profa. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza  
UFSCar



Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra  
USP



Prof. Dr. Marcelo Tadeu Marin  
UNESP

## **DEDICATÓRIA**

*Dedico a minha família e aos seus esforços incansáveis... vocês fizeram da aprendizagem, um caminho para o qual eu pudesse realizar os meus sonhos.*

## AGRADECIMENTO

Agradeço às dificuldades e aos problemas, os quais, fizeram com que eu chegasse até aqui.

Ao meu Papai e a minha família por todo o imensurável e incondicional amor e apoio. Por toda a minha vida vocês têm sido fonte de força. Que minhas conquistas possam orgulhá-los, pois elas lhes pertencem também.

A todos os professores que ao longo do tempo moldaram meus pensamentos pessoais e científicos, especialmente para aqueles que tomei como molde. Vocês sempre serão minhas referências.

À minha grande amiga, Mayara Barbosa por ser uma das grandes incentivadoras dos meus sucessos acadêmicos, termino por cumprir a promessa UFSCar-Fisiologia, feita a você.

A Maria Aparecida Perreli por ser uma das grandes motivadoras e minha inspiração para o estudo da Fisiologia, a Kwok Chiu Cheung por me ensinar a olhar o comportamento animal como um biólogo e a Daniele Decanine por ensinar que a biologia celular/molecular são partes essenciais da vida e que há beleza nelas.

A todos os amigos do Laboratório de Psicologia da Aprendizagem (LPA) Aura, Caroline, Daniela, Isabela, Lara, Ligia, Lucas, Marília, Paulo, Rimenez e Vitor, vocês contribuíram com seus conhecimentos e construíram juntos esse trabalho.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Azair Liane Matos do Canto de Souza, que acreditou em mim, no meu potencial, em minha vontade de aprender e responsabilidade. Agradeço por me ensinar a olhar para a neurociência como um cientista deve olhar.

À República Trakinas, Antonio, Mineiro, Japa, Érique, Phelipe e Victor pelos incríveis amigos e pelo crescimento pessoal. Nossas amizades e conversas, sem dúvida marcaram. Pude me tornar alguém social, intelectual e emocionalmente mais sóbrio e completo perto de vocês. Em especial, ao Manucci por toda a ajuda, companheirismo e amizade ao longo desses anos.

Aos amigos do Naruto-Online, em especial aos ninjas da folha Gabriel, Andrei e Wesley pelo lazer e por todas as risadas, o tempo passou mais rápido ao lado de todos vocês.

Folgo-me por não ter medido esforços para conquistar meus objetivos, e por nunca ter pensado em desistir dos meus sonhos.

À secretaria do Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

Ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pelo apoio financeiro concedido durante a realização deste estudo.

## EPÍGRAFE

*“Encontrei na mãe natureza uma amante que não posso chamar de cruel, mas muito modesta: noites de vigília, dias de ansiedade, refeições frugais e trabalhos intermináveis devem ser a sina de todos que a perseguem, por seus labirintos e meandros”*

*(Alexander Pope, Memoirs of the Extraordinary Life, Works and Discoveries of Martinus Scrieblerus (1741))*

## RESUMO

Vários estudos demonstraram que a experiência anterior (teste) ao labirinto em cruz elevado (LCE) aumenta a esquia dos braços abertos e prejudica o efeito ansiolítico do midazolam (MDZ), um agonista benzodiazepínico de receptores GABA<sub>A</sub>, em uma exposição subsequente (reteste), fenômeno conhecido como "tolerância à primeira exposição" (OTT). Uma hipótese é que a aprendizagem gerada na primeira exposição permite uma mudança na estratégia adotada pelo animal. Neste sentido, estruturas do sistema nervoso central estão envolvidas com a modulação da memória e ansiedade, sendo a região infra-límbica (IL) do córtex pré-frontal medial (CPFm), uma das regiões envolvidas não apenas nesses processos, mas também na modulação neuroendócrina induzida por estímulos estressores. Este estudo investigou os efeitos da injeção bilateral intra-CPFm (região IL) de RU28318 (antagonista de receptores mineralocorticóides, MR) nas fases de aquisição e consolidação da memória, sobre a tolerância aos efeitos do MDZ em camundongos submetidos ao teste e reteste no LCE. Foram utilizados camundongos machos, suíço-albino (n= 8-12 por grupo). Experimento 1: Os animais receberam injeção intraperitoneal (i.p.) de salina ou MDZ (2mg/kg) e após 30 minutos foram expostos ao teste no LCE durante 5 minutos. Após 24 horas os mesmos animais receberam injeção de salina ou MDZ (2mg/kg, i.p.), e 30 minutos depois foram individualmente expostos ao reteste no LCE. Experimento 2 (fase de aquisição): os animais receberam injeção bilateral intra-CPFm (IL) de veículo ou RU28318 (5 ou 10 ng/0,1µL) e foram expostos ao teste no LCE, durante 5 minutos. Vinte e quatro horas depois, cada camundongo recebeu injeção de veículo ou MDZ (2mg/kg, i.p.) e 30 minutos depois foram individualmente expostos ao reteste. Experimento 3 (fase de consolidação): semelhante ao Experimento 2, exceto que os animais de cada grupo foram expostos ao teste no LCE durante 5 minutos, e posteriormente, receberam injeção intra-CPFm de veículo ou RU28318. A reexposição ao LCE foi semelhante ao Experimento 2. A análise de variância (ANOVA) seguida pelo "post hoc" de Duncan mostrou que, no Experimento 1, a injeção de MDZ produziu efeito ansiolítico em animais expostos ao teste no LCE, caracterizado pelo aumento da exploração nos braços abertos e redução dos comportamentos de avaliação de risco, sem afetar a atividade locomotora. Esse efeito foi abolido no reteste, confirmando a OTT. No Experimento 2, a injeção de RU28318 intra-CPFm, independente da dose utilizada não modificou os comportamentos avaliados no período de teste. Entretanto, o RU28318 em ambas as doses antes do teste no LCE, restabeleceu o efeito ansiolítico do MDZ administrado antes do reteste. No Experimento 3, após o período de teste, nenhuma das doses de RU28318 produziu efeito sobre o OTT para o MDZ, sugerindo ausência de efeitos sobre a fase de consolidação da memória. Entretanto, como o bloqueio dos receptores MR do CPFm reverteu a tolerância aos efeitos do MDZ, influenciando o fenômeno de OTT, sugerimos que o antagonismo desses receptores na região IL do CPFm interfere com a fase de aquisição da memória em camundongos expostos ao teste e reteste no LCE.

Palavras-chave: Labirinto em cruz elevado. "One trial tolerance". Córtex pré-frontal medial. Receptores mineralocorticóides. Ansiedade.

## ABSTRACT

Several studies have shown that the previous experience (trial 1) to the elevated plus-maze (EPM) increases the avoidance of the open arms and impairs the anxiolytic-like effect of midazolam (MDZ), a benzodiazepine-GABA<sub>A</sub> receptor agonist, in a subsequent exposure (trial 2) to the maze, a phenomenon known as "one trial tolerance" (OTT). One hypothesis is that the learning generated in the first exposure allows a change in the strategy adopted by the animal. Considering that the infralimbic region (IL) of the medial prefrontal cortex (mPFC) would be involved in neuroendocrine modulation induced by stress, this study investigated the effects of intra-mPFC injection (region IL) of RU28318 (mineralocorticoid receptor antagonist, MR) in the memory acquisition and consolidation phase, in the tolerance to MDZ effects in mice exposed to the trial 1 and trial 2 in the LCE. Male Swiss mice (n = 8-12 per group) were used, and when necessary, bilateral cannulae were surgically implanted bilaterally in the IL region of the mPFC. Experiment 1: The animals of each group received intraperitoneal (i.p.) injection of saline or MDZ (2mg/kg) and after 30 minutes were exposed to trial 1 for 5 minutes in the EPM. After 24 hours, the mice received either systemic injection of saline or MDZ (2mg/kg) and 30 minutes later they were individually exposed to trial 2 in the LCE for 5 minutes. Experiment 2 (acquisition phase): After four days of recovery the subjects of each group received intra-mPFC injection of vehicle or RU28318 (5 or 10ng/0.1µl) and were exposed to trial 1 for 5 minutes. After 24 hours, each mouse received systemic injection (intraperitoneal, i.p.) of saline or midazolam (2mg/kg) and 30 minutes later was individually exposed to the Trial 2. Experiment 3 (consolidation phase): After four days of recovery the subjects of each group were exposed to the EPM test for 5 minutes and subsequently received intra-mPFC injection of vehicle or RU28318 (5 or 10ng/0.1µl). After 24 hours, the mice received either systemic injection of vehicle or MDZ (2mg/kg) and 30 minutes later they were individually exposed to trial 2 in the EPM for 5 minutes. The injection MDZ produced anxiolytic-like effect in animals exposed to the trial 1 to the EPM, characterized by increased exploration in the open arms and reduction of risk assessment behaviors without affecting the locomotor activity. This effect was abolished in the retest, confirming the OTT. Two-way ANOVA that intra-mPFC infusion of RU28318 did not modify any behavior in trial 1. However, it was observed that when administered prior to EPM, it reestablished the anxiolytic effect of MDZ administered prior to retest. When infused after the test period, RU28318 did not modify the OTT phenomenon for the MDZ. The MR antagonism in the IL region of the mPFC, seems to interfere with the memory acquisition phase but not the consolidation phase. Thus, we suggest that MR blockade of the IL region of the mPFC may interfere with the acquisition, but not the consolidation, appropriate information during trial, influencing the OTT phenomenon.

**Keywords:** Elevated plus maze. One trial tolerance. Medial prefrontal cortex. Mineralocorticoid receptor. Anxiety.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Imagem representativa do labirinto em cruz elevado (LCE). De produção do próprio autor. .... 16
- Figura 2 – Corte sagital esquemático das projeções da região infra-límbica do cortex pré-frontal medial (CPFm). Em destaque as projeções para estruturas límbicas como a matéria cinzenta periaquedutal (MCP), área tegmental ventral (ATV), complexo amigdalóide (CA), núcleos do tálamo (NT) e hipotálamo (HT). Adaptado de Vertes (2006). .... 21
- Figura 3 – Eixo hipotálamo-hipófise-glândulas adrenais (HPA), principais estruturas ativadas mediante a uma resposta ao estresse. De produção do próprio autor. .... 23
- Figura 4 – Principais circuitos cerebrais ativados em resposta ao estresse. Após a percepção do estímulo estressor, dois principais sistemas são ativados: a via rápida, ocorrendo pela ativação do sistema nervoso autônomo (em verde), e a via lenta, pelo eixo hipotálamo – hipófise – glândulas adrenais (eixo HPA, em azul). Inicialmente, a ativação do complexo amigdalóide (CA) estimula o hipotálamo, o qual fará com que o sistema simpático seja ativado. Esse, por sua vez, promove na região medular das glândulas adrenais, uma liberação de catecolaminas (noradrenalina e adrenalina), e também uma liberação de noradrenalina por meio do núcleo do trato solitário e “locus coeruleus” nas regiões encefálicas. A segunda via (linha azul) é caracterizada pela atuação do eixo HPA. O início da sua resposta ocorre pela secreção do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) a partir do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) pelas células parvocelulares. O CRH liberado no sistema porta hipofisário chega até os neurônios da adeno-hipófise, onde age nas células corticotrópicas fazendo com que essas liberem o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na corrente sanguínea. Após o ACTH chegar até o córtex das glândulas adrenais, este induz a produção e liberação de corticosteroides (CORT), que prepara o organismo para situações futuras através de sua ação sobre estruturas cerebrais como, o Complexo amigdalóide (CA), córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HPC) e PVN. As vias sofrem retroalimentação negativa exercida pelos corticosteroides, sendo esta exercida sobre o PVN, hipófise e HPC. Adaptado de JOELS et al. (2006). .... 24
- Figura 5 – Labirinto em cruz elevado (LCE) utilizado no presente estudo. De produção do Laboratório de Psicologia da Aprendizagem (LPA). .... 32

Figura 6 – Representação dos sítios de microinjeção no córtex pré-frontal medial (CPFm). (A) Representação esquemática dos locais de microinfusão dentro (círculos pretos) ou fora (círculos cinza) do CPFm. As secções estão entre + 1,54 e + 1,94 mm do bregma de acordo com o atlas de FRANKLIN; PAXINOS (2007). (B) Fotomicrografia de uma secção coronal de um sujeito representativo mostrando um local de injeção dentro do CPFm região infralímbica. Devido à sobreposição, o número de pontos representados é menor do que o número real de camundongos. De produção do próprio autor. .... 37

Figura 7 – Efeitos do midazolam (MDZ, 2mg/kg, i.p.) em camundongos submetidos ao protocolo de teste e reteste no labirinto em cruz elevado (LCE). As barras representam as médias e o erro padrão da média (n = 12). (A) entradas nos braços fechadas; (B) % de entradas nos braços abertos; (C) % de tempo nos braços abertos. # p<0,05 em comparação com seu respectivo grupo no teste. \* p<0,05 em comparação com seu respectivo grupo salina. Ver Tabela 1 para dados complementares. .... 39

Figura 8 – Efeitos das injeções combinadas de RU28318 (5 e 10ng/0,1µL, intra-CPFm na região infra-límbica) no período de teste (fase de aquisição da memória) e de midazolam (MDZ, 2mg/kg) intraperitoneal (i.p.) no reteste (24h após), em camundongos submetidos ao protocolo de teste e reteste no labirinto em cruz elevado (LCE). As barras representam as médias e o erro padrão da média (n = 8-11). (A) % de entradas nos braços abertos; (B) % de tempo nos braços abertos; (C) entradas nos braços fechados. # p<0,05 em comparação com seu respectivo grupo teste. \* p<0,05 em comparação ao seu respectivo grupo veículo. Ver Tabela 2 para dados complementares. .... 42

Figura 9 – Efeitos das injeções combinadas de RU28318 (5 e 10ng/0,1µL, intra-CPFm na região infra-límbica) no período após 5 minutos do teste (fase de consolidação da memória) e de midazolam (MDZ, 2mg/kg) intraperitoneal (i.p.) no reteste (24h após), em camundongos submetidos ao teste e reteste no labirinto em cruz elevado (LCE). As barras representam as médias e o erro padrão da média (9-11) e as setas verticais indicam o tratamento logo após a sessão de teste. (A) % de entradas nos braços abertos; (B) % de tempo nos braços abertos; (C) entradas nos braços fechados. # p<0,05 em comparação com seu respectivo grupo teste. \* p<0,05 em comparação ao seu respectivo grupo veículo. Ver Tabela 2 para dados complementares. .... 45

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeito da injeção de midazolam (MDZ, 2mg/kg) intraperitoneal (i.p.) em camundongos submetidos ao protocolo de teste e reteste no labirinto em cruz elevado (LCE). Os dados representam a média e  $\pm$  erro padrão da média (n = 12). \* p<0,05 em relação ao respectivo grupo salina. # p<0,05 em comparação ao respectivo grupo no teste. .... 40

Tabela 2 – Efeitos das injeções combinadas de RU28318 (5 e 10ng/0,1 $\mu$ L) infundido na região infra-límbica (IL) do cortex pré-frontal medial (CPFm) no período de teste sobre a fase de aquisição da memória, e de midazolam (MDZ, 2mg/kg) injetado intraperitonealmente (i.p.) no reteste, em camundongos submetidos ao teste e reteste no labirinto em cruz elevado (LCE). Os dados representam a média  $\pm$  erro padrão da média (n = 8-11). \* p<0,05 em relação ao respectivo grupo salina. # p<0,05 em comparação ao respectivo grupo no teste. .... 43

Tabela 3 – Efeitos das injeções combinadas de RU28318 (5 e 10ng/0,1 $\mu$ L) infundido na região infra-límbica (IL) do córtex pré-frontal medial (CPFm), no período de 5 minutos após o teste, sobre a fase de consolidação da memória, e de midazolam (MDZ, 2mg/kg) injetado intraperitonealmente (i.p.) no reteste, em camundongos submetidos ao teste e reteste no labirinto em cruz elevado (LCE). Os dados representam a média  $\pm$  erro padrão da média (n = 9-11). \* p<0,05 em relação ao respectivo grupo salina. # p<0,05 em comparação ao respectivo grupo no teste. .... 46

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACTH** – Hormônio adrenocorticotrófico  
**AMPA** – Ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico  
**BDZ** – Benzodiazepínicos  
**CA** - Complexo amidalóide  
**CBG** – Globulina de ligação a corticosteroides  
**CORT** – Corticosteroides  
**CPF** – Córtex pré-frontal  
**CPFm ou mPFC (inglês)** – Córtex pré-frontal medial  
**CRH** – Hormônio liberador de corticotrofina  
**GABA** – Ácido gama-amino-butírico  
**GABA<sub>A</sub> e GABA<sub>B</sub>** – Subtipos de receptores de GABA  
**GAD** – Enzima glutamato descarboxilase  
**GR** – Receptores glicocorticóides  
**HPA** – Eixo hipotálamo – hipófise – glândulas adrenais  
**HPC** – Hipocampo  
**HT** - Hipotálamo  
**IL** – Infralímbico  
**i.p.** – Intraperitoneal  
**LCE ou EPM (inglês)** – Labirinto em cruz elevado  
**MCP** - Matéria cinzenta periaquedutal  
**MDRpG** – Glicoproteína-P  
**MDZ** – Midazolam  
**mg/kg** – Miligramas/kilogramas  
**MR** – Receptores mineralocorticóides  
**Ng** – Nanogramas  
**NMDA** – N-metil-D-aspartato  
**NT** - Núcleos do tálamo  
**OTT** – Tolerância à primeira exposição “*one trial tolerance*”  
**PRL** – Córtex pré-límbico  
**PVN** – Núcleo paraventricular do hipotálamo “*paraventricular nucleus of hypothalamus*”  
**RU28318** – Antagonista de receptores mineralocorticóides  
**SAP** – esticar “*Stretched attend postures*”  
**SNC** – Sistema nervoso central  
**ATV** - Área tegmental ventral  
**11 $\beta$ -HSD** – Enzima 11 $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase  
 **$\mu$ L** – Microlitros

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
1.1. Ansiedade .....	14
1.2. Labirinto em Cruz Elevado .....	15
1.3. Memórias .....	19
1.4. Estresse .....	22
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>27</b>
2.1. Objetivo Geral .....	28
2.2. Objetivos Específicos .....	28
<b>3. MATERIAL E MÉTODO</b> .....	<b>29</b>
3.1. Sujeito .....	30
3.2. Ética .....	30
3.3. Drogas .....	30
3.4. Cirurgia e Microinjeção .....	30
3.5. Labirinto em Cruz Elevado .....	31
3.6. Análise Comportamental .....	32
3.7. Histologia .....	32
3.8. Delineamento Experimental .....	33
3.8.1. Procedimentos Gerais .....	33
3.8.2. Experimento 1: Avaliação do desenvolvimento da tolerância ao efeito ansiolítico do midazolam em animais reexpostos LCE .....	33
3.8.3. Experimento 2: Efeitos do RU28318 microinjetado na região IL do CPFm, na fase de aquisição da memória, sobre a tolerância aos efeitos do MDZ (OTT), em camundongos expostos e reexpostos ao LCE .....	34
3.8.4. Experimento 3: Efeitos do RU28318 microinjetado na região IL do CPFm, na fase de consolidação da memória, sobre tolerância aos efeitos do MDZ (OTT), em camundongos expostos e reexpostos ao LCE .....	34
3.9. Análise Estatística .....	35
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>36</b>
4.1. Experimento 1. Avaliação do desenvolvimento de tolerância (OTT) ao efeito ansiolítico do MDZ em camundongos submetidos ao protocolo de teste e reteste no LCE .....	38
4.2. Experimento 2: Efeitos do RU28318 microinjetado na região IL do CPFm, na fase de aquisição da memória, sobre a tolerância aos efeitos do MDZ (OTT), em camundongos expostos e reexpostos ao LCE .....	41
4.3. Experimento 3: Efeitos do RU28318 microinjetado na região IL do CPFm, na fase de consolidação da memória, sobre tolerância aos efeitos do MDZ (OTT), em camundongos expostos e reexpostos ao LCE .....	44
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>47</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>54</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>56</b>
<b>ANEXO 1</b> .....	<b>73</b>

## **1. INTRODUÇÃO**

---

## 1.1. Ansiedade

A ansiedade é uma emoção fundamental, imprescindível dentro do repertório afetivo humano (STEIN; BOUWER, 1997). Do ponto de vista evolutivo, pode-se dizer que a ansiedade é uma emoção compartilhada por diversas espécies de vertebrados, permitindo respostas adequadas frente a estímulos ameaçadores (BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2001; GRAEFF; ZANGROSSI JR, 2002; GRAY; MCNAUGAHTON, 2000). É expressa em situações de ameaça incerta ou potencial à integridade física ou psicológica do indivíduo, recrutando, para tanto, estruturas encefálicas e sistemas fisiológicos específicos (MCNAUGHTON; CORR, 2004). Tal reação é caracterizada por respostas de evitação, aumento da vigilância e atenção, redução da atividade exploratória (DAVIS et al., 2010), ocasionando respostas eficientes frente a ameaças relacionadas futuras (JOELS et al., 2006). A diferença em relação ao medo está principalmente nas diferentes situações que podem desencadear este tipo de emoção. Assim, o medo está diretamente relacionado a situações de perigo real e evidente, enquanto a ansiedade, em situações onde o perigo é incerto (BLANCHARD; BLANCHARD; RODGERS, 1990; GRAEFF, 1989).

Embora a ansiedade seja uma resposta adaptativa, ela pode tornar-se patológica em determinadas condições. Os transtornos de ansiedade são formas crônicas, desproporcionais, e contraproduzidas de respostas de ansiedade, resultando em prejuízos funcionais e sofrimento (HETEM, 2004). Estes transtornos são marcados por agressividade, inquietação, confusão, hiperexcitação, e pânico em condições mais graves, bem como manifestações neuroendócrinas e somáticas, que compreendem mudanças hormonais, cardiovasculares, gastrointestinais, respiratórias, dentre outras (HETEM, 2004; PEREIRA, 1997). Além disso, os transtornos de ansiedade causam redução da qualidade de vida e impactos negativos no campo pessoal, social e econômico (BAXTER et al., 2014; COMER et al., 2011; GREENBERG et al., 1999; OLESEN et al., 2012).

Nesse sentido, fármacos com propriedades ansiolíticas, ou seja, com propriedade de alterar os estados de ansiedade começaram a ser desenvolvidos e utilizados para o tratamento desse transtorno (ALLGULANDER, 1986). Uma classe utilizada para tal fim desde 1960, são os benzodiazepínicos (BDZ). Os efeitos característicos desses fármacos são de diminuição da ansiedade, indução de sono, relaxamento muscular e anticonvulsivante. No entanto, os BDZ possuem efeitos colaterais, como amnésia anterógrada e doses altas podem causar sedação e possível dependência (BALON, 2013; WICK, 2013). Esses fármacos exercem ações diretas no sistema de neurotransmissão GABAérgico. O ácido gama-

aminobutírico (GABA) é um neurotransmissor com característica inibitória presente no sistema nervoso central (SNC). Possui dois subtipos de receptores, os GABA<sub>A</sub> são receptores transmembrana multiméricos, nos quais os BZD possuem ação, e os GABA<sub>B</sub> metabotrópicos que possuem sítio de ligação para o baclofen, um relaxante muscular (SIEGHART et al., 1999). Os receptores GABA<sub>A</sub> pertencem à superfamília de receptores pentaméricos. No cérebro, são normalmente constituídos pela oligomerização de diferentes subunidades, duas subunidades alfa ( $\alpha$ ), duas subunidades beta ( $\beta$ ) e uma gama ( $\gamma$ ), dispostos simetricamente em torno de um eixo central de modo a formar um poro, por onde há uma possibilidade de passagem de íons cloreto. Quando esses receptores são ativados pelo neurotransmissor GABA, ocorrem mudanças conformacionais em sua estrutura, permitindo o influxo de íons cloreto para o interior da célula nervosa, hiperpolarizando-a. Os BDZ atuam no sentido de produzir aumento da afinidade do receptor pelo próprio GABA (CAMPAGNA-SLATER; WEAVER, 2007; GUIDOTTI et al., 1980; HAEFELY, 1990).

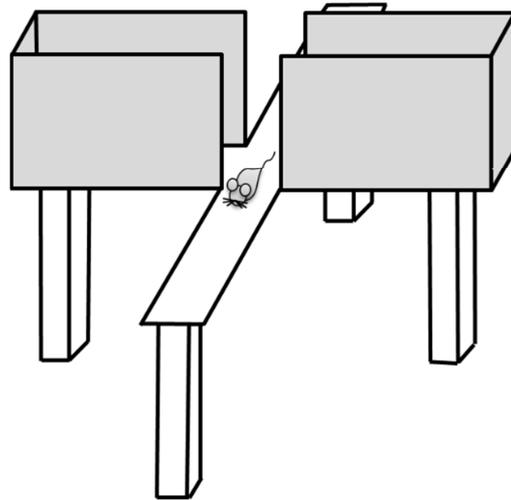
As pesquisas relacionadas às reações de defesa como no caso da ansiedade, têm instigado o interesse pelo desenvolvimento de testes que possibilitem o entendimento das bases biológicas dos transtornos de ansiedade, bem como permitam a avaliação de novos agentes terapêuticos. Dessa forma, modelos em animais que de maneira satisfatória, atendem etologicamente os critérios de semelhança fenomenológica observados na ansiedade foram criados (ZANGROSSI JR, 1997), baseando-se, por exemplo, nas respostas inatas dos animais frente a situações e/ou estímulos aversivos (FILE; MABBUTT; HITCHCOTT, 1990; LISTER, 1990; PELLOW et al., 1985).

## **1.2. Labirinto em Cruz Elevado**

Dentre os testes utilizados para o estudo da ansiedade em modelos animais, o labirinto em cruz elevado (LCE) é um teste amplamente utilizado, tanto para a triagem de agentes com propriedades ansiolíticas, bem como para o estudo das bases neurobiológicas da ansiedade (DALVI; RODGERS, 1996; GRIEBEL et al., 1997; HOGG, 1996; RODGERS, 1997; TEIXEIRA et al., 1996). O LCE consiste em um aparato formado a partir de dois braços fechados por paredes laterais opostos a dois braços abertos, ligados entre si por uma plataforma central e elevados do solo a uma altura que varia de acordo com a espécie de roedor avaliada (FIG. 1). Considera-se como medida do tipo ansiedade o número de entradas e o tempo de permanência do animal nos braços abertos em relação aos braços fechados (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005). O modelo foi validado para ratos por PELLOW et al.

(1985) e para camundongos por LISTER (1987), permitindo então, a avaliação detalhada dos comportamentos do tipo ansiedade (CAROLA et al., 2002; RODGERS; COLE, 1993; RODGERS; DALVI, 1997; RODGERS et al., 1999; RODGERS; JOHNSON, 1995; RODGERS; SHEPHERD, 1993).

Figura 1 – Imagem representativa do labirinto em cruz elevado (LCE).



De produção do próprio autor.

Do ponto de vista etológico, a exposição de ratos e camundongos a uma nova situação ocasiona tanto uma motivação exploratória, como evoca comportamentos defensivos induzidos pela incerteza acerca de potenciais ameaças. No LCE embora tanto os braços abertos quanto os fechados possibilitam a atividade exploratória, estudos confirmam a eficiência dos braços abertos em induzir comportamentos de esquiva, baseado na aversão natural de ratos e camundongos à ambientes abertos. Assim, gera-se, nesses animais, um conflito entre a esquiva e aproximação (exploração) (CRUZ; FREI; GRAEFF, 1994; FERNANDES; FILE, 1996; LISTER, 1987; PELLOW et al., 1985; TREIT; MENARD; ROYAN, 1993). Dessa maneira, embora todos os braços do LCE sejam possíveis de serem explorados por animais ingênuos, há uma preferência pelos braços fechados do aparato (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005). A sensibilidade do LCE às drogas ansiolíticas está relacionada justamente ao fato de haver o conflito esquiva/aproximação (HANDLEY; MCBLANE, 1993; MONTGOMERY, 1955), onde alteram esse conflito, reduzindo à esquiva; assim, o aumento seletivo na exploração do ambiente aberto seria um indício do efeito do tipo ansiolítico (CRUZ et al., 1994). Em contrapartida, uma diminuição da

exploração dos braços abertos estaria relacionada a um efeito do tipo ansiogênico, ou seja, aumento da ansiedade (PELLOW et al., 1985), o que permite o estudo bidirecional de drogas com ação sobre a ansiedade.

As respostas defensivas observadas no LCE não carecem de uma fase de condicionamento (p.ex. choque nas patas) para adquirir características aversivas, sendo respostas de caráter incondicionado. Entretanto, utilizar um protocolo que envolve reexposições ao aparato, permitiria avaliar os fenômenos característicos da ansiedade, como também de memória no mesmo organismo (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005; FILE, 1993), apesar de comumente abordarem estes processos de forma dissociada (FILE et al., 1990; GAZARINI; STERN; BERTOGLIO, 2011; RODGERS; JOHNSON, 1995; STERN; CAROBREZ; BERTOGLIO, 2008). Alguns estudos sugerem que a aprendizagem gerada na exposição inicial, permitiria ao LCE servir de modelo para transtornos de ansiedade que não respondem de forma comum ao efeito ansiolítico de determinadas drogas, por exemplo, as fobias específicas (STAPLES, 2010).

Uma característica importante descrita para o LCE é a alteração comportamental do animal mediante à uma exposição prévia ao labirinto, também é observada uma diminuição ou em alguns casos abolição dos efeitos ansiolíticos de certos agentes ansiolíticos, como benzodiazepínicos, barbitúricos, etanol, e outras drogas com atividade noradrenérgica, serotonérgica ou glutamatérgica (ALBRECHET-SOUZA; BORELLI; BRANDAO, 2008; BERTOGLIO; CAROBREZ, 2002a;2002b; CARVALHO et al., 2005; DAL-COL et al., 2003; FILE et al., 1990; FILE; ZANGROSSI, 1993; GONZALEZ; FILE, 1997; ZHOU, H. et al., 2015). Sendo independente de fatores como o material utilizado para a construção do LCE (FILE, 1993; RODGERS; SHEPHERD, 1993), bem como do período circadiano e condições de iluminação (BERTOGLIO; CAROBREZ, 2002b). Assim, a atividade ansiolítica de determinadas drogas não é observada em animais previamente expostos ao aparato, um fenômeno que foi primeiramente visualizado com o benzodiazepínico clordiazepóxido (FILE, 1990; LISTER, 1987), sendo referido como tolerância à primeira exposição ou “one-trial-tolerance” (OTT). A OTT também é observada em outros testes comportamentais como exploração na caixa claro/escuro, esquiava ao odor de gato e “four-plate” (HASCOET; BOURIN; COUETOUX DU TERTRE, 1997; HOLMES et al., 2001; MCGREGOR; DIELENBERG, 1999).

A tolerância farmacológica pode ser caracterizada como a perda, diminuição do efeito ou a necessidade de se utilizar uma maior dose para alcançar os efeitos da mesma magnitude aos observados anteriormente, sendo comumente observada com o uso repetido da

droga (BATESON, 2002; FILE, 1985). A OTT observada em diferentes aparatos, difere da tolerância farmacológica observada após à administração crônica de drogas ansiolíticas, uma vez que, a OTT pode ocorrer até na ausência da administração prévia de agentes ansiolíticos (FILE; BALDWIN; ARANKO, 1987; FILE et al., 1990; FILE; ZANGROSSI, 1993).

Diversas hipóteses buscam elucidar as bases ligadas à OTT. Dentre elas, a habituação locomotora (DAWSON et al., 1994), a mudança no estado do sítio de ligação ou do complexo do receptor envolvido (BERTOGLIO; CAROBREZ, 2002a;2002b;2003; GONZALEZ; FILE, 1997), a sensibilização ao medo e/ou ansiedade induzida (BERTOGLIO; CAROBREZ, 2000; TREIT et al., 1993), mudança de uma resposta de medo incondicionado para esquiva aprendida (BERTOGLIO; CAROBREZ, 2004; DAL-COL et al., 2003; HOLMES; RODGERS, 1998), sobre a qual os ansiolíticos não surtiriam efeito (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005; FILE; ZANGROSSI, 1993), ou o envolvimento do aprendizado e memória aversiva na modificação da estratégia adotada em cada uma das sessões de exposição do LCE (CALZAVARA et al., 2005; CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005; FILE, 1993; STERN et al., 2008).

A OTT poderia ser uma evidência de que o conflito provocado em animais submetidos ao LCE, imprescindível para a ação de drogas ansiolíticas, estaria diminuído na sessão de reteste. O fato do animal ter uma exposição prévia no LCE possibilitaria o desenvolvimento gradual de uma estratégia e comportamentos (não mais norteados pelo conflito esquiva/aproximação) como a escolha pelos braços fechados (BERTOGLIO; CAROBREZ, 2004), onde na sessão de reteste há um aumento de esquiva aos braços abertos (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005). Uma hipótese sugere que o desenvolvimento de uma memória na primeira exposição ao teste comportamental permitiria mudanças na estratégia adotada, ocasionando um ajuste na resposta comportamental no período de reexposição (STERN et al., 2010).

Além disso, vale salientar que estudos demonstram a participação e importância de diferentes neurotransmissores como o GABA, glutamato, serotonina e dopamina em estruturas límbicas como complexo amigdalóide (CA), matéria cinzenta periaquedutal (MCP) e hipocampo (HPC) no desenvolvimento da OTT (BARBALHO; NUNES-DE-SOUZA; CANTO-DE-SOUZA, 2009; CANTO-DE-SOUZA; NUNES-DE-SOUZA; RODGERS, 2002; DOS REIS; CANTO-DE-SOUZA, 2008; ZHOU, H. et al., 2015). Nesse mesmo sentido, outros estudos demonstram a participação do “vermis” cerebelar e a neurotransmissão histaminérgica na formação da memória (BERNAERTS; LAMBERTY; TIRELLI, 2004; DA SILVA et al., 2006; GIANLORENCO et al., 2012; SERAFIM et al.,

2010), sendo possível a participação integrada desses neurotransmissores e estruturas no desenvolvimento da OTT.

Portanto, empregando o protocolo do teste e reteste, é possível averiguar o efeito de drogas na aprendizagem aversiva ou verificar o efeito de drogas na memória aversiva no momento do reteste, pressupondo que um aprendizado aversivo ocorreu durante a primeira exposição ao modelo (GAZARINI et al., 2011). No mesmo sentido, a alteração no estado emocional gerado pela exposição diversas vezes no LCE pode abranger diversas estruturas cerebrais, que são recrutadas preferencialmente no teste ou reteste no LCE (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005).

### **1.3. Memórias**

A memória é um termo complexo que inclui diferentes sistemas, funções, processos e ativação de várias estruturas (CURRAN; MINTZER, 2006). Pode ser definida como o registro representativo de informações obtidas através da experiência. Embora constantemente os organismos captem informações através dos sentidos, apenas informações avaliadas como necessárias e imprescindíveis serão armazenadas de maneira duradoura. É observado que a magnitude e o tempo de duração da memória são determinados tanto pelo grau de atenção, relevância da informação e a emoção gerada no período de aquisição da mesma (IZQUIERDO; MCGAUGH, 2000).

A memória de longo prazo é dividida em fases de aquisição, consolidação e evocação (ABEL; LATTAL, 2001; MCGAUGH, 1966). A fase de aquisição é caracterizada pelo momento de obtenção da informação captada pelos sentidos, por meio da exposição do indivíduo a uma experiência, basicamente é a associação de estímulos e respostas entre si (CAMMAROTA et al., 1997). Posteriormente, ocorre uma filtragem e retenção progressiva da informação obtida, chamado de consolidação. Esse processo pode durar até dias, onde haverá a transição de uma memória momentânea para uma fixa e duradoura. Envolvendo a necessidade de síntese proteica (MCGAUGH, 2000; NAKAYAMA et al., 2013). Por fim, a memória poderá ser evocada quando uma situação for capaz de acessá-la, permitindo ao indivíduo a possibilidade de mudança em seus comportamentos (IZQUIERDO et al., 1998; VIANNA et al., 2000).

É observado que tanto ratos, como camundongos, são capazes de lembrar do contexto em que estavam, no momento em que foram surpreendidos por um estímulo aversivo (LEDOUX, 2000; LI; MCNALLY, 2014; MCGAUGH, 2000; VAZDARJANOVA;

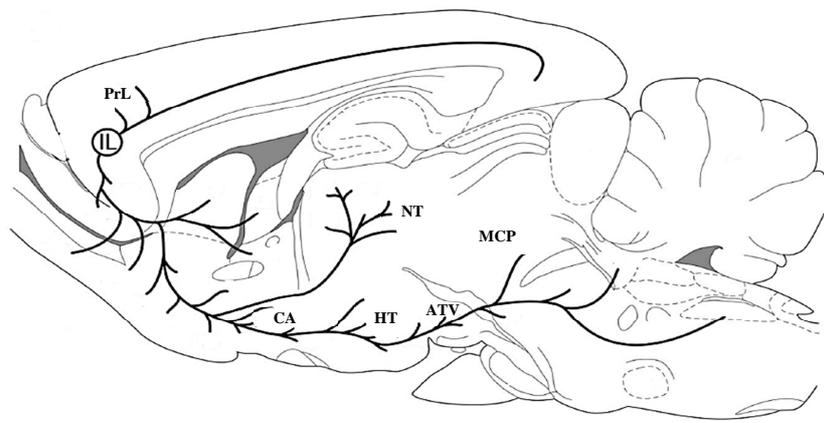
MCGAUGH, 1998). Estudos têm demonstrado que os aspectos relacionados a memórias aversivas estão diretamente ligados a transtornos de ansiedade (MATHEWS; MACLEOD, 1994; NUTT, 2005), bem como grande parte dos estados de ansiedade estão relacionados à aprendizagem aversiva decorrente do estresse (JOELS et al., 2006). As memórias emocionais, principalmente, possibilitam não só a expectativa e antecipação de acontecimentos futuros, como também, a expressão facilitada e adequada de comportamentos frente a um evento já vivido (DUDAI, 2009; YEHUDA; JOELS; MORRIS, 2010).

A aprendizagem pode ser vista como uma mudança no comportamento obtida pela experiência, observação ou prática motivada (LACHMAN, 1997). A possibilidade de modificação comportamental em decorrência de novas experiências, e a capacidade de aprender e recordar, estão relacionadas a modificações na plasticidade cerebral ocorrida pela percepção desses eventos (MAYFORD; SIEGELBAUM; KANDEL, 2012). A plasticidade consiste na capacidade do SNC de alterar sua própria estrutura e função (HOLTMAAT; SVOBODA, 2009). Essas mudanças incluem diversas formas de reorganizações que ocorrem no encéfalo, envolvendo as características funcionais das células nervosas, determinando a forma e estrutura de neurônios e células da glia, modificando a atividade enzimática, transdução de sinal e expressão gênica. Essas mudanças permitem alterações na eficiência sináptica aumentando ou diminuindo a transmissão de impulsos nervosos, refletindo, conseqüentemente, sobre a modulação do comportamento (MCMAHON; BARRIONUEVO, 2002; ZUCKER; REGEHR, 2002).

Diversas estruturas estão envolvidas nos processos que envolvem memória e ansiedade; dentre elas, pode-se destacar o hipotálamo (HT), a matéria cinzenta periaquedutal (MCP), o complexo amigdalóide (CA) e o córtex pré-frontal medial (CPFm) (BANNERMAN et al., 2004; BEHBEHANI, 1995; BRANDAO et al., 2003; GRAEFF et al., 1993; LANG; BRADLEY; CUTHBERT, 1998; WALKER; CARRIVE, 2003). O CPFm tem sido descrito como estrutura fundamental auxiliando a orquestrar as respostas defensivas e a formação de memórias aversivas, uma vez que possui conexões proeminentes com estruturas límbicas (CARVALHO et al., 2005; LAMPREA et al., 2000; MILLER; MCEWEN, 2006; PRICE; DREVETS, 2010; SHIN; LIBERZON, 2010). Ele está envolvido em funções, como memória, aprendizado e tomada de decisões (GHASHGHAEI; HILGETAG; BARBAS, 2007; MILAD; QUIRK, 2002), além de exercer um importante papel na modulação neuroendócrina em resposta ao estresse (JONES; MYERS; HERMAN, 2011; ZHANG, J. H.; HAN; SHI, 2012). Porém, as funções dessa estrutura nos processos que envolvem ansiedade e memória aversiva no LCE não estão totalmente esclarecidas.

Anatomicamente, o CPFm compõe parte do córtex pré-frontal (CPF), em roedores o CPFm é dividido em uma porção ventromedial, abrangendo as subdivisões pré-límbica (PrL), infra-límbica (IL) e o córtex orbital medial, além de uma porção dorsal que compreende o córtex cingulado anterior, córtex pré-central medial e uma porção dorsal do PrL (FRANKLIN; PAXINOS, 2007; HOOVER; VERTES, 2007; RESSTEL; CORREA, 2006). Dados sugerem que podem existir diferenças nas funções entre as regiões PrL e IL. VIDAL-GONZALEZ et al. (2006), mostraram que a microestimulação do PrL causou o aumento do medo contextual e decréscimo da extinção desse tipo de memória aversiva, e o IL promoveu os efeitos contrários. Além da modulação sobre estados comportamentais, o CPFm tem papel importante na resposta neuroendócrina induzida por estresse emocional, onde o PrL parece ter caráter inibitório à ativação do eixo hipotálamo-hipófise-glândulas adrenais (HPA), enquanto que a região IL participa da ativação desse eixo (JONES et al., 2011; RADLEY; ARIAS; SAWCHENKO, 2006) .

Figura 2 – Corte sagital esquemático das projeções da região infra-límbica do cortex pré-frontal medial (CPFm).



Em destaque as projeções para estruturas como córtex pre-límbico, matéria cinzenta periaquedutal (MCP), área tegmental ventral (ATV), complexo amigdalóide (CA), núcleos do tálamo (NT) e hipotálamo (HT). Adaptado de VERTES (2006).

Para determinar as projeções eferentes da região IL no CPFm, HURLEY et al. (1991) fizeram marcações retrógradas e anterógradas e observaram que axônios partem da região IL por três vias eferentes, uma via dorsal ascendente que inerva a região PrL e o córtex cingulado anterior, uma via lateral para o córtex insular, córtex perirhinal e partes do córtex piriforme e, finalmente, uma grande via ventral que inerva os núcleos do tálamo, o HP, o CA, a MCP e ao núcleo leito da estria terminal, bem como, núcleos autonômicos centrais que auxiliam na modulação das respostas viscerais aos estímulos emocionais como no estresse

(FIG. 2). Neste sentido, o CPFm é descrito como um substrato fundamental, ajudando a orquestrar a resposta defensiva e a formação de memórias aversivas (LAMPREA et al., 2000; MILLER; MCEWEN, 2006; SHIN; LIBERZON, 2010). Outros estudos têm destacado o papel do CPFm na consolidação de memórias (TRONEL; SARA, 2003), havendo diversas evidências de que o CPFm possui importante papel sobre os diferentes estágios da memória avaliados em diversos estudos (EUSTON; GRUBER; MCNAUGHTON, 2012; FRANKLAND et al., 2004; QUIRK; GARCIA; GONZALEZ-LIMA, 2006; SANTINI et al., 2004; ZHANG, Y.; FUKUSHIMA; KIDA, 2011; ZHAO et al., 2005).

Dados da literatura também indicam que os hormônios relacionados ao estresse teriam função essencial nas alterações comportamentais entre o teste e o reteste no LCE (ALBRECHET-SOUZA et al., 2007; GAZARINI et al., 2011; RODGERS et al., 1999).

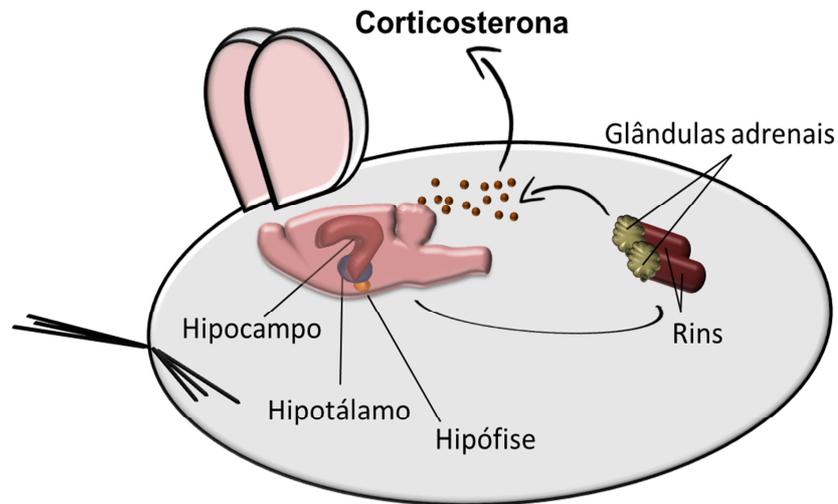
#### **1.4. Estresse**

O estresse ocorre, mas não somente, em respostas às ameaças reais e potenciais que necessitam de mudanças comportamentais imediatas e também futuras. As informações relacionadas a um estressor, na maioria das vezes, são captadas pelos sentidos e rapidamente conduzidas até o SNC, que recrutará, como resposta a esse estresse, sistemas neurais e endócrinos específicos (ULRICH-LAI; HERMAN, 2009). Alguns dos principais hormônios responsáveis pelas respostas ao estresse são os corticosteroides. Durante uma situação de estresse, os níveis circulantes dos hormônios corticosteroides aumentam rapidamente, cerca 10 vezes acima dos níveis circadianos normais, retornando aos níveis basais cerca de 1-3 horas após (DE KLOET, 1991). São sintetizados no córtex da glândula adrenal de forma circadiana (atuando no controle de processos fisiológicos ao longo do dia) ou pulsátil (principalmente resposta ao estresse), e secretados no sistema circulatório (LIGHTMAN et al., 2008) (FIG 3).

Existem dois mecanismos primários básicos, responsáveis pela manutenção e reestabelecimento do equilíbrio homeostático em uma situação de estresse. São eles o eixo HPA e o eixo simpato-adrenal. Assim, o estresse é processado por estruturas cerebrais que ativam neurônios parvocelulares localizados no hipotálamo, onde esses, por sua vez, secretam hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e vasopressina na circulação porta-hipofisária. Esses hormônios secretados promovem uma liberação de hormônios adrenocorticotróficos (ACTH) da adeno-hipófise, que serão liberados na corrente sanguínea chegando até a zona fasciculada do córtex da glândula adrenal, provocando a síntese e secreção dos corticosteroides, derivados do colesterol. Essa via é capaz de sofrer retroalimentação negativa

ocorrendo uma diminuição da expressão do RNA mensageiro para CRH e vasopressina ou a redução da expressão de RNA mensageiro para o precursor do ACTH na adeno-hipófise (HARBUZ; LIGHTMAN, 1992) (FIG. 4).

Figura 3 – Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), principais estruturas ativadas mediante a uma resposta ao estresse.



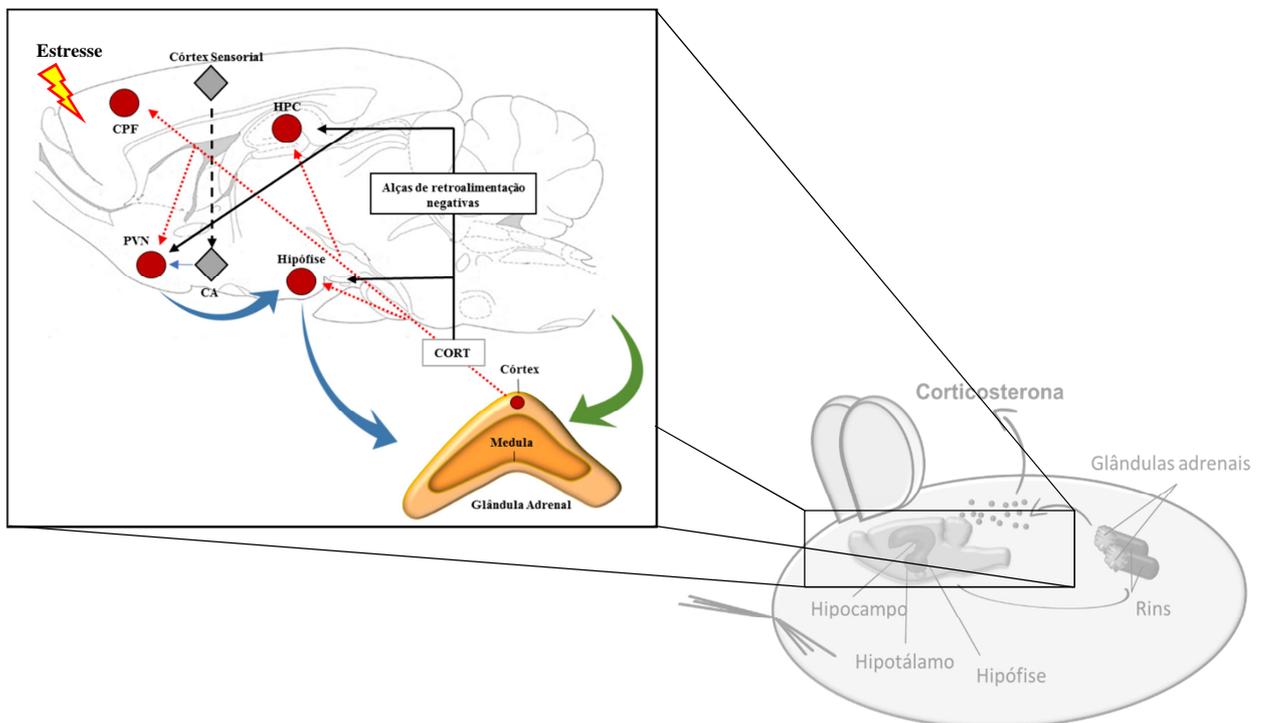
De produção do próprio autor.

A princípio, todas as áreas do cérebro estão expostas a este hormônio (JOELS; BARAM, 2009; MILLAN, 2003). No entanto, a ação em seus receptores nas áreas cerebrais pode ser regulado pela globulina de ligação a corticosteroides (CBG) que se liga a esses hormônios, impedindo-os de penetrar no cérebro; a glicoproteína-P (MDRpG) responsável por transportar de forma ativa, através da barreira hematoencefálica para fora do cérebro, uma pequena quantidade de corticosterona e grandes quantidades de esteróides sintéticos e outras drogas, de tal modo, que apenas altas concentrações sejam capazes de adentrarem no cérebro; e por fim pela enzima 11 $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase (11 $\beta$ -HSD), que nas células catalisa a conversão de corticosterona inativa em ativa (BREUNER; ORCHINIK, 2002; NARANG et al., 2008; SECKL, 1997), reativando-a (MCEWEN, 2007), possibilitando que suas ações sejam desempenhadas (MASON; PARIANTE; THOMAS, 2008).

Uma característica observada para os hormônios do estresse é que após ativarem seus receptores no SNC, eles geram ações que duram de minutos a dias (JOELS; BARAM, 2009). Por serem hormônios lipossolúveis, penetram facilmente a membrana celular e se ligam aos seus receptores intracelulares no citoplasma. A localização de seus receptores que, no cérebro de mamíferos, constituem nos subtipos mineralocorticoide e glicocorticoide (MR e GR, respectivamente) é diferencial. Enquanto os GR estão

concentrados em maior número no hipocampo, septo lateral e núcleo paraventricular, mas também encontrados na maioria das áreas encefálicas, atuando tanto no processamento emocional quanto na estabilização dos processos neuroquímicos em resposta ao aprendizado, o subtipo MR está presente principalmente em neurônios do HPC, septo lateral, no CA, “locus coeruleus”, PVN e CPFm, permitindo ações primárias envolvendo cognição, emoção e processamento inicial do estresse (DE KLOET, 1991; DE KLOET; JOELS; HOLSBOER, 2005; REUL; DE KLOET, 1986).

Figura 4 – Circuitos ativados em resposta ao estresse.



Após a percepção do estímulo estressor, dois principais sistemas são ativados: a via rápida, ocorrendo pela ativação do sistema nervoso autônomo (em verde), e a via lenta, pelo eixo hipotálamo – hipófise – glândulas adrenais (eixo HPA, em azul). Inicialmente, a ativação do complexo amigdalóide (CA) estimula o hipotálamo, o qual fará com que o sistema simpático seja ativado. Esse, por sua vez, promove na região medular das glândulas adrenais, uma liberação de catecolaminas (noradrenalina e adrenalina), e também uma liberação de noradrenalina por meio do núcleo do trato solitário e “locus coeruleus” nas regiões encefálicas. A segunda via (linha azul) é caracterizada pela atuação do eixo HPA. O início da sua resposta ocorre pela secreção do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) a partir do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) pelas células parvocelulares. O CRH liberado no sistema porta hipofisário chega até os neurônios da adeno-hipófise, onde age nas células corticotrópicas fazendo com que essas liberem o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na corrente sanguínea. Após o ACTH chegar até o córtex das glândulas adrenais, este induz a produção e liberação de corticosteroides (CORT), que prepara o organismo para situações futuras através de sua ação sobre estruturas cerebrais como, o complexo amigdalóide (CA), córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HPC) e PVN. As vias sofrem retroalimentação negativa exercida pelos corticosteroides, sendo esta exercida sobre o PVN, hipófise e HPC. Adaptado de JOELS et al. (2006).

Após a corticosterona se ligar aos seus receptores, MR ou GR, o complexo formado “ligante-receptor” é translocado até o núcleo celular, o qual se ligará a elementos de respostas a corticosteroides, responsáveis por diversas ações, como modulação da transcrição gênica, codificação de proteínas para receptores (GROC; CHOQUET; CHAOULOFF, 2008) ou proteínas do citoesqueleto (HARRELL et al., 2004), neurofilamentos e cinases (DATSON et al., 2008; MORSINK et al., 2006), estando, dessa maneira, os corticostéóirdes ligados a plasticidade sináptica. Outras funções regulatórias já foram observadas para os MR, como a liberação vesicular e aumento da liberação de neurotransmissores glutamato via proteína G, além de inibição de canais de potássio (KARST et al., 2005; OLIJSLAGERS et al., 2008).

Nos transtornos de ansiedade, a resposta para o estresse pode variar diante de cada situação e estímulo. Isso ocorre uma vez que há diferenças no grau de ativação dos eixos HPA e simpato-adrenal, como também, pela genética, o histórico de vida, a intensidade e frequência do estímulo, o contexto, o sexo, idade, entre outros (JOELS; BARAM, 2009; PACAK; PALKOVITS, 2001). Funções, como cognição e emoções, acabam por serem influenciadas pelo estresse, uma vez que grupos de neurônios responsáveis por serem ativados em situações de provável ameaça, bem como regiões sensíveis a hormônios relacionados ao estresse estão ativadas, promovendo alterações adaptativas (MCEWEN, 2007; MCNAUGHTON; CORR, 2004). O estressor psicológico recruta inicialmente estruturas ligadas à emoção (CA e CPF), aprendizado e memória (HPC) e tomada de decisão (CPFm) (PACAK; PALKOVITS, 2001).

Neste contexto, diversos trabalhos têm confirmado a atividade normal dos MR em modular os processos atencionais e mnemônicos ligados a situações aversivas (DE QUERVAIN et al., 2000; JOELS et al., 2006). Assim, estudos demonstram que o bloqueio ou a hiperatividade dos MR prejudica a aquisição e a consolidação da memória e conseqüentemente, da aprendizagem, em uma variedade de tarefas, tanto em seres humanos (RIMMELE et al., 2013; RIMMELE et al., 2010), quanto em animais de laboratório (OITZL; DE KLOET, 1992; SANDI; ROSE, 1997; ZHOU, M. et al., 2010; ZHOU, M. et al., 2011). Da mesma forma, trabalhos recentes têm demonstrado a participação do CPFm no aprendizado emocional durante a primeira exposição ao LCE (ALBRECHET-SOUZA et al., 2008; STERN et al., 2010).

Entretanto, para o nosso conhecimento, nenhum estudo investigou se a neurotransmissão que envolve os receptores MR da região IL do CPFm estaria envolvida no estabelecimento do OTT. Desta forma, com base nas evidências de que o aprendizado emocional de animais expostos à primeira sessão no LCE seria um fator preponderante para a

mudança na estratégia comportamental e na diminuição ou abolição dos efeitos dos benzodiazepínicos em animais reexpostos ao aparato, bem como, nas evidências que demonstram que os corticosteroides poderiam estar envolvidos na aquisição e/ou consolidação de tal aprendizado, a investigação do papel dos MR é fundamental para o entendimento das bases neurobiológicas da tolerância aos efeitos ansiolíticos dos benzodiazepínicos.

Assim, nossa hipótese é que os receptores MR participam na formação da memória ligada à primeira exposição ao LCE, a qual teria influência sobre o estabelecimento do OTT.

## **2. OBJETIVOS**

---

## **2.1. Objetivo Geral**

Investigar o papel dos receptores mineralocorticoides (MR) presentes na região infra-límbica (IL) do córtex pré-frontal medial (CPFm), na tolerância (OTT) aos efeitos do midazolam (MDZ) em camundongos submetidos ao protocolo de teste e reteste no labirinto em cruz elevado (LCE).

## **2.2. Objetivos Específicos:**

Caracterizar o efeito ansiolítico do MDZ e o fenômeno de OTT.

Avaliar o efeito do antagonismo de MR no CPFm (região IL) sobre a fase de aquisição e consolidação da memória, na tolerância aos efeitos do MDZ em camundongos submetidos ao protocolo de teste e reteste no LCE.

### **3. MATERIAL E MÉTODO**

---

### 3.1. Sujeitos

Foram utilizados camundongos machos da linhagem suíço-albino, com idade entre 35 e 45 dias, pesando entre 30 a 35 gramas, provenientes do biotério central da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar. Os indivíduos foram agrupados em gaiolas coletivas (41x34x16cm, 10 por gaiola), mantidos em condições controladas de temperatura ( $23\pm 1^\circ\text{C}$ ), luz (ciclo claro/escuro de 12/12 horas, luzes acessas às 7:00 horas) e livre acesso a água e alimento, exceto durante as sessões no LCE.

### 3.2. Ética

O trabalho possui número 6634120315 CEUA-UFSCar (Anexo 1), regido segundo as recomendações da diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos, elaborada pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA.

### 3.3. Drogas

Para o tratamento intraperitoneal (i.p.):

- Midazolam (MDZ, agonista  $\text{GABA}_A$  benzodiazepínico; Roche®, Brasil), na dose de 2mg/kg (i.p.), diluído em salina estéril (0,9% NaCl), a qual foi utilizada como controle (grupo salina);

Para o tratamento bilateral intra-CPFm:

- RU28318 (antagonista MR; Tocris Bioscience, EUA), nas doses de 5 e 10ng/0,1 $\mu\text{L}$  (intra-CPFm, região IL), dissolvido em veículo estéril (2% etanol, diluído em solução fisiológica 0,9% NaCl), o qual foi utilizado como controle (grupo veículo).

Todas as doses foram escolhidas de acordo com estudos prévios (KIM et al., 1998; MCEOWN; TREIT, 2011; NUNES-DE-SOUZA et al., 2000; TER HORST et al., 2014).

### 3.4. Cirurgia e Microinjeção

Os camundongos foram anestesiados com solução de cloridrato de cetamina e xilazina (100/10mg/kg, i.p.), e submetidos a tricotomia da região da cabeça, e posteriormente,

cirurgia estereotáxica (estereotáxico “Insight Instruments”, Brasil) para a implantação bilateral intracraniana de cânulas-guia (25-gauge x 7 mm; “Insight Equipaments”, Brasil) direcionadas à região IL do CPFm, de acordo com as coordenadas em referência ao bregma (CPFm-IL; AP: +1.6mm, ML: 0.3mm, DV: -2.5mm) de FRANKLIN; PAXINOS (2007).

As pontas das cânulas-guia foram deixadas a  $\pm$  2mm acima da estrutura alvo para que a mesma não fosse danificada. Para a fixação das mesmas, foram utilizados uma prótese de resina acrílica autopolimerizável e um parafuso de aço inoxidável preso ao crânio. Um mandril de aço inoxidável (33-gauge; Fishtex®, Brasil) foi colocado dentro das cânulas-guia para impedir possíveis obstruções e contaminação, sendo removido durante os procedimentos no período de teste.

Os animais receberam uma injeção de anti-inflamatório cetoprofeno (5mg/kg, i.p.) e antibiótico ceftriaxona (4mg/kg, i.p.), para evitar infecções e auxiliar a recuperação pos-cirúrgica (LU et al., 2004; STEPANOVIC-PETROVIC et al., 2014). O período pós-operatório durou entre 4 a 5 dias após a estereotáxia.

No dia do teste (Experimento 2) os animais receberam microinjeções bilaterais 5 minutos antes do teste ou 5 minutos após o teste (Experimento 3). As agulhas de injeções (33-gauge, 9mm de comprimento) foram inseridas dentro das cânulas-guia, cada agulha estava conectada, por meio de um tubo de polietileno (PE-10) a uma microseringa Hamilton (10 $\mu$ L). Uma bomba de infusão (“Insight” BI2000, “Insight Equipaments”, Brasil) foi programada para injetar 0,1 $\mu$ L de solução durante um período de 60 segundos, as agulhas permaneceram após a infusão cerca de 90 segundos no local para evitar o refluxo da solução; os animais foram contidos manualmente pelo experimentador com auxílio de uma flanela. O movimento de uma pequena bolha de ar no tubo de polietileno antes, durante e depois das injeções confirmaram o fluxo da solução (NUNES-DE-SOUZA et al., 2000).

### **3.5. Labirinto em Cruz Elevado**

O labirinto em cruz elevado (LCE), consiste de um aparato construído em madeira, composto de quatro braços dispostos uns dos outros de forma ortogonal, sendo dois fechados lateralmente com paredes de vidro (30x5x15cm) e dois abertos (30x5x0,25cm), e elevado do solo a 38,5cm, semelhante ao utilizado por LISTER (1987).

Figura 5 – Labirinto em cruz elevado (LCE) utilizado no estudo.



De produção do Laboratório de Psicologia da Aprendizagem (LPA).

### 3.6. Análise Comportamental

Os experimentos foram gravados por um sistema de câmera conectada a um computador posicionado em sala adjacente a sala de teste. As avaliações comportamentais foram feitas pela observação das gravações acompanhadas do uso do “software X-Plo-Rat” 2005 (GARCIA; CARDENAS; MORATO, 2005). Os parâmetros comportamentais analisados foram: total de entrada nos braços fechados (frequência), % de entradas nos braços abertos e % de tempo gasto nos braços abertos. Também foram avaliados: total de mergulhar (frequência; movimento exploratório com a cabeça/ombros para fora dos braços abertos), porcentagem de mergulhos protegidos (protegido = plataforma central + braços fechados), total de esticar (SAP) (frequência; *stretched attend postures* – esticar-se: postura exploratória na qual o corpo estende-se para frente, depois retrai-se à posição original sem locomoção efetiva, resposta relacionada a avaliação de risco), porcentagem de SAP protegido, total de levantamentos (frequência; movimento vertical contra as paredes) (CRUZ et al., 1994; RODGERS; JOHNSON, 1995).

### 3.7. Histologia

Ao final dos Experimentos 2 e 3, os camundongos foram submetidos a anestesia com solução de cloridrato de cetamina e xilazina (100/10mg/kg, i.p.), e receberam microinjeções bilaterais com 0,1µL de uma solução contendo 1% de azul de Evans, conforme o procedimento descrito para as microinjeções. Os animais foram eutanasiados com o uso de uma câmara de CO<sub>2</sub>, seus encéfalos removidos e mantidos em recipientes contendo solução

de formalina a 10% até serem seccionados em criostato a temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  (LEICA CM 1850, Leica Biosystems, Alemanha).

As secções coronais de  $30\mu\text{m}$  foram avaliadas em microscópio (Olympus BX41, Olympus, Japão) e a visualização da dispersão do azul de Evans indicou os locais das microinjeções. Os animais cujas microinjeções não atingiram a região IL do CPFm, foram excluídos da análise estatística.

### 3.8. Delineamento Experimental

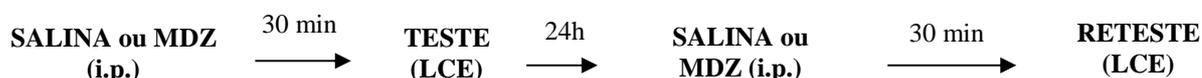
#### 3.8.1. Procedimento Geral

Os animais foram levados até uma sala adjacente a sala de teste, onde permaneceram por um período de 30 min para ambientação ao local. Passado esse período, foram administrados o controle ou as drogas e 30 min após as administrações sistêmicas ou 5 minutos após as administrações intra-CPFm, os camundongos foram submetidos ao LCE por 5 minutos em cada sessão (Experimento 1 e 2), exceto para o Experimento 3, onde a administração inicial de controle ou droga foi feita posterior a submissão dos animais ao LCE na primeira sessão, além disso os outros procedimentos foram iguais aos dos experimentos 1 e 2.

As sessões consistiram de teste (dia 1) e reteste (dia 2) 24 horas após a primeira exposição ao LCE. Ao término de cada sessão, o LCE foi limpo com algodão umedecido em solução de álcool a 20% (v/v) e seco com papel toalha. Os testes foram conduzidos sob iluminação moderada (77 lux) durante a fase clara do ciclo de luz.

#### 3.8.2. Experimento 1: Avaliação do desenvolvimento da tolerância ao efeito ansiolítico do midazolam em animais reexpostos LCE

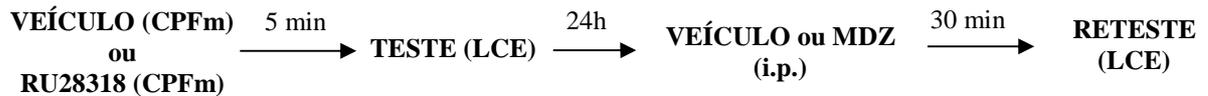
No primeiro dia (teste) os animais receberam administração sistêmica (i.p) de salina ou MDZ nas doses de 2mg/kg, e após 30 minutos, foram levados até o LCE, onde o teste foi iniciado colocando cada animal na plataforma central com a cabeça voltada para um dos braços abertos. Após 24 horas diferentes grupos receberam tratamento (i.p.) com salina ou MDZ nas doses de 2mg/kg, e 30 min depois foram reexpostos ao LCE, como delineado abaixo:



Assim, foram formados 4 grupos experimentais: salina/salina, salina/MDZ (2mg/kg), MDZ (2mg/kg)/salina, MDZ (2mg/kg)/MDZ (2mg/kg).

### **3.8.3. Experimento 2: Efeitos do RU28318 microinjetado na região IL do CPFm, na fase de aquisição da memória, sobre a tolerância aos efeitos do MDZ (OTT), em camundongos expostos e reexpostos ao LCE**

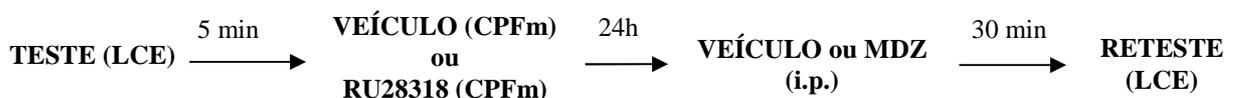
No primeiro dia (teste), 5 minutos antes da exposição ao LCE, diferentes grupos foram tratados com veículo ou RU28318 nas doses de 5 e 10ng/0,1µL intra-CPFm, o início do teste no LCE seguiu os mesmos procedimentos que no experimento 1. Após 24 horas (reteste), metade dos animais de cada grupo foi tratado sistemicamente (i.p.) com veículo ou MDZ 2mg/kg e 30 minutos depois, o mesmo grupos foram reexposto a LCE conforme procedimento delineado abaixo:



Assim, foram formados 6 grupos experimentais: veículo/veículo, veículo/MDZ (2mg/kg), RU28318 (5ng/0,1µL)/veículo, RU28318 (5ng/0,1µL)/MDZ (2mg/kg), RU28318 (10ng/0,1µL)/veículo, RU28318 (10ng/0,1µL)/MDZ (2mg/kg).

### **3.8.4. Experimento 3: Efeitos do RU28318 microinjetado na região IL do CPFm, na fase de consolidação da memória, sobre tolerância aos efeitos do MDZ (OTT), em camundongos expostos e reexpostos ao LCE**

No primeiro dia (teste), os animais foram expostos ao teste no LCE, e 5 minutos após diferentes grupos foram administrados com veículo ou RU28318 nas doses de 5 e 10ng/0,1µL intra-mPFC, o início do teste e o reteste seguiram os mesmos procedimentos que no experimento 2, procedimento delineado abaixo:



Assim, foram formados 6 grupos experimentais: veículo/veículo, veículo/MDZ (2mg/kg), RU28318 (5ng/0,1µL)/veículo, RU28318 (5ng/0,1µL)/MDZ (2mg/kg), RU28318 (10ng/0,1µL)/veículo, RU28318 (10ng/0,1µL)/MDZ (2mg/kg).

### **3.9. Análise Estatística**

Todos os dados foram inicialmente verificados quanto a homogeneidade de variância (teste de Levene). Quando necessário, os dados foram transformados em log (Experimentos 2: % de tempo nos braços abertos) antes de serem submetidos à análises de variância para medidas repetidas (two-way ANOVA) [Experimento 1 (fator 1: teste – salina ou MDZ (2mg/kg), fator 2: reteste – salina ou MDZ (2mg/kg)); Experimento 2 e 3 (fator 1: teste – veículo ou RU28318 nas doses de (5 ou 10ng/0,1µL), reteste – veículo ou MDZ (2mg/kg)]. Quando indicado por valores de P significativos, o teste de comparações múltiplas de Duncan foi utilizado. Foi considerado um valor p de 0,05 ou menor como significativo.

## **4. RESULTADOS**

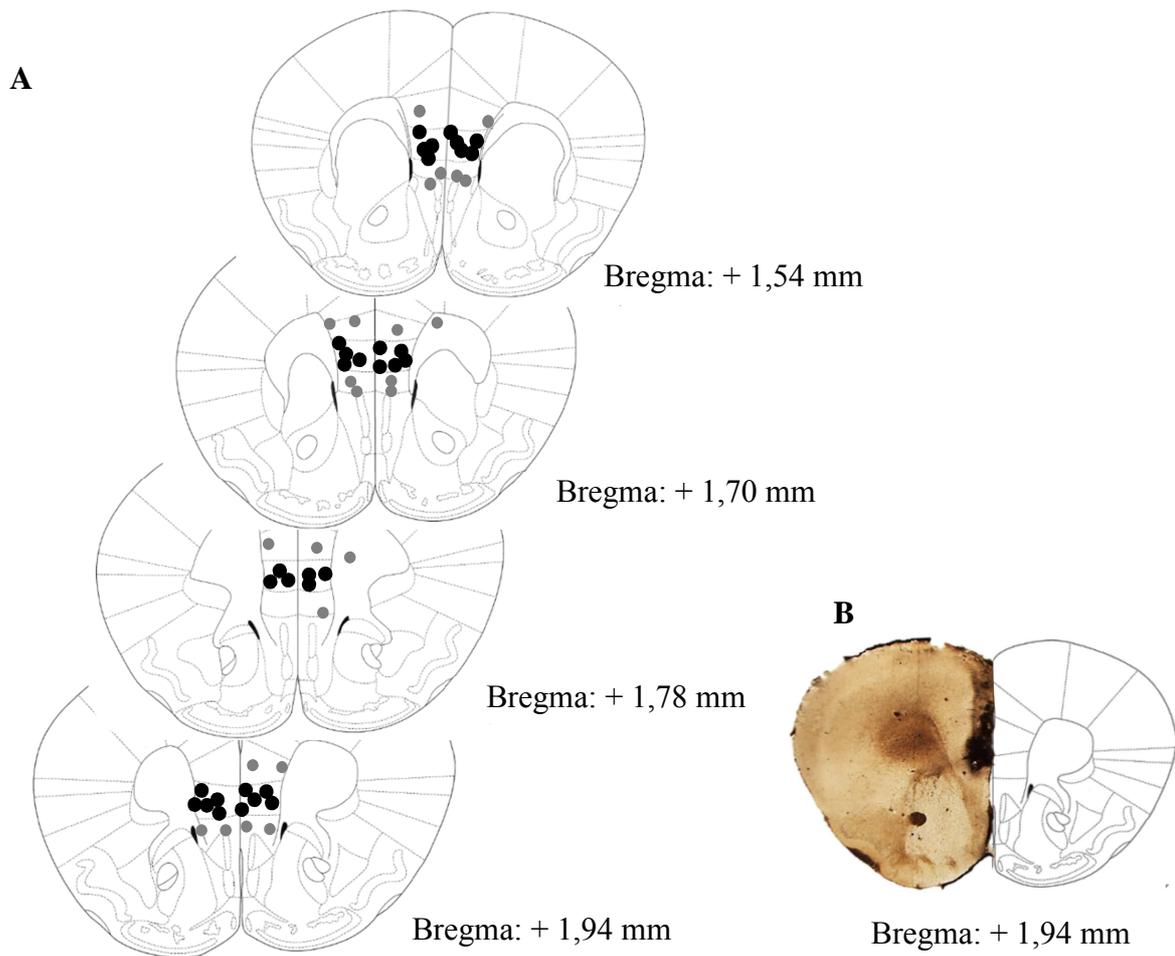
---

Foram utilizados 48 animais no Experimento 1. A análise histológica confirmou que um total de 60 camundongos receberam canulação na região IL do CPFm no Experimento 2 e 58 no Experimento 3 (Figura 5).

Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos (teste/reteste):

Experimento 1: salina/salina = 12; salina/MDZ (2mg/kg) = 12; MDZ (2mg/kg)/salina = 12; MDZ (2mg/kg)/MDZ (2mg/Kg) = 12.

Figura 6 – Representação dos sítios de microinjeção no córtex pré-frontal medial (CPFm).



(A) Representação esquemática dos locais de microinfusão dentro (círculos cheios) ou fora (círculos cinza) do CPFm. As seções estão entre + 1,54 e + 1,94 mm do bregma, de acordo com o atlas de FRANKLIN; PAXINOS (2007). (B) Fotomicrografia de uma seção coronal de um sujeito representativo mostrando um local de injeção dentro do CPFm região infra-límbica. Devido à sobreposição, o número de pontos representados é menor do que o número real de camundongos. De produção do próprio autor.

Experimento 2: veículo/veículo = 11; veículo/MDZ (2mg/kg) = 10; RU28318 (5ng)/veículo = 10; RU28318 (5ng)/MDZ (2mg/kg) = 11 no grupo; RU28318 (10ng)/veículo = 10; RU28318 (10ng)/MDZ (2mg/kg) = 8.

Experimento 3: veículo/veículo = 10; veículo/MDZ (2mg/kg) = 11; RU28318 (5ng)/veículo = 10; RU28318 (5ng)/MDZ (2mg/kg) = 10; RU28318 (10ng)/veículo = 8; RU28318 (10ng)/MDZ (2mg/kg) = 9.

#### **4.1 Experimento 1. Avaliação do desenvolvimento de tolerância (OTT) ao efeito ansiolítico do MDZ em camundongos submetidos ao protocolo de teste e reteste no LCE**

Os efeitos observados após a administração de salina ou MDZ (2mg/kg, i.p.) sobre o comportamento de camundongos submetidos ao protocolo teste e reteste no LCE são apresentados na (Figura 7 e Tabela 1).

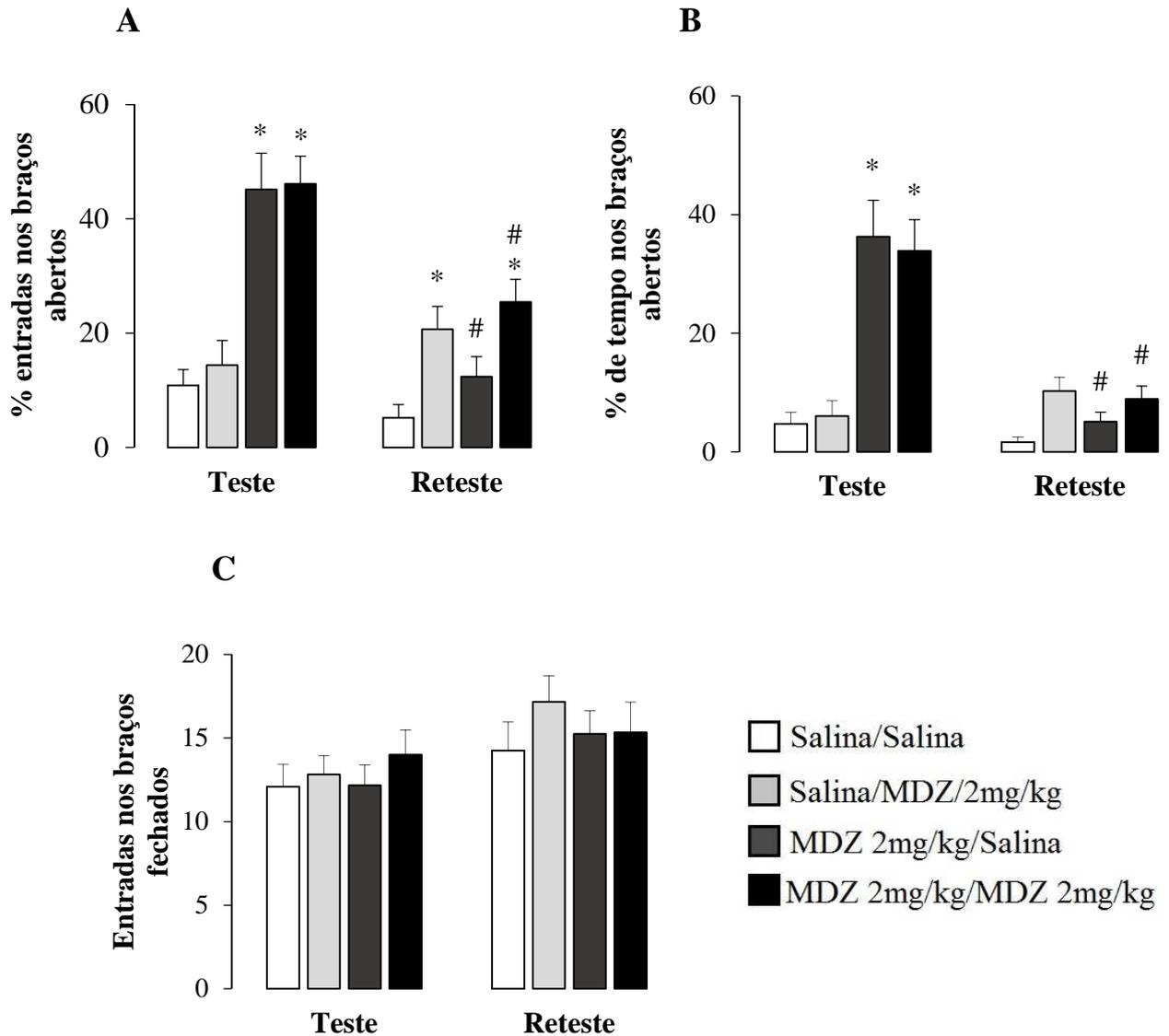
A ANOVA para medidas repetidas seguida pelo teste de Duncan demonstrou que o MDZ no período do teste aumentou a porcentagem de entradas nos braços abertos ( $F_{1,44} = 28,87$ ;  $p < 0,05$ ) e porcentagem de tempo nos braços abertos ( $F_{1,44} = 31,83$ ;  $p < 0,05$ ), sem alterar as entradas nos braços fechados ( $F_{1,44} = 0,07$ ;  $p > 0,05$ ), medida relacionada à atividade locomotora (Fig. 2). A ANOVA seguida pelo teste de Duncan também revelou que o MDZ diminuiu o total de SAP ( $F_{1,44} = 4,94$ ;  $p < 0,05$ ), a porcentagem de SAP protegido ( $F_{1,44} = 5,83$ ;  $p < 0,05$ ), porcentagem de mergulhos protegidos ( $F_{1,44} = 20,71$ ;  $p < 0,05$ ) e aumentou o total de mergulhos ( $F_{1,44} = 26,88$ ,  $p < 0,05$ ). Não foram observados efeitos significativos para a frequência de levantamentos ( $F_{1,44} = 0,93$ ;  $p > 0,05$ ) (Tabela 1).

As injeções de MDZ no reteste produziram aumento da porcentagem de entradas nos braços abertos ( $F_{1,44} = 5,78$ ,  $p < 0,05$ ), sem mudanças significativas na porcentagem de tempo nos braços abertos ( $F_{1,44} = 1,01$ ;  $p > 0,05$ ), total de SAP ( $F_{1,44} = 3,83$ ;  $p < 0,05$ ), porcentagem de SAP protegido ( $F_{1,44} = 0,49$ ,  $p > 0,05$ ), total de mergulhos ( $F_{1,44} = 0,31$ ;  $p > 0,05$ ), porcentagem de mergulhos protegidos ( $F_{1,44} = 0,59$ ;  $p > 0,05$ ), frequência de levantamentos ( $F_{1,44} = 0,08$ ;  $p > 0,05$ ).

Não houve interações significativas entre as administrações de MDZ no teste comparado ao reteste, em nenhum dos comportamentos observados [porcentagem de entradas nos braços abertos ( $F_{1,44} = 0,06$ ;  $p > 0,05$ ), porcentagem de tempo nos braços abertos ( $F_{1,44} = 0,67$ ;  $p > 0,05$ ), entradas nos braços fechados ( $F_{1,44} = 0,31$ ;  $p > 0,05$ ), total de SAP ( $F_{1,44} = 2,03$ ;  $p > 0,05$ ), porcentual de SAP protegido ( $F_{1,44} = 0,00$ ;  $p > 0,05$ ), total de mergulhos ( $F_{1,44} = 1,96$ ;  $p > 0,05$ ), porcentagem de mergulhos protegidos ( $F_{1,44} = 0,00$ ;  $p > 0,05$ ) e frequência de

levantamentos ( $F_{1,44} = 0,80$ ;  $p > 0,05$ ], embora o teste de Duncan tenha demonstrado uma diminuição no reteste do total de mergulhos e aumento na porcentagem de mergulhos protegidos em relação ao respectivo grupo no teste para o tratamento com salina.

Figura 7 – Efeitos das injeções combinadas de midazolam (MDZ 2mg/kg, i.p.) no período de teste e de midazolam (MDZ, 2mg/kg) no reteste (24h após), em camundongos submetidos ao protocolo de teste e reteste no labirinto em cruz elevado (LCE).



As barras representam as médias e o erro padrão da média ( $n = 12$ ). (A) % de entradas nos braços abertos; (B) % de tempo nos braços abertos; (C) entradas nos braços fechados; #  $p < 0,05$  em comparação com seu respectivo grupo no teste. \*  $p < 0,05$  em comparação com seu respectivo grupo salina. Ver Tabela 1 para dados complementares.

Tabela 1 – Efeitos das injeções combinadas de midazolam (MDZ 2mg/kg, i.p.) no período de teste e de midazolam (MDZ, 2mg/Kg) no reteste (24h após), em camundongos submetidos ao protocolo de teste e reteste no labirinto em cruz elevado (LCE).

Tratamento	Comportamentos									
	Total de SAP		% de SAP Protegido		Total de Mergulhos		% de Mergulhos Protegidos		Levantamentos (frequência)	
	Teste	Reteste	Teste	Reteste	Teste	Reteste	Teste	Reteste	Teste	Reteste
Salina/Salina	15.3 ± 1.5	10.4 ± 1.2#	89.7 ± 8.3	99.0 ± 1.0#	16.6 ± 2.8	6.3 ± 1.2#	90.7 ± 4.8	80.3 ± 9.5	14.0 ± 1.9	14.8 ± 2.8
Salina/MDZ 2	15.8 ± 1.6	8.0 ± 0.7#	92.7 ± 2.6	91.7 ± 3.2	15.8 ± 2.2	14.3 ± 1.8*	85.3 ± 6.6	74.6 ± 4.7	13.6 ± 2.4	17.2 ± 1.7
MDZ 2/Salina	9.5 ± 1.7*	13.8 ± 1.4*#	32.0 ± 10.9*	97.2 ± 1.3	27.7 ± 2.4*	15.9 ± 3.0*#	32.0 ± 10.9*	87.6 ± 3.9#	16.7 ± 2.3	18.3 ± 1.5
MDZ 2/MDZ 2	6.9 ± 1.0*	8.9 ± 1.0	39.4 ± 4.9*	88.2 ± 2.3	27.0 ± 1.2*	16.6 ± 2.4*#	39.4 ± 4.9*	70.1 ± 6.4#	16.8 ± 1.9	14.3 ± 1.6

Os dados representam a média e ± erro padrão da média (n = 12). \* p<0,05 em relação ao respectivo grupo salina. # p<0,05 em comparação ao respectivo grupo no teste.

## 4.2 Experimento 2: Efeitos do RU28318 microinjetado na região IL do CPFm, na fase de aquisição da memória, sobre a tolerância aos efeitos do MDZ (OTT), em camundongos expostos e reexpostos ao LCE

A Figura 8 e a Tabela 2 mostram os efeitos das injeções intra-CPFm na região IL de veículo ou RU28318 nas doses de 5 ou 10ng/0,1µL antes do teste, e de veículo ou MDZ na dose de 2mg/kg, i.p. antes do reteste em camundongos submetidos ao protocolo de teste e reteste no LCE.

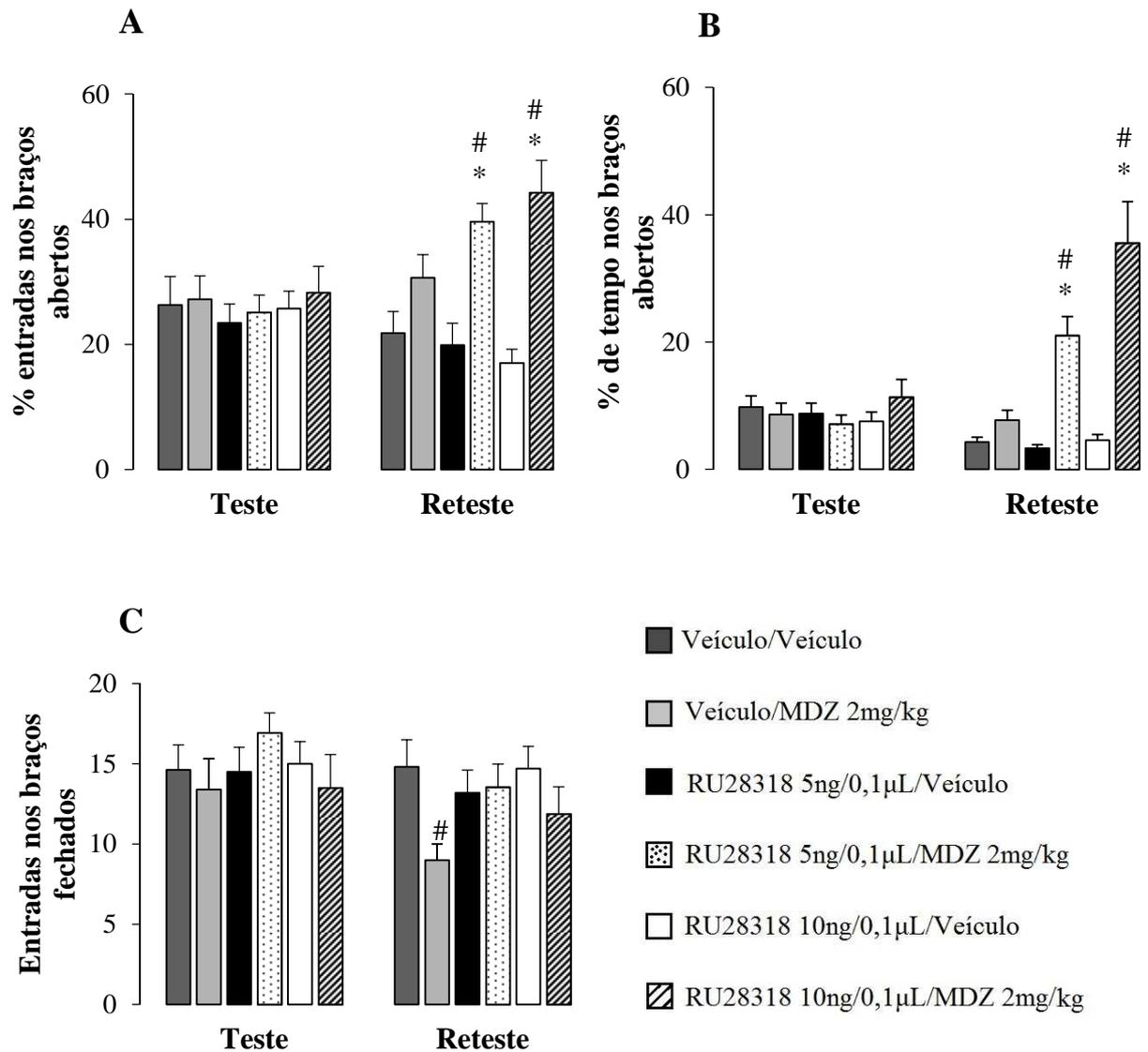
A ANOVA seguida pelo teste de Duncan não indicou diferenças no teste para nenhum dos comportamentos analisados [porcentagem de entradas nos braços abertos ( $F_{1,54} = 0,48$ ;  $p > 0,05$ ), porcentagem de tempo nos braços abertos ( $F_{1,54} = 2,77$ ,  $p > 0,05$ ), entradas nos braços fechados ( $F_{1,54} = 0,78$ ;  $p > 0,05$ ) medida relacionada à atividade locomotora, total de SAP ( $F_{1,54} = 1,63$ ;  $p > 0,05$ ), porcentagem de SAP protegido ( $F_{1,54} = 0,49$ ;  $p > 0,05$ ), total de mergulhos ( $F_{1,54} = 1,80$ ;  $p > 0,05$ ), porcentagem de mergulhos protegidos ( $F_{1,54} = 1,28$ ;  $p > 0,05$ ), e frequência de levantamentos ( $F_{1,54} = 0,03$ ;  $p > 0,05$ )]. A ANOVA seguida pelo teste de Duncan demonstrou que o tratamento com RU28318 na dose de 10ng/0,1µL antes do teste e MDZ anterior ao reteste aumentou a porcentagem de entradas nos braços abertos ( $F_{1,54} = 26,26$ ;  $p < 0,05$ ), a porcentagem de tempo nos braços abertos ( $F_{1,54} = 28,36$ ;  $p < 0,05$ ) e o total de mergulhos ( $F_{1,54} = 6,09$ ;  $p < 0,05$ ). Houve diminuição da porcentagem de SAP protegido ( $F_{1,54} = 21,75$ ;  $p < 0,05$ ) e da porcentagem de mergulhos protegidos ( $F_{1,54} = 7,00$ ;  $p < 0,05$ ), sem alterar [total de SAP ( $F_{1,54} = 1,19$ ;  $p > 0,05$ ), frequência de levantamentos ( $F_{1,54} = 0,17$ ;  $p > 0,05$ ) e entrada nos braços fechados ( $F_{1,54} = 1,83$ ;  $p > 0,05$ )].

Foi observado interação entre os tratamentos teste e reteste, onde a injeção sistêmica de MDZ no reteste aumentou a porcentagem de tempo nos braços abertos ( $F_{2,54} = 5,04$ ;  $p < 0,05$ ) em animais que foram tratados antes do teste com RU28318 tanto nas doses de 5 como 10ng/0,1µL, e não foi observado interação no que se refere à [porcentagem de entradas nos braços abertos ( $F_{2,54} = 2,12$ ;  $p > 0,05$ ), ao número de entradas nos braços fechados ( $F_{2,54} = 2,01$ ;  $p > 0,05$ ), ao total de SAP ( $F_{2,54} = 0,65$ ;  $p > 0,05$ ), porcentagem de SAP protegido ( $F_{2,54} = 2,00$ ;  $p > 0,05$ ), no total de mergulhos ( $F_{2,54} = 1,61$ ;  $p > 0,05$ ), na porcentagem de mergulhos protegidos ( $F_{2,54} = 1,42$ ;  $p > 0,05$ ), e no total de levantamentos ( $F_{2,54} = 1,51$ ;  $p > 0,05$ )].

Embora não tenha havido interação significativa entre o teste e o reteste para a porcentagem de SAP protegido, o teste de Duncan demonstrou uma diminuição desse comportamento para os grupos tratados com MDZ na dose de 2mg/kg, i.p. no reteste em

relação ao seu respectivo grupo no período do teste, que foram tratados com RU28318 nas doses de 5 e 10 ng/0,1 $\mu$ L) (Tabela 2).

Figura 8 – Efeitos das injeções combinadas de RU28318 (5 e 10ng/0,1 $\mu$ L, intra-CPFM na região infra-límbica) no período de teste (fase de aquisição da memória) e de midazolam (MDZ, 2mg/kg) intraperitoneal (i.p.) no reteste (24h após), em camundongos submetidos ao protocolo de teste e reteste no labirinto em cruz elevado (LCE).



As barras representam as médias e o erro padrão da média (n = 8-11). (A) % de entradas nos braços abertos; (B) % de tempo nos braços abertos; (C) entradas nos braços fechados. # p<0,05 em comparação com seu respectivo grupo teste. \* p<0,05 em comparação ao seu respectivo grupo veículo. Ver Tabela 2 para dados complementares.

Tabela 2 – Efeitos das injeções combinadas de RU28318 (5 e 10ng/0,1μL) infundido na região infra-límbica (IL) do córtex pré-frontal medial (CPFm) no período de teste sobre a fase de aquisição da memória, e de midazolam (MDZ, 2mg/kg) injetado intraperitonealmente (i.p.) no reteste, em camundongos submetidos ao teste e reteste no labirinto em cruz elevado (LCE).

Tratamento	Comportamentos									
	Total de SAP		% de SAP Protegido		Total de Mergulhos		% de Mergulhos Protegidos		Levantamentos (frequência)	
	Teste	Reteste	Teste	Reteste	Teste	Reteste	Teste	Reteste	Teste	Reteste
Veículo/Veículo	15,5 ± 2,0	14,2 ± 2,7	84,1 ± 4,7	98,4 ± 1,1	13,2 ± 2,1	9,8 ± 1,8	60,0 ± 5,6	77,1 ± 4,1	18,4 ± 3,5	15,8 ± 2,9
Veículo/MDZ 2	14,2 ± 2,4	10,4 ± 2,5	88,4 ± 3,2	83,9 ± 7,6	13,9 ± 2,5	9,6 ± 1,9	67,8 ± 5,9	67,4 ± 7,7	13,4 ± 2,2	11,2 ± 2,8
RU 5/ Veículo	17,5 ± 1,4	14,7 ± 1,7	92,7 ± 3,1	96,9 ± 1,8	15,4 ± 2,7	8,0 ± 1,0	67,5 ± 6,7	91,3 ± 4,7	14,7 ± 2,5	12,0 ± 1,8
RU 5/MDZ 2	20,5 ± 2,6	13,2 ± 2,2#	91,1 ± 2,8	64,8 ± 6,7*#	18,0 ± 2,9	19,3 ± 3,4*	90,2 ± 3,6*	43,5 ± 4,4*#	18,6 ± 3,2	15,0 ± 3,3
RU 10/Veículo	16,7 ± 2,2	13,7 ± 2,4	91,2 ± 2,9	95,4 ± 2,0	13,4 ± 2,6	8,9 ± 1,7	73,0 ± 4,3	74,0 ± 9,5	13,4 ± 2,3	16,7 ± 2,4
RU 10/MDZ 2	14,3 ± 3,4	9,5 ± 1,4	90,9 ± 4,8	64,9 ± 8,6*#	15,3 ± 2,6	17,9 ± 1,9*	80,4 ± 4,6*	41,4 ± 7,2*#	16,6 ± 2,4	11,1 ± 2,4

Os dados representam a média ± erro padrão da média (n = 8-11). \* P <0,05 em relação ao respectivo grupo veículo. # P <0,05 em comparação ao respectivo grupo no teste.

### **4.3 Experimento 3: Efeitos do RU28318 microinjetado na região IL do CPFm, na fase de consolidação da memória, sobre tolerância aos efeitos do MDZ (OTT), em camundongos expostos e reexpostos ao LCE**

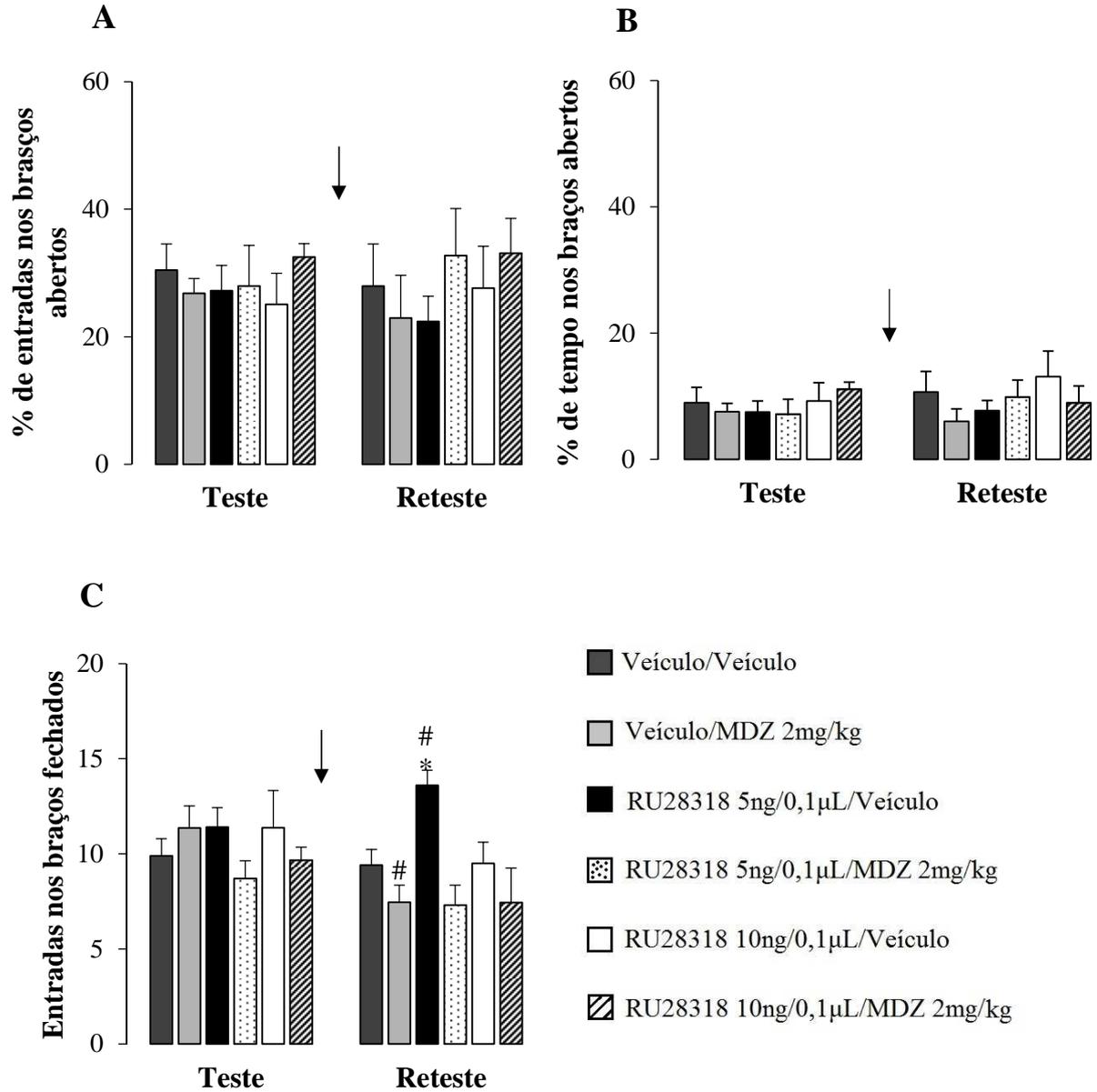
A Figura 9 e a Tabela 3 mostram os efeitos da injeção intra-CPFm de veículo ou RU28318 nas doses de 5 ou 10ng/0,1µL logo após o teste e veículo ou MDZ nas doses de 2mg/kg, i.p. antes do reteste em camundongos submetidos ao protocolo de teste e reteste no LCE.

A ANOVA seguida pelo teste de Duncan não indicou diferenças no teste para nenhum dos comportamentos analisados [porcentagem de entradas nos braços abertos ( $F_{2,52} = 0,17$ ;  $p > 0,05$ ), porcentagem de tempo nos braços abertos ( $F_{2,52} = 1,03$ ;  $p > 0,05$ ), entradas nos braços fechados ( $F_{2,52} = 0,45$ ;  $p > 0,05$ ) medida relacionada à atividade locomotora, total de SAP ( $F_{2,52} = 1,51$ ;  $p > 0,05$ ), porcentagem de SAP protegido ( $F_{2,52} = 0,77$ ;  $p > 0,05$ ), total de mergulhos ( $F_{2,52} = 2,04$ ;  $p > 0,05$ ), porcentagem de mergulhos protegidos ( $F_{2,52} = 0,95$ ;  $p > 0,05$ )] exceto para o total de levantamentos ( $F_{2,52} = 5,04$ ;  $p < 0,05$ ), no qual o RU28318 nas doses de 5 e 10ng/0,1µL diminuíram esse comportamento.

A ANOVA seguida pelo teste de Duncan demonstrou que a injeção intra-CPFm de RU28318 nas doses de 5 e 10ng/0,1µL logo após o teste, e posteriormente, de MDZ antes do reteste aumentou as entradas nos braços fechados ( $F_{1,52} = 9,01$ ;  $p < 0,05$ ), não sendo observadas diferenças para os outros comportamentos analisados [porcentagem de entradas nos braços abertos ( $F_{1,52} = 0,49$ ;  $p > 0,05$ ), porcentagem de tempo nos braços abertos ( $F_{1,52} = 0,48$ ;  $p > 0,05$ ), total de SAP ( $F_{1,52} = 3,64$ ;  $p > 0,05$ ), porcentagem de SAP protegido ( $F_{1,52} = 0,52$ ;  $p > 0,05$ ), total de mergulhos ( $F_{1,52} = 1,87$ ;  $p > 0,05$ ), porcentagem de mergulhos protegidos ( $F_{1,52} = 0,45$ ;  $p > 0,05$ ) e total de levantamentos ( $F_{1,52} = 0,91$ ;  $p > 0,05$ )].

Foi observado interação entre o período de teste e reteste, em que o MDZ sistêmico no reteste aumentou o total de mergulhos ( $F_{2,52} = 4,01$ ;  $p < 0,05$ ) em animais que previamente foram administrados intra-CPFm com RU28318 nas doses de 5 e 10 ng/0,1µL logo após o teste. Não foi observado interação para os demais comportamentos [porcentagem de entradas nos braços abertos ( $F_{2,52} = 0,92$ ;  $p > 0,05$ ), porcentagem de tempo nos braços abertos ( $F_{2,52} = 0,56$ ;  $p > 0,05$ ), entradas nos braços fechados ( $F_{2,52} = 3,02$ ;  $p > 0,05$ ), total de SAP ( $F_{2,52} = 0,51$ ;  $p > 0,05$ ), porcentagem de SAP protegido ( $F_{2,52} = 1,15$ ;  $p > 0,05$ ), porcentagem de mergulhos protegidos ( $F_{2,52} = 0,27$ ;  $p > 0,05$ ), total de levantamentos ( $F_{2,52} = 0,26$ ;  $p > 0,05$ )].

Figura 9 – Efeitos das injeções combinadas de RU28318 (5 e 10ng/0,1 $\mu$ L, intra-CPFm na região infra-límbica) no período após 5 minutos do teste (fase de consolidação da memória) e de midazolam (MDZ, 2mg/kg) intraperitoneal (i.p.) no reteste (24h após), em camundongos submetidos ao teste e reteste no labirinto em cruz elevado (LCE).



As barras representam as médias e o erro padrão da média (9-11) e as setas verticais indicam o tratamento logo após a sessão de teste. (A) % de entradas nos braços abertos; (B) % de tempo nos braços abertos; (C) entradas nos braços fechados. #  $p < 0,05$  em comparação com seu respectivo grupo teste. \*  $p < 0,05$  em comparação ao seu respectivo grupo veículo. Ver Tabela 2 para dados complementares.

Tabela 3 – Efeitos das injeções combinadas de RU28318 (5 e 10ng/0,1μL) infundido na região infra-límbica (IL) do córtex pré-frontal medial (CPFm), no período de 5 minutos após o teste, sobre a fase de consolidação da memória, e de midazolam (MDZ, 2mg/kg) injetado intraperitonealmente (i.p.) no reteste, em camundongos submetidos ao teste e reteste no labirinto em cruz elevado (LCE).

Tratamento	Comportamentos									
	Total de SAP		% de SAP Protegido		Total de Mergulhos		% de Mergulhos Protegidos		Levantamentos (frequência)	
	Teste	Reteste	Teste	Reteste	Teste	Reteste	Teste	Reteste	Teste	Reteste
Veículo/Veículo	10,7 ± 1,4	7,3 ± 1,0#	89,5 ± 2,6	80,3 ± 9,4	14,9 ± 1,0	10,1 ± 1,7#	85,1 ± 4,6	83,1 ± 5,5	7,3 ± 2,4	9,3 ± 1,9
Veículo/MDZ 2	9,6 ± 1,1	4,0 ± 0,8*#	88,0 ± 3,8	82,2 ± 10,1	16,8 ± 1,8	7,2 ± 1,4#	86,4 ± 2,6	82,9 ± 7,4	9,1 ± 1,7	3,7 ± 0,7*#
RU 5/ Veículo	9,0 ± 1,2	5,5 ± 0,9*	84,2 ± 6,9	94,6 ± 3,6	15,2 ± 1,8	9,9 ± 1,0#	82,6 ± 2,9	81,0 ± 5,5	4,6 ± 1,1	7,2 ± 1,4
RU 5/MDZ 2	8,6 ± 0,7	3,6 ± 0,6*#	94,6 ± 3,3	90,0 ± 10,0	10,6 ± 1,2*	4,1 ± 1,2*	87,5 ± 4,0	62,0 ± 12,7*#	7,8 ± 1,8	3,5 ± 0,9*
RU 10/Veículo	10,2 ± 0,5	5,8 ± 1,0#	93,4 ± 3,1	97,22 ± 2,7	11,0 ± 1,6	8,7 ± 2,3	84,1 ± 5,0	74,1 ± 12,5	3,1 ± 0,9	4,7 ± 1,9
RU 10/MDZ 2	11,3 ± 1,1	3,7 ± 1,0*#	77,7 ± 9,9	88,8 ± 11,1	17,3 ± 0,8#	5,5 ± 1,9*	73,5 ± 9,4	80,2 ± 8,6*#	3,7 ± 1,6	2,7 ± 0,7*

Os dados representam a média ± erro padrão da média (n = 9-11). \* p<0,05 em relação ao respectivo grupo veículo. # p<0,05 em comparação ao respectivo grupo no teste.

## **5. DISCUSSÃO**

---

Este estudo demonstrou que a injeção sistêmica de MDZ no teste produziu efeito ansiolítico, caracterizado pelo aumento da exploração nos braços abertos e redução dos comportamentos de avaliação de risco, sem afetar a atividade locomotora. No entanto, o efeito ansiolítico foi diminuído nos camundongos submetidos ao reteste, confirmando a OTT. Os resultados também mostraram que a injeção de RU28318 na região IL do CPFm na fase de aquisição (5 minutos antes do teste no LCE), mas não na consolidação da memória restabeleceu o efeito ansiolítico do MDZ administrado no reteste.

Os dados obtidos no Experimento 1, reforçam estudos que demonstram a alteração do conflito esquiva/aproximação gerado pelo MDZ, o qual reduz a esquiva, de modo que o aumento seletivo na exploração do ambiente aberto é uma indicação do efeito tipo ansiolítico (CRUZ et al., 1994). Além disso, o aumento de entradas nos braços abertos e diminuição da porcentagem de SAP protegido após a administração sistêmica de MDZ, corroboram achados anteriores que demonstraram uma diminuição da avaliação de risco e o aumento da atividade exploratória após a administração sistêmica de agonistas BDZ (BERTOGLIO; CAROBREZ, 2000; CRUZ-MORALES; SANTOS; BRANDAO, 2002).

Os resultados reforçam a sensibilidade do LCE na triagem de fármacos ansiolíticos em animais ingênuos (DALVI; RODGERS, 1996; RODGERS; LEE; SHEPHERD, 1992), bem como, a observação da atenuação dos efeitos ansiolíticos dos BDZ em animais ao LCE em protocolo de teste e reteste (BERTOGLIO; CAROBREZ, 2004; FILE et al., 1990; GAZARINI et al., 2011). Estudos têm demonstrado o envolvimento de fármacos agonistas GABAérgicos na OTT, os quais, por meio da transmissão via receptor GABA/benzodiazepínico estariam envolvidos com tal fenômeno. Por exemplo, a injeção de MDZ (3 e 30 nmol) na matéria cinzenta periaquedutal, produz efeito ansiolítico em camundongos avaliados no LCE, sendo esse efeito abolido durante o reteste, caracterizando o fenômeno de OTT (DOS REIS; CANTO-DE-SOUZA, 2008). Considerando que estruturas como o CPFm e matéria cinzenta periaquedutal estão envolvidas em respostas emocionais e aprendizagem aversiva, é possível que alterações em neurônios que possuem receptores GABAérgicos após a primeira experiência no LCE, contribuam para a OTT. No entanto, as injeções intra-complexo amigdaloide de MDZ, atenuaram o comportamento de ansiedade em camundongos expostos ao teste e reteste no LCE, sugerindo que os receptores GABA-BDZ dessa estrutura não modulam o fenômeno de OTT (BARBALHO et al., 2009).

Diversos estudos mostram as características aversivas do LCE, como indução à analgesia e aumento da condutância da pele (LEE; RODGERS, 1990; SUER et al., 1998), bem como um aumento da liberação de hormônios corticosteroides (FILE et al., 1994;

RODGERS et al., 1999). Esses hormônios por sua vez, parecem desempenhar um papel chave nas mudanças comportamentais em futuras reexposições ao LCE (ALBRECHET-SOUZA et al., 2007; GAZARINI et al., 2011), onde evidências apontam para a interferência de processos mnemônicos na OTT (CALZAVARA et al., 2005; STERN et al., 2008).

Resultados do nosso grupo não publicados indicam que à administração antes do teste, mas não após, de espirolactona (antagonista MR) sistêmica (i.p.) reverteu a tolerância aos efeitos ansiolíticos do MDZ no LCE, sugerindo um papel para os MR na aquisição da resposta emocional aversiva ao LCE (CACHUTE; SOUZA; CANTO-DE-SOUZA, 2014). Outro resultado importante sobre as ações dos MR é que esses receptores são um dos pré-requisitos para a manutenção do fluxo de informação durante o estresse (DE KLOET et al., 1998). Levando em consideração os resultados descritos acima, nosso estudo demonstrou que houve ou ocorreu interação entre o tratamento com RU28318 na sessão de teste com o tratamento com MDZ na a sessão de reteste. As injeções de RU28318 antes do teste na região IL do CPFm restabeleceu o efeito ansiolítico do MDZ administrado antes do reteste. Este efeito foi caracterizado pelo aumento da porcentagem de tempo gasto nos braços abertos. Também foi observado que RU28318 infundido após o período de teste não alterou o fenômeno de OTT para o MDZ.

Alguns aspectos relacionados às vias neurais e às funções desempenhadas por memória, são compartilhados (GRAY; MCNAUGHTON, 2000; LEDOUX, 2000). Desta forma, situações aversivas podem influenciar a aquisição e consolidação das memórias, e alguns estados de ansiedade estão associados à aprendizagem aversiva gerada por uma situação estressante (JOELS et al., 2006). Essas memórias emocionais permitem tanto a antecipação como a expectativa de eventos, permitindo a expressão de comportamentos apropriados diante de uma situação similar no futuro (DUDAI, 2009; MCNAUGHTON; CORR, 2004). As evidências indicam que a formação de uma memória no período de teste no LCE estaria associada com as alterações observadas em futura reexposição ao aparato (DALCOL et al., 2003; RODGERS et al., 1996; STERN et al., 2008). Estas observações são apoiadas por estudos nos quais a administração de fármacos que facilitam a aprendizagem, tais como anfetaminas ou pentilenotetrazol, proporcionou efeitos aumentados de OTT (VARGAS; DA CUNHA; ANDREATINI, 2006). No entanto, fármacos que produzem amnésia, como o clordiazepóxido e a escopolamina, ou ainda que interfiram com a transmissão sináptica, bloqueando-a, como a lidocaína, podem prejudicar o aprendizado impedindo o aparecimento do fenômeno (BERTOGLIO; CAROBREZ, 2004; FILE et al., 1990).

Os hormônios do estresse possuem funções periféricas como mobilização das reservas de energia, aumento transitório da capacidade imunológica e inibição de processos como reprodução e crescimento (GOMEZ-SANCHEZ; GOMEZ-SANCHEZ, 2014; RODRIGUES; LEDOUX; SAPOLSKY, 2009; ULRICH-LAI; HERMAN, 2009) e centrais (DE KLOET et al., 1998), sendo liberados antes de uma situação estressante, agem no processo de aprendizagem facilitando a aquisição e consolidação de memórias aversivas (JOELS et al., 2006). ALBRECHET-SOUZA et al. (2007), observaram um aumento no comportamento de avaliação de riscos em camundongos expostos e reexposição ao LCE, além de um aumento nos níveis de corticosterona em ambos os momentos, o que demonstra uma relação entre o aumento dos níveis deste hormônio e a expressão de certos comportamentos.

Os corticosteroides possuem múltiplos efeitos, conflitantes diversas vezes em relação a sua atuação na memória (LUPIEN; MCEWEN, 1997). A capacidade mnemônica parece sofrer influência da ação ordenada desses hormônios, de maneira a prejudicar ou facilitar a aquisição, consolidação ou recuperação de memórias considerando seu padrão temporal, a relação entre a saturação dos seus receptores e também as estruturas cerebrais onde esses hormônios estariam agindo (DE KLOET et al., 2005; DE KLOET et al., 1998; JOELS et al., 2006). Além disso, os corticosteroides parecem não influenciar a recuperação de memórias na fase de evocação em situações que não possuam caráter emocional, salientando a importância do estresse no gerenciamento das memórias aversivas (KUHLMANN; WOLF, 2006).

Inicialmente, todas as áreas do cérebro são expostas a esse hormônio; no entanto, seus receptores estão localizados em regiões específicas. Os GR estão presentes em quase todas as regiões do encéfalo, enquanto os MR estão mais localizados em neurônios do HPC, septo lateral, CA, “locus coeruleus”, PVN e CPFm (DE KLOET et al., 2005; DE KLOET et al., 1998). Os receptores MR estão relacionados a formação de memórias, sendo observado o papel destes receptores em aspectos do aprendizado espacial e emocional. A ativação ou bloqueio dessas regiões são capazes de mudar o comportamento relacionado à atividade exploratória e avaliação de risco, bem como para entradas e tempo gastos nos braços abertos no LCE (BARBALHO et al., 2009; BERTOGLIO et al., 2005; FILE; GONZALEZ, 1996).

O comportamento de avaliação de risco expressa um padrão complexo que se relaciona com a tomada de decisão em lidar com determinado evento, e tem sido associado à ansiedade (CRUZ et al., 1994; SHEPHERD et al., 1994). Em nossos resultados, o antagonismo dos receptores MR do CPFm, produziu aumento na porcentagem de mergulhos

protegidos em animais expostos ao LCE e ausência de efeitos para total de SAP, porcentagem de SAP protegido, total de mergulhos e levantamentos (frequência). Neste contexto, a avaliação da ação desses hormônios em ratos com uma única exposição ao LCE, demonstraram que a administração de metirapone (i.p.), um bloqueador de síntese de corticosterona, aumentou total de SAP, mas não alterou o SAP protegido, total de mergulhos, mergulhos protegidos e total de levantamentos, já o aumento dos níveis plasmáticos de corticosterona induziu um aumento no total de SAP e SAP protegido (MIKICS et al., 2005). HLAVACOVA; JEZOVA (2008) observaram que ratos tratados cronicamente com aldosterona, um ligando endógeno de MR, aumentaram significativamente o total de SAP e SAP protegido e diminuíram o total de mergulhos, mas não foi capaz de alterar o total de levantamentos.

É visto que o estresse agudo pode elevar os níveis de hormônios esteróides dentre eles os corticosteróides e os neuroesteróides (BARBACCIA; ROSCETTI; BOLACCHI; et al., 1996; BARBACCIA; ROSCETTI; TRABUCCHI; et al., 1996; MAJEWSKA; BISSERBE; ESKAY, 1985), outros estudos sugerem que após o estresse ocorrem alterações na expressão de receptores GABA<sub>A</sub> (SKILBECK; JOHNSTON; HINTON, 2010). Os esteróides neuroativos podem regular esses receptores (BELELLI et al., 2009; GUNN et al., 2011; MAGUIRE; MODY, 2009) alterando a expressão de suas subunidades (FOLLESA et al., 2004; SHEN et al., 2005), além da expressão da enzima glutamato descarboxilase (GAD) essencial para o síntese do neurotransmissor GABA (HAPPOLA et al., 1987), mesmo em períodos de curta exposição ao estresse, uma vez que, os esteróides neuroativos ficam retidos na célula formando uma reserva capaz de modular o sistema GABAérgico após um longo tempo a partir da sua exposição inicial (BELELLI; HERD, 2003). Essa modulação de receptores GABAérgicos poderia ocorrer ao longo do período de 24 horas entre o teste e o reteste, contribuindo para o fenômeno de OTT. O antagonismo de MR na região IL do CPFm parece interferir na fase de aquisição da memória, mas não na consolidação. Sugerindo que o bloqueio desses receptores na região do IL pode impedir a aquisição, mas não a consolidação, apropriada da informação durante o teste no LCE. Os mecanismos envolvidos nas alterações dos receptores GABA<sub>A</sub> no estresse ainda não estão totalmente claros, mas as mudanças geradas sobre esses receptores após o estresse podem variar, destacando principalmente o teste utilizado e o laboratório onde os experimentos ocorreram (MODY; MAGUIRE, 2011).

Estando envolvido em funções como memória, aprendizado e tomada de decisão (GHASHGHAIEI et al., 2007; MILAD; QUIRK, 2002), o CPFm desempenha papel

essencial na modulação da resposta neuroendócrina ao estresse (JONES et al., 2011). E tem sido associado a funções na ansiedade (WALL; FLINN; MESSIER, 2001; WALL; MESSIER, 2000b). Um breve período de estresse é capaz de afetar a plasticidade sináptica dos neurônios nesta região. Coletivamente, esses achados demonstram as alterações morfológicas e fisiológicas dos neurônios do CPFm em resposta ao estresse (CERQUEIRA et al., 2007; DUPIN et al., 2006; ROCHER et al., 2004). Alguns estudos demonstraram que lesões eletrolíticas da região IL diminuem o comportamento de ansiedade no LCE (LACROIX et al., 2000; SHAH; TREIT, 2003). BI et al. (2013) observaram que a administração de bicuculina, um inibidor seletivo de receptores GABA<sub>A</sub> na região IL, promoveu comportamentos de tipo ansiogênico, enquanto que a inativação de receptores glutamatérgicos, como ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico (AMPA) diminuiu a ansiedade, mas a inativação dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) não teve efeito. VIDAL-GONZALEZ et al. (2006) mostraram que a estimulação de PrL causou maior medo contextual e diminuição da extinção da memória aversiva, enquanto a estimulação de IL promoveu efeitos antagônicos. Como já dito, além da modulação em estados comportamentais, o CPFm desempenha um papel importante na resposta neuroendócrina induzida pelo estresse emocional, onde a região PrL parece estar responsável por bloquear a ativação do eixo HPA, enquanto a região IL desempenha um papel de ativação. Estes dados corroboram a hipótese de que IL é uma região que participa na modulação da ansiedade em roedores (LACROIX et al., 2000; WALL; MESSIER, 2000a;2000b). WALL; MESSIER (2000b) e sugerem que esta região seria uma área do cérebro capaz de processar a informação convergente a partir de vários locais envolvidos na mediação de ambos os processos, memória e ansiedade.

O antagonismo dos receptores MR em nosso estudo não produziu um efeito ansiolítico na primeira exposição, sugerindo que as doses utilizadas não alteraram as respostas de defesa nesse período. KORTE et al. (1995), demonstraram que a injeção intracerebroventricular de RU28318 na dose de 50ng/2,0 $\mu$ L produziu um efeito ansiolítico em ratos expostos ao LCE, estes animais haviam anteriormente sido submetidos a condições aversivas contextuais. No entanto, os animais que não receberam choques não exibiram alterações comportamentais após a administração do antagonista de MR. Isto sugere que o papel destes receptores não estaria associado à efeitos ansiolíticos de modo geral, como observado para os benzodiazepínicos, mas teria ações semelhantes quando a ansiedade do animal estivesse aumentada como resultado da exposição ao contexto estressor.

Também é possível ressaltar que as respostas relacionadas ao estresse são formadas, de modo geral, pela ação dos corticosteroides em conjunto com seus dois receptores, MR e GR. A relação entre a ocupação desses receptores influencia diretamente as ações futuras e a manutenção das respostas de defesa do animal. O equilíbrio nas respostas geradas por MR e GR, são uma das constantes importantes para o controle homeostático do corpo (DE KLOET et al., 1997; JOELS; DE KLOET, 1994). Enquanto os MRs estão associados a manutenção das respostas de estresse, os GRs (em conjunto com MRs) medeiam a recuperação desse estado. Por exemplo, níveis cronicamente muito baixos ou demasiadamente elevados de hormônios corticosteroides em neurônios do hipocampo durante o estresse, causam desequilíbrio na ocupação de seus receptores e podem prejudicar o processamento da informação e aumentar a vulnerabilidade desses neurônios. O equilíbrio nas ações mediadas pelos dois receptores nesses neurônios parece ser crítico para a excitabilidade neuronal, responsividade ao estresse e adaptação comportamental (DE KLOET et al., 1998). Nesse mesmo sentido, o uso de antagonistas seletivos demonstrou um prejuízo na memória espacial e em tarefas de evitação para o bloqueio de GR, após o período de aprendizagem (DE KLOET et al., 1988; OITZL; DE KLOET, 1992; ROOZENDAAL; PORTILLO-MARQUEZ; MCGAUGH, 1996; SANDI; ROSE, 1994) e, para os MR, um prejuízo na regulação entre a integração sensorial após a avaliação da informação ambiental e do ajuste comportamental futuro (OITZL; DE KLOET, 1992; OITZL; FLUTTERT; DE KLOET, 1994; OITZL; JOSEPHY; SPRUIJT, 1993; SANDI; ROSE, 1994).

## **6. CONCLUSÃO**

---

Em conclusão, este estudo apóia o entendimento da interação entre hormônios do estresse e da formação de memórias aversivas durante a primeira exposição de animais ao LCE, bem como demonstra que os receptores MR desempenham um papel na manutenção de respostas defensivas relacionadas a situações aversivas. Além disso, os dados sugerem que o antagonismo destes receptores na região infralímbica do CPFm é capaz de diminuir os efeitos da OTT em camundongos quando administrado na fase de aquisição, mas não na fase de consolidação da memória.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

ABEL, T.; LATTAL, K. M. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. **Curr Opin Neurobiol**, v. 11, n. 2, p. 180-7, Apr 2001.

ALBRECHET-SOUZA, L.; BORELLI, K. G.; BRANDAO, M. L. Activity of the medial prefrontal cortex and amygdala underlies one-trial tolerance of rats in the elevated plus-maze. **J Neurosci Methods**, v. 169, n. 1, p. 109-18, Mar 30 2008.

ALBRECHET-SOUZA, L. et al. Increases in plasma corticosterone and stretched-attend postures in rats naive and previously exposed to the elevated plus-maze are sensitive to the anxiolytic-like effects of midazolam. **Horm Behav**, v. 52, n. 2, p. 267-73, Aug 2007.

ALLGULANDER, C. History and current status of sedative-hypnotic drug use and abuse. **Acta Psychiatr Scand**, v. 73, n. 5, p. 465-78, May 1986.

BALON, R. Benzodiazepines revisited. **Psychother Psychosom**, v. 82, n. 6, p. 353-4, 2013.

BANNERMAN, D. M. et al. Regional dissociations within the hippocampus--memory and anxiety. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 28, n. 3, p. 273-83, May 2004.

BARBACCIA, M. L. et al. Stress-induced increase in brain neuroactive steroids: antagonism by abecarnil. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 54, n. 1, p. 205-10, May 1996.

BARBACCIA, M. L. et al. Time-dependent changes in rat brain neuroactive steroid concentrations and GABAA receptor function after acute stress. **Neuroendocrinology**, v. 63, n. 2, p. 166-72, Feb 1996.

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, Apr 24 2009.

BATESON, A. N. Basic pharmacologic mechanisms involved in benzodiazepine tolerance and withdrawal. **Curr Pharm Des**, v. 8, n. 1, p. 5-21, 2002.

BAXTER, A. J. et al. The global burden of anxiety disorders in 2010. **Psychol Med**, v. 44, n. 11, p. 2363-74, Aug 2014.

BEHBEHANI, M. M. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. **Prog Neurobiol**, v. 46, n. 6, p. 575-605, Aug 1995.

BELELLI, D. et al. Extrasynaptic GABAA receptors: form, pharmacology, and function. **J Neurosci**, v. 29, n. 41, p. 12757-63, Oct 14 2009.

BELELLI, D.; HERD, M. B. The contraceptive agent Provera enhances GABA(A) receptor-mediated inhibitory neurotransmission in the rat hippocampus: evidence for endogenous neurosteroids? **J Neurosci**, v. 23, n. 31, p. 10013-20, Nov 05 2003.

BERNAERTS, P.; LAMBERTY, Y.; TIRELLI, E. Histamine H3 antagonist thioperamide dose-dependently enhances memory consolidation and reverses amnesia induced by

dizocilpine or scopolamine in a one-trial inhibitory avoidance task in mice. **Behav Brain Res**, v. 154, n. 1, p. 211-9, Sep 23 2004.

BERTOGLIO, L. J. et al. Enhanced dorsolateral periaqueductal gray activity counteracts the anxiolytic response to midazolam on the elevated plus-maze Trial 2 in rats. **Behav Brain Res**, v. 162, n. 1, p. 99-107, Jul 01 2005.

BERTOGLIO, L. J.; CAROBREZ, A. P. Previous maze experience required to increase open arms avoidance in rats submitted to the elevated plus-maze model of anxiety. **Behav Brain Res**, v. 108, n. 2, p. 197-203, Mar 2000.

BERTOGLIO, L. J.; CAROBREZ, A. P. Anxiolytic effects of ethanol and phenobarbital are abolished in test-experienced rats submitted to the elevated plus maze. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 73, n. 4, p. 963-9, Nov 2002a.

BERTOGLIO, L. J.; CAROBREZ, A. P. Prior maze experience required to alter midazolam effects in rats submitted to the elevated plus-maze. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 72, n. 1-2, p. 449-55, May 2002b.

BERTOGLIO, L. J.; CAROBREZ, A. P. Anxiolytic-like effects of NMDA/glycine-B receptor ligands are abolished during the elevated plus-maze trial 2 in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 170, n. 4, p. 335-42, Dec 2003.

BERTOGLIO, L. J.; CAROBREZ, A. P. Scopolamine given pre-Trial 1 prevents the one-trial tolerance phenomenon in the elevated plus-maze Trial 2. **Behav Pharmacol**, v. 15, n. 1, p. 45-54, Feb 2004.

BI, L. L. et al. Enhanced excitability in the infralimbic cortex produces anxiety-like behaviors. **Neuropharmacology**, v. 72, p. 148-56, Sep 2013.

BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J.; RODGERS, R. J. Pharmacological and neural control of anti-predator defense in the rat. **Aggress Behav**, v. 16, p. 165-176, 1990.

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, May 2001.

BRANDAO, M. L. et al. [Neural organization of different types of fear: implications for the understanding of anxiety]. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 25 Suppl 2, p. 36-41, Dec 2003.

BREUNER, C. W.; ORCHINIK, M. Plasma binding proteins as mediators of corticosteroid action in vertebrates. **J Endocrinol**, v. 175, n. 1, p. 99-112, Oct 2002.

CACHUTE, C. N.; SOUZA, R. R.; CANTO-DE-SOUZA, A. **Bloqueio dos receptores mineralocorticóides prejudica a aquisição da tolerância aos efeitos ansiolíticos do midazolam em camundongos expostos ao reteste no labirinto em cruz elevado. 22º Congresso de Iniciação Científica 2014 e 7º Congresso de Desenvolvimento Tecnológico e Inovação.** São Carlos: Gráfica UFSCar 2014.

CALZAVARA, M. B. et al. Role of learning of open arm avoidance in the phenomenon of one-trial tolerance to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in mice. **Life Sci**, v. 76, n. 19, p. 2235-46, Mar 25 2005.

CAMMAROTA, M. et al. B-50/GAP-43 phosphorylation and PKC activity are increased in rat hippocampal synaptosomal membranes after an inhibitory avoidance training. **Neurochem Res**, v. 22, n. 4, p. 499-505, Apr 1997.

CAMPAGNA-SLATER, V.; WEAVER, D. F. Molecular modelling of the GABAA ion channel protein. **J Mol Graph Model**, v. 25, n. 5, p. 721-30, Jan 2007.

CANTO-DE-SOUZA, A.; NUNES-DE-SOUZA, R. L.; RODGERS, R. J. Anxiolytic-like effect of way-100635 microinfusions into the median (but not dorsal) raphe nucleus in mice exposed to the plus-maze: influence of prior test experience. **Brain Res**, v. 928, n. 1-2, p. 50-9, Feb 22 2002.

CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 29, n. 8, p. 1193-205, 2005.

CAROLA, V. et al. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. **Behav Brain Res**, v. 134, n. 1-2, p. 49-57, Aug 21 2002.

CARVALHO, M. C. et al. Changes in the biogenic amine content of the prefrontal cortex, amygdala, dorsal hippocampus, and nucleus accumbens of rats submitted to single and repeated sessions of the elevated plus-maze test. **Braz J Med Biol Res**, v. 38, n. 12, p. 1857-66, Dec 2005.

CERQUEIRA, J. J. et al. Specific configuration of dendritic degeneration in pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex induced by differing corticosteroid regimens. **Cereb Cortex**, v. 17, n. 9, p. 1998-2006, Sep 2007.

COMER, J. S. et al. Health-related quality of life across the anxiety disorders: results from the national epidemiologic survey on alcohol and related conditions (NESARC). **J Clin Psychiatry**, v. 72, n. 1, p. 43-50, Jan 2011.

CRUZ-MORALES, S. E.; SANTOS, N. R.; BRANDAO, M. L. One-trial tolerance to midazolam is due to enhancement of fear and reduction of anxiolytic-sensitive behaviors in the elevated plus-maze retest in the rat. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 72, n. 4, p. 973-8, Jul 2002.

CRUZ, A. P.; FREI, F.; GRAEFF, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 49, n. 1, p. 171-6, Sep 1994.

CURRAN, H. V.; MINTZER, M. Z. Psychopharmacology of memory. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 188, n. 4, p. 393-6, Nov 2006.

- DA SILVA, W. C. et al. Histamine enhances inhibitory avoidance memory consolidation through a H2 receptor-dependent mechanism. **Neurobiol Learn Mem**, v. 86, n. 1, p. 100-6, Jul 2006.
- DAL-COL, M. L. et al. Lack of midazolam-induced anxiolysis in the plus-maze Trial 2 is dependent on the length of Trial 1. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 74, n. 2, p. 395-400, Jan 2003.
- DALVI, A.; RODGERS, R. J. GABAergic influences on plus-maze behaviour in mice. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 128, n. 4, p. 380-97, Dec 1996.
- DATSON, N. A. et al. Central corticosteroid actions: Search for gene targets. **Eur J Pharmacol**, v. 583, n. 2-3, p. 272-89, Apr 07 2008.
- DAVIS, M. et al. Phasic vs sustained fear in rats and humans: role of the extended amygdala in fear vs anxiety. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 1, p. 105-35, Jan 2010.
- DAWSON, G. R. et al. One-trial tolerance to the effects of chlordiazepoxide on the elevated plus maze may be due to locomotor habituation, not repeated drug exposure. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 113, n. 3-4, p. 570-2, Jan 1994.
- DE KLOET, E. R. Brain corticosteroid receptor balance and homeostatic control. **Front Neuroendocrinol**, v. 12, p. 95-164, 1991.
- DE KLOET, E. R. et al. Antigluocorticoid RU 38486 attenuates retention of a behaviour and disinhibits the hypothalamic-pituitary adrenal axis at different brain sites. **Neuroendocrinology**, v. 47, n. 2, p. 109-15, Feb 1988.
- DE KLOET, E. R.; JOELS, M.; HOLSBOER, F. Stress and the brain: from adaptation to disease. **Nat Rev Neurosci**, v. 6, n. 6, p. 463-75, Jun 2005.
- DE KLOET, E. R. et al. Glucocorticoid feedback resistance. **Trends Endocrinol Metab**, v. 8, n. 1, p. 26-33, Jan-Feb 1997.
- DE KLOET, E. R. et al. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. **Endocr Rev**, v. 19, n. 3, p. 269-301, Jun 1998.
- DE QUERVAIN, D. J. et al. Acute cortisone administration impairs retrieval of long-term declarative memory in humans. **Nat Neurosci**, v. 3, n. 4, p. 313-4, Apr 2000.
- DOS REIS, L. M.; CANTO-DE-SOUZA, A. Intra-periaqueductal gray matter injections of midazolam fail to alter anxiety in plus-maze experienced mice. **Brain Res**, v. 1231, p. 93-102, Sep 22 2008.
- DUDAI, Y. Predicting not to predict too much: how the cellular machinery of memory anticipates the uncertain future. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 364, n. 1521, p. 1255-62, May 12 2009.
- DUPIN, N. et al. Common efficacy of psychotropic drugs in restoring stress-induced impairment of prefrontal plasticity. **Neurotox Res**, v. 10, n. 3-4, p. 193-8, Dec 2006.

EUSTON, D. R.; GRUBER, A. J.; MCNAUGHTON, B. L. The role of medial prefrontal cortex in memory and decision making. **Neuron**, v. 76, n. 6, p. 1057-70, Dec 20 2012.

FERNANDES, C.; FILE, S. E. The influence of open arm ledges and maze experience in the elevated plus-maze. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 54, n. 1, p. 31-40, May 1996.

FILE, S. E. Tolerance to the behavioral actions of benzodiazepines. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 9, n. 1, p. 113-21, Spring 1985.

FILE, S. E. One-trial tolerance to the anxiolytic effects of chlordiazepoxide in the plus-maze. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 100, n. 2, p. 281-2, 1990.

FILE, S. E. The interplay of learning and anxiety in the elevated plus-maze. **Behav Brain Res**, v. 58, n. 1-2, p. 199-202, Dec 20 1993.

FILE, S. E.; BALDWIN, H. A.; ARANKO, K. Anxiogenic effects in benzodiazepine withdrawal are linked to the development of tolerance. **Brain Res Bull**, v. 19, n. 5, p. 607-10, Nov 1987.

FILE, S. E.; GONZALEZ, L. E. Anxiolytic effects in the plus-maze of 5-HT<sub>1A</sub>-receptor ligands in dorsal raphe and ventral hippocampus. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 54, n. 1, p. 123-8, May 1996.

FILE, S. E.; MABBUTT, P. S.; HITCHCOTT, P. K. Characterisation of the phenomenon of "one-trial tolerance" to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 102, n. 1, p. 98-101, 1990.

FILE, S. E.; ZANGROSSI, H., JR. "One-trial tolerance" to the anxiolytic actions of benzodiazepines in the elevated plus-maze, or the development of a phobic state? **Psychopharmacology (Berl)**, v. 110, n. 1-2, p. 240-4, 1993.

FILE, S. E. et al. Raised corticosterone in the rat after exposure to the elevated plus-maze. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 113, n. 3-4, p. 543-6, Jan 1994.

FOLLESA, P. et al. Modulation of GABA(A) receptor gene expression by allopregnanolone and ethanol. **Eur J Pharmacol**, v. 500, n. 1-3, p. 413-25, Oct 01 2004.

FRANKLAND, P. W. et al. The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. **Science**, v. 304, n. 5672, p. 881-3, May 07 2004.

FRANKLIN, K. B.; PAXINOS, G. **The mouse brain in stereotaxic coordinates**. 3 ed. New York, NY: Academic Press, 2007.

GARCIA, A. M.; CARDENAS, F. P.; MORATO, S. Effect of different illumination levels on rat behavior in the elevated plus-maze. **Physiol Behav**, v. 85, n. 3, p. 265-70, Jun 30 2005.

GAZARINI, L.; STERN, C. A.; BERTOGLIO, L. J. Protein synthesis in dorsal hippocampus supports the drug tolerance induced by prior elevated plus-maze experience. **Neuroscience**, v. 179, p. 179-87, Apr 14 2011.

GHASHGHAEI, H. T.; HILGETAG, C. C.; BARBAS, H. Sequence of information processing for emotions based on the anatomic dialogue between prefrontal cortex and amygdala. **Neuroimage**, v. 34, n. 3, p. 905-23, Feb 01 2007.

GIANLORENCO, A. C. et al. Emotional memory consolidation impairment induced by histamine is mediated by H1 but not H2 receptors. **Brain Res Bull**, v. 89, n. 5-6, p. 197-202, Dec 01 2012.

GOMEZ-SANCHEZ, E.; GOMEZ-SANCHEZ, C. E. The multifaceted mineralocorticoid receptor. **Compr Physiol**, v. 4, n. 3, p. 965-94, Jul 2014.

GONZALEZ, L. E.; FILE, S. E. A five minute experience in the elevated plus-maze alters the state of the benzodiazepine receptor in the dorsal raphe nucleus. **J Neurosci**, v. 17, n. 4, p. 1505-11, Feb 15 1997.

GRAEFF, F. G. Ansiolíticos. In: (Ed.). **Drogas psicotrópicas e seu modo de ação**. São Paulo: EPU, 1989. p.1-83.

GRAEFF, F. G. et al. Role of the amygdala and periaqueductal gray in anxiety and panic. **Behav Brain Res**, v. 58, n. 1-2, p. 123-31, Dec 20 1993.

GRAEFF, F. G.; ZANGROSSI JR, H. Animal models of anxiety disorders. In: D'HAENEN, H.; DEN BOER, J. A., *et al* (Ed.). **Biological Psychiatry**. Chichester: John Wiley & Son Ltd, 2002. cap. 19, p.880-889.

GRAY, J. A.; MCNAUGAHTON, N. **The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system**. 2 ed. London: Oxford University Press, 2000.

GRAY, J. A.; MCNAUGHTON, N. **The Neuropsychology of Anxiety: An Enquiry into the Functions of the Septo-Hippocampal System**. 2. New York: Oxford University Press, 2000.

GREENBERG, P. E. et al. The economic burden of anxiety disorders in the 1990s. **J Clin Psychiatry**, v. 60, n. 7, p. 427-35, Jul 1999.

GRIEBEL, G. et al. Risk assessment behaviour: evaluation of utility in the study of 5-HT-related drugs in the rat elevated plus-maze test. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 57, n. 4, p. 817-27, Aug 1997.

GROC, L.; CHOQUET, D.; CHAOULOFF, F. The stress hormone corticosterone conditions AMPAR surface trafficking and synaptic potentiation. **Nat Neurosci**, v. 11, n. 8, p. 868-70, Aug 2008.

GUIDOTTI, A. et al. Benzodiazepines: a tool to explore the biochemical and neurophysiological basis of anxiety. **Fed Proc**, v. 39, n. 12, p. 3039-42, Oct 1980.

GUNN, B. G. et al. Neurosteroids and GABA(A) Receptor Interactions: A Focus on Stress. **Front Neurosci**, v. 5, p. 131, 2011.

- HAEFELY, W. E. The GABAA-benzodiazepine receptor: biology and pharmacology. In: BURROWS, G. D.; ROTH, R., *et al* (Ed.). **Handbook of anxiety**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, v. The Neurobiology of anxiety, 1990. p.65-188.
- HANDLEY, S. L.; MCBLANE, J. W. An assessment of the elevated X-maze for studying anxiety and anxiety-modulating drugs. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v. 29, n. 3, p. 129-38, Jun 1993.
- HAPPOLA, O. *et al*. Localization of L-glutamate decarboxylase and GABA transaminase immunoreactivity in the sympathetic ganglia of the rat. **Neuroscience**, v. 21, n. 1, p. 271-81, Apr 1987.
- HARBUZ, M. S.; LIGHTMAN, S. L. Stress and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis: acute, chronic and immunological activation. **J Endocrinol**, v. 134, n. 3, p. 327-39, Sep 1992.
- HARRELL, J. M. *et al*. Evidence for glucocorticoid receptor transport on microtubules by dynein. **J Biol Chem**, v. 279, n. 52, p. 54647-54, Dec 24 2004.
- HASCOET, M.; BOURIN, M.; COUETOUX DU TERTRE, A. Influence of prior experience on mice behavior using the four-plate test. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 58, n. 4, p. 1131-8, Dec 1997.
- HETEM, L. A. B. Diagnóstico diferencial. In: HETEM, L. A. B. e GRAEFF, F. G. (Ed.). **Transtornos de Ansiedade**. São Paulo: Atheneu, 2004. p.191-206.
- HLAVACOVA, N.; JEZOVA, D. Chronic treatment with the mineralocorticoid hormone aldosterone results in increased anxiety-like behavior. **Horm Behav**, v. 54, n. 1, p. 90-7, Jun 2008.
- HOGG, S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 54, n. 1, p. 21-30, May 1996.
- HOLMES, A. *et al*. Prior test experience compromises the anxiolytic efficacy of chlordiazepoxide in the mouse light/dark exploration test. **Behav Brain Res**, v. 122, n. 2, p. 159-67, Aug 01 2001.
- HOLMES, A.; RODGERS, R. J. Responses of Swiss-Webster mice to repeated plus-maze experience: further evidence for a qualitative shift in emotional state? **Pharmacol Biochem Behav**, v. 60, n. 2, p. 473-88, Jun 1998.
- HOLTMAAT, A.; SVOBODA, K. Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. **Nat Rev Neurosci**, v. 10, n. 9, p. 647-58, Sep 2009.
- HOOVER, W. B.; VERTES, R. P. Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. **Brain Struct Funct**, v. 212, n. 2, p. 149-79, Sep 2007.
- HURLEY, K. M. *et al*. Efferent projections of the infralimbic cortex of the rat. **J Comp Neurol**, v. 308, n. 2, p. 249-76, Jun 08 1991.

- IZQUIERDO, I. et al. Differential involvement of cortical receptor mechanisms in working, short-term and long-term memory. **Behav Pharmacol**, v. 9, n. 5-6, p. 421-7, Sep 1998.
- IZQUIERDO, I.; MCGAUGH, J. L. Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. **Behav Pharmacol**, v. 11, n. 7-8, p. 517-34, Nov 2000.
- JOELS, M.; BARAM, T. Z. The neuro-symphony of stress. **Nat Rev Neurosci**, v. 10, n. 6, p. 459-66, Jun 2009.
- JOELS, M.; DE KLOET, E. R. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the brain. Implications for ion permeability and transmitter systems. **Prog Neurobiol**, v. 43, n. 1, p. 1-36, May 1994.
- JOELS, M. et al. Learning under stress: how does it work? **Trends Cogn Sci**, v. 10, n. 4, p. 152-8, Apr 2006.
- JONES, K. R.; MYERS, B.; HERMAN, J. P. Stimulation of the prelimbic cortex differentially modulates neuroendocrine responses to psychogenic and systemic stressors. **Physiol Behav**, v. 104, n. 2, p. 266-71, Aug 03 2011.
- KARST, H. et al. Mineralocorticoid receptors are indispensable for nongenomic modulation of hippocampal glutamate transmission by corticosterone. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 52, p. 19204-7, Dec 27 2005.
- KIM, P. J. et al. Evaluation of RU28318 and RU40555 as selective mineralocorticoid receptor and glucocorticoid receptor antagonists, respectively: receptor measures and functional studies. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 67, n. 3, p. 213-22, Nov 1998.
- KORTE, S. M. et al. Anxiolytic-like effects of selective mineralocorticoid and glucocorticoid antagonists on fear-enhanced behavior in the elevated plus-maze. **Psychoneuroendocrinology**, v. 20, n. 4, p. 385-94, 1995.
- KUHLMANN, S.; WOLF, O. T. A non-arousing test situation abolishes the impairing effects of cortisol on delayed memory retrieval in healthy women. **Neurosci Lett**, v. 399, n. 3, p. 268-72, May 22 2006.
- LACHMAN, S. J. Learning is a process: toward an improved definition of learning. **The Journal of Psychology**, v. 131, n. 5, p. 477-480, 1997.
- LACROIX, L. et al. Differential role of the medial and lateral prefrontal cortices in fear and anxiety. **Behav Neurosci**, v. 114, n. 6, p. 1119-30, Dec 2000.
- LAMPREA, M. R. et al. Dissociation of memory and anxiety in a repeated elevated plus maze paradigm: forebrain cholinergic mechanisms. **Behav Brain Res**, v. 117, n. 1-2, p. 97-105, Dec 20 2000.
- LANG, P. J.; BRADLEY, M. M.; CUTHBERT, B. N. Emotion, motivation, and anxiety: brain mechanisms and psychophysiology. **Biol Psychiatry**, v. 44, n. 12, p. 1248-63, Dec 15 1998.

- LEDOUX, J. E. Emotion circuits in the brain. **Annu Rev Neurosci**, v. 23, p. 155-84, 2000.
- LEE, C.; RODGERS, R. J. Antinociceptive effects of elevated plus-maze exposure: influence of opiate receptor manipulations. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 102, n. 4, p. 507-13, 1990.
- LI, S. S.; MCNALLY, G. P. The conditions that promote fear learning: prediction error and Pavlovian fear conditioning. **Neurobiol Learn Mem**, v. 108, p. 14-21, Feb 2014.
- LIGHTMAN, S. L. et al. The significance of glucocorticoid pulsatility. **Eur J Pharmacol**, v. 583, n. 2-3, p. 255-62, Apr 07 2008.
- LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 92, n. 2, p. 180-5, 1987.
- LISTER, R. G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmacol Ther**, v. 46, n. 3, p. 321-40, 1990.
- LU, W. L. et al. Antipyretic, analgesic and anti-inflammatory activities of ketoprofen beta-cyclodextrin inclusion complexes in animals. **Biol Pharm Bull**, v. 27, n. 10, p. 1515-20, Oct 2004.
- LUPIEN, S. J.; MCEWEN, B. S. The acute effects of corticosteroids on cognition: integration of animal and human model studies. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 24, n. 1, p. 1-27, Jun 1997.
- MAGUIRE, J.; MODY, I. Steroid hormone fluctuations and GABA(A)R plasticity. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34 Suppl 1, p. S84-90, Dec 2009.
- MAJEWSKA, M. D.; BISSERBE, J. C.; ESKAY, R. L. Glucocorticoids are modulators of GABAA receptors in brain. **Brain Res**, v. 339, n. 1, p. 178-82, Jul 22 1985.
- MASON, B. L.; PARIANTE, C. M.; THOMAS, S. A. A revised role for P-glycoprotein in the brain distribution of dexamethasone, cortisol, and corticosterone in wild-type and ABCB1A/B-deficient mice. **Endocrinology**, v. 149, n. 10, p. 5244-53, Oct 2008.
- MATHEWS, A.; MACLEOD, C. Cognitive approaches to emotion and emotional disorders. **Annu Rev Psychol**, v. 45, p. 25-50, 1994.
- MAYFORD, M.; SIEGELBAUM, S. A.; KANDEL, E. R. Synapses and memory storage. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 4, n. 6, Jun 01 2012.
- MCEOWN, K.; TREIT, D. Mineralocorticoid receptors in the medial prefrontal cortex and hippocampus mediate rats' unconditioned fear behaviour. **Horm Behav**, v. 60, n. 5, p. 581-8, Nov 2011.
- MCEWEN, B. S. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. **Physiol Rev**, v. 87, n. 3, p. 873-904, Jul 2007.
- MCGAUGH, J. L. Time-dependent processes in memory storage. **Science**, v. 153, n. 3742, p. 1351-8, Sep 16 1966.

MCGAUGH, J. L. Memory--a century of consolidation. **Science**, v. 287, n. 5451, p. 248-51, Jan 14 2000.

MCGREGOR, I. S.; DIELENBERG, R. A. Differential anxiolytic efficacy of a benzodiazepine on first versus second exposure to a predatory odor in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 147, n. 2, p. 174-81, Nov 1999.

MCMAHON, D. B.; BARRIONUEVO, G. Short- and long-term plasticity of the perforant path synapse in hippocampal area CA3. **J Neurophysiol**, v. 88, n. 1, p. 528-33, Jul 2002.

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

MIKICS, E. et al. Behavioral specificity of non-genomic glucocorticoid effects in rats: effects on risk assessment in the elevated plus-maze and the open-field. **Horm Behav**, v. 48, n. 2, p. 152-62, Aug 2005.

MILAD, M. R.; QUIRK, G. J. Neurons in medial prefrontal cortex signal memory for fear extinction. **Nature**, v. 420, n. 6911, p. 70-4, Nov 07 2002.

MILLAN, M. J. The neurobiology and control of anxious states. **Prog Neurobiol**, v. 70, n. 2, p. 83-244, Jun 2003.

MILLER, M. M.; MCEWEN, B. S. Establishing an agenda for translational research on PTSD. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1071, p. 294-312, Jul 2006.

MODY, I.; MAGUIRE, J. The reciprocal regulation of stress hormones and GABA(A) receptors. **Front Cell Neurosci**, v. 6, p. 4, Jan 2011.

MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **J Comp Physiol Psychol**, v. 48, n. 4, p. 254-60, Aug 1955.

MORSINK, M. C. et al. The dynamic pattern of glucocorticoid receptor-mediated transcriptional responses in neuronal PC12 cells. **J Neurochem**, v. 99, n. 4, p. 1282-98, Nov 2006.

NAKAYAMA, D. et al. Post-retrieval late process contributes to persistence of reactivated fear memory. **Learn Mem**, v. 20, n. 6, p. 307-10, May 16 2013.

NARANG, V. S. et al. Dexamethasone increases expression and activity of multidrug resistance transporters at the rat blood-brain barrier. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 295, n. 2, p. C440-50, Aug 2008.

NUNES-DE-SOUZA, R. L. et al. Anxiety-induced antinociception in mice: effects of systemic and intra-amygdala administration of 8-OH-DPAT and midazolam. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 150, n. 3, p. 300-10, Jun 2000.

- NUTT, D. J. Overview of diagnosis and drug treatments of anxiety disorders. **CNS Spectr**, v. 10, n. 1, p. 49-56, Jan 2005.
- OITZL, M. S.; DE KLOET, E. R. Selective corticosteroid antagonists modulate specific aspects of spatial orientation learning. **Behav Neurosci**, v. 106, n. 1, p. 62-71, Feb 1992.
- OITZL, M. S.; FLUTTERT, M.; DE KLOET, E. R. The effect of corticosterone on reactivity to spatial novelty is mediated by central mineralocorticoid receptors. **Eur J Neurosci**, v. 6, n. 7, p. 1072-9, Jul 01 1994.
- OITZL, M. S.; JOSEPHY, M.; SPRUIJT, B. M. An ACTH/MSH(4-9) analog counteracts the behavioral effects of a mineralocorticoid receptor antagonist. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 44, n. 2, p. 447-50, Feb 1993.
- OLESEN, J. et al. The economic cost of brain disorders in Europe. **Eur J Neurol**, v. 19, n. 1, p. 155-62, Jan 2012.
- OLIJSLAGERS, J. E. et al. Rapid changes in hippocampal CA1 pyramidal cell function via pre- as well as postsynaptic membrane mineralocorticoid receptors. **Eur J Neurosci**, v. 27, n. 10, p. 2542-50, May 2008.
- PACAK, K.; PALKOVITS, M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. **Endocr Rev**, v. 22, n. 4, p. 502-48, Aug 2001.
- PELLOW, S. et al. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J Neurosci Methods**, v. 14, n. 3, p. 149-67, Aug 1985.
- PEREIRA, M. E. C. Mudanças no conceito de ansiedade. In: HETEM, L. A. B. e GAEFF, F. G. (Ed.). **Transtornos de ansiedade**. São Paulo: Científica Nacional Ltda, 1997. p.3-47.
- PRICE, J. L.; DREVETS, W. C. Neurocircuitry of mood disorders. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 1, p. 192-216, Jan 2010.
- QUIRK, G. J.; GARCIA, R.; GONZALEZ-LIMA, F. Prefrontal mechanisms in extinction of conditioned fear. **Biol Psychiatry**, v. 60, n. 4, p. 337-43, Aug 15 2006.
- RADLEY, J. J.; ARIAS, C. M.; SAWCHENKO, P. E. Regional differentiation of the medial prefrontal cortex in regulating adaptive responses to acute emotional stress. **J Neurosci**, v. 26, n. 50, p. 12967-76, Dec 13 2006.
- RESSTEL, L. B.; CORREA, F. M. Involvement of the medial prefrontal cortex in central cardiovascular modulation in the rat. **Auton Neurosci**, v. 126-127, p. 130-8, Jun 30 2006.
- REUL, J. M.; DE KLOET, E. R. Anatomical resolution of two types of corticosterone receptor sites in rat brain with in vitro autoradiography and computerized image analysis. **J Steroid Biochem**, v. 24, n. 1, p. 269-72, Jan 1986.
- RIMMELE, U. et al. Blocking mineralocorticoid receptors impairs, blocking glucocorticoid receptors enhances memory retrieval in humans. **Neuropsychopharmacology**, v. 38, n. 5, p. 884-94, Apr 2013.

RIMMELE, U. et al. Suppressing the morning rise in cortisol impairs free recall. **Learn Mem**, v. 17, n. 4, p. 186-90, Apr 2010.

ROCHER, C. et al. Acute stress-induced changes in hippocampal/prefrontal circuits in rats: effects of antidepressants. **Cereb Cortex**, v. 14, n. 2, p. 224-9, Feb 2004.

RODGERS, R. J. Animal models of 'anxiety': where next? **Behav Pharmacol**, v. 8, n. 6-7, p. 477-96; discussion 497-504, Nov 1997.

RODGERS, R. J.; COLE, J. C. Influence of social isolation, gender, strain, and prior novelty on plus-maze behaviour in mice. **Physiol Behav**, v. 54, n. 4, p. 729-36, Oct 1993.

RODGERS, R. J.; DALVI, A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 21, n. 6, p. 801-10, Nov 1997.

RODGERS, R. J. et al. Corticosterone response to the plus-maze: high correlation with risk assessment in rats and mice. **Physiol Behav**, v. 68, n. 1-2, p. 47-53, Dec 1-15 1999.

RODGERS, R. J.; JOHNSON, N. J. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 52, n. 2, p. 297-303, Oct 1995.

RODGERS, R. J. et al. Plus-maze retest profile in mice: importance of initial stages of trail 1 and response to post-trail cholinergic receptor blockade. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 54, n. 1, p. 41-50, May 1996.

RODGERS, R. J.; LEE, C.; SHEPHERD, J. K. Effects of diazepam on behavioural and antinociceptive responses to the elevated plus-maze in male mice depend upon treatment regimen and prior maze experience. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 106, n. 1, p. 102-10, 1992.

RODGERS, R. J.; SHEPHERD, J. K. Influence of prior maze experience on behaviour and response to diazepam in the elevated plus-maze and light/dark tests of anxiety in mice. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 113, n. 2, p. 237-42, 1993.

RODRIGUES, S. M.; LEDOUX, J. E.; SAPOLSKY, R. M. The influence of stress hormones on fear circuitry. **Annu Rev Neurosci**, v. 32, p. 289-313, 2009.

ROOZENDAAL, B.; PORTILLO-MARQUEZ, G.; MCGAUGH, J. L. Basolateral amygdala lesions block glucocorticoid-induced modulation of memory for spatial learning. **Behav Neurosci**, v. 110, n. 5, p. 1074-83, Oct 1996.

SANDI, C.; ROSE, S. P. Corticosteroid receptor antagonists are amnesic for passive avoidance learning in day-old chicks. **Eur J Neurosci**, v. 6, n. 8, p. 1292-7, Aug 01 1994.

SANDI, C.; ROSE, S. P. Training-dependent biphasic effects of corticosterone in memory formation for a passive avoidance task in chicks. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 133, n. 2, p. 152-60, Sep 1997.

SANTINI, E. et al. Consolidation of fear extinction requires protein synthesis in the medial prefrontal cortex. **J Neurosci**, v. 24, n. 25, p. 5704-10, Jun 23 2004.

SECKL, J. R. 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase in the brain: a novel regulator of glucocorticoid action? **Front Neuroendocrinol**, v. 18, n. 1, p. 49-99, Jan 1997.

SERAFIM, K. R. et al. L-histidine provokes a state-dependent memory retrieval deficit in mice re-exposed to the elevated plus-maze. **Braz J Med Biol Res**, v. 43, n. 1, p. 100-6, Jan 2010.

SHAH, A. A.; TREIT, D. Excitotoxic lesions of the medial prefrontal cortex attenuate fear responses in the elevated-plus maze, social interaction and shock probe burying tests. **Brain Res**, v. 969, n. 1-2, p. 183-94, Apr 18 2003.

SHEN, H. et al. Short-term steroid treatment increases delta GABAA receptor subunit expression in rat CA1 hippocampus: pharmacological and behavioral effects. **Neuropharmacology**, v. 49, n. 5, p. 573-86, Oct 2005.

SHEPHERD, J. K. et al. Behavioural and pharmacological characterisation of the elevated "zero-maze" as an animal model of anxiety. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 116, n. 1, p. 56-64, Sep 1994.

SHIN, L. M.; LIBERZON, I. The neurocircuitry of fear, stress, and anxiety disorders. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 1, p. 169-91, Jan 2010.

SIEGHART, W. et al. Structure and subunit composition of GABA(A) receptors. **Neurochem Int**, v. 34, n. 5, p. 379-85, May 1999.

SKILBECK, K. J.; JOHNSTON, G. A.; HINTON, T. Stress and GABA receptors. **J Neurochem**, v. 112, n. 5, p. 1115-30, Mar 2010.

STAPLES, L. G. Predator odor avoidance as a rodent model of anxiety: learning-mediated consequences beyond the initial exposure. **Neurobiol Learn Mem**, v. 94, n. 4, p. 435-45, Nov 2010.

STEIN, D. J.; BOUWER, C. A neuro-evolutionary approach to the anxiety disorders. **J Anxiety Disord**, v. 11, n. 4, p. 409-29, Jul-Aug 1997.

STEPANOVIC-PETROVIC, R. M. et al. Antihyperalgesic/antinociceptive effects of ceftriaxone and its synergistic interactions with different analgesics in inflammatory pain in rodents. **Anesthesiology**, v. 120, n. 3, p. 737-50, Mar 2014.

STERN, C. A.; CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Aversive learning as a mechanism for lack of repeated anxiolytic-like effect in the elevated plus-maze. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 90, n. 4, p. 545-50, Oct 2008.

STERN, C. A. et al. Activity in prelimbic cortex is required for adjusting the anxiety response level during the elevated plus-maze retest. **Neuroscience**, v. 170, n. 1, p. 214-22, Sep 29 2010.

SUER, C. et al. The relation between skin conductance level and plus-maze behavior in male mice. **Physiol Behav**, v. 64, n. 4, p. 573-6, Jun 15 1998.

TEIXEIRA, R. M. et al. Effects of central administration of tachykinin receptor agonists and antagonists on plus-maze behavior in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 311, n. 1, p. 7-14, Sep 5 1996.

TER HORST, J. P. et al. Deletion of the forebrain mineralocorticoid receptor impairs social discrimination and decision-making in male, but not in female mice. **Front Behav Neurosci**, v. 8, p. 26, 2014.

TREIT, D.; MENARD, J.; ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 44, n. 2, p. 463-9, Feb 1993.

TRONEL, S.; SARA, S. J. Blockade of NMDA receptors in prelimbic cortex induces an enduring amnesia for odor-reward associative learning. **J Neurosci**, v. 23, n. 13, p. 5472-6, Jul 02 2003.

ULRICH-LAI, Y. M.; HERMAN, J. P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. **Nat Rev Neurosci**, v. 10, n. 6, p. 397-409, Jun 2009.

VARGAS, K. M.; DA CUNHA, C.; ANDREATINI, R. Amphetamine and pentylentetrazole given post-trial 1 enhance one-trial tolerance to the anxiolytic effect of diazepam in the elevated plus-maze in mice. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 30, n. 8, p. 1394-402, Dec 30 2006.

VAZDARJANOVA, A.; MCGAUGH, J. L. Basolateral amygdala is not critical for cognitive memory of contextual fear conditioning. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 25, p. 15003-7, Dec 08 1998.

VERTES, R. P. Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. **Neuroscience**, v. 142, n. 1, p. 1-20, Sep 29 2006.

VIANNA, M. R. et al. Pharmacological demonstration of the differential involvement of protein kinase C isoforms in short- and long-term memory formation and retrieval of one-trial avoidance in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 150, n. 1, p. 77-84, May 2000.

VIDAL-GONZALEZ, I. et al. Microstimulation reveals opposing influences of prelimbic and infralimbic cortex on the expression of conditioned fear. **Learn Mem**, v. 13, n. 6, p. 728-33, Nov-Dec 2006.

WALKER, P.; CARRIVE, P. Role of ventrolateral periaqueductal gray neurons in the behavioral and cardiovascular responses to contextual conditioned fear and poststress recovery. **Neuroscience**, v. 116, n. 3, p. 897-912, 2003.

WALL, P. M.; FLINN, J.; MESSIER, C. Infralimbic muscarinic M1 receptors modulate anxiety-like behaviour and spontaneous working memory in mice. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 155, n. 1, p. 58-68, Apr 2001.

WALL, P. M.; MESSIER, C. Concurrent modulation of anxiety and memory. **Behav Brain Res**, v. 109, n. 2, p. 229-41, May 2000a.

WALL, P. M.; MESSIER, C. U-69,593 microinjection in the infralimbic cortex reduces anxiety and enhances spontaneous alternation memory in mice. **Brain Res**, v. 856, n. 1-2, p. 259-80, Feb 21 2000b.

WICK, J. Y. The history of benzodiazepines. **Consult Pharm**, v. 28, n. 9, p. 538-48, Sep 2013.

YEHUDA, R.; JOELS, M.; MORRIS, R. G. The memory paradox. **Nat Rev Neurosci**, v. 11, n. 12, p. 837-9, Dec 2010.

ZANGROSSI JR, H. Modelos animais de ansiedade. In: HETEM, L. A. B. e GRAEFF, F. G. (Ed.). **Transtornos de ansiedade**. São Paulo: Científica Nacional Ltda, 1997. p.85-112.

ZHANG, J. H.; HAN, F.; SHI, Y. X. Single prolonged stress induces changes in the expression of mineralocorticoid receptor in the medial prefrontal cortex in a rat model of post-traumatic stress disorder. **Mol Med Rep**, v. 6, n. 2, p. 330-4, Aug 2012.

ZHANG, Y.; FUKUSHIMA, H.; KIDA, S. Induction and requirement of gene expression in the anterior cingulate cortex and medial prefrontal cortex for the consolidation of inhibitory avoidance memory. **Mol Brain**, v. 4, p. 4, Jan 19 2011.

ZHAO, M. G. et al. Roles of NMDA NR2B subtype receptor in prefrontal long-term potentiation and contextual fear memory. **Neuron**, v. 47, n. 6, p. 859-72, Sep 15 2005.

ZHOU, H. et al. NMDA and D1 receptors are involved in one-trial tolerance to the anxiolytic-like effects of diazepam in the elevated plus maze test in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 135, p. 40-5, Aug 2015.

ZHOU, M. et al. Both mineralocorticoid and glucocorticoid receptors regulate emotional memory in mice. **Neurobiol Learn Mem**, v. 94, n. 4, p. 530-7, Nov 2010.

ZHOU, M. et al. Blocking mineralocorticoid receptors prior to retrieval reduces contextual fear memory in mice. **PLoS One**, v. 6, n. 10, p. e26220, 2011.

ZUCKER, R. S.; REGEHR, W. G. Short-term synaptic plasticity. **Annu Rev Physiol**, v. 64, p. 355-405, 2002.

## ANEXO 1

Pró Reitoria  
Pesquisa

Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Carlos



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "PAPEL DOS RECEPTORES MINERALOCORTICÓIDES DO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL MEDIAL NA TOLERÂNCIA AOS EFEITOS DO MIDAZOLAM EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO TESTE E RETESTE NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO", protocolada sob o CEUA nº 6634120315, sob a responsabilidade de **Kairo Alan Albarnaz Mariano** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) na reunião de 27/04/2015.

We certify that the proposal "ROLE OF MINERALOCORTICOID RECEPTORS OF MEDIAL PRE FRONTAL CORTEX ON TOLERANCE TO THE EFFECTS OF MIDAZOLAM IN MICE SUBMITTED TO TEST AND RETEST IN THE ELEVATED PLUZ MAZE", utilizing 336 Heterogenics mice (336 males), protocol number CEUA 6634120315, under the responsibility of **Kairo Alan Albarnaz Mariano** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Carlos (CEUA/UFSCAR) in the meeting of 04/27/2015.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **04/2015** a **03/2017** Área: **Ciências Fisiológicas**

Origem: **Biotério Central da UFSCar**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **40 a 50 dias**

Linhagem: **Swiss**

Peso: **30 a 35 g**

Resumo: O labirinto em cruz elevado (LCE) é um dos modelos animais mais empregados na triagem de novos agentes farmacológicos para o tratamento da ansiedade e no estudo das bases neurobiológicas dos comportamentos de defesa. De maneira interessante, o efeito do tipo ansiolítico de benzodiazepínicos, como o midazolam, em roedores testados pela primeira vez ao LCE é abolido em animais já expostos ao aparato, um fenômeno descrito como tolerância de uma exposição (OTT). Dados da literatura sugerem que o aprendizado proveniente da experiência prévia no aparato poderia estar envolvido neste processo, e que os hormônios do estresse teriam um papel fundamental nas mudanças comportamentais entre o teste e o reteste. Neste sentido, o presente projeto se propõe a investigar se os receptores mineralocorticosteróides (MR) do córtex pré-frontal medial (mPFC) estariam envolvidos no desenvolvimento do OTT. Para tanto, será investigado o papel dos receptores MR presentes no mPFC na tolerância dos efeitos do midazolam em camundongos submetidos ao protocolo de teste e reteste no labirinto em cruz elevado (LCE), caracterizando o fenômeno de OTT ao efeito ansiolítico do midazolam, o efeito do antagonista MR nas fases de aquisição e consolidação do OTT e o papel dos receptores MR do mPFC nas fases de aquisição e consolidação do OTT. Palavras-chave: ansiedade, benzodiazepínicos, mineralocorticoide, labirinto em cruz elevado, memória, tolerância.

Local do experimento: Laboratório de Psicologia da Aprendizagem (LPA)

São Carlos, 05 de dezembro de 2016

Prof. Dra. Luciana Thie Seki Dias  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Carlos

Prof. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho  
Vice-presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Carlos