



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

**O BLOQUEIO DOS RECEPTORES GLICOCORTICÓIDES DA REGIÃO
INFRALÍMBICA DO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL MEDIAL FACILITA A
AQUISIÇÃO, MAS NÃO A CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA DE
CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO PROTOCOLO DE TESTE E RETESTE
NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO**

AURA J. RODRÍGUEZ FONSECA

São Carlos, SP

2018



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

**O BLOQUEIO DOS RECEPTORES GLICOCORTICÓIDES DA REGIÃO
INFRALÍMBICA DO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL MEDIAL FACILITA A
AQUISIÇÃO, MAS NÃO A CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA DE
CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO PROTOCOLO DE TESTE E RETESTE
NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO**

AURA J. RODRÍGUEZ FONSECA

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

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

São Carlos, SP

2018



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 da candidata Aura Julieth Rodríguez Fonseca, realizada em 21/09/2018:



Prof.ª. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza
UFSCar



Prof. Dr. Tarciso Tadeu Miguel
UFU



Prof. Dr. Marcelo Tadeu Marin
UNESP

AGRADEÇO

À minha família, por ser o motor que impulsa os meus passos. Aos meus pais e irmãs pelo amor e apoio incondicional. Mis logros son suyos también.

Ao meu parceiro de vida Luis, pelo amor e o apoio pessoal nas altas e baixas emocionais na realização desse trabalho. ¡Gracias amor mio!

Ao Prof. Dr. Javier Leonardo Rico, por ter aberto a porta da neurociência, por me ensinar a olhar o comportamento animal como Psicóloga e me transmitir o prazer de estudar o comportamento como um todo.

Ao Dr. Rimenez Souza, por me ensinar um olhar multidisciplinar do comportamento. Pela inspiração e amizade. Tenho você como referência.

À Profa. Dra. Azair Canto de Souza, pela orientação e ensinamentos. Por ter acreditado na minha responsabilidade e vontade de aprender.

Aos professores da banca examinadora, pela disposição para a leitura desta dissertação.

Aos Colegas (Isabela, Paulo e Caroline), por nosso filho científico e por ter me ensinado que o trabalho entre amigos pode ser MARAvilhoso. Foram meses incríveis. Amo muito vocês!

A todos os meus amigos do Laboratório de Psicologia da Aprendizagem (LPA) Lara, Débora, Isabela, Ligia, Paulo, Giovana, Kairo, Vítor, Daniela, Lucas, Fernanda, Luiz, pelas risadas, pelos almoços, por compartilharem momentos bons e ruins. Obrigada pela amizade. Vocês contribuíram com seus conhecimentos na realização desse trabalho.

A Lara Maria Silveira, pelo apoio técnico e pessoal na realização desse trabalho. Obrigada pela hospitalidade!

Aos meus amigos da Colômbia, Laura, Karen, Kennya, Martha, Diana, Laura, Ricardo e Camilo por me ensinar que a amizade verdadeira pode ultrapassar o tempo e a distância. ¡Gracias por el amor y la amistad!

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 trabalho. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

Uma única experiência (teste) no o labirinto em cruz elevado (LCE) aumenta a esquivia dos braços abertos e prejudica a eficácia ansiolítica do agonista benzodiazepônico midazolam (MDZ) em uma reexposição (reteste) ao LCE, fenômeno conhecido na literatura como “tolerância de uma exposição” (OTT). Estudos consideram que o OTT pode ser decorrente de alteração relacionada a memória da primeira exposição, que promove mudanças na estratégia comportamental a ser adotada no reteste ou reexposição. Os receptores glicocorticóides da subregião infralímbica (IL) do córtex pré-frontal medial (CPFm) têm sido descritos como importantes moduladores da aprendizagem e cognição. Entretanto, permanece desconhecido o papel dos receptores glicocorticóides do CPFm-IL no desenvolvimento OTT em camundongos. Este estudo investigou os efeitos da injeção bilateral intra CPFm-IL de RU486 (antagonista dos receptores glicocorticóides, GR) nas fases de aquisição e consolidação da memória de camundongos submetidos ao protocolo de teste e reteste no LCE. No Experimento 1 (fase de aquisição), grupos independentes de camundongos machos suíços receberam injeção bilateral intra mPFC-IL de veículo ou RU486 (0,3 ou 1 ng/0,1µL) 5 minutos antes do teste, e foram expostos ao LCE, durante 5 minutos. Vinte e quatro horas depois, os sujeitos receberam injeções de veículo ou MDZ (2 mg/kg, intraperitoneal, i.p.), 30 minutos antes do reteste no LCE. No Experimento 2 (fase de consolidação), semelhante ao Experimento 1, exceto que os animais de cada grupo foram expostos ao teste no LCE durante 5 minutos, e posteriormente, receberam injeção intra CPFm-IL de veículo ou RU486. A análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) seguida pelo teste de Duncan mostrou que no Experimento 1, a exposição prévia ao labirinto (teste), produziu o fenômeno OTT no grupo Veículo/Veículo durante o reteste. O midazolam produziu efeito ansiolítico no reteste (Veículo/MDZ). Entretanto, nenhuma das doses de RU486 reverteu o efeito ansiolítico produzido pelo midazolam, porém diminuíram parâmetros comportamentais tais como, avaliação de risco (esticar protegido, SAP). Para o Experimento 2, após o período de teste, nenhuma das doses de RU28318 produziu efeito sobre o OTT, sugerindo ausência de efeitos sobre a fase de consolidação da memória. Os resultados indicam que o o bloqueio dos

receptores glicocorticóides intra CPFm-IL com RU486, desempenham um papel importante na aquisição da memória, fortalecendo a memória aversiva que é avaliada durante o reteste no LCE. Entretanto, este efeito é abolido na consolidação da memória. Tomados em conjunto, os presentes resultados demonstram que os receptores glicocorticóides do CPFm-IL estão envolvidos no desenvolvimento de aspectos mnemônicos relacionados a aprendizagem em situações aversivas.

Palavras-chave: Ansiedade. Labirinto em Cruz elevado. One trial tolerance. Córtex pré-frontal medial. Memórias aversivas. Receptores glicocorticóides.

ABSTRACT

A single experience (test) in the elevated plus maze (EPM) increases the avoidance of open arms and impairs the anxiolytic efficacy of the midazolam benzodiazepine agonist (MDZ) in a subsequent re-exposition (retest). Phenomenon known in the literature as "one trial tolerance" (OTT). Studies consider that OTT is due to a memory of the first exposure that allows changes in the strategy adopted at retest or day 2. Glucocorticoid receptors in the infralimbic subregion (IL) of the medial prefrontal cortex (mPFC) have been described as important modulators of learning and cognition; however, their involvement in establishing OTT remains unknown. This study investigated the effects of bilateral injection intra- mPFC -IL of RU486 (glucocorticoid receptor antagonist, GR) in the acquisition and consolidation phases of the memory of mice submitted to the test and retest protocol on the EPM. Experiment 1 (acquisition phase): independent groups of Swiss male mice received either intra-IL bilateral vehicle injection or RU486 (0.3 or 1 ng / 0.1 μ L) 5 minutes before the test and were exposed to EPM for 5 minutes. Twenty-four hours later, the subjects received vehicle injections or MDZ (2 mg/kg) (i.p), 30 minutes before retest in the EPM. Experiment 2 (consolidation phase): similar to Experiment 1, except that the animals in each group were exposed to the EPM test for 5 minutes, and after received injection intra- mPFC -IL of vehicle or RU486. The analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's post hoc showed that in Experiment 1, prior to the test period, none of the doses of RU486 had an effect on OTT for MDZ, suggesting no effect on the phase of memory acquisition. However, the combined treatment was able to reduce behavioral parameters such as risk assessment (SAP) in the reexposure to EPM. For Experiment 2 after the test period, none of the doses of RU28318 had an effect on OTT for MDZ, suggesting no effect on the memory consolidation phase. These results indicate that RU486 does not play a role on the memory acquisition of a trial 1 in the EPM, however was observed attenuation on anxiety-like behaviors. Additionally, our data indicate that RU486 does not play a role on the memory consolidation of a trial 1 in the EPM. Taken together, the present results demonstrate that the glucocorticoid receptors located within the mPFC -IL are involved in the development of mnemonic aspects related to learning in aversive situations.

Keywords: Anxiety. Elevated plus maze. One trial tolerance. Medial prefrontal cortex. Aversive memories. Glucocorticoid receptor.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Labirinto em cruz elevado (LCE) utilizado no presente estudo. Da produção do Laboratório de Psicologia da Aprendizagem (LPA).....32
- Figura 2** – Representação dos sítios de injeção no córtex pré-frontal medial (CPFm). (A) Representação esquemática dos locais de injeção dentro (círculos cheios) 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 (2001). (B) Fotomicrografia de uma secção coronal de um sujeito representativo mostrando o 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.....39
- Figura 3** – Efeito das injeções combinadas de RU486 (0,3 e 1,0 ng/0,1µL) intra-CPFm IL antes do teste, e de midazolam (MDZ 2mg/Kg, i.p) antes do reteste em camundongos expostos ao protocolo de teste e reteste no labirinto em cruz elevado (LCE). As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) para a % de entradas nos braços abertos (A), a % de tempo gasto nos braços abertos (B) e entradas nos braços fechados (C) (n=11-14). *p<0,05 em comparação ao respectivo grupo veículo. #p<0,05 em comparação ao respectivo grupo no teste. @ p<0,05 em comparação ao respectivo grupo midazolam.....43
- Figura 4** – Efeito das injeções combinadas de RU486 (0,3 e 1,0 ng/0,1µL) intra-CPFm IL imediatamente depois do teste, e de midazolam (MDZ 2mg/Kg, i.p) antes do reteste em camundongos expostos ao protocolo de teste e reteste no labirinto em cruz elevado (LCE). As barras representam as médias e o erro

padrão da média (M+EPM) para a % de entradas nos braços abertos (A), a % de tempo gasto nos braços abertos (B) e entradas nos braços fechados (C) (n=8-11). Veículo (injetado imediatamente após o teste); RU486 (Antagonista GR injetado imediatamente após o teste nas diferentes doses: 0,3ng/0,1µL e 1,0ng/0,1µL).....50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeito das injeções combinadas de RU486 (0,3 e 1,0 ng/0,1µL) intra-CPFm IL antes do teste, e de midazolam (MDZ 2mg/Kg, i.p) antes do reteste em camundongos expostos ao protocolo de teste e reteste no labirinto em cruz elevado (LCE). Os dados representam a média ± erro padrão da média (n=11-14). *p<0,05 em comparação ao respectivo grupo veículo. #p<0,05 em comparação ao respectivo grupo no teste. @ p<0,05 em comparação ao respectivo grupo midazolam.....48

Tabela 2 – Efeito das injeções combinadas de RU486 (0,3 e 1,0 ng/0,1µL) intra-CPFm IL imediatamente depois do teste, e de midazolam (MDZ 2mg/Kg, i.p) antes do reteste em camundongos expostos ao protocolo de teste e reteste no labirinto em cruz elevado (LCE). Os dados representam a média ± erro padrão da média (n=8-11)). Veículo (injetado imediatamente após o teste); RU486 (Antagonista GR injetado imediatamente após o teste nas diferentes doses: 0,3ng/0,1µL e 1,0ng/0,1µL) *p<0,05 em comparação ao respectivo grupo veículo. #p<0,05 em comparação ao respectivo grupo no teste.....53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACTH** – Hormônio adrenocorticotrófico
- BDZ** – Benzodiazepínicos
- CORT** – Corticosteróides
- CPF** – Córtex pré-frontal
- CPFm ou mPFC (inglês)** – Córtex pré-frontal medial
- CRH** – Hormônio liberador de corticotrofina
- GABA** – Ácido gama-amino-butírico
- GABAA e GABAB** – Subtipos de receptores de GABA
- GAD** – enzima glutamato descarboxilase
- GR** – Receptores glicocorticóides
- HPA** – Eixo hipotálamo – hipófise – glândulas adrenais
- IL** – Infralímbico
- i.p.** – Intraperitoneal
- LCE ou EPM (inglês)** – Labirinto em cruz elevado
- MDZ** – Midazolam
- mg/kg** – Miligramas/kilogramas
- MR** – Receptores mineralocorticóides
- ng** – Nanogramas
- OTT** – Tolerância à primeira exposição (One Trial Tolerance)
- RU486** – Antagonista de receptores glicocorticóides
- SAP** – esticar (Stretched attend postures)
- SNC** – Sistema nervoso central
- µL** – microlitros

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	27
2.1. Objetivo Geral	28
2.2. Objetivos Específicos.....	28
3. MATERIAL E MÉTODO	29
3.1. Sujeitos	30
3.2. Drogas	30
3.3. Cirurgia Estereotáxica e Injeção	31
3.4. Labirinto em Cruz Elevado	32
3.5. Análise Comportamental	33
3.6. Histologia	33
3.7. Ética	34
3.8. Delineamento Experimental.....	34
3.8.1. Procedimento Geral.....	34
3.8.2. Experimento 1. Avaliação dos efeitos do RU486 injetado no CPFm (IL) e do midazolam (i.p.), sobre a aquisição da memória de camundongos expostos ao protocolo de teste e reteste no LCE.....	35
3.8.3. Experimento 2. Avaliação dos efeitos do RU486 injetado no CPFm (IL) e do midazolam (i.p.), sobre a consolidação da memória de camundongos expostos ao protocolo de teste e reteste no LCE.....	36
3.9. Análise estatística.....	36
4. RESULTADOS	38
4.1. Experimento 1. Avaliação dos efeitos do RU486 injetado no CPFm (IL) e do midazolam (i.p.), sobre a aquisição da memória de camundongos expostos ao protocolo de teste e reteste no LCE	40
4.2. Experimento 2. Avaliação dos efeitos do RU486 injetado no CPFm (IL) e do midazolam (i.p.), sobre a consolidação da memória de camundongos expostos ao protocolo de teste e reteste no LCE	49
5. DISCUSSÃO	54
6. CONCLUSÃO	65
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
ANEXO 1	82

1. INTRODUÇÃO

A memória é um processo cognitivo essencial para a adaptação as mudanças ambientais, e conseqüentemente para a sobrevivência. O armazenameno das informações é determinado pelo grau de atenção, relevância e a emoção gerada (IZQUIERDO; MCGAUGH, 2000). A memória compreende um conjunto de mecanismos que operam no sistema nervoso central (SNC) que levam ao armazenamento duradouro de informações relacionadas ao ambiente e ao comportamento. Tais mecanismos operam em seqüência, e correspondem às diferentes fases da memória. A primeira é a fase de aquisição, onde toda informação relacionada a um traço particular é reunida através dos sistemas sensoriais ou a introspecção (IZQUIERDO; MCGAUGH, 2000). Após a aquisição, estas informações devem ser codificadas e armazenadas, o que constitui a fase de consolidação. A consolidação refere-se a um processo molecular pelo qual um traço particular de memória de curto prazo é transferido para uma memória estável de longo prazo (DE QUERVAIN; SCHWABE; ROOZENDAAL, 2016). A consolidação pode ser de curto prazo (segundos a minutos), longo prazo (horas e meses) e longa duração (tempo de vida). Estudos demonstram, que drogas podem bloquear preferencialmente a memória de curto prazo (segundos-minutos) ou de longo-prazo (horas-meses) sugerindo que os estágios de memória dependentes do tempo são baseados em processos independentes que atuam em paralelo (MCGAUGH, 2000). Enquanto permanecerem armazenadas, as informações consolidadas podem ser acessadas, o que constitui a fase de evocação, e representa o ato de lembrar (MCGAUGH, 2000; ABEL; LATTAL, 2001). As memórias são reativadas por dicas associadas a aquisição de informação, e a reativação

repetida da memória pode reforçar e promover a consolidação de longo prazo (SQUIRE; ALVAREZ, 1995).

Geralmente, experiências emocionais significativas resultam em memórias intensas e duradouras que facilitam a expectativa e antecipação de eventos futuros, em relação à expressão de comportamentos que foram adequados em uma situação já vivenciada (IZQUIERDO; MCGAUGH, 2000; MCGAUGH, 2000; ROOZENDAAL; BARSEGYAN; LEE, 2007). Nesse sentido a aprendizagem de situações aversivas está diretamente relacionada aos estados de ansiedade (JOËLS et al., 2006a; DUDAI, 2009; YEHUDA; JOËLS; MORRIS, 2010). Além disso, alguns aspectos da neurobiologia como vias neurais e certos aspectos neurofisiológicos da ansiedade e da memória são compartilhados, os quais ocorrem de maneira paralela e influenciam um ao outro (LEDOUX, 2000; MCNAUGHTON; CORR, 2004).

As respostas de ansiedade e o medo são emoções que compreendem um conjunto de reações autonômicas, cognitivas e comportamentais que auxiliam o sujeito no recrutamento de respostas adequadas, assegurando assim a sua sobrevivência (GRAEFF et al., 1993). Em situações ameaçadoras ou de perigo em potencial a ansiedade é uma reação normal e adaptativa, que permite avaliar os riscos ligados aos estímulos aversivos. Em contrapartida, as respostas de medo são caracterizadas por reações mais intensas, destinadas a suprir a demanda de estímulos onde o perigo está caracteristicamente mais próximo. Em ambos os casos, as respostas podem produzir reações autonômicas e comportamentais adequadas, bem como recrutam sistemas cerebrais de forma distinta. Embora tais reações sejam consideradas naturais, a partir do momento em que são expressas de forma excessiva e persistente,

ou em situações inapropriadas, elas podem se tornar em uma condição patológica (STAPLES, 2010).

Os transtornos de ansiedade são caracterizados por alterações autonômicas, que compreendem mudanças hormonais, cardiovasculares, gastrointestinais e respiratórias as quais são acompanhadas por alterações comportamentais como aumento de atenção, evitação ou enfrentamento de eventos aversivos gerando um estado emocional qualificado subjetivamente como desagradável (SIMON et al., 1999; PEREIRA, 2004; NUTT, 2005).

Considerando a perspectiva evolucionista, na qual animais e humanos compartilham aspectos neurobiológicos envolvidos nas respostas emocionais a estímulos aversivos, bem como nas diversas formas de enfrentamento (BLANCHARD; BLANCHARD; RODGERS, 1991), o uso de modelos animais naturalísticos são fundamentais para compreender os mecanismos implicados na neurobiologia da ansiedade assim como permitir o desenvolvimento e teste de novos fármacos para seu tratamento (BLANCHARD; BLANCHARD; RODGERS, 1991; STAPLES, 2010). Um dos paradigmas amplamente utilizados para o entendimento da neurobiologia dos transtornos de ansiedade é a exposição de roedores ao labirinto em cruz elevado (LCE), um modelo animal que gera conflito entre a aproximação ou exploração de um espaço novo e a esquiva induzida pela incerteza de potenciais ameaças (PELLOW et al., 1985; LISTER, 1987; CRUZ; FREI; GRAEFF, 1994).

O LCE é um modelo validado para ratos (PELLOW et al., 1985) e para camundongos (LISTER, 1987), composto por dois braços fechados com paredes laterais opostos a dois braços abertos, ligados ortogonalmente entre si

por uma plataforma central e elevados do solo geralmente a 50cm (RODGERS; SHEPHERD, 1993; RODGERS; JOHNSON, 1995; DALVI; RODGERS, 1996; TEIXEIRA et al., 1996; RODGERS; DALVI, 1997; RODGERS et al., 1999; CAROLA et al., 2002; CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005). O LCE é amplamente utilizado para a triagem de agentes com ação sobre transtornos de ansiedade atuando de forma bidirecional na alteração do conflito esquivar-aproximação (CRUZ; FREI; GRAEFF, 1994). Assim, a utilização de drogas com ação ansiolítica diminuem a esquivar aos braços abertos, enquanto as drogas com atividade ansiogênica produzem diminuição da exploração dos braços abertos (PELLOW et al., 1985; LISTER, 1987).

No entanto, alguns aspectos ligados às mudanças comportamentais de animais que são re-expostos ao aparelho são pouco esclarecidos. Neste contexto, roedores inexperientes apresentam um aumento característico na exploração nos braços abertos depois da administração de drogas ansiolíticas. No entanto, se os sujeitos tiveram uma experiência prévia de 5 minutos no LCE (teste), eles não respondem mais a essas drogas na re-exposição (reteste). Este fenômeno foi observado pela primeira vez com o benzodiazepínico clordiazepóxido (LISTER, 1987), e posteriormente foi denominado tolerância de uma exposição (OTT, da sigla inglesa para one-trial tolerance) (FILE; MABBUTT; HITCHCOTT, 1990). Embora o fenômeno de OTT esteja relacionado a redução da eficácia de drogas ansiolíticas devido a uma experiência prévia (teste 1) sem droga, o fenômeno também pode ser entendido como uma tolerância comportamental, onde essa única experiência prévia é suficiente para promover redução na exploração dos braços abertos na re-exposição ao aparelho (FILE; MABBUTT; HITCHCOTT, 1990; FILE;

ZANGROSSI, 1993; GONZALEZ; FILE, 1997; HOLMES; RODGERS, 1998; BERTOGLIO; CAROBREZ, 2002a; CARVALHO et al., 2005; ALBRECHET-SOUZA; BORELLI; BRANDÃO, 2008; ZHOU et al., 2015; BOURIN, 2018). O fenômeno OTT não é dependente do tratamento com drogas no teste (dia 1), nem do tipo de material utilizado para a construção do LCE (FILE; MABBUTT; HITCHCOTT, 1990; FILE; ZANGROSSI, 1993). Alguns autores propuseram que a perda da eficácia dos benzodiazepínicos pode ser decorrente da habituação da atividade locomotora entre as tentativas (DAWSON et al., 1994). Entretanto outros autores observaram pouca evidência ou ausência de redução nas medidas principais de locomoção tais como, entradas totais nos braços e/ou entradas nos braços fechados, durante o reteste (FILE, 1990; RODGERS et al., 1992; RODGERS; SHEPHERD, 1993; FERNANDES; FILE, 1996; RODGERS et al, 1996; RODGERS et al., 1997a, BERTOGLIO; CAROBREZ, 2002a,b; REIS; CANTO-DE-SOUZA, 2008; BARBALHO; NUNES-DE-SOUZA; CANTO-DE-SOUZA, 2009).

A tolerância a alguns benzodiazepínicos, barbitúricos, etanol, e algumas drogas com atividade noradrenérgica, serotonérgica, ou glutamatérgica também podem apresentar redução nos seus efeitos, quando administradas antes da reexposição ao LCE (FILE; MABBUTT; HITCHCOTT, 1990; FILE et al., 1994; GONZALEZ; FILE, 1997; BERTOGLIO; CAROBREZ, 2002a; DAL-CÓL et al., 2003; CARVALHO et al., 2005; ALBRECHET-SOUZA; BORELLI; BRANDÃO, 2008; ZHOU et al., 2015). Interessantemente, o OTT foi evidenciado também em animais que são reexpostos a uma situação aversiva em outros modelos de ansiedade, tal como no teste de quatro placas (HASCOET; BOURIN; TERTRE, 1997) e o teste claro-escuro (HOLMES et al., 2001). Foi relatado que este

fenômeno persiste após a exposição inicial em intervalos de 24h até 28 dias em ratos, e até 14 dias em camundongos (SCHNEIDER et al., 2011).

Com o intuito de explicar o fenômeno do OTT, várias hipóteses baseadas em perspectivas comportamentais, farmacológicas e neuroquímicas tem sido reportadas. Dentre elas a habituação locomotora (DAWSON et al., 1994; RODGERS; JOHNSON, 1995), mudança no estado emocional evocado na segunda exposição ao LCE (FILE; ZANGROSSI, 1993; RODGERS; SHEPHERD, 1993; HOLMES; RODGERS, 1998), mudança no estado do sítio de ligação ou complexo do receptor envolvido (GONZALEZ; FILE, 1997; BERTOGLIO; CAROBREZ, 2002b), ou a mudança de uma resposta de medo incondicionado para esquiva aprendida (HOLMES; RODGERS, 1998; DALCÓL et al., 2003; BERTOGLIO; CAROBREZ, 2004),

Estudos tem demonstrado que o OTT também parece ser dependente do aprendizado na primeira exposição ao aparelho, onde a aquisição e consolidação de uma memória formada na primeira exposição ao LCE permite aos animais ainda norteados pelo conflito, adotar uma estratégia comportamental diferente da utilizada na exposição inicial (RODGERS; SHEPHERD, 1993; CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005; STERN; CAROBREZ; BERTOGLIO, 2008; GAZARINI; STERN; BERTOGLIO, 2011). Estudos tem demonstrado que a administração de drogas amnésicas antes da primeira exposição previne a ocorrência de OTT, enquanto a facilitação da consolidação da memória adquirida na primeira exposição o potencializa (FILE; MABBUTT; HITCHCOTT, 1990; STERN; CAROBREZ; BERTOGLIO, 2008). Nesse contexto, injeções de histamina no vérmis cerebelar produziram prejuízo na

consolidação da memória emocional de camundongos expostos ao reteste no LCE (GIANLORENÇO et al., 2012).

Entretanto, resultados do nosso grupo de pesquisa demonstraram que a neurotransmissão pelo complexo receptor GABA/benzodiazepínico de neurônios presentes na substância cinzenta periaquedutal (SCP) está envolvida no estabelecimento do OTT, uma vez que a administração de midazolam diretamente nesta estrutura antes da reexposição, não resulta em efeitos ansiolíticos em animais que foram expostos previamente ao LCE (REIS;CANTO-DE-SOUZA, 2008). Porém em outro estudo, a administração intra-amígdala de midazolam produziu efeito ansiolítico em camundongos re-expostos ao LCE, mostrando que os receptores GABA/benzodiazepínicos presentes na amígdala parecem não ter envolvimento no OTT (BARBALHO; NUNES-DE-SOUZA; CANTO-DE-SOUZA, 2009).

Além da participação da neurotransmissão gabaérgica, outros estudos evidenciam a participação de diferentes neurotransmissores como o glutamato, serotonina e dopamina em estruturas encefálicas tais como, hipotálamo dorsomedial, córtex pré-frontal medial e hipocampo, ligadas ao aprendizado emocional durante a primeira exposição ao LCE e no desenvolvimento do OTT (FILE; MABBUTT; HITCHCOTT, 1990; FILE et al., 1994; NUNES-DE-SOUZA et al., 2000; CANTO-DE-SOUZA; NUNES-DE-SOUZA; RODGERS, 2002; CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005; ALBRECHET-SOUZA et al., 2007; STERN et al., 2010; GAZARINI; STERN; BERTOGLIO, 2011).

Anatomicamente, o córtex pré-frontal medial (CPFm) compõe parte do córtex pre-frontal. Na sua porção ventromedial, o CPFm compreende

subdivisões pré-límbica (PrL), infralímbica (IL) e o córtex orbital medial, além de uma porção dorsal que compreende o córtex cingulado anterior, córtex precentral medial e uma porção dorsal do PrL (PAXINOS; FRANKLIN, 2001; RESSTEL; CORRÊA, 2006; HOOVER; VERTES, 2007). O CPFm é uma estrutura encefálica com conexões proeminentes com outras estruturas límbicas e possui papel essencial tanto na formação de memórias aversivas, como na modulação neuroendócrina em resposta ao estresse (JONES et al., 2011; ZHANG et al., 2012). As estruturas límbicas são as responsáveis por processar e integrar informações relacionadas a resposta defensiva. Dentre as principais estruturas do sistema límbico temos: hipocampo, tálamo, hipotálamo, amígdala, giro cingulado e o córtex pré-frontal (BRANDÃO, 2004). Tanto em humanos como em roedores o CPFm está envolvido em amplos e variados aspectos da cognição, incluindo a regulação da atenção, o comportamento inibitório, aprendizagem e memória (LAMPREA et al., 2000; CARVALHO et al., 2005; MILLER; MCEWEN, 2006). Porém, a função dessa estrutura nos processos que envolvem ansiedade e a memória aversiva no LCE não está totalmente esclarecida. Resultados tem demonstrado diferenças nas funções entre as regiões PrL e IL. Neste sentido, a microestimulação do PrL aumenta a expressão e extinção do medo contextual; enquanto a microestimulação do IL diminui a aquisição e extinção desse tipo de memória aversiva (VIDAL-GONZALEZ et al., 2006). Além disso, estudos evidenciaram o papel do CPFm na resposta neuroendócrina induzida por situações aversivas, onde o PrL bloqueia a ativação do eixo hipotálamo-hipófise, adrenal (HPA), enquanto a subdivisão IL exerce o antagonismo deste (RADLEY; ARIAS; SAWCHENKO, 2006; JONES; MYERS; HERMAN, 2011).

Dados da literatura indicam um papel essencial dos hormônios do estresse nas funções cerebrais, na formação, consolidação e expressão de memórias aversivas (JOËLS et al., 2006a). Assim, durante a exposição a novidade e, principalmente, durante situações potencialmente ameaçadoras os corticosteróides (p. ex. corticosterona em roedores, cortisol no homem) são mediadores do estresse (DE KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005), facilitando a adaptação e a consolidação da informação frente a potenciais ameaças. Neste sentido, foi demonstrado um papel crucial para os corticosteróides no desenvolvimento do OTT, identificando uma importante correlação entre a liberação desses hormônios e a expressão de comportamentos de avaliação de risco em ratos expostos ao LCE, tanto no teste como no reteste (ALBRECHET-SOUZA et al., 2007).

Quando o organismo percebe o estímulo estressor, principalmente dois sistemas são ativados: o eixo simpato-adrenal e o HPA. Inicialmente ocorre a ativação do complexo amigdalóide que estimula o hipotálamo, o qual promove a ativação do sistema simpático. Esse por sua vez, atua tanto na região medular das glândulas adrenais estimulando a liberação de catecolaminas (noradrenalina e adrenalina); como no núcleo do trato solitário e locus coeruleus promovendo a liberação de noradrenalina nas regiões encefálicas. O segundo sistema ativado em resposta ao estresse é o HPA. O início dessa resposta começa com a secreção do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) pelas células parvocelulares do hipotálamo. O CRH na adeno-hipófise anterior, promove a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na corrente sanguínea. No córtex das glândulas adrenais, o ACTH estimula a

síntese e liberação dos corticosteroides. Essas vias sofrem retroalimentação negativa (HYMAN, 2009).

Os corticoides são moléculas lipossolúveis sintetizadas a partir do colesterol que se fundem através da membrana citoplasmática, ligando-se ao seu receptor e formam dímeros. O seu receptor, pertence a grande família de receptores nucleares, no entanto, ele permanece no citosol. Sem ligação com os corticosteroides, o receptor encontra-se ligado às chaperonas que são proteínas que proporcionam estabilidade e afinidade pelos corticosteroides. Uma vez os corticosteroides ligam-se ao seu receptor, o complexo receptor – corticosteroide sofre mudança conformacional, desligando-se das suas chaperonas deslocando-se, assim através dos poros da membrana até o núcleo. A ligação receptor e corticosteroides, regula a expressão gênica de 3 formas: a) ligando-se diretamente ao seu domínio no DNA, b) interagindo com outros fatores de ativação ou repressão da transcrição do DNA; e c) ligando-se diretamente ao DNA e interagindo com fatores vizinhos de ativação ou repressão da transcrição gênica. Os corticosteroides podem sinalizar de forma não genômica através das alterações na atividade de várias kinases (CAIN; CIDLOWSKI, 2015).

O subtipo MR está presente principalmente em neurônios da formação hipocampal, septo lateral e moderadamente na amígdala, locus coeruleus, núcleo paraventricular e o CPFm, acarretando em ações primárias envolvendo cognição, emoção e processamento inicial do estresse. Os receptores GR estão encontrados na maioria das áreas encefálicas como no CPFm, atuando tanto no processamento emocional quanto na estabilização dos processos neuroquímicos em resposta ao aprendizado (DE KLOET, 1991; DE KLOET;

JOËLS; HOLSBOER, 2005). Apesar da ampla distribuição dos receptores GR, eles estão presentes em maior número em áreas como o hipocampo, amígdala, septo lateral e núcleo paraventricular, onde controlam não só o aprendizado aversivo, mas também a alça de retroalimentação do eixo HPA (REUL; DE KLOET, 1986).

Neste contexto, vários estudos têm demonstrado que a atividade normal dos corticosteroides sobre os receptores GR, parecem ter um papel essencial na modulação dos processos mnemônicos ligados a situações aversivas (DE QUERVAIN et al., 2000; JOËLS et al., 2006a). Assim Rimmele et al., (2010) e Rimmele et al., (2013) demonstraram que o bloqueio ou a hiperatividade dos corticosteroides sobre os receptores GR prejudica a aquisição e a consolidação da aprendizagem em uma variedade de tarefas, tanto em humanos, quanto em animais de laboratório.

Embora estudos apontem para uma ampla distribuição de receptores corticosteroides no complexo amigdalóide, pouca ou moderada expressão destes receptores ocorre na SCP (JOËLS; BARAM, 2009), sugerindo que os resultados diferentes obtidos com a administração de midazolam intra-amígdala e intra-SCP antes do reteste no LCE, possam ser decorrentes de uma modulação diferente realizada pelos receptores corticosteroides.

Levando em consideração os trabalhos descritos na literatura sobre o OTT, recentemente estudo do nosso laboratório demonstrou que injeções de RU28318 (antagonista seletivo dos receptores MR) no CPFm, restaurou os efeitos ansiolíticos do midazolam administrado antes do reteste no labirinto em camundongos (ALBERNAZ et al., 2018).

Entretanto, nenhum estudo investigou se os receptores glicocorticóides da subdivisão IL do CPFm podem estar envolvidos no estabelecimento do OTT. Desta forma, levando em consideração as evidências de que o aprendizado emocional de animais expostos à primeira sessão no LCE pode ser um fator preponderante para a mudança na estratégia comportamental, e na diminuição e/ou abolição dos efeitos dos benzodiazepínicos em animais reexpostos ao aparato, bem como nas evidências que demonstram que os corticosteróides podem estar envolvidos na aquisição/consolidação deste aprendizado, será importante investigar se os receptores GR estão envolvidos no estabelecimento do OTT.

Diante das evidências da literatura apontadas acima, a nossa hipótese é que os receptores GR participam na formação da memória ligada à primeira exposição ao LCE.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar o papel dos receptores glicocorticóides (GR) presentes na região infralímbica (IL) do córtex pré-frontal medial (CPFm), na memória de camundongos submetidos ao protocolo de teste e reteste no labirinto em cruz elevado (LCE).

2.2. Objetivos específicos

1. Avaliar o efeito do antagonista GR no CPFm (região IL) sobre a fase de aquisição da memória de camundongos submetidos ao protocolo de teste e reteste no LCE.
2. Avaliar o papel dos receptores GR do CPFm (região IL) sobre a fase de consolidação da memória de camundongos submetidos ao protocolo de teste e reteste no LCE.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. Sujeitos

Foram utilizados 128 camundongos adultos machos da linhagem Suíço albino, com idade entre 35 e 45 dias e peso entre 30-40g, provenientes do biotério central da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar. Os sujeitos foram alojados no biotério setorial do laboratório de Psicologia da Aprendizagem (LPA), agrupados em gaiolas coletivas (41x34x16cm, 10 por gaiola), mantidos em condições controladas de temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) e luz (ciclo de 12/12 horas, luzes acesas às 07:00 e apagadas às 19:00 horas), com livre acesso ao alimento e à água, exceto durante os curtos períodos de teste.

3.2. Drogas

Para os testes experimentais:

- Midazolam, 8-cloro-6-(2-fluorofenil)-1-metil-4H-imidazo(1,5a)(1,4) benzodiazepina (MDZ, agonista GABA_A-benzodiazepínico; Roche®, Brasil), na dose de 2,0 mg/kg, (intraperitoneal, i.p.), diluído em salina estéril (0,9% NaCl), utilizado como controle (grupo veículo).

- RU486 (antagonista GR; Tocris Bioscience, EUA), nas doses de 0,3 e 1,0 ng/0,1μL (intra- CPFm), dissolvido em veículo (2% etanol, diluído em solução fisiológica 0,9% NaCl), utilizado como controle (grupo veículo).

Para os procedimentos cirúrgicos:

- Cloridrato de cetamina e Xilazina (100mg/kg e 10mg/kg respectivamente, i.p, anestésico; Syntec, Brasil),

- Cetoprofeno (5,0 mg/kg, i.p., anti-inflamatório) e ceftriaxona (4 mg/kg, i.p., antibiótico).

As doses foram escolhidas de acordo com estudos prévios (KIM et al., 1998; MESSIER; KALASKA, 1999; NUNES-DE-SOUZA et al., 2000; MCEOWN; TREIT, 2011; TER HORST et al., 2014).

3.3. Cirurgia estereotáxica e Injeção

Após anestesia com solução de cloridrato de cetamina e xilazina (100mg/kg e 10 mg/kg, i.p., respectivamente), os animais passaram por cirurgia para a implantação bilateral intracraniana de cânulas-guia (25-gauge x 7 mm; Insight Equipamentos, Brasil) direcionadas para o córtex pré-frontal infralímbico (CPFm IL) e fixadas com resina acrílica (JET®). As coordenadas estereotáxicas utilizadas foram: +1,7 mm anterior ao bregma; 0,3 mm bilateralmente a linha média e -1 mm ventral à superfície craniana (PAXINOS; FRANKLIN, 2001). Um mandril de aço inoxidável (33-gauge; Fishtex®, Brasil) foi inserido dentro de cada cânula-guia para evitar obstrução e prevenir contaminação. Após o término do procedimento cirúrgico, os camundongos receberam injeção do antiinflamatório cetoprofeno (5mg/kg i.p) (LU et al., 2004) e do antibiótico ceftriaxona (4mg/kg, i.m) (STEPANOVIC-PETROVIC et al., 2014) para auxiliar na recuperação pós-operatória.

No dia do teste os animais receberam injeções bilaterais 5 minutos antes da exposição ao LCE. As agulhas de injeção (33-gauge, aço inoxidável, Insight Equipamentos, Brasil), cujo comprimento ultrapassa em aproximadamente 2,0 mm as pontas das cânulas-guia, foram inseridas dentro das mesmas para a injeção de veículo ou RU486 intra-CPFm-IL. A agulha de injeção foi conectada,

por meio de tubo de polietileno (PE-10), a microsseringa Hamilton de 10 μ L acoplada em uma bomba de infusão (BI 2000 – Insight Equipamentos, Brasil), que foi programada para injetar 0,1 μ L de solução durante 30 segundos.

O procedimento de injeção bilateral consistiu na remoção do mandril, inserção da agulha de injeção e a injeção das soluções por 30 segundos. A permanência da agulha de injeção foi por 60 segundos, enquanto o animal era contido 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 confirmou o fluxo da solução (NUNES-DE-SOUZA et al., 2008).

3.4. Labirinto em Cruz Elevado

O Labirinto em cruz elevado (LCE) é um aparato construído em madeira, composto de quatro braços dispostos uns dos outros de forma ortogonal, sendo dois fechados lateralmente com paredes transparentes (30 x 5 x 15cm) e dois abertos (30 x 5 x 0,25cm), e elevado do solo a 38,5cm. Semelhante ao utilizado por (LISTER, 1987).



Figura 1- Labirinto em cruz elevado (LCE)
Da produção do Laboratório de Psicologia da Aprendizagem (LPA).

3.5. Análise Comportamental

Os experimentos foram gravados por um sistema de câmera conectada a um computador posicionado em sala adjacente a sala de teste. Durante as sessões experimentais foram realizados os registros comportamentais utilizando o programa X-Plo-Rat 2005, versão 1.1.0 (GARCIA; CARDENAS; MORATO, 2005).

A entrada em um braço é definida pelo cruzamento com todas as quatro patas para dentro do braço. As medidas avaliadas foram: % entradas nos braços abertos (entradas nos braços abertos X 100/total de entradas), % de tempo gasto nos braços abertos (tempo gasto nos braços abertos X 100/300), total de entradas nos braços fechados (frequência, também utilizada como medida de atividade locomotora). Também foram avaliados: total de SAP (frequência; stretched attend postures –SAP: 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 mergulhos (frequência; movimento exploratório com a cabeça/ombros para fora dos braços abertos), porcentagem de mergulhos protegidos (protegido = plataforma central = braços fechados), total e levantar (frequência; movimento vertical contra as paredes) (RODGERS; COLE, 1993; CRUZ; FREI; GRAEFF, 1994; RODGERS; JOHNSON, 1995).

3.6. Histologia

Terminados os procedimentos experimentais, os animais foram anestesiados com solução de cloridrato de cetamina e xilazina (100/10 mg/kg,

i.p.), e receberam injeção bilateral (0,1 µL), do corante, azul de Evans 1%, de maneira semelhante ao procedimento de injeção das drogas. Posteriormente, foi realizada a retirada dos encéfalos, que foram acondicionados em formaldeído 10% por no mínimo 24 horas. Previamente ao processo de secção, os encéfalos foram transferidos da solução de formaldeído 10%, e acondicionados em uma solução de sacarose 30%, para promover a crioproteção do tecido durante a secção, e mantidos em geladeira por no mínimo 24 horas.

Utilizando um criostato (Leica CM 1850), os encéfalos foram congelados e cortados em secções de 35µm na proximidade da área demarcada pelo corante. Em seguida, os cortes foram montados em lâminas de microscopia e analisadas quanto ao sítio de injeção com auxílio de um microscópio (Olympus BX41, Olympus, Japão).

3.7. Ética

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animas (CEUA-UFSCar) N°9286190517 (Anexo 1), regido segundo as recomendações da diretriz brasileira para o cuidado e utilização de animais para fins científicos e didáticos, elaborada pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA.

3.8. Delineamento Experimental

3.8.1 Procedimento Geral

Os animais foram transportados para sala adjacente à sala de teste 30 minutos antes do início do experimento, para habituação ao local. As sessões consistiram no dia 1 (Teste), onde os sujeitos foram expostos por 5 minutos ao

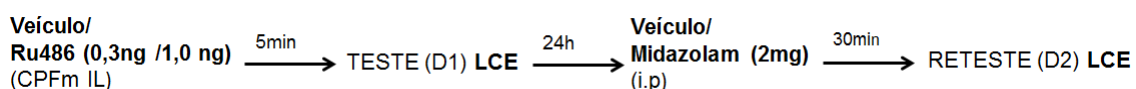
LCE, após 24 horas, foram re-expostos por 5 minutos ao aparelho no dia 2 (Reteste), de acordo com o protocolo de cada experimento.

Após 5 minutos das administrações intra-CPFm (IL) e 30 minutos das administrações sistêmicas, os sujeitos foram submetidos ao teste ou reteste no LCE. Exceto para o Experimento 2, onde a administração inicial do veículo ou RU486 intra-CPFm (IL) foi realizada imediatamente após a primeira exposição ao LCE (Teste).

Após a retirada do animal e antes da exposição de outro, o labirinto foi limpo com algodão umedecido em solução de álcool a 20% (v/v) e seco com papel toalha. Os testes foram conduzidos sob a fase clara do ciclo de luz sob iluminação moderada (77 lux).

3.8.2. Experimento 1. Avaliação dos efeitos do RU486 injetado no CPFm (IL) e do midazolam (i.p.), sobre a aquisição da memória de camundongos expostos a protocolo de teste e reteste no LCE.

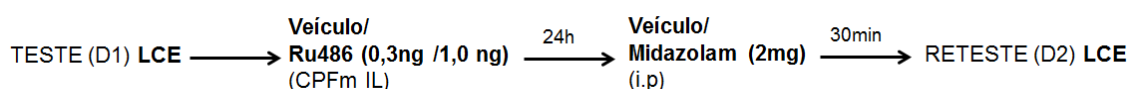
Para avaliar a aquisição da memória, cinco minutos antes da exposição ao teste no LCE, diferentes grupos foram tratados com administrações de veículo ou RU486 (0,3 e 1,0 ng/0,1µL) intra-mPFC (IL). Após 24 horas, metade dos animais de cada grupo foram tratados com veículo (controle) ou MDZ (2mg/kg), e 30 minutos após, os mesmos foram expostos ao reteste no LCE.



Assim, foram formados 6 grupos experimentais: veículo/veículo, veículo/MDZ(2mg/kg), RU486 (0,3ng/0,1µL)/veículo, RU486 (0,3 ng/0,1µL)/MDZ(2mg/kg), RU486 (1,0ng/0,1µL)/veículo, RU486 (1,0 ng/0,1µL)/MDZ (2mg/kg).

3.8.3. Experimento 2. Avaliação dos efeitos do RU486 injetado no CPFm (IL) e midazolam (i.p.), sobre a consolidação da memória de camundongos expostos a protocolo de teste e reteste no LCE.

Para avaliar a evocação da memória, inicialmente os sujeitos foram expostos ao LCE, por 5 minutos. Imediatamente após o teste, quando ocorreu a aquisição da memória, e antes de ocorrer o processo de consolidação, foram formados os grupos que receberam injeção de veículo ou RU486 (0,3 e 1,0 ng/0,1µL) intra-CPFm (IL). Vinte e quatro horas após a primeira injeção, metade dos animais de cada grupo receberam injeção de veículo ou MDZ (2 mg/kg, i.p.), e 30 minutos após foram submetidos ao reteste no labirinto, como delineado abaixo:



Assim, foram formados 6 grupos experimentais: veículo/veículo, veículo/MDZ(2mg/kg), RU486 (0,3 ng/0,1µL)/veículo, RU486 (0,3 ng/0,1µL)/MDZ(2mg/kg), RU486 (1,0 ng/0,1µL)/veículo, RU486 (1,0 ng/0,1µL)/MDZ (2mg/kg).

3.9. Análise estatística

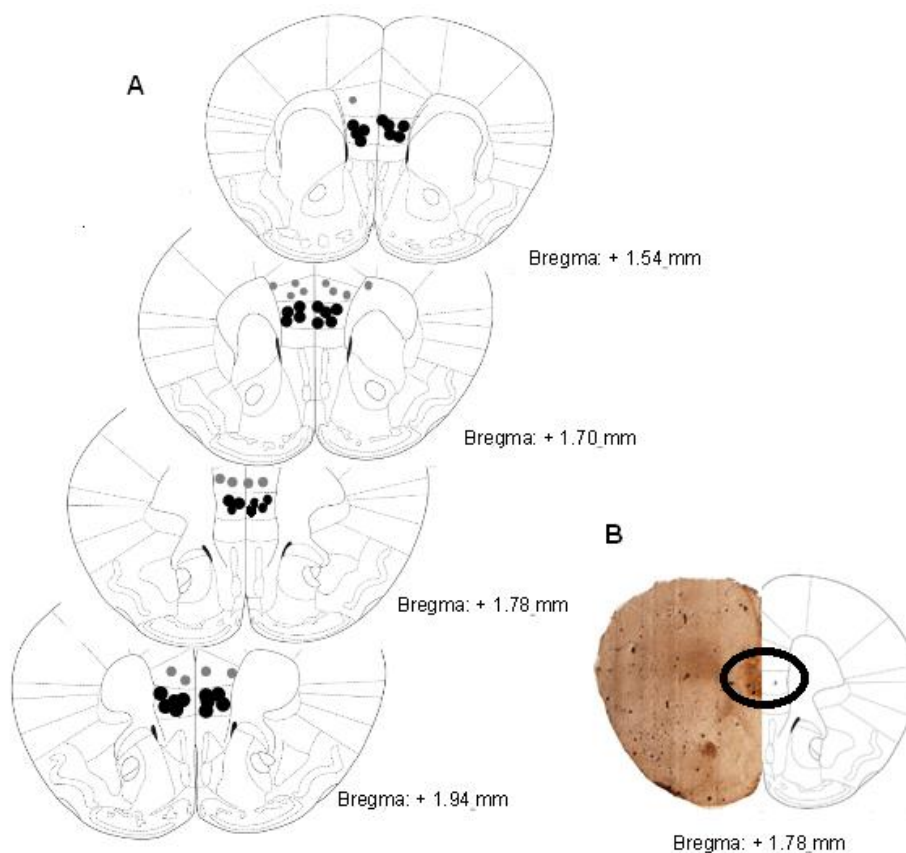
Os dados são apresentados como média \pm EPM (erro padrão da média). Os dados foram analisados pela análise de variância (ANOVA) de duas vias para medidas repetidas [fator 1: teste – veículo ou RU486 (nas doses de 0,3 e 1,0 ng/0,1µL), fator 2: reteste – salina ou MDZ (2mg/kg)].

Os casos de significância foram analisados pelos testes de comparação múltiplas de Duncan. O valor de p menor ou igual a 0,05 foi adotado como nível de significância.

4. RESULTADOS

A análise histológica confirmou que um total de 74 camundongos receberam canulação na região IL do CPFm no Experimento 1 e 54 no Experimento 2 (Figura 2).

Figura 2 – Representação dos sítios de injeção no córtex pré-frontal medial (CPFm IL). (A) Representação esquemática dos locais de injeção dentro (círculos pretos) ou fora (círculos cinza) do CPFm. As seções estão entre + 1,54 e + 1,94 mm do bregma, de acordo com o atlas de Paxinos e Franklin (2001) (PAXINOS; FRANKLIN, 2001). (B) Fotomicrografia de uma secção coronal de um sujeito representativo mostrando o local de injeção (círculo preto) dentro do CPFm IL. Devido à sobreposição, o número de pontos representados é menor do que o número real de camundongos. De produção do próprio autor.



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

Experimento 1: veículo/veículo= 12; veículo/MDZ (2mg/kg)= 14; RU486 (0,3 ng/0,1µL)/veículo= 14; RU486 (0,3 ng/0,1µL)/MDZ (2mg/kg)= 12 no grupo; RU486 (1,0 ng/0,1µL)/veículo= 11; RU486 (1,0 ng/0,1µL)/MDZ (2mg/kg)= 11.

Experimento 2: veículo/veículo= 9; veículo/MDZ (2mg/kg)= 11; RU486 (0,3 ng/0,1µL)/veículo= 8; RU486 (0,3 ng/0,1µL)/MDZ (2mg/kg)= 9; RU486 (1,0 ng/0,1µL)/veículo= 8; RU486 (1,0 ng/0,1µL)/MDZ (2mg/kg)= 9.

4.1. Experimento 1. Avaliação dos efeitos do RU486 injetado no CPFm (IL) e do midazolam (i.p.), sobre a aquisição da memória de camundongos expostos a protocolo de teste e reteste no LCE.

A Figura 3 (A, B, C) mostra os efeitos da injeção de veículo ou RU486 (0,3 e 1,0 ng/0,1µL) no CPFm (IL) antes do teste, e de veículo ou MDZ (2mg/kg, i.p.) antes do reteste em camundongos avaliados no LCE.

A ANOVA de dois fatores (pré-tratamento, intra CPFm IL e tratamento, sistêmico) não mostrou diferença significativa para a porcentagem de entradas nos braços abertos [pré-tratamento ($F(2,68)=0,75$, $P>0,05$) e tratamento ($F(1,68)=3,47$, $P>0,05$), exceto para a interação pré-tratamento e tratamento que apresentou efeito estatístico significativo ($F(2,68)=3,51$, $P>0,05$). O teste de Duncan mostrou que no reteste ocorreu aumento significativo na porcentagem de entradas nos braços abertos para o grupo midazolam (Veículo/MDZ), em comparação ao grupo controle (veículo/veículo). Os grupos RU486 0,3/MDZ e RU486 1,0/MDZ, apresentaram diminuição na porcentagem de entradas nos braços abertos quando comparados ao grupo midazolam (Veículo/MDZ).

O post hoc mostrou que no reteste ocorreu diminuição na porcentagem de entradas nos braços abertos para os grupos Veículo/Veículo, RU486 0,3/Veículo, RU486 0,3/MDZ, RU486 1,0/Veículo e RU486 1,0/MDZ, quando comparados aos respectivos grupos no teste. O post hoc mostrou que nenhum dos grupos Veículo/MDZ, RU486 0,3/Veículo, RU486 0,3/MDZ, RU486 1,0/Veículo e RU486 1,0/MDZ, alterou a porcentagem de entradas nos braços abertos quando comparados ao controle (Veículo/Veículo) durante o teste **(Figura 3A)**.

A ANOVA de dois fatores (pré-tratamento, intra CPFm IL e tratamento, sistêmico) não mostrou diferença significativa para a porcentagem tempo gasto nos braços abertos [pré-tratamento ($F(2,68)=1,22$, $P>0,05$) e tratamento ($F(1,68)=2,80$, $P>0,05$), exceto para a interação pré-tratamento e tratamento que apresentou efeito estatístico significativo ($F(2,68)=6,43$, $P<0,05$). O teste de Duncan mostrou que no reteste ocorreu aumento significativo na porcentagem de tempo gasto nos braços abertos para o grupo midazolam (Veículo/MDZ), em comparação ao grupo controle (veículo/veículo). Os grupos RU486 0,3/MDZ e RU486 1,0/MDZ, apresentaram diminuição na porcentagem de tempo gasto nos braços abertos quando comparados ao grupo midazolam (Veículo/MDZ).

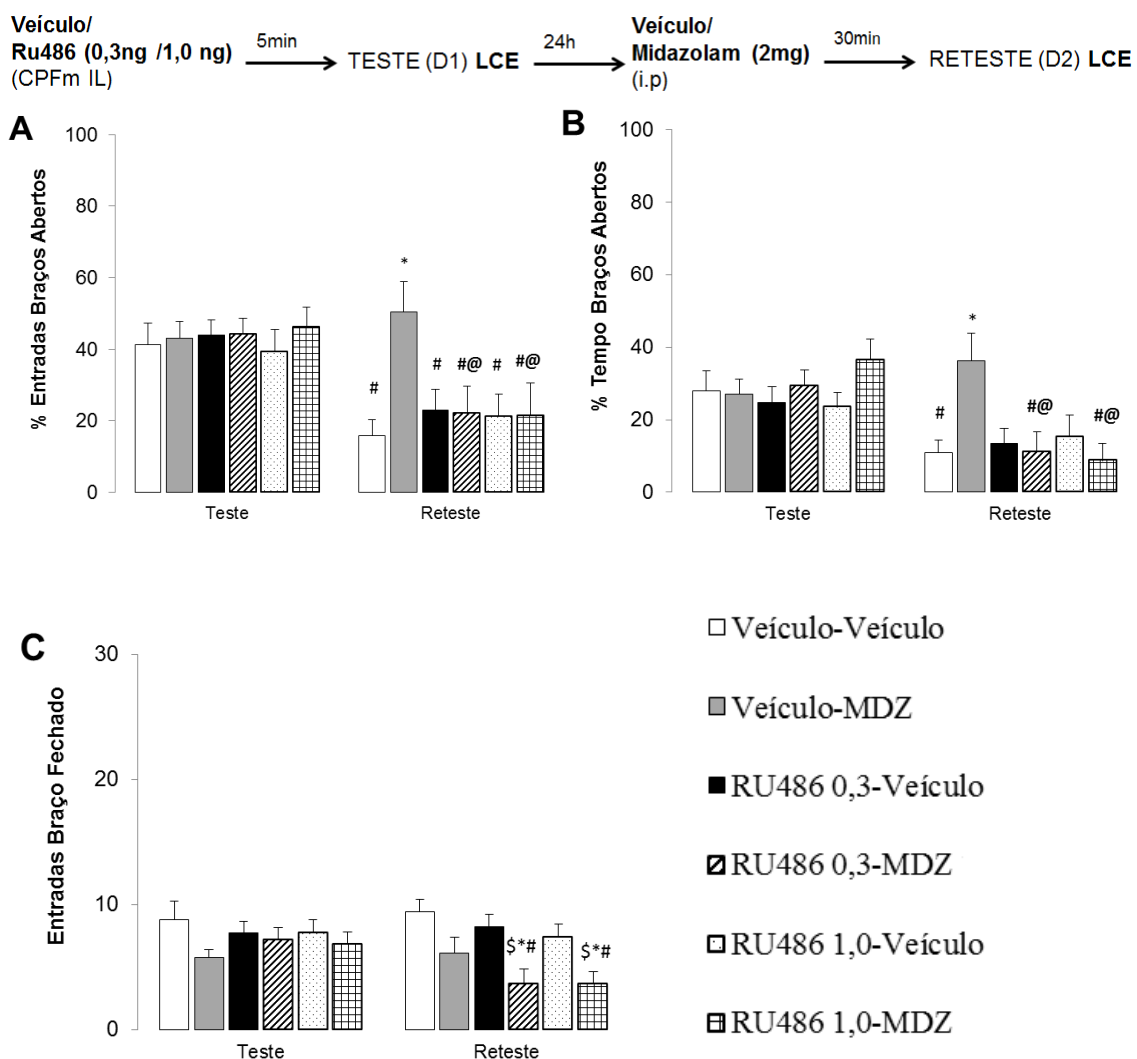
O post hoc mostrou que no reteste ocorreu diminuição na porcentagem de tempo gasto nos braços abertos para os grupos Veículo/Veículo, RU486 0,3/MDZ e RU486 1,0/MDZ, quando comparados aos respectivos grupos no teste. O post hoc mostrou que nenhum dos grupos Veículo/MDZ, RU486 0,3/Veículo, RU486 0,3/MDZ, RU486 1,0/Veículo e RU486 1,0/MDZ, alterou a

porcentagem de entradas nos braços abertos quando comparados ao controle (Veículo/Veículo) durante o teste (**Figura 3B**).

A ANOVA de dois fatores (pré-tratamento, intra CPFm IL e tratamento, sistêmico) não mostrou diferença significativa para as entradas nos braços fechados [pré-tratamento ($F(2,68)=0,93$, $P>0,05$) e interação pré-tratamento e tratamento ($F(1,68)=1,12$, $P>0,05$), exceto para o tratamento que apresentou efeito estatístico significativo ($F(2,68)=14,87$, $P<0,05$). O teste de Duncan mostrou que no reteste ocorreu diminuição das entradas nos braços fechados para os grupos RU486 0,3/MDZ e RU486 1,0/MDZ, quando comparados ao grupo Veículo/Veículo e ao seu respectivo grupo RU486 0,3/Veículo e RU486 1,0/Veículo.

O post hoc mostrou que no reteste ocorreu diminuição nas entradas dos braços fechados para os grupos RU486 0,3/MDZ e RU486 1,0/MDZ, quando comparados aos respectivos grupos no teste. O post hoc mostrou que nenhum dos grupos veículo/MDZ, RU486 0,3/Veículo, RU486 0,3/MDZ, RU486 1,0/Veículo e RU486 1,0/MDZ, alterou as entradas nos braços fechados quando comparados ao controle (Veículo/Veículo) durante o teste (**Figura 3C**).

Figura 3. Efeito das injeções combinadas de RU486 (0,3 e 1,0 ng/0,1 μ L) intra-CPFm IL antes do teste, e de midazolam (MDZ 2mg/Kg, i.p) antes do reteste em camundongos expostos ao protocolo de teste e reteste no labirinto em cruz elevado (LCE).



As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) para a % de entradas nos braços abertos (A), a % de tempo gasto nos braços abertos (B) e entradas nos braços fechados (C) (n=11-14). *p<0,05 em comparação ao respectivo grupo veículo (Veículo/Veículo). #p<0,05 em comparação ao respectivo grupo no teste. @ p<0,05 em comparação ao respectivo grupo midazolam. \$p<0,05 em comparação ao respectivo grupo RU486 0,3/Veículo ou RU4861,0/Veículo.

A Tabela 1 mostra os efeitos da injeção de veículo ou RU486 (0,3 e 1,0 ng/0,1µL) no CPFm (IL) antes do teste, e de veículo ou MDZ (2mg/Kg, i.p.) antes do reteste em camundongos avaliados no LCE.

A ANOVA de dois fatores (pré-tratamento, intra CPFm IL e tratamento, sistêmico) mostrou diferença significativa para o total de SAP [pré-tratamento ($F(2,68)=3,13$, $P<0,05$), tratamento ($F(1,68)=14,85$, $P<0,05$), e para a interação pré-tratamento e tratamento $F(2,68)=6,88$, $P<0,05$]. O teste de Duncan mostrou que no reteste ocorreu diminuição significativa do total de SAP para os grupos RU486 0,3/MDZ e RU486 1,0/MDZ, quando comparados ao grupo midazolam (Veículo/MDZ) e ao seu respectivo grupo RU486 0,3/Veículo e RU486 1,0/Veículo. O post hoc mostrou que no reteste ocorreu diminuição do total de SAP para os grupos RU486 0,3/MDZ e RU486 1,0/MDZ, quando comparados ao respectivo grupo no teste. O post hoc mostrou que nenhum dos grupos Veículo/MDZ, RU486 0,3/Veículo, RU486 0,3/MDZ, RU486 1,0/Veículo e RU486 1,0/MDZ, alterou o total de SAP quando comparados ao controle (Veículo/Veículo) durante o teste (**Tabela 1**).

A ANOVA de dois fatores (pré-tratamento, intra CPFm IL e tratamento, sistêmico) não mostrou diferença significativa para a porcentagem de SAP protegido [pré-tratamento ($F(2,68)=2,88$, $P>0,05$), exceto para o tratamento ($F(1,68)=7,80$, $P<0,05$) e interação pré-tratamento e tratamento ($F(2,68)=4,83$, $P<0,05$) que foram estatisticamente diferentes. O teste de Duncan mostrou que no reteste ocorreu diminuição significativa da porcentagem de esticar protegido para o grupo midazolam (Veículo/MDZ), em comparação ao grupo controle (veículo/veículo). Os grupos RU486 0,3/MDZ e RU486 1,0/MDZ, apresentaram aumento na porcentagem de esticar protegido quando comparados ao grupo

midazolam (Veículo/MDZ). O post hoc mostrou que no reteste ocorreu aumento na porcentagem de esticar protegido para os grupos Veículo/Veículo, RU486 0,3/MDZ e RU486 1,0/MDZ, quando comparados ao respectivo grupo no teste. O post hoc mostrou que nenhum dos grupos Veículo/MDZ, RU486 0,3/Veículo, RU486 0,3/MDZ, RU486 1,0/Veículo e RU486 1,0/MDZ, alterou a porcentagem de esticar protegido quando comparados ao controle (Veículo/Veículo) durante o teste (**Tabela 1**).

A ANOVA de dois fatores (pré-tratamento, intra CPFm IL e tratamento, sistêmico) não mostrou diferença significativa para o total de mergulhos para [pré-tratamento ($F(2,68)=1,31$, $P>0,05$) e tratamento ($F(1,68)=0,0007$, $P>0,05$), exceto para a interação pré-tratamento e tratamento que apresentou efeito estatístico significativo ($F(2,68)=6,22$, $P<0,05$). O teste de Duncan mostrou que no reteste ocorreu aumento significativo do total de mergulhos para o grupo midazolam (Veículo/MDZ), em comparação ao grupo controle (veículo/veículo). Os grupos RU486 0,3/MDZ e RU486 1,0/MDZ, apresentaram diminuição no total de mergulhos quando comparados ao grupo midazolam (Veículo/MDZ). O post hoc mostrou que no reteste ocorreu diminuição no total de mergulhos para os grupos Veículo/Veículo, RU486 0,3/MDZ e RU486 1,0/MDZ, quando comparados aos respectivos grupos no teste. O post hoc mostrou que nenhum dos grupos Veículo/MDZ, RU486 0,3/Veículo, RU486 0,3/MDZ, RU486 1,0/Veículo e RU486 1,0/MDZ, alterou o total de mergulhos quando comparados ao controle (Veículo/Veículo) durante o teste (**Tabela 1**).

A ANOVA de dois fatores (pré-tratamento, intra CPFm IL e tratamento, sistêmico) não mostrou diferença significativa para a porcentagem de mergulhos protegidos [pré-tratamento ($F(2,68)=1,33$, $P>0,05$) e interação pré-

tratamento e tratamento ($F(2,68)=2,28$, $P>0,05$), exceto para o tratamento que apresentou efeito estatístico significativo ($F(1,68)=7,95$, $P<0,05$). O teste de Duncan mostrou que no reteste ocorreu diminuição significativa da porcentagem de mergulhos protegidos para o grupo midazolam (Veículo/MDZ 2), em comparação ao grupo controle (veículo/veículo). Os grupos RU486 0,3/MDZ e RU486 1,0/MDZ, apresentaram aumento na porcentagem de mergulhos protegidos quando comparados ao grupo midazolam (Veículo/MDZ). O post hoc mostrou que no reteste ocorreu aumento na porcentagem de mergulhos protegidos para o grupo Veículo/Veículo quando comparado ao respectivo grupo no teste. O post hoc mostrou que nenhum dos grupos Veículo/MDZ, RU486 0,3/Veículo, RU486 0,3/MDZ, RU486 1,0/Veículo e RU486 1,0/MDZ, alterou a porcentagem de mergulhos protegidos quando comparados ao controle (Veículo/Veículo) durante o teste (**Tabela 1**).

A ANOVA de dois fatores (pré-tratamento, intra CPFm IL e tratamento, sistêmico) não mostrou diferença significativa para a frequência de levantar [pré-tratamento ($F(2,68)=2,04$, $P>0,05$) e interação pré-tratamento e tratamento ($F(2,68)=0,05$, $P>0,05$), exceto para o tratamento que apresentou efeito estatístico significativo ($F(1,68)=10,76$, $P<0,05$). O teste de Duncan mostrou que no reteste ocorreu diminuição da frequência de levantar para o grupo RU486 1,0/MDZ em comparação ao grupo controle (veículo/veículo). O post hoc mostrou que no reteste ocorreu diminuição no grupo RU486 0,3/MDZ para a frequência de levantar, quando comparados ao respectivo grupo no teste. O post hoc mostrou que nenhum dos grupos Veículo/MDZ, RU486 0,3/MDZ, RU486 1,0/Veículo e RU486 1,0/MDZ, alterou a frequência de

levantar quando comparados ao controle (Veículo/Veículo) durante o teste
(Tabela1).

Tabela 1. Efeito das injeções combinadas de RU486 (0,3 e 1,0 ng/0,1µL) intra-CPFm IL antes do teste, e de midazolam (MDZ 2mg/Kg, i.p) antes do reteste em camundongos expostos ao protocolo de teste e reteste no labirinto em cruz elevado (LCE).

Tratamento	Comportamentos									
	Total SAP		% SAP Protegido		Total Mergulho		%Mergulho Protegido		Frequência Levantar	
	Teste	Reteste	Teste	Reteste	Teste	Reteste	Teste	Reteste	Teste	Reteste
Veículo-Veículo	52,7 ± 3,6	60,4 ± 3,9	72,4 ± 5,1	89,1 ± 3,7#	49,4 ± 5,3	27,5 ± 5,6#	51,6 ± 5,1	75,5 ± 6,5#	20,1 ± 2,9	23,4 ± 2,3
Veículo-MDZ	51,5 ± 3,9	50,2 ± 5,5	66,4 ± 5,9	61,7 ± 7,2*	42,8 ± 4,8	51,3 ± 10,5*	46,1 ± 7,5	33,1 ± 8,3*	14,9 ± 1,8	19,5 ± 2,8
RU486 0,3-Veículo	49,7 ± 4	61 ± 3,8	77,2 ± 3,5	87,9 ± 3,8	48 ± 4,8	31,7 ± 3,8	53,6 ± 6,1	72,2 ± 6,5	19,7 ± 2,3	20 ± 2,2
RU486 0,3-MDZ	57,4 ± 3,4	26,9 ± 6,8\$*#@	69,3 ± 4,5	87,4 ± 5,4#@	50,8 ± 5,8	18,5 ± 5,7#@	47,6 ± 6,5	59,6 ± 10,9@	25,4 ± 3	12,9 ± 3,9#
RU486 1,0-Veículo	50,1 ± 3,5	54,9 ± 4,4	80,2 ± 4	87,3 ± 4,1	41,8 ± 4,4	31,5 ± 5,2	55,6 ± 5,2	72,7 ± 8,1	24,7 ± 1,3	25 ± 3,9
RU486 1,0-MDZ	52,5 ± 2,8	19 ± 5,0\$*#@	66,6 ± 5,4	88,3 ± 4,7#@	46,3 ± 4,3	20,6 ± 8,7#@	46,3 ± 5,8	68,2 ± 11,3@	18 ± 2,3	12,5 ± 2,1\$*

Os dados representam a média ± erro padrão da média (n=11-14). *p<0,05 em comparação ao respectivo grupo veículo. #p<0,05 em comparação ao respectivo grupo no teste. @ p<0,05 em comparação ao respectivo grupo midazolam. \$p<0,05 em comparação ao respectivo grupo RU486 0,3/Veículo ou RU4861,0/Veículo.

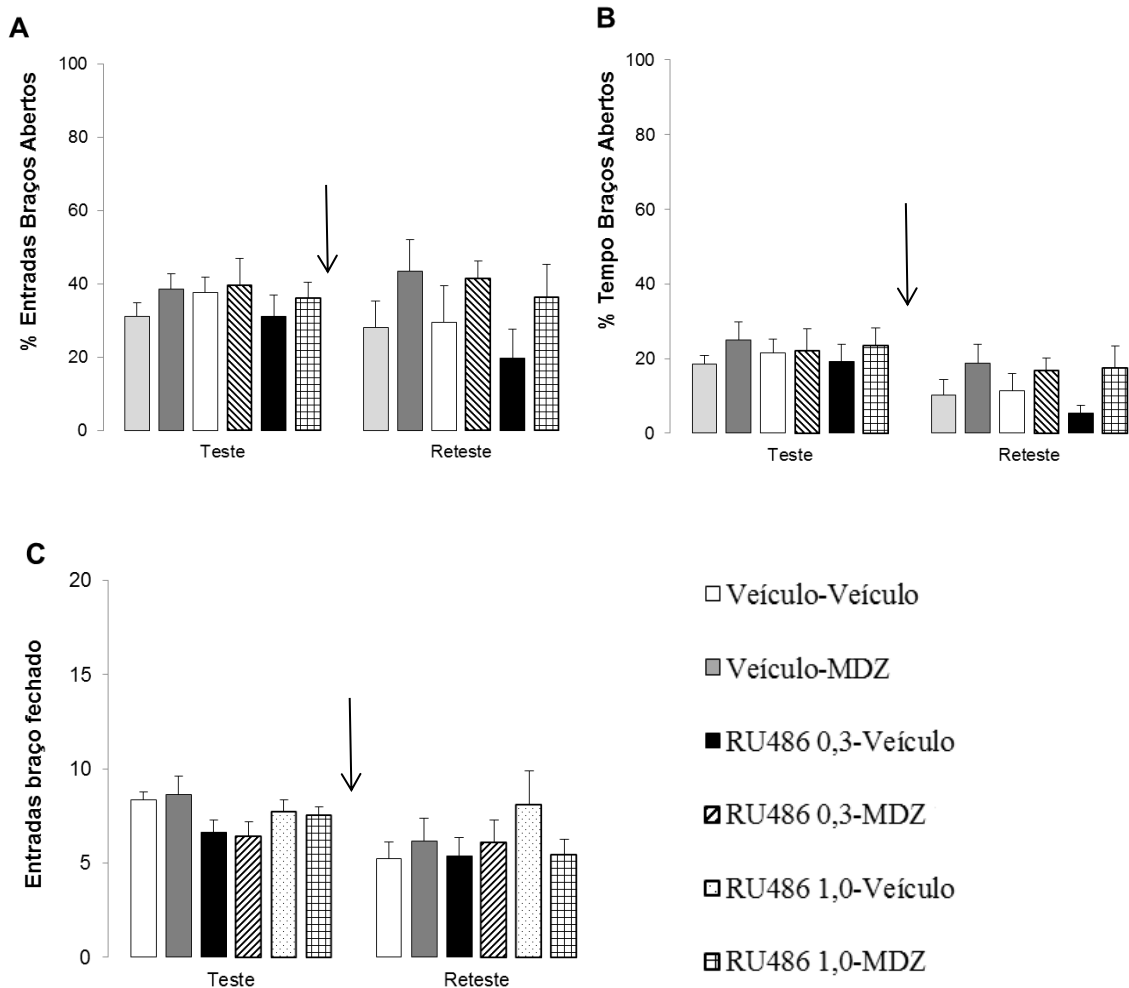
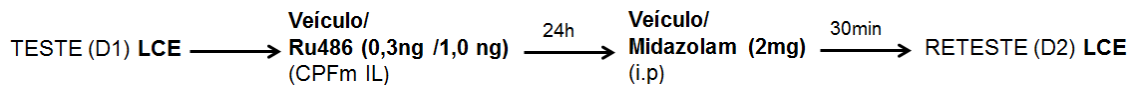
SAP= esticar.

4.2. Experimento 2. Avaliação dos efeitos do RU486 injetado no CPFm (IL) e do midazolam (i.p.), sobre a consolidação da memória de camundongos expostos ao protocolo de teste e reteste no LCE.

A Figura 4 (A, B, C) mostra os efeitos da injeção de veículo ou RU486 (0,3 e 1,0 ng/0,1 μ L) no CPFm (IL) imediatamente após o teste, e veículo ou MDZ (2mg/Kg, i.p.) antes do reteste em camundongos avaliados no LCE.

A ANOVA de dois fatores (pré-tratamento, intra CPFm IL e tratamento, sistêmico) não mostrou diferença significativa para os seguintes comportamentos: porcentagem de entradas nos braços abertos [pré-tratamento ($F(2,48)=0,67$, $P>0,05$), tratamento ($F(1,48)=6,85$, $P>0,05$), e para a interação pré-tratamento e tratamento ($F(2,48)=0,13$, $P>0,05$) (**Figura 4A**); porcentagem de tempo gasto nos braços abertos [pré-tratamento ($F(2,48)=0,19$, $P>0,05$), tratamento ($F(1,48)=3,21$, $P>0,05$), e para a interação pré-tratamento e tratamento ($F(2,48)=0,18$, $P>0,05$) (**Figura 4B**); entradas nos braços fechados [pré-tratamento ($F(2,48)=1,16$, $P>0,05$), tratamento ($F(1,48)=0,11$, $P>0,05$), e para a interação pré-tratamento e tratamento ($F(2,48)=1,04$, $P>0,05$) (**Figura 4C**).

Figura 4. Efeito das injeções combinadas de RU486 (0,3 e 1,0 ng/0,1 μ L) intra-CPFm IL imediatamente depois do teste, e de midazolam (MDZ 2mg/Kg, i.p) antes do reteste em camundongos expostos ao protocolo de teste e reteste no labirinto em cruz elevado (LCE).



As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) para a % de entradas nos braços abertos (A), a % de tempo gasto nos braços abertos (B) e entradas nos braços fechados (C) (n=8-11). A seta representa o momento de injeção após o teste.

A Tabela 2 mostra os efeitos da injeção de veículo ou RU486 (0,3 e 1,0 ng/0,1 μ L) no CPFm (IL) imediatamente após o teste, e de veículo ou MDZ (2mg/kg, i.p.) antes do reteste em camundongos avaliados no LCE.

A ANOVA de dois fatores (pré-tratamento, intra CPFm IL e tratamento, sistêmico) não mostrou diferença significativa para os seguintes compostamentos: total de SAP [pré-tratamento ($F(2,48)=0,11$, $P>0,05$), tratamento ($F(1,48)=0,61$, $P>0,05$), e para a interação pré-tratamento e tratamento ($F(2,48)=0,91$, $P>0,05$); porcentagem de SAP protegido [pré-tratamento ($F(2,48)=0,22$, $P>0,05$), tratamento ($F(1,48)=3,02$, $P>0,05$), e para a interação pré-tratamento e tratamento ($F(2,48)=0,32$, $P>0,05$); total de mergulhos [pré-tratamento ($F(2,48)=0,31$, $P>0,05$), tratamento ($F(1,48)=0,95$, $P>0,05$), e para a interação pré-tratamento e tratamento ($F(2,48)=0,43$, $P>0,05$); frequência de levantar [pré-tratamento ($F(2,48)=1,00$, $P>0,05$), tratamento ($F(1,48)=0,19$, $P>0,05$), e para a interação pré-tratamento e tratamento ($F(2,48)=0,31$, $P>0,05$) (**Tabela 2**).

A ANOVA de dois fatores (pré-tratamento, intra CPFm IL e tratamento, sistêmico) não mostrou diferença significativa para a porcentagem de mergulhos protegidos [pré-tratamento ($F(2,68)=0,43$, $P>0,05$) e interação pré-tratamento e tratamento ($F(2,68)=0,75$, $P>0,05$)], exceto para o tratamento que apresentou efeito estatístico significativo ($F(1,68)=5,64$, $P<0,05$). O teste de Duncan mostrou que no reteste ocorreu aumento significativo da porcentagem de mergulhos protegidos para o grupo RU486 1,0/Veículo, quando comparado ao respectivo grupo no teste. O post hoc mostrou que nenhum dos grupos Veículo/MDZ, RU486 0,3/Veículo, RU486 0,3/MDZ, RU486 1,0/Veículo e

RU486 1,0/MDZ, alterou a porcentagem de mergulhos protegidos quando comparados ao controle (Veículo/Veículo) durante o teste.

O post hoc mostrou que no reteste ocorreu diminuição da porcentagem de mergulhos protegidos no grupo RU486 1,0/MDZ, quando comparado ao seu respectivo grupo RU486 1,0/Veículo (**Tabela 2**).

Tabela 2. Efeito das injeções combinadas de RU486 (0,3 e 1,0 ng/0,1µL) intra-CPFM IL imediatamente depois do teste, e de midazolam (MDZ 2mg/Kg, i.p) antes do reteste em camundongos expostos ao protocolo de teste e reteste no labirinto em cruz elevado (LCE).

Tratamento	Comportamentos									
	Total SAP		% SAP Protegido		Total Mergulho		%Mergulho Protegido		Frequência Levantar	
	Teste	Reteste	Teste	Reteste	Teste	Reteste	Teste	Reteste	Teste	Reteste
Veículo-Veículo	67 ± 4,9	49,7 ± 6,6	86,2 ± 2,6	85,4 ± 5,0	43,7 ± 4,9	22,7 ± 7,5	66,5 ± 6,2	61,7 ± 9,9	25,1 ± 1,7	19,1 ± 3,0
Veículo-MDZ	67,1 ± 4,4	44,3 ± 7,1	76,7 ± 4,9	76,8 ± 6,4	47,1 ± 6,7	31,6 ± 8,8	54,3 ± 5,7	49,0 ± 8,6	25,0 ± 2,2	14,5 ± 2,8
RU486 0,3-Veículo	66,1 ± 6,1	46,2 ± 7,0	77,8 ± 3,5	86,1 ± 4,8	42,3 ± 5,2	29,7 ± 8,6	57,0 ± 6,1	70,2 ± 7,8	26,5 ± 4,2	15 ± 3,6
RU486 0,3-MDZ	67,4 ± 2,6	51,6 ± 7,7	80,4 ± 5,7	82,8 ± 2,5	51,4 ± 5,9	34 ± 4,9	64,2 ± 6,5	59,5 ± 6,1	29,8 ± 3,5	17,2 ± 3,1
RU486 1,0-Veículo	70,3 ± 3,2	59,2 ± 7,7	81,5 ± 4,8	92,7 ± 2,4	42,7 ± 6,9	24,7 ± 4,3	62,6 ± 7,6	82,0 ± 5,8#	30,2 ± 3,7	24,6 ± 5,3
RU486 1,0-MDZ	66,4 ± 3,5	42 ± 7,1	78,4 ± 4,4	82,2 ± 4,8	40 ± 3,2	30,6 ± 10,6	51,5 ± 7,2	52,4 ± 7,7*	27,8 ± 3,1	22,1 ± 4,1

Os dados representam a média ± erro padrão da média (n=8-11). Veículo (injetado imediatamente após o teste); RU486 (Antagonista GR injetado imediatamente após o teste nas diferentes doses: 0,3ng/0,1µL e 1,0ng/0,1µL). *p<0,05 em comparação ao respectivo grupo veículo. #p<0,05 em comparação ao respectivo grupo no teste.

SAP= esticar.

5. DISCUSSÃO

No experimento 1, os nossos resultados mostraram que durante a avaliação da aquisição da memória, ocorreu diminuição das porcentagens de entradas e de tempo gasto nos braços abertos do LCE para o grupo controle, tratado com Veículo intra CPFm-IL e Veículo (i.p.), confirmando o fenômeno conhecido como tolerância a uma única exposição ao LCE (OTT). As injeções combinadas de RU486 intra CPFm-IL, nas doses de 0,3 e 1,0 ng (RU0,3/Veículo, RU0,3/MDZ, RU1,0/Veículo e RU1,0/MDZ), não alteraram os comportamentos relacionados a ansiedade durante o teste. Entretanto, durante o reteste as injeções combinadas de RU486 intra CPFm-IL (RU0,3/MDZ e RU1,0/MDZ), quando comparadas as injeções de midazolam (2,0 mg/Kg, i.p., Veículo/MDZ), produziram diminuição das porcentagens de entradas e de tempo gasto nos braços abertos do labirinto em camundongos. As injeções combinadas de midazolam sistêmico (Veículo/MDZ), produziram efeito ansiolítico durante o reteste. Estes resultados sugerem que o bloqueio dos receptores glicocorticóides com o RU486 no CPFm-IL antes do teste, mantém a memória do evento aversivo, impedindo o efeito ansiolítico do midazolam no reteste (Experimento 1).

No Experimento 2, avaliamos os efeitos do RU486 (antagonista GR), injetado no CPFm (IL), sobre a consolidação da memória em camundongos expostos a protocolo de teste e reteste no LCE. Os resultados mostraram que as injeções de midazolam (i.p.) após o teste, não promovem alteração das respostas de ansiedade avaliadas no labirinto. O bloqueio dos receptores glicocorticóides com o RU486 no CPFm-IL após o teste não interferiu com a consolidação da memória.

Levando em consideração os resultados do Experimento 1, vários trabalhos têm mostrado que a experiência prévia sem tratamento farmacológico, promove redução na exploração dos braços abertos do labirinto durante a reexposição ao aparelho (FILE; MABBUTT; HITCHCOTT, 1990; FILE; ZANGROSSI, 1993; GONZALEZ; FILE, 1997; HOLMES; RODGERS, 1998; CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005). Os resultados obtidos no nosso trabalho mostraram diminuição da porcentagem de entradas e tempo gasto nos braços abertos, assim como redução de comportamentos de avaliação de risco, sem afetar a atividade locomotora em camundongos expostos ao reteste no LCE. Estes achados corroboram com os trabalhos da literatura citados acima, confirmando que uma única exposição ao labirinto promove o fenômeno OTT.

Foi observado que o tratamento com midazolam (2,0 mg/kg) promoveu diminuição da ansiedade avaliada em camundongos reexpostos ao labirinto. O papel da modulação GABA/benzodiazepínica na ansiedade já foi descrita em vários estudos (PELLOW et al., 1985; FILE; MABBUTT; HITCHCOTT, 1990; RODGERS; COLE, 1993; GRIEBEL et al., 1997; HOLMES; RODGERS, 1998; MENARD; TREIT, 1999; TEIXEIRA; CAROBREZ, 1999; BERTOGLIO; CAROBREZ, 2004; GAZARINI; STERN; BERTOGLIO, 2011).

Diferente do resultado observado no nosso Experimento 1, outros trabalhos já mostraram que a experiência prévia ao labirinto aumenta a evitação dos braços abertos (FERNANDES; FILE, 1996; HOLMES; RODGERS, 1998; BERTOGLIO; CAROBREZ, 2000), altera o comportamento natural (FILE; ZANGROSSI, 1993; HOLMES; RODGERS, 1998), e compromete o efeito ansiolítico dos benzodiazepínicos na subsequente exposição ao labirinto (FILE;

MABBUTT; HITCHCOTT, 1990; RODGERS et al., 1999; BERTOGLIO; CAROBREZ, 2002a). Além disso, Reis; Canto-de-Souza, (2008) demonstraram que a injeção de midazolam (3 e 30 nmol) na matéria cinzenta-periaquedutal (MCP) produziu efeito ansiolítico em camundongos expostos ao LCE, efeito abolido durante a reexposição ou reteste.

Entretanto, no nosso estudo a perda dos efeitos ansiolíticos do midazolam durante a reexposição, não foi observado. Apesar da diferença do local de administração, resultado semelhante foi observado com administração de midazolam (3 e 30 nmol) na amígdala, resultando em diminuição dos comportamentos relacionados com ansiedade em camundongos expostos ao teste e ao reteste no LCE (BARBALHO; NUNES-DE-SOUZA; CANTO-DE-SOUZA, 2009).

Algumas hipóteses foram sugeridas para explicar o fenómeno OTT tais como, habituação locomotora (DAWSON et al., 1994), sensibilização do medo aos braços abertos (RODGERS; SHEPHERD, 1993), mudança qualitativa no estado emocional na subsequente exposição ao labirinto (HOLMES; RODGERS, 1998) e alteração do estado do sítio de ligação e/ou do complexo receptor envolvido (GONZALEZ; FILE, 1997; BERTOGLIO; CAROBREZ, 2002a, 2002b, 2003), ou ainda alterações nos neurônios contendo receptores GABAérgicos após a primeira experiência no LCE (BARBALHO; NUNES-DE-SOUZA; CANTO-DE-SOUZA, 2009).

A ansiedade e a memória compartilham vias neurais e funções desempenhadas por certas estruturas no cérebro (LEDOUX, 2000; MCNAUGHTON; GRAY, 2000). A esse respeito, evidências indicam que a formação de uma memória no teste no LCE, pode estar associada a mudanças

observadas no reteste. Por exemplo, estudos que empregaram a administração de drogas que facilitam o aprendizado, como anfetamina ou pentilenotetrazol, demonstrou facilitar os efeitos do OTT (VARGAS; DA CUNHA; ANDREATINI, 2006); e estudos que usaram drogas que produzem amnésia, por exemplo, clordiazepóxido e escopolamina, ou alguns que interferem na transmissão sináptica bloqueando-a, como a lidocaína, impediram o surgimento do fenômeno OTT (FILE; MABBUTT; HITCHCOTT, 1990; FILE; GONZALEZ; GALLANT, 1998; BERTOGLIO; CAROBREZ, 2004).

Levando em consideração os resultados descritos acima, nós observamos que as injeções de RU486 no CPFm-IL antes do teste, não restauraram os efeitos ansiolíticos do midazolam administrado antes do reteste, sugerindo que o antagonismo desses receptores GR nesta estrutura, parece interferir na fase de aquisição da memória de camundongos expostos ao protocolo de teste e reteste no LCE. No entanto, são necessários mais estudos experimentais que avaliem por exemplo, quais os efeitos da injeção combinada de midazolam central (CPFm IL) e midazolam sistêmico. Desta forma, será possível confirmar se o midazolam vai sofrer a perda do efeito ansiolítico, caracterizando a ocorrência do OTT.

Estudos têm demonstrado indução de analgesia e aumento da liberação de hormônios corticosteroides em animais expostos ao LCE (LEE; RODGERS, 1990; FILE et al., 1994). Esses hormônios relacionados à resposta emocional aversiva, possuem um papel fundamental nas mudanças comportamentais em futuras reexposições ao LCE (ALBRECHET-SOUZA et al., 2007; GAZARINI; STERN; BERTOGLIO, 2011). Os hormônios relacionados ao estresse têm funções periféricas (GOMEZ-SANCHEZ; GOMEZ-SANCHEZ, 2014) e centrais

(DE KLOET et al., 1998), ativadas diante de uma situação estressante ou potencialmente ameaçadora, atuando no processo de aprendizagem e facilitando a aquisição e consolidação de memórias aversivas (JOËLS et al., 2006b).

Neste sentido, alguns autores (ALBRECHET-SOUZA et al., 2007), observaram aumento no comportamento de avaliação de risco e nos níveis de corticosterona em ratos reexpostos ao LCE. Esses resultados sugerem uma relação entre o aumento dos níveis desse hormônio e a expressão de certos comportamentos, tais como congelamento, defecação e esticar (PELLOW et al., 1985). Da mesma forma, destaca o papel dos hormônios corticosteroides nos processos de aprendizagem emocional e sua provável contribuição para o estabelecimento do OTT.

Em um primeiro momento, todas as áreas do encéfalo estão expostas a este hormônio, entretanto, seus receptores estão localizados em regiões específicas. Os mineralocorticóides (MR) são encontrados nos neurônios do hipocampo, septo lateral, complexo amigdalóide, locus coeruleus, núcleo paraventricular e CPFm e os glicocorticóides estão presentes em quase todas as regiões (DE KLOET et al., 1998; DE KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005). A ação dos corticosteroides ocorre em conjunto com seus dois receptores, MR e GR, respectivamente. A relação entre a ocupação desses receptores influencia diretamente as ações futuras e a manutenção das respostas de defesa do animal (JOËLS; DE KLOET, 1994; DE KLOET et al., 1997).

Dados do nosso laboratório demonstraram que injeções de RU28318 (antagonista seletivo dos receptores MR) no mPFC restaurou os efeitos ansiolíticos do midazolam administrado antes do reteste no labirinto em

camundongos. Este antagonista produziu aumento da porcentagem de tempo gasto nos braços abertos do labirinto (ALBERNAZ et al., 2018). Esses dados sugerem que o antagonismo desses receptores de MR no CPFm interferem com a fase de aquisição da memória.

As respostas de avaliação de risco podem ser caracterizadas por um complexo padrão comportamental associado à ansiedade, que relaciona tanto a tomada de decisão, quanto o esforço para enfrentar uma situação ameaçadora (CRUZ; FREI; GRAEFF, 1994; SHEPHERD et al., 1994). Nos nossos resultados, o antagonista seletivo dos receptores glicocorticóides RU486 (0,3 ou 1,0 ng) intra-CPFm IL, produziu diminuição do total de SAP em animais reexpostos ao labirinto e ausência de efeitos para a porcentagem de SAP protegido, mergulhos e frequência de levantamentos. Esses resultados reforçam achados prévios da literatura mostrando ação não genômica dos glicocorticóides. Por exemplo, MIKICS et al., (2005) demonstraram que a administração de metirapona (i.p), um bloqueador da síntese de corticosterona, diminuiu o total de SAP, mas não alterou o SAP protegido, total de mergulhos, mergulhos protegidos e o total de levantar. Nesse sentido, outros achados também têm demonstrado que o bloqueio dos glicocorticóides prejudica a aquisição e consolidação em tarefas de aprendizagem em seres humanos e em animais de laboratório (OITZL; DE KLOET, 1992; SANDI; ROSE, 1997; RIMMELE et al., 2010, RIMMELE et al., 2013, ZHOU et al., 2010, ZHOU et al., 2011).

Os nossos resultados observados no Experimento 2, durante a fase de consolidação da memória mostraram que as injeções de RU486 no CPFmIL imediatamente depois do teste, não foram capazes de alterar as respostas de

ansiedade avaliadas em camundongos durante o reteste no labirinto. O fenômeno OTT não foi observado durante as avaliações das porcentagens de entradas e tempo gasto nos braços abertos do labirinto. O antagonismo desses receptores GR no CPFm-IL parece não interferir na fase de consolidação da memória de camundongos expostos ao protocolo de teste e reteste no LCE.

Levando em consideração os estudos relacionados a via de administração, resultado anterior do nosso grupo mostrou ausência do efeito do midazolam injetado na SCP de camundongos re-expostos ao LCE (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, estejam envolvidos no fenômeno OTT (BARBALHO; NUNES-DE-SOUZA; CANTO-DE-SOUZA, 2009).

A consolidação de memórias é um fenômeno complexo, modulado por vias interconectadas e regulado por vários neurotransmissores tais como, adrenalina, noradrenalina, hormônio adrenocorticotrófico ACTH, vasopresina, oxitocina, a neurotransmissão histaminérgica, glicocorticóides entre outros substratos neurobioquímicos (DE QUERVAIN et al., 2000; IZQUIERDO; MCGAUGH, 2000; ROOZENDAAL; BARSEGYAN; LEE, 2007; GIANLORENÇO et al., 2012).

De forma geral, esses neurotransmissores e hormônios podem atuar através de influências desde o complexo basolateral do núcleo amigdalóide, com interação a outras regiões incluindo o hipocampo e o córtex (DE QUERVAIN et al., 2000; IZQUIERDO; MCGAUGH, 2000). No nível celular, os

glicocorticoides aumentam a consolidação da memória e a plasticidade sináptica através da sinalização intra e extracelular, as propriedades dos canais iônicos e a estrutura celular (KARST et al., 2002; BISAZ; CONBOY; SANDI, 2009). Estudos sugerem que o hipocampo é essencial por algum tempo após a aquisição de informação, mas gradualmente se torna menos importante para o armazenamento e recuperação da mesma, já que parece depender mais de áreas corticais (SQUIRE; ALVAREZ, 1995; HARDT; NADEL, 2017).

Evidências tem demonstrado que os glicocorticoides administrados farmacologicamente ou agonistas GR, seguem uma relação dose-resposta em forma de U invertido sobre os seus efeitos na memória. Doses moderadas melhoram a memória, enquanto doses menores ou mais altas são tipicamente menos efetivas ou prejudicam a consolidação da memória (ROOZENDAAL; MCGAUGH, 1997; ROOZENDAAL; WILLIAMS; MCGAUGH, 1999; DE QUERVAIN; SCHWABE; ROOZENDAAL, 2016). No entanto, faltam evidências neurobioquímicas sobre o papel das estruturas corticais na modulação da consolidação de memórias aversivas. Nesse contexto, os dados obtidos nesse trabalho sugerem que os receptores glicocorticóides não modulam aspectos mnemônicos associados a consolidação no CPFm-IL em camundongos expostos ao reteste no LCE. Cabe ressaltar que foi observada alta variabilidade nas respostas comportamentais dos camundongos expostos ao reteste no LCE, talvez com o aumento do número de sujeitos pudesse ser possível evidenciar o fenômeno OTT, assim como o papel dos receptores glicocorticóides no CPFm na consolidação de memórias aversivas.

Vários autores têm observado que um breve período de estresse é capaz de afetar a plasticidade sináptica dos neurônios no CPFm, substrato

neural essencial relacionado às funções cognitivas (MILAD; QUIRK, 2002; GHASHGHAEI; HILGETAG; BARBAS, 2007) e modular a resposta neuroendócrina do estresse (HERMAN et al., 2005; JONES; MYERS; HERMAN, 2011). Os achados demonstraram sensibilidade morfológica e fisiológica diferenciada dos neurônios CPFm ao estresse. Estudos mostraram que a lesão eletrolítica do CPFm na sub-região IL diminui o comportamento de ansiedade no LCE (LACROIX et al., 2000; SHAH; TREIT, 2003).

Neste mesmo sentido, foi mostrado que a estimulação de IL promoveu diminuição do medo contextual (VIDAL-GONZALEZ et al., 2006). Essa sub-região também parece ser responsável pela facilidade de ativação do eixo HPA (LACROIX et al., 2000; WALL; MESSIER, 2000).

Em conjunto, esses dados corroboram a hipótese de que a IL é uma região que participa da modulação da ansiedade em roedores. Outros autores sugerem que essa região seria capaz de processar informações convergentes de outras regiões encefálicas, tais como matéria cinzenta periaquedutal, área tegmental ventral, núcleos do complexo amigdalóide, núcleos do tálamo e hipotálamo, mediando respostas de ansiedade e memória (WALL; MESSIER, 2000; VERTES, 2006).

Korte et al., (1995) demonstraram que a injeção intra-cerebroventricular do antagonista RU486 (50 ng/2,0µL) aumentou a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos, sugerindo efeitos ansiolíticos dessa droga em ratos. Esses resultados contrastam com os nossos. A discrepância pode ser atribuída a diferenças no desenho experimental. Os animais que exibiram efeitos do tipo ansiolítico tinham recebido previamente choques elétricos nas patas. Animais que não receberam choques não exibiram alterações comportamentais após a

injeção do antagonista de glicocorticóides, sugerindo que o antagonismo tem efeitos ansiolíticos somente quando o comportamento semelhante à ansiedade é aumentado, como por exemplo o resultado de exposição prévia ao estressor contextual.

6. CONCLUSÃO

Após a avaliação dos resultados obtidos neste estudo, concluímos que:

- A experiência prévia ao labirinto em cruz elevado (LCE) produz aumento de comportamentos relacionados a ansiedade, conforme foi observado no grupo controle, durante a aquisição da memória, em camundongos reexpostos ao labirinto, caracterizando o fenômeno OTT.
- O agonista GABA-benzodiazepínico, midazolam (2,0 mg/kg), produziu efeito ansiolítico em camundongos reexpostos ao LCE.
- O bloqueio dos receptores glicocorticóides com RU486 no CPFm-IL, nas doses de (0,3 e 1,0 ng), inibiu os efeitos ansiolíticos do midazolam administrado antes do reteste, sugerindo a participação desta estrutura cortical no fenômeno OTT.
- Os resultados sugerem que o antagonismo desses receptores no CPFm-IL na fase de consolidação da memória não participam do fenômeno OTT.
- Este estudo mostra a importância dos receptores glicocorticóides na manutenção de respostas defensivas relacionadas a situações aversivas.

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, T.; LATTAL, K. M. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. **Current Opinion in Neurobiology**, 2001.

ALBERNAZ, K; SOUZA, RR; CANTO-DE-SOUZA, A. O bloqueio de receptores mineralocorticóides no córtex pré-frontal medial infra-límbico (IL/mPF) restaurou os efeitos ansiolíticos do midazolam (MDZ) em camundongos submetidos ao teste e reteste no labirinto em cruz elevado (LCE). **XLI REUNIÃO ANUAL DA SBNec. Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento. Apresentação de Painel**: Santos, Sp, 22 a 25 de agosto de 2018.

ALBRECHET-SOUZA, L.; BORELLI, K. G.; BRANDÃO, M. L. Activity of the medial prefrontal cortex and amygdala underlies one-trial tolerance of rats in the elevated plus-maze. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 169, n. 1, p. 109-118, 2008.

ALBRECHET-SOUZA, L.; CRISTINA DE CARVALHO, M.; RODRIGUES FRANCI, C.; BRANDÃO, M. L. 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. **Hormones and Behavior**, v. 52, n. 2, p. 267-273, 2007.

BARBALHO, C. A.; NUNES-DE-SOUZA, R. L.; CANTO-DE-SOUZA, A. Similar anxiolytic-like effects following intra-amygdala infusions of benzodiazepine receptor agonist and antagonist: Evidence for the release of an endogenous benzodiazepine inverse agonist in mice exposed to elevated plus-maze test. **Brain Research**, v. 1267, p. 65-76, 2009.

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. **Behavioural Brain Research**, v. 108, n. 2, p. 197-203, 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. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 73, n. 4, p. 963-969, 2002a.

BERTOGLIO, L. J.; CAROBREZ, A. P. Prior maze experience required to alter midazolam effects in rats submitted to the elevated plus-maze. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 72, n. 1-2, p. 449-55, mai 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**, v. 170, n. 4, p. 335-342, 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. **Behavioural Pharmacology**, v. 15, n. 1, p. 45-54, 2004.

BISAZ, R.; CONBOY, L.; SANDI, C. Learning under stress: A role for the neural cell adhesion molecule NCAM. **Neurobiology of Learning and Memory**, 2009.

BLANCHARD, D.; BLANCHARD, R. J.; RODGERS, R. J. Risk assessment and animal models of anxiety. **Animal models in Psychopharmacology**. [s.l.: s.n.]p. 117-13.

BOURIN, M. The test retest model of anxiety: An appraisal of findings to explain benzodiazepine tolerance. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 2018.

BRANDÃO, M. L. As bases biológicas do comportamento: introdução à neurociência. São Paulo, **Editores Pedagógica e Universitária**, 2004.

CAIN, D. W.; CIDLOWSKI, J. A. Specificity and sensitivity of glucocorticoid signaling in health and disease. Best Practice and Research. **Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 29, n. 4, p. 545-556, 2015.

CANTO-DE-SOUZA, A.; LUIZ NUNES-DE-SOUZA, R.; JOHN RODGERS, R. 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 Research**, v. 928, n. 1-2, p. 50-59, 2002.

CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. In: Neuroscience and Biobehavioral. **Neurosci Biobehav Rev**, 2005.

CAROLA, V.; D'OLIMPIO, F.; BRUNAMONTI, E.; MANGIA, F.; RENZI, P. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. **Behavioural Brain Research**, v. 134, n. 1-2, p. 49-57, 2002.

CARVALHO, M. C.; ALBRECHET-SOUZA, L.; MASSON, S.; BRANDÃO, M. L. 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. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 12, p. 1857-1866, 2005.

CRUZ, A. P. M.; FREI, F.; GRAEFF, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 49, n. 1, p. 171-176, 1994.

DAL-CÓL, M. L. C.; ORLANDI PEREIRA, L.; ROSA, V. P.; CALIXTO, A. V.; CAROBREZ, A. P.; FARIA, M. S. Lack of midazolam-induced anxiolysis in the plus-maze Trial 2 is dependent on the length of Trial 1. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 74, n. 2, p. 395-400, 2003.

DALVI, A.; RODGERS, R. J. GABAergic influences on plus-maze behaviour in mice. **Psychopharmacology**, v. 128, n. 4, p. 380-397, 1996.

DAWSON, G. R.; CRAWFORD, S. P.; STANHOPE, K. J.; IVERSEN, S. D.; TRICKLEBANK, M. D. One-trial tolerance to the effects of chlordiazepoxide on the elevated plus maze may be due to locomotor habituation, not repeated drug exposure. **Psychopharmacology**, v. 113, n. 3-4, p. 570-572, 1994.

DE KLOET, E. R. Brain corticosteroid receptor balance and homeostatic control. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 12, n. 2, p. 95-164, 1991.

DE KLOET, E. R.; JOËLS, M.; HOLSBOER, F. Stress and the brain: From adaptation to disease. **Nature Reviews Neuroscience**, 2005. .

DE KLOET, E. R.; VREUGDENHIL, E.; OITZL, M. S.; JOËLS, M. Glucocorticoid feedback resistance. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, 1997.

DE KLOET, E. R.; VREUGDENHIL, E.; OITZL, M. S.; JOËLS, M. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. **Endocrine Reviews**, 1998.

DE QUERVAIN, D. J. F.; ROOZENDAAL, B.; NITSCH, R. M.; MCGAUGH, J. L.; HOCK, C. Acute cortisone administration impairs retrieval of long-term declarative memory in humans. **Nature Neuroscience**, v. 3, n. 4, p. 313-314, 2000.

DE QUERVAIN, D.; SCHWABE, L.; ROOZENDAAL, B. Stress, glucocorticoids and memory: Implications for treating fear-related disorders. **Nature Reviews Neuroscience**, 2016. .

REIS, L. M.; CANTO-DE-SOUZA, A. Intra-periaqueductal gray matter injections of midazolam fail to alter anxiety in plus-maze experienced mice. **Brain Research**, v. 1231, p. 93-102, 2008.

DUDAI, Y. Predicting not to predict too much: How the cellular machinery of memory anticipates the uncertain future. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, n. 1521, p. 1255-1262, 2009.

FERNANDES, C.; FILE, S. E. The influence of open arm ledges and maze experience in the elevated plus-maze. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 54,p. 31-40, 1996.

FILE, S.E. One-trial tolerance to the anxiolytic effects of benzodiazepines in the plus-maze. **Psychopharmacology**, v. 100, p. 281-282, 1990.

FILE, S. E.; GONZALEZ, L. E.; GALLANT, R. Role of the basolateral nucleus of the amygdala in the formation of a phobia. **Neuropsychopharmacology**, v. 19, n. 5, p. 397-405, 1998.

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**, v. 102, n. 1, p. 98-101, 1990.

FILE, S. E.; ZANGROSSI, H. One-trial tolerance” to the anxiolytic actions of

benzodiazepines in the elevated plus-maze, or the development of a phobic state?. **Psychopharmacology**, v. 110, n. 1-2, p. 240-244, 1993.

FILE, S. E.; ZANGROSSI, H.; SANDERS, F. L.; MABBUTT, P. S. Raised corticosterone in the rat after exposure to the elevated plus-maze. **Psychopharmacology**, v. 113, n. 3-4, p. 543-546, 1994.

FREDERICO G. GRAEFF. Livro: Drogas Psicotrópicas e Seu Modo de Ação. **Estante Virtual**. 1984.

GARCIA, A. M. B.; CARDENAS, F. P.; MORATO, S. Effect of different illumination levels on rat behavior in the elevated plus-maze. **Physiology and Behavior**, v. 85, n. 3, p. 265-270, 2005.

GAZARINI, L.; STERN, C. A. J.; BERTOGLIO, L. J. Protein synthesis in dorsal hippocampus supports the drug tolerance induced by prior elevated plus-maze experience. **Neuroscience**, v. 179, p. 179-187, 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. 905-923, 2007.

GIANLORENÇO, A. C. L.; SERAFIM, K. R.; CANTO-DE-SOUZA, A.; MATTIOLI, R. Emotional memory consolidation impairment induced by histamine is mediated by H1 but not H2 receptors. **Brain Research Bulletin**, v. 89, n. 5-6, p. 197-202, 2012.

GOMEZ-SANCHEZ, E.; GOMEZ-SANCHEZ, C. E. The multifaceted mineralocorticoid receptor. **Comprehensive Physiology**, v. 4, n. 3, p. 965-994, 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. **The Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 4, p. 1505-1511, 1997.

GRAEFF, F. G.; SILVEIRA, M. C.; NOGUEIRA, R. L.; AUDI, E. A; OLIVEIRA, R. M. Role of the amygdala and periaqueductal gray in anxiety and panic. **Behavioural brain research**, v. 58, n. 1-2, p. 123-31, 1993.

GRIEBEL, G.; RODGERS, R. J.; PERRAULT, G.; SANGER, D. J. Risk assessment behaviour: Evaluation of utility in the study of 5-HT-related drugs in the rat elevated plus-maze test. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 57, n. 4, p. 817-827, 1997.

HARDT, O.; NADEL, L. Systems consolidation revisited, but not revised: The promise and limits of optogenetics in the study of memory. **Neuroscience Letters**, 2017.

HASCOET, M.; BOURIN, M.; TERTRE, C. Du. Influence of prior experience on mice behavior using the four-plate test. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 58, n. 4, p. 1131-1138, 1997.

HERMAN, J. P.; OSTRANDER, M. M.; MUELLER, N. K.; FIGUEIREDO, H. Limbic system mechanisms of stress regulation: Hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, 2005.

HOLMES, A.; ILES, J. P.; MAYELL, S. J.; RODGERS, R. J. Prior test experience compromises the anxiolytic efficacy of chlordiazepoxide in the mouse light/dark exploration test. **Behavioural Brain Research**, v. 122, n. 2, p. 159-167, 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. 473-488, 1998.

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. 149-179, 2007.

HYMAN, S. E. How adversity gets under the skin. **Nature Neuroscience**, 2009.

IZQUIERDO, I.; MCGAUGH, J. L. Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. **Behavioural Pharmacology**, 2000.

JOËLS, M.; BARAM, T. Z. The neuro-symphony of stress. **Nature Reviews Neuroscience**, 2009.

JOELS, M.; DE KLOET, E. R. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the brain. Implications for ion permeability and transmitter systems. **Progress in Neurobiology**, v. 43, p. 1-36, 1994.

JOËLS, M.; PU, Z.; WIEGERT, O.; OITZL, M. S.; KRUGERS, H. J. Learning under stress: how does it work?. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 10, n. 4, p. 152-158, 2006a.

JOËLS, M.; PU, Z.; WIEGERT, O.; OITZL, M. S.; KRUGERS, H. J. Learning under stress: how does it work?. **Trends in cognitive sciences**, v. 10, n. 4, p. 152-8, 1 apr. 2006b.

JONES, K. R.; MYERS, B.; HERMAN, J. P. Stimulation of the prelimbic cortex differentially modulates neuroendocrine responses to psychogenic and systemic stressors. **Physiology and Behavior**, v. 104, n. 2, p. 266-271, 2011.

KARST, H.; NAIR, S.; VELZING, E.; RUMPF-VAN ESSEN, L.; SLAGTER, E.; SHINNICK-GALLAGHER, P.; JOELS, M. Glucocorticoids alter calcium conductances and calcium channel subunit expression in basolateral amygdala neurons. **European Journal of Neuroscience**, v. 16, n. 6, p. 1083-1089, 2002.

KIM, P. J.; COLE, M. A.; KALMAN, B. A.; SPENCER, R. L. Evaluation of RU28318 and RU40555 as selective mineralocorticoid receptor and glucocorticoid receptor antagonists, respectively: Receptor measures and functional studies. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 67, n. 3, p. 213-222, 1998.

KORTE, S. M.; DE BOER, S. F.; DE KLOET, E. R.; BOHUS, B. Anxiolytic-like effects of selective mineralocorticoid and glucocorticoid antagonists on fear-enhanced behavior in the elevated plus-maze. **Psychoneuroendocrinology**, v. 20, n. 4, p. 385-394, 1995.

LACROIX, L.; SPINELLI, S.; HEIDBREDE, C. A.; FELDON, J. Differential role of the medial and lateral prefrontal cortices in fear and anxiety. **Behavioral neuroscience**, v. 114, n. 6, p. 1119-1130, 2000.

LAMPREA, M. R.; CARDENAS, F. P.; SILVEIRA, R.; MORATO, S.; WALSH, T. J. Dissociation of memory and anxiety in a repeated elevated plus maze paradigm: Forebrain cholinergic mechanisms. **Behavioural Brain Research**, v. 117, n. 1-2, p. 97-105, 2000.

LEDOUX, J. Emotion circuits in the brain. **Ann. Rev. Neuroscience**. p. 155-184, 2000.

LEE, C.; RODGERS, R. J. Antinociceptive effects of elevated plus-maze exposure: influence of opiate receptor manipulations. **Psychopharmacology**, v. 102, n. 4, p. 507-513, 1990.

LISTER, R. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, n. 2, 1987.

LU, W.-L.; ZHANG, Q.; ZHENG, L.; WANG, H.; LI, R.-Y.; ZHANG, L.-F.; SHEN, W.-B.; TU, X.-D. Antipyretic, analgesic and anti-inflammatory activities of ketoprofen β -cyclodextrin inclusion complexes in animals. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 10, 2004.

MCEOWN, K.; TREIT, D. Mineralocorticoid receptors in the medial prefrontal cortex and hippocampus mediate rats' unconditioned fear behaviour. **Hormones and Behavior**, v. 60, n. 5, p. 581-588, 2011.

MCGAUGH, J. L. Memory a Century of Consolidation. **Science**, v. 287, n. 5451, p. 248-251, 2000.

MCNAUGHTON, N.; CORR, P. J. A two-dimensional neuropsychology of defense: Fear/anxiety and defensive distance. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 2004. .

MCNAUGHTON, N.; GRAY, J. A. Anxiolytic action on the behavioural inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety. **Journal of Affective Disorders**, v. 61, n. 3, p. 161-176, 2000.

MENARD, J.; TREIT, D. Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 1999.

MESSIER, J.; KALASKA, J. F. Comparison of variability of initial kinematics and endpoints of reaching movements. **Experimental Brain Research**, v. 125, n. 2, p. 139-152, 1999.

MIKICS, É.; BARSY, B.; BARSVÁRI, B.; HALLER, J. Behavioral specificity of non-genomic glucocorticoid effects in rats: Effects on risk assessment in the elevated plus-maze and the open-field. **Hormones and Behavior**, v. 48, n. 2, p. 152-162, 2005.

MILAD, M. R. R.; QUIRK, G. J. J. Neurons in medial prefrontal cortex signal memory for fear extinction. **Nature**, v. 420, n. 6911, p. 70–74, 2002.

MILLER, M. M.; MCEWEN, B. S. Establishing an agenda for translational research on PTSD. **Annals of the New York Academy of Sciences, Anais**, 2006.

NUNES-DE-SOUZA, R. L.; CANTO-DE-SOUZA, A.; DA-COSTA, M.; FORNARI, R. V.; GRAEFF, F. G.; PELÁ, I. R. Anxiety-induced antinociception in mice: Effects of systemic and intra- amygdala administration of 8-OH-DPAT and midazolam. **Psychopharmacology**, v. 150, n. 3, p. 300-310, 2000.

NUNES-DE-SOUZA, V.; NUNES-DE-SOUZA, R. L.; RODGERS, R. J.; CANTO-DE-SOUZA, A. 5-HT₂ receptor activation in the midbrain periaqueductal grey (PAG) reduces anxiety-like behaviour in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 187, n. 1, p. 72-79, 2008.

NUTT, D. J. Overview of diagnosis and drug treatments of anxiety disorders. **CNS Spectrums**, 2005. .

OITZL, M. S.; DE KLOET, E. R. Selective Corticosteroid Antagonists Modulate Specific Aspects of Spatial Orientation Learning. **Behavioral Neuroscience**, v. 106, n. 1, p. 62-71, 1992.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. B. J. The mouse brain in stereotaxic coordinates. **2 ed. New York, NY: Academic Press**, 2001.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 3, p. 149-167, 1985.

PEREIRA, M. E. C. Conceito de ansiedade. Transtornos de Ansiedade. **São Paulo: Científica Nacional Ltda**, p. 3-28, 2004.

RADLEY, J. J.; ARIAS, C. M.; SAWCHENKO, P. E. Regional differentiation of the medial prefrontal cortex in regulating adaptive responses to acute emotional stress. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 50, p. 12967-12976, 2006.

RESSTEL, L. B. M.; CORRÊA, F. M. A. Involvement of the medial prefrontal cortex in central cardiovascular modulation in the rat. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, 2006. .

REUL, J. M. H. 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. **Journal of Steroid Biochemistry**, v. 24, n. 1, p. 269-272, 1986.

RIMMELE, U.; BESEDOVSKY, L.; LANGE, T.; BORN, J. Blocking mineralocorticoid receptors impairs, blocking glucocorticoid receptors enhances memory retrieval in humans. **Neuropsychopharmacology**, v. 38, n. 5, p. 884-894, 2013.

RIMMELE, U.; MEIER, F.; LANGE, T.; BORN, J. Suppressing the morning rise in cortisol impairs free recall. **Learning & Memory**, v. 17, n. 4, p. 186-190, 2010.

RODGERS, R. J.; COLE, J. C.; COBAIN, M. R.; DALY, P.; DORAN, P. J.; EELLS, J. R.; WALLIS, P. Anxiogenic like effects of fluprazine and eltoprazine I the mouse elevated plus-maze: profile comparisons with 8-OH-DPAT, CGS12066B,TFMPP and mCPP. **Behavioural Pharmacology**, v. 3, p. 621-634, 1992.

RODGERS, R. J.; COLE, J. C. Influence of social isolation, gender, strain, and prior novelty on plus-maze behaviour in mice. **Physiology and Behavior**, v. 54, n. 4, p. 729-736, 1993.

RODGERS, R. J.; DALVI, A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 8, n. 6-7, p. 477-96; 1997.

RODGERS, R. J.; HALLER, J.; HOLMES, A.; HALASZ, J.; WALTON, T. J.; BRAIN, P. F. Corticosterone response to the plus-maze: High correlation with risk assessment in rats and mice. **Physiology and Behavior**, v. 68, n. 1-2, p. 47-53, 1999.

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

RODGERS, R. J.; JOHNSON, N. J. T.; COLE, J. C.; DEWA, R. C. V.; KIDD, G. R.; KIMPSON, P. H. Plus-maze retest profile: importance of initial stages of trial 1 and response to post-trial cholinergic receptor blockade in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 54, p. 41-50, 1996.

RODGERS, R. J.; JOHNSON, N. J. T.; CARR, J.; HODGSON, T. P. Resistance of experientially induced changes in murine plus-maze behaviour to altered retest conditions. **BEHAVIORAL BRAIN RESEARCH**, v. 86, p. 71-77, 1997a.

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**, v. 113, n. 2, p. 237-242, 1993.

ROOZENDAAL, B.; BARSEGYAN, A.; LEE, S. Adrenal stress hormones, amygdala activation, and memory for emotionally arousing experiences **Progress in Brain Research**, 2007.

ROOZENDAAL, B.; MCGAUGH, J. L. Glucocorticoid receptor agonist and antagonist administration into the basolateral but not central amygdala modulates memory storage. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 67, n. 2, p. 176-179, 1997.

ROOZENDAAL, B.; WILLIAMS, C. L.; MCGAUGH, J. L. Glucocorticoid receptor activation in the rat nucleus of the solitary tract facilitates memory consolidation: involvement of the basolateral amygdala. **The European journal of neuroscience**, v. 11, n. 4, p. 1317-1323, 1999.

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

SCHNEIDER, P.; HO, Y.-J.; SPANAGEL, R.; PAWLAK, C. R. A Novel Elevated Plus-Maze Procedure to Avoid the One-Trial Tolerance Problem. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 5, 2011.

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 Research**, v. 969, n. 1-2, p. 183-194, 2003.

SHEPHERD, J. K.; GREWAL, S. S.; FLETCHER, A.; BILL, D. J.; DOURISH, C. T. Behavioural and pharmacological characterisation of the elevated “zero-maze” as an animal model of anxiety. **Psychopharmacology**, v. 116, n. 1, p. 56-64, 1994.

SIMON, G. E.; VONKORFF, M.; PICCINELLI, M.; FULLERTON, C.; ORMEL, J. An international study of the relation between somatic symptoms and depression. **The New England journal of medicine**, v. 341, n. 18, p. 1329-35, 1999.

SQUIRE, L. R.; ALVAREZ, P. Retrograde amnesia and memory consolidation: a neurobiological perspective. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 5, n. 2, p. 169-177, 1995.

STAPLES, L. G. Predator odor avoidance as a rodent model of anxiety: Learning-mediated consequences beyond the initial exposure. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 94, n. 4, p. 435-45, 2010.

STEPANOVIC-PETROVIC', R. M.; MICOV, A. M.; TOMIC', M. A.; KOVACEVIC', J. M.; BOŠKOVIC', B. D. Antihyperalgesic/Antinociceptive effects of ceftriaxone and its synergistic interactions with different analgesics in inflammatory pain in rodents. **Anesthesiology**, v. 120, n. 3, p. 737-750, 2014.

STERN, C. A. J.; CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Aversive learning as a mechanism for lack of repeated anxiolytic-like effect in the elevated plus-maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 90, n. 4, p. 545-550, 2008.

STERN, C. A. J.; DO MONTE, F. H. M.; GAZARINI, L.; CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Activity in prelimbic cortex is required for adjusting the anxiety response level during the elevated plus-maze retest. **Neuroscience**, v. 170, n. 1, p. 214-222, 2010.

TEIXEIRA, R. M.; SANTOS, A. R.; RIBEIRO, S. J.; CALIXTO, J. B.; RAE, G. A.; DE LIMA, T. C. 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, 1996.

TEIXEIRA, K. V.; CAROBREZ, A. P. Effects of glycine or (\pm)-3-amino-1-hydroxy-2-pyrrolidone microinjections along the rostrocaudal axis of the dorsal periaqueductal gray matter on rats' performance in the elevated plus-maze task. **Behavioral Neuroscience**, v. 113, n. 1, p. 196-203, 1999.

TER HORST, J. P.; VAN DER MARK, M.; KENTROP, J.; ARP, M.; VAN DER VEEN, R.; DE KLOET, E. R.; OITZL, M. S. Deletion of the forebrain mineralocorticoid receptor impairs social discrimination and decision-making in male, but not in female mice. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 8, 2014.

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. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 30, n. 8, p. 1394-1402, 2006.

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, 2006.

VIDAL-GONZALEZ, I.; VIDAL-GONZALEZ, B.; RAUCH, S. L.; QUIRK, G. J. Microstimulation reveals opposing influences of prelimbic and infralimbic cortex on the expression of conditioned fear. **Learning & Memory**, v. 13, n. 6, p. 728-733, 2006.

WALL, P. M.; MESSIER, C. U-69,593 microinjection in the infralimbic cortex

reduces anxiety and enhances spontaneous alternation memory in mice. **Brain Research**, v. 155, n. 1, p. 58-68, 2000.

YEHUDA, R.; JOËLS, M.; MORRIS, R. G. M. The memory paradox. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 11, n. 12, p. 837-9 2010. .

ZHOU, H.; YU, C. L.; WANG, L. P.; YANG, Y. X.; MAO, R. R.; ZHOU, Q. X.; XU, L. 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. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 135, p. 40-45, 2015.

ZHOU, M.; BAKKER, E. H. M.; VELZING, E. H.; BERGER, S.; OITZL, M.; JOËLS, M.; KRUGERS, H. J. Both mineralocorticoid and glucocorticoid receptors regulate emotional memory in mice. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 94, n. 4, p. 530-537, 2010.

ZHOU, M.; KINDT, M.; JOËLS, M.; KRUGERS, H. J. Blocking mineralocorticoid receptors prior to retrieval reduces contextual fear memory in mice. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, 2011.



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do papel dos receptores glicocorticoides da região infralímbica do córtex pré-frontal medial na tolerância aos efeitos do midazolam em camundongos submetidos ao protocolo de teste e reteste no labirinto em cruz elevado", protocolada sob o CEUA nº 9286190517, sob a responsabilidade de **Profª Drª Azair Liane Matos do Canto de Souza e equipe; Aura Julieth Rodriguez Fonseca; Rimenez Rodrigues Souza ; Lara Maria Silveira** - 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 13/06/2017.

We certify that the proposal "Assessment of the role of glucocorticoid receptors in the infralimbic region of the medial prefrontal cortex in tolerance to the effects of midazolam in mice submitted to the test and retest paradigm in the elevated plus maze", utilizing 192 Heterogenics mice (192 males), protocol number CEUA 9286190517, under the responsibility of **Profª Drª Azair Liane Matos do Canto de Souza and team; Aura Julieth Rodriguez Fonseca; Rimenez Rodrigues Souza ; Lara Maria Silveira** - 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 06/13/2017.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [06/2017](#) a [07/2018](#) Área: [Psicologia](#)

Origem: [Biotério Central da UFSCar](#)

Espécie: [Camundongos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [25 a 35 dias](#)

N: [192](#)

Linhagem: [Mus Musculus/Suíço Albino](#)

Peso: [30 a 40 g](#)

Resumo: Um dos paradigmas amplamente utilizados para o entendimento da neurobiologia dos transtornos de ansiedade é a exposição de roedores ao labirinto em cruz elevado (LCE). Neste contexto, quando benzodiazepínicos são administrados em roedores antes da exposição inicial, aumentam o tempo gasto e as entradas aos braços abertos. Essa única experiência prévia no LCE torna ineficientes os componentes ansiolíticos observando-se o fenômeno de tolerância por uma exposição (OTT, one trial tolerance) caracterizado por uma redução na exploração dos braços abertos na reexposição ao labirinto. Dados da literatura indicam que os hormônios relacionados ao estresse teriam função essencial nas alterações comportamentais entre o teste e o reteste no LCE. Os receptores para esses hormônios são constituídos pelos subtipos mineralocorticoide (MR) e glicocorticoide (GR). Os subtipo GR, estão presentes em maior número em áreas como o hipocampo, amígdala e o córtex pré-frontal medial (CPFm), estando extremamente ligados ao controle de estados emocionais intensos, com na aquisição e extinção de memórias aversivas, e também a alça de retroalimentação do eixo HPA.

Dentre as áreas descritas como fundamentais para o controle dos estados emocionais aversivos, está o córtex pré-frontal medial (CPFm), que na subdivisão infralímbica (IL) está envolvida tanto na modulação neuroendócrina em resposta ao estresse, como na regulação do comportamento emocional. Com base nestes dados, o presente projeto se propõe a investigar o papel dos receptores glicocorticoides (GR) presentes no mPFC IL na tolerância dos efeitos do midazolam em camundongos submetidos ao protocolo de teste e reteste no LCE. Os resultados esperados, incluem a identificação do papel dos receptores GR no desenvolvimento de aspectos mnemônicos, bem como permitir o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas focadas na atividade dos hormônios do estresse.

Local do experimento: Salas experimentais do Laboratório de Psicologia de Aprendizagem

São Carlos, 16 de junho de
2017



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



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