

**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FISIOLÓGICAS – UFSCar/UNESP  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar  
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
LABORATÓRIO DE NEUROPSICOFARMACOLOGIA**

**Ana Cláudia Cipriano**

**AVALIAÇÃO NEUROPSICOFARMACOLÓGICA DOS MECANISMOS CRFÉRGICOS NA  
AMÍDALA, NAS REAÇÕES DE DEFESA DE CAMUNDONGOS PRÉ-EXPOSTOS À  
DERROTA SOCIAL**

**Araraquara, SP**

**2015**

**ANA CLÁUDIA CIPRIANO**

**AVALIAÇÃO NEUROPSICOFARMACOLÓGICA DOS MECANISMOS  
CRFÉRGICOS NA AMÍDALA, NAS REAÇÕES DE DEFESA DE CAMUNDONGOS  
PRÉ-EXPOSTOS À DERROTA SOCIAL**

Tese apresentada ao Programa Interinstitucional  
de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas –  
PIPGCF UFSCar/UNESP para a obtenção do  
título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza

Co-orientadora: Dra. Karina Santos Gomes

**Araraquara, SP**

**2015**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

C577an Cipriano, Ana Cláudia.  
Avaliação neuropsicofarmacológica dos mecanismos  
CRFérgicos na amídala, nas reações de defesa de  
camundongos pré-expostos à derrota social / Ana Cláudia  
Cipriano. -- São Carlos : UFSCar, 2015.  
68 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,  
2015.

1. Neuropsicofarmacologia. 2. Derrota social. 3. CRF. 4.  
Ansiedade. 5. Amídala. 6. Labirinto em cruz elevado. I.  
Título.

CDD: 616.8041 (20<sup>a</sup>)



Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Ana Cláudia Cipriano, realizada em 15/05/2015:

Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza  
UNESP

Profa. Dra. Isabel Marian Hartmann de Quadros  
Unifesp

Profa. Dra. Silvana Chiavegatto  
USP

Profa. Dra. Cleopatra da Silva Planeta  
UNESP

Profa. Dra. Amanda Ribeiro de Oliveira  
UFSCar

***“Um dia, quando olhares para trás, verás que os dias mais belos foram aqueles em que lutaste.”***

*Sigmund Freud*

## AGRADECIMENTOS

A Deus por se mostrar presente nas mais diferentes formas ao longo da minha vida.

Aos anjos que Deus pôs no meu caminho, também chamados de amigos. Aos amigos da infância difícil que me ensinaram a ser criativa, fazer muito com tão pouco. Aos amigos da adolescência que me ajudaram a sonhar e correr atrás dos sonhos. Aos amigos da vida adulta/atual por alegrarem meus dias e partilharem vitórias e frustrações.

Aos meus familiares que com suas diferentes formas de agir me ajudaram a trilhar meus caminhos e concluir este trabalho.

A todos os professores que foram verdadeiros mestres ao longo da minha vida. Sem a influência de seus pequenos e grandiosos atos, eu não seria quem sou.

A Rô, Bete e Tirene pelo excelente trabalho prestado e pela amizade essencial.

A Karina pela co-orientação que com certeza foi crucial para o meu processo de formação.

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP e ao Programa Interinstitucional de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas – PIPGCF UFSCar/UNESP pela infraestrutura disponibilizada para a realização do meu doutorado. A FAPESP pelo apoio financeiro imprescindível para minha manutenção, participação em reuniões científicas e aquisição de insumos.

Aos animais que cederam suas vidas para a realização dos estudos contidos nesta tese.

As ciências humanas, ao feminismo e demais militâncias, que sempre nortearam a minha vida pessoal e profissional.

Ao meu querido orientador Ricardo, por ser não apenas um pai científico, mas por ser um ombro amigo e confiar no meu potencial sempre.

A vida por ela ser como é.

## RESUMO

O estresse é uma ameaça real ou potencial para a integridade psicológica ou fisiológica de um indivíduo e que resulta em respostas fisiológicas e/ou comportamentais. Os conhecimentos sobre estas respostas bem como sobre os substratos neurobiológicos envolvidos nestes processos só foram possíveis com o desenvolvimento de modelos animais de estresse. Dentre os vários modelos utilizados, destaca-se o modelo de derrota social por suas características mais etológicas. Em relação aos substratos neurobiológicos, é sabido que a amígdala tem um importante papel na modulação de respostas defensivas. Esta estrutura encefálica possui diversos neurotransmissores e respectivos receptores com importantes implicações em estados emocionais, dentre eles o Fator de Liberação de Corticotropina (CRF). Os mecanismos de ação do CRF se dão por sua interação com os receptores CRF1 e CRF2. A ativação destes receptores na amígdala tem sido postulada como um dos possíveis substratos neuroquímicos das alterações que ocorrem nos transtornos comportamentais induzidos por estresse em humanos, destacando-se os transtornos de ansiedade por serem os mais prevalentes na população. Como ferramenta de estudo desses transtornos, temos o labirinto em cruz elevado (LCE), um dos mais populares modelos animais de ansiedade. Estudos no LCE apontam que o CRF1 modula a ansiedade, enquanto o papel do CRF2 não está claro. Poucos estudos, no entanto, têm investigado os efeitos do CRF, bem como de antagonistas para CRF1 e CRF2 injetados diretamente na amígdala sobre as respostas defensivas de camundongos. Além disso, ainda se fazem necessários diversos estudos para entender a complexa relação entre a neurotransmissão CRFérgica da amígdala na etiologia de transtornos de ansiedade relacionados a prévia exposição ao estresse. Sendo assim, o objetivo deste estudo é investigar o papel do CRF na amígdala, nas reações de defesa avaliadas no LCE em camundongos previamente expostos ao estresse de derrota social agudo. Para tanto, realizou-se experimentos para (i) caracterizar os efeitos do estresse de derrota social agudo sobre o comportamento de camundongos no LCE e sobre os níveis de corticosterona plasmática; (ii) investigar os efeitos de microinjeções intra-amígdala de CRF e de antagonistas CRF1 e CRF2 sobre os comportamentos de camundongos no LCE e (iii) investigar os efeitos de microinjeções intra-amígdala de antagonistas CRF1 e CRF2 em camundongos pré-expostos ao estresse de derrota social agudo e submetidos ao LCE. Os resultados obtidos demonstram que o estresse de derrota social agudo é ansiogênico a curto e longo prazos, entretanto a resposta de ansiedade a curto prazo é variável. Estes mesmos efeitos a curto prazo são acompanhados por aumento do nível de corticosterona plasmática. Ainda demonstram que o CRF na amígdala é ansiogênico e que há uma modulação tônica via CRF1, já o papel do CRF2 continua indeterminado. Entretanto, não foi possível determinar o papel da neurotransmissão CRFérgica nas respostas exibidas por camundongos pré-expostos ao estresse de derrota social e submetidos ao LCE.

Palavras-chaves: derrota social, CRF, ansiedade, amígdala e LCE

## ABSTRACT

Stressful situations are a real or potential threat for psychological or physiological integrity of an individual. The underlying neurobiological substrates involved in these processes were substantially investigated through the use of animal models of stress. In this context, a crescent number of studies have used more naturalistic animal tests, such as the social defeat test. Regarding neurobiological substrates, it is known that the amygdala plays an important role in the modulation of defensive responses. This forebrain structure has several neurotransmitters and receptors with important implications in emotional states. In this context, the neuropeptide Corticotropin Releasing Factor (CRF) and its receptors, CRF1 and CRF2, have been recently investigated as an important modulatory system of defensive reactions to aversive situations. Activation CRF mechanisms in the amygdala has been postulated as a possible neurochemical substrate underlying the emotional disorders, especially anxiety disorders, induced by stress in humans. To study anxiety-related responses induced by stressors in animals, the elevated plus maze (EPM) test has been widely used. While previous studies have emphasized the role of CRF1 receptors in modulation of anxiety in rodents exposed to the EPM, the involvement of CRF2 receptors remains unclear. Few studies, however, have investigated the effects of CRF and CRF1 and CRF2 antagonists injected directly into the amygdala on the defensive responses in mice. In addition, several studies are needed to clarify the complex relationship between CRF neurotransmission of the amygdala in the etiology of anxiety disorders related to previous exposure to stress. This study investigated the role of CRF in the amygdala upon the defense reactions evaluated in the EPM in mice previously exposed to acute social defeat. Therefore, we carried out experiments to (i) characterize the effects of acute social defeat on behavior in the EPM and on the levels of plasma corticosterone; (ii) to investigate the effects of intra-amygdala microinjection of CRF, CRF1 and CRF2 antagonists on the behavior of mice in the EPM and (iii) to investigate the effects of intra-amygdala microinjections of CRF1 and CRF2 antagonists on anxiety-related behaviors of mice pre-exposed to acute social defeat. Results showed that the exposure to acute social defeat stress produces anxiogenesis at short and long terms (i.e, assessed 5 min and 10 days after stress exposure), however short-term anxiety response is variable. Stress-short term effects are accompanied by increased plasma corticosterone levels. In addition, while intra-amygdala CRF increases anxiety, local injection of CRF1 (but not CRF2) receptor antagonists produced anxiolytic-like effects, suggesting a tonic role of CRF1 in the modulation of anxiety in mice exposed to the EPM. However, it was not possible to determine what is the role of CRF neurotransmission in the responses displayed by mice pre-exposed to social defeat and submitted to EPM.

Key-words: social defeat, CRF, anxiety, amygdala and EPM



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
2. OBJETIVOS.....	15
2.1. Geral.....	15
2.2. Específicos.....	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3.1. Sujeitos.....	16
3.2. Cirurgia.....	16
3.3. Fármacos.....	17
3.4. Equipamento.....	17
3.4.1. <i>Labirinto em Cruz Elevado (LCE)</i> .....	17
3.5. Histologia.....	17
3.6. Dosagem de corticosterona.....	18
3.7. Escolha dos agressores.....	18
3.8. Procedimentos.....	18
3.8.1. <i>Experimento 1 – Avaliação dos efeitos do estresse de derrota social agudo sobre os comportamentos exibidos por camundongos no LCE e sobre a ativação do eixo HPA</i> .....	18
<u>3.8.1.1. <i>Efeitos a curto e longo prazo do estresse sobre os comportamentos de camundongos expostos ao LCE</i></u> .....	<u>19</u>
<u>3.8.1.2. <i>Avaliação dos níveis de corticosterona de animais expostos apenas ao estresse de derrota social agudo, bem como de animais expostos ao estresse e submetidos ao LCE</i></u> .....	<u>20</u>
3.8.2. <i>Experimento 2 – Investigação do papel do CRF e de seus receptores na amígdala nos comportamentos defensivos eliciados pela exposição de camundongos ao labirinto em cruz elevado</i> .....	21
<u>3.8.2.1. <i>Avaliação do papel do CRF na amígdala nos comportamentos de camundongos submetidos ao LCE</i></u> .....	<u>21</u>
<u>3.8.2.2. <i>Investigação da participação do receptor de CRF do subtipo 2 da amígdala nos comportamentos defensivos exibidos no LCE por camundongos</i></u> .....	<u>21</u>

<b>3.8.3. Experimento 3 – Investigação da participação dos receptores de CRF da amígdala nos comportamentos defensivos exibidos no LCE por camundongos previamente submetidos ao estresse de derrota social agudo.....</b>	<b>22</b>
<b>3.9. Análise estatística.....</b>	<b>22</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>23</b>
<b>4.1. Efeitos do estresse de derrota social agudo em camundongos sobre os comportamentos defensivos exibidos no labirinto em cruz elevado e sobre a ativação do eixo HPA.....</b>	<b>23</b>
<b>4.1.1. Efeitos a curto e longo prazo do estresse sobre os comportamentos de camundongos expostos ao LCE.....</b>	<b>23</b>
<b>4.1.2. Efeito do estresse de derrota social agudo sobre os níveis plasmáticos de corticosterona e sobre os comportamentos defensivos de camundongos exibidos no labirinto em cruz elevado.....</b>	<b>28</b>
<b>4.2. Efeitos da microinjeção na amígdala de compostos da família CRF, bem como de antagonistas para seus receptores, sobre os comportamentos defensivos de camundongos expostos ao labirinto em cruz elevado.....</b>	<b>33</b>
<b>4.2.1. Papel do CRF na amígdala nos comportamentos defensivos eliciados pela exposição de camundongos ao labirinto em cruz elevado.....</b>	<b>33</b>
<b>4.2.2. Papel do subtipo 2 do receptor de CRF da amígdala nos comportamentos defensivos de camundongos expostos ao LCE.....</b>	<b>41</b>
<b>4.3. Ausência de efeitos do bloqueio CRFérgico na amígdala de camundongos expostos ao estresse de derrota social agudo e submetidos ao labirinto em cruz elevado.....</b>	<b>47</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>51</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>60</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O conceito de estresse emergiu na literatura médica com os trabalhos de Hans Selye, no início do século 20. Originalmente um termo utilizado na física para designar a tensão e o desgaste a que materiais estão expostos, a partir dos trabalhos de Selye, o estresse foi definido como uma resposta não específica de um corpo a qualquer demanda. Sendo, por sua vez, denominado estressor aquele que produz estresse (MONROE, 2000). Atualmente, o estresse pode ser definido como uma ameaça real ou potencial para a integridade psicológica ou fisiológica de um indivíduo e que resulta em respostas fisiológicas e/ou comportamentais (MCEWEN, 2000).

Além de popularizar o termo estresse, Selye foi responsável por definir a “síndrome geral da adaptação”, que consiste nas alterações fisiológicas que ocorrem em animais e humanos expostos ao estresse prolongado. Esta síndrome é dividida em três fases distintas: alarme, adaptação (ou resistência) e exaustão. Assim que um organismo é exposto a um estressor, rapidamente ocorre a reação de alarme, sendo esta fase subdividida em outras duas fases: a fase de choque e a fase de contrachoque. Os efeitos do estressor são expressos em alterações nos processos homeostáticos, incluindo processos regulatórios que afetam a pressão sanguínea, níveis de glicose circulante, balanço eletrolítico, distribuição do fluxo de sangue e permeabilidade da membrana. Essas respostas (choque) são neutralizadas, em parte, pelas respostas de contrachoque do córtex adrenal, através da liberação de corticosteroides, e da medula adrenal, através da liberação de epinefrina (MCCARTY; PACAK, 2000).

Persistindo o estímulo estressor, ocorre a segunda fase da síndrome geral da adaptação. Durante esta fase de resistência, o organismo aumenta sua adaptação aos efeitos adversos do estressor mas fica mais suscetível aos efeitos deletérios de outras alterações homeostáticas. Se o estímulo estressor continuar e/ou aumentar sua intensidade, o organismo entra na fase final da síndrome geral da adaptação, a fase de exaustão. Selye propôs que nesta fase a atividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (eixo HPA) estaria aumentada e que ocorreria alterações no sistema imune (susceptibilidade aumentada a agentes infecciosos) e no trato gastrointestinal (úlceras), resultando por fim na morte do organismo (MCCARTY; PACAK, 2000).

Em resumo, os efeitos fisiológicos do estresse incluem alterações nos sistemas neuroendócrino e nervoso autônomo, assim como na função imunológica. Já alguns exemplos de alterações comportamentais relacionadas ao estresse são respostas agressivas e de congelamento em animais, tabagismo, consumo de álcool e déficit no desempenho de tarefas complexas em humanos. O estresse também é capaz de alterar o processamento de informações e funções cognitivas relacionadas a atenção e a memória. Ainda, em humanos, as experiências subjetivas durante o estresse de angústia, insatisfação e raiva, em conjunto com respostas depressivas e relacionadas a ansiedade, contribuem para o aparecimento de transtornos psiquiátricos (STEPTOE, 2000).

Todos os avanços sobre os efeitos fisiológicos e psicológicos do estresse, bem como sobre os substratos neurobiológicos envolvidos nestes processos só foram possíveis com o desenvolvimento de modelos animais capazes de avaliar as mudanças induzidas pela exposição aguda ou crônica a estressores (por ex. predadores, choques, restrição de movimento). As diferenças principais entre estes modelos se relacionam com a duração (aguda ou crônica) e natureza do estressor (físico ou psicossocial) (CAMPOS et al., 2013).

Dentre os vários modelos animais de estresse utilizados, destaca-se o modelo de derrota social por suas características mais etológicas. Este modelo consiste num conflito entre co-específicos, no qual um animal dominante residente ataca um intruso, resultando na exibição de diversos comportamentos defensivos no animal agredido. A derrota social observada em conflitos entre camundongos se caracteriza pela exibição da postura de submissão (por ex. postura de levantar defensivo) do animal atacado (MICZEK et al., 1982). Primeiramente descrito por Yen e colaboradores (1959), esse procedimento tornou-se amplamente utilizado para o estudo da neurobiologia da agressão (para uma revisão ver MICZEK et al., 1994; SIEGFRIED; FRISCHKNECHT; NUNES-DE-SOUZA, 1990) e das conseqüências do estresse crônico sobre vários parâmetros comportamentais, fisiológicos, farmacológicos e moleculares (por ex. KRISHNAN et al., 2007; ZELENA et al., 1999). Devido às alterações comportamentais, endócrinas e fisiológicas observadas na derrota social, tem-se proposto este modelo como sendo válido para o estudo de desordens comportamentais, tais como depressão, abuso de drogas e ansiedade social (BJÖRKQVIST, 2001; KEENEY; HOGG, 1999; LAVIOLA et al., 1999; STEIN; BOUWER, 1997).

Estas alterações comportamentais, endócrinas e fisiológicas são um reflexo do equilíbrio dinâmico (homeostase) ameaçado por um estressor. Como resultado, o comportamento é dirigido no sentido de avaliar o potencial desestabilizador desse estressor. Se o evento não corresponde a alguma representação cognitiva com base na experiência subjetiva anterior do indivíduo, há um aumento na excitação, estado de alerta, vigilância, atenção focada e processamento cognitivo. A interface entre a informação sensorial recebida e o processo de avaliação é formado por estruturas do sistema límbico, que incluem o hipocampo, a amígdala e o córtex pré-frontal (DE KLOET et al., 2005).

A amígdala é uma das principais regiões encefálicas envolvidas no processamento de estímulos aversivos, coordenando respostas automáticas, integrando informações sensoriais aos estímulos contextuais e/ou discretos, através de projeções recíprocas com estruturas corticais e subcorticais (LEDOUX, 2000; PHELPS; LEDOUX, 2005; ZALD, 2003). Sucintamente, a amígdala é composta de aproximadamente 13 núcleos com complexas conexões inter e intranucleares. Esses núcleos estão subdivididos em três principais grupos: o grupo basolateral, que inclui os núcleos lateral, basal e basal acessório; o grupo superficial ou cortical, incluindo os núcleos corticais e o núcleo do trato olfatório lateral; e o grupo centromedial, composto pelos núcleos medial e central (para uma revisão, ver SAH et al., 2003). Têm-se estabelecido que os subnúcleos basolateral e central desempenham papéis fundamentais na aquisição e expressão de comportamentos relacionados ao medo (SAH et al., 2003). Em relação ao subnúcleo medial, dados na literatura demonstram seu envolvimento com as respostas neuroendócrinas decorrentes do estresse agudo, como o de contenção (DAYAS; BULLER; DAY, 1999), porém não em respostas neuroendócrinas relacionadas ao estresse crônico (SOLOMON et al., 2010).

Em ratos, tem sido proposta a existência de vias distintas na amígdala, modulando reações de medo (conjunto de respostas rápidas a um estímulo específico de perigo) e ansiedade (conjunto de respostas mais contínuas desencadeadas por situações ameaçadoras imprevisíveis). A primeira envolveria os núcleos central, medial e basolateral da amígdala, enquanto a segunda envolveria projeções da amígdala basolateral para o núcleo intersticial da estria terminal (DAVIS, 2006). Uma meta-análise de estudos envolvendo neuroimagem demonstrou que, assim como o proposto em investigações com animais, estímulos ameaçadores

ativavam a amígdala de humanos saudáveis (PHAN et al., 2002). Em pacientes diagnosticados com diferentes tipos de transtornos de ansiedade e submetidos a estímulos ameaçadores, tem sido demonstrado um padrão característico de aumento de atividade da amígdala, podendo este padrão ser também observado quando os pacientes encontram-se nos estágios iniciais de tratamento, e quando o estímulo ameaçador está mascarado, ou seja, quando o paciente não tem consciência do estímulo (para uma revisão, ver MATHEW; PRICE; CHARNEY, 2008). Além disso, estados emocionais como ansiedade e medo condicionado em ratos têm sido relacionados a alterações neuroplásticas na amígdala, que levam a excitabilidade de seus neurônios eferentes pelo aumento das transmissões noradrenérgica e glutamatérgica e pela diminuição das transmissões opioidérgica e GABAérgica (DAVIS; RAINNIE; CASSELL, 1994).

A amígdala contém diversos neurotransmissores e respectivos receptores com importantes implicações em estados emocionais (ex. DAVIS, 1993; MCGAUGH, 2004). Neste sentido, níveis significantes de receptores para o Fator de Liberação de Corticotropina (CRF) foram reportados, principalmente na amígdala basolateral (DE SOUZA et al., 1985). O CRF é um peptídeo com 41 aminoácidos produzido no hipotálamo, sendo inicialmente conhecido por sua função no eixo HPA, o qual, segundo Mathew, Price e Charney (2008), é um sistema interativo de hormônios liberados em resposta a estímulos estressores. Este peptídeo faz parte de uma extensa família de peptídeos, a qual inclui além do CRF, três urocortinas (Ucn1, Ucn2 e Ucn3), três urotensinas (Utn1, Utn2 e Utn3) e o sauvagine (Svg). Cabe um destaque ao próprio CRF e as urocortinas, por serem os membros da família encontrados em mamíferos (RONAN; SUMMERS, 2011).

Os mecanismos de ação do CRF e peptídeos relacionados se dão pela interação com dois tipos de receptores, o CRF1 (CHANG et al., 1993; CHEN, R. et al., 1993; VITA et al., 1993) e o CRF2 (LOVENBERG et al., 1995; PERRIN et al., 1995). Apenas o CRF e a Ucn1 possuem afinidade pelo CRF1, enquanto o CRF e todas as urocortinas ligam-se com diferentes graus de afinidade ao CRF2 (HILLHOUSE; GRAMMATOPOULOS, 2006). Receptores do subtipo 1 estão amplamente distribuídos pelas regiões neocortical, límbica e do tronco cerebral do sistema nervoso central, enquanto o subtipo 2 está limitado a regiões cerebrais específicas, incluindo núcleos da rafe, septo lateral (LS), núcleos cortical e medial da amígdala e núcleos paraventricular (PVN) e ventromedial hipotalâmicos (HAUGER et

al., 2006). Embora seja provável que a família CRF de peptídeos produza um resultado coordenado, ativando respostas comportamentais, fisiológicas e neuroendócrinas ao estresse, as diferentes distribuições regionais dos peptídeos e receptores pelo sistema nervoso central, juntamente com diferentes afinidades de ligação, sugerem funções mais específicas para cada peptídeo dentro do esquema sincronizado em resposta ao estresse (RONAN; SUMMERS, 2011).

Embora seja conhecido que o CRF1 medeia comportamentos relacionados a ansiedade e a depressão, bem como as respostas do eixo HPA ao estresse, as funções do CRF2 ainda não são bem compreendidas. Uma hipótese é que a ativação do CRF1 inicia respostas de medo e ansiedade, enquanto a ativação do CRF2 restabeleceria a homeostase contrabalanceando os efeitos aversivos da sinalização do CRF1. Uma hipótese alternativa postula que CRF1 e CRF2 contribuem de maneiras opostas para as reações defensivas, com o CRF1 mediando respostas defensivas ativas desencadeadas por estressores escapáveis e com o CRF2 mediando respostas relacionadas a ansiedade e depressão induzidas por estressores inescapáveis (para uma revisão ver HAUGER et al., 2006).

Estudos clínicos e pré-clínicos sugerem que uma neurotransmissão CRFérgica anormal persistente, contribui de maneira importante para a etiologia de doenças relacionadas a ansiedade, estresse e depressão (HAUGER et al., 2006). É conhecido que a exposição de ratos a estressores agudo ou crônico provoca aumento da liberação de CRF na amígdala (CUMMINGS et al., 1983; MERALI et al., 1998; MERLO-PICH et al., 1992, 1995; RODRIGUEZ DE FONSECA et al.; 1997). Além disso, a ativação de receptores CRF nesta estrutura prosencefálica tem sido postulada como um dos possíveis substratos neuroquímicos das alterações que ocorrem nos transtornos comportamentais induzidos por estresse em humanos (SHEKHAR et al., 2005).

Dentre os transtornos mentais, destacam-se os transtornos de ansiedade por serem os mais prevalentes na população. Estima-se que 6,7% da população mundial é afetada anualmente e 12,9% será afetada em algum momento ao longo da vida (STEEL et al., 2014). Em um recorte nacional temos que, na região metropolitana de São Paulo, os transtornos de ansiedade também são os mais comuns, afetando 19,9% dos entrevistados nos 12 meses anteriores a coleta de dados (ANDRADE et al., 2012). De acordo com a mais recente edição do Manual de Diagnóstico e Estatística dos Distúrbios Mentais (DSM-5, do inglês *Diagnostic*

*Statistical Manual of Mental Disorders*), temos que se enquadram como transtornos de ansiedade: o transtorno de ansiedade de separação, o mutismo seletivo, as fobias específicas, o transtorno de ansiedade social ou fobia social, o transtorno do pânico, a agorafobia, o transtorno de ansiedade generalizada, o transtorno de ansiedade devido a uma condição médica geral, outros transtornos de ansiedade especificados e o transtorno de ansiedade não especificado (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013). Ainda, segundo o DSM-5, os transtornos de ansiedade incluem distúrbios que compartilham características de medo e ansiedade excessivos, além de distúrbios comportamentais relacionados. Sendo o medo a resposta emocional a uma ameaça iminente real ou aparente, ao passo que a ansiedade é a antecipação de uma ameaça futura. Esses dois estados se sobrepõem, mas também diferem entre si, com o medo mais frequentemente associado a picos de ativação autonômica necessários para a luta ou fuga, pensamentos de perigo imediato e comportamentos de esquiva, enquanto a ansiedade está mais frequentemente associada com o estado de aumento de tensão muscular e de vigilância em preparação para o perigo futuro, bem como com comportamentos cautelosos ou de esquiva (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

Dentre os modelos animais de ansiedade temos que o labirinto em cruz elevado (LCE) é um dos mais populares em uso, baseando-se na aversão natural de roedores a espaços abertos (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005). Neste sentido, existe um grande corpo de evidências enfatizando o papel desempenhado pelo CRF1 na modulação da ansiedade (por exemplo, MIGUEL; NUNES-DE-SOUZA, 2011; SMITH et al., 1998; SPINA et al., 2000; TIMPL et al., 1998), enquanto resultados contrastantes sobre o papel desempenhado pelo CRF2 na modulação de respostas defensivas a estímulos ameaçadores foram relatados, com resultados mostrando efeitos ansiolíticos, ansiogênicos ou mesmo ausência de efeitos (por exemplo, BALE et al., 2000; KISHIMOTO et al., 2000; TAKAHASHI et al., 2001). Embora boa parte dos estudos anteriores usou agonistas e antagonistas do receptor de CRF sistemicamente ou via intracerebroventricular, tornando-se difícil identificar em que área do sistema nervoso central o CRF modula a ansiedade e o medo, algumas áreas do sistema límbico são potenciais candidatos a desempenhar tal função. Neste contexto, injeções intra-matéria cinzenta periaquedutal (MCP) de CRF ou agonistas CRF produziram um efeito ansiogênico em ratos (BORELLI;



BRANDÃO, 2008) e camundongos (MIGUEL; NUNES-DE-SOUZA, 2011). Em camundongos, a injeção intra-MCP de antagonista CRF1 seletiva e completamente bloqueou o efeito ansiogênico do CRF (MIGUEL; NUNES-DE-SOUZA, 2011). Curiosamente, tanto antagonistas seletivos quanto não seletivos de CRF1 injetados na MCP, por si só, não foram capazes de alterar os índices de ansiedade no LCE em ratos (MARTINS et al., 2000) ou camundongos (MIGUEL; NUNES-DE-SOUZA, 2011). Entretanto, recentemente, Miguel, Gomes e Nunes-de-Souza (2014) demonstraram que no córtex pré-frontal medial há modulação tônica via CRF1 dos comportamentos exibidos por camundongos no LCE. Poucos estudos, no entanto, têm investigado os efeitos do CRF, bem como de seus de antagonistas para CRF1 e CRF2 injetados diretamente na amígdala sobre as respostas defensivas de camundongos.

Recentemente De Francesco e colaboradores (2015), caracterizaram que neurônios CRFérgicos da amígdala de camundongos são ativados quando estes animais são submetidos ao estresse de derrota social agudo, reafirmando a importância de estudos neuropsicofarmacológicos que visem a melhor compreensão do papel do CRF nesta estrutura límbica em animais expostos a este modelo de estresse.

Em suma, diversas evidências apontam para uma relação entre a neurotransmissão CRFérgica da amígdala e a etiologia de transtornos de ansiedade relacionados a prévia exposição a uma situação estressante, entretanto ainda se fazem necessários diversos estudos para entender esta complexa relação.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Geral**

Investigar o papel do CRF na amígdala, nas reações de defesa avaliadas no labirinto em cruz elevado em camundongos previamente expostos ao estresse agudo desencadeado pela derrota social.

### **2.2. Específicos**

1. Caracterizar os efeitos do estresse de derrota social agudo em camundongos.

2. Investigar os efeitos de microinjeções intra-amígdala de CRF e de seus antagonistas (CRF1 e CRF2) nos comportamentos defensivos eliciados pela exposição de camundongos ao labirinto em cruz elevado.

3. Investigar os efeitos de microinjeções intra-amígdala de antagonistas de receptores para o CRF (CRF1 e CRF2) em camundongos submetidos ao labirinto em cruz elevado, pré-expostos a uma única exposição ao estresse de derrota social.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Sujeitos

Foram utilizados camundongos Suíços albinos machos (25-35g), provenientes do biotério central da Universidade Estadual Paulista, UNESP. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ( $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ), umidade ( $55 \pm 5\%$ ) e luz (ciclo de 12/12 horas, luzes acesas às 07h) e tiveram livre acesso ao alimento e à água, exceto durante os curtos períodos de teste.

Todos os procedimentos envolvendo o uso de animais neste estudo tiveram início após a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista, Campus de Araraquara, protocolo CEUA/FCF/CAr nº 19/2011.

#### 3.2. Cirurgia

A fim de realizar microinjeções de fármacos diretamente no complexo amidalóide, realizou-se cirurgia estereotáxica semelhante ao procedimento descrito por Cornélio e Nunes-de-Souza (2007). Os camundongos receberam implantação intracraniana bilateral de cânulas guia (25 gauge) de 7,0 mm de comprimento, após anestesia com a combinação de cetamina e xilazina (100 mg/kg e 10 mg/kg, i.p.). As cânulas foram fixadas no crânio do animal com cimento acrílico. Ao término da cirurgia, os camundongos receberam uma injeção intramuscular de penicilina-G benzatina (pentabiótico, 56,7 mg/kg em um volume de 0,1 mL) e uma injeção subcutânea do analgésico anti-inflamatório Banamine (flunixinina meglumina, 3,5 mg/kg). A princípio as coordenadas estereotáxicas para implantação das cânulas guia foram baseadas em estudos anteriores (BARBALHO et al., 2009; CORNÉLIO; NUNES-DE-SOUZA, 2007) bem como no Atlas de Paxinos e Franklin (2001), sendo posteriormente ajustadas de acordo com os resultados obtidos em testes. Sendo assim as coordenadas utilizadas foram 1,1 mm posterior ao bregma,  $\pm 3,1$  mm lateral à sutura sagital e 3,7 mm ventral à superfície craniana.

### 3.3. Fármacos

Foram utilizados os seguintes fármacos:

- CRF (fator de liberação de corticotropina), como agonista dos receptores CRF, nas doses 37,5 pmol/0,1 µl, 75 pmol/0,1 µl e 150 pmol/0,2 µl;
- CP376395 ((3,6-dimetil-2-(2,4,6-trimetilfenoxi)piridina-4-il)(1-etilpropil)amina), antagonista CRF1, nas doses 0,375 nmol/0,1 µl, 0,75 nmol/0,1 µl e 1,5 nmol/0,1 µl;
- Antisauvagine-30 ([D-Phe<sup>11</sup>,His<sup>12</sup>]-Sauvagine (11-40)), antagonista CRF2, nas doses 1 nmol/0,1 µl e 3 nmol/0,1 µl;
- Urocortina 3, agonista CRF2, nas doses 4 pmol/0,1 µl, 8 pmol/0,1 µl e 16 pmol/0,1 µl.

Para todos os fármacos, a dose inicialmente utilizada teve como base estudos anteriores (BLACKTOP et al., 2011; FUNK; KOOB, 2007; MIGUEL; NUNES-DE-SOUZA, 2011; MYERS; GREENWOOD-VAN MEERVELD, 2010; TELEGDY; ADAMIK, 2013; VALDEZ et al., 2003), as demais doses foram escolhidas de acordo com os resultados obtidos com a dose inicial.

Todos os fármacos foram diluídos em salina fisiológica (NaCl 0,9%) e armazenados conforme instrução do fornecedor.

### 3.4. Equipamento

#### 3.4.1. Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O LCE é similar àquele descrito por Lister (1987). O aparelho é feito de acrílico (assoalho de madeira e paredes transparentes) e consiste de dois braços abertos (30 x 5 x 0,25 cm) e dois braços fechados (30 x 5 x 15 cm), unidos por uma plataforma central comum (5 x 5 cm), e elevado 38,5 cm do solo por um suporte de madeira.

### 3.5. Histologia

Ao final do experimento envolvendo microinjeção, todos os animais foram perfundidos com uma solução de paraformaldeído (4%), seguida pela injeção

intra-amídala de uma solução de 1% de azul de metileno. Os animais foram então decapitados, seus encéfalos removidos e acomodados em recipientes contendo solução de formalina (10%) para sofrerem seções coronais ao longo do trajeto da cânula com o auxílio de um criostato (Leica CM 1850). As seções foram inspecionadas com o uso de um microscópio (Leica DM LB) e a visualização da dispersão do azul de metileno indicou o local da injeção.

### **3.6. Dosagem de corticosterona**

Ao final do experimento para medição dos níveis de corticosterona, todos os animais foram decapitados e amostras de sangue foram coletadas. As amostras foram centrifugadas (5000 rpm/15 minutos) para coleta do plasma e as concentrações de corticosterona foram avaliadas por imunoenensaio enzimático (ELISA) em fase sólida baseado no princípio de competição (Corticosterone ELISA, IBL International®, Germany – Referência 52211) de acordo com as instruções do fabricante. A leitura foi feita em duplicata através do leitor Powerwave HT da Biotek®, em comprimento de onda de 450 nm. Foram consideradas apenas as amostras que ficaram dentro do limite das curvas padrão.

### **3.7. Escolha dos agressores**

Após a chegada ao biotério local do Laboratório de Neuropsicofarmacologia, os animais foram alojados em grupos de 15 sujeitos em gaiolas viveiro (45 x 28 x 13 cm). No período de habituação às condições locais, um observador identificou os camundongos dominantes de cada gaiola (definido como o sujeito que exhibe comportamentos espontâneos de agressão aos demais da gaiola), que foram isolados em gaiolas individuais (28 x 17x 12 cm) por, no mínimo, 4 semanas, para intensificar o comportamento agressivo (VALZELLI, 1981).

### **3.8. Procedimentos**

***3.8.1. Experimento 1 – Avaliação dos efeitos do estresse de derrota social agudo sobre os comportamentos exibidos por camundongos no LCE e sobre a ativação do eixo HPA***

### **3.8.1.1. Efeitos a curto e longo prazo do estresse sobre os comportamentos de camundongos expostos ao LCE**

Camundongos intrusos foram colocados, individualmente, na gaiola moradia (28 x 17 x 13 cm) de um camundongo residente agressor. A interação agressiva ocorreu até o animal intruso exibir a postura de submissão, denominada levantar defensivo (elevação do corpo sobre as patas traseiras, patas dianteiras estendidas em direção ao agressor, cabeça retraída e orelhas arqueadas; MICZEK et al., 1982) por pelo menos 3 segundos ou por um período total máximo de 5 minutos de agressão, o que ocorresse primeiro (YAP et al., 2006). Em seguida, o animal intruso permaneceu 5 minutos dentro da gaiola do animal residente, porém sem contato físico, isolado por um recipiente de acrílico perfurado (15 x 7 x 7 cm), o que o permitia ter contato olfatório, auditivo e visual com o agressor. Cinco minutos ou dez dias após esse período, o camundongo intruso era exposto ao LCE.

Cada animal foi colocado sobre a plataforma central do labirinto, com a cabeça voltada para um dos braços abertos, podendo explorar o aparelho por um período de 5 minutos. Os testes foram conduzidos durante a fase clara do ciclo de luz, em uma sala com baixa iluminação (50 lux, no nível do assoalho do LCE).

Os comportamentos foram avaliados pela análise das sessões gravadas através de um sistema câmera-gravador de DVD, por um observador treinado, usando o programa X-plorat 3.0, desenvolvido pelo grupo do Professor Doutor Silvio Morato, FFCLRP-USP. Os comportamentos analisados foram os parâmetros convencionais: frequência de entradas nos braços abertos e fechados (definida pelo cruzamento com todas as quatro patas para dentro do braço) e duração do tempo gasto nestes compartimentos e na plataforma central. Esses dados foram usados para o cálculo da porcentagem de entradas e do tempo de permanência dos animais nos braços abertos (Entradas:  $[\text{aberto}/\text{total}] \times 100$ ; Tempo:  $[\text{tempo no compartimento}/300] \times 100$ ). Além das medidas espaço-temporais, foram também registradas as seguintes medidas complementares (etológicas):

- Frequências de avaliação de risco: esticar – SAP (do inglês stretched attend posture), postura exploratória na qual o animal estende o corpo, retraindo-o em seguida para voltar à posição original; mergulhar – head dipping, movimento exploratório da cabeça ultrapassando o assoalho do braço aberto do LCE. As

avaliações de risco foram mensuradas nas áreas protegidas (braços fechados e centro), áreas desprotegidas (braços abertos) e no total (somatória dos comportamentos exibidos nas áreas protegidas e nas áreas desprotegidas);

- Frequência e tempo de visitas à extremidade distal dos braços abertos (estar com as quatro patas nos 10 cm finais dos braços abertos);

- Frequência e tempo de levantamentos (elevação do corpo apoiando-se nas patas traseiras).

Como situação controle, um grupo de camundongos passou pelos mesmos procedimentos, exceto pelo fato de que a interação foi com um camundongo residente não agressivo e o período em que ocorria o contato físico foi de 1 minuto (média de tempo que os camundongos agredidos demoraram para exibir a postura de submissão).

### **3.8.1.2. Avaliação dos níveis de corticosterona de animais expostos apenas ao estresse de derrota social agudo, bem como de animais expostos ao estresse e submetidos ao LCE**

Camundongos intrusos foram submetidos ao protocolo de estresse de derrota social conforme descrito no item 3.8.1.1. Diferentes grupos de animais foram decapitados 10, 30 ou 60 minutos após a interação agressiva e amostras de sangue foram coletadas para a realização da técnica de ELISA conforme item 3.6.

Outro grupo de animais passou pelo mesmo procedimento de estresse descrito anteriormente, entretanto após o camundongo intruso ser retirado da gaiola do residente, este foi colocado em uma gaiola moradia individualmente, onde permanecia por 5 minutos, para em seguida ser exposto ao LCE. A forma de análise e os parâmetros analisados foram os mesmos que os descritos anteriormente (item 3.8.1.1.). Dez, trinta ou sessenta minutos após serem colocados no LCE, os animais foram decapitados e amostras de sangue coletadas para a realização da técnica de ELISA conforme item 3.6.

Como grupo controle, camundongos passaram pelos mesmos procedimentos que o grupo estressado, porém foram confrontados com um camundongo conhecido não agressivo.

Um grupo de animais foi retirado da caixa moradia (41 x 34 x 16 cm) e sacrificado em seguida, para se ter o valor de corticosterona basal dos camundongos.

### ***3.8.2. Experimento 2 – Investigação do papel do CRF e de seus receptores na amígdala nos comportamentos defensivos eliciados pela exposição de camundongos ao labirinto em cruz elevado***

#### **3.8.2.1. Avaliação do papel do CRF na amígdala nos comportamentos de camundongos submetidos ao LCE**

Quatro a seis dias após a cirurgia, os animais receberam microinjeção de salina, CRF, CP376395 ou antisauvagine-30 na amígdala através da cânula guia posicionada 1,0 mm dorsal à estrutura alvo. A injeção das soluções foi feita através da inserção de uma agulha (33 gauge) de 8,0 mm de comprimento no interior da cânula guia. A agulha de injeção foi conectada, por meio de um tubo de polietileno (PE-10), a uma microseringa Hamilton, com a qual foi feita a injeção. O movimento de uma pequena bolha de ar no tubo de polietileno durante as injeções confirmou o fluxo da solução.

Dez minutos após a microinjeção das soluções em teste, cada animal foi colocado sobre a plataforma central do LCE e o procedimento no aparato foi realizado conforme descrito no item 3.8.1.1.

#### **3.8.2.2. Investigação da participação do receptor de CRF do subtipo 2 da amígdala nos comportamentos defensivos exibidos no LCE por camundongos**

Quatro a seis dias após a cirurgia, um grupo de animais recebeu microinjeção de salina ou urocortina 3 na amígdala através da cânula guia posicionada 1,0 mm dorsal à estrutura alvo. A injeção das soluções foi feita como descrito anteriormente.

Dez minutos após a microinjeção, cada animal foi submetido ao LCE conforme descrito no item 3.8.1.1.

Outro grupo de animais recebeu um pré-tratamento de salina ou antisauvagine-30 na amígdala e 10 minutos após recebeu uma microinjeção de salina



ou CRF na mesma estrutura alvo. Passados dez minutos da segunda injeção, estes animais foram expostos ao LCE como descrito anteriormente.

### **3.8.3. Experimento 3 – Investigação da participação dos receptores de CRF da amígdala nos comportamentos defensivos exibidos no LCE por camundongos previamente submetidos ao estresse de derrota social agudo**

Quatro a seis dias após a cirurgia, os animais receberam microinjeção de salina, CP376395 ou antisauvagine-30 na amígdala conforme descrito no item 3.8.2.1. Imediatamente após a microinjeção, os camundongos (intrusos) foram colocados, individualmente, na gaiola moradia de um camundongo residente agressor e a sessão de estresse de derrota social ocorreu como no item 3.8.1.1. Após a sessão, o camundongo intruso era retirado da gaiola do residente, colocado em uma gaiola moradia individualmente, onde permanecia por 5 minutos, para em seguida ser exposto ao LCE conforme descrito no item 3.8.1.1.

## **3.9. Análise estatística**

Para a análise estatística dos Experimentos 2 e 3 foram considerados apenas os resultados do teste dos animais nos quais as injeções atingiram bilateralmente a amígdala (verificado através da histologia).

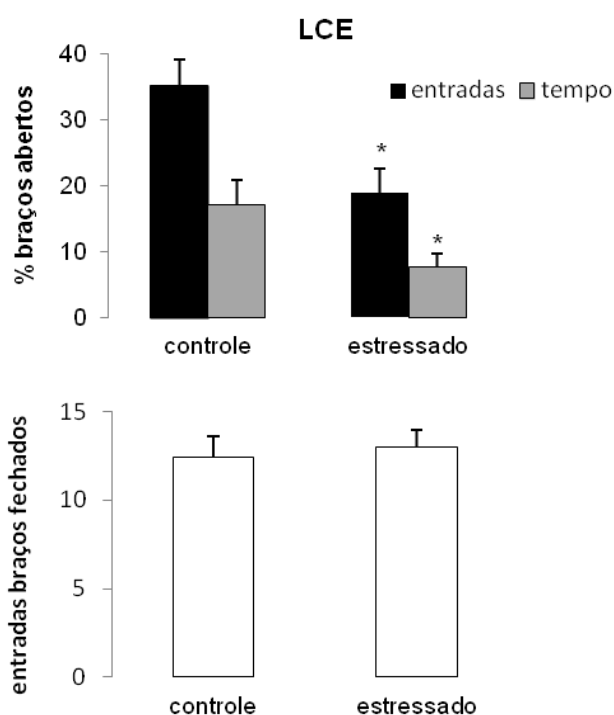
Inicialmente, todos os dados foram submetidos ao teste de homogeneidade de variância de Levene. Posteriormente, para o experimento descrito no item 3.8.1.1., utilizou-se o teste t de *Student*. Para o experimento descrito no item 3.8.1.2., utilizou-se análise de variância (ANOVA) de dois fatores (fator 1 – tipo de interação e fator 2 – tempo de coleta). Para os experimentos descritos nos itens 3.8.2.1., 3.8.2.2. (referente a urocortina 3) e 3.8.3., utilizou-se ANOVA de um fator (tratamento). Para a parte do item 3.8.2.2. referente a antisauvagine-30 e CRF, utilizou-se ANOVA de dois fatores (fator 1 – pré-tratamento e fator 2 – tratamento). Nos casos aonde foram detectadas diferenças pela ANOVA, a análise prosseguiu com o teste post hoc de comparações múltiplas de Duncan ou de comparações planejadas. Valores de p iguais ou inferiores a 0,05 foram considerados significativos.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Efeitos do estresse de derrota social agudo em camundongos sobre os comportamentos defensivos exibidos no labirinto em cruz elevado e sobre a ativação do eixo HPA

#### 4.1.1. Efeitos a curto e longo prazo do estresse sobre os comportamentos de camundongos expostos ao LCE

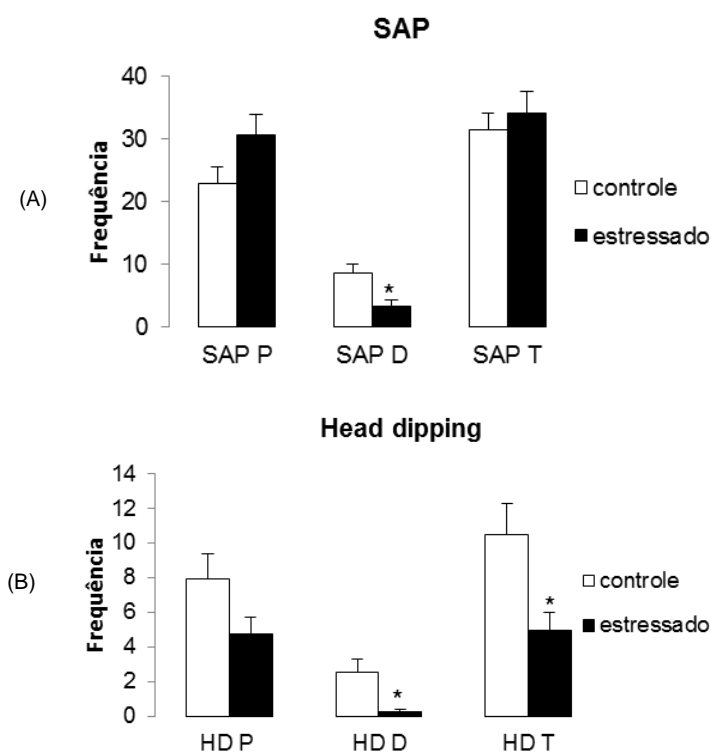
Os efeitos a curto prazo (após 5 minutos) do estresse de derrota social agudo sobre as medidas espaço-temporais e complementares do LCE podem ser vistos nas figuras 1, 2 e 3.



**Figura 1.** Representação gráfica dos efeitos a curto prazo do estresse de derrota social agudo sobre as medidas espaço-temporais do LCE. Barras: média  $\pm$  EPM; N = 12. \* $p < 0,05$  em comparação ao grupo controle.

A análise estatística das medidas espaço-temporais, utilizando-se o teste t de *Student* demonstrou significância para as medidas porcentagem de entradas nos braços abertos ( $t_{(22)} = 3,02$ ,  $p < 0,01$ ) e porcentagem de tempo nos braços abertos ( $t_{(22)} = 2,22$ ,  $p < 0,05$ ), indicando que os animais submetidos ao estresse de derrota social entraram menos nos braços abertos bem como passaram

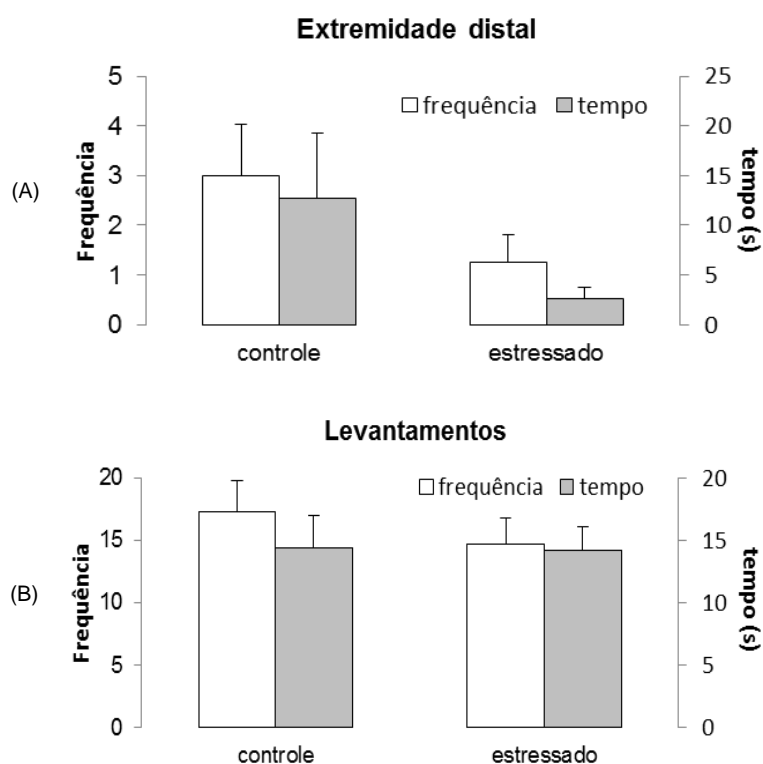
menos tempo nestes braços quando comparados ao grupo controle. Não houve diferenças significativas entre os grupos na medida entradas nos braços fechados ( $t_{(22)} = -0,39, p > 0,05$ ).



**Figura 2.** Representação gráfica dos efeitos a curto prazo do estresse de derrota social agudo sobre a frequência de avaliação de risco [A - esticadas (*stretched attend posture* - SAP) e B - mergulhos (*head dipping* - HD)] exibidas por camundongos nas diferentes regiões (áreas protegidas - braços fechados e centro, áreas desprotegidas - braços abertos e total) do LCE. Barras: média  $\pm$  EPM; N = 12. \* $p < 0,05$  em comparação ao grupo controle.

De acordo com o teste t de *Student*, houve diferença significativa na frequência de esticadas e na frequência de mergulhos na área desprotegida, bem como na frequência total de mergulhos ( $t_{(22)} = 2,79$ ;  $t_{(22)} = 3,27$  e  $t_{(22)} = 2,68$ ,  $p < 0,05$ , respectivamente), indicando diminuição de esticadas e de mergulhos na área desprotegida e de mergulhos no total do grupo estressado em relação ao grupo controle. O teste também apontou para uma tendência ( $p = 0,076$ ) de aumento de esticadas na área protegida do grupo estressado quando comparado ao grupo controle.

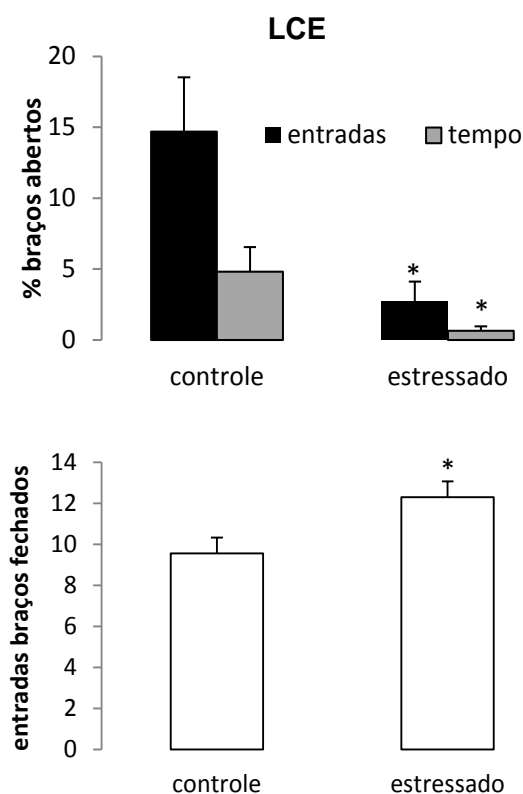
Não houve diferença significativa na frequência total de esticadas e na frequência de mergulhos na área protegida ( $t_{(22)} = -0,58$  e  $t_{(22)} = 1,76$ ,  $p > 0,05$ , respectivamente).



**Figura 3.** Representação gráfica dos efeitos a curto prazo do estresse de derrota social agudo sobre a frequência e tempo de (A) visitas à extremidade distal dos braços abertos e (B) levantamentos exibidos por camundongos no LCE. Barras: média  $\pm$  EPM; N = 12.

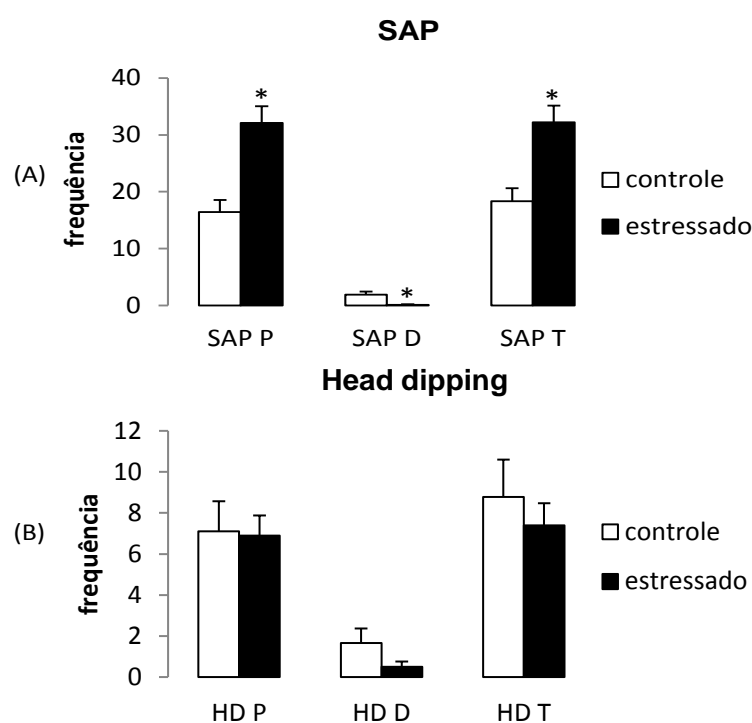
O teste t de *Student* não apontou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tanto na frequência quanto no tempo de permanência na extremidade dos braços abertos ( $t_{(22)} = 1,49$  e  $t_{(22)} = 1,51$ ,  $p > 0,05$ , respectivamente), bem como não apontou diferença entre os grupos na frequência e tempo de levantamentos ( $t_{(22)} = 0,79$  e  $t_{(22)} = 0,06$ ,  $p > 0,05$ , respectivamente).

Quanto aos efeitos a longo prazo (após 10 dias) de uma única sessão de estresse de derrota social agudo sobre as medidas do LCE, os resultados podem ser vistos nas figuras 4, 5 e 6.



**Figura 4.** Representação gráfica dos efeitos a longo prazo do estresse de derrota social agudo sobre as medidas espaço-temporais do LCE. Barras: média  $\pm$  EPM; N = 9 para controle e N = 10 para estressado. \* $p < 0,05$  em comparação ao grupo controle.

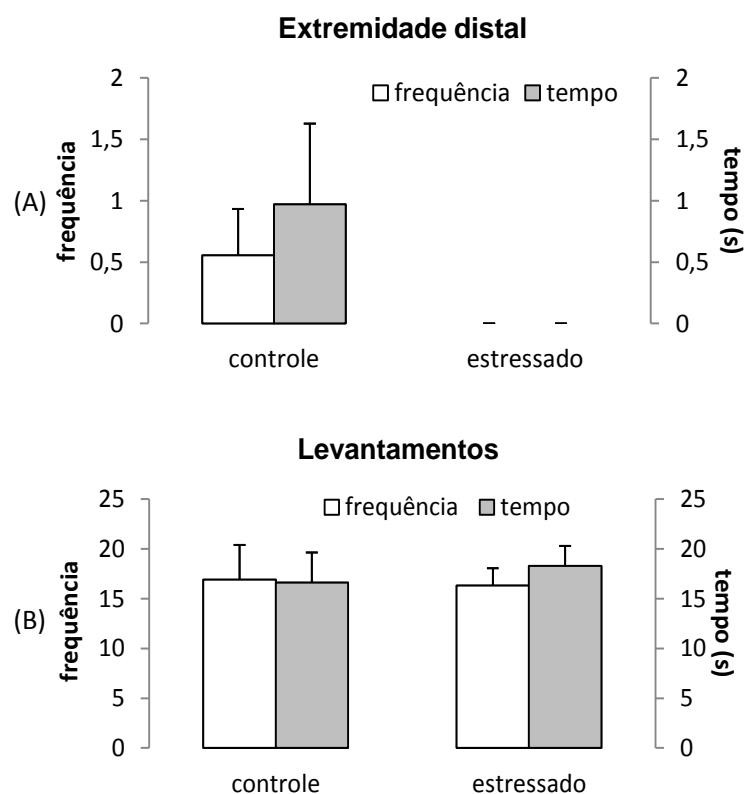
A análise estatística das medidas espaço-temporais, utilizando-se o teste t de *Student* demonstrou significância para as medidas porcentagem de entradas nos braços abertos ( $t_{(17)} = 3,02$ ,  $p < 0,01$ ) e porcentagem de tempo nos braços abertos ( $t_{(17)} = 2,47$ ,  $p < 0,05$ ), indicando que os animais submetidos a uma única sessão de estresse de derrota social, 10 dias após o confronto, entraram menos nos braços abertos bem como passaram menos tempo nestes braços quando comparados ao grupo controle. Além disso, o estresse aumentou a exploração dos braços fechados ( $t_{(17)} = -2,46$ ;  $p < 0,05$ ).



**Figura 5.** Representação gráfica dos efeitos a longo prazo do estresse de derrota social agudo sobre a frequência de avaliação de risco [A - esticadas (*stretched attend posture* - SAP) e B - mergulhos (*head dipping* - HD)] exibidas por camundongos nas diferentes regiões (áreas protegidas - braços fechados e centro, áreas desprotegidas - braços abertos e total) do LCE. Barras: média  $\pm$  EPM; N = 9 para controle e N = 10 para estressado. \* $p < 0,05$  em comparação ao grupo controle.

De acordo com o teste t de *Student*, houve diferença significativa na frequência de esticadas nas áreas protegidas e desprotegidas, bem como na frequência total ( $t_{(17)} = -4,07$ ;  $t_{(17)} = 3,29$  e  $t_{(17)} = -3,51$ ;  $p < 0,01$ , respectivamente), indicando diminuição de esticadas na área desprotegida e aumento na área protegida e no total do grupo estressado em relação ao grupo controle.

Não houve diferença significativa na frequência de mergulhos nas áreas protegidas e desprotegidas, assim como no total ( $t_{(17)} = 0,12$ ;  $t_{(17)} = 1,61$  e  $t_{(17)} = 0,66$ ;  $p > 0,05$ , respectivamente).

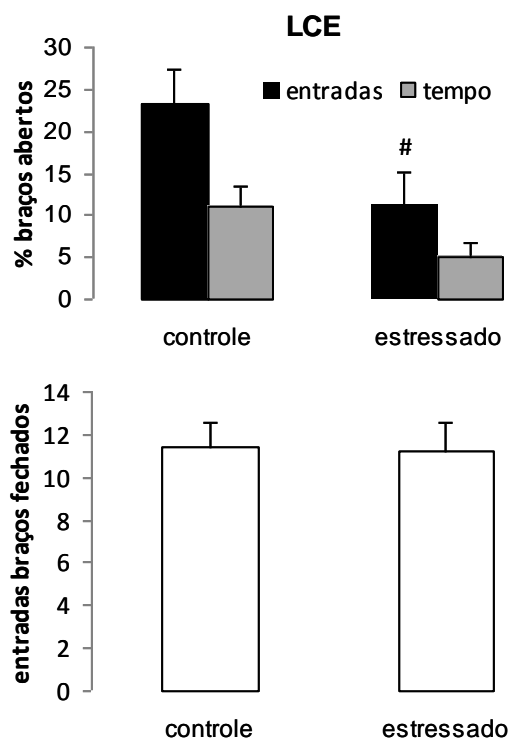


**Figura 6.** Representação gráfica dos efeitos a longo prazo do estresse de derrota social agudo sobre a frequência e tempo de (A) visitas à extremidade distal dos braços abertos e (B) levantamentos exibidos por camundongos no LCE. Barras: média  $\pm$  EPM; N = 9 para controle e N = 10 para estressado.

O teste t de *Student* não apontou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tanto na frequência quanto no tempo de permanência na extremidade dos braços abertos ( $t_{(17)} = 1,56$ ;  $p > 0,05$ , para ambas as medidas), bem como não apontou diferença entre os grupos na frequência e tempo de levantamentos ( $t_{(17)} = 0,15$  e  $t_{(17)} = -0,46$ ;  $p > 0,05$ , respectivamente).

#### **4.1.2. Efeito do estresse de derrota social agudo sobre os níveis plasmáticos de corticosterona e sobre os comportamentos defensivos de camundongos exibidos no labirinto em cruz elevado**

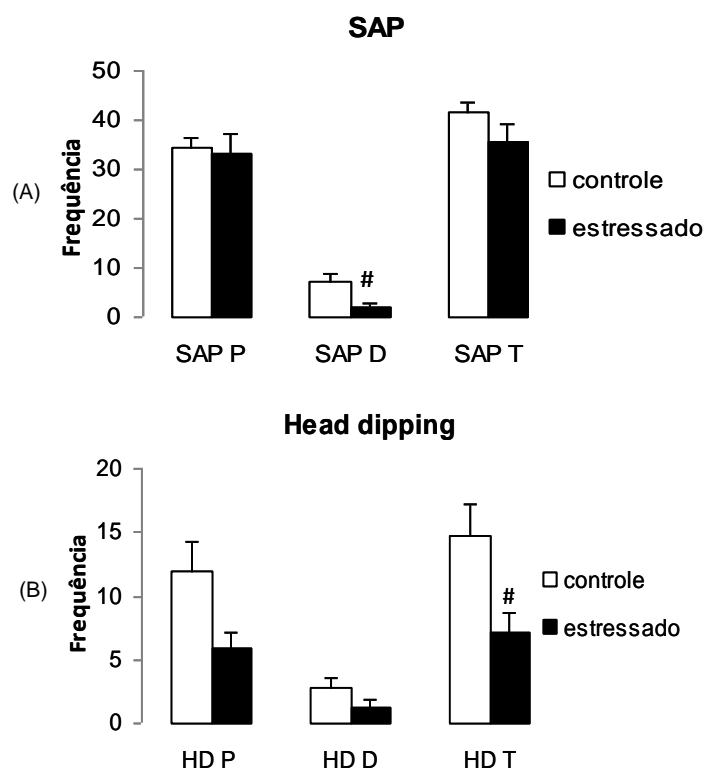
Os efeitos do estresse de derrota social agudo sobre o comportamento dos animais que tiveram amostras de sangue coletadas para a medição dos níveis de corticosterona plasmática, podem ser vistos nas figuras 7, 8 e 9.



**Figura 7.** Efeitos do estresse de derrota social agudo sobre as medidas espaço-temporais do LCE. Barras: média  $\pm$  EPM; N = 16 para controle e N = 15 para estressado. # $p < 0,10$  em comparação ao grupo controle.

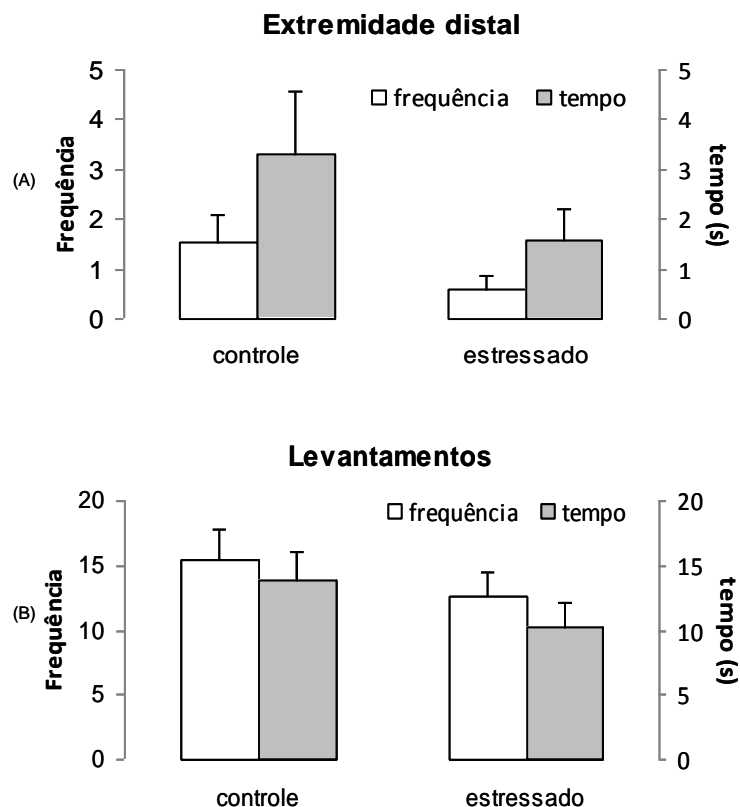
A análise estatística das medidas espaço-temporais, utilizando-se o teste t de *Student* demonstrou uma tendência para a medida porcentagem de entradas nos braços abertos ( $t_{(29)} = 1,78$ ;  $p = 0,08$ ) e não revelou significância para porcentagem de tempo nos braços abertos ( $t_{(29)} = 1,46$ ;  $p > 0,05$ ), bem como para a medida entrada nos braços fechados ( $t_{(29)} = -0,09$ ;  $p > 0,05$ ).





**Figura 8.** Efeitos do estresse de derrota social agudo sobre a frequência de avaliação de risco [A - esticadas (*stretched attend posture* - SAP) e B - mergulhos (*head dipping* - HD)] exibidas por camundongos nas diferentes regiões (áreas protegidas - braços fechados e centro, áreas desprotegidas - braços abertos e total) do LCE. Barras: média  $\pm$  EPM; N = 16 para controle e N = 15 para estressado. # $p < 0,10$  em comparação ao grupo controle.

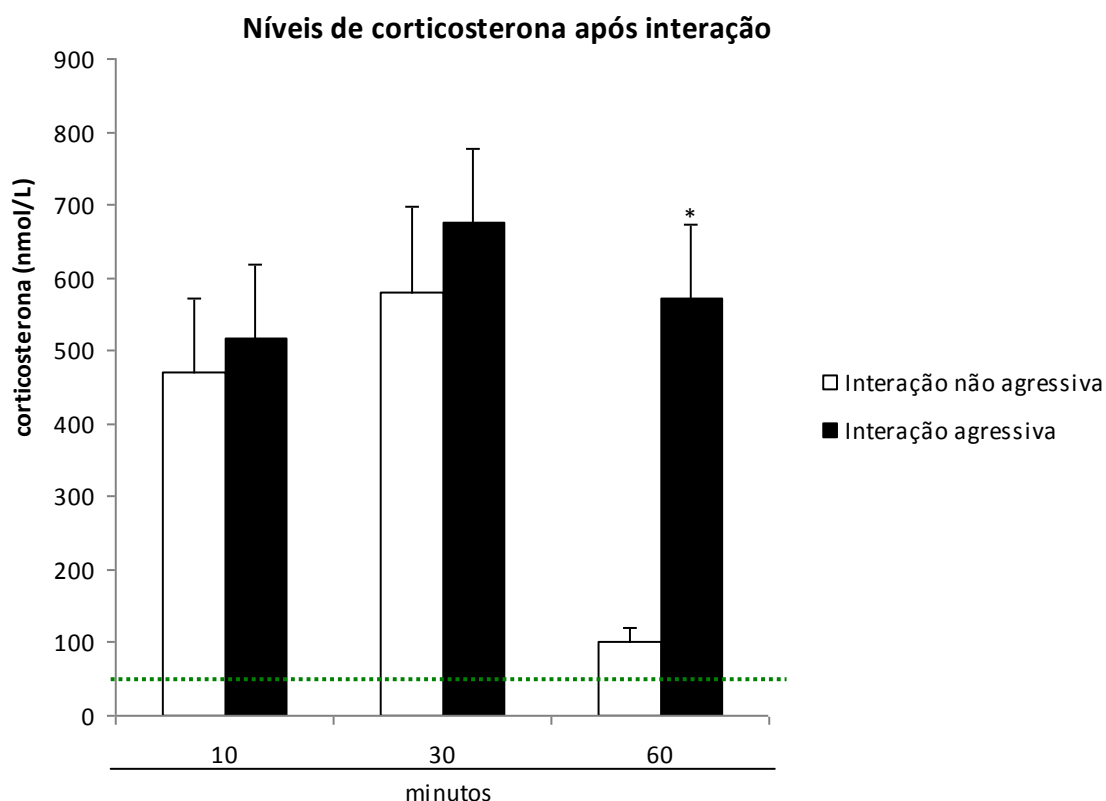
De acordo com o teste t de *Student*, houve tendência de diferença para frequência de esticadas nas áreas desprotegidas e frequência de mergulhos total ( $t_{(29)} = 1,98$ ;  $p = 0,06$  e  $t_{(29)} = 1,87$ ;  $p = 0,07$ , respectivamente). Não houve diferença significativa na frequência de esticadas nas áreas protegidas e total ( $t_{(29)} = -0,14$  e  $t_{(29)} = 0,61$ ;  $p > 0,05$ , respectivamente), bem como não houve diferença significativa na frequência de mergulhos nas áreas protegidas e desprotegidas ( $t_{(29)} = 1,59$  e  $t_{(29)} = 1,35$ ;  $p > 0,05$ , respectivamente).



**Figura 9.** Ausência de efeitos do estresse de derrota social agudo sobre a frequência e tempo de (A) visitas à extremidade distal dos braços abertos e (B) levantamentos exibidos por camundongos no LCE. Barras: média  $\pm$  EPM; N = 16 para controle e N = 15 para estressado.

O teste *t* de *Student* não apontou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tanto na frequência quanto no tempo de permanência na extremidade dos braços abertos ( $t_{(29)} = 0,94$  e  $t_{(29)} = 0,58$ ;  $p > 0,05$ , respectivamente), bem como não apontou diferença entre os grupos na frequência e tempo de levantamentos ( $t_{(29)} = 1,47$  e  $t_{(29)} = 1,42$ ;  $p > 0,05$ , respectivamente).

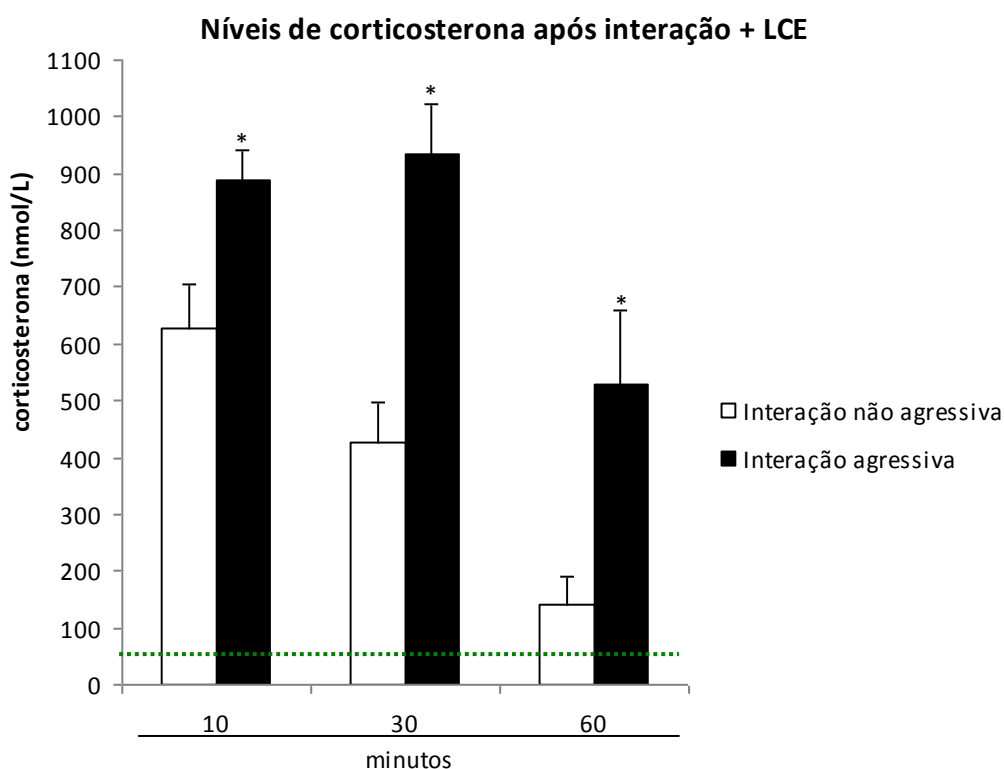
Em relação aos níveis de corticosterona após o estresse de derrota social, temos os resultados na figura 10.



**Figura 10.** Avaliação dos níveis de corticosterona plasmática dos grupos controle (expostos a interação não agressiva) e estressado (expostos a interação agressiva) em amostras de sangue coletadas 10, 30 ou 60 minutos após o fim da interação. Barras: média  $\pm$  EPM. Linha tracejada: valor basal de corticosterona (44,87 nmol/L); N = 6 para controle com amostras coletadas aos 10 min e aos 60 min, N = 7 para controle com amostras coletadas aos 30 min e para estressado com amostras coletadas aos 30 min, N = 8 para estressado com amostras coletadas aos 10 min e aos 60 min. \* $p < 0,05$  em relação ao respectivo grupo controle.

A ANOVA de dois fatores apontou significância para os fatores “tipo de interação” e “tempo de coleta” ( $F_{1,36} = 5,75$  e  $F_{2,36} = 3,89$ ;  $p < 0,05$ , respectivamente), mas não apontou interação entre os fatores ( $F_{2,36} = 2,44$ ;  $p > 0,05$ ). A análise *post hoc* de comparações planejadas apontou diferença entre controle e estressado para amostras coletadas após 60 minutos de interação ( $F_{1,36} = 10,07$ ;  $p < 0,05$ ), mas não nos tempos 10 e 30 minutos ( $F_{1,36} = 0,10$  e  $F_{1,36} = 0,43$ ;  $p > 0,05$ , respectivamente).

Para os animais que foram submetidos ao estresse de derrota social e em seguida expostos ao LCE, temos os níveis de corticosterona representados na figura 11.



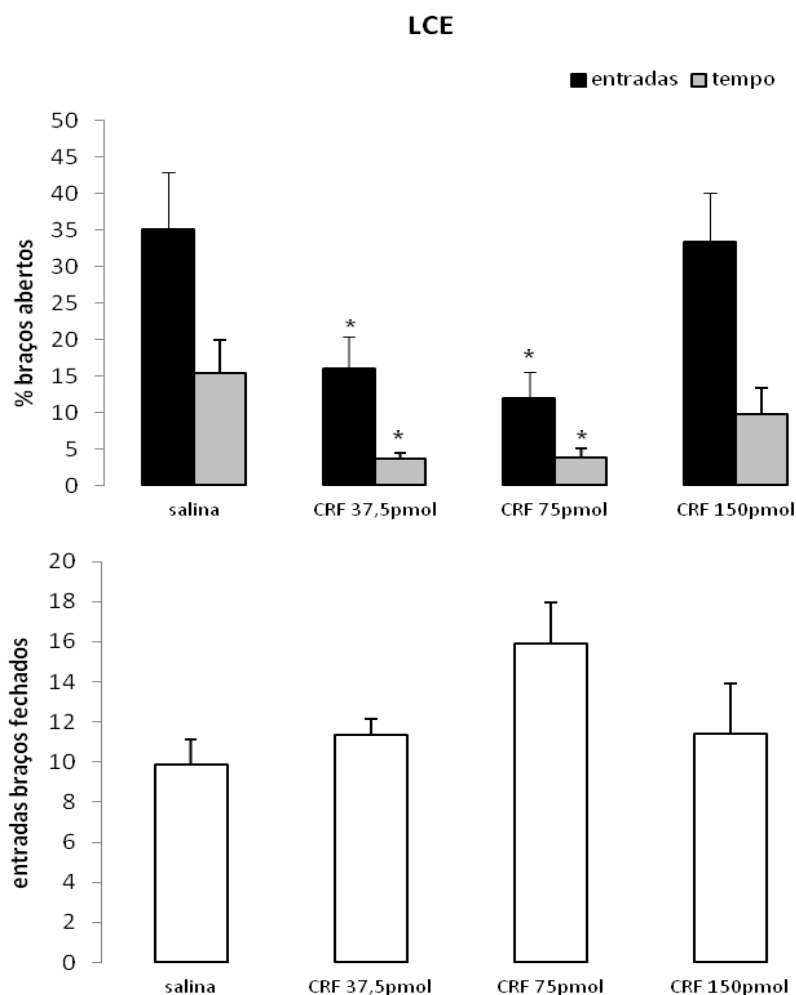
**Figura 11.** Avaliação dos níveis de corticosterona plasmática dos grupos controle (expostos a interação não agressiva) e estressado (expostos a interação agressiva) expostos ao LCE, em amostras de sangue coletadas 10, 30 ou 60 minutos após o início da exposição ao LCE. Barras: média  $\pm$  EPM. Linha tracejada: valor basal de corticosterona (44,87 nmol/L); N = 4 para estressado com amostras coletadas aos 30 min, N = 5 para controle com amostras coletadas aos 30 min e para controle e estressado com amostras coletadas aos 60 min, N = 6 para controle e estressado com amostras coletadas aos 10 min. \* $p < 0,05$  em relação ao respectivo grupo controle.

A ANOVA de dois fatores apontou significância para os fatores “tipo de interação” e “tempo de coleta” ( $F_{1,25} = 34,05$  e  $F_{2,25} = 15,97$ ;  $p < 0,05$ , respectivamente), mas não apontou interação entre os fatores ( $F_{2,25} = 1,17$ ;  $p > 0,05$ ). A análise *post hoc* de comparações planejadas apontou diferença entre controle e estressado para amostras coletadas após 10, 30 e 60 minutos do início da exposição ao LCE ( $F_{1,25} = 6,20$ ;  $F_{1,25} = 17,23$  e  $F_{1,25} = 11,30$ ;  $p < 0,05$ , respectivamente).

## 4.2. Efeitos da microinjeção na amígdala de compostos da família CRF, bem como de antagonistas para seus receptores, sobre os comportamentos defensivos de camundongos expostos ao labirinto em cruz elevado

### 4.2.1. Papel do CRF na amígdala nos comportamentos defensivos eliciados pela exposição de camundongos ao labirinto em cruz elevado

Na figura 12, tem-se a representação das medidas espaço-temporais do LCE dos animais que tiveram diferentes doses de CRF microinjetadas na amígdala.

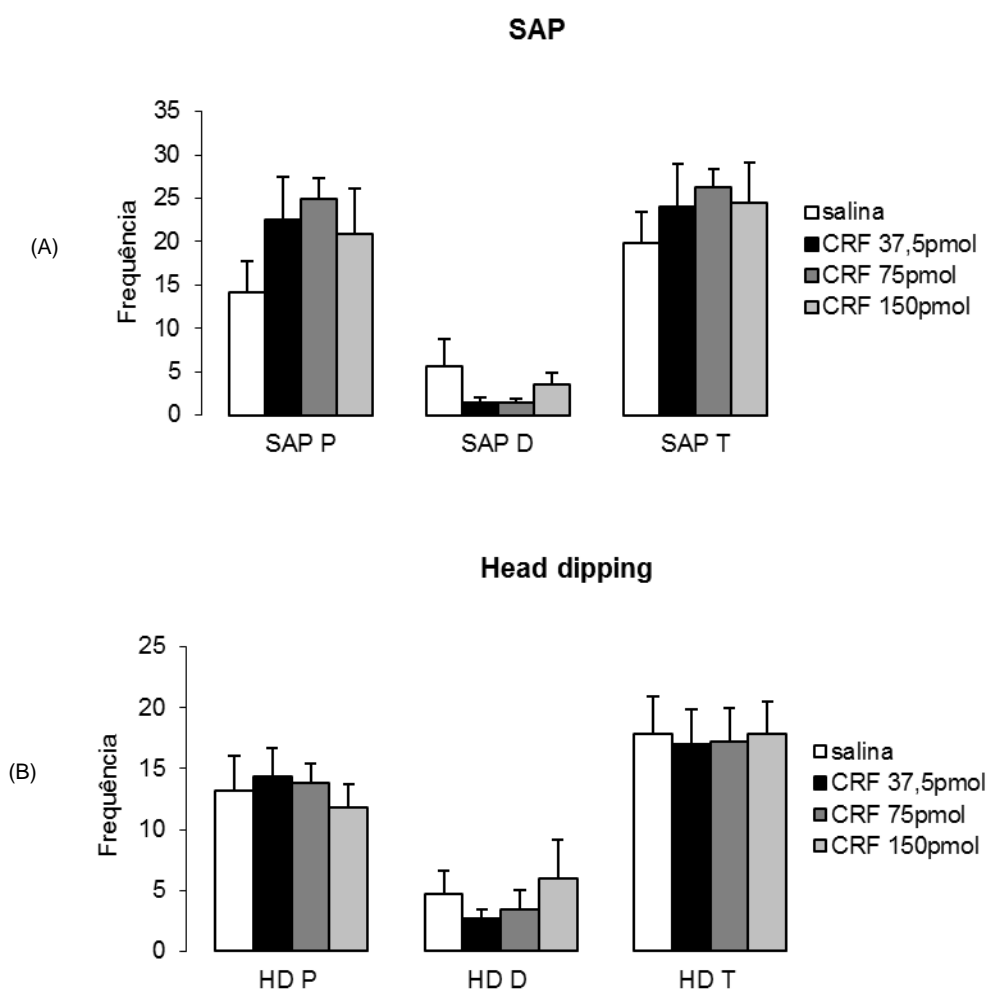


**Figura 12.** Representação gráfica dos efeitos da microinjeção de CRF na amígdala de camundongos sobre as medidas espaço-temporais do LCE. Barras: média  $\pm$  EPM; N = 7 para salina, N = 6 para CRF 37,5 pmol, N = 9 para CRF 75 pmol e N = 7 para CRF 150 pmol. \* $p < 0,05$  em comparação ao grupo salina.

A ANOVA unifatorial revelou significância para o fator tratamento tanto para porcentagens de entradas como para tempo nos braços abertos ( $F_{3,25} = 4,39$ ,  $p < 0,05$  e  $F_{3,25} = 3,56$ , respectivamente;  $p < 0,05$ ). A análise *post hoc* com o teste de Duncan indicou uma diminuição da porcentagem de entradas dos grupos CRF 37,5 pmol e CRF 75 pmol em relação ao grupo salina. Além disso, o teste apontou para

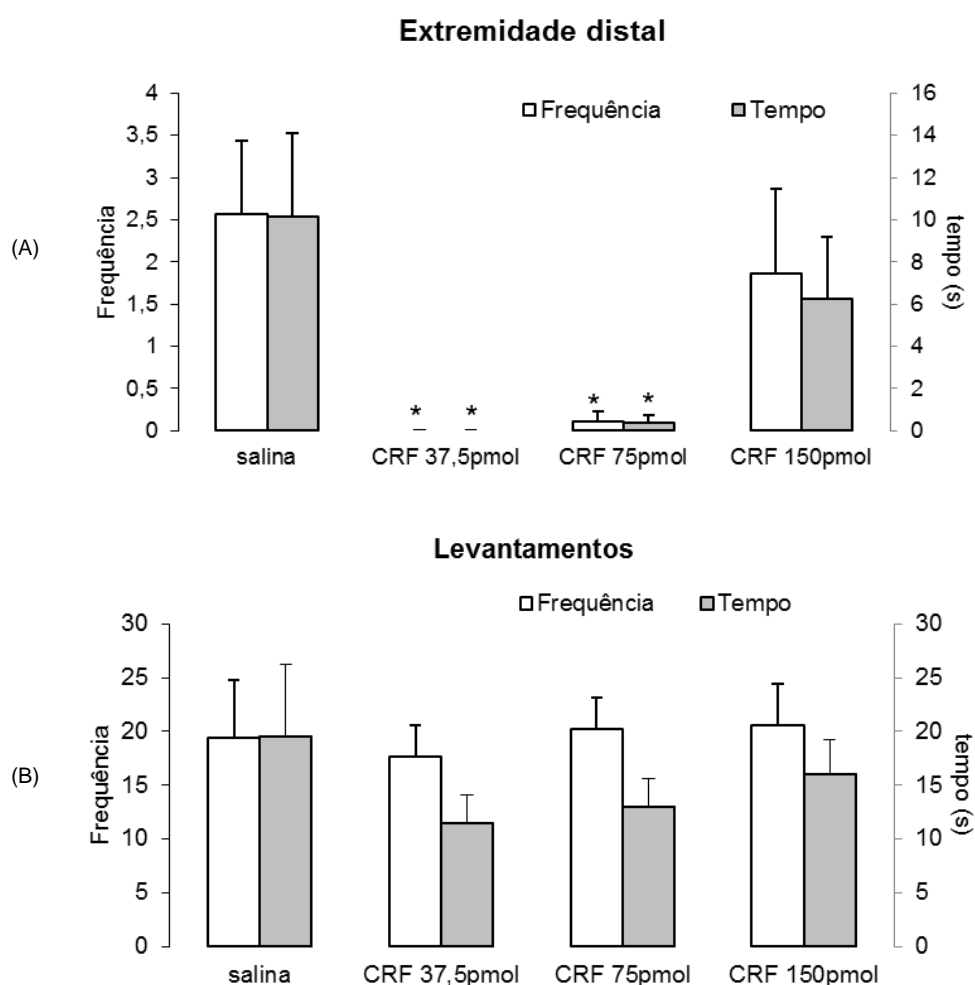
uma diminuição na porcentagem de tempo dos grupos CRF 37,5 pmol e CRF 75 pmol em relação ao grupo salina. Nenhuma diferença significativa foi apontada pela análise de variância para a medida entrada nos braços fechados ( $F_{3,25} = 2,15, p > 0,05$ ).

Além das medidas espaço-temporais também foram registradas medidas complementares, ou etológicas, dos animais que receberam CRF intra-amídala e foram expostos ao LCE. O resultado pode ser visto nas figuras 13 e 14.



**Figura 13.** Representação gráfica dos efeitos do tratamento com CRF intra-amídala sobre a frequência de avaliação de risco [A - esticadas (*stretched attend posture* - SAP) e B - mergulhos (*head dipping* - HD)] exibidas por camundongos nas diferentes regiões (áreas protegidas - braços fechados e centro, áreas desprotegidas - braços abertos e total) do LCE. Barras: média  $\pm$  EPM; N = 7 para salina, N = 6 para CRF 37,5 pmol, N = 9 para CRF 75 pmol e N = 7 para CRF 150 pmol.

De acordo com a ANOVA unifatorial, não houve diferença significativa na frequência de esticadas entre os grupos nas áreas protegidas, desprotegidas ou no total ( $F_{3,25} = 1,41$ ;  $F_{3,25} = 1,46$  e  $F_{3,25} = 0,57$ ,  $p > 0,05$ , respectivamente), bem como para a frequência de mergulhos entre os grupos nas áreas protegidas, desprotegidas e total ( $F_{3,25} = 0,22$ ;  $F_{3,25} = 0,49$  e  $F_{3,25} = 0,02$ ,  $p > 0,05$ , respectivamente).



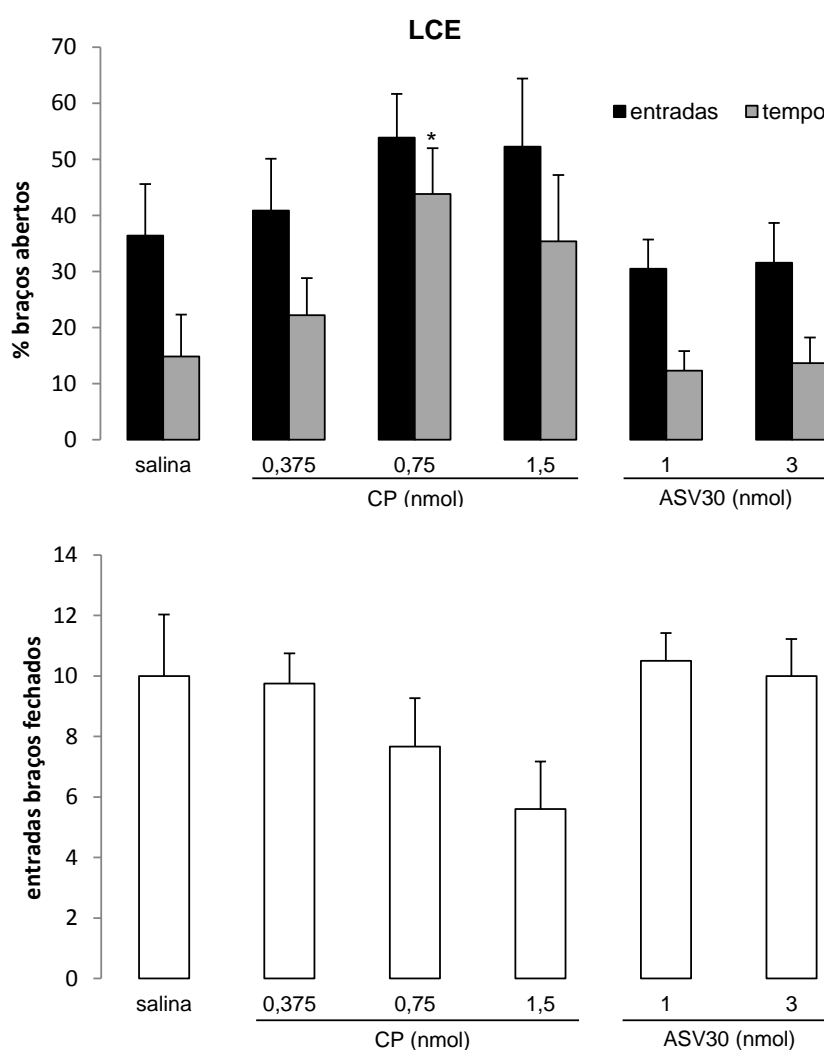
**Figura 14.** Representação gráfica dos efeitos do tratamento com CRF intra-amídala sobre a frequência e tempo de (A) visitas à extremidade distal dos braços abertos e (B) levantamentos exibidos por camundongos no LCE. Barras: média  $\pm$  EPM; N = 7 para salina, N = 6 para CRF 37,5 pmol, N = 9 para CRF 75 pmol e N = 7 para CRF 150 pmol. \* $p < 0,05$  em comparação ao grupo salina.

A ANOVA apontou significância para as medidas frequência e tempo dos animais na extremidade distal dos braços abertos ( $F_{3,25} = 3,89$  e  $F_{3,25} = 4,15$ ,  $p < 0,05$ , respectivamente). O teste *post hoc* de Duncan, indicou que os grupos que

receberam CRF nas doses de 37,5 e 75 pmol exploraram com menos frequência a extremidade distal do que o grupo que recebeu salina. Os animais que receberam CRF também exploraram as extremidades distais dos braços abertos por menos tempo, segundo o teste de Duncan.

Para as medidas frequência e tempo de levantamentos, não houve diferenças significativas entre os grupos ( $F_{3,25} = 0,10$  e  $F_{3,25} = 0,73$ ,  $p > 0,05$ , respectivamente).

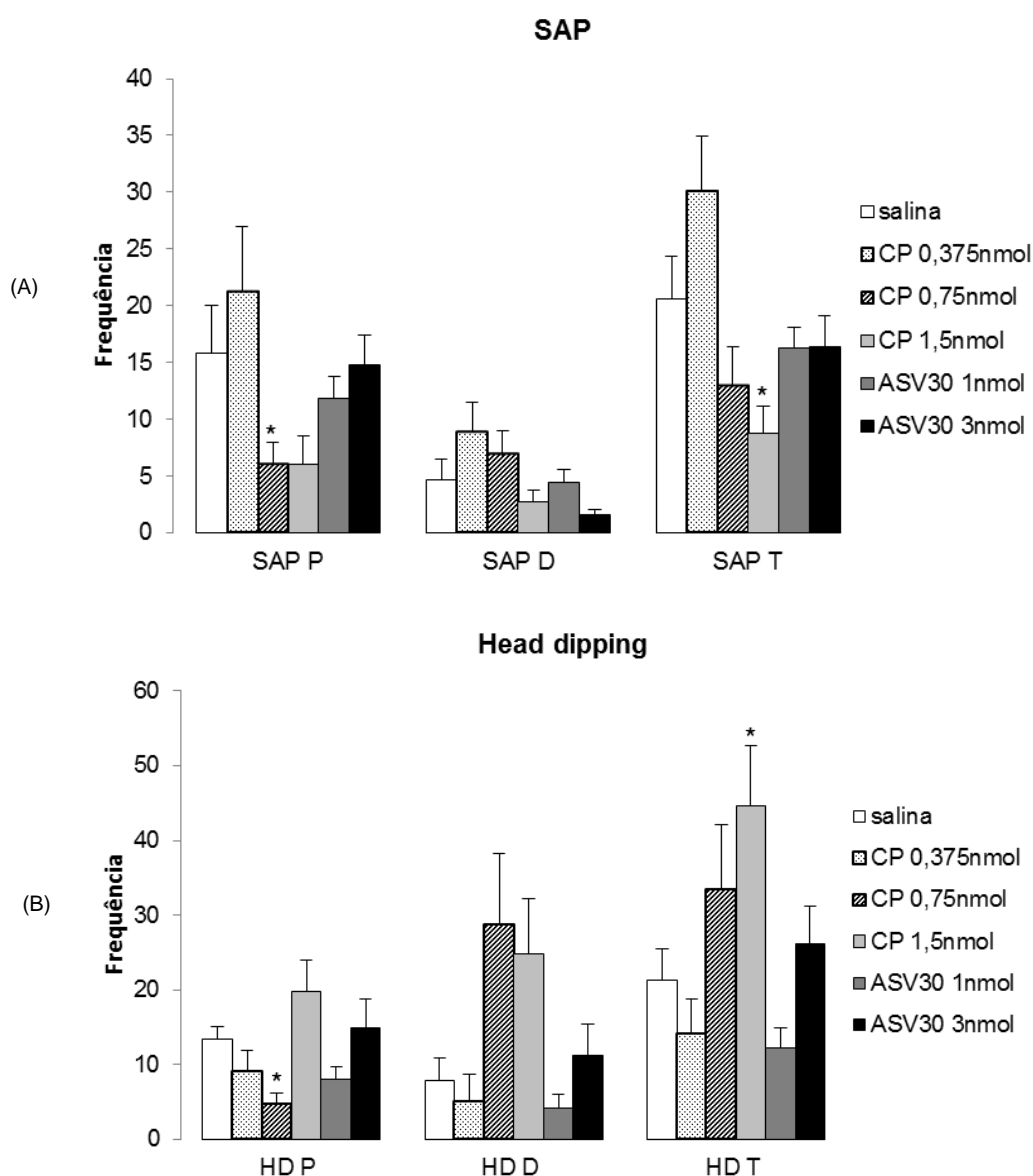
Além dos efeitos do CRF exógeno na amígdala, também se verificou o efeito do CRF endógeno, indiretamente, através de injeções intra-amídala de antagonistas seletivos para os receptores do subtipo 1 (CP376395) e do subtipo 2 (antisauvagine-30). Os resultados podem ser vistos nas figuras 15, 16 e 17.



**Figura 15.** Representação gráfica dos efeitos da microinjeção de antagonistas CRF na amígdala de camundongos sobre as medidas espaço-temporais do LCE, na qual ASV30 significa antisauvagine-30. Barras: média  $\pm$  EPM; N = 7 para salina, N = 8 para CP 0,375 nmol, N = 9 para CP 0,75 nmol, N = 5 para CP 1,5 nmol, N = 6 para ASV30 1 nmol e N = 5 ASV30 3 nmol. \* $p < 0,05$  em comparação ao grupo salina.



A análise de variância não foi significativa para as medidas entradas nos braços abertos e entradas nos braços fechados ( $F_{5,34} = 0,92$  e  $F_{5,34} = 1,66$ ,  $p > 0,05$ , respectivamente). Em relação à porcentagem de tempo nos braços abertos, a ANOVA foi significativa ( $F_{5,34} = 2,46$ ,  $p = 0,05$ ), sendo que a análise *post hoc* com o teste de Duncan, apontou para um aumento na porcentagem de tempo do grupo CP 0,75 nmol ( $43,81 \pm 8,15$ ) em relação ao grupo salina ( $14,80 \pm 7,52$ ).

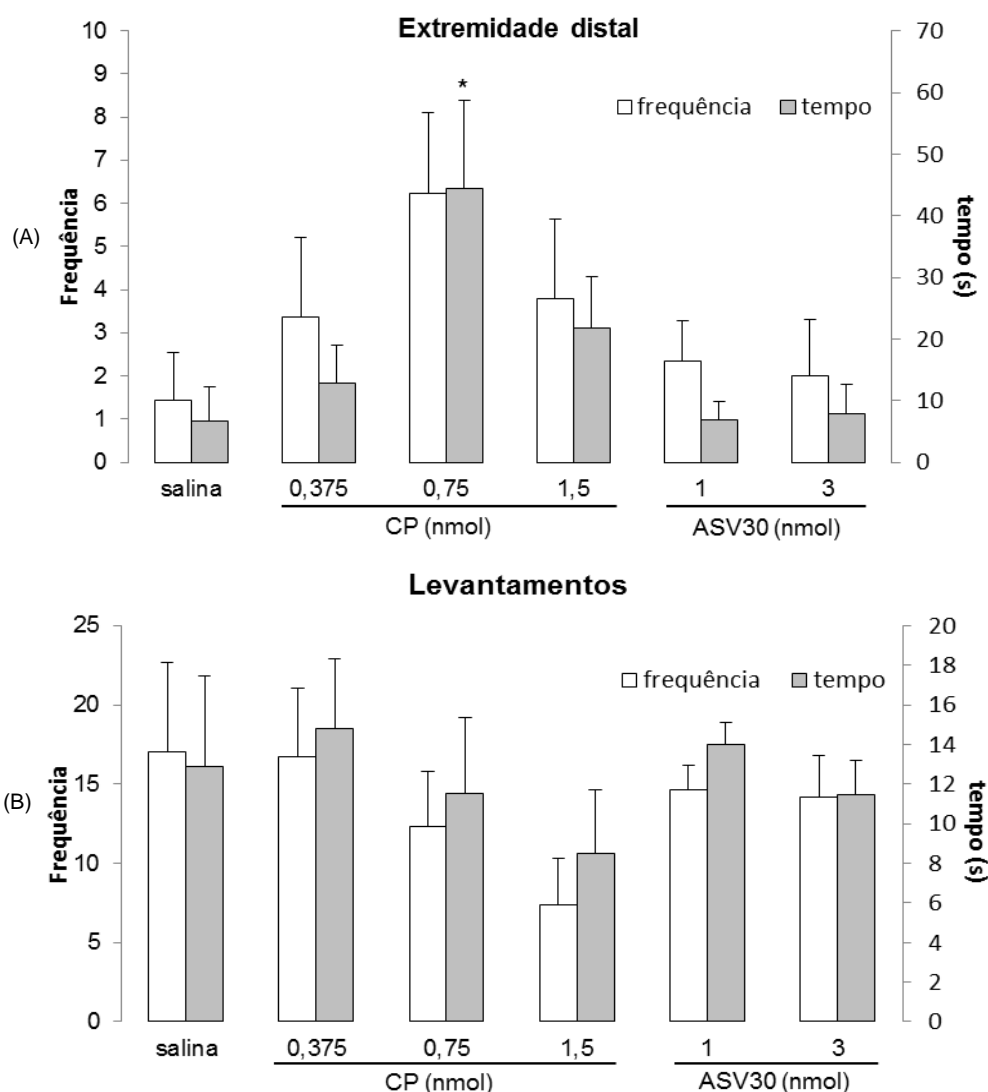


**Figura 16.** Representação gráfica dos efeitos do tratamento com antagonistas CRF intramédula sobre a frequência de avaliação de risco [A - esticadas (*stretched attend posture* - SAP) e B - mergulhos (*head dipping* - HD)] exibidas por camundongos nas diferentes regiões (áreas protegidas - braços fechados e centro, áreas desprotegidas - braços abertos e total) do LCE, na qual ASV30 significa antisauvagine-30. Barras: média  $\pm$  EPM; N = 7 para salina, N = 8 para CP 0,375 nmol, N = 9 para CP 0,75 nmol, N = 5 para CP 1,5 nmol, N = 6 para ASV30 1 nmol e N = 5 ASV30 3 nmol. \* $p < 0,05$  em comparação ao grupo salina.

De acordo com a ANOVA unifatorial, houve diferença significativa tanto na frequência de esticadas na área protegida quanto na frequência total entre os grupos ( $F_{5,34} = 3,25$  e  $F_{5,34} = 4,26$ ,  $p < 0,05$ , respectivamente), mas não houve diferença na frequência de esticadas na área desprotegida ( $F_{5,34} = 1,17$ ,  $p > 0,05$ ).

A análise *post hoc* apontou uma diminuição na frequência de esticadas na área protegida do grupo CP 0,75 nmol em relação ao grupo salina, bem como uma diminuição na frequência de esticadas totais do grupo CP 1,5 nmol em relação ao grupo salina. A análise *post hoc* também apontou para uma tendência ( $p = 0,074$ ) de diminuição de esticadas na área protegida do grupo CP 1,5 nmol quando comparado ao grupo salina.

Para a medida frequência de mergulhos, A ANOVA unifatorial apontou diferença significativa entre os grupos nas áreas protegidas, desprotegidas e no total ( $F_{5,34} = 5,08$ ;  $F_{5,34} = 3,34$  e  $F_{5,34} = 3,62$ ,  $p < 0,05$ , respectivamente). Quando estes dados foram submetidos a análise *post hoc*, indicou-se uma diminuição na frequência de mergulhos na área protegida do grupo CP 0,75 nmol em relação ao grupo salina, bem como um aumento na frequência de mergulhos totais do grupo CP 1,5 nmol em relação ao grupo salina. Já em relação aos mergulhos nas áreas desprotegidas, embora a ANOVA tenha apontado uma diferença entre os grupos, a análise *post hoc* indicou como tendência o aumento de mergulhos dos grupos CP 0,75 nmol e CP 1,5 nmol quando comparados ao grupo salina, sendo  $p = 0,080$  e  $p = 0,066$ , respectivamente.

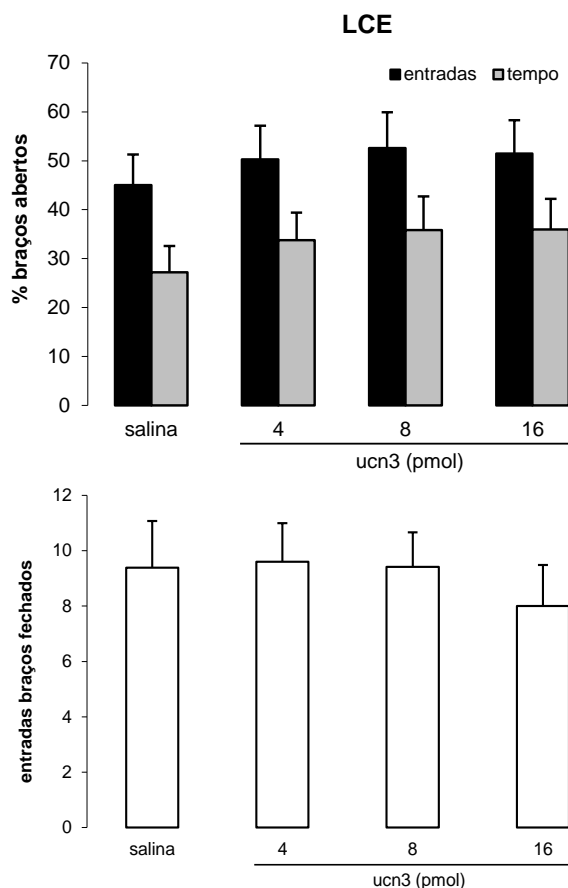


**Figura 17.** Representação gráfica dos efeitos do tratamento com antagonistas CRF intramídala sobre a frequência e tempo de (A) visitas à extremidade distal dos braços abertos e (B) levantamentos exibidos por camundongos no LCE, na qual ASV30 significa antisauvagine-30. Barras: média  $\pm$  EPM; N = 7 para salina, N = 8 para CP 0,375 nmol, N = 9 para CP 0,75 nmol, N = 5 para CP 1,5 nmol, N = 6 para ASV30 1 nmol e N = 5 ASV30 3 nmol. \* $p < 0,05$  em comparação ao grupo salina.

A ANOVA foi estatisticamente significativa na medida de tempo dos animais na extremidade distal dos braços abertos ( $F_{5,34} = 3,39$ ,  $p < 0,05$ ), porém não apontou diferenças estatísticas em relação à frequência de visitas à extremidade dos braços abertos, frequência e tempo de levantamentos entre os grupos ( $F_{5,34} = 1,64$ ;  $F_{5,34} = 0,81$  e  $F_{5,34} = 0,50$ ,  $p > 0,05$ , respectivamente). O teste *post hoc* de Duncan, indicou que o grupo que recebeu CP na dose de 0,75 nmol explorou as extremidades distais dos braços abertos por mais tempo quando comparado ao grupo salina.

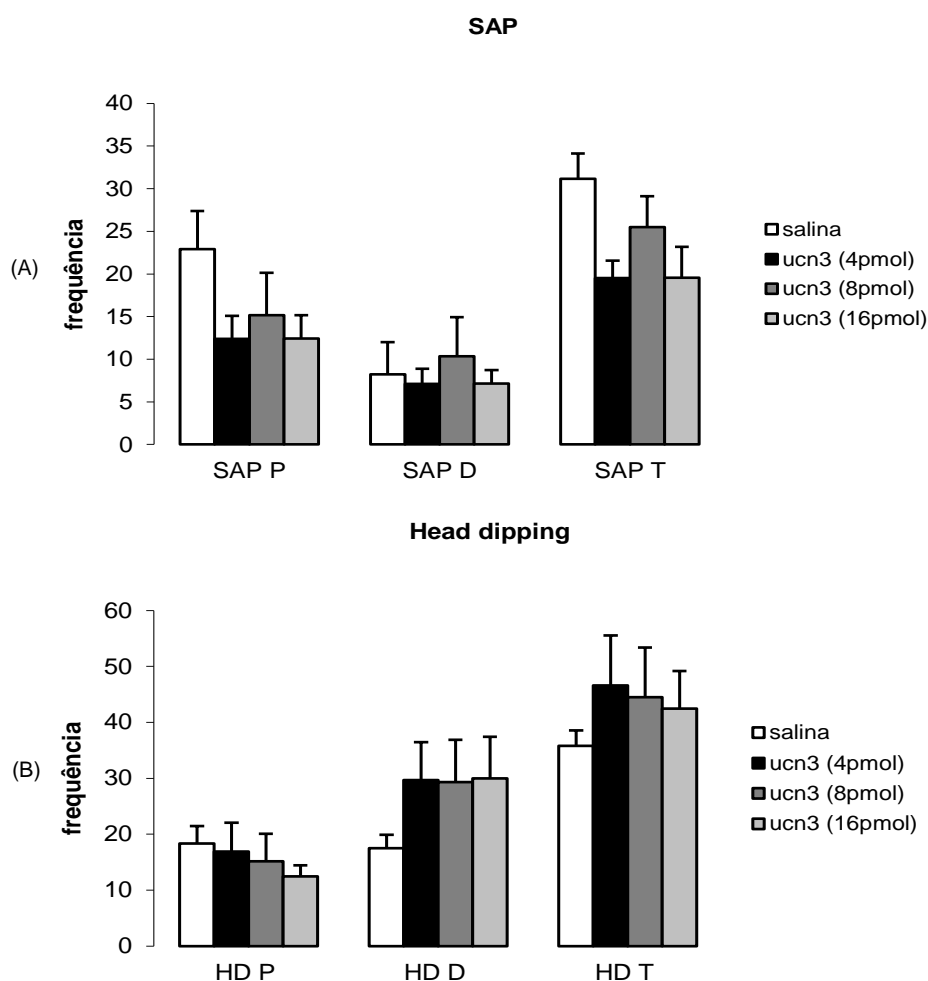
#### 4.2.2. Papel do subtipo 2 do receptor de CRF da amígdala nos comportamentos defensivos de camundongos expostos ao LCE

Nas figuras 18, 19 e 20, tem-se a representação das medidas espaço-temporais e complementares do LCE dos animais que tiveram o agonista para CRF2 (urocortina 3) microinjetado na amígdala.



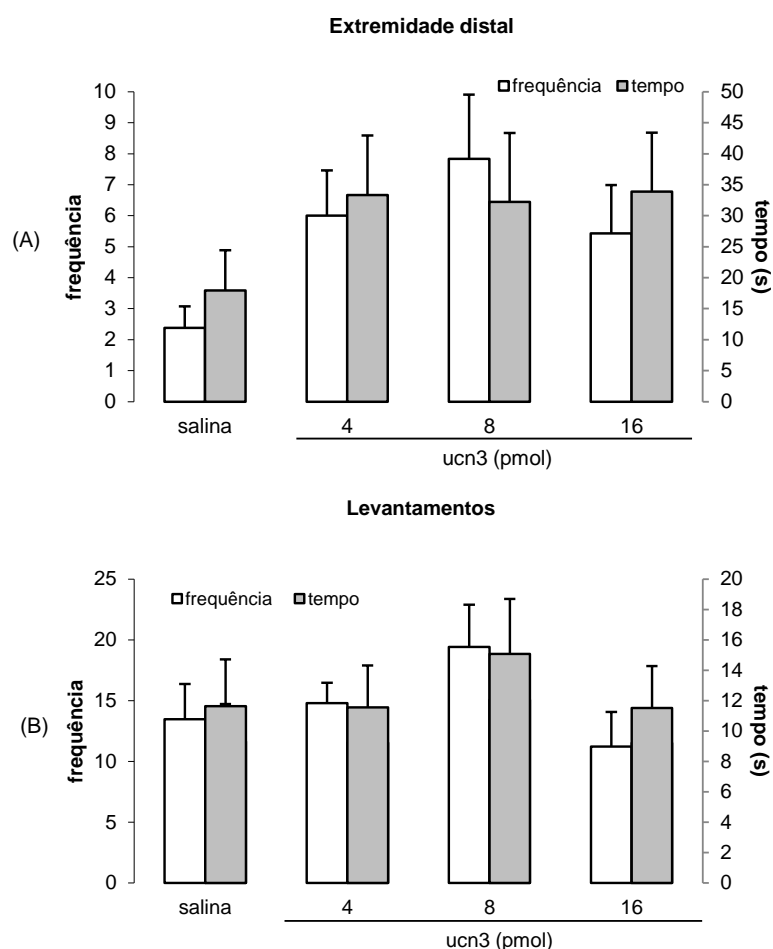
**Figura 18.** Avaliação dos efeitos da microinjeção intra-amídala de ucn 3 sobre as medidas convencionais de ansiedade (% entradas e de tempo nos braços abertos) e de locomoção (frequência de entradas nos braços fechados) em camundongos expostos ao LCE. Barras: média  $\pm$  EPM; N = 13 (salina); N = 10 (ucn3, 4 pmol), N = 12 (ucn3, 8 pmol) e N = 14 (ucn3, 16pmol).

A ANOVA unifatorial não revelou significância para o fator tratamento tanto para porcentagens de entradas como para tempo nos braços abertos, bem como para a medida entrada nos braços fechados ( $F_{3,45} = 0,25$ ;  $F_{3,45} = 0,48$  e  $F_{3,45} = 0,26$ , respectivamente;  $p > 0,05$ ).



**Figura 19.** Avaliação dos efeitos da microinjeção intra-amídala de ucn 3 sobre a frequência de avaliação de risco [A - esticadas (*stretched attend posture* - SAP) e B - mergulhos (*head dipping* - HD)] exibidas por camundongos nas diferentes regiões (áreas protegidas - braços fechados e centro, áreas desprotegidas - braços abertos e total) do LCE. Barras: média  $\pm$  EPM; N = 13 (salina); N = 10 (ucn3, 4 pmol), N = 12 (ucn3, 8 pmol) e N = 14 (ucn3, 16pmol).

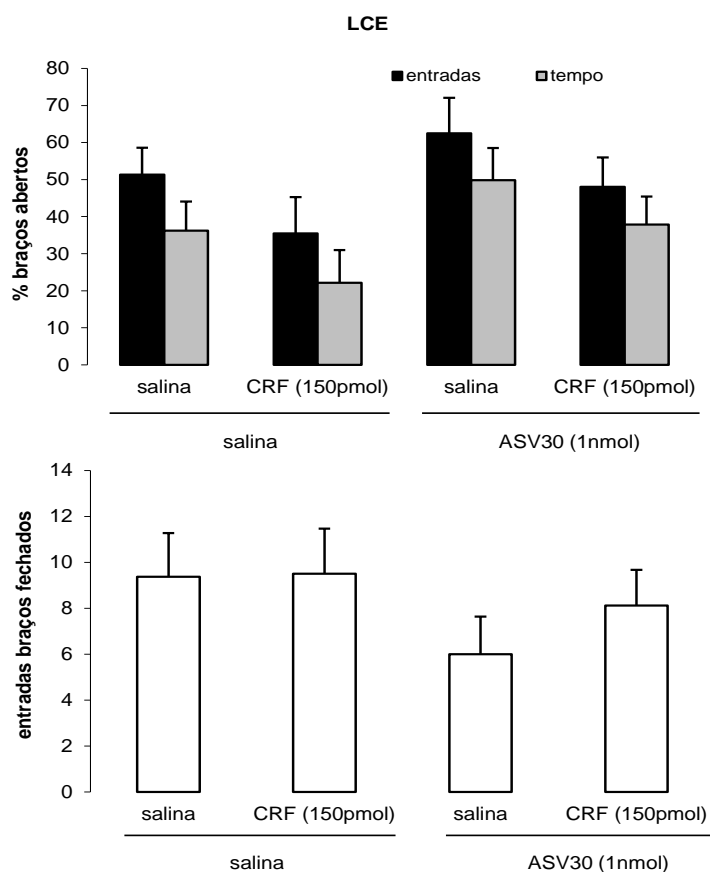
De acordo com a ANOVA unifatorial, não houve diferença significativa na frequência de esticadas entre os grupos nas áreas protegidas, desprotegidas ou no total ( $F_{3,45} = 2,04$ ;  $F_{3,45} = 0,51$  e  $F_{3,45} = 1,78$ ,  $p > 0,05$ , respectivamente), bem como para a frequência de mergulhos entre os grupos nas áreas protegidas, desprotegidas e total ( $F_{3,45} = 1,00$ ;  $F_{3,45} = 0,78$  e  $F_{3,45} = 0,43$ ,  $p > 0,05$ , respectivamente).



**Figura 20.** Avaliação dos efeitos da microinjeção intra-amídala de ucn 3 sobre a frequência e tempo de (A) visitas à extremidade distal dos braços abertos e (B) levantamentos em camundongos expostos ao LCE. Barras: média  $\pm$  EPM; N = 13 (salina); N = 10 (ucn3, 4 pmol), N = 12 (ucn3, 8 pmol) e N = 14 (ucn3, 16pmol).

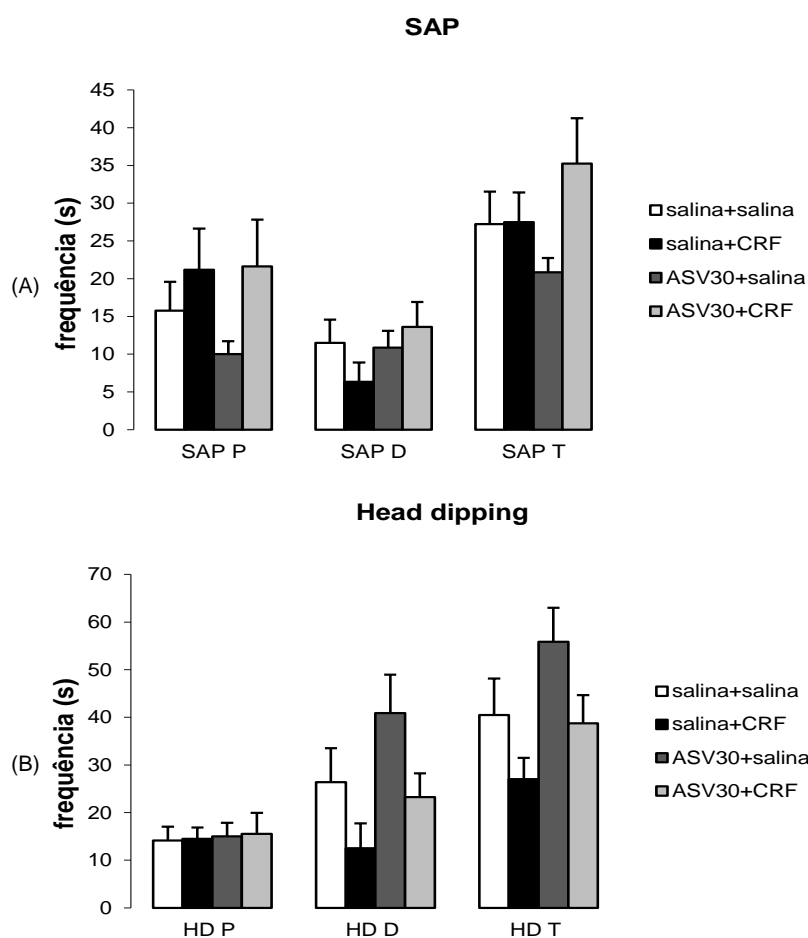
A ANOVA não apontou significância para as medidas frequência e tempo dos animais na extremidade distal dos braços abertos ( $F_{3,45} = 2,26$  e  $F_{3,45} = 0,70$ ,  $p > 0,05$ , respectivamente), bem como para as medidas frequência e tempo de levantamentos ( $F_{3,45} = 1,48$  e  $F_{3,45} = 0,32$ ,  $p > 0,05$ , respectivamente).

Além de avaliar o efeito da ativação de CRF2 via seu agonista Ucn3, avaliou-se as consequências do bloqueio de CRF2 sobre os efeitos da microinjeção na amídala da dose de 150 pmol de CRF. Os resultados podem ser vistos nas figuras 21, 22 e 23.



**Figura 21.** Avaliação dos efeitos da microinjeção intra-amígdala de antisauvagine-30 seguida da microinjeção de CRF sobre as medidas convencionais de ansiedade (% entradas e de tempo nos braços abertos) e de locomoção (frequência de entradas nos braços fechados) em camundongos expostos ao LCE. Barras: média  $\pm$  EPM; N = 8 (salina+salina e ASV30+CRF); N = 6 (salina+CRF) e N = 7 (ASV30+salina).

Em relação a medida porcentagem de entradas nos braços abertos, a ANOVA de dois fatores não apontou diferenças entre os grupos nem para o fator pré-tratamento ( $F_{1,25} = 1,90$ ,  $p > 0,05$ ), bem como para o fator tratamento ( $F_{1,25} = 3,09$ ,  $p > 0,05$ ), além de não apontar significância para a interação entre os fatores ( $F_{1,25} = 0,007$ ,  $p > 0,05$ ). O mesmo ocorreu para as medidas porcentagem de tempo nos braços abertos ( $F_{1,25} = 3,17$  para o fator pré-tratamento;  $F_{1,25} = 2,50$  para o fator tratamento e  $F_{1,25} = 0,02$  para a interação,  $p > 0,05$ ) e entradas nos braços fechados ( $F_{1,25} = 1,79$  para o fator pré-tratamento;  $F_{1,25} = 0,40$  para o fator tratamento e  $F_{1,25} = 0,32$  para a interação,  $p > 0,05$ ).



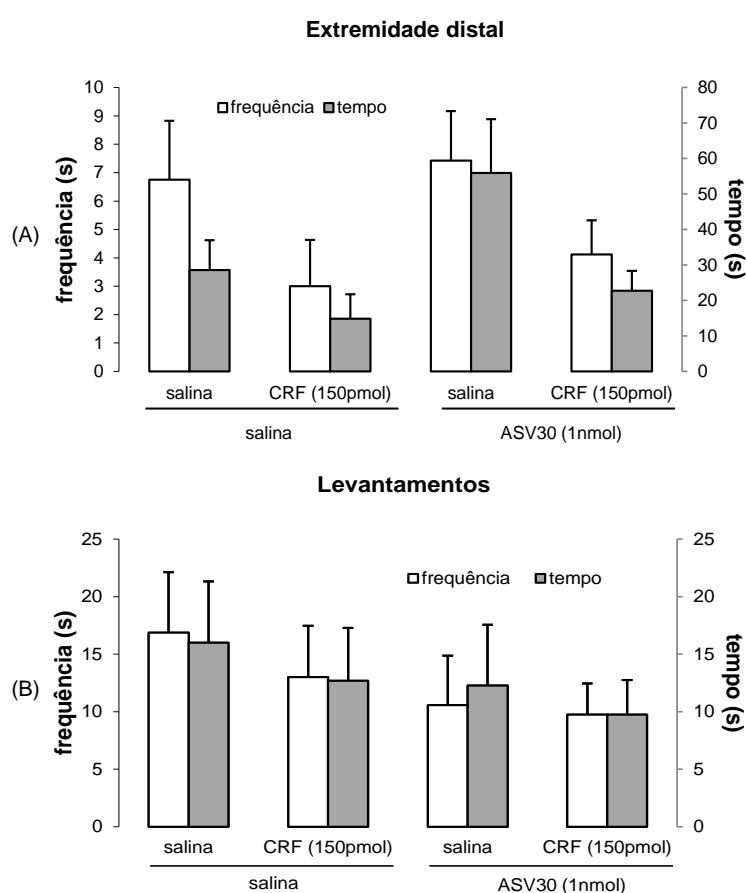
**Figura 22.** Avaliação dos efeitos da microinjeção intra-amídala de antisauvagine-30 seguida da microinjeção de CRF sobre a frequência de avaliação de risco [A - esticadas (*stretched attend posture* - SAP) e B - mergulhos (*head dipping* - HD)] exibidas por camundongos nas diferentes regiões (áreas protegidas - braços fechados e centro, áreas desprotegidas - braços abertos e total) do LCE. Barras: média  $\pm$  EPM; N = 8 (salina+salina e ASV30+CRF); N = 6 (salina+CRF) e N = 7 (ASV30+salina).

A ANOVA de dois fatores não apontou nenhuma diferença para as medidas SAP protegido ( $F_{1,25} = 0,31$  para o fator pré-tratamento;  $F_{1,25} = 3,24$  para o fator tratamento e  $F_{1,25} = 0,43$  para a interação,  $p > 0,05$ ), SAP desprotegido ( $F_{1,25} = 1,28$  para o fator pré-tratamento;  $F_{1,25} = 0,17$  para o fator tratamento e  $F_{1,25} = 1,82$  para a interação,  $p > 0,05$ ) e SAP total ( $F_{1,25} = 0,02$  para o fator pré-tratamento;  $F_{1,25} = 2,62$  para o fator tratamento e  $F_{1,25} = 2,44$  para a interação,  $p > 0,05$ ).

Em relação aos mergulhos, para os realizados nas áreas protegidas, a ANOVA não apontou quaisquer diferenças ( $F_{1,25} = 0,08$  para o fator pré-tratamento;  $F_{1,25} = 0,02$  para o fator tratamento e  $F_{1,25} = 0,00$  para a interação,  $p > 0,05$ ). Já para os mergulhos realizados nas áreas desprotegidas, o teste estatístico demonstrou diferença para o fator tratamento ( $F_{1,25} = 5,68$ ,  $p < 0,05$ ), tendência de diferença para



o fator pré-tratamento ( $F_{1,25} = 3,65$ ,  $p = 0,067$ ) e nenhuma diferença para a interação ( $F_{1,25} = 0,08$ ,  $p > 0,05$ ). Devido a significância no fator tratamento e a tendência no fator pré-tratamento, realizou-se o teste *post hoc* de Duncan, o qual indicou diferenças significantes entre os grupos salina+CRF e ASV30+salina. Já para os mergulhos totais, houve diferenças para os fatores pré-tratamento ( $F_{1,25} = 4,12$ ,  $p = 0,05$ ) e tratamento ( $F_{1,25} = 5,26$ ,  $p < 0,05$ ) e nenhuma diferença na interação ( $F_{1,25} = 0,07$ ,  $p > 0,05$ ), finalizando com o Duncan indicando que o grupo salina+CRF é diferente do grupo ASV30+salina.



**Figura 23.** Avaliação dos efeitos da microinjeção intra-amídala de antisauvagine-30 seguida da microinjeção de CRF sobre a frequência e tempo de (A) visitas à extremidade distal dos braços abertos e (B) levantamentos em camundongos expostos ao LCE. Barras: média  $\pm$  EPM; N = 8 (salina+salina e ASV30+CRF); N = 6 (salina+CRF) e N = 7 (ASV30+salina).

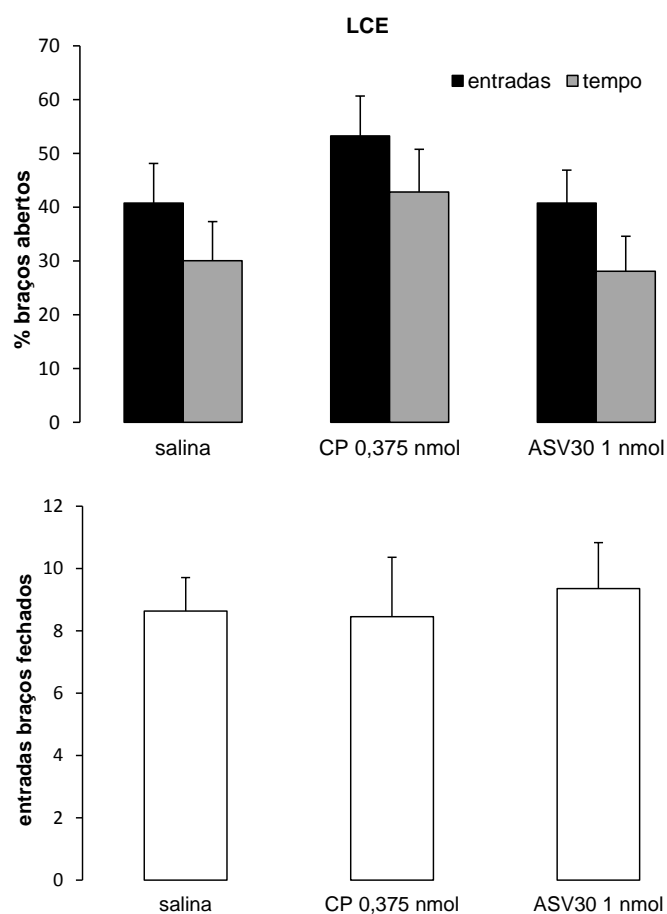
Em relação a frequência de visitas a extremidade distal, a ANOVA de dois fatores apontou diferença para o fator tratamento ( $F_{1,25} = 4,19$ ,  $p = 0,05$ ) mas não para o fator pré-tratamento ( $F_{1,25} = 0,27$ ,  $p > 0,05$ ) e para a interação ( $F_{1,25} = 0,02$ ,  $p > 0,05$ ). O mesmo perfil foi apontado no teste estatístico para o tempo de

permanência na extremidade distal, havendo diferença no fator tratamento ( $F_{1,25} = 5,83$ ,  $p < 0,05$ ) mas não no fator pré-tratamento ( $F_{1,25} = 3,29$ ,  $p > 0,05$ ) e na interação ( $F_{1,25} = 1,00$ ,  $p > 0,05$ ).

Quanto aos levantamentos, A ANOVA de dois fatores não apontou nenhuma diferença nem para frequência ( $F_{1,25} = 1,22$  para o fator pré-tratamento;  $F_{1,25} = 0,29$  para o fator tratamento e  $F_{1,25} = 0,12$  para a interação,  $p > 0,05$ ) e nem para o tempo ( $F_{1,25} = 0,51$  para o fator pré-tratamento;  $F_{1,25} = 0,39$  para o fator tratamento e  $F_{1,25} = 0,01$  para a interação,  $p > 0,05$ ).

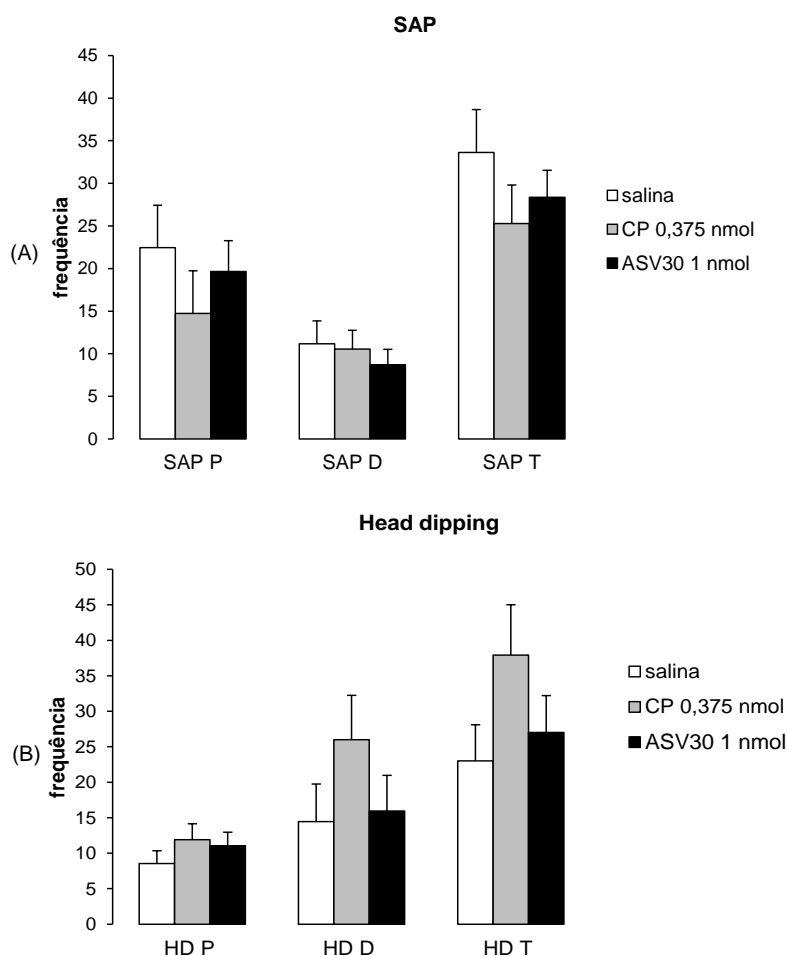
#### **4.3. Ausência de efeitos do bloqueio CRFérgico na amígdala de camundongos expostos ao estresse de derrota social agudo e submetidos ao labirinto em cruz elevado**

Na figura 24, tem-se a representação das medidas espaço-temporais do LCE dos animais que tiveram antagonistas para CRF1 (CP376395) e para CRF2 (antisauvagine-30) microinjetados na amígdala e foram submetidos ao estresse de derrota social agudo antes de serem expostos ao aparato.



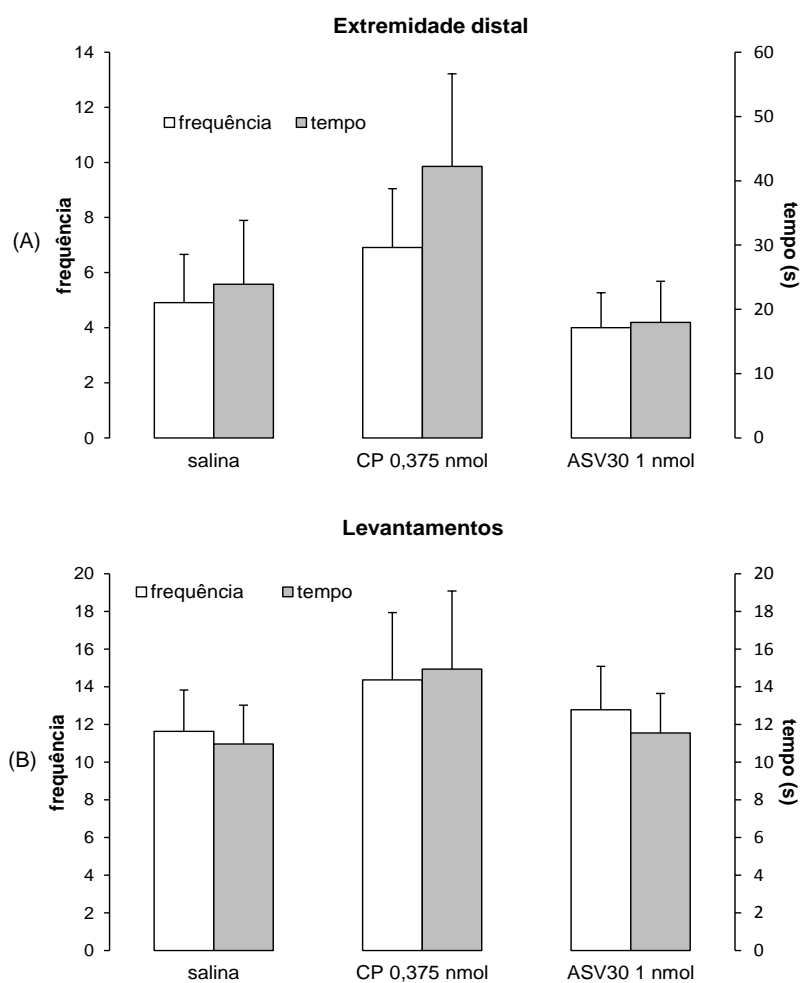
**Figura 24.** Representação gráfica dos efeitos da microinjeção de antagonistas de CRF na amígdala de camundongos pré-expostos ao estresse de derrota social agudo e submetidos ao LCE. Barras: média  $\pm$  EPM; N = 11 para salina e para CP376395 (CP) 0,375 nmol, N = 14 para antisauvagine-30 (ASV30) 1 nmol.

A ANOVA unifatorial não revelou significância para o fator tratamento tanto para porcentagens de entradas como para tempo nos braços abertos, bem como para a medida entrada nos braços fechados ( $F_{2,33} = 1,04$ ;  $F_{2,33} = 1,20$  e  $F_{2,33} = 0,10$ , respectivamente;  $p > 0,05$ ).



**Figura 25.** Representação gráfica dos efeitos da microinjeção de antagonistas de CRF na amígdala de camundongos pré-expostos ao estresse de derrota social agudo sobre a frequência de avaliação de risco [A - esticadas (*stretched attend posture* - SAP) e B - mergulhos (*head dipping* - HD)] exibidas nas diferentes regiões (áreas protegidas - braços fechados e centro, áreas desprotegidas - braços abertos e total) do LCE. Barras: média  $\pm$  EPM; N = 11 para salina e para CP376395 (CP) 0,375 nmol, N = 14 para antisauvagine-30 (ASV30) 1 nmol.

De acordo com a ANOVA unifatorial, não houve diferença significativa na frequência de esticadas entre os grupos nas áreas protegidas, desprotegidas ou no total ( $F_{2,33} = 0,71$ ;  $F_{2,33} = 0,36$  e  $F_{2,33} = 0,95$ ,  $p > 0,05$ , respectivamente), bem como para a frequência de mergulhos entre os grupos nas áreas protegidas, desprotegidas e total ( $F_{2,33} = 0,73$ ;  $F_{2,33} = 1,23$  e  $F_{2,33} = 1,63$ ,  $p > 0,05$ , respectivamente).



**Figura 26.** Representação gráfica dos efeitos da microinjeção de antagonistas de CRF na amígdala de camundongos pré-expostos ao estresse de derrota social agudo sobre a frequência e tempo de (A) visitas à extremidade distal dos braços abertos e (B) levantamentos exibidos no LCE. Barras: média  $\pm$  EPM; N = 11 para salina e para CP376395 (CP) 0,375 nmol, N = 14 para antisauvagine-30 (ASV30) 1 nmol.

A ANOVA não apontou significância para as medidas frequência e tempo dos animais na extremidade distal dos braços abertos ( $F_{2,33} = 0,78$  e  $F_{2,33} = 1,52$ ,  $p > 0,05$ , respectivamente), bem como para as medidas frequência e tempo de levantamentos ( $F_{2,33} = 0,23$  e  $F_{2,33} = 0,54$ ,  $p > 0,05$ , respectivamente).

## 5. DISCUSSÃO

O conjunto de dados apresentados nesta tese visa trazer novas informações acerca da neurotransmissão CRFérgica da amígdala de camundongos sujeitos a situações aversivas, tal qual a exposição ao estresse de derrota social e ao LCE.

Primeiramente, foram analisados os efeitos a curto (5 minutos) e longo (10 dias) prazos do estresse de derrota social agudo sobre os comportamentos de camundongos submetidos ao LCE. A princípio, o protocolo padronizado foi capaz de gerar alterações a curto prazo tanto nas medidas espaço-temporais (figura 1) quanto nas medidas complementares (figura 2), resultando na diminuição de comportamentos, tais quais porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos e esticadas e mergulhos em ambiente desprotegido, que indicam aumento de aversão no LCE (ESPEJO, 1997; RODGERS; JOHNSON, 1995). Comparando-se estes dados com os dados obtidos por Rodgers e Cole (1993), tem-se um importante avanço, pois se conseguiu diminuição na exploração dos braços abertos sem diminuição da exploração dos braços fechados e dos levantamentos, ou seja, aumento nos índices de ansiedade sem prejuízo locomotor.

A longo prazo, o protocolo padronizado também foi capaz de alterar medidas que indicam aumento de aversão no LCE, tais quais porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos (figura 4) e esticadas em ambiente desprotegido (figura 5). O efeito de apenas uma exposição ao estresse sobre comportamentos mensurados no LCE vários dias após esta sessão de estresse, já havia sido demonstrado em outros trabalhos da literatura realizados com estresse de restrição (MITRA et al., 2005) e com o estresse de exposição ao predador (ADAMEC; SHALLOW, 1993), ambos em ratos. Entretanto, no presente estudo se tem que um estresse em camundongos também é capaz de causar alterações comportamentais a longo prazo no LCE. No caso do estresse de restrição em ratos, o aumento de ansiedade estava associado a uma espinhogênese em neurônios da amígdala (MITRA et al., 2005), tornando interessante, em experimentos futuros, avaliar se os comportamentos ansiogênicos decorrentes do estresse de derrota social também são acompanhados de outras alterações relacionadas à neuroplasticidade nessa estrutura (p.ex., níveis de ERK e CREB fosforilado).

Em relação a medição hormonal desencadeada pelo estresse, observa-se que os animais submetidos à interação agressiva mantêm níveis altos de corticosterona uma hora após o fim da interação, enquanto os animais expostos a interação não agressiva exibem níveis plasmáticos do hormônio próximos ao basal (figura 10). Uma vez que a exposição de animais a ambientes novos bem como o seu manuseio são estressores leves (OTTENWELLER, 2000), pode-se sugerir que o aumento inicial de corticosterona plasmática observado no grupo controle se dá por esses motivos. Ainda, o aumento prolongado (por pelo menos uma hora) de corticosterona demonstra a ação estressora do protocolo de derrota social, corroborando a hipótese de que o aumento dos níveis de corticosterona plasmática é um indicador de ativação do eixo HPA em situações de estresse (para uma revisão ver WHITNALL, 1993).

De forma importante, quando os animais são submetidos seguidamente a dois estímulos aversivos (estresse de derrota social e LCE), observa-se uma ativação robusta do eixo HPA, com níveis elevados de corticosterona do grupo estressado, em relação ao grupo controle, sendo detectados logo aos 10 minutos após o início da exposição ao LCE (figura 11). Vale destacar, que os níveis de corticosterona do grupo controle (i.e., grupo não estressado, porém exposto ao LCE) são significativamente diferentes do grupo estressado, demonstrando que a interação agressiva intensifica a ativação do eixo HPA frente a um novo desafio, uma vez que a exposição ao LCE por si só é capaz de aumentar os níveis de corticosterona (MENDES-GOMES et al., 2011).

Ainda que não tão robusta quanto a resposta hormonal, tem-se também alteração da resposta comportamental dos animais submetidos ao estresse de derrota social e expostos ao LCE, com tendência de diminuição de porcentagem de entradas nos braços abertos (figura 7) e SAP desprotegido (figura 8), dois índices relacionados a comportamento ansiogênico de roedores expostos a este modelo animal (ESPEJO, 1997; RODGERS; JOHNSON, 1995). Destaca-se a variabilidade da resposta comportamental gerada pelo estresse de derrota social agudo, uma vez que nos resultados do experimento para avaliação dos efeitos a curto e longo prazo do estresse (item 4.1.1.) observa-se robusto efeito ansiogênico. Dessa forma, faz-se importante um olhar para indivíduos suscetíveis e não suscetíveis ao estresse, para melhor entendimento do papel do estresse de derrota social como uma situação ansiogênica.

Embora a ativação dos sistemas de resposta ao estresse seja crítica para a sobrevivência no contexto de ameaças internas ou externas à homeostase, a rápida contra regulação destes sistemas é igualmente importante para o restabelecimento das funções do organismo após o fim da ameaça. Estudos sugerem que anormalidades genéticas, exposição ao estresse no início da vida, a exposição a um evento traumático e o estresse imprevisível em qualquer idade pode aumentar a sensibilidade de um indivíduo à tensão, e reduzir a resiliência frente a novos eventos aversivos. Resiliência é uma função entre o limiar no qual perturbações internas ou externas ativam os sistemas de resposta ao estresse, e a rapidez com que essas respostas ao estresse cessam com o fim do estímulo aversivo (HAUGER et al., 2006). Nesse sentido, alguns animais podem ser mais resilientes ao estresse de derrota social do que outros, alterando o perfil de respostas observado em uma média entre experimentos. Indo ao encontro dessa hipótese, Adamec e colaboradores (2012) verificaram que animais expostos ao seu predador, neste caso ratos expostos a gatos, apresentavam diferentes perfis de resposta comportamental quando submetidos ao LCE. Ainda correlacionaram que dentre estes animais expostos ao estresse do confronto com predador, os que apresentavam baixos índices de ansiedade (resilientes) possuíam elevada expressão de c-fos no córtex pré-frontal medial, enquanto os que apresentavam altos índices de ansiedade (suscetíveis) possuíam reduzida expressão de c-fos nesta estrutura. Segundo Adamec e colaboradores (2012), esta ativação elevada do córtex pré-frontal estaria intimamente relacionada a resiliência destes animais, uma vez que esta estrutura tem uma via direta para a amígdala, podendo inibir sua excitabilidade, o que seria responsável por gerar os baixos índices de ansiedade no LCE. De forma importante, a existência de vários perfis de resposta do tipo ansiedade de animais que passaram por uma situação prévia de estresse demonstra-se promissora para o entendimento dos mecanismos de resiliência ao estresse, com grande potencial para estudos translacionais das desordens relacionadas ao estresse que acometem humanos.

Em relação ao papel do CRF na modulação de respostas defensivas, de forma importante, por ser algo ainda não relatado na literatura, os resultados obtidos com microinjeções intra-amígdala de um antagonista seletivo para CRF1 sugerem um papel ansiogênico tônico do CRF neste subtipo de receptor, nas reações de defesa de camundongos exibidas no LCE.



Como ilustrado na figura 12, injeções intra-amídala de CRF, nas doses de 37,5 e 75 pmol, diminuíram tanto as porcentagens de entrada quanto de tempo nos braços abertos, medidas estas estabelecidas como índice de ansiedade em animais expostos ao LCE (RODGERS; JOHNSON, 1995). Estes efeitos não se deram por alterações na locomoção dos animais, uma vez que não houve diferenças entre o número de entradas nos braços fechados e levantamentos dos animais que receberam CRF nas doses de 37,5 e 75 pmol em relação ao grupo salina (figuras 12 e 14).

Em relação às medidas complementares, apenas a medida “extremidade distal” (figura 14) sofreu alteração com as microinjeções de CRF, nas mesmas doses que alteraram as medidas espaço-temporais (37,5 e 75 pmol), demonstrando que este neuropeptídeo na amídala aumenta a aversão à parte mais distal do braço aberto.

De forma interessante, a injeção intra-amídala de 150 pmol de CRF, não resultou em aumento da ansiedade, e sim em ausência de efeito, uma vez que mostrou ser inócua tanto nas medidas espaço-temporais quanto nas complementares (figuras 12, 13 e 14). Resultados similares foram encontrados por Ohata e Shibasaki (2011) com microinjeções no córtex pré-frontal medial de ratos, onde doses menores de CRF produziram efeitos de diminuição tanto na porcentagem de entrada quanto na de tempo nos braços abertos do LCE, enquanto doses maiores foram desprovidas de efeito ou apresentaram efeito ansiolítico. A ausência de efeitos poderia ter se dado pelo fato dos efeitos da ligação do CRF a receptores do subtipo 1 serem antagonistas aos efeitos da ligação a receptores do subtipo 2. Desta forma, em baixas doses o CRF se liga preferencialmente a receptores do subtipo 1 que estão em neurônios gabaérgicos. A ativação destes neurônios gabaérgicos levaria por sua vez a inibição da liberação de serotonina pelo núcleo dorsal da rafe na matéria cinzenta periaquedutal, o que geraria um efeito do tipo ansiogênico. Em altas doses, o CRF se ligaria a receptores CRF do subtipo 2 que se encontram em neurônios serotoninérgicos que se projetam para a matéria cinzenta periaquedutal, levando a um efeito do tipo ansiolítico (KIRBY et al., 2008). Sendo assim, os efeitos causados pela ativação de CRF1 iriam de encontro ao efeito da ativação de CRF2, gerando uma ausência de efeitos no geral. Segundo Donner e colaboradores (2012), estas vias de interação CRF-serotonina estariam intimamente relacionadas com a amídala, principalmente com os núcleos basolateral e central.

Em relação às microinjeções de antagonista intra-amígdala, o antagonista CRF2 (antisauvagine-30) não se mostrou capaz de alterar os índices de ansiedade tanto das medidas espaço-temporais quanto das complementares (figuras 15, 16 e 17). O papel do CRF2 nos comportamentos relacionados a ansiedade permanece desconhecido, visto que os resultados na literatura são contraditórios (por exemplo, MIGUEL; NUNES-DE-SOUZA, 2011; TAKAHASHI et al., 2001). Os dados aqui apresentados sugerem que este subtipo de receptor CRFérgico da amígdala de camundongos não está envolvido com a modulação tônica de comportamentos tipo ansiedade avaliados no LCE.

Por sua vez, os resultados com o antagonista CRF1 (CP376395) demonstram um efeito tipo ansiolítico na dose de 0,75 nmol, uma vez que houve aumento na porcentagem de tempo no braço aberto (figura 15). Este resultado é corroborado pela tendência de aumento de mergulhos na área desprotegida e pela diminuição de SAP protegido (figura 16), que, segundo Rodgers e Johnson (1995) e Espejo (1997), são o conjunto mais robusto de medidas etológicas para expressar a diminuição de ansiedade. Além disso, houve diminuição de mergulhos na área protegida e aumento de tempo na extremidade distal do braço aberto (ambiente aversivo), que podem ser observados nas figuras 16B e 17A, respectivamente, sendo ambos os índices também indicativos de efeito antiaversivo.

Tanto a diminuição de SAP total quanto o aumento de mergulhos total encontrados com a dose de CP de 1,5 nmol (figura 16), parecem ser reflexos de outros comportamentos, sendo o primeiro, reflexo da tendência de diminuição de SAP protegido e o segundo, reflexo do aumento não significativo de mergulhos na área protegida e da tendência de aumento de mergulhos na área desprotegida.

Em camundongos, em experimentos que envolveram a administração intracerebroventricular de fármacos, foi demonstrado que o antagonista CRF1 (NBI 30775) foi capaz de atenuar o sobressalto causado por som, eliciado por injeções de CRF (RISBROUGH et al., 2003). Ainda, microinjeções do antagonista de CRF1, antalarmina, no núcleo basolateral da amígdala de camundongos diminuíram o comportamento defensivo de animais que passaram por derrota social, quando estes são expostos a um animal não agressivo (ROBISON et al., 2004), demonstrando que o bloqueio de CRF1 em camundongos parece ter um efeito antiaversivo.

Sendo assim, o conjunto de resultados obtidos no presente estudo somado aos encontrados na literatura indica que o CRF possui papel ansiogênico na amígdala. Desta forma, a partir dos resultados com os antagonistas CRF1 e 2, pode-se sugerir que o CRF endógeno na amígdala tem importante papel modulador, via receptores tipo 1, nos comportamentos relacionados à ansiedade exibidos por camundongos expostos ao LCE.

Dados obtidos em nosso laboratório e publicados recentemente indicam que este papel modulador do CRF via receptores do subtipo 1 depende da escala hierárquica (do tronco ao córtex) em que a estrutura encefálica encontra-se no sistema de defesa. Sendo assim, aparentemente, na matéria cinzenta periaquedutal não há modulação tônica CRFérgica (MIGUEL; NUNES-DE-SOUZA, 2011), enquanto na amígdala há uma modulação tônica via receptores do subtipo 1 intermediária (como apresentado neste estudo) e no córtex pré-frontal esta modulação via CRF1 é mais pronunciada (MIGUEL; GOMES; NUNES-DE-SOUZA, 2014).

Visto que o papel do CRF2 na amígdala não foi elucidado com as microinjeções de ASV30, outra ferramenta farmacológica foi utilizada, neste caso o agonista para CRF2, a urocortina 3. Como pode ser visto nas figuras 18, 19 e 20, infusões intra-amígdala de urocortina 3 não alteraram quaisquer comportamentos de camundongos submetidos ao LCE. Embora alguns estudos tenham relacionado este peptídeo com a atenuação de reações de defesa (FUNK; KOOB, 2007; TELEGDY; ADAMIK, 2013; VALDEZ et al., 2003), outros apontam que tanto urocortina 2 quanto a urocortina 3 estão mais relacionadas ao balanço energético necessário para o organismo voltar a homeostase após uma situação adversa (para uma revisão ver CHEN, P. et al., 2013). Dessa forma, a ausência de efeito da ativação de CRF2 via urocortina 3 sobre os comportamentos de camundongos exibidos no LCE corrobora, através de injeção local na amígdala, hipóteses da literatura de que este subtipo de receptor não estaria relacionado à reação de defesa de animais.

Ainda na tentativa de elucidar se a ausência de efeitos da dose de 150 pmol de CRF microinjetada na amígdala é devido a ativação de CRF2, uma vez que o neuropeptídeo tem afinidade por ambos CRF1 e CRF2 (HILLHOUSE; GRAMMATOPOULOS, 2006), fez-se o bloqueio destes receptores com antisauvagine-30, seguido da microinjeção desta dose de CRF. O que se pode ver nas figuras 21, 22 e 23 é que o prévio bloqueio de CRF2 não foi capaz de alterar

nenhum parâmetro comportamental de animais que tiveram CRF administrado na amígdala.

Uma vez que os dados com urocortina 3 e com injeções combinadas de ASV30 e CRF não revelam quaisquer indícios de que a ativação de CRF2 se contraponha ao efeito da ativação de CRF1 (sabidamente ansiogênico) que explique a ausência de efeito de doses mais elevadas de CRF intra-amígdala sobre o comportamento de camundongos expostos ao LCE (figuras 12, 13 e 14), outras hipóteses fazem-se necessárias. Nesse sentido, Veldhuis e De Wied (1984) apontam que as diferentes respostas comportamentais obtidas com diferentes doses e vias de administração de CRF podem ser resultantes da influência da liberação de outros peptídeos pelo encéfalo e pela adrenal, em decorrência da administração de CRF, como por exemplo, o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e a corticosterona. Visto que a corticosterona participa do feedback negativo para controlar níveis apropriados de CRF sistêmico e encefálico (WHITNALL, 1993), altas doses de CRF na amígdala poderiam gerar uma cascata de eventos fisiológicos visando manter o organismo sob controle, resultando em efeito nulo da microinjeção deste peptídeo sobre o comportamento dos animais expostos ao LCE.

Ainda, dados demonstram o envolvimento da CRF-binding protein (CRF-BP) em manter a homeostase, através do clearance ou degradação de CRF, e que a ausência desta proteína leva a aumento de ansiedade em camundongos submetidos ao LCE, apontando seu papel em contribuir para o controle dessa modalidade de comportamento (KAROLYI et al., 1999). Sendo a amígdala um sítio que contém CRF-BP (POTTER et al., 1992), a dose de 150 pmol de CRF microinjetada nesta estrutura, poderia elevar os níveis dessa proteína, gerando aumento da degradação de CRF, anulando seus efeitos sobre o comportamento, levando o organismo à homeostase.

Depois de avaliado o efeito do estresse de derrota social agudo sobre os comportamentos de animais expostos ao LCE, bem como o efeito do CRF e de seus antagonistas também sobre os comportamentos de camundongos expostos a este mesmo aparato, avaliou-se o efeito do bloqueio de receptores CRF sobre o comportamento de camundongos previamente submetidos ao estresse de derrota social e expostos ao LCE. Como ilustrado nas figuras 24, 25 e 26, injeções intra-amígdala do antagonista para CRF1 (CP376395), na dose de 0,375 nmol, e para CRF2 (antisauvagine-30), na dose de 1 nmol, foram inócuas sobre o comportamento

exibido no LCE por camundongos que haviam sido previamente derrotados numa interação agressiva. Embora nenhum dado envolva o bloqueio de receptores de CRF na amígdala de camundongos expostos ao LCE e que tivessem sido previamente submetidos ao estresse de derrota social agudo, diversos dados na literatura relatam a implicação do sistema CRFérgico em situações de estresse (CUMMINGS et al., 1983; MERALI et al., 1998; MERLO-PICH et al., 1992, 1995; RODRIGUEZ DE FONSECA et al.; 1997; SHEKHAR et al., 2005), o que torna intrigante a ausência de efeitos observada neste experimento.

Ademais, tem-se na literatura que antagonistas para CRF1 sem efeito tônico sobre os comportamentos emitidos por ratos no LCE, passam a produzir efeitos quando esses animais são expostos previamente ao estresse (BIRO et al., 1993; HEINRICHS et al., 1992, 1994; KASK; RAGO; HARRO, 1997; MENZAGHI et al., 1994; SPINA et al., 2000). Cabe ressaltar que, neste caso, a espécie utilizada era diferente, bem como o sítio de injeção e o fármaco.

Em relação ao sítio de injeção, neste estudo já foi demonstrado evidências sugestivas de modulação CRFérgica tônica na amígdala de camundongos expostos ao LCE. Neste caso, as doses utilizadas neste estudo envolvendo estresse, podem não ter sido suficientes para bloquear o CRF, visto que se teria um tônus CRFérgico normal acrescido pelo CRF liberado devido ao estresse. Entretanto, destaca-se que o grupo estressado que recebeu na amígdala apenas salina, não apresentou no LCE o comportamento do tipo ansiogênico que seria o esperado.

Quanto à ausência de efeito ansiogênico do estresse nos animais do grupo controle (que receberam microinjeção de salina na amígdala), algumas hipóteses podem ser levantadas. Primeiramente, aponta-se a problemática da variabilidade de respostas comportamentais dos animais expostos a derrota social e submetidos ao LCE, anteriormente discutida. Entretanto, a hipótese mais cabível seria um falho planejamento do delineamento do experimento em questão. Como pode ser visto no item 3.8.3. temos que os animais passaram pelo procedimento da microinjeção dos diferentes compostos na amígdala e logo em seguida já foram expostos ao estresse. Nesse sentido, Doremus-Fitzwater e colaboradores (2011) demonstraram que quanto maior o número de manipulações pré-teste menos ansiosos ratos adultos se apresentavam no LCE, sendo o aumento na porcentagem de entradas e de tempo no braço aberto linear ao aumento do número de

manipulações. Fazendo um paralelo, este fenômeno pode ser uma mimetização dos efeitos da microinjeção intra-amídala da dose de 150 pmol de CRF, ou seja, somando-se o estresse do procedimento de microinjeção com o estresse de derrota social em si, chegou-se a níveis de CRF que estariam na faixa da ausência de efeito no LCE. Neste caso o ideal seria realizar as microinjeções intra-amídala e aguardar um intervalo para a execução do estresse de derrota social.

Diante dos problemas relatados com o delineamento experimental e das diversas evidências expostas neste estudo, não se pode descartar que uma modulação CRFérgica esteja por trás do efeito tipo ansiedade observado a curto e longo prazo em camundongos pré-expostos ao estresse de derrota social.

## 6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que o estresse de derrota social agudo é capaz de gerar comportamentos tipo ansiedade a curto e longo prazos em animais expostos ao LCE. Entretanto, a resposta a curto prazo demonstra-se variável, tornando interessante uma abordagem que subdivida estes animais em resilientes e suscetíveis ao estresse. Ainda, a curto prazo, o estresse de derrota social agudo recruta o eixo HPA, sendo esta resposta intensificada quando o animal é exposto a um novo desafio (LCE).

Conclui-se também que o CRF possui papel ansiogênico na amígdala e que este papel é modulado tonicamente pelo CRF1. Quanto ao CRF2, seu papel continua indeterminado, entretanto nenhuma evidência neste estudo aponta para sua participação na modulação de comportamentos exibidos no LCE.

Por fim, não foi possível determinar qual é o envolvimento da neurotransmissão CRFérgica nas respostas exibidas por camundongos pré-expostos ao estresse de derrota social e submetidos ao LCE, sendo necessários experimentos complementares com um delineamento experimental alternativo.

## REFERÊNCIAS

- ADAMEC, R. E.; SHALLOW, T. Lasting effects on rodent anxiety of a single exposure to a cat. *Physiol. Behav.*, v. 54, n. 1, p. 101-109, jul. 1993.
- ADAMEC, R. E. et al. A comparison of activation patterns of cells in selected prefrontal cortical and amygdala areas of rats which are more or less anxious in response to predator exposure or submersion stress. *Physiol. Behav.*, v. 105, n. 3, p. 628-638, feb. 2012.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*. 5th ed. Washington, DC: Academic Press, 2013. v. 1.
- ANDRADE, L. H. et al. Mental disorders in megacities: findings from the São Paulo megacity mental health survey, Brazil. *PLoS One*, v. 7, n. 2, p. e31879, feb. 2012.
- BALE, T.L. et al. Mice deficient for corticotropin-releasing hormone receptor-2 display anxiety-like behavior and are hypersensitive to stress. *Nat. Genet.*, v. 24, n. 4, p. 410-414, apr. 2000.
- BARBALHO, C. A.; CANTO-DE-SOUZA, A. L.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Similar anxiolytic-like effects following intra-amygdala infusions of benzodiazepine receptor agonist and antagonist: evidence for the release of an endogenous benzodiazepine inverse agonist in mice exposed to elevated plus-maze test. *Brain Res.*, v. 1267, p. 65-76, apr. 2009.
- BIRO, E. et al. Role of endogenous corticotropin-releasing factor in mediation of neuroendocrine and behavioral responses to cholecystokinin octapeptide sulfate ester in rats. *Neuroendocrinology*, v. 57, n. 2, p. 340-345, 1993.
- BJÖRKQVIST, K. Social defeat as a stressor in humans. *Physiol. Behav.*, v. 73, n. 3, p. 435-442, jun. 2001.
- BLACKTOP, J. M. et al. Augmented cocaine seeking in response to stress or CRF delivered into the ventral tegmental area following long-access self-administration is mediated by CRF receptor type 1 but not CRF receptor type 2. *J. Neurosci.*, v. 31, n. 31, p. 11396-11403, aug. 2011.
- BORELLI, K. G.; BRANDÃO, M. L. Effects of ovine CRF injections into the dorsomedial, dorsolateral and lateral columns of the periaqueductal gray: a functional role for the dorsomedial column. *Horm. Behav.*, v. 53, n. 1, p. 40-50, jan. 2008.
- CAMPOS, A. C. et al. Animal models of anxiety disorders and stress. *Rev. Bras. Psiquiatr.*, v. 35, suppl. 2, p. S101-S111, 2013.
- CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, v. 29, n. 8, p. 1193-1205, aug. 2005.



CHANG, C. P. et al. Identification of a seven transmembrane helix receptor for corticotropin-releasing factor and sauvagine in mammalian brain. *Neuron.*, v. 11, n. 6, p. 1187-1195, dec. 1993.

CHEN, R. et al. Expression cloning of a human corticotropin-releasing factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 90, n. 19, p. 8967-8971, oct. 1993.

CHEN, P. et al. Central urocortin 3 and type 2 corticotropin-releasing factor receptor in the regulation of energy homeostasis: critical involvement of the ventromedial hypothalamus. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, v. 7, n. 3, p. 180, jan. 2013.

CORNÉLIO, A. M.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Anxiogenic-like effects of mCPP microinfusions into the amygdala (but not dorsal or ventral hippocampus) in mice exposed to elevated plus-maze. *Behav. Brain. Res.*, v. 178, n. 1, p. 82-89, mar. 2007.

CUMMINGS, S. et al. Corticotropin-releasing factor immunoreactivity is widely distributed within the central nervous system of the rat: an immunohistochemical study. *J. Neurosci.*, v. 3, n.7, p. 1355-1368, 1983.

DAYAS, C. V.; BULLER, K. M.; DAY, T. A. Neuroendocrine responses to an emotional stressor: evidence for involvement of the medial but not the central amygdala. *Eur. J. Neurosci.*, v. 11, n. 7, p. 2312-2322, jul. 1999.

DAVIS, M. Pharmacological analysis of fear-potentiated startle. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 26, n. 3, p. 235-260, mar. 1993.

DAVIS, M.; RAINNIE, D.; CASSELL, M. Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety. *Trends Neurosci.*, v. 17, n. 5, p. 208-214, may. 1994.

DAVIS, M. Neural systems involved in fear and anxiety measured with fear-potentiated startle. *Am. Psychol.*, v. 61, n. 8, p. 741-756, 2006.

DE KLOET, E. R.; JOELS, M.; HOLSBOER, F. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat. Rev. Neurosci.*, v. 6, n. 6, p. 463-475, jun. 2005.

DE FRANCESCO, P. N. et al. Neuroanatomical and functional characterization of CRF neurons of the amygdala using a novel transgenic mouse model. *Neuroscience*. v. 289, p. 153-165, mar. 2015.

DE SOUZA, E. B. et al. Corticotropin-releasing factor receptors are widely distributed within the rat central nervous system: an autoradiographic study. *J. Neurosci.*, v. 5, n. 12, p. 3189-3203, dec. 1985.

DONNER, N. C. et al. Elevated tph2 mRNA expression in a rat model of chronic anxiety. *Depression and Anxiety*, v. 29, n. 4, p. 307-319, apr. 2012.

DOREMUS-FITZWATER, T. L.; VARLINSKAYA, E. I.; SPEAR, L. P. Effects of pretest manipulation on elevated plus-maze behavior in adolescent and adult male

and female Sprague-Dawley rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v. 92, n. 3, p. 413-423, may 2009.

ESPEJO, E. F. Structure of the mouse behaviour on the elevated plus-maze test of anxiety. *Behav. Brain Res.*, v. 86, n. 105-112, jun. 1997.

FUNK, C. K.; KOOB, G. F. A CRF2 agonist administered into the central nucleus of the amygdala decreases ethanol self-administration in ethanol-dependent rats. *Brain Res.*, v. 1155: 172-178, jun. 2007.

HAUGER, R. L. et al. Corticotropin releasing factor (CRF) receptor signaling in the central nervous system: new molecular targets. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*, v. 5, n. 4, p. 453-479, aug. 2006.

HEINRICHS, S. C. et al. Corticotropin-releasing factor antagonist reduces emotionality in socially defeated rats via direct neurotropic action. *Brain Res.*, v. 581, n. 2, p. 190-197, may 1992.

HEINRICHS, S. C. et al. Antistress action of a corticotropin-releasing factor antagonist on behavioral reactivity to stressors of varying type and intensity. *Neuropsychopharmacology*, v. 11, n. 3, p. 179-186, nov. 1994.

HILLHOUSE, E. W.; GRAMMATOPOULOS, D. K. The molecular mechanisms underlying the regulation of the biological activity of corticotropin-releasing hormone receptors: implications for physiology and pathophysiology. *Endocr. Rev.*, 27(3): 260-286, 2006.

KAROLYI, I. J. et al. Altered anxiety and weight gain in corticotropin-releasing hormone-binding protein-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 96, n. 20, p. 11595-11600, sep. 1999.

KASK, A.; RAGO, L.; HARRO, J. Alpha-helical CRF(9-41) prevents anxiogenic-like effect of NPY Y1 receptor antagonist BIBP3226 in rats. *Neuroreport*, v. 8, n. 16, p. 3645-3647, nov. 1997.

KEENEY, A. J.; HOGG, S. Behavioural consequences of repeated social defeat in the mouse: preliminary evaluation of a potential animal model of depression. *Behav. Pharmacol.*, v. 10, n. 8, p. 753-764, dec. 1999.

KIRBY, L. G. et al. Corticotropin-releasing factor increases GABA synaptic activity and induces inward current in 5-hydroxytryptamine dorsal raphe neurons. *J. Neurosci.*, v. 28, n. 48, p. 12927-13037, nov. 2008.

KISHIMOTO, T. et al. Deletion of *crhr2* reveals an anxiolytic role for corticotropin-releasing hormone receptor-2. *Nat. Genet.*, v. 24, n. 4, p. 415-419, apr. 2000.

KRISHNAN, V. et al. Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. *Cell*, v. 131, n. 2, p. 391-404, oct. 2007.

LAVIOLA, G. et al. Psychobiological risk factors for vulnerability to psychostimulants in human adolescents and animal models. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, v. 23, n. 7, p. 993-1010, nov. 1999.

LEDOUX, J. E. Emotion circuits in the brain. *Ann. Rev. Neurosci.*, v. 23, p. 155-184, 2000.

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*, v. 92, n. 2, p. 180-185, 1987.

LOVENBERG, T. W. et al. Cloning and characterization of a functionally distinct corticotropin-releasing factor receptor subtype from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 92, n. 3, p. 836-840, jan. 1995.

MARTINS, A. P.; MARRAS, R. A.; GUIMARÃES, F. S. Anxiolytic effect of a CRH receptor antagonist in the dorsal periaqueductal gray. *Depress. Anxiety*, v. 12, n. 2, p. 99-101, 2000.

MATHEW, S. J.; PRICE, R. B.; CHARNEY, D. S. Recent advances in the neurobiology of anxiety disorders: Implications for novel therapeutics. *Am. J. Med. Genet. Part. C Semin. Med. Genet.*, v. 148C, n. 2, p. 89-98, may 2008.

MCCARTY, R.; PACAK, K. Alarm Phase and General Adaptation Syndrome. In: FINK, G (Ed.). *Encyclopedia of Stress*. 1st Edition. San Diego: Academic Press, 2000, p. 126-130.

MCEWEN, B. S. Stress, Definitions and Concepts of. In: FINK, G (Ed.). *Encyclopedia of Stress*. 1st Edition. San Diego: Academic Press, 2000, p. 508-509.

MCGAUGH, J. L. The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annu. Rev. Neurosci.*, v. 27, p. 1-28, 2004.

MENDES-GOMES, J. et al. Corticosterone does not change open elevated plus maze-induced antinociception in mice. *Horm. Behav.*, v. 60, n. 4, p. 408-413, sep. 2011.

MENZAGHI, F. et al. Characterization of a novel and potent corticotropin-releasing factor antagonist in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 269, n. 2, p. 564-572, may 1994.

MERALI, Z. et al. Aversive and appetitive events evoke the release of corticotropin-releasing hormone and bombesin-like peptides at the central nucleus of the amygdala. *J. Neurosci.*, v. 18, n. 12, p. 4758-4766, jun. 1998.

MERLO-PICH, E. et al. Stress-induced release of corticotropin-releasing factor in the amygdala measured by in vivo microdialysis. *Neurosci. Abstr.*, v. 18, p. 535, 1992.

MERLO-PICH, E. et al. Increase of extracellular corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity levels in the amygdala of awake rats during restraint stress and

ethanol withdrawal as measured by microdialysis. *J. Neurosci.*, v. 15, n. 8, p. 5439-5447, aug. 1995.

MICZEK, K. A.; THOMPSON, M. L.; SHUSTER, L. Opioid-like analgesia in defeated mice. *Science*, v. 215, n. 4539, p. 1520-1522, mar. 1982.

MICZEK, K. A. et al. Neurobiological mechanisms controlling aggression: preclinical developments for pharmacotherapeutic interventions. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, v. 18, n. 1, p. 97-110, 1994.

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

MIGUEL, T. T.; GOMES, K. S.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Tonic modulation of anxiety-like behavior by corticotropin-releasing factor (CRF) type 1 receptor (CRF1) within the medial prefrontal cortex (mPFC) in male mice: role of protein kinase A (PKA). *Horm Behav.*, v. 66, n. 2, p. 247-256, jul. 2014.

MITRA, R. et al. Stress duration modulates the spatiotemporal patterns of spine formation in the basolateral amygdala. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 102, n. 26, p. 9371-9376, jun. 2005.

MONROE, S. M. Psychological Stressors, Overview. In: FINK, G (Ed.). *Encyclopedia of Stress*. 1st Edition. San Diego: Academic Press, 2000, p. 287-294.

MYERS, B.; GREENWOOD-VAN MEERVELD, B. Elevated corticosterone in the amygdala leads to persistent increases in anxiety-like behavior and pain sensitivity. *Behav. Brain Res.*, v. 214, n. 2, p. 465-469, dec. 2010.

OHATA, H.; SHIBASAKI, T. Microinjection of different doses of corticotropin-releasing factor into the medial prefrontal cortex produces effects opposing anxiety-related behavior in rats. *J. Nihon. Med. Sch.*, v. 78, n. 5, p. 286-292, 2011.

OTTENWELLER, J. E. Animals models (nonprimate) for human stress. In: FINK, G. (Ed.). *Encyclopedia of Stress*. 1st Edition. San Diego: Academic Press, 2000, p. 200-205.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. B. J. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press, 2001.

PERRIN, M. et al. Identification of a second corticotropin-releasing factor receptor gene and characterization of a cDNA expressed in heart. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 92, n. 7, p. 2969-2973, mar. 1995.

PHAN, K. L. et al. Functional neuroanatomy of emotion: A meta-analysis of emotion activation studies in PET and fMRI. *Neuroimage*, v. 16, n. 2, p. 331-348, jun. 2002.

PHELPS, E. A.; LEDOUX, J. E. Contributions of the amygdala to emotion processing: from animal models to human behavior. *Neuron.*, v. 48, n. 2, p. 175-187, oct. 2005.

POTTER, E. et al. The central distribution of a corticotropin-releasing factor (CRF)-binding protein predicts multiple sites and modes of interaction with CRF. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 89, n. 9, p. 4192-4196, may 1992.

RISBROUGH, V. B. et al. Role of corticotropin releasing factor (CRF) receptors 1 and 2 in CRF-potentiated acoustic startle in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 170, n. 2, p. 178-187, nov. 2003.

ROBISON, C. L. et al. A CRH1 antagonist into the amygdala of mice prevents defeat-induced defensive behavior. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 1032, p. 324-327, dec. 2004.

RODGERS, R. J.; COLE, J. C. Anxiety enhancement in the murine elevated plus maze by immediate prior exposure to social stressors. *Physiology and Behavior*, v. 53, n. 2, p. 383-388, feb. 1993.

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

RODRIGUEZ DE FONSECA, F. et al. Activation of corticotropin-releasing factor in the limbic system during cannabinoid withdrawal. *Science*, v. 276, n. 5321, p. 2050-2054, jun. 1997.

RONAN, P. J; SUMMERS, C. H. Molecular signaling and translational significance of the corticotropin releasing factor system. *Prog Mol Biol Transl Sci.*, v. 98, p. 235-292, 2011.

SAH, P. et al. The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiol. Rev.*, v. 83, n. 3, p. 803-834, jul. 2003.

SHEKHAR, A. et al. Role of stress, corticotrophin releasing factor (CRF) and amygdala plasticity in chronic anxiety. *Stress*, v. 8, n. 4, p. 209-219, dec. 2005.

SIEGFRIED, B.; FRISCHKNECHT, H. R.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. An ethological model for the study of activation and interaction of pain, memory and defensive systems in the attacked mouse. Role of endogenous opioids. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, v. 14, n. 4, p. 481-490, 1990.

SMITH, G. W. et al. Corticotropin releasing factor receptor 1-deficient mice display decreased anxiety, impaired stress response, and aberrant neuroendocrine development. *Neuron.*, v. 20, n. 6, p. 1093-1102, jun. 1998.

SOLOMON, M. B. et al. The medial amygdala modulates body weight but not neuroendocrine responses to chronic stress. *J. Neuroendocrinol.*, v. 22, n. 1, p. 13-23, jan. 2010.

SPINA, M. G. et al. Behavioral effects of central administration of the novel CRF antagonist astressin in rats. *Neuropsychopharmacol.* v. 22, n. 3, p. 230-239, mar. 2000.

STEIN, D. J.; BOUWER, C. A neuro-evolutionary approach to the anxiety disorders. *J. Anxiety Disord.*, v. 11, n. 4, p. 409-429, jul.-aug. 1997.

STEEL, Z. et al. The global prevalence of common mental disorders: a systematic review and meta-analysis 1980-2013. *Int. J. Epidemiol.*, v. 43, n. 2, p. 476-493, apr. 2014.

STEPTOE, A. Stress Effects, Overview. In: FINK, G. (Ed.). *Encyclopedia of Stress*. 1st Edition. San Diego: Academic Press, 2000, p. 510-511.

TAKAHASHI, L. K. et al. Antagonism of CRF(2) receptors produces anxiolytic behavior in animal models of anxiety. *Brain Res.*, v. 902, n. 2, p. 135-142, jun. 2001.

TELEGDY, G.; ADAMIK, A. Involvement of transmitters in the anxiolytic action of urocortin 3 in mice. *Behav. Brain Res.*, v. 252, p. 88-91, sep. 2013.

TIMPL, P. et al. Impaired stress response and reduced anxiety in mice lacking a functional corticotropin-releasing hormone receptor 1. *Nat. Genet.*, v. 19, n. 2, p. 162-166, jun. 1998.

VALDEZ, G. R. et al. Locomotor suppressive and anxiolytic-like effects of urocortin 3, a highly selective type 2 corticotropin-releasing factor agonist. *Brain Res.*, v. 980, n. 2, p. 206-212, aug. 2003.

VALZELLI, L (Ed.). *Psychobiology of aggression and violence*. New York: Raven Press, 1981. 262 p.

VELDHUIS, H. D.; DE WIED, D. Differential behavioral actions of corticotropin-releasing factor (CRF). *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v. 21, n. 5, p. 707-713, nov. 1984.

VITA, N. et al. Primary structure and functional expression of mouse pituitary and human brain corticotropin releasing factor receptors. *FEBS Lett.*, v. 335, n.1, p. 1-5, nov. 1993.

WHITNALL, M. H. Regulation of the hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurosecretory system. *Prog. Neurobiol.*, v. 40, n. 5, p. 573-629, may 1993.

YAP, J. J. et al. Repeated brief social defeat episodes in mice: Effects on cell proliferation in the dentate gyrus. *Behav. Brain Res.*, v. 172, n. 2, p. 344-350, sep. 2006.

YEN, C. Y.; STANGER, R. L.; MILLMAN N. Ataractic suppression of isolation-induced aggressive behavior. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, v. 123, p. 179-185, dec. 1959.

ZALD, D. H. The human amygdala and the emotional evaluation of sensory stimuli. *Brain Res. Brain Res. Rev.*, v. 41, n. 1, p. 88-123, jan. 2003.

ZELENA, D. et al. Social stress of variable intensity: physiological and behavioral consequences. *Brain Res. Bull.*, v. 48, n. 3, p. 297-302, feb. 1999.