

JOSÉ SIMÕES DE ANDRADE

EFFEITOS DO ESTRESSE AGUDO SOBRE O
COMPORTAMENTO DE RATOS NO LABIRINTO EM T
ELEVADO, IMUNORREATIVIDADE À PROTEÍNA FOS E
CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE CORTICOSTERONA

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação Interdisciplinar em Ciências
da Saúde da Universidade Federal de
São Paulo – UNIFESP, para a obtenção
do Título de Mestre em Ciências

SANTOS

2012

JOSÉ SIMÕES DE ANDRADE

EFFEITOS DO ESTRESSE AGUDO SOBRE O
COMPORTAMENTO DE RATOS NO LABIRINTO EM T
ELEVADO, IMUNORREATIVIDADE À PROTEÍNA FOS E
CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE CORTICOSTERONA

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação Interdisciplinar em Ciências
da Saúde da Universidade Federal de
São Paulo – UNIFESP, para a obtenção
do Título de Mestre em Ciências

Orientadora: Prof^a. Dra. Milena de Barros Viana
Co-orientadora: Prof^a. Dra. Isabel Cristina Céspedes

SANTOS
2012

JOSÉ SIMÕES DE ANDRADE

EFFEITOS DO ESTRESSE AGUDO SOBRE O
COMPORTAMENTO DE RATOS NO LABIRINTO EM T
ELEVADO, IMUNORREATIVIDADE À PROTEÍNA FOS E
CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE CORTICOSTERONA

Presidente da banca: Prof^a. Dra. Milena de Barros Viana

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Alexandre Valotta da Silva

Prof. Dr. Hélio Zangrossi Júnior

Prof^a. Dra. Luciana Le Sueur Maluf

Aprovado em: 21/09/2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
CAMPUS BAIXADA SANTISTA
PÓS-GRADUAÇÃO INTERDISCIPLINAR EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO ACADÊMICO
DEPARTAMENTO DE BIOCÊNCIAS

Chefe do Departamento: Prof. Dr. Odair Aguiar Júnior

Coordenador do Curso de Pós-graduação: Prof. Dr. Daniel Araki Ribeiro

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela oportunidade de concretizar um sonho e concluir mais uma etapa da minha vida.

Agradeço ao meu falecido pai pelos muitos ensinamentos. Agradeço aos meus familiares e amigos pelo apoio e, especialmente, agradeço à minha futura esposa pela paciência e incentivo para a conclusão deste trabalho.

Agradeço também às minhas orientadora e co-orientadora, pela dedicação, paciência, confiança e incentivo. E ofereço um agradecimento também especial para Renata Abrão e Juliana Olivetti que estiveram sempre presentes nas diversas coletas de dados do presente trabalho.

Esta conquista foi muito difícil e árdua, e tenho a certeza de que sem a colaboração de vocês eu não teria conseguido. Todos são muito importantes. Obrigado.

APOIO

CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico)

FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo)

RESUMO

Resultados de estudos anteriores sugerem que o estresse agudo por restrição facilita respostas de esquiva medidas no modelo do labirinto em T elevado (LTE), um efeito ansiogênico. Por outro lado, as respostas de fuga se mantêm inalteradas. Tendo em vista que diferentes estruturas encefálicas parecem ser ativadas pela exposição dos animais às tarefas de esquiva e fuga do LTE, é possível que as diferenças comportamentais observadas sejam decorrentes dos diferentes mecanismos neurobiológicos que são ativados pela exposição ao estímulo estressor. No presente estudo, análise da imunorreatividade à proteína *fos* (*fos-ir*) foi utilizada para mapear as áreas encefálicas ativadas pela exposição ao estresse por restrição (30 minutos) em animais submetidos às tarefas de esquiva ou fuga do LTE 30 minutos após o procedimento de estresse. O comportamento destes animais, bem como a análise de *fos-ir* foi comparado com o de animais controle, não submetidos ao estresse por restrição. Concentrações séricas de corticosterona foram dosadas em grupos de animais não-estressados e estressados, com o intuito de verificar se o estresse por restrição ativava o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, conforme descrito na literatura. Confirmando resultados anteriores, o estresse por restrição facilitou as respostas de esquiva no LTE, efeito ansiogênico, mantendo inalteradas as respostas de fuga. Animais não estressados submetidos à tarefa de esquiva do LTE apresentaram maior *fos-ir* no córtex frontal, no septo latero-intermediário, na amígdala basolateral, na amígdala basomedial, na amígdala lateral, hipotálamo anterior e núcleo dorsal da rafe. Por outro lado, na tarefa de fuga do LTE, os animais não estressados apresentaram maior *fos-ir* no hipotálamo ventromedial, na substância cinzenta periaquedutal dorsolateral e no *locus ceruleus*. Ambas as tarefas produziram um aumento na *fos-ir* no hipotálamo dorsomedial. O estresse agudo por restrição aumentou significativamente as concentrações séricas de corticosterona. No grupo de animais estressados e submetido à tarefa de esquiva houve maior *fos-ir* na amígdala basolateral e no núcleo dorsal da rafe. Esses dados confirmam que diferentes estruturas encefálicas são ativadas pelas diferentes tarefas (esquiva ou fuga) do LTE e demonstram que o estresse agudo por restrição altera seletivamente respostas de esquiva e a *fos-ir* em estruturas que tem sido tradicionalmente relacionadas à modulação destas respostas.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	v
RESUMO.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Definição de estresse.....	1
1.2. Família de peptídeos CRF e seus receptores.....	1
1.3. Via neurais do estresse.....	3
1.4. Ansiedade normal e patológica.....	5
1.5. Etologia e neuroanatomia da ansiedade.....	9
1.6. Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) e transtornos de Ansiedade....	12
1.7. Modelos experimentais de ansiedade: labirinto em T elevado (LTE).....	15
1.8. Estresse e ansiedade.....	17
2. OBJETIVOS.....	19
2.1. Objetivos gerais.....	19
2.2. Objetivos específicos.....	19
3. MATERIAL E MÉTODO	20
3.1. Animais.....	20
3.2. Aparelhos experimentais.....	20
3.2.1. Labirinto em T elevado (braços abertos).....	20
3.2.2. Labirinto em T fechado.....	21
3.3. Procedimentos.....	21
3.3.1. Procedimento de pré-exposição.....	22
3.3.2. Procedimentos para as medidas no labirinto em T fechado e esquiva e fuga no LTE.....	22
3.3.3. Procedimento de estresse agudo.....	23
3.4. Procedimentos histológicos.....	24
3.4.1. Perfusão e microtomia.....	24
3.4.2. Imunoistoquímica para proteína fos.....	25
3.4.3. Coloração pelo método de Nissl e análise microscópica.....	26

3.4.4. Contagem de células imunorreativas.....	26
3.4.5. Procedimento para a realização da dosagem de corticosterona.....	27
3.5. Análise estatística	28
4. RESULTADOS.....	29
4.1. Testes comportamentais.....	29
4.2. Imunorreatividade à proteína fos.....	31
4.3. Dosagem de corticosterona plasmática.....	38
5. DISCUSSÃO.....	39
6. CONCLUSÕES.....	47
7. REFERÊNCIAS.....	48
ABSTRACT.....	68
ANEXO – Artigo publicado – <i>Acute restraint differently alters defensive responses and fos immunoreactivity in the rat brain</i>	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Regulação do eixo HHA e da liberação de glicocorticóides em resposta ao estresse sob a influência do hipocampo.....	5
Figura 2. Controle da resposta de estresse pela amígdala.....	12
Figura 3. Regulação coordenada do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal pelo hipocampo e pela amígdala.....	13
Figura 4. Labirinto em T elevado.....	21
Figura 5. Labirinto em T fechado.....	21
Figura 6. Animais sendo pré-expostos ao labirinto em T elevado.....	22
Figura 7. Tubo de acrílico utilizado para o procedimento de restrição.....	24
Figura 8. Testes comportamentais.....	30
Figura 9. Fotomicrografias de células imunorreativas à proteína <i>fos</i> : (A) córtex frontal, (B) septo latero-intermediário, (C) amígdala basolateral, (D) amígdala basomedial, (E) amígdala lateral.....	33
Figura 10. Fotomicrografias de células imunorreativas à proteína <i>fos</i> : (A) hipotálamo anterior, (B) hipotálamo dorsomedial, (C) núcleo dorsal da rafe.....	34
Figura 11. Fotomicrografias de células imunorreativas à proteína <i>fos</i> : (A) hipotálamo ventromedial, (B) substância cinzenta periaquedutal dorsolateral, (C) <i>locus ceruleus</i>	36
Figura 12. Fotomicrografias de células imunorreativas à proteína <i>fos</i> : (A) amígdala basolateral e (B) núcleo dorsal da rafe.....	37
Figura 13. Concentração sérica de corticosterona.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Níveis de defesa, substrato neural e emoção relacionada.....	11
Tabela 2. Imunorreatividade à proteína <i>fos</i> (média \pm EPM) em em áreas pré-determinadas de diferentes regiões do encéfalo de ratos não estressados e estressados.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC – Complexo avidina-biotina

ACTH – Hormônio adrenocorticotrófico

ANOVA – Análise de variância

BZDs – Benzodiazepínicos

CA – Corno de Âmon

CCT – Corticosterona

CEDEME - Centro de desenvolvimento de modelos experimentais para medicina e biologia

CEP – Comitê de ética em pesquisa

CID – 10 – Código internacional das doenças

COBEA – Colégio brasileiro de experimentação animal

CRF – Fator liberador de corticotrofina

DCX - Doublecortina

DSM-IV^{TR}– Manual de diagnóstico e estatística das doenças mentais – 4ª edição

ECBI – Estresse crônico brando e imprevisível

EPM – Erro padrão da média

EVAH – Escala visual analógica do humor

GABA – Ácido gama-aminobutírico

HHA – Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

KPBS – Solução tampão de fosfato de potássio

LCE – Labirinto em cruz elevado

LTE – Labirinto em T elevado

NDR – Núcleo dorsal da rafe

NPV – Núcleo paraventricular do hipotálamo

OMS – Organização mundial da saúde

PBS – Solução tampão de fosfato de sódio

SCP – Substância cinzenta periaquedutal

SCPD - Substância cinzenta periaquedutal porção dorsal

SFP – Simulação do falar em público

SIC – Sistema de inibição comportamental

TAG – Transtorno de ansiedade generalizada

TP – Transtorno de pânico

UCR – Urocortina

5-HT – Serotonina

1. INTRODUÇÃO

1.1. Definição de estresse

O termo estresse é a tradução para o termo “*stress*”, da língua inglesa, utilizado pela primeira vez por H. Selye (1936) para exprimir o estado reacional de um organismo submetido à ação de um excitante qualquer. O excitante, que Selye chamou de estressor, pode ser animado (como, por exemplo, um microorganismo), físico (frio/calor), químico (uma toxina), um distúrbio ou uma lesão orgânica (hemorragia) ou nervosa (esforço, emoção agradável ou desagradável) (Garnier e Delamare, 1984). No presente trabalho, o termo estressor será utilizado para o estímulo que desencadeia a resposta fisiológica de estresse (Auriol, 1970). Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2009) mostram que o estresse afeta 90% da população mundial e está relacionado a uma série de transtornos psiquiátricos, cardiovasculares, imunológicos, locomotores, entre outros, com enorme custo aos sistemas de saúde.

1.2. Família de peptídeos CRF e seus receptores

Na última década, o conhecimento das várias alterações fisiológicas em resposta à exposição do organismo ao estímulo estressor ou estressante aumentou significativamente, principalmente em relação ao papel de certas vias neurais e suas substâncias reguladoras que podem estar envolvidas na resposta de estresse, incluindo neuropeptídeos relacionados à regulação endócrina. Acredita-se que o mais importante desses neuropeptídeos seja o CRF (*corticotropin releasing factor* ou fator liberador de corticotrofina), o componente hipotalâmico do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA; Vale *et al.*, 1981). O CRF é liberado na eminência mediana no interior do sistema porta-hipofisário a partir de um estímulo estressante, e participa da regulação fisiológica da secreção de ACTH (hormônio adrenocorticotrófico) (Brown *et al.*, 1985). É sintetizado por neurônios parvocelulares do núcleo paraventricular do hipotálamo (NPV) e a lesão deste núcleo reduz o CRF na eminência mediana em 90%, com 80% de redução do ACTH liberado após um estímulo estressor (Bruhn *et al.*, 1984).

O CRF esteve durante alguns anos, relacionado apenas ao NPV e ao seu papel de ativador hipotalâmico do eixo HHA. Porém, o CRF atua também como um neuromodulador com ação em circuitos límbicos e autonômicos (Yan *et al.*, 1998). Atualmente, a literatura relata que a distribuição do CRF atinge amplas áreas, incluindo áreas prosencefálicas relacionadas à emoção e ao comportamento da resposta de estresse e grupos celulares do tronco encefálico relacionados às respostas autônomas de estresse (simpatoadrenérgico). Desta forma, o CRF pode ser considerado um árbitro na ativação, integração e ações complementares na adaptação ao estresse (Sawchenko *et al.*, 2009). Embora as projeções do NPV para a eminência mediana representem a principal fonte encefálica de CRF, células extra-hipotalâmicas que apresentam marcação para o CRF foram identificadas no núcleo do trato solitário, no *locus ceruleus*, na área tegmental ventral, no núcleo central da amígdala, no núcleo intersticial da estria terminal, no núcleo da banda diagonal de Broca, e no hipocampo, bem como em interneurônios corticais espalhados (Swanson *et al.*, 1983; Merchenthaler, 1984; Petrusz *et al.*, 1985; Koob *et al.*, 1994; De Souza, 1995; Eckart *et al.*, 2002). O CRF encontra-se expresso também na parte periférica do sistema nervoso autônomo e no sistema nervoso entérico, associado a funções digestivas e de controle do apetite, respectivamente (Sawchenko *et al.*, 2009). Destaca-se ainda sua influência em quadros como a depressão e a ansiedade (Hauger *et al.*, 2006).

Os outros peptídeos da família CRF são a urocortina 1 (UCN1), urocortina 2 (UCN2) e urocortina 3 (UCN3), que também agem em resposta e na adaptação aos estressores, mediando algumas funções originalmente atribuídas ao CRF, mediante acoplamento aos receptores desta família de neuropeptídeos (Bittencourt *et al.*, 1999; Sawchenko *et al.*, 2009).

Os receptores da família CRF incluem o CRFR1 e o CRFR2 α,β,γ , e encontram-se, principalmente, no sistema nervoso central (SNC) e, em pequena quantidade, nos tecidos periféricos. O CRF tem baixa afinidade pelo CRFR2, a UCN1 tem afinidade por ambos os receptores enquanto que a UCR2 e a UCR3 tem maior afinidade pelo CRFR2 (Chalmers *et al.*, 1995; Lovenberg *et al.*, 1995; Kostich *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2005). O CRFR1 encontra-se amplamente localizado no neocórtex, na amígdala basolateral, amígdala medial, na hipófise anterior, em núcleos hipotalâmicos, nas células cerebelares de Purkinje, na área tegumentar dorsolateral e núcleo tegmental do pedúnculo pontino, além de outras áreas

associadas em sua maioria às funções emocionais e comportamentais dos peptídeos CRF (Chalmers *et al.*, 1995; Refojo *et al.*, 2005). O CRFR2 localiza-se no septo lateral, no hipotálamo ventromedial e no núcleo cortical da amígdala, e outras áreas associadas principalmente às funções neuroendócrinas e autônomas (Chalmers *et al.*, 1995; Refojo *et al.*, 2005). Ambos os receptores são encontrados no hipocampo (Chalmers *et al.*, 1995; Refojo *et al.*, 2005).

Os efeitos dos peptídeos da família CRF sobre os estados psíquicos têm sido objeto de vários estudos. Estudos com animais submetidos a várias condições estressantes ou deficientes de receptores CRFs, tem ajudado a elucidar condições patológicas, como os transtornos psiquiátricos com origem em quadros de ansiedade, em distúrbios hormonais ou autônomos, e que estejam relacionadas a estes peptídeos (Neylan, 1998; Hauger *et al.*, 2006). Bremner *et al.*(1997) relataram altas concentrações de CRF no líquido cerebrospinal de pacientes diagnosticados com transtorno de estresse pós-traumático em comparação a indivíduos saudáveis. As concentrações de CRF no plasma também se encontram cerca de 100 a 255% mais altas em pacientes com diagnóstico de transtorno depressivo grave, quando comparados com voluntários saudáveis (Catalan *et al.*, 1998).

1.3. Vias neurais de resposta de estresse

Herman e Cullinan (1997) classificaram os estressores orgânicos em dois grupos: o estressor sistêmico, também denominado estressor físico ou somatossensorial, que se origina de desconforto físico e que envolve uma ameaça fisiológica imediata, sendo diretamente retransmitido para o NPV provavelmente via projeções catecolaminérgicas do tronco encefálico; e o estressor processivo, também denominado estressor psicogênico, que representa um estímulo que exige interpretação de níveis superiores do cérebro, como os circuitos límbicos que controlam o NPV. No presente trabalho, para a aquisição de um estado de estresse e ativação das vias neurais límbicas relacionadas ao CRF, foi utilizado o modelo de estresse por restrição, classificado como estressor processivo.

Ulrich-Lai e Herman (2009), estudando os circuitos encefálicos da resposta de estresse e que regulam o eixo HHA em resposta ao estressor psicogênico, descreveram as áreas límbicas e as áreas intermediárias que se conectam ao NPV, promovendo a elaboração final da resposta de estresse. Estas regiões límbicas, que

são responsáveis por coordenar as respostas de estresse, possuem conexões com circuitos responsáveis pela memória e pela recompensa.

A partir do hipocampo (Figura 1), mais precisamente do *subculum* ventral, tem início um neurocircuito que apresenta como resposta final um efeito inibitório sobre o eixo HHA através do NPV (usado como referencial para a análise da ação das áreas límbicas na resposta de estresse). Participam deste circuito áreas intermediárias como áreas hipotalâmicas (área pré-óptica medial, hipotálamo dorsomedial, parte posterior do núcleo paraventricular do hipotálamo), áreas do núcleo intersticial da estria terminal (partes ântero-medial e póstero-medial), área septal (parte lateral) e áreas corticais (pré-límbica e infra-límbica). A partir de núcleos da amígdala partem três vias estimulatórias sobre o eixo HHA. Uma delas tem início no núcleo central da amígdala e antes de atingir o NPV atinge vias intermediárias como o núcleo intersticial da estria terminal (parte ântero-ventral), o hipotálamo dorsomedial e o núcleo do trato solitário. A outra via parte do núcleo medial da amígdala passando por áreas intermediárias como a área pré-óptica medial do hipotálamo e o núcleo intersticial da estria terminal antes de atingir o NPV. Ainda, a terceira via tem início no núcleo basolateral da amígdala, atinge áreas intermediárias como o núcleo intersticial da estria terminal e os núcleos central e medial da amígdala, atingindo o NPV.

As áreas corticais que estão relacionadas ao controle do eixo HHA incluem: o córtex pré-límbico, cujas fibras atingem o núcleo dorsal da rafe, o núcleo paraventricular do tálamo, o núcleo paraventricular do hipotálamo (parte posterior) e a amígdala basolateral, com efeito inibitório sobre o NPV; e o córtex infra-límbico, cujas fibras atingem o núcleo intersticial da estria terminal, o núcleo do trato solitário e os núcleos central, medial e basolateral da amígdala, que exercem efeito estimulatório sobre o NPV.

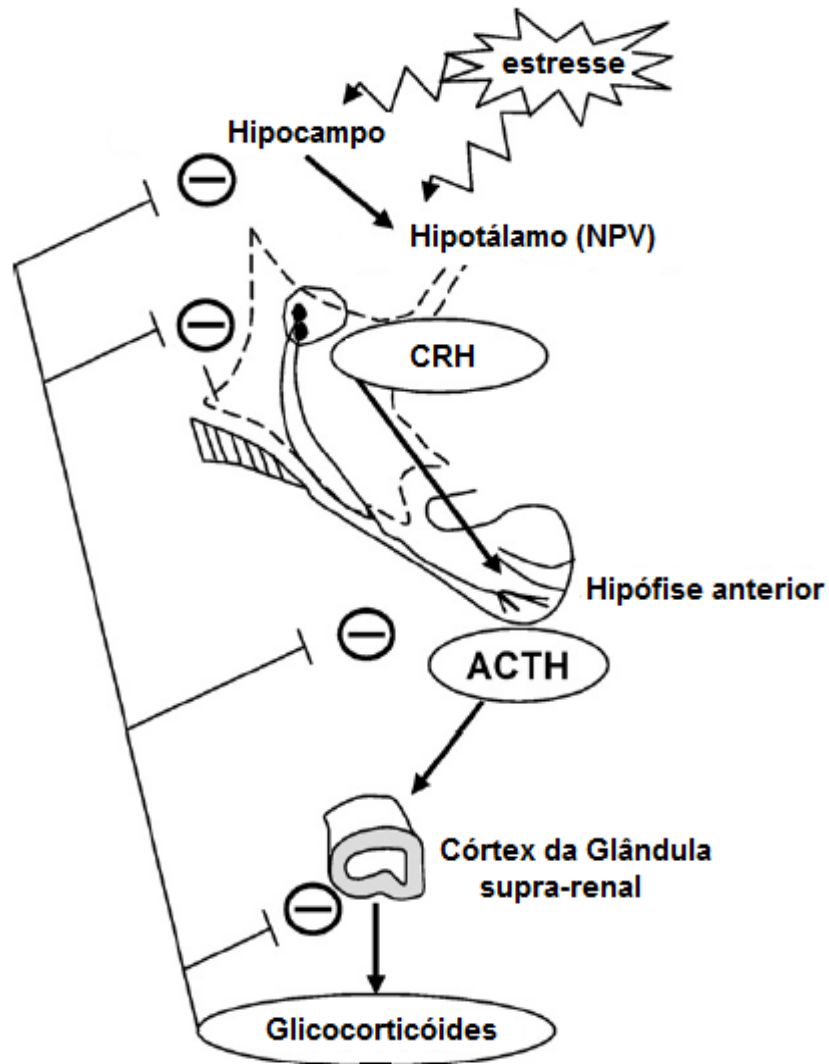


Figura 1. Regulação do eixo HHA e da liberação de glicocorticóides em resposta ao estresse sob a influência do hipocampo (Figura adaptada de LANFUMEY, *et al.*, 2008).

1.4. Ansiedade normal e patológica

A palavra ansiedade é derivada do grego *Anshein*, que significa estrangular, oprimir, sufocar (Graeff e Brandão, 1999). Trata-se de um estado de tensão ou apreensão, relacionado frequentemente à expectativa de algo que pode vir a acontecer (Bearet *al.*, 2008; Lent, 2010) e que surge acompanhado por uma série de alterações comportamentais e neurovegetativas. Estas alterações frequentemente incluem aumento da tensão motora (tremor, espasmos, dores musculares, inquietação), hiperatividade autonômica (aumento da frequência de batimentos cardíacos, sudorese, mãos frias), dificuldades de concentração, e aumento da

vigilância e atenção. Alterações hormonais, como o aumento da concentração sérica do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), dos corticóides adrenais, de prolactina e do hormônio do crescimento são também geradas em uma situação de ansiedade (Graeff e Brandão, 1999 e Kandel *et al.*, 2003).

A ansiedade faz parte do espectro normal das experiências humanas, sendo uma emoção que está relacionada ao comportamento de avaliação de risco que é evocado em situações em que o perigo é incerto, seja porque o contexto é novo ou porque o estímulo do perigo esteve presente no passado, mas não está mais no presente (Graeff, 2007). Enquanto patologia, a ansiedade pode interferir sobremaneira com o desempenho normal do indivíduo, tornando-se necessária a sua avaliação clínica e, eventualmente, a instituição de algum tratamento, que pode ser baseado em terapêutica comportamental, em terapêutica medicamentosa ou na associação de ambas (Graeff e Brandão, 1999).

A ansiedade patológica faz parte dos chamados “transtornos psiquiátricos relacionados ao estresse”, os quais representam um problema de saúde pública no século XXI (Wong e Licinio, 2004). Atualmente, estimativas sugerem que uma significativa parcela da população sofre ou sofrerá ao longo do período de um ano de algum dos transtornos de ansiedade reconhecidos, sendo a sua incidência maior na população ativa. Apesar de diferirem em termos dos estímulos que evocam a ansiedade (reais ou imaginários) e das respostas comportamentais que o indivíduo utiliza para tentar diminuí-la, esses transtornos tem, em comum, a expressão patológica do medo (Silva, 2006). Abaixo encontram-se descritos alguns dos principais transtornos de ansiedade encontrados na clínica, de acordo com o Manual de Diagnóstico e Estatística das Doenças Mentais, da Associação Norte-Americana de Psiquiatria (DSM) (DSM-IV^{TR}, 2002):

A) Transtorno do Pânico: é caracterizado por frequentes ataques de pânico, consistindo em episódios discretos com início inesperado, envolvendo intensa apreensão, medo extremo e terror, geralmente associados a sentimentos de morte iminente.

B) Agorafobia: é uma sensação de ansiedade acerca de, ou evitação de lugares ou situações de onde escapar pode ser algo difícil ou constrangedor. Esse tipo de ansiedade leva o indivíduo a evitar situações que pareçam ameaçadoras, tais como:

ficar sozinho fora de casa, em uma multidão, em um carro ou avião, em uma ponte ou em um elevador.

C) Transtorno obsessivo-compulsivo (TOC): é definido como obsessões que podem causar intensa ansiedade ou perturbação, onde o comportamento apresentado (por exemplo: criação de rituais) serve para neutralizar a ansiedade que o indivíduo apresenta.

D) Transtorno de ansiedade generalizada (TAG): é um quadro de ansiedade ou preocupação excessiva que ocorre por no mínimo seis meses, envolvendo sensações persistentes de apreensão.

E) Fobias específicas: é um tipo de ansiedade causada pela exposição a determinados objetos ou situações que o indivíduo teme, esse tipo de ansiedade frequentemente leva a um comportamento de esquiva.

F) Fobia social: é provocada pela exposição a certas situações sociais, onde é necessária a interação com outra pessoa ou alguma atividade que envolva a observação direta do indivíduo (por exemplo: falar em público) ou interação com um grupo de pessoas.

G) Transtorno de estresse pós-traumático: é desencadeado pela rememoração de um evento extremamente traumático que o indivíduo vivenciou. É acompanhado por sintomas que envolvem o aumento do estado de alerta e de hesitação dos estímulos associados ao trauma.

Os diferentes transtornos de ansiedade podem ser classificados com base nas suas características clínicas e na maneira como respondem a agentes farmacológicos, sendo com este conhecimento possível a validação de modelos animais (Zangrossi e Graeff, 1997). As classificações atualmente adotadas estão disponibilizadas em manuais de diagnósticos padronizados internacionalmente, dentre eles, o Código Internacional de Doenças (CID), atualmente em sua 10ª. Versão (CID-10), e o DSM, atualmente em sua quarta versão revisada (DSM-IV^{TR}, 2002).

No presente trabalho, foram enfatizadas apenas as descrições clínicas do transtorno de pânico (TP) e do transtorno de ansiedade generalizada (TAG), uma vez que as medidas realizadas pelo modelo animal de ansiedade que foi utilizado no presente estudo tem sido relacionadas a estes dois subtipos de ansiedade (Graeff e Zangrossi, 2002).

De acordo com o DSM- IV^{TR}, um ataque de pânico é conceituado como sendo um episódio de medo intenso ou desconforto, acompanhado por sintomas somáticos ou cognitivos. O ataque ocorre de forma súbita, inesperada, e é geralmente acompanhado por um sentimento de morte ou perigo iminente e uma necessidade de fuga da situação. Dentre alguns sintomas estão: palpitação, tremores, náuseas, tonturas, dificuldade de respiração, sensação de choque, sentimentos de falta de controle, medo de enlouquecer ou de morrer.

O diagnóstico do TP ocorre quando o paciente apresenta recorrência de ataques súbitos ou inesperados (no mínimo quatro ataques em quatro semanas), que podem ser acompanhados por mudanças significativas no comportamento e por preocupações persistentes quanto à recorrência, às implicações e às consequências de outros ataques. Este quadro clínico pode, eventualmente, levar a um comportamento de esquiva, principalmente dos locais ou situações em que possam sentir-se desprotegidos ou dos quais não possam evadir-se com facilidade, ou esquiva agorafóbica, o que pode gerar mais limitações em suas atividades triviais.

Já o TAG, é caracterizado como um quadro clínico definido por ansiedade e preocupação excessivas, ocorrendo na maioria dos dias de um período de pelo menos seis meses, a respeito de vários eventos ou atividades. O indivíduo encontra dificuldade em controlar suas preocupações. A ansiedade e preocupação devem ser acompanhadas de pelo menos três sintomas adicionais, de uma lista que inclui inquietação, fadiga, dificuldade de concentração, irritabilidade, tensão muscular e perturbações do sono. O diagnóstico deve excluir aspectos característicos de outros transtornos de ansiedade, tais como, preocupação com a possibilidade de ataques de pânico (como no TP), de encontrar-se longe de casa ou dos parentes (como na ansiedade de separação), de ganhar peso (como na anorexia nervosa), de possuir uma doença grave (como na hipocondria) e de sentir-se embaraçado frente a situações de evidência (como na fobia social). Ainda de acordo com o DSM- IV^{TR}, o indivíduo portador do TAG, nem sempre descreve suas preocupações como

excessivas, no entanto, descreve a ocorrência de estresse devido a preocupações constantes, dificuldade de controlar estas preocupações e de manter um funcionamento social e ocupacional adequados.

Os critérios operacionais do DSM- IV^{TR} visam essencialmente caracterizar os transtornos de ansiedade fundamentados em análises clínico-descritivas (Graeff, 1990), atribuindo à ansiedade humana a noção de heterogeneidade, noção esta apoiada pela hipótese da existência de mecanismos neurais distintos subjacentes aos diferentes subtipos de ansiedade. É importante ressaltar, entretanto, que existem controvérsias referentes a esta concepção, sendo que alguns autores defendem que os transtornos de ansiedade existentes difeririam apenas em termos de grau e não em termos qualitativos (Pereira, 1997; 2009).

1.5. Etologia e neuroanatomia da ansiedade

Embora a ansiedade, enquanto psicopatologia seja por definição um fenômeno de má adaptação, tipicamente humano, dentro de uma perspectiva biológica, as raízes funcionais da ansiedade encontram uma analogia nas reações de defesa que os animais exibem frente a estímulos ou situações de perigo. Esta abordagem é baseada na premissa de que importantes aspectos do comportamento humano são originários de padrões comportamentais funcionais, encontrados em outras espécies animais.

O conceito de níveis de defesa provém originalmente da análise eto-experimental do comportamento de ratos realizada pelos pesquisadores Robert e Caroline Blanchard (1987).

O primeiro nível parece ser determinado por situações potencialmente perigosas. Nestes casos, o animal com frequência exibe um comportamento exploratório cauteloso, denominado de comportamento de avaliação de risco, ou uma inibição comportamental. O animal mantém o corpo distendido, com o ventre rente ao solo, avançando e recuando a cabeça, repetidamente e, ao menor sinal de perigo, reage com uma intensidade bem maior do que reagiria em situações seguras.

Em casos onde os sinais de perigo tornam-se explícitos, a reação típica apresentada pelo animal é a de congelamento, ou seja, o animal apresenta uma inibição comportamental, permanecendo completamente imóvel – exceto por movimentos ocasionais e rápidos das vibrissas. Esta imobilidade é acompanhada por uma série de alterações neurovegetativas. Se o perigo estiver a certa distância do animal, o escape, em geral, é observado (Blanchard e Blanchard, 1987).

O último nível de defesa ocorre quando o perigo está muito próximo. Neste caso, o rato reage com posturas e vocalizações ameaçadoras. Caso a ameaça não seja suficiente para refrear o ataque do agressor, ocorre a fuga. E, por último, se a fuga for impossível, resta a luta defensiva. A Tabela 1 faz referência às diferentes estratégias básicas de defesa supracitadas. A mesma tabela enumera algumas estruturas do Sistema Nervoso Central (SNC) que tem sido implicadas nos comportamentos defensivos. Em primeiro lugar, destacam-se o sistema septo-hipocampal (S-H; McNaughton e Gray, 2000) e a amígdala. Ambos serviriam de interface entre o neocórtex e o sistema límbico subcortical. Tanto o sistema septo-hipocampal quanto a amígdala recebem densas projeções do córtex temporal polimodal, onde se verifica a síntese das informações colhidas pelos diferentes sistemas sensoriais, bem como informações sensoriais de natureza olfativa e interoceptiva diretamente. A emoção relacionada à ativação destas estruturas seria a ansiedade antecipatória ou condicionada, relacionada a processos de aprendizado e memória.

Tabela 1. Níveis de defesa, substrato neural e emoção relacionada.

Perigo	Reação de defesa	Estruturas cerebrais	Emoção
Potencial	Avaliação de risco/ Inibição comportamental	Septo-hipocampo/ Amígdala	Ansiedade
Antecipado	Congelamento	Amígdala/ Periaquedutal ventral	Ansiedade antecipatória
	Esquiva	Amígdala	Ansiedade condicionada
Distal	Escape	Hipotálamo medial	Ansiedade incondicionada
Proximal	Fuga/Ameaça defensiva/Ataque/ Congelamento	Periaquedutal dorsal	Pânico

Adaptada de Graeff e Zangrossi Jr., 2002.

Outras evidências indicam, no entanto, que as áreas cerebrais propostas por McNaughton e Gray (2000) não seriam as únicas envolvidas na geração da ansiedade. Assim, tem sido demonstrado que um conjunto de estruturas encefálicas longitudinalmente organizadas, compreendendo além de partes da amígdala (Figura 2), a substância cinzenta periaquedutal (SCP) em sua porção dorsal (SCPD), determinados núcleos hipotalâmicos, e interligado por vias nervosas ascendentes e descendentes, também se constitui em substrato neural da ansiedade (Graeff, 1990; Graeff *et al.*, 1993). Este circuito coordenaria diferentes estratégias de defesa, como a imobilidade tensa ou congelamento e os comportamentos de luta e de fuga. Por

isso, essas regiões foram denominadas áreas encefálicas de defesa. Sua ativação também evoca sensações extremamente desagradáveis (medo intenso, dor não localizada) no homem. Além disso, animais de laboratório aprendem rapidamente a desligar a estimulação elétrica do hipotálamo e da SCPD. Por este motivo, Graeff (1990) tem designado este circuito neural de sistema encefálico aversivo ou sistema cerebral aversivo. As emoções relacionadas à ativação destas áreas, de acordo com a Tabela 1, seriam o pânico e a ansiedade incondicionada (Graeff e Zangrossi Jr., 2002).

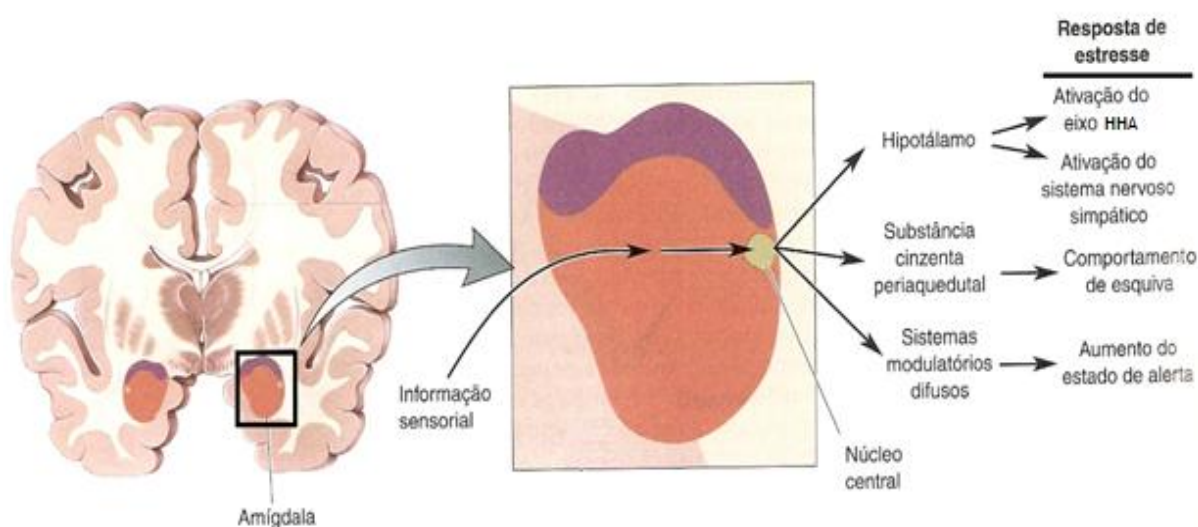


Figura 2. Controle da resposta de estresse pela amígdala (Figura adaptada de BEAR *et al.*, 2008).

1.6. Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) e transtornos de ansiedade

A amígdala e o hipocampo regulam o eixo HHA e a resposta de estresse de forma coordenada. Do hipocampo (*subculum*) parte um neurocircuito que apresenta como resposta final um efeito inibitório sobre o eixo HHA através do NPV (Ulrich-Lai e Herman, 2009). Por outro lado, a partir de diferentes núcleos da amígdala (central, medial e basolateral) partem três vias que exercem ação estimulatória sobre o eixo HHA (Ulrich-Lai e Herman, 2009). É possível, assim, afirmar que de maneira geral o hipocampo inibe, enquanto a amígdala ativa o eixo HHA.

Com relação à ansiedade, sabe-se que tanto o eixo HHA quanto o eixo simpático adrenal são ativados pela ansiedade antecipatória (Mason, 1975). A secreção de glicocorticóides acompanha a ansiedade aguda e é adaptativa para a execução de respostas comportamentais de defesa (Schulkin *et al.*, 2005). Por outro

lado, há evidências de que altas concentrações de glicocorticóides, por períodos prolongados, estejam relacionadas a quadros de depressão e à ansiedade patológica (Gold e Chrousos, 2002). Tendo em vista que o hipocampo e a amígdala regulam o funcionamento do eixo HHA é possível sugerir a hipótese de que transtornos relacionados ao estresse sejam decorrentes ou de uma hiperatividade da amígdala ou a uma diminuição da atividade hipocampal (Figura 3).

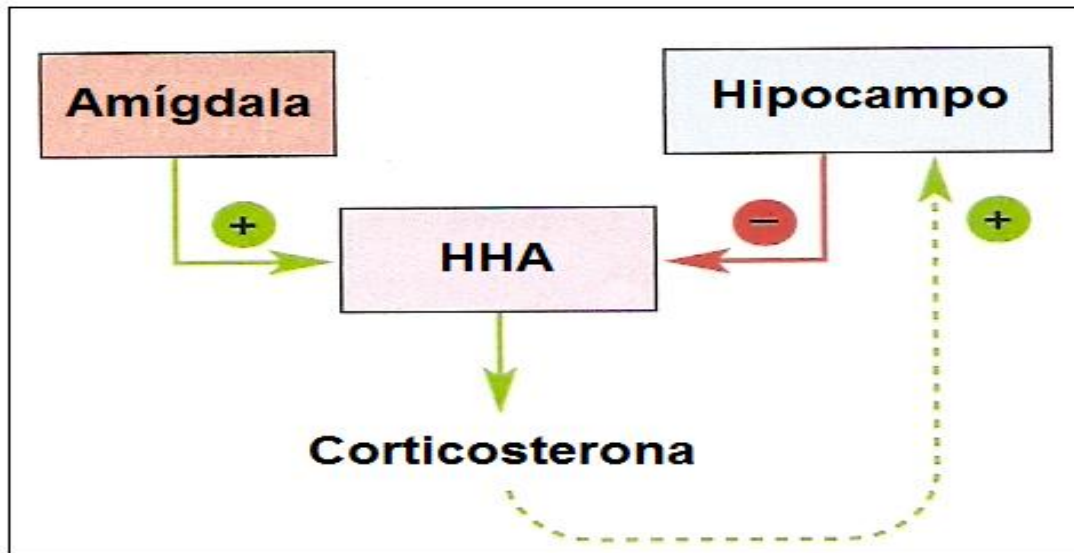


Figura 3. Regulação coordenada do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal pelo hipocampo e pela amígdala (Figura adaptada de BEAR, *et al.*, 2008).

De fato, tem sido observado que a exposição de forma contínua a glicocorticóides, como aquela que ocorre durante os períodos de estresse crônico acarreta disfunção e morte de neurônios hipocampais (Ruiz *et al.*, 2007). Uma variedade de eventos estressores, como contenção (Watanabe *et al.*, 1992), conflito psicossocial (Magarinos *et al.*, 1996), exposição a um predador, dentre outros, pode dar origem a uma atrofia dos neurônios hipocampais da área CA3 e em outras sub-regiões hipocampais, quando o estresse crônico é prolongado por cerca de 3 a 4 semanas (Sousa *et al.*, 2000). Além disso, quando a atrofia dendrítica encontra-se presente em neurônios hipocampais, déficits de memória são observados (Conrad *et al.*, 1996).

A exposição a eventos estressores também parece acarretar diminuição na neurogênese no giro denteado da formação hipocampal de adultos (Gould *et*

al.,1998). Ademais, a administração crônica de glicocorticóides em animais de laboratório leva ao aumento das cavidades ventriculares e à diminuição no volume hipocampal (Sapolsky, 2001), à semelhança do que tem sido observado em pacientes diagnosticados com transtornos de ansiedade ou depressão (Lindauer *et al.*, 2006). Assim, a degeneração do hipocampo parece criar um círculo vicioso, no qual a resposta de estresse se torna mais pronunciada, levando a uma maior liberação de cortisol e conseqüentemente maior dano ao hipocampo (Belanoff *et al.*, 2001). Disto resultariam os transtornos relacionados ao estresse mencionados acima. É interessante observar que depressão e ansiedade são frequentemente acompanhados por redução de habilidades cognitivas (Belanoff *et al.*, 2001; Galderisi *et al.*, 2008), redução esta que também tem sido observada após a administração crônica de glicocorticóides (Lupien *et al.*, 1994). Também tem sido demonstrado que o tratamento crônico com drogas antidepressivas, utilizadas na clínica tanto para o tratamento da depressão quanto de diferentes subtipos de ansiedade (Nutt e George, 1990), aumenta a neurogênese hipocampal em animais de laboratório (Murray *et al.*, 2008), revertendo, portanto os efeitos acarretados pelo estresse crônico ou pela administração crônica de corticosterona, exibindo assim uma ação protetora e reversiva dos danos causados ao hipocampo pelos glicocorticóides, em especial na região do giro denteado (Sairanen *et al.*, 2005).

No que diz respeito a subtipos específicos de ansiedade patológica encontrados na clínica, a hipótese adotada sugere que os mesmos processos neurobiológicos que regulam a ansiedade antecipatória encontram-se envolvidos com o TAG (Deakin e Graeff, 1991; Graeff, 2007): ambos envolveriam respostas comportamentais de defesa a perigos distais ou apenas potenciais, a ativação das mesmas estruturas encefálicas (como a amígdala e o sistema septo-hipocampal) e seriam acompanhados tanto por uma ativação do eixo HHA quanto do eixo simpático-adrenal (Mason, 1975). Por outro lado, o TP seria acompanhado pelos mesmos mecanismos que regulam a defesa contra a ameaça proximal (Graeff, 2007): ativação, em particular, do sistema hipotalâmico medial e da substância cinzenta periaquedutal, e do eixo simpático adrenal, não havendo, aparentemente neste caso, ativação do eixo HHA. Esta observação é relevante, pois fortalece a hipótese de que esses dois quadros clínicos, TAG e TP, diferem não apenas em termos quantitativos, mas qualitativamente. Pois, tendo em vista que sofrer um

ataque de pânico é uma experiência devastadora, possivelmente mais estressante que o TAG, era de se esperar que o eixo HHA fosse ativado em maior proporção do que na ansiedade, se ambos os quadros clínicos diferissem apenas em termos de grau. Todavia resultados sugerem que ataques de pânico espontâneos, assim como os induzidos por agentes psicogênicos seletivos (tais como lactato e dióxido de carbono), não ativam o eixo HHA (Graeff *et al.*, 2005). O mesmo tem sido observado em pacientes adultos com TP. Na verdade, pacientes com TP parecem responder de forma reduzida a estressores leves (Battaglia *et al.*, 1997; Stones *et al.*, 1999). Tem sido sugerida, assim, a ocorrência de uma sub-sensibilização do eixo HHA, ou de um desacoplamento do eixo HHA do sistema noradrenérgico no caso do TP (Battaglia *et al.*, 1997; Stones *et al.*, 1999). Assim sendo, o ataque de pânico poderia envolver uma resposta de emergência, na qual haveria liberação adrenérgica e noradrenérgica, mas não tendo tempo suficiente para a ativação do eixo HHA (Graeff, 2007).

Ensaio clínico realizado com o teste de ansiedade experimental com simulação do falar em público (SFP) corroboram a hipótese descrita acima. Em um estudo específico, dados de cortisol salivar e de medidas de ansiedade obtidas pela Escala Visual Analógica do Humor (EVAH) mostraram que a SFP parece não ativar o eixo HHA, da mesma forma que os ataques de pânico não ativam o eixo HHA, ao contrário da ansiedade antecipatória e de quadros de TAG, que envolvem aprendizado (Garcia-Leal *et al.*, 2005). Assim, além das diferenças na sintomatologia e na resposta farmacológica, ter-se-ia, portanto aqui, mais uma diferença neurobiológica entre estes dois transtornos, TP e TAG: os dois quadros afetariam de maneira distinta hormônios do estresse. Enquanto a ansiedade generalizada ativaria tanto o eixo HHA quanto o sistema simpático adrenal, o pânico, por ser uma resposta emergencial, causaria acentuada ativação simpática, alterando pouco o eixo HHA.

1.7. Modelos experimentais de ansiedade: O labirinto em T elevado (LTE)

Modelos animais são muito utilizados na tentativa de se reproduzir, em laboratório, determinados aspectos da ansiedade. As primeiras investigações sobre o tema ansiedade utilizavam os modelos de resposta emocional condicionada ou modelo de supressão condicionada, proposto por Estes e Skinner (Graeff e

Guimarães, 2005), que consiste na apresentação de um estímulo aversivo, no caso choque elétrico, quando o animal emite o comportamento de pressionar a barra concomitante à apresentação de alimento. Entretanto, este modelo apresentou problemas com sua validação farmacológica, uma vez que drogas não-ansiolíticas foram capazes de reverter a supressão condicionada. Posteriormente, outros modelos foram desenvolvidos, como o modelo de conflito de Geller e Blum (1970). A ausência de resposta destes modelos a ansiolíticos não-benzodiazepínicos, somada à interferência de aspectos motivacionais, como privação de água e alimento, às medidas de ansiedade, levaram ao desenvolvimento de modelos etologicamente fundamentados, como o labirinto em cruz elevado (LCE).

O LCE (Handley e Mithani, 1985; Pelow *et al.*, 1985) é um modelo animal de ansiedade que se baseia no medo natural que ratos apresentam a espaços elevados e abertos. Este modelo consiste de um aparato feito de madeira, constituído por dois braços abertos unidos perpendicularmente a dois braços fechados, todo o conjunto elevado a 50 cm do chão. Embora tenha sido amplamente utilizado nos últimos anos, por apresentar vantagens como fácil manuseio e o não envolvimento de outros processos psicobiológicos como a dor ou privação de água ou alimentos, o LCE parece não detectar consistentemente o efeito de drogas não benzodiazepínicas (BZDs) (Handley e McBlane, 1993; Graeff e Zangrossi Jr, 2002). Esta inconsistência tem sido atribuída ao fato do LCE ser um modelo misto, isto é, não distinguir entre os diferentes subtipos de ansiedade existentes na clínica.

De fato, um comportamento definido operacionalmente como ansiedade em um determinado modelo animal pode diferir daquele gerado por outros modelos (ou mesmo de outros comportamentos gerados pelo mesmo modelo), no que se refere à resposta às drogas, manipulações ambientais e substratos neurais correspondentes (File, 1995; Graeff e Zangrossi Jr, 2002). Considerando o fato da ansiedade não ser um fenômeno unitário, podendo ser subdividida em diferentes subtipos específicos que respondem diferentemente ao tratamento farmacológico, o modelo do labirinto em T elevado (LTE) foi desenvolvido (Graeff, *et al.*, 1993; Viana, *et al.*, 1994). Este modelo objetiva primordialmente promover, em um mesmo animal, dois tipos de respostas comportamentais de defesa: uma relacionada à inibição comportamental (esquiva inibitória) e uma relacionada à emissão de uma resposta motora (fuga do braço aberto do modelo). Em termos clínicos, tem sido proposto que essas duas

respostas estão relacionadas, respectivamente, a dois subtipos de ansiedade: o TAG e o TP (Graeff e Zangrossi Jr., 2002).

A validação inicial do modelo do LTE mostrou que compostos de três classes de ansiolíticos - o agonista de receptores BZDs diazepam, o agonista 5-HT_{1A} buspirona, e o antagonista não seletivo de receptores 5-HT₂ ritanserina, diminuem as latências de esquia inibitória, sem alterarem as medidas de fuga do braço aberto do modelo (Graeff *et al.*, 1998). Evidências clínicas mostram que o TAG é sensível a estas classes de ansiolíticos (Nutt e George, 1990), o que corrobora o pressuposto de que a esquia inibitória dos braços abertos do LTE esteja relacionada ao TAG. Por outro lado, a administração crônica de compostos antidepressivos eficazes para o TP, como a imipramina e fluoxetina, apresentou efeito panicolítico sobre a tarefa de fuga do modelo (Teixeira *et al.*, 2000; Poltronieri *et al.*, 2003).

Além da validação farmacológica, foi também demonstrado que as diferentes tarefas do modelo do LTE ativam estruturas distintas (Silveira *et al.*, 2001). Utilizou-se para isto análise da imunorreatividade à proteína *fos* (*fos-ir*). Entretanto, este estudo original foi conduzido sem a inclusão do procedimento de pré-exposição. Mais recentemente o procedimento de pré-exposição por 30 minutos a um dos braços abertos do LTE, um dia antes dos testes com o modelo, tem sido adotado com o objetivo de potencializar a fuga do LTE, diminuindo as respostas à novidade (Sena *et al.*, 2003).

1.8. Estresse e ansiedade

Modelos animais tem sido largamente utilizados para estudar as consequências do estresse sobre o comportamento. No entanto, resultados de diversos estudos tem mostrado que as consequências que o estresse pode ter sobre respostas comportamentais de defesa relacionadas à ansiedade são conflitantes. Por exemplo, evidências prévias mostram que o estresse agudo por restrição aumenta a ansiedade em três diferentes modelos comportamentais de ansiedade: o modelo do labirinto em cruz elevado, a retirada defensiva e a caixa de transição claro-escuro (Smagin *et al.*, 1996; MacNeil *et al.*, 1997; Harris *et al.*, 2001; Morilak *et al.*, 2003). Estes modelos comportamentais são baseados em respostas

desencadeadas frente a uma situação de conflito e/ou comportamento de esquiva-aproximação. Ou seja, se baseiam no medo natural que o animal tem de espaços abertos ou locais iluminados, e na tendência de exploração de novos ambientes (Archer, 1975; Pellow *et al.*, 1985; Crawley, 1985). Por outro lado, a exposição prévia ao estresse brando não altera o comportamento dos animais no modelo do ocultamento defensivo (Broekkamp *et al.*, 1986), que mede a aversão à introdução de um objeto invasivo na gaiola do animal (Chotiawat e Harris, 2006).

Mais recentemente, um estudo (de Paula Soares *et al.*, 2001) realizado no modelo do labirinto em T elevado (Viana *et al.*, 1994; Zangrossi e Graeff, 1997; Teixeira *et al.*, 2000; Poltronieri *et al.*, 2003), um modelo que permite a avaliação de duas respostas comportamentais de defesa distintas no mesmo rato – esquiva e fuga -, mostrou que a restrição (de maneira semelhante ao choque escapável e ao nado forçado) facilitou a resposta de esquiva, mantendo inalteradas as respostas de fuga. Este último foi apenas prejudicado pela exposição prévia a choques inescapáveis nas patas.

Uma possível explicação para estes resultados discrepantes pode encontrar-se não apenas na magnitude do estressor utilizado, mas no tipo de comportamento ansioso avaliado. Como previamente mencionado (Graeff e Zangrossi, 2002), diferentes respostas comportamentais de defesa medidas pelos modelos animais podem diferir não apenas na forma como respondem ao tratamento farmacológico e a manipulações ambientais, mas também com base nos substratos neurais que ativam. Com relação a este último ponto, é importante mencionar que os mecanismos neuronais responsáveis pelas diferentes consequências do estresse em modelos animais de ansiedade ainda necessitam ser investigados (Shin e Liberzon, 2010).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Levando em consideração as evidências expostas anteriormente, o objetivo geral do presente trabalho foi investigar as respostas comportamentais e mapear, através da análise de imunorreatividade à proteína *fos* (*fos-ir*), áreas ativadas pela exposição de ratos Wistar machos não estressados e submetidos ao estresse agudo por restrição e às tarefas de esquiva e fuga do LTE. Para os testes com o LTE, utilizou-se a inclusão do procedimento de pré-exposição.

2.2. Objetivos específicos

Diante dos objetivos gerais descritos, tem-se como objetivos específicos:

- Analisar as respostas comportamentais de defesa de ratos não estressados, submetidos ao procedimento de pré-exposição, e testados nas tarefas de esquiva e fuga do LTE;
- Analisar as respostas comportamentais de defesa de ratos estressados e testados nas tarefas de esquiva e fuga do LTE;
- Mapear em animais não estressados, através da análise de *fos-ir*, áreas relacionadas ao comportamento de esquiva e fuga do LTE, com a introdução do procedimento de pré-exposição;
- Mapear em animais estressados, através da análise de *fos-ir*, áreas relacionadas ao comportamento de esquiva e fuga do LTE;
- Analisar, através da dosagem de corticosterona sérica, a resposta neuroendócrina de estresse diante do estímulo agudo de restrição adotado;

3. MATERIAIS E MÉTODO

3.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar, machos, pesando entre 250 g – 300 g, provenientes do Centro de desenvolvimento de modelos experimentais para medicina e biologia (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Após sua chegada ao laboratório, os animais foram agrupados em caixas de polipropileno de 32 cm x 40 cm e grade de aço inoxidável, quatro animais por caixa. Cada grupo experimental foi composto por oito animais.

Os animais foram mantidos em condições ambientais controladas: ciclo claro/escuro de 12/12 h (com o período claro das 7:00 h às 19:00 h) e temperatura de $22^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Todos tiveram livre acesso à água e ração para roedores (Nuvilab®). Os protocolos experimentais desenvolvidos encontram-se de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e obtiverem aprovação do Comitê de ética em pesquisa (CEP) da Universidade Federal de São Paulo (Parecer do CEP nº. 1338/2011).

3.2. Aparelhos experimentais

3.2.1. Labirinto em T elevado (braços abertos)

O LTE é um aparelho confeccionado em madeira, com três braços de iguais dimensões (50 x 12 cm). Um braço fechado, por paredes com 40 cm de altura, localiza-se perpendicularmente aos braços abertos opostos, os quais são circundados por acrílico transparente de 1 cm de altura, para evitar a queda dos animais. Todo o aparelho encontra-se elevado a 50 cm do solo (Figura 4).

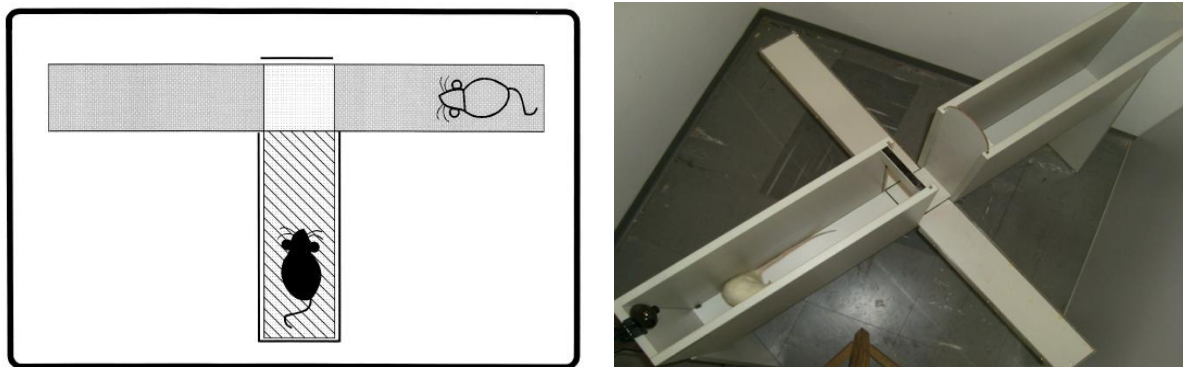


Figura 4. Labirinto em T elevado. A porção hachurada representa o braço fechado do modelo.

3.2.2. Labirinto em T fechado

O labirinto em T fechado é um aparelho confeccionado em madeira, com três braços fechados por paredes e que possuem iguais dimensões (50 x 12 cm). Todo o aparelho encontra-se elevado a 50 cm do solo (Figura 5). Este equipamento foi utilizado como controle da atividade exploratória dos animais e respostas à novidade.

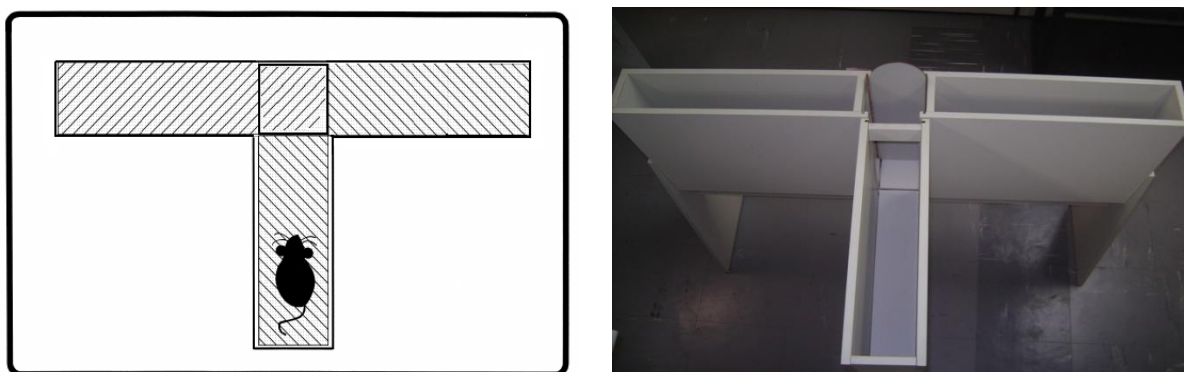


Figura 5. Labirinto em T fechado.

3.3. Procedimentos

Os testes comportamentais foram realizados em ambiente com temperatura semelhante ao ambiente da guarda de animais, iluminação controlada (60 Lux) e ruído de fundo providenciado por um exaustor, para evitar interferências sonoras externas. Todos os procedimentos foram realizados no período da manhã (8:00 h às

12:00 h), pois esse horário é o mais adequado para se conseguir concentrações mais baixas do hormônio CCT (Muñoz-Abellán *et al.*, 2009).

3.3.1. Procedimento de pré-exposição

Foram formados 5 grupos experimentais: labirinto fechado, não estresse-esquiva, não estresse-fuga, estresse-esquiva, estresse-fuga. No dia anterior à realização dos testes comportamentais, os animais foram expostos a um dos braços abertos do LTE, por 30 minutos cada um individualmente. Tem sido observado (Sena *et al.*, 2003) que a pré-exposição diminui as latências de fuga no dia do teste, tornando essas medidas mais suscetíveis aos efeitos dos tratamentos comportamentais ou farmacológicos.

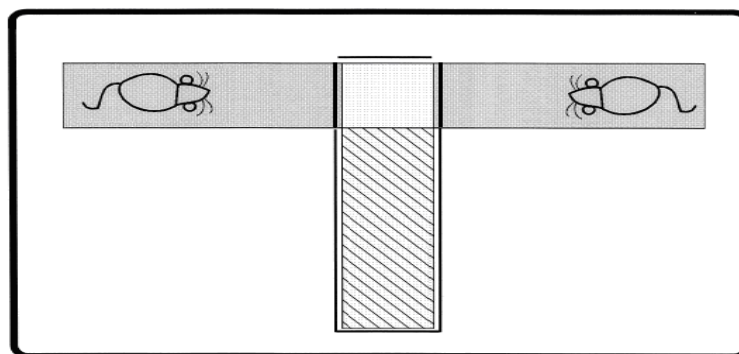


Figura 6. Animais sendo pré-expostos ao labirinto em T elevado. Neste procedimento, o acesso ao centro e ao braço fechado é obstruído, sendo possível que dois animais sejam pré-expostos ao mesmo tempo.

3.3.2. Procedimentos para as medidas no labirinto em T fechado e esquiva e fuga no LTE

Os animais submetidos ao labirinto em T fechado foram colocados na extremidade distal do braço transversal do labirinto, com a cabeça voltada para o centro do aparelho. Cronometrava-se, então, a latência de saída, com as quatro patas, do braço fechado em direção ao centro ou aos outros braços fechados (Latência₁). Imediatamente após sua saída, o animal era retirado do labirinto e colocado em uma caixa, por 30 segundos. Em seguida, a mesma medida era

tomada por mais duas vezes consecutivas (Latências 2 e 3), com intervalo de 30 segundos entre elas.

Animais testados na tarefa de esquivar eram colocados na extremidade distal do braço fechado do LTE, com a cabeça voltada para o centro do aparelho. Cronometrava-se, então, a latência de saída, com as quatro patas, do braço fechado em direção ao braço aberto (latência basal). A mesma medida era tomada por mais duas vezes consecutivas (latências de Esquiva inibitória 1 e 2), com intervalo de 30 segundos entre elas.

Para as medidas de fuga, o animal era colocado na extremidade do braço aberto e cronometrava-se o tempo de saída deste braço com as quatro patas (Fuga 1). Esse procedimento também era repetido por mais duas vezes consecutivas, com intervalos de 30 segundos entre elas, para a aquisição das medidas de Fuga 2 e Fuga 3.

Para todos os grupos, o tempo máximo do animal em cada uma das medidas foi de 300 segundos.

3.3.3. Procedimento de estresse agudo

Os grupos estresse-esquiva e estresse-fuga passavam pelo procedimento de restrição por 30 minutos, 30 minutos antes da exposição às tarefas de esquiva e fuga do LTE. Os animais eram imobilizados em um tubo de acrílico transparente com dimensões internas de 210 mm x 55 mm, e ventilação na extremidade cranial e na região dorsal. O tubo possuía na extremidade caudal uma região removível utilizada para a colocação e retirada do animal (Figura 7).



Figura 7. Tubo de acrílico utilizado para o procedimento de restrição (Adaptada de Padovan e Guimarães, 2000).

3.4. Procedimentos histológicos

Após a realização dos testes comportamentais, os animais receberam overdose de anestésico e foram perfundidos intracardiacamente para retirada dos encéfalos para posterior análise de imunorreatividade à proteína *fos*.

3.4.1. Perfusão e microtomia

Os animais foram sacrificados entre 90 e 120 minutos após os testes comportamentais, tendo em vista que a imunorreatividade à proteína *fos* em resposta a qualquer estímulo, atinge seu pico máximo de resposta entre 20 a 120 minutos após o estímulo estressor (Bullitt, 1990; Imaki, *et al.*, 1994; Titze-de-Almeida, *et al.*, 1994; Cole e Sawchenko, 2002).

Os animais foram anestesiados profundamente por meio de uma injeção intraperitoneal de 1 ml/Kg de cetamina/xilasina 3:1 (cloridrato de cetamina a 10% e cloridrato de xilasina a 2% - Syntec do Brasil Ltda – Fabricante: Rhobifarma indústria farmacêutica Ltda, Hortolândia – São Paulo - Brasil). A perfusão dos animais foi realizada com o auxílio de bomba peristáltica, onde uma cânula foi inserida no ápice do coração (ventrículo esquerdo) e o átrio direito foi perfurado. A perfusão foi iniciada com 100 ml de solução salina a 0,9% por 1 minuto, seguida da solução fixadora de paraformaldeído 4% em água (pH 9,5 a 4°C) por cerca de 25 minutos.

Os encéfalos foram retirados e pós-fixados durante 1 h no mesmo fixador a 4°C, e colocados em solução de sacarose a 20 % em tampão fosfato de sódio (PBS) pH 7,4, durante 24 h. Os encéfalos foram seccionados em cortes frontais de 30 µm em criostato (5 séries de cada encéfalo), colocados em solução anti-congelante na concentração de 30% (sacarose, diluída em uma solução de PBS, etilenoglicol e água destilada) e mantidos em *freezer* a -20°C até serem utilizados na reação de imunistoquímica para proteína *fos*.

3.4.2. Imunoistoquímica para proteína *fos*

O método de identificação da proteína *fos* foi realizado com o objetivo de avaliar a atividade neuronal nas regiões encefálicas envolvidas com as respostas comportamentais de defesa investigadas. Os neurônios respondem a estímulos extracelulares através da expressão de certos genes de resposta imediata. Por exemplo, a transcrição da proteína *fos* a partir do gene *c-fos*, está entre as primeiras proteínas a aparecerem. O rápido acúmulo desta proteína, combinado com métodos imunistoquímicos, pode oferecer a possibilidade de detecção do nível de atividade neuronal. Sendo assim, a análise da imunorreatividade à proteína *fos* foi utilizada neste estudo como um marcador da atividade neuronal em áreas envolvidas na resposta a estímulos estressores (Bullitt, 1990; Titze-de-Almeida *et al.*, 1994). Para o desenvolvimento da técnica, as secções foram retiradas da solução anti-congelante, lavadas em solução tampão de fosfato de potássio (KPBS) e para a neutralização da peroxidase endógena, lavadas por 15 minutos em solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 0,3% em uma mistura de KPBS e Triton X-100 na proporção de 0,003%. Após serem lavadas em KPBS, foram pré-incubadas por 60 minutos em uma solução de soro normal de cabra a 2% (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos) e Triton X-100 diluídos em KPBS. Em seguida, as séries foram incubadas em anticorpo primário anti-*fos* produzido em coelho (EMD Chemicals, San Diego, Califórnia, Estados Unidos), diluído em KPBS e Triton X-100 em uma concentração de 1:20.000, sob agitação constante, a 4°C, durante 48 h. Foram então retiradas da solução do anticorpo primário e lavadas em KPBS à temperatura ambiente. A detecção do anticorpo primário foi obtida pelo método da imunoperoxidase indireta usando o complexo avidina-biotina (Vectastain – Kit ABC, Vector laboratories, Burlingame, Califórnia, Estados Unidos) (Hsu e Raine, 1981), sendo as secções

colocadas em solução de anticorpo secundário biotilado (imunoglobulinas G conjugadas à biotina) anti-coelho produzido em cabra (Vector laboratories, Burlingame, Califórnia, Estados Unidos) a uma concentração de 1:1000, diluído em uma mistura de KPBS e Triton X-100, sob agitação constante à temperatura ambiente por 60 minutos. Após serem lavadas em KPBS, foram mergulhadas em uma solução de avidina e em uma solução de biotina peroxidase (Vectastain – Kit ABC, Vector laboratories, Burlingame, Califórnia, Estados Unidos), alternadamente, diluídas em KPBS a uma concentração de 1:500 em temperatura ambiente por 60 minutos. Após serem lavadas em KPBS, a reação imunoistoquímica foi revelada utilizando-se a 3,3'diaminobenzidina tetrahidrocloro (DAB 0,05%, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos) e H₂O₂ (0,01% - Synth, Diadema, São Paulo, Brasil) durante 10 minutos. Após o término das reações e devidas lavagens, os cortes histológicos foram montados em lâminas gelatinizadas e posteriormente corados pelo método de Nissl.

3.4.3. Coloração pelo método de Nissl e análise microscópica

Para a coloração, os cortes foram montados em lâminas histológicas gelatinizadas e o corante utilizado foi tionina 0,25% (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos) para evidenciar a citoarquitetura do tecido nervoso e a identificação de núcleos e/ou tratos. O procedimento para coloração foi feito por meio de série etanólica decrescente, imersão no corante tionina por 30 segundos e posterior passagem em série etanólica crescente. Por fim, a cobertura dos cortes histológicos foi feita por lamínulas usando o meio de montagem DPX (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos).

3.4.4. Contagem de células imunorreativas

Os resultados foram analisados em microscópio Axio Observer D1- Zeiss (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha). A nomenclatura e a identificação das estruturas encefálicas pesquisadas no estudo foram baseadas no atlas de coordenadas estereotáxicas de Paxinos e Watson (2009) e foi utilizada como referência a coordenada ântero-posterior: Bregma + 1,68 (córtex frontal), + 0,96 (septo dorsolateral, septo latero-intermediário e septo ventromedial), - 1,80 (hipotálamo

anterior), - 2,28 (hipocampo), - 2,92 (amígdala basolateral, amígdala basomedial, amígdala lateral e amígdala medial), - 3,12 (hipotálamo dorsomedial e hipotálamo ventromedial), - 7,56 (núcleo dorsal da rafe e núcleo mediano da rafe), - 7,68 (substância cinzenta periaquedutal dorsolateral, substância cinzenta periaquedutal dorsomedial, substância cinzenta periaquedutal lateral e substância cinzenta periaquedutal ventrolateral), - 9,72 (*locus ceruleus*). As fotos das regiões encefálicas de interesse foram obtidas e posteriormente a quantificação do número de células imunorreativas para a proteína *fos* em campo claro foi realizada através do software de contagem Image Pro-Plus 6.0 (Media Cybernetics, Inc., Silver Spring, Maryland, Estados Unidos). Através deste software, as imagens de cada agrupamento neuronal foram submetidas à contagem do número de neurônios marcados (cada ponto contado e visualizado na imagem corresponde a um neurônio – método semiquantitativo), sendo padronizado um espectro de variação na cor da marcação, a partir de uma área com tamanho e formato criado visualmente pelo operador de acordo com o formato da estrutura a ser analisada. O software tem o recurso de salvar a área criada para que todos os animais sejam submetidos à contagem bidimensional por uma área padronizada para cada estrutura. Foi utilizado o número de 5 a 6 animais por grupo.

3.4.5. Procedimento para a realização das dosagens de corticosterona (CCT)

Dois grupos independentes de animais, controle (animais que não passaram pelo procedimento de restrição) e grupo estresse (animais que passaram pelo estresse por restrição por 30 minutos), foram submetidos ao procedimento de dosagem de CCT. Todos os procedimentos foram realizados no mesmo horário para ambos os grupos (8:00 h às 12:00 h). Os animais controle foram mantidos por 30 minutos na mesma sala experimental onde o procedimento de estresse foi realizado nos animais pertencentes ao grupo estresse. Imediatamente após esse período, os animais estressados que passaram pela restrição por 30 minutos e os animais controle foram decapitados e amostras de sangue foram coletadas em tubos com EDTA e centrifugadas a 2800 rpm por 20 minutos a 4°C. As alíquotas do soro obtidas após centrifugação foram congeladas imediatamente e permaneceram congeladas a -20°C até o momento das análises. Para a dosagem da concentração

de CCT foi utilizado o *Corticosterone Enzyme Immunoassay Kit* (Assay Designs, Piscataway, New Jersey, Estados unidos). As concentrações de CCT foram analisadas segundo protocolo descrito por Chu *et al.* (2007). Este experimento foi utilizado como controle para investigar se o estresse por restrição ativa o eixo HHA, conforme descrito na literatura (Sterrenburget *al.*,2012).

3.5. Análise estatística

As latências de saída do T fechado ou do braço fechado/aberto do LTE foram submetidas à análise de variância de duas vias (ANOVA) para medidas repetidas, tendo a tarefa (se T fechado, esquiva ou fuga do LTE) como fator independente e as tentativas (latência de saída 1, 2 e 3) como fator dependente. Para analisar o efeito das repetições em cada grupo experimental foi utilizada ANOVA de uma via para medidas repetidas, seguida do teste *post-hoc* de Duncan, quando indicado. O teste t de Student para medidas independentes foi utilizado para realizar a comparação das latências de saída entre animais estressados e não estressados. Para verificar os efeitos do estresse sobre a imunorreatividade à proteína fos foi utilizada ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Duncan ou teste t de Student para medidas independentes. Para a dosagem da concentração sérica de CCT foi utilizado o teste t de Student para medidas independentes. Valores de $P \leq 0,05$ foram considerados significativos.

4. RESULTADOS

4.1. Testes comportamentais

A Figura 8 (painel esquerdo) mostra o comportamento dos ratos não estressados e submetidos ao labirinto em T fechado e tarefas de esquiva e fuga do LTE. A ANOVA de duas vias mostrou um efeito significativo das tentativas [$F(2,44) = 15,80$; $P < 0,001$], tarefas [$F(2,22) = 28,63$; $P < 0,001$] e da interação tentativas *versus* tarefas [$F(2,22) = 28,63$; $P < 0,001$]. A ANOVA de uma via para medidas repetidas mostrou que as latências para sair do braço fechado do LTE (esquiva) aumentaram no decorrer das tentativas [$F(2,16) = 20,56$; $P < 0,001$], o tempo de latência da última tentativa sendo significativamente maior do que o tempo de latência da primeira tentativa (Duncan, $P = 0,001$). Por outro lado, a latência dos animais para sair do braço aberto do LTE (fuga) diminuiu no decorrer das tentativas [$F(2,24) = 9,04$, $P = 0,001$], a segunda (Duncan, $P = 0,008$) e a terceira tentativa (Duncan, $P = 0,003$) sendo significativamente menores do que a primeira. Não houve diferença significativa entre as 3 latências de saída do labirinto em T fechado.

No painel direito da Figura 8 encontra-se ilustrado o comportamento no LTE dos animais estressados. A ANOVA de duas vias mostrou um efeito significativo das tentativas [$F(2,28) = 30,23$; $P < 0,001$], tarefas [$F(1,14) = 46,68$; $P < 0,001$] e interação tentativas *versus* tarefas [$F(2,28) = 32,64$; $P < 0,001$]. A ANOVA de uma via para medidas repetidas mostrou que as latências de saída do braço fechado do LTE aumentaram ao longo das tentativas [$F(2,14) = 31,45$; $P < 0,001$], as latências na segunda e na terceira tentativa sendo significativamente maiores do que na primeira tentativa ($P = 0,001$). Por outro lado, as latências de fuga diminuíram ao longo das tentativas [$F(2,14) = 5,14$, $P = 0,021$], a latência da última tentativa ($P = 0,007$) sendo significativamente menor do que a da primeira.

Além disso, o teste t de Student para medidas independentes mostrou que quando o grupo de ratos controle é comparado com o grupo de ratos submetidos a estresse, eles apresentam maior tempo de latência na tarefa de esquiva 1 [$t(8,44) = -3,07$; $p = 0,014$], embora não haja diferença significativa entre os grupos na latência

basal [$t(14,23) = 0,55$; $p = 0,587$] ou na tarefa de esquiva 2 [$t(13,08) = -1,36$; $p = 0,209$]. Igualmente o comportamento de fuga não foi alterado pelo estresse (fuga 1: [$t(12,33) = 0,29$; $p = 0,776$]; fuga 2: [$t(13,19) = -1,09$; $p = 0,292$]; fuga 3: [$t(13,88) = -0,17$; $p = 0,866$]).

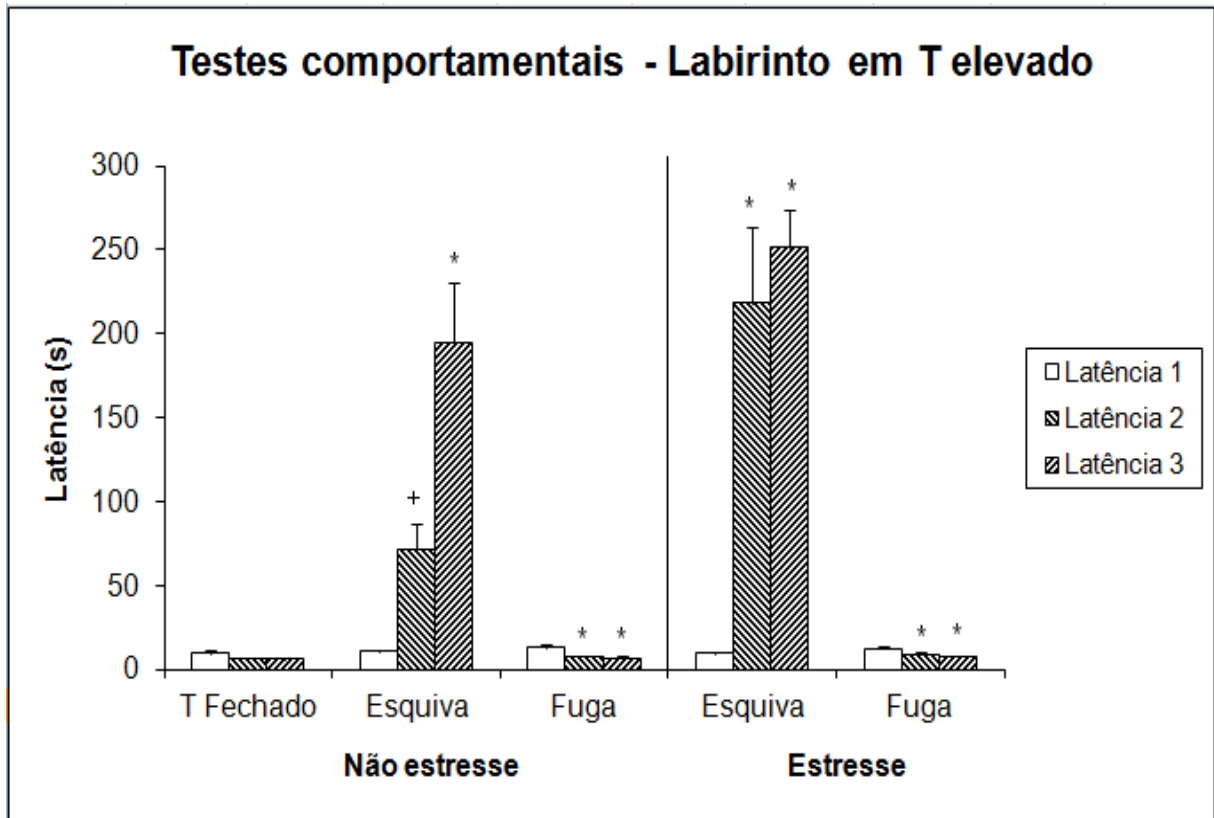


Figura 8. Painel esquerdo: Latências (média \pm EPM) de saída do labirinto em T fechado (controle) ou do braço fechado (tarefa de esquiva) ou aberto (tarefa de fuga) do labirinto em T elevado em três tentativas consecutivas (L1, L2 e L3) – ratos não estressados. **Painel direito:** Latências (média \pm EPM) de saída braço fechado (tarefa de esquiva) ou braço aberto (tarefa de fuga) no labirinto em T elevado em três tentativas consecutivas (L1, L2 e L3) – ratos estressados. N = 8 – 9 animais por grupo de tratamento. * $P < 0,05$ (teste de Duncan) comparado com L1 dentro do mesmo grupo; + $P < 0,05$ (teste t de Student para medidas independentes) comparado com a mesma tentativa no grupo estresse.

4.2. Imunorreatividade à proteína fos

A Tabela 2 (parte esquerda) apresenta as análises semiquantitativas de imunorreatividade à proteína fos em diversas regiões do encéfalo de ratos, após as medidas comportamentais, para os animais não estressados. A ANOVA de uma via mostrou diferença significativa na imunorreatividade à proteína fos no córtex frontal [F(2,15) = 10,47; P = 0,001], septo lateral-intermediário [F(2,15) = 5,52; P = 0,016], amígdala basolateral [F(2,15) = 30,83; P <0,001], amígdala basomedial [F(2,15) = 8,59; P = 0,003], amígdala lateral [F(2,15) = 14,74; P <0,001], hipotálamo anterior [F(2,15) = 20,63; P <0,001], hipotálamo dorsomedial [F(2,15) = 5,65; P = 0,015], hipotálamo ventromedial [F(2,15) = 4,98; P = 0,022], substância cinzenta periaquedutal dorsolateral [F(2,15) = 5,50; P = 0,016], núcleo dorsal da rafe [F(2,15) = 5,28; P = 0,018] e *locus ceruleus* [F(2,15) = 9,25; P = 0,002].

A análise *post-hoc* (teste de Duncan, P < 0,05) indicou que os ratos não estressados submetidos à tarefa de esquiva no LTE apresentaram maior densidade de imunorreatividade à proteína fos em comparação com o grupo controle no córtex frontal (9A), no septo latero-intermediário (9B), na amígdala basolateral (9C), na amígdala basomedial (9D), na amígdala lateral (9E), no hipotálamo anterior (10A), no hipotálamo dorsomedial (10B) e no núcleo dorsal da rafe (10C). No córtex frontal (9A), na amígdala basolateral (9C), na amígdala basomedial (9D), na amígdala lateral (9E) e no hipotálamo anterior (10A), a imunorreatividade à proteína fos foi também maior em relação ao grupo submetido à tarefa de fuga.

Não houve diferença significativa na imunorreatividade à proteína fos entre o grupo não estressado submetido à tarefa de esquiva e o grupo controle no septo ventrolateral, no hipocampo (corno de Amon e giro denteado), na amígdala medial, no hipotálamo ventromedial, na substância cinzenta periaquedutal dorsomedial, na substância cinzenta periaquedutal dorsolateral, na substância cinzenta periaquedutal lateral, na substância cinzenta periaquedutal ventrolateral, no núcleo mediano da rafe e no *locus ceruleus*.

Tabela 2. Número de células imunorreativas à proteína *fos* em diferentes regiões do encéfalo de ratos não estressados e estressados, por áreas pré-determinadas (média ± EPM). N = 5 - 6 animais por grupo.

ESTRUTURA	NÃO ESTRESSADO			ESTRESSADO	
	Controle	Esquiva	Fuga	Esquiva	Fuga
Córtex frontal	16,2 ± 4,7	81,8 ± 16,2 ^{a, b}	35,6 ± 6,3	312,0 ± 72,4	225,6 ± 35,4
Septo dorsolateral	12,0 ± 1,0	27,2 ± 7,5	32,8 ± 6,2	100,3 ± 41,5	93,5 ± 23,2
Septo latero-intermediário	13,0 ± 5,4	38,5 ± 6,8 ^a	25,0 ± 3,7	99,1 ± 33,5	128,8 ± 19,1
Septo ventrolateral	20,0 ± 3,5	23,0 ± 4,4	38,2 ± 8,3	124,7 ± 33,6	162,3 ± 29,4
Hipocampo (Corno de Amon)	5,2 ± 0,7	5,7 ± 2,6	14,8 ± 7,9	25,7 ± 7,4	48,3 ± 10,6
Hipocampo (Giro denteado)	17,8 ± 3,4	6,8 ± 2,1	38,2 ± 16,4	57,8 ± 14,6	100,8 ± 22,0
Amígdala basolateral	11,5 ± 1,0	58,5 ± 7,5 ^{a, b}	18,3 ± 2,4	127,5 ± 15,1 ^b	66,5 ± 11,3
Amígdala basomedial	15,5 ± 1,6	30,0 ± 3,8 ^{a, b}	16,0 ± 2,6	99,3 ± 15,9	60,7 ± 14,3
Amígdala lateral	13,0 ± 2,4	47,8 ± 7,5 ^{a, b}	25,3 ± 1,0	86,8 ± 10,0	80,6 ± 11,3
Amígdala medial	12,3 ± 0,8	9,2 ± 1,6	12,6 ± 3,9	77,5 ± 12,9	84,0 ± 18,6
Hipotálamo anterior	19,0 ± 2,4	46,3 ± 5,2 ^{a, b}	17,3 ± 2,3	117,5 ± 13,3	78,3 ± 13,5
Hipotálamo dorsomedial	29,2 ± 5,1	129,5 ± 33,3 ^a	104,3 ± 17,7 ^a	366,8 ± 63,9	359,8 ± 49,1
Hipotálamo ventromedial	18,5 ± 2,9	39,3 ± 10,8	55,2 ± 8,8 ^a	231,2 ± 59,2	212,2 ± 16,1
Substância cinzenta periaquedutal dorsomedial	22,7 ± 2,4	26,5 ± 5,4	41,4 ± 7,2	136,3 ± 34,6	107,0 ± 21,4
Substância cinzenta periaquedutal dorsolateral	26,2 ± 3,5	28,3 ± 4,9	49,5 ± 7,4 ^{a, b}	99,2 ± 20,1	105,5 ± 21,2
Substância cinzenta periaquedutal lateral	26,2 ± 4,1	47,0 ± 13,7	46,5 ± 11,5	120,2 ± 23,5	90,8 ± 13,3
Substância cinzenta periaquedutal ventrolateral	42,8 ± 7,5	56,5 ± 14,8	58,3 ± 11,7	119,5 ± 16,9	140,3 ± 17,4
Núcleo dorsal da rafe	20,2 ± 3,0	40,2 ± 6,2 ^a	28,5 ± 3,1	100,3 ± 7,3 ^b	60,5 ± 6,6
Núcleo mediano da rafe	30,2 ± 5,6	35,6 ± 7,3	31,3 ± 5,5	89,0 ± 10,2	62,3 ± 7,9
<i>Locus ceruleus</i>	14,5 ± 1,3	12,5 ± 1,8	20,7 ± 1,1 ^{a, b}	40,7 ± 3,9	48,0 ± 6,3

^aP<0,05, em relação ao labirinto em T fechado (teste de Duncan).

^bP<0,05, em relação a outra tarefa no mesmo grupo (não estressados: teste de Duncan; estressados: teste t de Student não pareado).

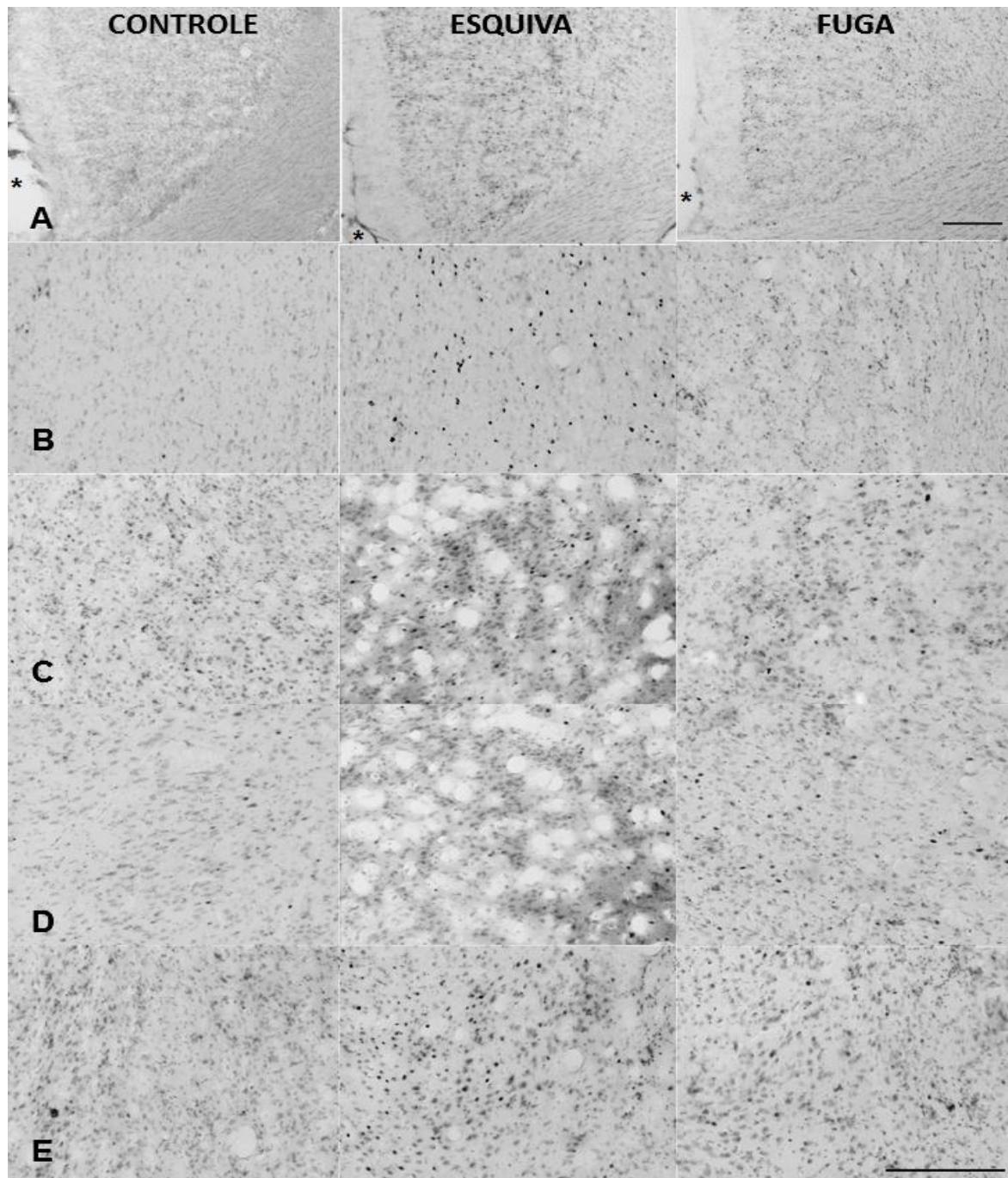


Figura 9. Fotomicrografias representativas das áreas que apresentaram diferença estatisticamente significativa com relação à imunorreatividade à proteína *fos* (pontos escuros) em cortes coronais de encéfalos de ratos não estressados. Tarefas de esquiva (coluna central) e fuga (coluna da direita) do labirinto em T elevado, com seu respectivo grupo controle (coluna da esquerda). (A) córtex frontal, (B) septo latero-intermediário, (C) amígdala basolateral, (D) amígdala basomedial, (E) amígdala lateral. Escala: 300 μ m. (*) Fissura longitudinal do encéfalo.

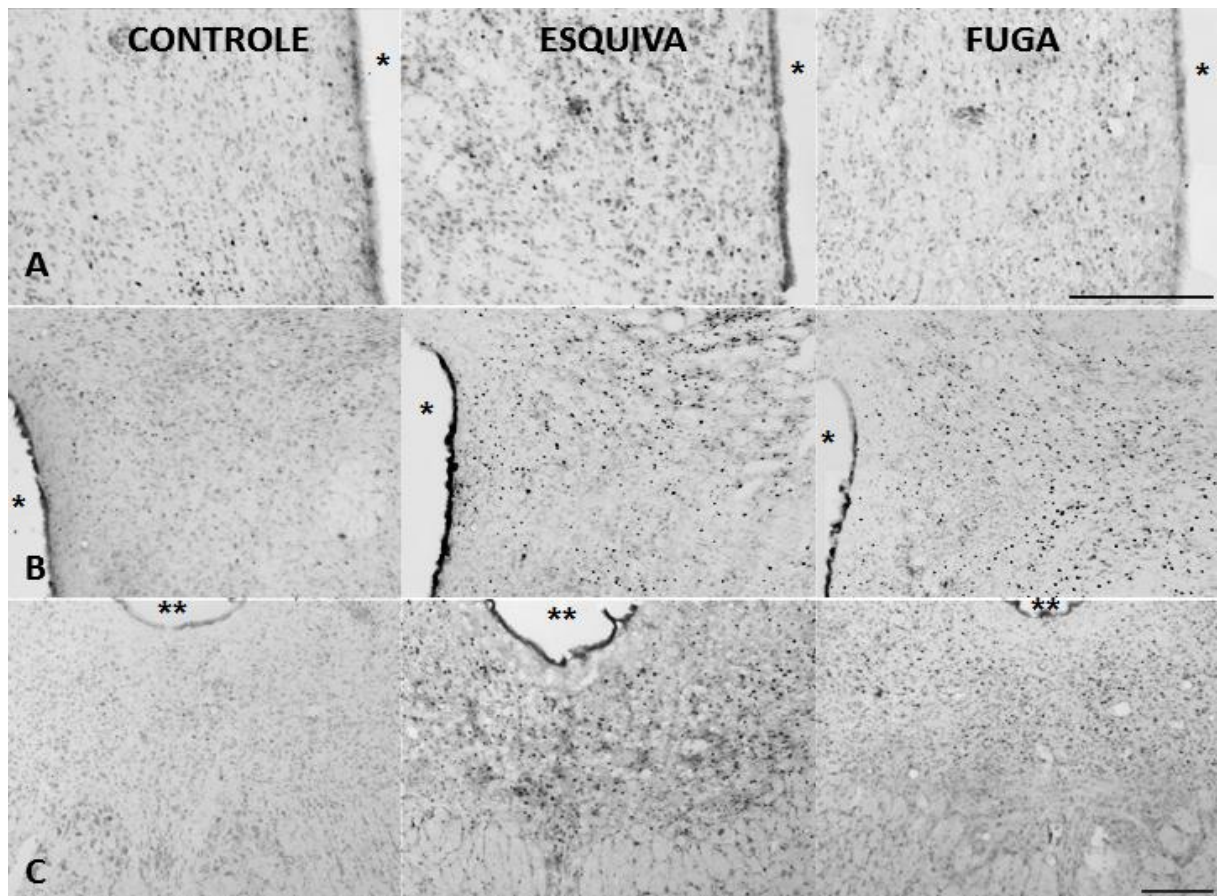


Figura 10. Fotomicrografias representativas das áreas que apresentaram diferença estatisticamente significativa com relação à imunorreatividade à proteína *fos* (pontos escuros) em cortes coronais de encéfalos de ratos não estressados. Tarefas de esquiva (coluna central) e fuga (coluna da direita) do labirinto em T elevado, com seu respectivo grupo controle (coluna da esquerda). (A) hipotálamo anterior, (B) hipotálamo dorsomedial, (C) núcleo dorsal da rafe. Escala: 300 μ m. (*) Terceiro ventrículo; (**) Aqueduto cerebral.

Para os ratos não estressados submetidos à tarefa de fuga, o teste *post-hoc* de Duncan mostrou que houve aumento significativo na imunorreatividade à proteína *fos* ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle no hipotálamo dorsomedial (10B), hipotálamo ventromedial (11A), substância cinzenta periaquedutal dorsolateral (11B) e *locus ceruleus* (11C). Na substância cinzenta periaquedutal dorsolateral (11C) e no *locus ceruleus* (11D), a imunorreatividade à proteína *fos* também foi significativamente maior em relação ao grupo submetido à tarefa de esquiva.

Não houve diferença significativa na imunorreatividade à proteína *fos* entre o grupo testado na tarefa de fuga em comparação com o grupo controle no córtex frontal, no septo dorsolateral, no septo latero-intermediário, no septo ventrolateral, no hipocampo (corno de Amon e giro denteado), na amígdala basolateral, na amígdala basomedial, na amígdala lateral, na amígdala medial, no hipotálamo anterior, na substância cinzenta periaquedutal dorsomedial, na substância cinzenta periaquedutal lateral, na substância cinzenta periaquedutal ventrolateral, no núcleo dorsal da rafe e no núcleo mediano da rafe.

Também não houve diferenças significativas na imunorreatividade à proteína *fos* entre os grupos testados na tarefa de esquiva e fuga no córtex frontal, no septo dorsolateral, no septo latero-intermediário, no septo ventrolateral, no hipocampo (corno de Amon e giro denteado), na amígdala basolateral, na amígdala basomedial, na amígdala lateral, na amígdala medial, no hipotálamo anterior, hipotálamo dorsomedial, hipotálamo ventromedial, na substância cinzenta periaquedutal dorsomedial, na substância cinzenta periaquedutal lateral, na substância cinzenta ventrolateral, no núcleo dorsal da rafe e no núcleo mediano da rafe.

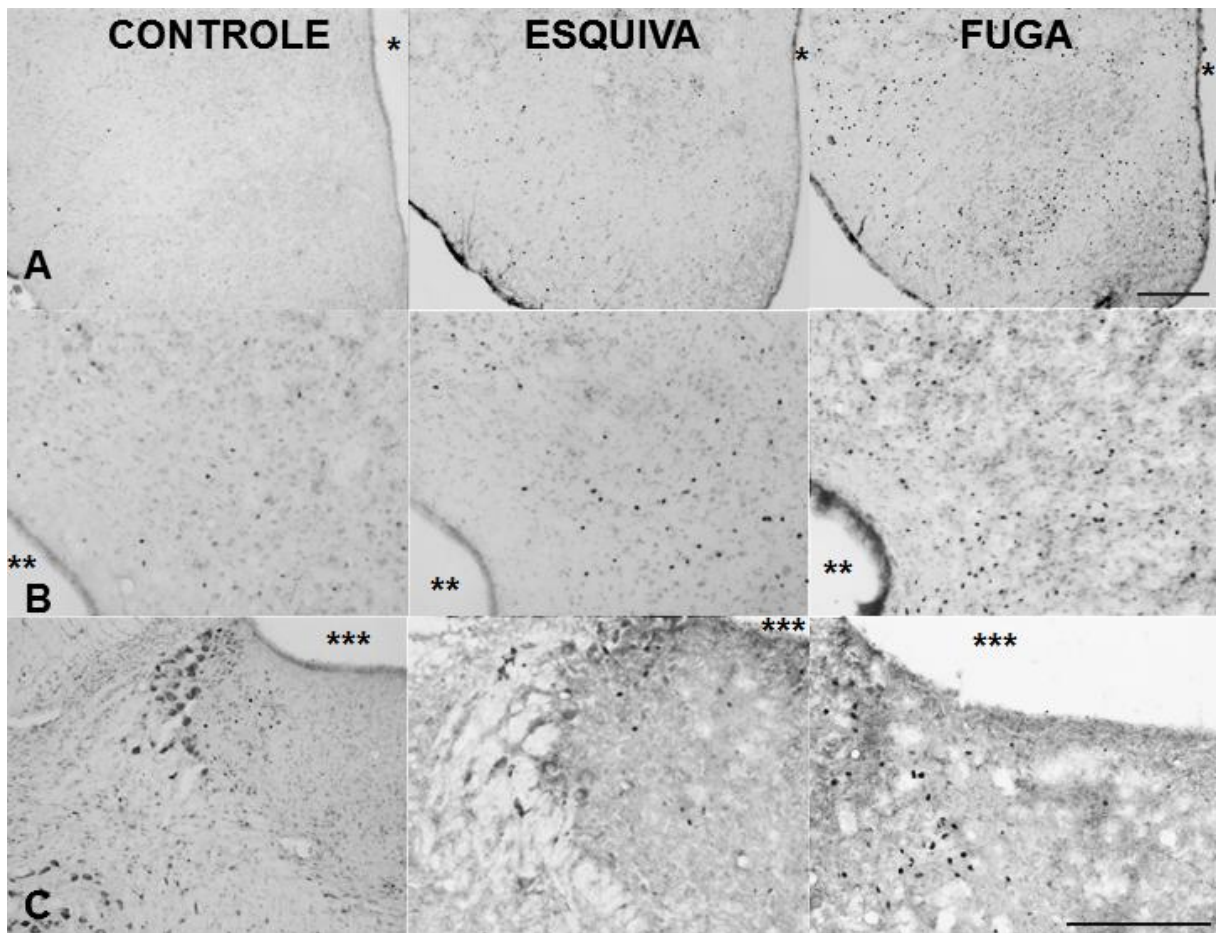


Figura 11. Fotomicrografias representativas das áreas que apresentaram diferença estatisticamente significativa com relação à imunoreatividade à proteína *fos* (pontos escuros) em cortes coronais de encéfalos de ratos não estressados. Tarefas de esquiva (coluna central) e fuga (coluna da direita) do labirinto em T elevado, com seu respectivo grupo controle (coluna da esquerda). (A) hipotálamo ventromedial, (B) substância cinzenta periaquedutal dorsolateral, (C) *locus ceruleus*. Escala: 300 μ m. (*) Terceiro ventrículo; (**) Aqueduto cerebral; (***) Quarto ventrículo.

A tabela 2 (direita) ilustra os resultados obtidos pela análise quantitativa de imunorreatividade à proteína *fos* em regiões do encéfalo de ratos estressados que passaram pelas tarefas de esquiva ou fuga no LTE. O teste t de Student para medidas independentes mostrou que os animais estressados submetidos à tarefa de esquiva no LTE apresentaram aumento na imunorreatividade à proteína *fos* na amígdala basolateral [$t(10) = 3,24$; $P = 0,009$] (12A) e no núcleo dorsal da rafe [$t(4,05) = 9,91$; $P = 0,002$] (12B) em comparação com o grupo que passou pela tarefa de fuga. Nenhuma outra diferença significativa foi detectada entre as duas tarefas entre os animais estressados.

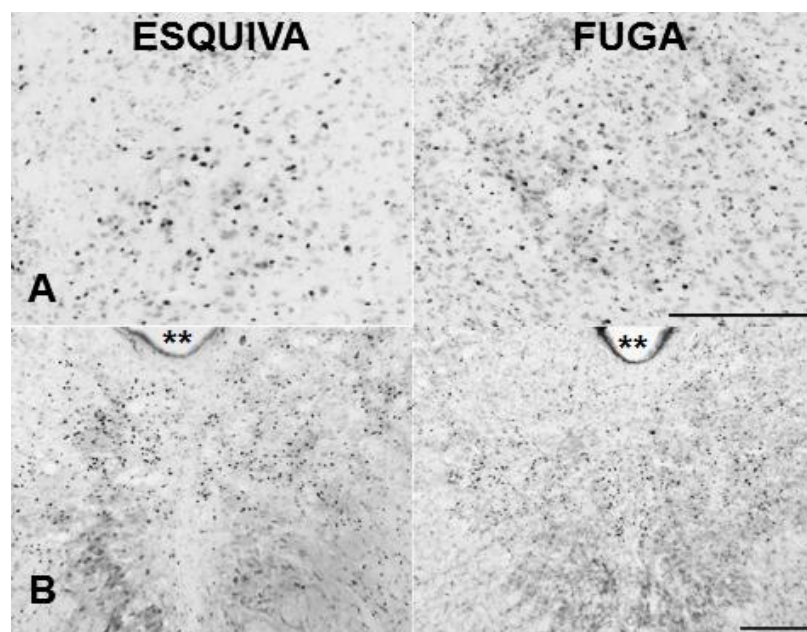


Figura 12. Fotomicrografias representativas das áreas que apresentaram diferença estatisticamente significativa com relação à imunorreatividade à proteína *fos* (pontos escuros) em cortes coronais da amígdala basolateral (A) e do núcleo dorsal da rafe (B) depois que os animais estressados foram testados na tarefa de esquiva (coluna da esquerda) e fuga (coluna da direita) do labirinto em T elevado. Escala: 300 μm . (**) Aqueduto cerebral.

4.3. Dosagem de corticosterona

A Figura 13 mostra as concentrações séricas de corticosterona (ng/ml) dos ratos não estressados e estressados. O teste t de Student para medidas independentes mostrou que os animais estressados apresentaram aumento significativo na concentração de corticosterona [$t(6) = 4,73$; $P = 0,003$].

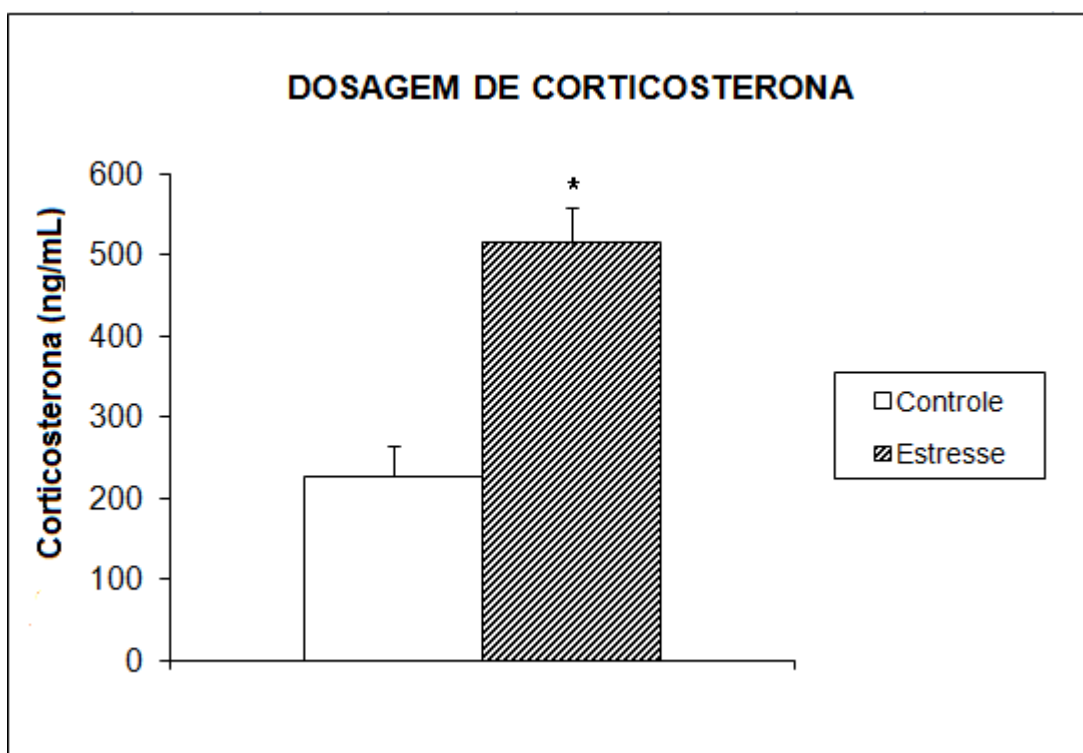


Figura 13. Medidas de corticosterona (ng/ml) dos ratos não estressados e dos ratos submetidos ao procedimento de estresse por restrição por 30 minutos. As barras representam a média \pm EPM de 5 animais não estressados e de 3 animais estressados. $P < 0,05$, teste t de Student para medidas independentes.

5. DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho mostram que diferentemente dos animais submetidos ao modelo do labirinto em T fechado, os animais não estressados e os animais estressados expostos ao LTE e testados na tarefa de esquiva levaram mais tempo para deixar o braço fechado do labirinto ao longo das três tentativas. Por outro lado, os animais apresentam a tendência de deixar o braço aberto do labirinto (fuga) mais rapidamente ao longo das tentativas, indicando que não há habituação da tarefa de fuga. Os dados comportamentais obtidos estão de acordo com estudos anteriores (Viana *et al.*, 1994; Zangrossi e Graeff, 1997; Teixeira *et al.*, 2000; Poltronieri *et al.*, 2003, Silveira *et al.*, 2001; Sena *et al.*, 2003), que mostram que a exposição ao braço aberto é crucial para o desempenho dos sujeitos experimentais em ambas as tarefas do LTE. Nossos resultados comportamentais sugerem também que o estresse altera seletivamente uma resposta comportamental de defesa, a esquiva, mantendo inalteradas as respostas de fuga. Esses resultados corroboram evidências anteriores (De Paula Soares *et al.*, 2011), que sugerem que a tarefa de esquiva é mais suscetível aos efeitos do estresse.

Os dados obtidos no presente trabalho também demonstram que diferentes estruturas encefálicas são ativadas pela exposição dos animais às tarefas de esquiva e fuga do LTE. Em um estudo anterior, Silveira *et al.*, (2001) demonstraram que a tarefa de esquiva acarreta aumento na imunorreatividade à proteína *fos* na amígdala central, no hipotálamo anterior, no hipotálamo dorsomedial e no núcleo mediano da rafe. Embora nossos dados confirmem que a tarefa de esquiva acarreta uma ativação dos dois núcleos hipotalâmicos, o presente trabalho não mostra aumento significativo na imunorreatividade à proteína *fos* na amígdala central e no núcleo mediano da rafe. Sugere-se que essas diferenças são possivelmente devidas à diferença no procedimento experimental adotado. Em nosso trabalho, incluímos o procedimento de pré-exposição dos animais por 30 minutos a um dos braços abertos do LTE, um dia antes dos testes com o modelo. Isto porque estudos mais recentes sugerem que a pré-exposição diminui as latências de fuga no dia dos testes, tornando essa medida mais fidedigna e mais suscetível aos efeitos de diferentes tratamentos farmacológicos (Sena *et al.*, 2003). É possível, portanto, que o procedimento de pré-exposição tenha alterado o padrão de imunorreatividade à

proteína fos. As demais estruturas que apresentaram aumento na imunorreatividade à proteína fos nos animais submetidos à tarefa de esquiva no LTE foram o córtex frontal, septo latero-intermediário, amígdala basolateral e núcleo dorsal da rafe – estruturas que tradicionalmente têm sido relacionadas à modulação da ansiedade.

De acordo com Gray e McNaughton (1987; 2001; 2004), o septo (incluindo suas porções lateral e medial), juntamente com o hipocampo, é uma estrutura central do chamado “Sistema de Inibição Comportamental” (SIC). O SIC é ativado quando o animal é confrontado com uma ameaça que envolva o comportamento de esquiva/aproximação (por exemplo, quando colocado na porção distal do braço fechado do LTE, o rato exibe um comportamento de esquiva/evitação em relação ao braço aberto aversivo). Nesses casos, a avaliação de risco é necessária para lidar com a possível ameaça, enquanto a inibição comportamental reduz os riscos, no caso de uma ameaça real. De acordo com essa linha de pensamento, a ansiedade antecipatória reflete um estado central decorrente da ativação do SIC. Gray e McNaughton também propuseram que o córtex pré-frontal atua modulando a atividade do sistema septo-hipocampal e que lesões nessa área poderiam afetar a inibição comportamental e a ansiedade antecipatória (Gray, 1987; Gray e McNaughton, 2001; McNaughton e Corr, 2004). De fato, um estudo anterior realizado no LTE mostrou que lesões da porção medial do córtex pré-frontal ocasionam prejuízo das tarefas de esquiva sem alterar a tarefa de fuga (Blanco *et al.*, 2009). O mesmo resultado foi obtido com a administração do benzodiazepínico midazolam no septo lateral (Viana *et al.*, 2008).

A amígdala é composta por um aglomerado de núcleos heterogêneos, funcionalmente e morfológicamente distintos, e que apresentam interconexões complexas (Tye *et al.*, 1998). A estrutura tem sido relacionada tanto à detecção de estímulos estressantes/ansiogênicos quanto à modulação de respostas adaptativas a estímulos estressores (Shin e Liberzon, 2010; Ledoux, 1998; Ledoux, 2000; Charney e Drevets, 2002). O complexo basolateral é composto pelo núcleo lateral, pelo núcleo basal ou basolateral e pelo núcleo basomedial, que também é conhecido como núcleo basal acessório (Tye *et al.*, 1998; Sah *et al.*, 2003). O núcleo lateral compreende a interface sensorial primária da amígdala, recebendo estímulos auditivos, visuais e somáticos provenientes do tálamo e do córtex. Dessa forma, tem sido proposto (Ledoux, 1998; Ledoux, 2000; Davis e Myers, 2002; Davis, 2006) que o núcleo lateral da amígdala é um local onde ocorre a convergência de diferentes

tipos de estímulos sensoriais de natureza aversiva, condicionados e incondicionados (é importante mencionar que no presente estudo a imunorreatividade à proteína fos no núcleo lateral da amígdala dos animais expostos à tarefa de fuga encontra-se próxima à significância estatística: $P = 0,07$). As principais projeções do núcleo lateral são para o núcleo basolateral e basomedial e para o núcleo central da amígdala (que se conecta com estruturas motoras, autonômicas e neuroendócrinas, relacionadas com a expressão do comportamento de medo). Os núcleos basais estabelecem conexões generalizadas, projetando-se para a amígdala central e lateral, e compartilhando projeções recíprocas com o córtex pré-frontal (Ongür e Price, 2000). Corroborando nossos resultados, estudos anteriores mostram que a inibição da amígdala basolateral através da administração de agonistas benzodiazepínicos/GABAérgicos altera as respostas de esquiva no LTE, enquanto a tarefa de fuga se mantém inalterada (Zangrossi *et al.*, 1999; Bueno *et al.*, 2005). Em conjunto, esses resultados também chamam a atenção para o papel preferencial da amígdala basolateral na modulação do comportamento de esquiva a ameaças potenciais ou distais, comportamento este relacionado à ansiedade antecipatória e, como sugerido por alguns autores (Deakin e Graeff, 1991; Graeff *et al.*, 1996; Graeff e Zangrossi, 2010), ao TAG (ver Tabela 1). Com relação a este último aspecto, é interessante mencionar que um estudo realizado com a técnica de ressonância magnética funcional (morfometria voxel-a-voxel) (Etkin *et al.*, 2009) mostrou que pacientes com TAG apresentam diminuição significativa das conexões que a amígdala basolateral estabelece com áreas corticais, quando comparados a indivíduos saudáveis.

Diferentes núcleos do hipotálamo também têm sido relacionados à modulação de respostas relacionadas à ansiedade. Corroborando resultados anteriores (Silveira *et al.*, 2001), no presente estudo o hipotálamo anterior e o hipotálamo dorsomedial apresentaram maior imunorreatividade à proteína fos nos animais que foram expostos à tarefa de esquiva do LTE. Esses dois núcleos, juntamente com o hipotálamo ventromedial e o núcleo pré-mamilar dorsal, fazem parte da chamada “região hipotalâmica medial defensiva” (Canteras, 2002). Os núcleos estão interligados e parecem estar especialmente envolvidos com a integração de respostas relacionadas ao medo inato (Canteras, 2002; Silveira e Graeff, 1992; Shekhan e Keim, 1997; Shekhan e Keim, 2000; Santos *et al.*, 2008). Estudos anteriores têm demonstrado que a estimulação elétrica da região hipotalâmica

medial induz o comportamento de fuga, mesmo comportamento apresentado quando os animais encontram-se diante de um perigo iminente (Hess e Brugger, 1943; Fernandez de Molina e Hunsperger, 1962; Panksepp, 1971). Além disso, a administração de agonistas glutamatérgicos no hipotálamo medial (Silveira e Graeff, 1992; Shekhan e Keim, 1997; Shekhan e Keim, 2000; Santos *et al.*, 2008; Hess, 1943; Fernandez de Molina e Hunsperger, 1962; Panksepp, 1971; Bailey e DiMicco, 2001) e de antagonistas GABAérgicos (Schmitt *et al.*, 1985) evoca um padrão de defesa similar. É importante salientar que no presente estudo a imunorreatividade à proteína *fos* no hipotálamo ventromedial dos animais submetidos à tarefa de esquiva apresentou um aumento próximo à significância estatística (Teste de Duncan, $P = 0.09$), quando comparada com a do grupo controle. Embora o estudo realizado por Silveira *et al.* (2001) não tenha examinado o hipotálamo ventromedial, outro estudo desenvolvido pelo mesmo grupo de pesquisa mostrou que a inativação farmacológica desta região prejudica as tarefas de esquiva e fuga do LTE (Bueno *et al.*, 2007), evidências que vão no mesmo sentido dos resultados observados no presente trabalho.

Outra estrutura ativada pela tarefa de esquiva do LTE foi o núcleo dorsal da rafe. No estudo anterior realizado (Silveira *et al.*, 2001), a imunorreatividade à proteína *fos* nesta região também apresentou aumento após os animais terem sido expostos à tarefa de esquiva, não atingindo, no entanto, significância estatística. Contrariamente aos resultados obtidos do presente estudo, foi observada diferença significativa no núcleo mediano da rafe (Silveira *et al.*, 2001), novamente sugerindo que o procedimento de pré-exposição altera o padrão de ativação das estruturas encefálicas. De fato, os dados do presente trabalho sugerem que o núcleo dorsal da rafe (e não o núcleo mediano) é uma das principais estruturas envolvidas com a regulação do comportamento de esquiva. Após a restrição, diferenças significativas no padrão de imunorreatividade à proteína *fos* foram encontradas apenas na amígdala basolateral e no núcleo dorsal da rafe entre os animais que passaram pela tarefa de esquiva e os animais que passaram pela tarefa de fuga. Assim, estas duas estruturas parecem estar envolvidas com a mediação do efeito ansiogênico acarretado pela restrição.

O núcleo dorsal da rafe é o principal responsável pela inervação serotoninérgica a estruturas prosencefálicas (Jacobs e Azmitia, 1992). Neurônios serotoninérgicos oriundos do núcleo dorsal da rafe de ratos se projetam para

diversas estruturas relacionadas ao medo/ansiedade, como o hipotálamo dorsal, amígdala e hipocampo (Lowry *et al.*, 2005; Lowry *et al.*, 2008). Além disso, o córtex pré-frontal recebe uma densa inervação de neurônios serotonérgicos provenientes predominantemente do núcleo dorsal da rafe (Andrade, 2011). Quanto ao papel desempenhado pela serotonina na ansiedade, Deakin e Graeff (1991, 1996 e 2000) sugerem que o feixe prosencefálico medial que se origina do núcleo dorsal da rafe e inerva a amígdala e o córtex frontal relaciona-se à modulação de respostas de esquiva frente a uma ameaça distal ou potencial. Como já mencionado, essa estratégia comportamental está relacionada à ansiedade antecipatória, e possivelmente ao TAG (Gray, 1987; Gray e McNaughton, 2001; McNaughton, 2004; Deakin e Graeff, 1991; Graeff, 1996; Graeff e Zangrossi, 2010). Por sua vez, a via periventricular que parte do dorsal da rafe e se projeta para a substância cinzenta periaquedutal modula respostas inatas de fuga ou luta, desencadeadas frente a uma situação de perigo proximal (como por exemplo, a fuga do braço aberto do LTE), dor aguda ou asfixia, reações possivelmente relacionadas ao TP (Deakin e Graeff, 1991; Graeff, 1996; Graeff e Zangrossi, 2010).

As duas vias acima regulam respostas de defesa ao estresse agudo (uma hipótese que é corroborada pelos dados do presente estudo). Deakin e Graeff sugerem ainda que a via que conecta o núcleo mediano da rafe ao hipocampo promove resiliência a condições de estresse crônico (Deakin e Graeff, 1991; Graeff, 1996; Graeff e Zangrossi, 2010). Esse mecanismo permite que o animal (ou a pessoa) tenha uma vida relativamente normal, independente das adversidades contínuas que experimente. A depressão é deflagrada quando este mecanismo de enfrentamento falha.

Corroborando os resultados do presente estudo, dados anteriores (Silveira *et al.*, 2001) mostraram aumento na imunorreatividade à proteína *fos* após a tarefa de fuga na substância cinzenta periaquedutal dorsal (que no estudo anterior não foi separada em colunas para análise). É sabido que a substância cinzenta periaquedutal dorsal é uma das estruturas-chave envolvidas na modulação de respostas relacionadas ao pânico. Por exemplo, pacientes neurocirúrgicos relataram medo extremo e uma sensação de morte iminente após a estimulação elétrica desta região (Nashold *et al.*, 1974). Além disso, a estimulação elétrica ou química da substância cinzenta periaquedutal dorsal em ratos provoca uma reação de fuga explosiva que se assemelha a um ataque de pânico (Jacquet e Squires, 1988;

Fanselow, 1994; Graeff, 1991; Jenck, 1995). Em um estudo anterior, foi observado que a ativação de receptores GABAA e GABAB da substância cinzenta periaquedutal prejudica as respostas de fuga no LTE (Bueno *et al.*, 2005). Mais recentemente, tem sido demonstrado que a estimulação elétrica profunda (*deep brain stimulation*) da substância cinzenta periaquedutal dorsolateral de ratos (mesma estrutura marcada no presente estudo) e de uma das suas estruturas alvo, o hipotálamo ventromedial (outra estrutura que também foi ativada pela tarefa de fuga no presente estudo), acarreta saltos e fuga desgovernada, acompanhados por uma forte ativação autonômica (Lim *et al.*, 2008), respostas que se assemelham às observadas durante um ataque de pânico.

Diferentemente dos nossos resultados, o estudo de Silveira *et al.* (2001) não mostrou aumento significativo na imunorreatividade à proteína fos em animais submetidos à tarefa de fuga no hipotálamo dorsomedial e no *locus ceruleus*. Essas diferenças indicam que a facilitação das respostas de fuga obtida a partir da introdução do procedimento de pré-exposição (Teixeira *et al.*, 2000; Poltronieri *et al.*, 2003; Sena *et al.*, 2003) encontra-se possivelmente relacionada à ativação dessas duas estruturas encefálicas.

Como o hipotálamo medial e a substância cinzenta periaquedutal dorsal, o *locus ceruleus* tem sido relacionado à regulação de respostas de pânico (Grove *et al.*, 1997; Sullivan *et al.*, 2001; Singewald e Sharp, 2000; Szabo *et al.*, 2000; Gallego *et al.*, 2010). A estrutura fornece inervação noradrenérgica para diferentes regiões encefálicas, enviando projeções, dentre outras estruturas, para o núcleo dorsal da rafe, substância cinzenta periaquedutal, hipotálamo anterior e amígdala (España e Berridge, 2006). A estimulação elétrica do *locus ceruelus* em macacos induz uma série de respostas fisiológicas e comportamentais que tem sido associadas ao TP, como aumento da vigilância, dilatação da pupila, piloereção, aumento da pressão arterial e aumento da taxa respiratória (Redmond, 1986). Por outro lado, lesões do *locus ceruelus* geram diminuição de respostas emocionais frente a ameaças. Estudos realizados com seres humanos também corroboram o envolvimento do *locus ceruelus* com o TP. Por exemplo, a administração de ioimbina, um antagonista de receptores α 2-adrenérgicos, induz ataques de pânico em pacientes com este transtorno (Nutt, 1989; Gurguis e Uhde, 1990; Sullivan *et al.*, 1999), presumivelmente devido ao aumento da disponibilidade sináptica de noradrenalina como consequência do bloqueio de autorreceptores inibitórios (Sullivan *et al.*, 1999).

Mais recentemente, um estudo que utilizou a técnica de morfometria baseada em voxel em 10 pacientes com transtorno do pânico e em 23 indivíduos saudáveis, mostrou que os indivíduos com TP apresentaram aumento no volume da substância cinzenta periaquedutal e em outras estruturas do tronco encefálico como o *locus ceruleus*, o núcleo dorsal da rafe, a substância nigra e a área tegumentar ventral (Protopopescu *et al.*, 2006).

As medidas de CCT sérica realizadas sugerem que a exposição ao estímulo estressor acarreta aumentos na liberação deste glicocorticoide, possivelmente devido à ativação do eixo HHA, observações que corroboram evidências prévias (Newman e Soma, 2009; Buscardo *et al.*, 2010; Sterrenburg *et al.*, 2012). No entanto, como a tarefa de esquivar foi facilitada pela restrição, enquanto a tarefa de fuga do LTE se manteve inalterada, nossos dados também sugerem que a resposta de fuga - em termos clínicos associada ao pânico (Viana *et al.*, 1994; Zangrossi e Graeff, 1997; Teixeira *et al.*, 2000; Poltronieri *et al.*, 2003; Sena *et al.*, 2001) – não se encontra relacionada a aumentos nas concentrações de CCT. Confirmando esta observação, resultados obtidos recentemente por nosso grupo de pesquisa (Diniz *et al.*, 2011), mostraram que a administração crônica de CCT facilitou a tarefa de esquivar, sem interferir com a tarefa de fuga do LTE. É interessante observar que evidências clínicas sugerem que embora altas concentrações de cortisol acompanhem a ansiedade antecipatória e o TAG, alterações no funcionamento do eixo HHA e nas concentrações de cortisol plasmático não tem sido associadas a ataques de pânico ou ao TP (Klein, 1993; Coplan *et al.*, 1995; Graeff, 2007; Graef *et al.*, 2005). Além disso, diferentes estímulos panicogênicos (por exemplo, lactato de sódio e CO₂) que podem de forma aguda ser o gatilho para o desencadeamento de um ataque de pânico, não geram aumentos na liberação de cortisol (Terleph *et al.*, 2006; Van Duinen *et al.*, 2008). Assim, tem sido proposto (Klein, 1993; Coplan *et al.*, 1995; Graeff, 2007 e Graef *et al.*, 2005) que além de diferenças na sintomatologia e na resposta ao tratamento farmacológico, o TAG e o TP afetam diferentemente os hormônios relacionados ao estresse. Enquanto a ansiedade antecipatória e a ansiedade generalizada encontram-se associadas à ativação do eixo HHA e do eixo simpatoadrenal, um ataque de pânico seria caracterizado como uma reação emergencial de medo, relacionada à ativação simpática, mas com pouco efeito sobre o eixo HHA. Os resultados apresentados no presente trabalho parecem corroborar esta proposição.

Finalmente, é importante ressaltar que diversos estudos tem demonstrado a interação entre serotonina e glicocorticóides na modulação de respostas a estímulos estressores. Depois de atravessar a barreira hematoencefálica, a CCT atinge diferentes regiões encefálicas, incluindo o hipocampo, a amígdala, o núcleo paraventricular do hipotálamo, o *locus ceruleus* e o núcleo dorsal da rafe (para uma revisão ver Lanfumey *et al.*, 2008). Nesta última região, os receptores para glicocorticóides parecem encontrar-se expressos exclusivamente em neurônios serotoninérgicos (Härfstrand *et al.*, 1986; Fuxe, *et al.*, 1987; Morimoto *et al.*, 1996). Diferentes estressores também atuam aumentando a síntese e liberação de serotonina em diversas áreas encefálicas (Pei *et al.*, 1990; Clement *et al.*, 1993; Inoue *et al.*, 1994). Além disso, estudos anteriores demonstram que a exposição a eventos estressores, além de atuar aumentando as concentrações de glicocorticóides circulantes, ativa neurônios serotoninérgicos do núcleo dorsal da rafe, aumentando a liberação de serotonina (Maswood, *et al.*, 1998; Grahn *et al.*, 1999; Greenwood *et al.*, 2003).

Sendo assim, é possível sugerir que o efeito ansiogênico observado no presente trabalho após a exposição ao estresse agudo está relacionado a um aumento nas concentrações de CCT, que subsequentemente ativaria receptores glicocorticóides em algumas estruturas encefálicas, como, por exemplo, o núcleo dorsal da rafe. Nesta estrutura, a ativação de receptores glicocorticóides promoveria também a liberação de serotonina em estruturas prosencefálicas. Como proposto por Deakin e Graeff (Deakin e Graeff, 1991; Graeff *et al.*, 1996; Graeff e Zangrossi, 2010), o aumento da liberação de serotonina em estruturas prosencefálicas (como a amígdala basolateral) facilitaria respostas de defesa a ameaças potenciais ou distais, aumentando a ansiedade antecipatória e contribuindo para a fisiopatologia do TAG.

6. CONCLUSÕES

O estresse por restrição aumentou significativamente as latências de esquiva dos braços abertos do LTE, gerando efeito ansiogênico. Já a tarefa de fuga se manteve inalterada.

Diferentes estruturas encefálicas foram ativadas pela exposição dos animais às tarefas de esquiva (córtex frontal, septo latero-intermediário, amígdala basolateral, amígdala basomedial, amígdala lateral, hipotálamo anterior, hipotálamo dorsomedial, e núcleo dorsal da rafe) e fuga do LTE (hipotálamo dorsomedial, hipotálamo ventromedial, substância cinzenta periaquedutal dorsolateral e *locus ceruleus*). No caso dos ratos que passaram pelo estresse por restrição houve maior ativação da amígdala basolateral e do núcleo dorsal da rafe nos animais submetidos à tarefa de esquiva. Estas duas estruturas possivelmente encontram-se envolvidas com a modulação dos efeitos ansiogênicos gerados pela restrição.

E por fim, o estresse por restrição utilizado no presente trabalho foi capaz de aumentar as concentrações séricas de corticosterona, o que sugere que aumentos nas concentrações de corticosterona acompanham os efeitos ansiogênicos deste tipo de estresse.

7. REFERÊNCIAS

Andrade R. Serotonergic regulation of neuronal excitability in the prefrontal cortex. *Neuropharmacology*, 61(3): 382-386, 2011.

Archer J. Letter: The Maudsley reactive and nonreactive strains of rats: the need for an objective evaluation of differences. *Behav Genet*, 5 (4): 411-413, 1975.

Archer J. Tests for emotionality in rats and mice: A review. *Animal Behavior*, 21: 205-235, 1973.

Auriol BM. Prolégomènes à une yogathérapie de groupe. Tese de Doutorado: Université de Toulouse: Faculté de Médecine, 1970.

Bailey TW, DiMicco JA. Chemical stimulation of the dorsomedial hypothalamus elevates plasma ACTH in conscious rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 280(1): R8-15, 2001.

Battaglia M, Bajo S, Strambi LF, Brambilla F, Castronovo C, Vanni G, Bellodi L. Physiological and behavioral responses to minor stressors in offspring of patients with panic disorder. *J Psychiatr Res*, 31(3): 365-376, 1997.

Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. *Neurociências: desvendando o sistema nervoso*. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

Belanoff JK, Kalehzan M, Sund B, Fleming Ficek SK, Schatzberg AF. Cortisol activity and cognitive changes in psychotic major depression. *Am. J. Psychiatry*, 158 (10): 1612-1616, 2001.

Bittencourt JC, Vaughan J, Arias C, Rissman RA, Vale WW, Sawchenko, PE. Urocortin expression in rat brain: evidence against a pervasive relationship of urocortin-containing projections with targets bearing type 2 CRF receptors. *J. Comp. Neurol*, 415: 285-312, 1999.

Bittencourt JC. Métodos em Neurociência. São Paulo: Roca, 2007.

Blanchard DC, Blanchard RJ. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annual Review of Psychology*, 7: 24S-35S, 1987.

Blanco E, Castilla-Ortega E, Miranda R, Begega A, Aguirre JA, Arias JL, Santín LJ. Effects of medial prefrontal cortex lesions on anxiety-like behaviour in restrained and non-restrained rats. *Behav Brain Res*, 201(2): 338-342, 2009.

Bremner JD, Licinio J, Darnell A, Krystal JH, Owens MJ, Southwick SM, Nemeroff CB, Charney DS. Elevated corticotropin-releasing factor concentrations in posttraumatic stress disorder. *Am J Psychiatry*, 154: 624–629, 1997.

Broekkamp CL, Rijk HW, Joly-Gelouin D, Lloyd KL. Major tranquillizers can be distinguished from minor tranquillizers on the basis of effects on marble burying and swim-induced grooming in mice. *Eur J Pharmacol*, 126 (3): 223-229, 1986.

Brown MR, Fisher LA, Webb V, Vale WW, Rivier JE. Corticotropin-releasing factor: a physiologic regulator of adrenal epinephrine secretion. *Brain Research*. 328: 355-357. 1985.

Bruhn TO, Plotsky PM, Vale WW. Effect of paraventricular lesions on corticotropin-releasing factor (CRF)-like immunoreactivity in the stalk-median eminence: studies on the adrenocorticotropin response to ether stress and exogenous CRF. *Endocrinology*, 114: 57-62, 1984.

Bueno CH, Zangrossi H Jr, Nogueira RL, Soares VP, Viana MB. Panicolytic-like effect induced by the stimulation of GABAA and GABAB receptors in the dorsal periaqueductal grey of rats. *Eur J Pharmacol*, 516(3): 239-246, 2005.

Bueno CH, Zangrossi H Jr, Viana MB. The inactivation of the basolateral nucleus of the rat amygdala has an anxiolytic effect in the elevated T-maze and light/dark transition tests. *Braz J Med Biol Res*, 38 (11): 1697-1701, 2005.

Bueno CH, Zangrossi H Jr, Viana, MB. GABA/benzodiazepine receptors in the ventromedial hypothalamic nucleus regulate both anxiety and panic-related defensive responses in the elevated T-maze. *Brain Res Bull*, 74(1-3):134-141, 2007.

Bullitt E. Expression of c-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *J Comp Neurol*, 269: 517-530, 1990.

Busnardo C, Tavares RF, Resstel LB, Elias LL, Correa FM. Paraventricular nucleus modulates autonomic and neuroendocrine responses to acute restraint stress in rats. *Auton Neurosci*, 158(1-2): 51-57, 2010.

Canteras N. The medial hypothalamic defensive system: hodological organization and functional implications. *Pharmacol Biochem Behav*, 71: 481-491, 2002.

Chalmers DT, Lovenberg TW, De Souza EB. Localization of novel corticotropin-releasing factor receptor (CRF2) mRNA expression to specific subcortical nuclei in rat brain: comparison with CRF1 receptor mRNA expression. *J Neurosci*, 15 (10): 6340-6350, 1995.

Charney DS, Drevets WC. Neurobiological basis of anxiety disorders. In: Davis KL, Charney DS, Coyle JT, Nemeroff C, editors. *Neuropsychopharmacology: The fifth generation of progress*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 901–930, 2002.

Chen XQ, Xu NY, Du JZ, Wang Y, Duan C. Corticotropin-releasing factor receptor subtype 1 and somatostatin modulating hypoxia-caused downregulated Mrna of pituitary growth hormone and upregulated MRNA of hepatic insulin-like growthFactor-I of rats. *Mol Cell Endocrinol*, 242(1-2): 50-58, 2005.

Chotiwat C, Harris RBS. Increased anxiety-like behavior during the post-stress period in mice exposed to repeated restraint stress. *Horm Behav*, 50: 489-495, 2006.

Chu K, Koob GF, Cole M, Zorrilla EP, Roberts AJ. Dependence-induced increases in ethanol self-administration in mice are blocked by the CRF1 receptor antagonist antalarmin and by CRF1 receptor knockout. *Pharmacol Biochem Behav*, 86 (4): 813-821, 2007.

CID 10: Classificação de Transtornos mentais e de comportamento da CID 10. Porto Alegre: Artmed, 1993.

Clement HW, Schäfer F, Ruwe C, Gemsa D, Wesemann W. Stress-induced changes of extracellular 5-hydroxyindoleacetic acid concentrations followed in the nucleus raphe dorsalis and the frontal cortex of the rat. *Brain Res*, 614 (1-2): 117-124, 1993.

Cole RL, Sawchenko PE. Neurotransmitter regulation of cellular activation and neuropeptide gene expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J Neurosci*, 22 (3): 959-969, 2002.

Conrad CD, Galea LA, Kuroda Y, McEwen BS. Chronic stress impairs rat spatial memory on the Y maze and this effect is blocked by tianeptine pretreatment. *Behav Neurosci*, 110 (6): 1321-1234, 1996.

Cook CJ. Stress induces CRF release in the paraventricular nucleus and both CRF and GABA release in the amygdala. *Physiol Behav*, 82 (4): 751-762, 2004.

Coplan JD, Pine D, Papp L, Martinez J, Cooper T, Rosenblum LA, Gorman JM. Uncoupling of the noradrenergic-hypothalamic-pituitary-adrenal axis in panic disorder patients. *Neuropsychopharmacology*, 13 (1): 65-73, 1995.

Crawley JN. Exploratory behavior models of anxiety in mice. *Neurosci Biobehav Rev*, 9 (1): 37-44, 1985.

Davis M, Myers KM. The role of glutamate and gamma-aminobutyric acid in fear extinction: clinical implications for exposure therapy. *Biol Psychiatry*, 52 (10): 998-1007, 2002.

Davis M. Neural systems involved in fear and anxiety measured with fear-potentiated startle. *Am Psychol*, 61 (8): 741-756, 2006.

De Paula Soares V, Vicente MA, Biojone C, Zangrossi H Jr, Guimarães FS, Joca SR. Distinct behavioral consequences of stress models of depression in the elevated T-maze. *Behav Brain Res*, 225 (2): 590-595, 2011.

De Souza EB. Corticotropin-releasing factor receptors: physiology, pharmacology, biochemistry and role in central nervous system and immune disorders. *Psychoneuroendocrinology*, 20: 789-819, 1995.

Deakin JF, Graeff FG. 5-HT and mechanisms of defense, *J Psychopharmacol*, 5: 305-315, 1991.

Diniz L, Dos Reis BB, de Castro GM, Medalha CC, Viana MB. Effects of chronic corticosterone and imipramine administration on panic and anxiety-related responses. *Braz J Med Biol Res*, 44 (10): 1048-1053, 2011.

DSM-IV^{TR} - Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais. Porto Alegre: Editora Artmed, 2002.

Eckart K, Jahn O, Radulovic J, Radulovic M, Blank T, Stiedl O, Brauns O, Tezval H, Zeyda T, Spiess J. Pharmacology and biology of corticotropin-releasing factor (CRF) receptors. *Receptors Channels*, 8: 163-177, 2002.

España RA, Berridge CW. Organization of noradrenergic efferents to arousal-related basal forebrain structures. *J Comp Neurol*, 496 (5): 668-683, 2006.

Etkin A, Prater KE, Schatzberg AF, Menon V, Greicius MD. Disrupted amygdalar subregion functional connectivity and evidence of a compensatory network in generalized anxiety disorder. *Arch Gen Psychiatry*, 66 (12): 1361-1372, 2009.

Fanselow MS. Neural organization of the behaviour system responsible for fear. *Psychol Bull Rev*, 1: 429-438, 1994.

Fernandez de Molina A, Hunsperger RW. Organization of the subcortical system governing defense and flight reactions in the cat. *J Physiol*, 160: 200-213, 1962.

File, SE. Animal models of different anxiety states. In: Biggio, G. et al. (ed.). *GABA A receptors and anxiety*. New York, Raven Press, 1995.

Fuxe K, Cintra A, Agnati LF, Härfstrand A, Wikstrom AC, Okret S, Zoli M, Miller LS, Greene JL, Gustafsson JA. Studies on the cellular localization and distribution of glucocorticoid receptor and estrogen receptor immunoreactivity in the central nervous system of the rat and their relationship to the monoaminergic and peptidergic neurons of the brain. *J Steroid Biochem*, 27 (1-3): 159-170, 1987.

Galderisi S, Mancuso F, Mucci A, Garramone S, Zamboli R, Maj M. Alexithymia and cognitive dysfunctions in patients with panic disorder. *Psychother Psychosom*, 77 (3): 182-188, 2008.

Gallego X, Murtra P, Zamalloa T, Canals JM, Pineda J, Amador-Arjona A, Maldonado R, Dierssen M. Increased opioid dependence in a mouse modelo of panic disorder. *Front Behav Neurosci*, 3: 60, 2010.

García-Bueno B, Caso JR, Leza JC. Stress as a neuroinflammatory condition in brain: damaging and protective mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev*, 32 (6): 1136-1151, 2008.

Garcia-Leal C, Parente AC, Del-Ben CM, Guimarães FS, Moreira AC, Elias LL, Graeff FG. Anxiety and salivary cortisol in symptomatic and nonsymptomatic panic patients and healthy volunteers performing simulated public speaking. *Psychiatry Res*, 133: (2-3) 239-252, 2005.

Garnier, M., Delamare, V. *Dicionário de termos técnicos de medicina*. 20 ed. São Paulo: Organização Andrei Editora Ltda, 1984.

Glaser R, Kiecolt-Glaser JK. Stress-induced immune dysfunction: implications for health. *Nat Rev Immunol*, 5 (3): 243-251, 2005.

Gold PW, Chrousos GP. Organization of the stress system and its dysregulation in melancholic and atypical depression: high vs. low CRH/NE states. *Molecular Psychiatry*, 7 (3): 254–275, 2002.

Gould E, Tanapat P, McEwen BS, Flugge G, Fuchs E. Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95 (6): 368–371, 1998.

Graeff FG, Brandão ML. *Neurobiologia das Doenças Mentais*. 5 ed. São Paulo: Lemos, 1999.

Graeff FG, Garcia-Leal C, Del-Ben CM, Guimarães FS. Does the panic attack activate the hypothalamic-pituitary-adrenal axis? *An Acad Bras Cienc*, 77 (3): 477-491, 2005.

Graeff FG, Guimarães FS, De Andrade TG, Deakin JF. Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. *Pharmacol Biochem Behav*, 54 (1): 129-141, 1996.

Graeff FG, Netto CF, Zangrossi H Jr. The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. *Neurosci Biobehav Rev*, 23 (2): 237-246, 1998.

Graeff FG, Viana MB, Tomaz C. The elevated T maze, a new experimental model of anxiety and memory: effect of diazepam. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 26 (1): 67-70, 1993.

Graeff FG, Zangrossi H Jr. Animal models of anxiety. In: D'Haenen D, Den Boer JA, Willner P, editors. *Biological Psychiatry*, London: John Wiley & Sons; 879-893, 2002.

Graeff FG, Zangrossi H Jr. The dual role of serotonin in defense and the mode of action of antidepressants on generalized anxiety and panic disorders. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*, 10 (3): 207-217, 2010.

Graeff FG. Ansiedade, pânico e eixo hipotálamo-pituitário-adrenal. *Rev Bras Psiquiatria*, 29 (Supl I): S3-6, 2007.

Graeff FG. Brain defense systems and anxiety. in: Roth M, Burrows GD, Noyes R (eds.), *Handbook of Anxiety*, vol. 3. Amsterdam, Elsevier Science Publishers, 307-354, 1990.

Graeff FG. Neurotransmitters in the periaqueductal gray and animal models of panic anxiety. In: Briley M, File SE, editors. *New Concepts in Anxiety*. London: MacMillan, 288-312, 1991.

Graeff FG, Guimarães F. *Fundamentos de Psicofarmacologia*. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

Graeff FG. Anxiety, panic and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Rev Bras Psiquiatr*, 29 Suppl 1: S3-6, 2007.

Grahn RE, Will MJ, Hammack SE, Maswood S, McQueen MB, Watkins LR, Maier SF. Activation of serotonin-immunoreactive cells in the dorsal raphe nucleus in rats exposed to an uncontrollable stressor. *Brain Res*, 826 (1): 35-43, 1999.

Gray JA, McNaughton N. The neuropsychology of anxiety. Oxford: Oxford University Press; 2001. Panksepp J. Aggression elicited by electrical stimulation of the hypothalamus in albino rats. *Physiol Behav*, 6 (4): 321-329, 1971.

Gray JA, McNaughton N. The neuropsychology of anxiety. Oxford: Oxford University Press; 2001.

Gray JA. The neuropsychology of anxiety. Oxford: Oxford University Press; 1987.

Greenwood BN, Foley TE, Day HE, Campisi J, Hammack SH, Campeau S, Maier SF, Fleshner M. Freewheel running prevents learned helplessness/behavioral depression: role of dorsal raphe serotonergic neurons. *J Neurosci*, 23 (7): 2889-2898, 2003.

Grove G, Coplan JD, Hollander E. The neuroanatomy of 5-HT dysregulation and panic disorder. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 9 (2): 198-207, 1997.

Gurguis GN, Uhde TW. Effect of yohimbine on plasma homovanillic acid in panic disorder patients and normal controls. *Biol Psychiatry*, 28 (4): 292-296, 1990.

Handley, SL, McBlane, JW. 5-HT drugs in animal models of anxiety. *Psychopharmacology*, 112: 13-20, 1993.

Handley SL, Mithani, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists in a maze-exploration model of "fear"-motivated behaviour. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 327: 1-5, 1984.

Härfstrand A, Fuxe K, Cintra A, Agnati LF, Zini I, Wikström AC, Okret S, Yu ZY, Goldstein M, Steinbusch H, et al. Glucocorticoid receptor immunoreactivity in monoaminergic neurons of rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83 (24): 9779-9783, 1986.

Harris RB, Zhou J, Shi M, Redmann S, Mynatt RL, Ryan DH. Over expression of agouti protein and stress responsiveness in mice. *Physiol Behav*, 73 (4): 599-608, 2001.

Hasler G, Fromm S, Alvarez RP, Luckenbaugh DA, Drevets WC, Grillon C. Cerebral blood flow in immediate and sustained anxiety. *J Neurosci*, 27 (23): 6313–6309, 2007.

Hauger RL, Risbrough V, Brauns O, Dautzenberg FM. Corticotropin releasing factor (CRF) receptor signaling in the central nervous system: new molecular targets. *Cns Neurol Disord Drug Targets*, 5 (4): 453-479, 2006.

Herman JP, Cullinan WE. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci*, 20 (2): 78-84, 1997.

Hess WR, Brugger M. Das subkortikale Zentrum der affektiven abwehrreaktion. *Helv Physiol Pharmacol Acta*. 1: 33 – 52, 1943.

Hsu SM, Raine L. Protein A avidin and biotin in immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem*, 29: 1349–1353, 1981.

Hsu SM, Raine L. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody procedures. *J Histochem Cytochem*, 29: 577-580, 1981.

Imaki T, Wang XQ, Shibasaki T, Demura H. Glucocorticoids modulate neuronal activity of CRF gene transcription and CRF production following stress in paraventricular nucleus (PVN) in rats. *Soc. Endocrinol. Abstr*, 32 (2): 261-270, 1994.

Imaki T, Wang XQ, Shibasaki T, Harada S, Chikada N, Takahashi C, Naruse M, Demura H. Chlordiazepoxide attenuates stress-induced activation of neurons, corticotropin-releasing factor (CRF) gene transcription and CRF biosynthesis in the paraventricular nucleus (PVN). *Mol Brain Res*. 32: 261–270, 1995.

Inoue T, Tsuchiya K, Koyama T. Regional changes in dopamine and serotonin activation with various intensity of physical and psychological stress in the rat brain. *Pharmacol Biochem Behav*, 49 (4): 911-920, 1994.

Jacobs BL, Azmitia EC. Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev*, 72 (1): 165-229, 1992.

Jacquet YF, Squires RF. Excitatory amino acids: role in morphine excitation in rat periaqueductal gray. *Behav Brain Res*, 31(1): 85-88, 1988.

Jenck F, Moreau JL, Martin JR. Dorsal periaqueductal gray-induced aversion as a simulation of panic anxiety: elements of face and predictive validity. *Psychiatry Res*, 57: 181-191, 1995.

Joels M, Baram TZ. The neuro-symphony of stress. *Nature Rev Neurosci*, 10: 459-66, 2009.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. *Princípios da neurociências*. 4 ed. São Paulo: Manole, 2003.

Klein DF. False suffocation alarms, spontaneous panics, and related conditions. An integrative hypothesis. *Arch Gen Psychiatry*, 50 (4): 306-317, 1993.

Kostich WA, Chen A, Sperle K, Largent BL. Molecular identification and analysis of a novel human corticotropin-releasing factor (CRF) receptor: the CRF2 gamma receptor. *Mol Endocrinol*, 12: 1077-1085, 1998.

Lanfumeij L, Mongeau R, Cohen-Salmon C, Hamon M. Corticosteroid-serotonin interactions in the neurobiological mechanisms of stress-related disorders. *Neurosc Biobehav Rev*, 32: 1174-1184, 2008.

Ledoux JE. Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci*, 23: 155-184, 2000.

Ledoux JE. Fear and the brain: where have we been, and where are we going? *Biol Psychiatry*, 44: 1229–1238, 1998.

Lent, R. Cem bilhões de neurônios: Conceitos fundamentais de neurociências. 2 ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2010.

Lim LW, Blokland A, Visser-Vandewalle V, Vlamings R, Sesia T, Steinbusch H, Schruers K, Griez E, Temel Y. High-frequency stimulation of the dorsolateral periaqueductal gray and ventromedial hypothalamus fails to inhibit panic-like behaviour. *Behav Brain Res*, 193 (2): 197-203, 2008.

Lindauer RJ, Olf M, van Meijel EP, Carlier IV, Gersons BP. Cortisol, learning, memory, and attention in relation to smaller hippocampal volume in police officers with posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry*, 59 (2): 171-177, 2006.

Lovenberg TW, Liaw CW, Grigoriadis DE, Clevenger W, Chalmers DT, De Souza EB, Oltersdorf T. Cloning and characterization of a functionally distinct corticotrophin-releasing factor receptor subtype from rat brain. *Proc Natl Acad Sci Usa*, 92: 840-856, 1995.

Lowry CA, Hale MW, Evans AK, Heerkens J, Staub DR, Gasser PJ, Shekhar A. Serotonergic systems, anxiety, and affective disorder: focus on the dorsomedial part of the dorsal raphe nucleus. *Ann N Y Acad Sci*, 1148: 86-94, 2008.

Lowry CA, Johnson PL, Hay-Schmidt A, Mikkelsen J, Shekhar A. Modulation of anxiety circuits by serotonergic systems. *Stress*, 8 (4): 233-246, 2005.

Lupien S, Lecours AR, Lussier I, Schwartz G, Nair NP, Meaney MJ. Basal cortisol levels and cognitive deficits in human aging. *J Neurosci*, 14 (5): 2893–2903, 1994.

MacNeil G, Sela Y, McIntosh J, Zacharko RM. Anxiogenic behavior in the light-dark paradigm following intraventricular administration of cholecystokinin-8S, restrain stress, or uncontrollable footshock in the CD-1 mouse. *Pharmacol Biochem Behav*, 58 (3): 737-746, 1997.

Magarinos AM, McEwen BS, Flügge G, Fuchs E.. Chronic psychosocial stress causes apical dendritic atrophy of hippocampal CA3 pyramidal neurons in subordinate tree shrews. *J Neurosci*, 16 (10): 3534-3540, 1996.

Mason JW. A historical view of stress field. *J Hum Stress*, 1: 6-12, 1975.

Maswood S, Barter JE, Watkins LR, Maier SF. Exposure to inescapable but not escapable shock increases extracellular levels of 5-HT in the dorsal raphe nucleus of the rat. *Brain Res*, 783 (1): 115-120, 1998.

McNaughton N, Corr PJ. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. *Neurosci Biobehav Rev*, 28: 285-305, 2004.

McNaughton N, Gray JA. Anxiolytic action on the behavioural inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety. *J Affect Disord*, Dec 61 (3): 161-176, 2000.

Merchenthaler I. Corticotropin releasing factor (CRF)-like immunoreactivity in the rat central nervous system. Extrahypothalamic distribution. *Peptides*, 5: 53–69, 1984.

Merchenthaler I, Vigh S, Petrusz P, Schally AV. Immunocytochemical localization of corticotrophin-releasing factor (CRF) in the rat brain. *Am. J. Anat*, 165 (4): 385-396, 1982.

Moreau JL, Bourson A, Jenck F, Martin JR, Mortas, P. Curative effects of the atypical antidepressant Mianserin in the chronic mild stress-induced anhedonia model of depression. *Journal of psychiatry and neuroscience*, 19: 51-56, 1994.

Morilak DA, Cecchi M, Khoshbouei H. Interactions of norepinephrine and galanin in the central amygdala and lateral bed nucleus of the stria terminalis modulate the behavioral response to acute stress. *Life Sci*, 73 (6): 715-726, 2003.

Morimoto M, Morita N, Ozawa H, Yokoyama K, Kawata M. Distribution of glucocorticoid receptor immunoreactivity and mRNA in the rat brain: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Neurosci Res*, 26: 235–269, 1996.

Muñoz-Aldellán C, Daviu N, Rabasa C, Nadal R, Armario A. Cat odor causes long-lasting contextual fear conditioning and increased pituitary-adrenal activation without modifying anxiety. *Hormones and behavior*, 56: 465-471, 2009.

Murray F, Smith DW, Hulson PH. Chronic low dose corticosterone exposure decreased hippocampal cell proliferation, volume and induced anxiety and depression like behaviours in mice. *European Journal of Pharmacology*, 583 (1): 115-127, 2008.

Nashold BS Jr, Wilson WP, Slaughter DG. The midbrain and pain. In: Bonica JJ, editor. *Advances in Neurology*. New York: Raven press, 191-196, 1974.

Newman AE, Soma KK. Corticosterone and dehydroepiandrosterone in songbird plasma and brain: effects of season and acute stress. *Eur J Neurosci*, 29 (9): 1905-1914, 2009.

Neylan, T.C, Hans S. The Field Of Stress Research. *Neuropsychiatry Class*. 10 (2): 230-231. 1998.

Nutt DJ, George DT. Serotonin and Anxiety. In: Burrows GD, Roth M, Noyes Jr. R, eds., *Handbook of Anxiety, The Neurobiology of Anxiety*. Vol. 3, Amsterdam, Elsevier Science Publishers, 189-221, 1990.

Nutt DJ. Altered central alpha 2-adrenoceptor sensitivity in panic disorder. *Arch Gen Psychiatry*, 46 (2): 165-169, 1989.

Ongür D, Price JL. The organization of networks within the orbital and medial prefrontal cortex of rats, monkeys and humans. *Cereb Cortex*, 10 (3): 206-219, 2000.

Padovan CM, Guimarães FS. Restraint-induced hypoactivity in an elevated plus-maze. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 33: 79-83, 2000.

Pan Y, Zhangk WYI, Xiak X, Kong, LD. Effects of icariin on hypothalamic-pituitary-adrenal axis action and cytokine levels in stressed Sprague-Dawley rats. *Biol Pharm Bull*, 29 (12): 2399-2403, 2006.

Panksepp J. Aggression elicited by electrical stimulation of the hypothalamus in albino rats. *Physiol Behav*, 6 (4): 319-321, 1974.

Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 6 ed. Elsevier: Academic Press, 2009.

Pei Q, Zetterström T, Fillenz M. Tail pinch-induced changes in the turnover and release of dopamine and 5-hydroxytryptamine in different brain regions of the rat. *Neuroscience*, 35 (1): 133-138, 1990.

Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*, 14 (3): 149-167, 1985.

Pereira, MEC. Kraepelin e a questão da manifestação clínica das doenças mentais. *Revista latino-americana de psicopatologia fundamental*. 12 (1): 161-166, 2009.

Pereira, MEC. Mudanças nos conceitos de ansiedade. In: HETEM, L.A.B.; GRAEFF, F.G. (Editores.). *Ansiedade e Transtornos de Ansiedade*. Rio de Janeiro: Editora Científica Nacional, 1997.

Petrusz P, Merchenthaler I, Maderdrut JL, Heitz PU. Central and peripheral distribution of corticotropin-releasing factor. *Fed. Proc, Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 44: 229-235, 1985.

Poltronieri SC, Zangrossi Jr H, Viana MB. Antipanic-like effect of serotonin reuptake inhibitors in the elevated T-maze. *Behav Brain Res*, 147: 185-192, 2003.

Protopopescu X, Pan H, Tuescher O, Cloitre M, Goldstein M, Engelien A, Yang Y, Gorman J, LeDoux J, Stern E, Silbersweig D. Increased brainstem volume in panic disorder: a voxel-based morphometric study. *Neuroreport*, 17 (4): 361-363, 2006.

Redmond DE Jr. The possible role of locus ceruleus noradrenergic activity in anxiety-panic. *Clin Neuropharmacol*, 9 Suppl 4: 40-2, 1986.

Ruiz JE, Barbosa JN, Schoedl AF, Mello MF. Psychoneuroendocrinology of posttraumatic stress disorder. *Rev Bras Psiquiatr*, 29 (Supl I): S7-12, 2007.

Sah P, Faber ESL, Lopez De Armentia M, Power J. The Amygdaloid Complex: Anatomy and Physiology. *PhysiolRev*, 83 (3): 803-834, 2003.

Sairanen M, Lucas G, Ernfors P, Castrén M, Castrén E. Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant drugs have different but coordinated effects on neuronal turnover, proliferation, and survival in the adult dentate gyrus. *The journal of neuroscience*, 25 (5): 1089 – 1094, 2005.

Santos JM, Macedo CE, Brandão ML. Gabaergic mechanisms of hypothalamic nuclei in the expression of conditioned fear. *Neurobiol Lear Mem*, 560-568, 2008.

Sapolsky RM. Depression, antidepressants, and the shrinking hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 98 (22): 12320–12322, 2001.

Sawchenko PE, Yuan ZF, Laplante R, Rissman RA, Bittencourt JC. Corticotropin-releasing factor hormone: integration of adaptive responses to stress. *Encyclopedia of neuroscience*, 3: 239-245, 2009.

Schmitt P, Di Scala G, Brandão ML, Karli P. Behavioral effects of microinjections of SR 95103, a new GABA-A antagonist, into the medial hypothalamus or the mesencephalic central gray. *Eur J Pharmacol*, 117 (2): 149-158, 1985.

Schulkin J, Morgan MA, Rosen JB. A neuroendocrine mechanism for sustaining fear. *Trends in Neurosciences*, 28 (12): 629-635, 2005.

Selye, H. A syndrome produced by diverse noxious agents. *Nature*. 138: 32-38, 1936.

Sena LM, Bueno C, Pobbe RL, Andrade TG, Zangrossi H Jr, Viana MB. The dorsal raphe nucleus exerts opposed control on generalized anxiety and panic-related defensive responses in rats. *Behav Brain Res*, 142: 125-133, 2003.

Shekhar A, Keim SR. LY354740, a potent group II metabotropic glutamate receptor agonist prevents lactate-induced panic-like response in panic-prone rats. *Neuropharmacology*, 39 (7): 1139-1146, 2000.

Shekhar A, Keim SR. The circumventricular organs form a potential neural pathway for lactate sensitivity: implications for panic disorder. *J Neurosci*, 17 (24): 9726-9735, 1997.

Shin LM, Liberzon I. The neurocircuitry of fear, stress and anxiety disorders. *Neuropsychopharmacology*, 35 (1): 169-191, 2010.

Silva P. *Farmacologia*. 7^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

Silveira MC, Sandner G, Graeff FG. Induction of Fos immunoreactivity in the brain by exposure to the elevated plus-maze. *Behav Brain Res*, 56: 115-118, 1993.

Silveira MC, Zangrossi H, de Barros Viana M, Silveira R, Graeff FG. Differential expression of Fos protein in the rat brain induced by performance of avoidance or escape in the elevated T-maze. *Behav Brain Res*, 126 (1-2): 13-21, 2001.

Silveira MCL, Graeff FG. Defense reaction elicited by microinjection of kainic acid into the medial hypothalamus of the rat: antagonism by a GABAA receptor agonist. *Behav Neural Biol*, 57 (3): 226-232, 1992.

Singewald N, Sharp T. Neuroanatomical targets of anxiogenic drugs in the hindbrain as revealed by Fos immunocytochemistry. *Neuroscience*, 98 (4): 759-770, 2000.

Smagin GN, Harris RB, Ryan DH. Corticotropin-releasing factor receptor antagonist infused into the locus ceruleus attenuates immobilization stress-induced defensive withdrawal in rats. *Neurosci Lett*, 220 (3): 167-170, 1996.

Sousa N, Lukoyanov NV, Madeira MD, Almeida OF, Paula-Barbosa MM. Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. *Neuroscience*, 97 (2): 253–266, 2000.

Southwick SM, Bremner D, Krystal JH, Charney DS. Psychobiologic research in post-traumatic stress disorder. *Psychiatr Clin North Am*, 17 (2): 251-264, 1994.

Sterrenburg L, Gaszner B, Boerrigter J, Santbergen L, Bramini M, Roubos EW, Peeters BW, Kozicz T. Sex-dependent and differential responses to acute restraint stress of corticotropin-releasing factor-producing neurons in the rat paraventricular nucleus, central amygdala, and bed nucleus of the stria terminalis. *J Neurosci Res*, 90 (1): 179-192, 2012.

Stones A, Groome D, Perry D, Hucklebridge F, Evans P. The effect of stress on salivary cortisol in panic disorder patients. *J Affect Disord*. Jan-Mar 52 (1-3): 197-201, 1994.

Sullivan GM, Coplan JD, Kent JM, Gorman JM. The noradrenergic system in pathological anxiety: a focus on panic with relevance to generalized anxiety and phobias. *Biol Psychiatry*, 46 (9): 1205-1218, 1999.

Swanson LW, Sawchenko PE, Rivier J, Vale W. The organization of ovine corticotropin-releasing factor (CRF) immunoreactive cells and fibres in the rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroendocrinology*, 36: 165- 186, 1983.

Szabo ST, de Montigny C, Blier P. Progressive attenuation of the firing activity of locus coeruleus noradrenergic neurons by sustained administration of selective serotonin reuptake inhibitors. *Int J Neuropsychopharmacol*, 3 (1): 1-11, 2000.

Teixeira RC, Zangrossi H, Graeff FG. Behavioral effects of acute and chronic imipramine in the elevated T-maze model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav*, 65: 571-576, 2000.

Terleph TA, Klein RG, Roberson-Nay R, Mannuzza S, Moulton JL 3rd, Woldehawariat G, Guardino M, Pine DS. Stress responsivity and HPA axis activity in juveniles: results from a home-based CO₂ inhalation study. *Am J Psychiatry*, 163 (4): 738-740, 2006.

Titze-De-Almeida R, Shida H, Guimarães FS, Del-Bel EA. Stress-induced expression of c-fos proto-oncogene in the hippocampal formation. *Braz J Med Biol Res*, 27: 1087-1088, 1994.

Tye KM, Prakash R, Kim SY, Fenno LE, Grosenick L, Zarabi H, Thompson KR, Gradinaru V, Ramakrishnan C, Deisseroth K. Amygdala circuitry mediating reversible and bidirectional control of anxiety. *Nature*, 471 (7338): 358-362, 2011.

Ulrich-Lai YM, Herman JP. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nature Reviews Neuroscience*, 10: 397-409, 2009.

Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier J. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotrophin and B-endorphin. *Science*, 13: 1394-1397, 1981.

Van Duinen MA, Schruers KR, Maes M, Griez EJ. CO2 challenge induced HPA axis activation in panic. *Int J Neuropsychopharmacol*, 10 (6): 797-804, 2007.

Viana MB, Tomaz CAB, Graeff FG. The elevated T-maze: a new animal model of anxiety and memory. *Pharmacol Biochem Behav*, 49: 549–554, 1994.

Viana MB, Zangrossi H Jr, Onusic GM. 5-HT1A receptors of the lateral septum regulate inhibitory avoidance but not escape behavior in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 89: 360-366, 2008.

Watanabe Y, Gould E, McEwen BS. Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Brain Research*, 588 (2): 341-345, 1992.

Wong ML, Licinio J. From monoamines to genomic targets: a paradigm shift for drug discovery in depression. *Nat Rev Drug Discov*, 3: 136–151, 2004.

Yan XX, Toth Z, Schultz L, Ribak CE, Baram TZ. Corticotropin-releasing hormone (CRH) – containing neurons in the immature rat hippocampal formation: light and electron microscopic features and colocalization with glutamate decarboxylase and parvalbumin. *Hippocampus*, 8 (3): 231-243, 1998.

Zangrossi H Jr, Viana MB, Graeff FG. Anxiolytic effect of intra-amygdala injection of midazolam and 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin in the elevated T-maze. *Eur J Pharmacol*, 369 (3): 267-270, 1999.

Zangrossi H Jr, Graeff FG. Behavioral validation of the elevated T-maze, a new animal model of anxiety. *Brain Res Bull*, 44 (1): 1-5, 1997.

ABSTRACT

Results from a previous study show that rats exposed to acute restraint display anxiogenic-like behavior, evidenced by facilitation of avoidance responses in the elevated T-maze (ETM) model of anxiety. In contrast, escape responses were unaltered by stress exposure. Since ETM avoidance and escape tasks seem to activate distinct sets of brain structures, it is possible that the differences observed with acute restraint are due to particularities in the neurobiological mechanisms which modulate these responses. In the present study, analysis of *fos* protein immunoreactivity (*fos-ir*) was used to map areas activated by exposure of male Wistar rats to restraint stress (30 min) previously (30 min) to the ETM. Corticosterone levels were also measured in stressed and non-stressed animals. Confirming previous observations restraint facilitated avoidance performance, an anxiogenic result, while leaving escape unaltered. Performance of the avoidance task increased *fos-ir* in the frontal cortex, intermediate lateral septum, basolateral amygdala, basomedial amygdala, lateral amygdala, anterior hypothalamus and dorsal raphe nucleus. In contrast, performance of escape increased *fos-ir* in the ventromedial hypothalamus, dorsolateral periaqueductal gray and *locus ceruleus*. Both behavioral tasks also increased *fos-ir* in the dorsomedial hypothalamus. Restraint significantly raised corticosterone levels. Additionally after restraint, *fos-ir* was predominantly seen in the basolateral amygdala and dorsal raphe of animals submitted to the avoidance task. This data confirms that different sets of brain structures are activated by ETM avoidance and escape tasks and suggests that acute restraint differently alters ETM behavior and the pattern of *fos* activation in the brain.