

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara
Departamento de Fármacos e Medicamentos

RELATÓRIO CIENTÍFICO

Envolvimento da neurotransmissão CRFérgica na lateralização funcional do córtex pré-frontal medial (CPFm) nas respostas cardiovasculares e comportamental observadas no modelo de medo condicionado ao contexto.

Bolsista: Dr. Lucas Gomes de Souza
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP Araraquara/SP, Laboratório de Farmacologia;

Supervisor: Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP Araraquara/SP, Laboratório de Farmacologia.

Araraquara – SP

2026

LUCAS GOMES DE SOUZA

Envolvimento da neurotransmissão CRFérgica na lateralização funcional do córtex pré-frontal medial (CPFm) nas respostas cardiovasculares e comportamental observadas no modelo de medo condicionado ao contexto.

Relatório de Pós-doutorado realizado na Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – FCF/UNESP Araraquara-SP.

Supervisor Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani.

FAPESP, nº processo: 2020/11827-7

Araraquara – SP

2026

RESUMO DO PLANO INICIAL

O córtex pré-frontal medial (CPFm) é uma estrutura límbica que está envolvida na expressão de respostas fisiológicas e comportamentais à estímulos aversivos condicionados, incluindo aqueles desencadeadas pelo medo condicionado ao contexto (MCC). Entretanto, os mecanismos neuroquímicos locais no CPFm envolvidos no controle das respostas ao MCC não são completamente compreendidos. Neste sentido, foram relatadas a presença de peptídeos do sistema do fator de liberação de corticotrofina (do inglês, CRF) em interneurônios gabaérgicos e terminais axônicos, bem como dos receptores CRFérgicos, no CPFm. Apesar das evidências de que estímulos aversivos ativam neurônios que expressam CRF e aumentam a liberação local de CRF no CPFm, um papel desse mecanismo neuroquímico no controle das respostas cardiovasculares e de congelamento do MCC pelo CPFm nunca foi reportado. *Desse modo, uma primeira hipótese a ser investigada no presente estudo é que o controle das respostas cardiovasculares e de congelamento do MCC pelo CPFm é mediado pela neurotransmissão CRFérgica local.* Outro aspecto relevante em relação ao CPFm são as evidências de lateralização funcional no controle das respostas à estímulos aversivos. Nesse sentido, resultados de estudos prévios indicaram que o CPFm direito (CPFmD) parece estar mais diretamente relacionado com o controle das respostas fisiológicas e comportamentais durante situações de estresse, ao passo que o CPFm esquerdo (CPFmE) teria um papel contra-regulatório ao inibir o CPFmD. Apesar dessas evidências, uma possível lateralização no controle das respostas do MCC pelo CPFm nunca foi documentada. *Nesse sentido, uma segunda hipótese a ser testada no presente estudo é que o controle das respostas de congelamento e cardiovasculares do MCC pelo CPFm ocorra de maneira lateralizada.* Nós também avaliaremos o papel da neurotransmissão CRFérgica em uma eventual lateralização do controle das respostas ao MCC pelo CPFm. Foi também relatado uma lateralização nas consequências morfológicas no CPFm decorrentes da exposição crônica à estímulos estressores, de modo que o CPFmE parece ser mais acometido. É também bem descrito na literatura que a exposição a estressores crônicos antes do treinamento em modelos de condicionamento aumenta a memória de medo e, conseqüentemente, as respostas defensivas condicionadas. Apesar do envolvimento da neurotransmissão CRFérgica no CPFm na influência do estresse crônico nas respostas aversivas condicionadas nunca ter sido reportado, a hipótese de uma participação desse mecanismo neuroquímico do CPFm é suportada por um estudo recente

que observou que o aumento na resposta condicionada de congelamento em animais submetidos a um protocolo de estresse crônico variado (ECV) foi acompanhado de elevação nos níveis de RNA mensageiro do receptor CRF₁ no CPFm. Assim, uma última hipótese a ser investigada é que a neurotransmissão CRFérgica no CPFm está envolvida nas alterações morfológicas locais e na facilitação das respostas ao MCC decorrentes da exposição prévia a um protocolo de ECV, e essa participação ocorre de maneira lateralizada. Diante do exposto, os objetivos da presente proposta são: (1) investigar se o controle exercido pelo CPFm das respostas de congelamento e cardiovasculares observadas no MCC ocorre de maneira lateralizada; (2) caracterizar o papel da neurotransmissão CRFérgica no CPFm no controle das respostas de congelamento e cardiovasculares ao MCC; e investigar se esse controle ocorre de maneira lateralizada; e (3) avaliar o envolvimento da neurotransmissão CRFérgica no CPFm nas alterações morfológicas locais e das respostas de congelamento e cardiovasculares do MCC induzidas pela exposição a um protocolo de ECV; e avaliar se esses efeitos ocorrem de maneira lateralizada.

RESUMO DO PRESENTE RELATÓRIO

No período referente ao presente relatório nós investigamos se o controle exercido pelo córtex pré-frontal medial (CPFm) das respostas de congelamento e cardiovasculares desencadeadas pelo medo condicionado ao contexto (MCC) ocorre de maneira lateralizada (*objetivo 1 da proposta inicial*). Desse modo, para a avaliação de uma lateralização funcional no envolvimento do CPFm na expressão das respostas cardiovasculares e de congelamento ao MCC, nós realizamos microinjeções de CoCl_2 (inibidor sináptico não-seletivo, 1 mM/100 nL) bilateralmente ou unilateralmente nos hemisférios direito ou esquerdo do CPFm 10 minutos antes da sessão teste do protocolo de MCC. Com relação aos efeitos da microinjeção bilateral de CoCl_2 no CPFm, nós observamos que esse tratamento reduziu as respostas de aumento da pressão arterial e frequência cardíaca e o comportamento de congelamento durante a reexposição ao contexto condicionado aversivamente, mas sem alterar significativamente a queda da temperatura cutânea da cauda. A microinjeção unilateral de CoCl_2 no hemisfério direito do CPFm também reduziu a resposta comportamental de congelamento, porém sem afetar as respostas cardiovasculares e a queda da temperatura cutânea da cauda durante a reexposição ao contexto condicionado aversivamente. No entanto, a microinjeção unilateral de CoCl_2 no hemisfério esquerdo do CPFm não afetou nenhuma das respostas desencadeadas pelo MCC avaliadas no presente estudo.

Durante o período referente ao presente relatório nós também executamos experimentos referentes ao estudo do envolvimento da neurotransmissão local do fator de liberação de corticotrofina (do inglês, CRF) no controle das respostas do MCC pelo CPFm (*objetivo 2 da proposta inicial*). Nesse sentido, foi investigado os efeitos da microinjeção bilateral ou unilateral no CPFm de antagonistas seletivos do receptor CRF_1 (CP376395, 5 nmol/100nL) ou CRF_2 (antisauvagine-30, 5nmol/100nL) sobre a ativação neuronal local em animais expostos ao protocolo de MCC. Nós identificamos que o tratamento bilateral do CPFm com os antagonistas seletivos dos receptores CRF_1 ou CRF_2 não afetou o número de células locais positivas para a proteína Fos. No entanto, o tratamento unilateral no hemisfério esquerdo do CPFm tanto com o antagonista seletivo do receptor CRF_1 quanto com o antagonista seletivo do receptor CRF_2 aumentou o número local de células marcadas com a proteína Fos ipsilateralmente (mas não contralateralmente) em relação ao sítio de injeção; ao passo que o antagonismo do receptor CRF_2 , mas não do receptor CRF_1 , no hemisfério direito aumentou a ativação neuronal local ipsilateral. Além disso, nós observamos que o tratamento bilateral do

CPFm ventral com antisauvagine-30 (antagonista seletivo do receptor CRF₂) aumentou a expressão do comportamento de congelamento durante a reexposição ao contexto condicionado aversivamente, ao passo que a microinjeção bilateral de CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF₁) reduziu a resposta pressora ao MCC. A microinjeção unilateral de antisauvagine-30 no hemisfério esquerdo do CPFm ventral também aumentou a expressão do comportamento de congelamento durante a reexposição ao contexto condicionado aversivamente, ao passo que o antagonismo tanto do receptor CRF₁ quanto do receptor CRF₂ unilateralmente no CPFm esquerdo reduziram a resposta taquicárdica. Nós apresentamos também dados preliminares referentes ao efeito do antagonismo unilateral do receptor CRF₁ no hemisfério direito.

Além das atividades diretamente relacionadas ao desenvolvimento do projeto, durante o período o bolsista também participou da Reunião Anual da Society for Neuroscience (Neuroscience 2024) realizado em Chicago/Illinois/EUA no período de 05 a 09 de outubro de 2024, em que foi apresentado parte dos resultados obtidos no período na forma de PÔSTER (o certificado de participação e apresentação foi anexado em “outros documentos”). O bolsista também realizou visita técnica nos dias 10 e 11 de outubro de 2024 ao laboratório do Dr. James P. Heman do Departamento de Farmacologia, Fisiologia e Neurobiologia da Universidade de Cincinnati (Cincinnati, OH, EUA) (declaração de visita técnica foi anexada em “outros documentos”). O bolsista também participou do XLVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento (SBNeC 2024), realizado em Águas de Lindóia/São Paulo/Brasil no período de 28 de outubro a 01 de novembro de 2024, em que apresentou parte dos resultados obtidos no período em um módulo temático como PALESTRANTE; além de ter atuado como avaliador de pôsteres (o certificado de participação e apresentação foi anexado em “outros documentos”). Por fim, cabe salientar que além da descrição das atividades desenvolvidas pelo bolsista no período, o presente relatório também descreve estratégia para conclusão de todos os experimentos e análises apresentados na proposta inicial e que não puderam ser concluídos durante a vigência da bolsa (para detalhes, ver seção DIFICULDADES ENCONTRADAS NO PERÍODO).

1. INTRODUÇÃO

Reações de defesa são geradas durante situações aversivas com o objetivo da sobrevivência e manutenção da homeostasia (Crestani, 2016a; Deakin; Graeff, 1991; McEwen, 2017; Santos; Castro, 1998; Sterling, 2012; Ulrich-Lai; Herman, 2009). As reações de defesa incluem respostas fisiológicas e comportamentais (Kozłowska et al., 2015; Roelofs, 2017; Roelofs; Dayan, 2022). Entre as alterações fisiológicas podemos destacar a ativação do eixo hipófise-pituitária-adrenal (HPA) (Herman et al., 2016; Herman; Tasker, 2016; Ulrich-Lai; Herman, 2009), aumento da atividade simpática, da pressão arterial e da frequência cardíaca; redistribuição do fluxo sanguíneo (redução da perfusão cutânea e visceral e aumento do fluxo sanguíneo para a musculatura esquelética) e alteração na atividade do barorreflexo (Crestani, 2016b; Dampney, 2015; Kozłowska et al., 2015). A diminuição do fluxo sanguíneo para a pele reduz a temperatura cutânea durante situações aversivas (Busnardo et al., 2013; Gomes-de-Souza et al., 2016, 2020; Vianna; Carrive, 2005). As respostas comportamentais dependem das características do estímulo aversivo e do ambiente (por exemplo, distância do estímulo aversivo e presença de rotas de fuga) e de traços individuais (grau de agressividade e vulnerabilidade para ansiedade) e incluem, por exemplo, congelamento, luta ou fuga e imobilidade tônica (Canteras et al., 2010; Kozłowska et al., 2015; Roelofs, 2017).

Um modelo que tem sido utilizado para o estudo das reações de defesa é o medo condicionado ao contexto (MCC) (Fanselow, 1980; Maren; Phan; Liberzon, 2013; Ressler et al., 2022). O modelo de MCC é baseado no condicionamento Pavloviano clássico, de modo a consistir no pareamento de um estímulo neutro (nesse caso sendo o contexto, mas podendo também ser som ou luz) com um estímulo aversivo (por exemplo, choque nas patas) (Fanselow, 1980; Maren; Phan; Liberzon, 2013; Ressler et al., 2022; Resstel et al., 2006a, 2008a; Resstel; Correa; Guimarães, 2007). Desse modo, a reexposição ao local onde foi realizado o pareamento (isto é, o contexto) desencadeia reações de medo, que incluem respostas fisiológicas e comportamentais condicionadas (Fanselow, 1980; Resstel et al., 2006a, 2008a). Nesse sentido, durante a reexposição ao contexto condicionado aversivamente o animal não tem a possibilidade de fuga, o que acarreta a emissão de respostas condicionadas consistindo de congelamento (imobilidade, com exceção dos movimentos relacionados à respiração) (Fanselow, 1980, 2000; Resstel et al., 2006a), aumento da pressão arterial e frequência cardíaca, aumento da temperatura corporal e queda da temperatura cutânea (devido à vasoconstrição nos leitos vasculares

cutâneos) (Carrive, 2000; Kozłowska et al., 2015; Resstel et al., 2006a; Vianna; Carrière, 2005).

Por se tratar de um modelo que envolve aprendizado e memória, diversas estruturas telencefálicas estão envolvidas na expressão das respostas condicionadas, incluindo o córtex pré-frontal medial (CPFm) (Canteras; Graeff, 2014; Canteras et al., 2010; Giustino; Maren, 2018; Howland et al., 2022; Johnstone et al., 2007b; Marek; Sun; Sah, 2019; Rozeske et al., 2015). O CPFm é uma região cortical límbica subdividido em quatro sub-regiões: o córtex cingulado anterior (CCA), o córtex pré-límbico (PL), o córtex infra-límbico (IL) e o peduncular dorsal (Groenewegen, 1988; McKlveen; Myers; Herman, 2015; McKlveen et al., 2019; Wellman; Bollinger; Moench, 2020; Wree et al., 1985). O CPFm é composto por cerca de 80% de neurônios piramidais excitatórios e cerca de 20% de interneurônios inibitórios (Douglas; Martin, 1990; Gabbott et al., 1997; McKlveen; Myers; Herman, 2015). A porção ventral do CPFm, que inclui as regiões PL e IL, possui conexões com estruturas envolvidas no controle de funções límbicas e de respostas autônomas e comportamentais (Gabbott et al., 1997; Hurley et al., 1991; McDonald; Mascagni; Guo, 1996; Neafsey; Hurley-Gius; Arvanitis, 1986; Takagishi; Chiba, 1991; Van Der Kooy et al., 1982; Vertes, 2004), de modo que o CPFm ventral tem sido implicado no controle das respostas fisiológicas e comportamentais durante situações aversivas (McDougall; Widdop; Lawrence, 2005; McKlveen; Myers; Herman, 2015; McKlveen et al., 2019; Resstel; Corrêa, 2006; Ulrich-Lai; Herman, 2009; Vidal-Gonzalez et al., 2006). Neste sentido, foi reportado aumento no número de células positivas para a proteína Fos (um marcador de ativação neuronal) no CPFm ventral em ratos expostos ao MCC (Beck; Fibiger, 1995; Lemos; Resstel; Guimarães, 2010), o que sugere a participação dessa estrutura cortical na expressão de respostas emocionais condicionadas. De acordo, outros estudos demonstraram que a lesão química ou a inibição sináptica não-seletiva com CoCl_2 do CPFm ventral resultaram em redução das respostas pressora, taquicárdica e de congelamento desencadeadas pelo medo condicionado ao contexto e ao som (Fryszak; Neafsey, 1994a; Resstel et al., 2006a). Apesar das evidências do envolvimento de vários mecanismos neuroquímicos no CPFm nas respostas comportamentais e cardiovasculares ao MCC (incluindo as neurotransmissões colinérgica, glutamatérgica, nitrérgica, endocanabinóide e endovanilóide) (Ferreira-Junior et al., 2012a; Lisboa et al., 2010b; Resstel; Correa; Guimarães, 2007; Terzian; Micale; Wotjak, 2014), os mecanismos neuroquímicos locais no CPFm envolvidos no controle dessas respostas ainda não são completamente compreendidos.

O fator de liberação de corticotrofina (CRF – do inglês “*corticotropin-releasing factor*”) é um peptídeo composto por 41 aminoácidos produzido a partir da clivagem de um peptídeo de 194 aminoácidos (Dedic; Chen; Deussing, 2018; Spiess et al., 1981). O CRF foi inicialmente identificado como um hormônio hipotalâmico do eixo HPA que atua estimulando a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) a partir da adeno-hipófise (Vale et al., 1981). Entretanto, estudos posteriores identificaram a neurotransmissão CRFérgica (isto é, a expressão de CRF e de seus receptores) em diversas estruturas encefálicas, e esse mecanismo neuroquímico encefálico foi descrito atuar na modulação de respostas emocionais como a ansiedade e a depressão, da função cardiovascular, da atividade autônoma e locomotora, de respostas cognitivas e memória e aprendizado (Dedic; Chen; Deussing, 2018; Deussing; Chen, 2018; Gao; Gao, 2019; Henckens et al., 2017).

O sistema CRFérgico possui dois receptores metabotrópicos denominados CRF₁ e CRF₂, nos quais atuam principalmente a partir da proteína Gs estimulando a via de sinalização adenilato ciclase/AMPc/PKA (Chang et al., 1993; Chen et al., 1993; Lovenberg et al., 1995; Perrin et al., 1995; Schreiber; Gilpin, 2018; Vita et al., 1993). Além do CRF, o sistema CRFérgico inclui outros três peptídeos: a urocortina 1 (UCN₁), a urocortina 2 (UCN₂) e a urocortina 3 (UCN₃) (Bale; Vale, 2004; Dedic; Chen; Deussing, 2018; Hostetler; Ryabinin, 2013; Jahn et al., 2004; Schreiber et al., 2019; Schreiber; Gilpin, 2018). O neuropeptídeo CRF possui maior afinidade ao receptor CRF₁, a UCN₁ tem afinidade similar à ambos os receptores, ao passo que a UCN₂ e a UCN₃ ligam-se seletivamente ao receptor CRF₂ (Dedic; Chen; Deussing, 2018; Deussing; Chen, 2018; Hauger et al., 2003). Além dos dois receptores, os efeitos dos peptídeos do sistema CRF são também modulados por uma proteína denominada *proteína de ligação do CRF (PL-CRF)* (Behan et al., 1996; Westphal; Seasholtz, 2006), que parece atuar principalmente limitando a biodisponibilidade dos peptídeos do sistema CRFérgico (Deussing; Chen, 2018; Ketchesin; Huang; Seasholtz, 2017), apesar de outros efeitos, incluindo modulação da ativação dos receptores CRF, também terem sido descritos (Ketchesin; Huang; Seasholtz, 2017).

Estudos demonstraram uma ampla distribuição da neurotransmissão CRFérgica no encéfalo, incluindo no CPFm (Dedic; Chen; Deussing, 2018; Deussing; Chen, 2018). Nesse sentido, o neuropeptídeo CRF foi identificado em interneurônios GABAérgicos no córtex (Gallopin et al., 2006a; Kubota et al., 2011; Mardinly et al., 2016), incluindo no CPFm (Chen et al., 2020), bem como em terminais no CPFm oriundos de outras áreas

(Crawley et al., 1985; Swanson et al., 1983). Terminais imunorreativos para a UCN₁ foram também identificados esparsamente nas regiões PL e IL do CPFm (Bittencourt et al., 1999). Com relação aos receptores, foi reportado que o CPFm de roedores expressa predominantemente o receptor CRF₁ (Chalmers; Lovenberg; De Souza, 1995; Chan; Vale; Sawchenko, 2000; Tan et al., 2017a; Van Pett et al., 2000), porém foi reportada a presença do receptor CRF₂ no córtex pré-frontal (Carboni et al., 2018; Guan et al., 2014). A expressão de ambos os receptores foi também identificada no córtex pré-frontal de primatas não-humanos e humanos (Merali, 2004; Sánchez et al., 1999). O receptor CRF₁ foi demonstrado ser expresso em neurônios piramidais glutamatérgicos (Gallopín et al., 2006a; Refojo et al., 2011a) e em terminais sinápticos (Yarur et al., 2020) no CPFm, ao passo que o receptor CRF₂ parece ser expresso exclusivamente em terminais pré-sinápticos (Yarur et al., 2020). A PL-CRF também foi identificada no CPFm (Chan; Vale; Sawchenko, 2000; Ketchesin; Stinnett; Seasholtz, 2016; Potter et al., 1992), e parece ser expressa em interneurônios GABAérgicos locais (Ketchesin; Huang; Seasholtz, 2017).

O estresse ativa neurônios que expressam CRF e aumenta a liberação local de CRF no CPFm (Merali et al., 2008; Timofeeva; Huang; Richard, 2003). Nesse sentido, a neurotransmissão CRFérgica no CPFm foi reportada estar envolvida na expressão de respostas comportamentais não-condicionadas relacionadas à ansiedade e depressão (Bijlsma et al., 2011; Chen et al., 2020; Miguel; Gomes; Nunes-de-Souza, 2014; Nguyen et al., 2006; Ohata; Shibasaki, 2011), em prejuízos cognitivos causados pelo estresse (Uribe-Mariño et al., 2016) e na resposta de aversão condicionada a lugar em animais expostos ao odor de predador (Schreiber et al., 2017). Além disso, a microinjeção de CRF no CPFm aumentou a expressão de comportamentos relacionados à ansiedade em animais sujeitos a uma sessão aguda ou à exposição repetida ao estresse de restrição (Jaferi; Bhatnagar, 2007), ao passo que um agonista CRF diminuiu respostas comportamentais defensivas inatas em camundongos expostos ao predador (i.e., rato) (Pentkowski et al., 2013). Foi também reportado o envolvimento da neurotransmissão CRFérgica local em neuroplasticidades e na liberação de noradrenalina no CPFm ventral causadas pela exposição a eventos estressores (Hwa et al., 2019; Shimizu et al., 1994; Smagin et al., 1997). A participação de receptores CRF do CPFm na resposta de ativação do eixo HPA induzida pelo estresse também foi reportada (Jaferi; Bhatnagar, 2007).

Apesar das evidências mencionadas acima, em uma ampla busca na literatura nós não encontramos nenhum estudo que tenha avaliado um possível papel da neurotransmissão CRFérgica no CPFm nas respostas cardiovasculares e de

congelamento ao MCC. Além das evidências da expressão dos receptores CRF₁ e CRF₂ no CPFm (Carboni et al., 2018; Chalmers et al., 1995; Guan et al., 2014; Radulovic et al., 1998; Tan et al., 2017b; Van Pett et al., 2000), e de que estímulos aversivos ativam neurônios que expressam CRF e aumentam a liberação de CRF no CPFm (Merali et al., 2008; Timofeeva; Huang; Richard, 2003), um papel no controle das respostas ao MCC é também suportado por evidências de que a neurotransmissão CRFérgica no CPFm controla funções cognitivas (Hupalo et al., 2019; Hupalo; Berridge, 2016).

Lateralização funcional, ou seja, uma assimetria entre os hemisférios encefálicos, foi reportada em várias estruturas encefálicas, e é proposta ser benéfica ao organismo (Frasnelli, 2013). Por exemplo, a lateralização funcional pode acarretar em economia de tecido neural ao evitar a duplicação de funções nos dois hemisférios (Levy, 1977), melhoras funcionais devido ao processamento em paralelo de informações (Rogers, 2000; Rogers; Zucca; Vallortigara, 2004) e impedimento do desencadeamento de respostas opostas ao permitir que um hemisfério tenha controle sobre as ações do hemisfério oposto (Andrew, 1991; Vallortigara, 2000).

A maioria das funções corticais são lateralizadas, de modo que foi demonstrado a existência de lateralização funcional no CPFm (Cerqueira; Almeida; Sousa, 2008a; Costa et al., 2016a; Czéh et al., 2007; Davidson, 2004; Sullivan; Gratton, 1999a), e essa lateralização parece ter um papel relevante na etiologia das respostas ao estresse (Canto-de-Souza et al., 2021; Cerqueira; Almeida; Sousa, 2008a; Lee et al., 2015; Sullivan; Gratton, 2002a; Victoriano et al., 2020). Por exemplo, estudos em humanos evidenciaram que pacientes com acidente vascular cerebral no lobo frontal esquerdo tiveram uma incidência de quadros de depressão, enquanto lesões no lobo frontal direito desencadearam episódios de mania (Robinson et al., 1984). Outros estudos relataram distúrbios lateralizados na estrutura e função em várias estruturas encefálicas, principalmente no CPFm, em pacientes sofrendo de transtornos de depressão e ansiedade (Davidson, 1998; Johnstone et al., 2007a). Em roedores, Sullivan e colaboradores (1999) demonstraram que a lesão química no CPFm direito (CPFmD) de ratos diminuiu a resposta de corticosterona e a úlcero-gênese induzidas pelo estresse de restrição no frio de maneira similar à lesão bilateral (Sullivan; Gratton, 1999a), ao passo que a lesão do CPFm esquerdo (CPFmE) não alterou essas respostas. De modo similar, a avaliação comportamental no labirinto em cruz elevado (LCE) revelou efeito ansiolítico da lesão do CPFmD, mas sem efeito quando o CPFmE foi lesado (Sullivan & Gratton, 2002). Em conjunto, esses resultados fundamentaram a proposição de uma lateralização no CPFm em

ratos, com o CPFmD sendo mais diretamente relacionado com as respostas fisiológicas e comportamentais desencadeadas por estímulos aversivos (Sullivan; Gratton, 2002a). Entretanto, o CPFmE pode também desempenhar um papel nas respostas ao estresse ao inibir o CPFmD (Cerqueira; Almeida; Sousa, 2008a; Sullivan, 2004a). A ideia de que o CPFmE tenha um papel contra-regulatório ao inibir o CPFmD é suportada por evidências recentes de que a inibição do CPFmE com CoCl_2 causou efeito do tipo ansiogênico no LCE, enquanto a inibição do CPFmD causou alteração comportamental do tipo ansiolítica no LCE (Costa et al., 2016a).

Apesar das evidências descritas acima, uma possível lateralização no controle das respostas do MCC pelo CPFm nunca foi avaliada. Um estudo recente em ratos identificou que a estimulação optogenética diária do hemisfério esquerdo (mas não do hemisfério direito) do CPFm inibiu o prejuízo causado por um estímulo traumático anterior na extinção da memória condicionada ao som, mas os autores não identificaram efeitos da manipulação do CPFm na aquisição ou extinção do condicionamento ao som em animais não estressados (Canto-de-Souza et al., 2021). Desse modo, durante o período deste relatório nós realizamos os estudos para avaliação do papel da neurotransmissão CRFérgica na lateralização do controle das respostas ao MCC pelo CPFm. Considerando i) que o CPFmD parece estar diretamente relacionado com as respostas fisiológicas e comportamentais desencadeadas por estímulos aversivos, e o CPFmE iniba o CPFmD (Cerqueira; Almeida; Sousa, 2008a; Costa et al., 2016a; Sullivan; Gratton, 2002a); e ii) que a ativação de receptores CRF no CPFm tem efeitos predominantemente inibitórios sobre a atividade de neurônios piramidais locais (Alizamini et al., 2022; Lv et al., 2024; Orozco-Cabal et al., 2008; Yarur et al., 2020, 2021), nossa hipótese testada é que o CRF iniba neurônios em ambos os hemisférios, porém a inibição no hemisfério esquerdo esteja envolvida na expressão das respostas de comportamentais e cardiovasculares ao MCC ao aumentar a ativação neuronal do CPFmD, ao passo que a inibição no hemisfério direito tenha uma influência inibitória sobre essas respostas.

2. OBJETIVOS

Os experimentos realizados no período referente ao presente relatório e descritos abaixo tiveram os seguintes objetivos específicos:

1. Investigar se o controle das respostas de congelamento e cardiovasculares observadas no MCC pelo CPFm ventral ocorre de maneira lateralizada.
2. Caracterizar o papel da neurotransmissão CRFérgica no CPFm ventral na ativação neuronal em ratos expostos ao MCC e investigar se esse controle ocorre de maneira lateralizada.
3. Caracterizar o papel da neurotransmissão CRFérgica no CPFm ventral no controle das respostas comportamentais e cardiovasculares em ratos expostos ao MCC, e investigar se esse controle ocorre de maneira lateralizada.

3. METODOLOGIA

3.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar com peso entre 230-260g, que foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (Botucatu/SP) e foram transferidos para o biotério do Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (FCFAR-UNESP) no mínimo sete dias antes do início dos experimentos. Os ratos foram alocados em caixas com acesso livre a ração granulada e água, e foram submetidos a alternância de luz (12h claro/12h escuro). O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA) da FCFAR-UNESP (*protocolo 01/2022*).

3.2. Implante de cânulas guias e microinjeção no córtex pré-frontal medial (CPFm)

Os animais foram anestesiados com uma solução contendo cetamina (87mg/kg) e xilazina (13mg/kg) e a cabeça do rato foi imobilizada em um estereotáxico (Stoelting, EUA). Após o posicionamento, foi realizada a tricotomia e a assepsia do campo cirúrgico com álcool a 70%. Para redução do sangramento durante a cirurgia foi injetado 0,3ml de solução de lidocaína com vasoconstritor. A calota craniana foi exposta por meio de uma incisão na pele de aproximadamente 1,5 cm, afastando-se completamente o periósteo. A limpeza da região foi feita utilizando-se solução salina e água oxigenada a 10%. Todas as coordenadas para o CPFm tiveram como referência parâmetros obtidos do Atlas de Paxinos & Watson (1997), como segue:

- ântero-posterior: +3,3 mm em relação ao bregma;
- lateral: +2,7 mm a partir do bregma;
- ventral: -3,2 mm em relação à superfície craniana; com ângulo de 22°.

Após o posicionamento da cânula de aço inoxidável, foi feito um orifício no crânio com auxílio de broca odontológica, por onde foi introduzida a cânula (26x0,6 mm, 23G, 10 mm de comprimento, *bilateral ou unilateral nos hemisférios direito ou esquerdo*). A cânula foi fixada ao crânio com uma resina acrílica autopolimerizável, e um pequeno parafuso foi previamente implantado na calota craniana para fixação do acrílico. Foram inseridos mandris com 0,2 mm de diâmetro no interior de cada cânula para evitar a sua obstrução durante o período de recuperação do animal. Como medida profilática, ao final da cirurgia o animal recebeu 0,2mL de pentabiótico veterinário (Fontoura-Wyeth, São

Paulo, Brasil) por via intramuscular e 0,3 mL do anti-inflamatório não-esteroidal flunexina meglumina (Banamine®, Schering Plough, Brazil) pela via subcutânea.

As agulhas injetoras (33G, Small Parts, EUA) que foram utilizadas para a microinjeção das drogas no CPFm foi um mm mais longa do que as cânulas guias fixadas ao crânio, e foram conectadas a uma seringa de 2 µL (7002KH, Hamilton, EUA) através de um tubo de polietileno (PE-10) (Clay Adams, EUA). As drogas foram injetadas no volume de 100nL/lado (Brasil; Fassini; Corrêa, 2017; Resstel et al., 2006a).

3.3. Medo condicionado ao contexto (MCC)

Os animais foram separados e acomodados em caixas individuais. As fases de habituação, condicionamento e os testes foram realizados em uma câmara de 23x20x21 cm (Insight, Ribeirão Preto, Brasil). A câmara foi composta por uma grade no piso, composta por 18 hastes de aço inoxidável (5 mm de diâmetro), espaçadas 20 mm e conectadas a um gerador de choques (AVS Projetos, São Carlos, São Paulo, Brasil). A câmara foi limpa com etanol (20%) entre cada animal e cada fase do protocolo. Os animais foram habituados por 10 minutos à caixa de condicionamento. Após quatro horas da fase de habituação, foi realizada a fase de condicionamento, em que os animais exploraram a caixa por 2 minutos, e em seguida receberam seis choques nas patas (1,5mA/3seg) com intervalos aleatórios variando entre 20 a 60 segundos (Ferreira-Junior et al., 2012a; Hott et al., 2012; Resstel et al., 2008a). Vinte e quatro horas após o condicionamento, os animais foram submetidos à cirurgia de canulação da artéria femoral (*conforme descrito o item 3.5*) para registro cardiovascular. A fase de teste foi realizada 48 horas após a fase de condicionamento. No dia do teste, os animais foram reexpostos por um período de 10 minutos à câmara onde receberam choque previamente, porém sem o disparo de choques.

3.4. Avaliações comportamentais (congelamento, atividade locomotora, levantadas e autolimpeza)

O comportamento de congelamento foi registrado manualmente durante a sessão teste do MCC. O congelamento foi definido como a completa ausência de movimentos, exceto aqueles relacionados à respiração (Fanselow, 1980, 2000). Os comportamentos ativos (atividade locomotora, levantadas e autolimpeza) foram registrados (Resstel et al., 2006; Gomes-de-Souza et al., 2024). A frequência de apresentação de cada comportamento foi registrada com o auxílio do programa (XploRat, 2005, versão 1.1.0). O número de cruzamentos foi usado como parâmetro para a avaliação da atividade

locomotora, sendo que uma linha foi definida dividindo a caixa (Resstel et al., 2006; Gomes-de-Souza et al, 2024).

3.5. Cirurgia de canulação da artéria femoral

Os animais foram anestesiados com uma solução contendo cetamina (87mg/kg) e xilazina (13mg/kg) e foi implantado um cateter na artéria femoral para registro dos parâmetros cardiovasculares. O cateter foi constituído por um segmento de polietileno PE-10 (4-5cm) soldado a um segmento de polietileno PE-50 (12-13cm) (Clay Adams, Parsippany, EUA), previamente preenchidos com solução salina e anticoagulante (15 U/mL de heparina em solução salina), e obstruídos com pino de metal. Após a implantação, o cateter foi exteriorizado na região dorsal do animal e fixado à pele por meio de sutura cirúrgica. Como medida profilática, após a cirurgia os animais receberam 0,3mL do anti-inflamatório não-esteroidal flunexina meglumina (Banamine®, Schering Plough, Brasil) pela via subcutânea. Os animais foram mantidos em caixas individuais durante todo o período pós-operatório e de registro cardiovascular.

3.6. Registro de pressão arterial média e frequência cardíaca

O cateter implantado na artéria femoral foi conectado a um transdutor de pressão (DPT100, Utah Medical Products Inc., EUA) através de um segmento de polietileno PE-50. A pressão arterial pulsátil foi registrada utilizando um amplificador (Bridge Amp, ML221, ADInstruments, Austrália) conectado a um sistema de aquisição de dados computadorizado (PowerLab 4/30, ML 866, ADInstruments, Austrália). Os valores de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) foram obtidos a partir do sinal de pressão arterial pulsátil.

3.7. Registro da temperatura cutânea

O aumento da atividade simpática vasomotora durante situações aversivas diminui o fluxo sanguíneo cutâneo (Blessing, 2003), o que, por sua vez, diminui a temperatura da pele (Busnardo et al., 2019; Vianna; Carrive, 2005). Desse modo, a diminuição da temperatura cutânea da cauda foi avaliada como uma medida indireta da resposta simpática vasomotora em leitos cutâneos durante o MCC. Para tanto, os registros da temperatura cutânea da cauda foram feitos durante a sessão teste do MCC utilizando um termovisor (IRI4010, Inglaterra). A análise foi feita através de um software para análise termográfica, e a temperatura foi representada como variações de intensidade de cor (Busnardo et al., 2019; Vianna; Carrive, 2005). Para a análise das imagens, a medida da temperatura foi realizada em cinco pontos ao longo da cauda do animal, e a média foi calculada para cada registro (Gomes-de-Souza et al., 2016, 2020).

3.8. Drogas e soluções

O CoCl_2 (inibidor sináptico não-seletivo), o CP376395 (antagonista seletivo de receptor CRF_1), a antisauvagine-30 (antagonista seletivo de CRF_2) e a uretana foram dissolvidos em salina (NaCl 0,9%). Os medicamentos utilizados para anestesia [cetamina (INOVAT LTDA, Embu-Guaçu, São Paulo, Brasil) e xilazina (Syntec LTDA, Santana de Parnaíba, São Paulo, Brasil)] foram utilizadas conforme fornecido pelos fabricantes.

3.9. Determinação anatômica dos sítios de microinjeção no CPFm

Ao final de cada experimento, os ratos foram anestesiados com uretana (1,2g/kg i.p.) e 100nl de corante azul de Evans (1%) foi microinjetado no CPFm para determinação do sítio de microinjeção. Em seguida, os ratos foram perfundidos e os cérebros removidos, pós-fixados e posteriormente seccionados em cortes frontais de 40 μm de espessura com auxílio de um criostato (CM1900, Leica, Alemanha) para análise dos sítios de microinjeção. 3.12. Medidas de RNAm dos receptores CRF_1 e CRF_2 em neurônios ativados do CPFm.

3.10. Medidas de RNAm dos receptores CRF_1 e CRF_2 em neurônios ativados do CPFm.

3.10.1. Microdissecção do CPFm

Os animais foram decapitados e os encéfalos rapidamente removidos. A microdissecção foi realizada a partir de secção coronal da região do CPFm obtida em um criostato (-20°C) (CM1900, Leica, Alemanha) utilizando uma agulha de ponta chata de 14G. As amostras foram obtidas a partir das coordenadas de +3,7 mm a +2,7 mm em relação ao bregma, de acordo com parâmetros obtidos do Atlas de Paxinos & Watson (Paxinos; Watson, 1997). Após a dissecação, as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80°C para posterior análise.

3.12.2. Separação de neurônios ativados por citometria de fluxo (FACS)

O procedimento foi adaptado de (Fanous et al., 2012; Guez-Barber et al., 2011, 2012; Rubio et al., 2015). As amostras foram descongeladas em um tampão de hibernação celular (Hibernate A Thermo Fisher Scientific - A12475-01). Em seguida, as amostras foram transferidas para uma placa de vidro, pré-resfriada em gelo, e duas gotas do tampão de hibernação foram depositadas sobre o tecido celular. Então, a região de interesse foi lacerada 100 vezes em cada posição ortogonal com o auxílio de uma lâmina de aço (pré-resfriada em gelo). O tecido lacerado foi transferido para um tubo contendo 1ml do tampão de hibernação. As amostras foram centrifugadas a 1.000 rpm por 2 min à 4°C . Em

seguida, o sobrenadante foi removido e 1 ml de uma solução resfriada (4°C) de accutase (Sigma-Aldrich -A6964) foi adicionado à amostra. Com auxílio de uma micropipeta de 1000µl o *pellet* foi homogeneizado e a amostra foi incubada a 4°C sob rotação de 360°. Então, os tubos foram centrifugados a 3.000 rpm por 2 min a 4°C. O sobrenadante foi removido e o *pellet* resuspendido em 0,6ml do tampão de hibernação. As células foram trituradas 3 vezes para dissociação. Após a dissociação, as células foram fixadas e permeabilizadas com etanol 50% (resfriado a -20°C) por 15 minutos em rotação de 360°. As amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm por 2 min a 4°C, o sobrenadante removido e o *pellet* foi resuspendido em 500µl de tampão de fosfato sódico. Em seguida, as amostras foram filtradas em filtros de 100µm e 40µm, sucessivamente. Após a filtração, as células foram incubadas com anticorpos conjugados a fluoróforos anti-NeuN-PE (1:500; Millipore) e anti-Fos-647 (1:100; Santa Cruz) por 30 minutos a 4°C em rotação de 360°. As células foram lavadas com tampão de fosfato de sódio e centrifugadas a 3.000 rpm por 3 min a 4°C. O sobrenadante foi removido e o *pellet* foi resuspendido em tampão de fosfato de sódio. As amostras foram mantidas em gelo até a separação no citômetro de fluxo. Foram coletadas no máximo 5000 eventos NeuN-positivos e todos os eventos Fos-positivos. Os tubos contendo as células foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80°C para posterior análise da expressão gênica por RT-qPCR.

3.10.3. RT-qPCR

Após as amostras terem passados por separação de neurônios ativados por citometria de fluxo (*item 3.13.2*), a extração do RNAm foi realizada utilizando-se o Kit PicoPure RNA isolation (Cellco), de acordo com as recomendações do fabricante. Em seguida, fitas simples de cDNA foram sintetizadas com o Kit Superscript III first strand cDNA synthesis (Invitrogen, Life Technologies), seguindo as orientações do fabricante. As amostras foram colocadas no termociclador (Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700®) e ao término do procedimento o cDNA sintetizado foi armazenado à -20°C. Posteriormente, o ensaio de RT-qPCR foi realizado em duplicata utilizando-se as amostras de cDNA; uma sonda específica para cada gene alvo (marcada com Fam); uma sonda para o gene controle (Pde10a), marcada com Vic; além do kit TaqMan Advanced Fast PCR Master Mix (Life Technologies). Ao final, as misturas foram pipetadas em placas de 96 poços, para o processo de amplificação, no equipamento para PCR em tempo real (Applied Biosystem 7500 Real-Time PCR System). Os resultados de amplificação gênica foram normalizados em relação aos resultados do gene controle Pde10a. A análise

da expressão gênica foi semiquantitativa (método $\Delta\Delta CT$), como descrito por (Livak; Schmittgen, 2001). O valor de CT (*threshold cycle*) representará o momento da reação de PCR em que a fluorescência de determinada amostra foi detectada inequivocamente acima do ruído de fundo (*background*), sendo o resultado expresso em unidades arbitrárias ($2^{-\Delta\Delta CT}$). O modelo matemático utilizado para a obtenção das unidades arbitrárias para essa análise foi:

- 1- Subtração do valor de CT do gene PDYN pelo CT do gene GAPDH (ΔCt);
- 2- Média do ΔCT das amostras;
- 3- ΔCT de cada amostra – a média do ΔCT ($\Delta\Delta CT$);
- 4- Elevação negativa do $\Delta\Delta CT$ na base 2 = $2^{-\Delta\Delta CT}$.

3.11. Imunohistoquímica de Fos

Os animais foram anestesiados com uretana (1,2 g/kg, i.p.) e foram perfundidos com salina (NaCl 0,9%) acompanhado de paraformaldeído 4% em solução com tampão fosfato (pH 7,4). Em seguida, os encéfalos foram removidos e estocados em freezer -80°C até o processamento. A técnica de imunohistoquímica de Fos foi feita após a realização de cortes dos encéfalos na região do CPFm em criostato (-20°C) (CM1900, Leica, Alemanha).

Após a lavagem com PBS (tampão fosfato-salina), os cortes foram transferidos para uma solução contendo anticorpo primário [PBS, triton, soro normal de cabra e anticorpo c-fos (diluição 1:2000; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA; produzido em coelho)] e incubadas, sob agitação, por 24 horas à temperatura ambiente. Depois de três lavagens de 5 minutos com PBS, os cortes foram novamente incubados, sob agitação e à temperatura ambiente, por 1 hora, utilizando-se o anticorpo secundário (PBS, triton, soro normal de cabra e anticorpo biotinilado anti-IgG de coelho, diluição 1:600; Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA, Vector Laboratories). Novamente, os cortes foram submetidos a três lavagens de 5 minutos com PBS e, em seguida, incubados com solução Avidina-Biotina (solução A-B) durante 1 hora à temperatura ambiente. Depois disso, os cortes foram lavados com PBS para o início da revelação, para a qual foram utilizados os reagentes diaminobenzidina em PBS e H₂O₂ 30%. Os cortes foram mergulhados nesta solução à temperatura ambiente durante 6-8 minutos. O procedimento foi interrompido, e os cortes submetidos a duas lavagens com PBS. Os cortes foram distribuídos em lâminas gelatinizadas e fixadas com lamínulas.

A contagem foi realizada a partir de uma área fixa do CPFm, e a quantificação foi realizada em pelo menos 2 cortes do CPFm por animal. A área do CPFm analisada foi determinada, e os resultados foram expressos como número médio de células positivas para Fos/mm². O CPFm foi identificado de acordo com o atlas de encéfalo de ratos de Paxinos & Watson 1997.

3.12. Drogas e soluções

O CoCl₂ (inibidor sináptico não-seletivo), o CP376395 (antagonista seletivo de receptor CRF₁), a antisauvagine-30 (antagonista seletivo de CRF₂) e a uretana foram dissolvidos em salina (NaCl 0,9%). Os medicamentos utilizados para anestesia [cetamina (INOVAT LTDA, Embu-Guaçu, São Paulo, Brasil) e xilazina (Syntec LTDA, Santana de Parnaíba, São Paulo, Brasil)] foram utilizadas conforme fornecido pelos fabricantes.

3.13. Determinação anatômica dos sítios de microinjeção no CPFm

Ao final de cada experimento, os ratos foram anestesiados com uretana (1,2g/kg i.p.) e 100nl de corante azul de Evans (1%) foi microinjetado no CPFm para determinação do sítio de microinjeção. Em seguida, os ratos foram perfundidos e os cérebros removidos, pós-fixados e posteriormente seccionados em cortes frontais de 40µm de espessura com auxílio de um criostato (CM1900, Leica, Alemanha) para análise dos sítios de microinjeção.

4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

4.1. Avaliação da lateralização funcional no controle das respostas cardiovasculares e comportamentais ao medo condicionado ao contexto pelo CPFm ventral.

Este protocolo teve o objetivo de investigar se o controle pelo CPFm das respostas cardiovasculares e de congelamentos desencadeadas pelo MCC ocorre de maneira lateralizada. Para tanto, todos os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas guias direcionadas ao CPFm (*bilateralmente ou unilateralmente nos hemisférios direito ou esquerdo*), e foram mantidos em recuperação por no mínimo 3 dias. Após o período de recuperação, foi iniciado os procedimentos de condicionamento, que consistiu em três fases: habituação, condicionamento e teste (*conforme descrito no item 3.3*). Vinte quatro horas após a fase de condicionamento, os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico para implantação de cateter na artéria femoral, que foi utilizado para registro da pressão arterial e FC. A sessão teste foi realizada 24 horas após a cirurgia de canulação da femoral. No dia do teste, os animais foram levados para a sala de registro em suas próprias caixas, e permaneceram por pelo menos 60 minutos para se adaptarem às condições da sala experimental, como som e iluminação, antes do início do experimento. A sala de registro teve a temperatura controlada (24°C) e foi diferente da sala onde foi realizado o condicionamento (Resstel et al., 2006b; Uliana et al., 2020).

No dia do teste, grupos independentes de animais receberam microinjeções bilaterais ou unilateral no hemisfério esquerdo ou direito do CPFm de veículo (salina, 100nL) ou de CoCl₂ (inibidor sináptico não-seletivo) (1nmol/100nL) (Resstel et al., 2006b). Dez minutos após o tratamento do CPFm, os animais foram expostos a sessão teste do MCC, que teve duração de 10 minutos. Foram avaliados os parâmetros de PAM, FC, temperatura cutânea da cauda e os comportamentos de congelamento, autolimpeza, levantadas e atividade locomotora. Os registros cardiovasculares foram iniciados ao menos 30 minutos antes da sessão teste do MCC, e foi realizado durante todo o período de exposição ao contexto. O registro da temperatura cutânea da cauda foi realizado imediatamente antes do tratamento no CPFm (ou seja, 10 minutos antes da sessão de teste) e imediatamente antes e após a sessão teste do MCC. O percentual de expressão do comportamento de congelamento e os comportamentos ativos durante a sessão teste também foi avaliado

(ver item 3.4). A Figura 1 apresenta o protocolo completo para os experimentos de condicionamento.

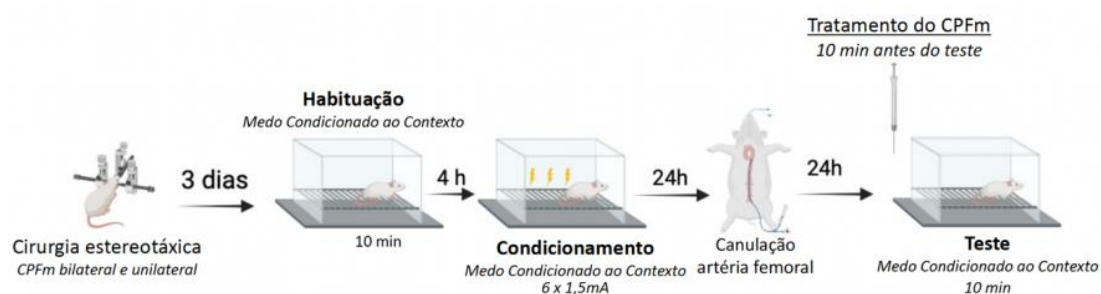


Figura 1 – Ilustração do protocolo experimental para avaliação do efeito da inibição sináptica não-seletiva bilateral ou unilateral no CPFm sobre as respostas cardiovasculares e de congelamento ao MCC.

4.2. Efeito do tratamento do CPFm com antagonistas seletivos dos receptores CRF₁ ou CRF₂ sobre a ativação neuronal local em animais submetidos ao protocolo de MCC.

Esse protocolo faz parte do conjunto de experimentos apresentados na proposta inicial que objetivam investigar o envolvimento de receptores CRF₁ e CRF₂ no CPFm no controle das respostas ao MCC, bem como avaliar se esse controle é lateralizado. No período referente ao presente relatório foram realizados experimentos que objetivaram investigar o efeito do tratamento farmacológico do CPFm com antagonistas seletivos dos receptores CRF na ativação neuronal local em animais expostos ao protocolo de MCC. Para tanto, os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico de implante de cânulas guias bilaterais ou unilateral no hemisfério direito ou esquerdo do CPFm e expostos ao procedimento do MCC (*conforme descrito no item 3.3*), que foi iniciado após ao menos três dias de recuperação do procedimento cirúrgico. No dia da sessão teste, grupos independentes de animais receberam microinjeções bilaterais ou unilateral no hemisfério esquerdo ou direito do CPFm de veículo (salina, 100 nL), de CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF₁) (5 nmol/100nL) ou de antisauvagine-30 (antagonista seletivo do receptor CRF₂) (5 nmol/100nL) [91]. Dez minutos após o tratamento do CPFm, os animais foram expostos a sessão teste do MCC, que teve duração de 10 minutos. Oitenta minutos após o término da sessão teste, os animais foram submetidos a procedimento para obtenção dos encéfalos para imunohistoquímica (*para detalhes, ver item 3.10*). Cortes da região do CPFm foram processados para quantificação do número de células positivas para a proteína Fos (*para detalhes, ver item 3.10*). A Figura 2 ilustra o protocolo experimental completo empregado neste experimento.

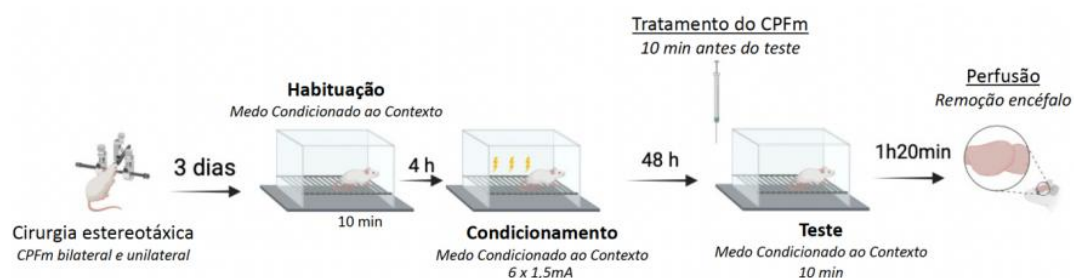


Figura 2 - Ilustração do protocolo experimental para avaliação do efeito do antagonismo bilateral ou unilateral de receptores CRFérgicos no CPFm sobre a ativação neuronal local em animais submetidos ao protocolo de MCC.

4.3. Efeito do tratamento do CPFm com antagonistas seletivos dos receptores CRF₁ ou CRF₂ no controle das respostas comportamentais e cardiovasculares em animais submetidos ao protocolo de MCC.

Esse protocolo faz parte do conjunto de experimentos apresentados na proposta inicial que objetivam investigar o envolvimento de receptores CRF₁ e CRF₂ no CPFm no controle das respostas ao MCC, bem como avaliar se esse controle é lateralizado. No período referente ao presente relatório foram realizados experimentos que objetivaram investigar o efeito do tratamento farmacológico do CPFm com antagonistas seletivos dos receptores CRF no controle as respostas comportamentais e cardiovasculares em animais expostos ao protocolo de MCC. Para tanto, os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico de implante de cânulas guias bilaterais ou unilateral no hemisfério direito ou esquerdo do CPFm e expostos ao procedimento do MCC (*conforme descrito no item 3.3*), que foi iniciado após ao menos três dias de recuperação do procedimento cirúrgico. No dia da sessão teste, grupos independentes de animais receberam microinjeções bilaterais ou unilateral no hemisfério esquerdo ou direito do CPFm de veículo (salina, 100 nL), de CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF₁) (5 nmol/100nL) ou de antisauvagine-30 (antagonista seletivo do receptor CRF₂) (5 nmol/100nL) [91]. Dez minutos após o tratamento do CPFm, os animais foram expostos a sessão teste do MCC, que teve duração de 10 minutos. Foram avaliados os parâmetros de PAM, FC, temperatura cutânea da cauda e os comportamentos de congelamento, autolimpeza, levantadas e atividade locomotora. Os registros cardiovasculares foram iniciados ao menos 30 minutos antes da sessão teste do MCC, e foi realizado durante todo o período de exposição ao contexto. O registro da temperatura cutânea da cauda foi realizado imediatamente antes do tratamento no CPFm (ou seja, 10 minutos antes da sessão de teste) e imediatamente antes e após a sessão teste

do MCC. O percentual de expressão do comportamento de congelamento e os comportamentos ativos durante a sessão teste também foi avaliado (ver item 3.4). A Figura 3 apresenta o protocolo completo para os experimentos de condicionamento.

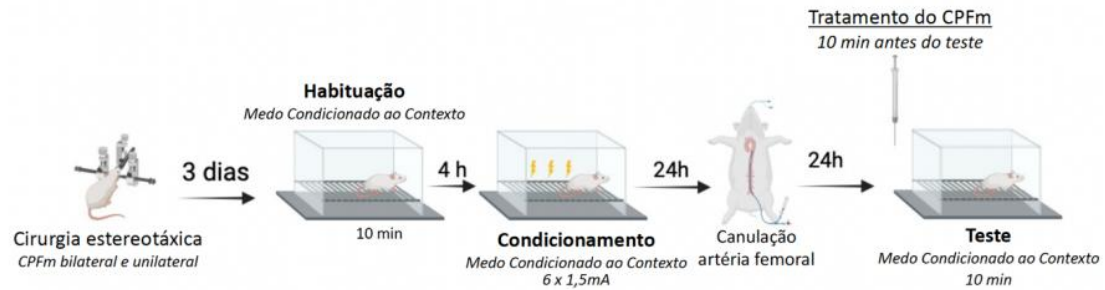


Figura 3 – Ilustração do protocolo experimental para avaliação do efeito dos antagonistas seletivos dos receptores CRF₁ e CRF₂ bilaterais ou unilaterais no CPFm sobre as respostas cardiovasculares e de congelamento ao MCC.

5. ANÁLISE DOS DADOS

Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). A comparação dos valores basais (ou seja, valores antes da sessão teste do MCC) de PAM, FC e da temperatura cutânea da cauda após o tratamento com veículo *versus* CoCl₂ no CPFm foram comparados usando teste *t* de Student (*protocolo 4.1*) e uma ANOVA monofatorial após o tratamento com veículo *versus* CRF₁ *versus* CRF₂ (*protocolo 4.3*). Os efeitos da reexposição ao contexto condicionado aversivamente sobre os parâmetros cardiovasculares foram apresentados como alterações em relação aos valores basais. As alterações evocadas pelo MCC foram obtidas subtraindo-se as medidas registradas durante a sessão de evocação do medo à média dos valores registrados durante os 10 minutos anteriores ao início da sessão. A ANOVA bifatorial, com tratamento como fator principal (veículo *versus* CoCl₂; *protocolo 4.1*); (veículo *versus* CRF₁ *versus* CRF₂ *protocolo 4.3*) e o tempo como medida repetida, foram utilizadas para a análise das curvas temporais de PAM, FC, temperatura cutânea da cauda e congelamento. Os valores médios do comportamento de congelamento, atividade locomotora, levantamentos, autolimpeza e das respostas de PAM e FC durante toda a sessão de evocação do medo nos animais tratados com (veículo x droga) foram comparados usando o teste *t* de Student (*protocolo 4.1*) e uma ANOVA monofatorial (*protocolo 4.3*).

O número de células positivas para a proteína Fos (*protocolo 4.2*) ipsilateral e contralateral em relação aos tratamentos unilaterais foram analisados usando a ANOVA bifatorial, com tratamento (veículo x CP376395 x antisauvagine-30) e hemisfério do CPFm (ipsilateral x contralateral) como fatores principais. Quando a ANOVA indicou interação entre os fatores, o pós-teste de Bonferroni foi utilizado para avaliar diferenças específicas entre os grupos experimentais. Para o tratamento bilateral, o número de células positivas para a proteína Fos foi quantificado bilateralmente e o efeito do tratamento foi avaliado usando a ANOVA monofatorial (veículo x CP376395 x antisauvagine-30). Os resultados dos testes estatísticos com $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos para todas as análises.

6. RESULTADOS

6.1. Avaliação da lateralização funcional no controle das respostas cardiovasculares e comportamentais ao medo condicionado ao contexto pelo CPFm ventral.

A Figura 4 mostra representações diagramáticas baseadas no Atlas de Paxinos & Watson (1997) indicando os sítios de microinjeção no CPFm (bilateral, hemisfério esquerdo e hemisfério direito) de todos os animais utilizados nesse protocolo. A Figura 4 também apresenta secções coronais do cérebro de ratos representativos ilustrando os sítios de microinjeção bilaterais e unilaterais no CPFm.

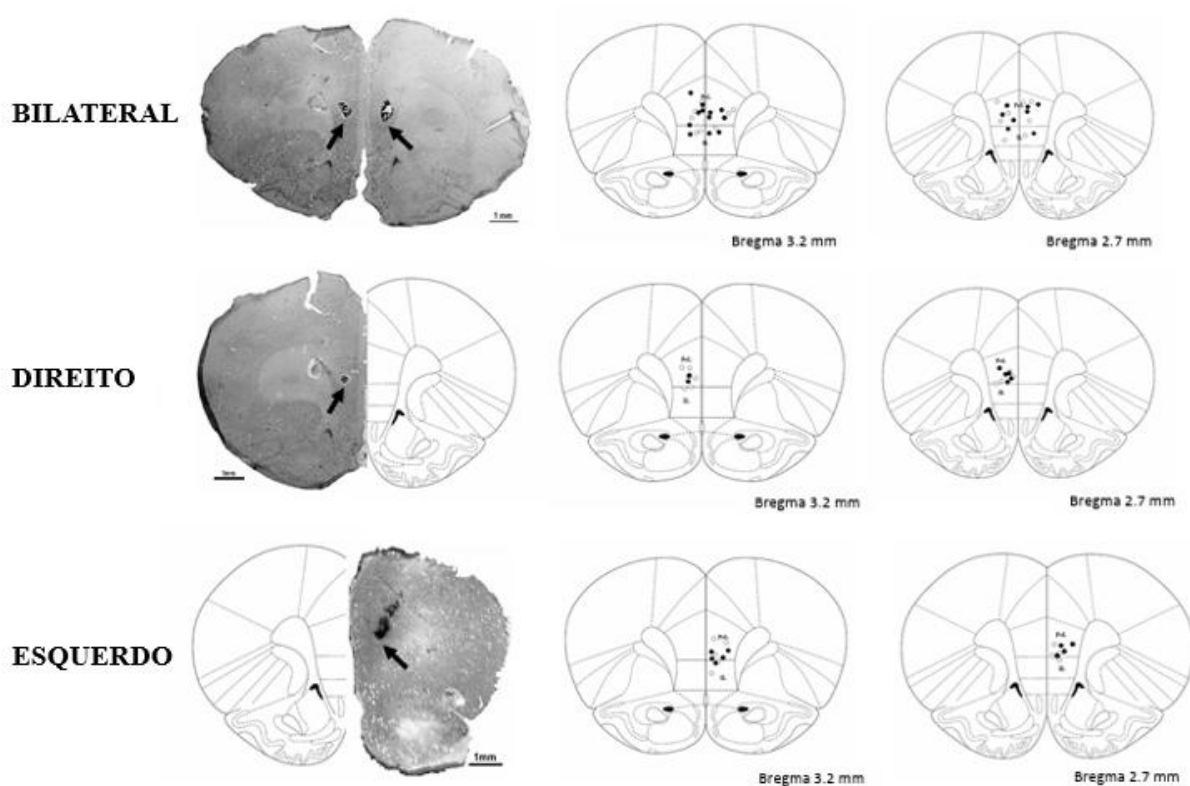


Figura 4 – (ESQUERDA) Fotomicrografias de cortes coronais cerebrais obtidos de animais representativos ilustrando os sítios de microinjeção no CPFm bilateral (figura superior) e unilateral nos hemisférios direito (figura ao meio) ou esquerdo (figura inferior). As setas indicam os sítios de microinjeção. **(DIREITA)** Representação esquemática baseada no atlas cerebral de ratos de Paxinos e Watson (1997) indicando locais de microinjeção bilateral e unilateral (hemisférios direito e esquerdo) no CPFm do veículo (círculos brancos) e CoCl₂ (círculos pretos). PrL, córtex pré-límbico, IL, córtex infra-límbico.

6.1.1. Efeito da microinjeção bilateral ou unilateral (hemisférios esquerdo ou direito) de CoCl_2 (inibidor sináptico não-seletivo) no CPFm nos parâmetros cardiovasculares basais

A microinjeção bilateral ou unilateral (hemisférios direito ou esquerdo) no CPFm de CoCl_2 (inibidor sináptico não-seletivo, 1mM/100nL) não afetou os valores basais (ou seja, valores obtidos antes da sessão teste do protocolo de MCC) de PAM, FC ou temperatura cutânea da cauda (Tabela 1).

Tabela 1 - Parâmetros basais de pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura cutânea da cauda (temperatura pele) após a administração bilateral ou unilateral (hemisfério direito ou esquerdo) de CoCl_2 (inibidor sináptico não-seletivo, 1mM/100nL) ou veículo (100nL) no CPFm.

GRUPO	<i>n</i>	PAM (mmHg)	FC (bpm)	Temperatura da cauda (°C)
BILATERAL				
<i>VEÍCULO</i>	7	109±3	336±16	30.5±0.5
<i>CoCl₂</i>	7	111±2	373±8	30.8±0.6
		<i>t</i> =0.55, <i>df</i> =12 <i>P</i> =0.6743	<i>t</i> =2.1, <i>df</i> =12 <i>P</i> =0.0609	<i>t</i> =0.39, <i>df</i> =12 <i>P</i> =0.7076
DIREITO				
<i>VEÍCULO</i>	6	107±2	366±10	30.3±0.5
<i>CoCl₂</i>	7	108±2	369±7	30.5±0.4
		<i>t</i> =0.36, <i>df</i> =11 <i>P</i> =0.7320	<i>t</i> =0.26, <i>df</i> =11 <i>P</i> =0.8061	<i>t</i> =0.32, <i>df</i> =11 <i>P</i> =0.7578
ESQUERDO				
<i>VEÍCULO</i>	7	110±3	371±8	30.2±0.5
<i>CoCl₂</i>	8	112±2	366±12	30.9±0.3
		<i>t</i> =0.57, <i>df</i> =13 <i>P</i> =0.5798	<i>t</i> =0.33, <i>df</i> =13 <i>P</i> =0.7423	<i>t</i> =1.24, <i>df</i> =13 <i>P</i> =0.2379

Os valores são média ± erro padrão da média (EPM). Teste *t* de Student.

6.1.2. Efeito da microinjeção bilateral de CoCl_2 (inibidor sináptico não-seletivo) no CPFm nas respostas condicionadas ao contexto

A análise das curvas temporais do comportamento de congelamento durante a reexposição ao contexto condicionado aversivamente indicou efeito do tratamento com CoCl_2 ($F_{(1,16)}=6,3$, $P=0,0230$), mas sem efeito do tempo ($F_{(2,661,45,24)}=0,93$, $P=0,4220$) ou interação tratamento x tempo ($F_{(9,144)}=1,4$, $P=0,1792$) (Fig. 5A). A análise dos valores médios de congelamento durante todo o período de reexposição ao contexto aversivo também indicou redução nessa resposta comportamental nos animais tratados bilateralmente com CoCl_2 ($t=3,3$, $df=16$, $P=0,0046$) (Fig. 5B). A análise das curvas temporais de PAM durante a reexposição ao contexto condicionado aversivamente indicou efeitos do tratamento com CoCl_2 ($F_{(1,13)}=4,5$, $P=0,0496$) e do tempo ($F_{(15,195)}=24,9$, $P<0,0001$), bem como uma interação tratamento x tempo ($F_{(15,195)}=1,9$, $P=0,0309$) (Fig. 5C). No entanto, a análise dos valores médios durante todo o período de reexposição ao contexto aversivo não indicou efeito significativo do tratamento com CoCl_2 ($t = 1,8$, $df = 13$, $P = 0,0928$) (Fig. 5D).

A análise das curvas temporais de alteração da FC evocadas pelo MCC indicaram efeitos do tratamento com CoCl_2 ($F_{(1,13)}=11,5$, $P=0,0049$) e do tempo ($F_{(15,195)}=8,5$, $P<0,0001$), bem como uma interação tratamento x tempo ($F_{(15,195)}=2,8$, $P=0,0005$) (Fig. 5E). A análise dos valores médios durante todo o período de reexposição ao contexto aversivo também indicou que o tratamento com CoCl_2 reduziu a resposta de taquicardia desencadeada pelo MCC ($t=2,6$, $df=13$, $P=0,0194$) (fig. 5F).

Por fim, a análise das curvas temporais de queda da temperatura cutânea da cauda desencadeada pelo MCC indicou efeito do tempo ($F_{(2,26)} = 4,9$, $P = 0,0128$), mas sem influência do tratamento bilateral com CoCl_2 ($F_{(1,13)}=0,28$, $P=0,6448$) ou interação tratamento x tempo ($F_{(2,26)}=0,65$, $P=0,5283$) (Fig. 5G).

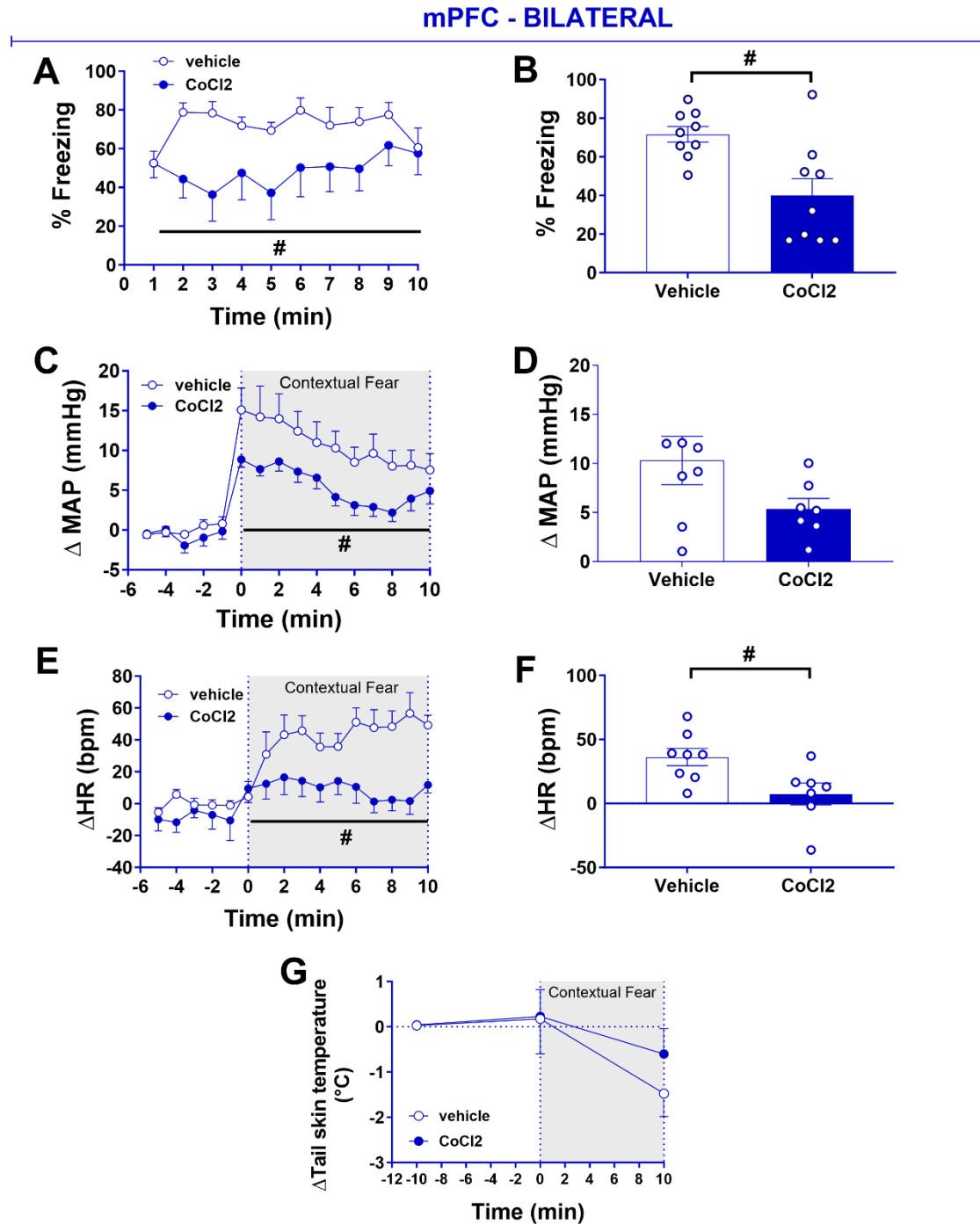


Figura 5 - (A) Curvas temporais da % de congelamento durante a reexposição ao medo condicionado ao contexto em animais submetidos a microinjeção bilateral no CPFm de veículo (100nL, n=9) ou de CoCl₂ (inibidor sináptico não-seletivo, 1mM/100nL, n=9). # P<0,05 indicando efeito principal do tratamento, ANOVA bifatorial. **(B, D e F)** Valores médios de % congelamento (B) e da resposta de pressão arterial média (Δ PAM) (D) e da frequência cardíaca (Δ FC) (F) durante todo o período de reexposição ao contexto condicionado aversivamente. # P<0,05, teste *t* de Student. **(C, E e G)** Curvas temporais de Δ PAM (C), Δ HR (E) e Δ temperatura cutânea da cauda (G) desencadeadas pelo MCC em animais submetidos a microinjeção bilateral no CPFm de veículo (100nL, n=8) ou de CoCl₂ (1mM/100nL, n=7). # P<0,05, indicando efeito principal do tratamento, ANOVA bifatorial. Os valores em todos os gráficos representam a média $\pm$ EPM.

6.1.3. Efeito da microinjeção unilateral de CoCl_2 (inibidor sináptico não-seletivo) no hemisfério direito do CPFm nas respostas condicionadas ao contexto

A análise das curvas temporais do comportamento de congelamento durante a reexposição ao contexto condicionado aversivamente indicou um efeito principal do tratamento com CoCl_2 ($F_{(1,14)}=5,7$, $P=0,0319$), mas sem influência do tempo ($F_{(2,300,32,21)}=1,6$, $P=0,2051$) e interação tratamento x tempo ($F_{(9,126)}=1,5$, $P=0,1723$) (Fig. 6A). A análise dos valores médios de congelamento durante todo o período de reexposição ao contexto aversivo também indicou uma redução nos animais tratados com CoCl_2 no hemisfério direito do CPFm ($t=2,7$, $df=14$, $P=0,0192$) (Fig. 6B).

A análise das curvas temporais de alteração da PAM causada pelo MCC indicou efeito do tempo ($F_{(15,165)}=17,1$, $P<0,0001$), mas sem influência do tratamento ($F_{(1,11)}=0,23$, $P=0,6459$) e interação tratamento x tempo ($F_{(15,165)}=0,74$, $P=0,7502$) (Fig. 6C). A análise dos valores médios durante todo o período de reexposição ao contexto aversivo também não indicou efeito do tratamento com CoCl_2 ($t=0,4$, $df=11$, $P=0,6739$) (Fig. 6D).

A análise das curvas temporais de alteração da FC desencadeadas pelo MCC indicou efeito do tempo ($F_{(15,165)}=5,1$, $P<0,0001$), mas sem efeito principal do tratamento ($F_{(1,11)}=0,55$, $P=0,4759$) e interação tratamento x tempo ($F_{(15,165)}=1,3$, $P=0,1879$) (Fig. 6E). A análise dos valores médios durante todo o período de reexposição ao contexto aversivo também não indicou efeito do tratamento do hemisfério direito do CPFm com CoCl_2 na resposta taquicárdica evocada pelo MCC ($t=0,87$, $df=11$, $P=0,4063$) (Fig. 6F).

A análise das curvas temporais da queda da temperatura cutânea da cauda desencadeada pelo MCC indicou efeito do tempo ($F_{(2,22)}=10,5$, $P=0,0004$), mas sem efeito da microinjeção de CoCl_2 no CPFm direito ($F_{(1,11)}=0,51$, $P=0,4868$) ou interação tratamento x tempo ($F_{(2,22)}=0,54$, $P=0,5847$) (Fig. 6G).

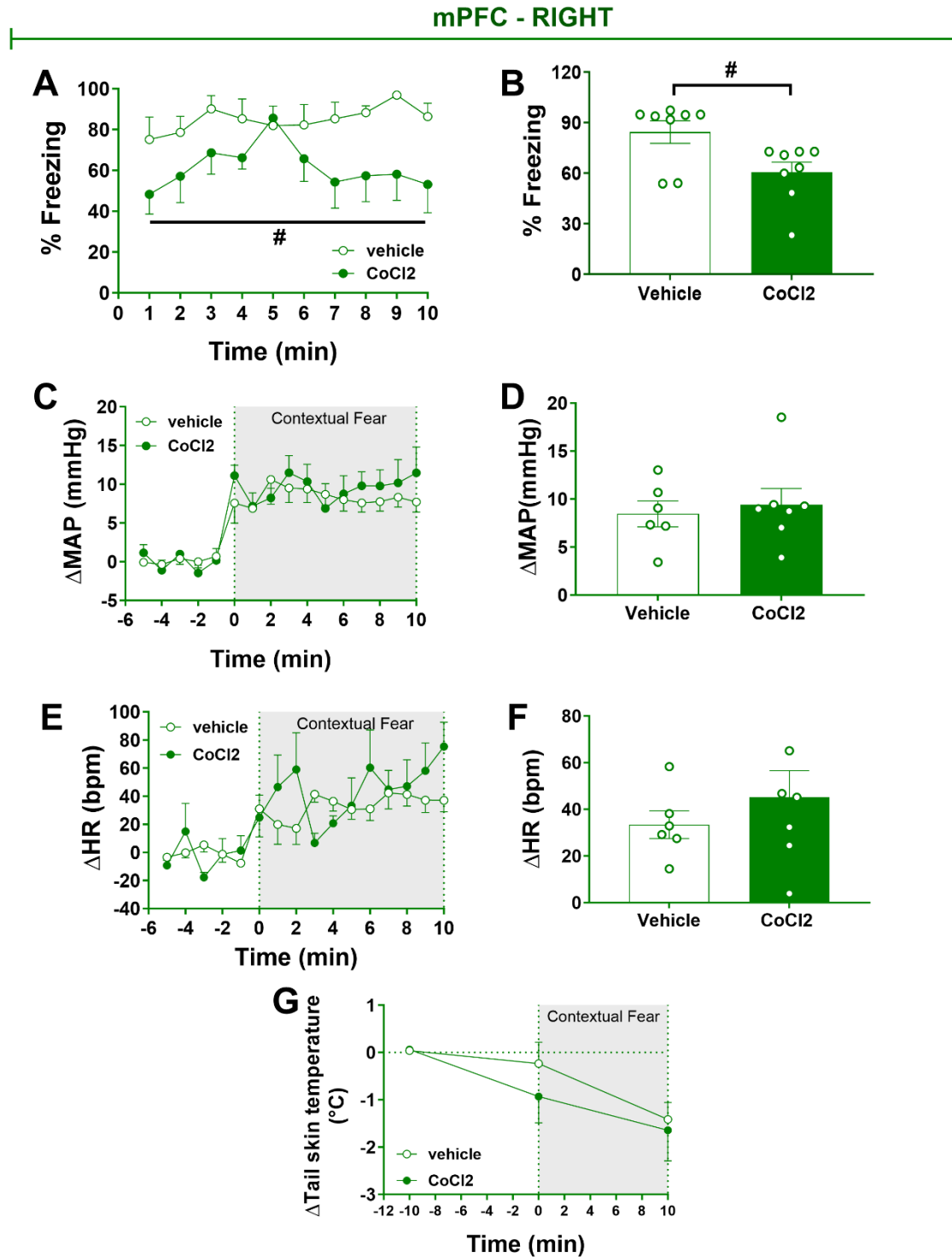


Figura 6 - (A) Curvas temporais da % de congelamento durante a reexposição ao contexto condicionado aversivamente em animais submetidos à microinjeção unilateral no hemisfério direito do CPFm de veículo (100nL, n=8) e/ou de CoCl₂ (inibidor sináptico não-seletivo, 1mM/100nL, n=8). # P<0,05, indicando efeito principal do tratamento, ANOVA bifatorial. (B, D e F) de % de congelamento (B) e alterações da pressão arterial média (Δ PAM) (D) e da frequência cardíaca (Δ FC) (F) durante todo o período de reexposição ao

contexto aversivo. # $P < 0,05$, teste t de Student. (C, E e G) Curvas temporais de Δ PAM (C), Δ FC (E) e Δ temperatura cutânea da cauda (G) desencadeadas pelo MCC em animais submetidos a microinjeção unilateral no hemisfério direito do CPFm de veículo (100nL, $n = 6$) ou de CoCl_2 (1mM/100nL, $n=7$). ANOVA bifatorial. Os valores em todos os gráficos representam a média $\pm$ EPM.

6.1.4. Efeito da microinjeção unilateral de CoCl_2 (inibidor sináptico não-seletivo) no hemisfério esquerdo do CPFm nas respostas condicionadas ao contexto

A análise das curvas temporais do comportamento de congelamento durante a reexposição ao contexto condicionado aversivamente não indicou efeito dos tratamentos com CoCl_2 ($F_{(1,15)}=0,2$, $P=0,7319$), do tempo ($F_{(4,507,67,60)}=1,6$, $P=0,1613$) ou interação tratamento x tempo ($F_{(9,135)}=0,9$, $P=0,5529$) (Fig. 7A). A análise dos valores médios de congelamento durante todo o período de reexposição ao contexto aversivo também não indicou efeito da microinjeção de CoCl_2 no hemisfério esquerdo do CPFm ($t = 0,54$, $df=15$, $P=0,6021$) (Fig. 7B).

A análise das curvas temporais de alteração da PAM durante a reexposição ao contexto aversivo indicou efeito do tempo ($F_{(15,195)}=20,5$, $P<0,0001$), mas sem influência do tratamento ($F_{(1,13)}=0,1$, $P=0,8156$) e interação tratamento x tempo ($F_{(15,195)}=1,06$, $P=0,3983$) (Fig. 7C). A análise dos valores médios durante todo o período de reexposição ao contexto aversivo também não indicaram efeito do tratamento com CoCl_2 no hemisfério esquerdo do CPFm ($t = 0,09$, $df = 13$, $P = 0,9349$) (Fig. 7D).

A análise das curvas temporais de alteração da FC desencadeada pelo MCC indicou efeito do tempo ($F_{(15,195)}=8,4$, $P<0,0001$) e uma interação tratamento x tempo ($F_{(15,195)}=4,2$, $P<0,0001$), mas sem efeito do tratamento com CoCl_2 ($F_{(1,13)}=0,05$, $P=0,8386$) (Fig. 7E). A análise dos valores médios durante todo o período de reexposição ao contexto aversivo também não indicou efeito do tratamento com CoCl_2 no hemisfério esquerdo do CPFm na resposta taquicárdica desencadeada pelo MCC ($t=0,92$, $df=13$, $P=0,3768$) (Fig. 7F).

A análise das curvas temporais da queda da temperatura cutânea da cauda desencadeada pelo MCC indicou efeito do tempo ($F_{(2,26)}=20,5$, $P<0,0001$), mas sem efeito do tratamento com CoCl_2 no hemisfério esquerdo do CPFm ($F_{(1,13)}=1,22$, $P=0,2633$) ou interação tratamento x tempo ($F_{(2,26)}=1,02$, $P=0,3768$) (Fig. 7G).

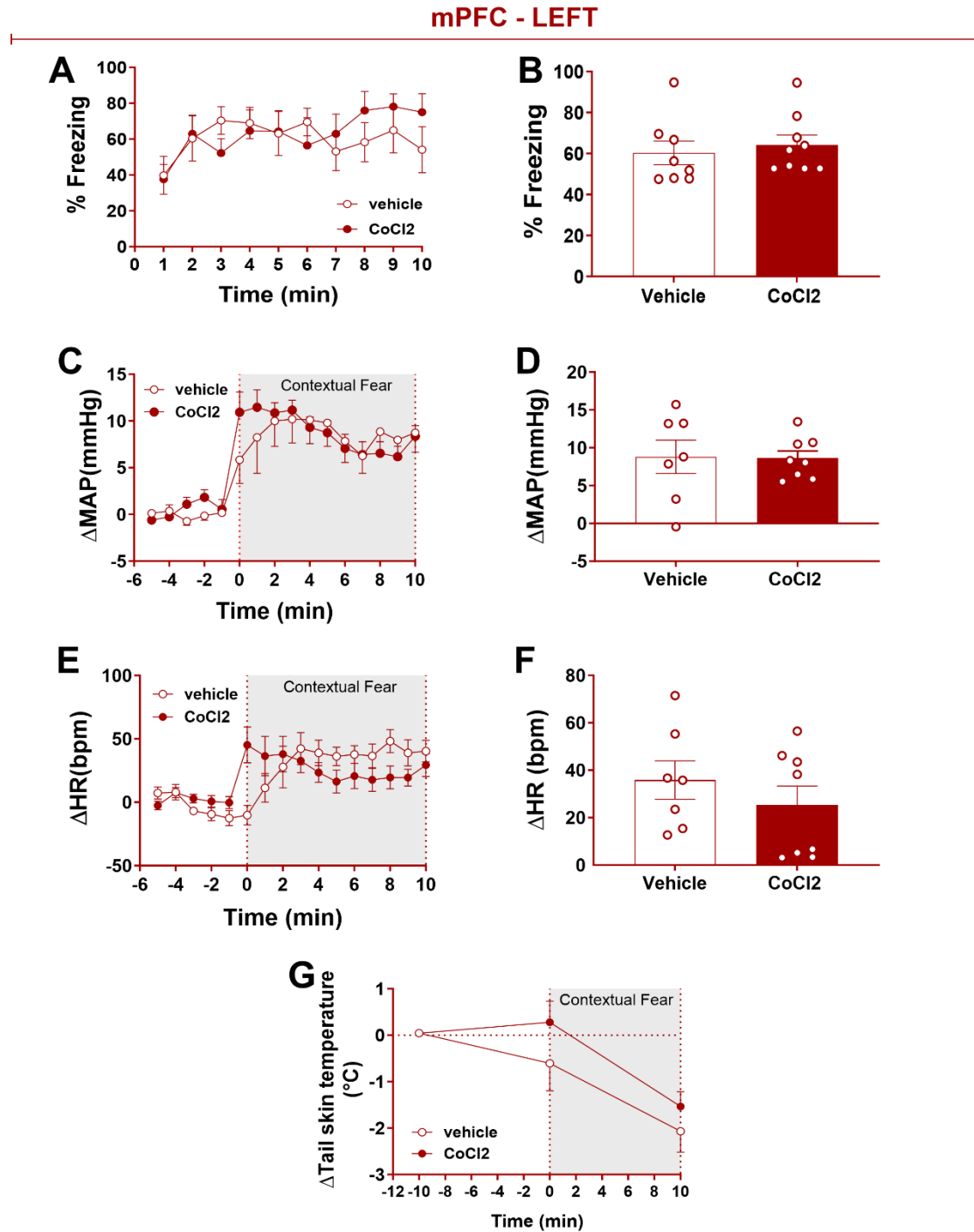


Figura 7 - (A) Curvas temporais da % de congelamento durante a reexposição ao contexto condicionado aversivamente em animais submetidos à microinjeção unilateral no hemisfério esquerdo do CPFm de veículo (100nL, n=8) ou de CoCl₂ (inibidor pré-sináptico não-seletivo, 1mM/100nL, n=9). # P<0,05, indicando efeito principal do tratamento, ANOVA bifatorial. **(B, D e F)** Valores médios de % de congelamento (B) e alterações da pressão arterial média (Δ PAM) (D) e da frequência cardíaca (Δ FC) (F) durante o todo o período de reexposição ao contexto aversivo. # P<0,05, teste *t* de Student. **(C, E e G)** Curvas temporais de Δ PAM (C), Δ FC (E) e Δ temperatura cutânea da cauda (G) desencadeadas pelo MCC em animais submetidos a microinjeção unilateral no hemisfério esquerdo do CPFm de veículo (100nL, n=7) ou de CoCl₂ (1mM/100nL, n=8). ANOVA bifatorial. Os valores em todos os gráficos representam a média $\pm$ EPM.

6.2. Efeito da microinjeção bilateral ou unilateral (hemisférios direito ou esquerdo) no CPFm de antagonistas seletivos dos receptores CRFérgicos na ativação neuronal local em ratos expostos ao medo condicionado ao contexto.

A Figura 8 mostra cortes coronais de animais representativos ilustrando os sítios de microinjeção bilateral (Figura 8A) e unilateral nos hemisférios direito (Figura 8B) e esquerdo (Figura 8C) do CPFm em tecido submetido ao procedimento imunohistoquímico de marcação da proteína Fos.

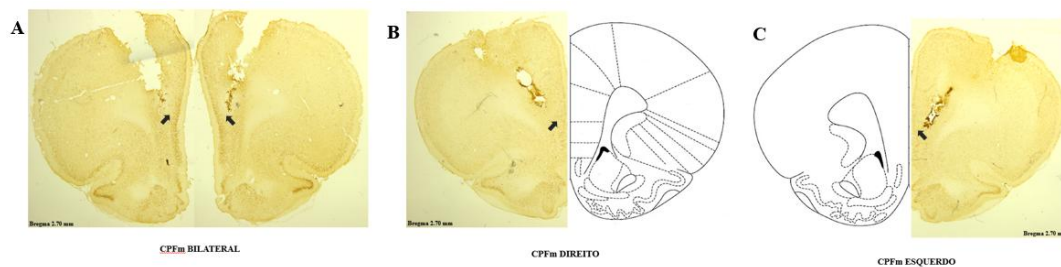


Figura 8 - Fotomicrografias de cortes coronais cerebrais de animais representativos ilustrando os sítios de microinjeção bilateral (Fig. 8A) e unilateral nos hemisférios direito (B) e esquerdo (C) em tecido submetido ao procedimento imunohistoquímico de marcação da proteína Fos. As setas indicam o sítio de microinjeção.

A microinjeção bilateral de CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF_1 , 5 nmol/100nL) ou de antisauvagine-30 (antagonista seletivo do receptor CRF_2) (5 nmol/100nL) no CPFm não afetou o número local de células positivas para a proteína Fos ($F_{(2,20)} = 0,1721$, $P = 0,8431$) (Figura 9).

BILATERAL

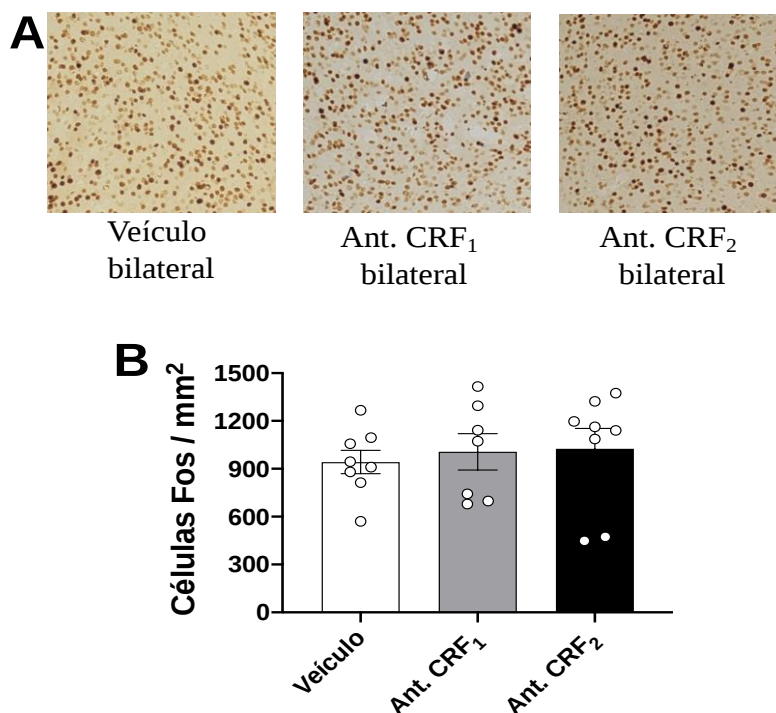


Figura 9 – Efeito do tratamento bilateral do CPFm com antagonistas seletivos dos receptores CRFérgicos sobre o número de células locais marcadas para a proteína Fos em animais expostos ao protocolo de MCC. **(A)** Imagens de cortes coronais de animais representativos ilustrando a marcação da proteína Fos no CPFm em ratos submetidos ao tratamento local bilateral com veículo (100nL), CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF₁, 5nmol/100nL, Ant. CRF₁) ou antisauvagine-30 (antagonista seletivo do receptor CRF₂, 5nmol/100nL, Ant. CRF₂). **(B)** Número de células marcadas para a proteína Fos no CPFm em animais expostos ao protocolo de MCC e tratados bilateralmente com veículo (n=8), CP376395 (n=7) ou antisauvagine-30 (n=8). ANOVA monofatorial.

A análise dos resultados decorrentes do efeito das microinjeções unilaterais no hemisfério DIREITO do CPFm sobre o número de células marcadas para a proteína Fos ipsilateralmente [isto é, no mesmo hemisfério da injeção (hemisfério direito)] e contralateralmente [isto é, hemisfério oposto ao tratamento (hemisfério esquerdo)] em relação ao tratamento indicou efeito do fator tratamento ($F_{(2,32)}=4,438$; $P=0,0199$) e uma interação tratamento x hemisfério ($F_{(2, 32)} = 5,691$; $P=0,0077$), porém sem efeito do fator hemisfério ($F_{(1,32)}= 3,507$; $P=0,0703$) (Figura 18). A análise de comparações múltiplas (pós-teste de Bonferroni) revelou que o tratamento com o antagonista seletivo do receptor CRF₂ (antisauvagine-30) aumentou o número de células marcadas para a proteína Fos ipsilateralmente ao tratamento quando comparado ao grupo veículo-ipsilateral ($P=0,0023$) e a marcação contralateral nos animais do mesmo grupo experimental ($P=0,0429$) (Figura 10).

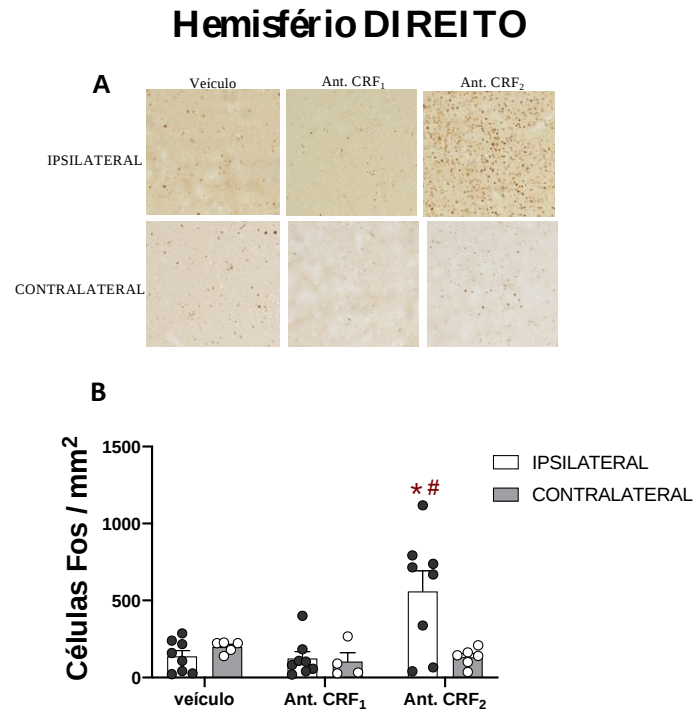


Figura 10 - Efeito do tratamento unilateral no hemisfério direito do CPFm com antagonistas seletivos dos receptores CRFérgicos sobre o número de células locais marcadas para a proteína Fos ipsilateralmente [isto é, no mesmo hemisfério de injeção (hemisfério direito)] e contralateralmente [isto é, hemisfério oposto ao tratamento (hemisfério esquerdo)] em animais expostos ao protocolo de MCC. **(A)** Imagens de cortes coronais de animais representativos ilustrando a marcação da proteína Fos no CPFm ipsilateral e contralateral em relação ao tratamento em ratos submetidos ao tratamento local unilateral no hemisfério direito com veículo (100nL), CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF₁, 5nmol/100nL) ou antisauvagine-30 (antagonista seletivo do receptor CRF₂, 5nmol/100nL). **(B)** Número local de células marcadas para a proteína Fos ipsilateral e contralateral em relação ao tratamento no CPFm em animais expostos ao protocolo de MCC e tratados unilateralmente no hemisfério direito do CPFm com veículo (ipsi: n=8, contra: n=5), CP376395 (ipsi: n=7, contra: n=4) ou antisauvagine-30 (ipsi: n=8, contra: n=6). ANOVA bifatorial seguido do pós-teste de Bonferroni. * P<0,05 versus grupo veículo-ipsilateral; # P<0,05 versus grupo contralateral na mesma condição experimental.

A análise dos resultados decorrentes do efeito das microinjeções unilaterais no hemisfério ESQUERDO do CPFm sobre o número de células marcadas para a proteína Fos ipsilateralmente [isto é, no mesmo hemisfério de injeção (hemisfério esquerdo)] e contralateralmente [isto é, hemisfério oposto ao tratamento (hemisfério direito)] em relação ao tratamento indicou efeito do fator hemisfério ($F_{(1,48)}=9,553$, $P=0,0033$), do fator tratamento ($F_{(2,48)}=4,240$, $P=0,0201$), bem como uma interação hemisfério x tratamento ($F_{(2,48)}=7,454$, $P=0,0015$) (Figura 11). A análise de comparações múltiplas (pós-teste de Bonferroni) revelou que o tratamento com o antagonista seletivo do receptor

CRF₁ (CP376395) ou CRF₂ (antisauvagine-30) aumentou o número de células marcadas para a proteína Fos ipsilateralmente quando comparado ao grupo veículo-ipsilateral (ant. CRF₁: P=0,0267; ant. CRF₂: P=0,0002) e a marcação contralateral nos animais do mesmo grupo experimental (ant. CRF₁: P=0,0293; ant. CRF₂: P=0,0078) (Figura 11).

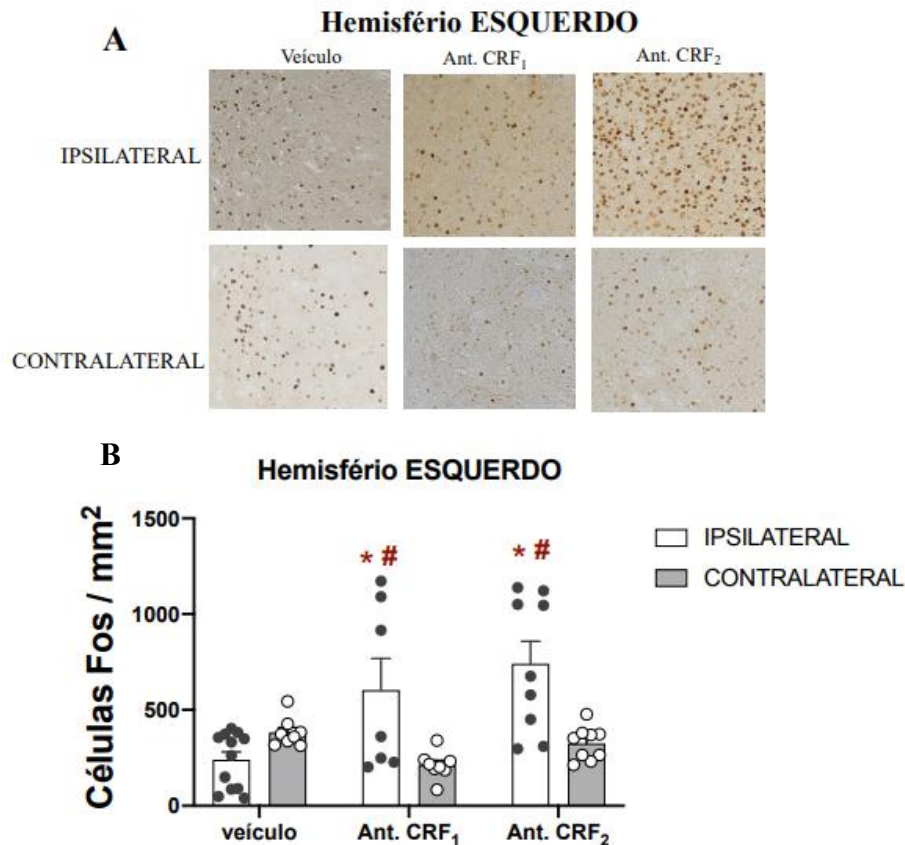


Figura 11 – Efeito do tratamento unilateral no hemisfério esquerdo do CPFm com antagonistas seletivos dos receptores CRFérgicos sobre o número de células locais marcadas para a proteína Fos ipsilateralmente [isto é, no mesmo hemisfério de injeção (hemisfério esquerdo)] e contralateralmente [isto é, hemisfério oposto ao tratamento (hemisfério direito)] em animais expostos ao protocolo de MCC. **(A)** Imagens de cortes coronais de animais representativos ilustrando a marcação da proteína Fos no CPFm ipsilateral e contralateral em relação ao tratamento em ratos submetidos ao tratamento local unilateral no hemisfério esquerdo do CPFm com veículo (100nL), CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF₁, 5nmol/100nL) ou antisauvagine-30 (antagonista seletivo do receptor CRF₂, 5nmol/100nL). **(B)** Número local de células marcadas para a proteína Fos ipsilateral e contralateral em relação ao tratamento em animais expostos ao protocolo de MCC e tratados unilateralmente no hemisfério esquerdo do CPFm com veículo (ipsi: n=12, contra: n=8), CP376395 (ipsi: n=7, contra: n=8) ou antisauvagine-30 (ipsi: n=9, contra: n=9). ANOVA bifatorial seguido do pós-teste de Bonferroni. * P<0,05 versus grupo veículo-ipsilateral; # P<0,05 versus grupo contralateral na mesma condição experimental.

6.3. Efeito da microinjeção bilateral ou unilateral (hemisférios direito ou esquerdo) no CPFm de antagonistas seletivos dos receptores CRFérgicos no controle das respostas comportamentais e cardiovasculares em ratos expostos ao medo condicionado ao contexto.

A Figura 12 mostra representações diagramáticas baseadas no Atlas de Paxinos & Watson (1997) indicando os sítios de microinjeção no CPFm (bilateral, hemisfério esquerdo e hemisfério direito) de todos os animais utilizados nesse protocolo.

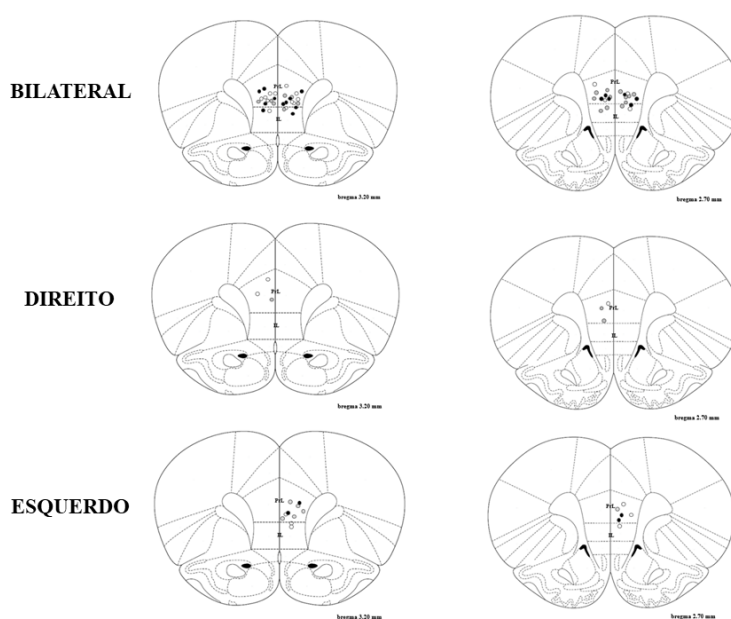


Figura 12 –Representação esquemática baseada no atlas cerebral de ratos de Paxinos e Watson (1997) indicando locais de microinjeção bilateral e unilateral (hemisférios direito e esquerdo) no CPFm do veículo (círculos brancos) e Ant. CRF₁ (círculos cinzas) e Ant. CRF₂ (círculos pretos). PrL, córtex pré-límbico, IL, córtex infra-límbico.

6.3.1. Efeito da microinjeção bilateral ou unilateral (hemisférios esquerdo ou direito) dos antagonistas seletivos dos receptores (CRF₁ e CRF₂) no CPFm nos parâmetros cardiovasculares basais.

A microinjeção bilateral ou unilateral (hemisférios direito ou esquerdo) no CPFm do antagonista seletivo do receptor CRF₁ (CP376395, 5nmol/100nL) e/ou do antagonista seletivo do receptor CRF₂ (antisauvagine-30, 5nmol/100nL) não afetaram os valores basais (ou seja, valores obtidos antes da sessão teste do protocolo de MCC) de PAM, FC ou temperatura cutânea da cauda (Tabela 2).

Tabela 2 - Parâmetros basais de pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura cutânea da cauda (temperatura da pele) após a administração bilateral ou unilateral (hemisfério direito ou esquerdo) do antagonista seletivo do receptor CRF₁ (CP376395, 5nmol/100nL) e/ou do antagonista seletivo do receptor CRF₂ (antisauvagine-30, 5nmol/100nL) no CPFm. *O grupo experimental está com o número amostral pequeno (n=3), ** O grupo experimental está com o número amostral igual a zero (n=0).

GRUPO	N	PAM (mmHg)	FC (bpm)	Temperatura da cauda (°C)
BILATERAL				
Veículo	8	109±3	370±14	31±0.2
Ant. CRF ₁	10	113±2	368±12	32±0.4
Ant. CRF ₂	10	116±3	374±11	31±0.3
		$F_{(2,25)}=1.144,$ $P=0,3345$	$F_{(2,25)}=0.07057,$ $P=0,9320$	$F_{(2,25)}=0.05571,$ $P=0,5571$
ESQUERDO				
Veículo	6	117±6	370±14	30±0.7
Ant. CRF ₁	6	112±2	377±19	33±0.7
Ant. CRF ₂	7	117±2	392±14	32±0.6
		$F_{(2,13)}=0.5034,$ $P=0,6158$	$F_{(2,13)}=0.3871,$ $P=0,6866$	$F_{(2,13)}=0.0721,$ $P=0,0721$
DIREITO				
*Veículo	3	119±14	329±19	33±1
*Ant. CRF ₁	3	114±6	322±6	32±0.2
**Ant. CRF ₂	-	-	-	-
		$t=0.3162, df=4$ $P=0,7677$	$t=0.3312, df=4$ $P=0,7571$	$t=1.227, df=4$ $P=0,2869$

Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM).

6.3.2. Efeito da microinjeção bilateral de CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF₁) e/ou de antisauvagine-30 (antagonista seletivo do receptor CRF₂) no CPFm nas respostas condicionadas ao contexto.

6.4. Efeito da microinjeção BILATERAL de CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF₁) ou de antisauvagine-30 (antagonista seletivo do receptor CRF₂) no CPFm nas respostas condicionadas ao contexto

A análise das curvas temporais do comportamento de congelamento durante a reexposição ao contexto condicionado aversivamente não indicou efeito dos fatores tempo ($F_{(3,328,89,85)} = 0.9051$, $P=0,4502$) ou tratamento ($F_{(2,27)} = 1,840$; $P=0,1781$) ou interação entre o tempo *versus* o tratamento ($F_{(18,243)} = 0,6196$; $P=0,8830$) (Fig. 13, Painel Superior). Entretanto, análise individualizada comparando os grupos veículo x antagonista do receptor CRF₂ indicou valores de congelamento maiores nos animais sujeitos ao antagonismo do receptor CRF₂ bilateralmente no CPFm ventral ($F_{(2,17)} = 4,658$; $P=0,0453$) (Fig. 13, Painel Superior).

A análise dos valores médios de congelamento durante todo o período de reexposição ao contexto aversivo não indicou efeitos dos pré-tratamentos farmacológicos bilateralmente ($F_{(2,27)} = 1,248$; $P=0,1781$) (Fig. 13, Painel Superior). Entretanto, análise individualizada comparando os grupos veículo x antagonista do receptor CRF₂ também indicou valores de congelamento maiores nos animais sujeitos ao antagonismo do receptor CRF₂ ($t=2.158$, $df=17$, $P=0,0454$) (Fig. 13, Painel Superior).

A análise dos comportamentos ativos como a frequência de autolimpeza ($F_{(2,27)} = 1,743$; $P=0,1941$), levantamentos ($F_{(2,27)} = 0,1166$; $P=0,8904$) e cruzamentos ($F_{(2,27)} = 0,6344$; $P=0,5380$) não indicaram alterações em animais tratados bilateralmente com os antagonistas seletivos dos receptores CRF₁ ou CRF₂ no CPFm ventral em relação ao grupo controle (Fig. 13, Painel Inferior).

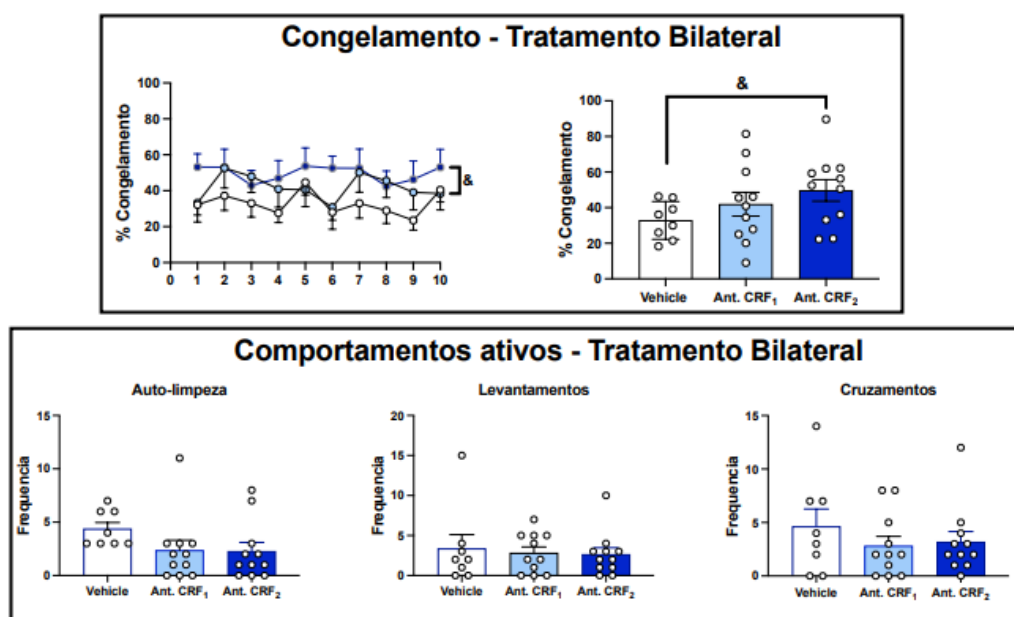


Figura 13 – Respostas comportamentais durante a reexposição ao contexto condicionado aversivamente. (**Superior**) Curvas temporais (gráfico à esquerda) e valores médios durante toda a sessão (gráfico à direita) do % de congelamento durante a reexposição à caixa de condicionamento em animais submetidos à microinjeção bilateral no CPFm de veículo (100nL, n=8), de CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF1, 5nmol/100nL, Ant. CRF1, n=11) ou antisauvagine-30 (antagonista seletivo do receptor CRF2, 5nmol/100nL, Ant. CRF2, n=11). Os valores em todos os gráficos representam a média±EPM. ANOVA bifatorial (curva temporal, gráfico à esquerda), ANOVA monofatorial (gráfico de barras à direita) ou teste t Student (gráfico de barras à direita, comparação individualizada). * $P < 0,05$, indicando efeito das comparações individualizadas dos grupos veículo e antagonista receptor CRF₁ (ANOVA bifatorial, curvas temporais; teste t Student, gráfico barras). (**Inferior**) Frequência de manifestação de comportamentos de autolimpeza (grooming) e levantamento e cruzamentos durante a re-exposição à câmara de condicionamento em animais submetidos à microinjeção bilateral no CPFm de veículo (n=8), CP376395 (n=11) ou antisauvagine-30 (n=11). Os valores em todos os gráficos representam a média±EPM. ANOVA monofatorial.

A análise das curvas temporais de variação da PAM, FC e temperatura cutânea da cauda durante a reexposição ao contexto condicionado aversivamente indicaram efeito do tempo (PAM: $F_{(15,375)} = 28,74$, $P < 0,0001$; FC: $F_{(15,375)} = 15,98$, $P < 0,0001$; temperatura: $F_{(2,50)} = 20,58$; $P < 0,0001$), porém sem influência dos pré-tratamentos farmacológicos (PAM: $F_{(2,25)} = 2,054$, $P = 0,1494$; FC: $F_{(2,25)} = 0,065$, $P = 0,9371$; temperatura: $F_{(2,25)} = 0,4020$; $P = 0,6734$) ou interação entre o tratamento *versus* tempo (PAM: $F_{(30,375)} = 1,417$, $P = 0,0751$; FC: $F_{(30,375)} = 0,6907$, $P = 0,8906$; temperatura: $F_{(4,50)} = 0,4214$; $P = 0,7924$) (Fig. 14). Entretanto, a análise individualizada das curvas temporais de variação de PAM comparando os grupos veículo x antagonista do receptor CRF₁ indicou valores menores nos animais sujeitos ao antagonismo do receptor CRF₁ bilateralmente no CPFm ventral em relação ao tratado com grupo veículo ($F_{(1,16)} = 5,549$; $P = 0,0316$) (Fig. 14).

A análise dos valores médios de variação da PAM ($F_{(2,25)} = 2,446$; $P = 0,1071$) e FC ($F_{(2,25)} = 0,0828$; $P = 0,9208$) durante todo o período de reexposição ao contexto aversivo também não indicou efeitos significativos dos pré-tratamentos bilaterais com os antagonistas seletivos dos receptores CRF₁ ou CRF₂ no CPFm ventral em relação ao grupo

tratado com veículo (Fig. 14). Entretanto, a análise individualizada da variação da PAM comparando os grupos veículo x antagonista do receptor CRF_1 indicou valores menores nos animais sujeitos ao antagonismo do receptor CRF_1 em relação ao grupo tratado com veículo ($t=2.464$, $df=16$, $P=0,0255$) (Fig. 14).

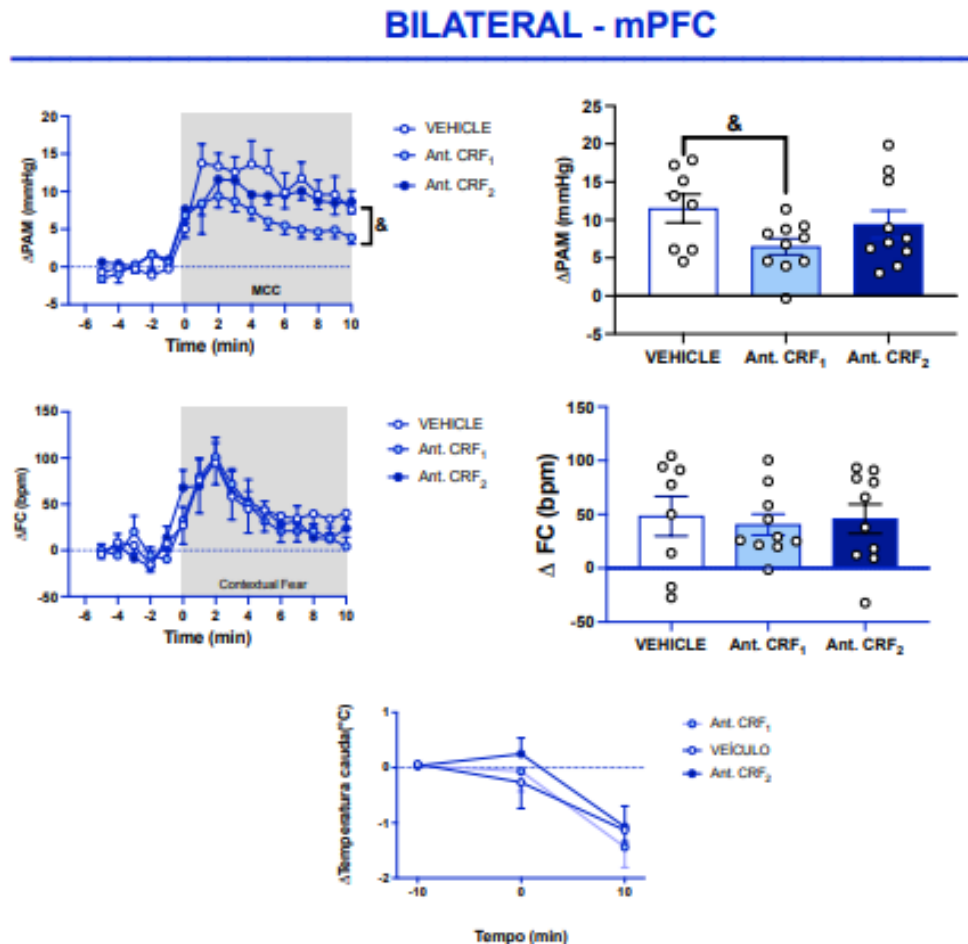


Figura 14 - Respostas cardiovasculares durante a reexposição ao contexto condicionado aversivamente. Curvas temporais (gráfico à esquerda e no final do painel) de variação da pressão arterial média (ΔPAM), frequência cardíaca (ΔFC) e temperatura cutânea da cauda (Δ temperatura cauda) durante a reexposição ao contexto condicionado aversivamente em animais submetidos à microinjeção bilateral no CPFM de veículo (100nL, $n=8$) de veículo (100nL, $n=8$), CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF_1 , 5nmol/100nL, Ant. CRF_1 , $n=10$) ou antisauvagine-30 (antagonista seletivo do receptor CRF_2 , 5nmol/100nL, Ant. CRF_2 , $n=10$). Valores médios de ΔPAM e ΔFC durante toda a sessão (gráfico à direita). Os valores em todos os gráficos representam a média $\pm$ EPM. ANOVA bifatorial (curva temporal, gráficos à esquerda), ANOVA monofatorial (gráficos de barras à direita) ou teste *t Student* (gráfico de barras à direita, comparação individualizada). & $P<0,05$, indicando efeito das comparações individualizadas dos grupos veículo e antagonista receptor CRF_1 (ANOVA bifatorial, curvas temporais; teste *t Student*, gráfico barras).

6.5. Efeito da microinjeção unilateral de CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF_1) ou de antisauvagine-30 (antagonista seletivo do receptor CRF_2) no HEMISFÉRIO ESQUERDO do CPFM nas respostas condicionadas ao contexto

A análise das curvas temporais do comportamento de congelamento durante a reexposição ao contexto condicionado aversivamente não indicou efeito do tempo ($F_{(3,527, 49,38)} = 1.886$, $P=0,1351$) ou interação entre os fatores tempo *versus* tratamento ($F_{(18,126)} = 0.8806$, $P=0.6025$), mas indicou efeito do tratamento ($F_{(2,14)} = 17,90$; $P=0,0001$) (Fig. 15, Painel Superior). A análise *post-hoc de Dunnett* revelou valores maiores de congelamento nos animais sujeitos ao pré-tratamento farmacológico com o antagonista seletivo do receptor CRF_2 nos minutos cinco ($P=0,0118$) e 10 ($P=0,0118$) da sessão teste do protocolo de MCC (Fig. 15, Painel Superior). A análise dos valores médios de congelamento durante todo o período de reexposição ao contexto aversivo indicou efeito dos pré-tratamentos farmacológicos unilateralmente no hemisfério esquerdo ($F_{(2,14)} = 19,26$; $P<0,0001$) (Fig. 15, Painel Superior). A análise *post-hoc de Dunnett* revelou aumento no comportamento de congelamento nos animais pré-tratados unilateralmente no hemisfério esquerdo com o antagonista seletivo do receptor CRF_2 ($P=0.0002$) (Fig. 15, Painel Superior). Entretanto, a análise dos comportamentos ativos como a frequência de autolimpeza ($F_{(2,14)} = 1,357$; $P=0,2894$), levantamentos ($F_{(2,14)} = 1,004$; $P=0,3914$) e cruzamentos ($F_{(2,14)} = 0,5696$; $P=0,5783$) durante o período de reexposição ao contexto condicionado aversivamente não indicou alterações nos animais tratados unilateralmente no hemisfério esquerdo com os antagonistas seletivos dos receptores CRF_1 ou CRF_2 em relação ao grupo tratado com veículo (Fig. 15, Painel Inferior).

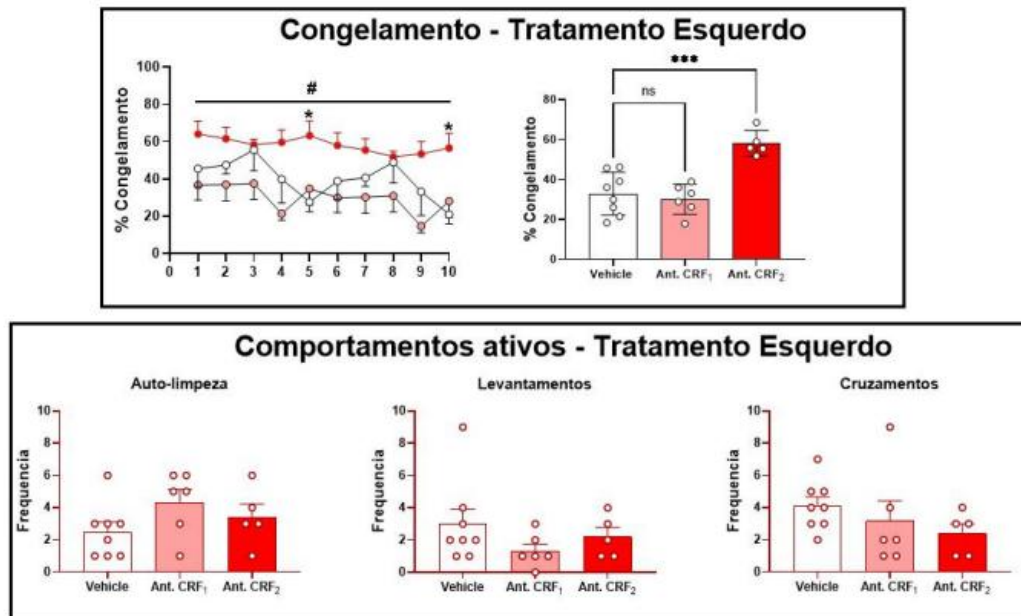


Figura 15 - Respostas comportamentais durante a reexposição ao contexto condicionado aversivamente. (Superior) Curvas temporais (gráfico à esquerda) e valores médios durante toda a sessão (gráfico à direita) do % de congelamento durante a reexposição à caixa de condicionamento em animais submetidos à microinjeção unilateral no hemisfério esquerdo do CPm de veículo (100nL, n=6), CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF_1 , 5nmol/100nL, Ant. CRF_1 , n=6) ou antisauvagine-30 (antagonista seletivo do receptor CRF_2 , 5nmol/100nL, Ant. CRF_2 , n=5). Os valores em todos os gráficos representam a média±EPM. * $P<0,05$, indicando efeito principal do tratamento,

ANOVA bifatorial; *** $P < 0,05$, ANOVA monofatorial seguida do pós-teste de Dunnet. **(Inferior)** Frequência de manifestação de comportamentos de autolimpeza (grooming) e levantamento e cruzamentos durante a reexposição à câmara de condicionamento em animais submetidos à microinjeção unilateral no hemisfério esquerdo do CPFm de veículo ($n=6$), CP376395 ($n=6$) ou antisauvagine-30 ($n=5$). Os valores em todos os gráficos representam a média $\pm$ EPM. ANOVA monofatorial.

A análise das curvas temporais de variação da PAM e temperatura cutânea da cauda durante a reexposição ao contexto condicionado aversivamente indicou efeito do tempo (PAM: $F_{(4,806,67.29)} = 34.02$, $P < 0,0001$; temperatura: $F_{(1,619, 22.67)} = 7.140$, $P = 0,0061$), porém sem influência dos pré-tratamentos farmacológicos (PAM: $F_{(2,14)} = 0,2167$, $P = 0,8078$; temperatura: $F_{(2,14)} = 0,0016$; $P = 0,9984$) ou interação entre o tratamento *versus* tempo (PAM: $F_{(28,196)} = 1,475$, $P = 0,0683$; temperatura: $F_{(4,28)} = 0,09375$; $P = 0,9836$) (Fig. 16). A análise das curvas temporais de variação da FC indicou efeito do tempo ($F_{(3,517,49,24)} = 9.543$, $P < 0,0001$) e interação entre tratamento e tempo ($F_{(28,196)} = 1,672$, $P = 0,0237$), porém sem efeito dos pré-tratamentos farmacológicos ($F_{(2,14)} = 0,5072$, $P = 0,6128$) (Fig. 16). A análise *post-hoc de Tukey* revelou valores reduzidos nos minutos um ($P = 0,0473$) e dois ($P < 0,05$) nos animais pré-tratados com o antagonista seletivo do receptor CRF_1 , ao passo que valores menores nos minutos zero ($P = 0,0285$) e um ($P < 0,05$) foi indicado nos animais pré-tratados com o antagonista seletivo do receptor CRF_2 (Fig. 16). No entanto, a análise dos valores médios de variação da PAM ($F_{(2,14)} = 0,1357$; $P = 0,8742$) e FC ($F_{(2,14)} = 0,3354$; $P = 0,7207$) durante todo o período de reexposição ao contexto aversivo não indicou efeitos significativos dos pré-tratamentos unilaterais no hemisfério esquerdo com os antagonistas seletivos dos receptores CRF_1 ou CRF_2 em relação ao grupo tratado com veículo (Fig. 16).

Esquerdo - mPFC

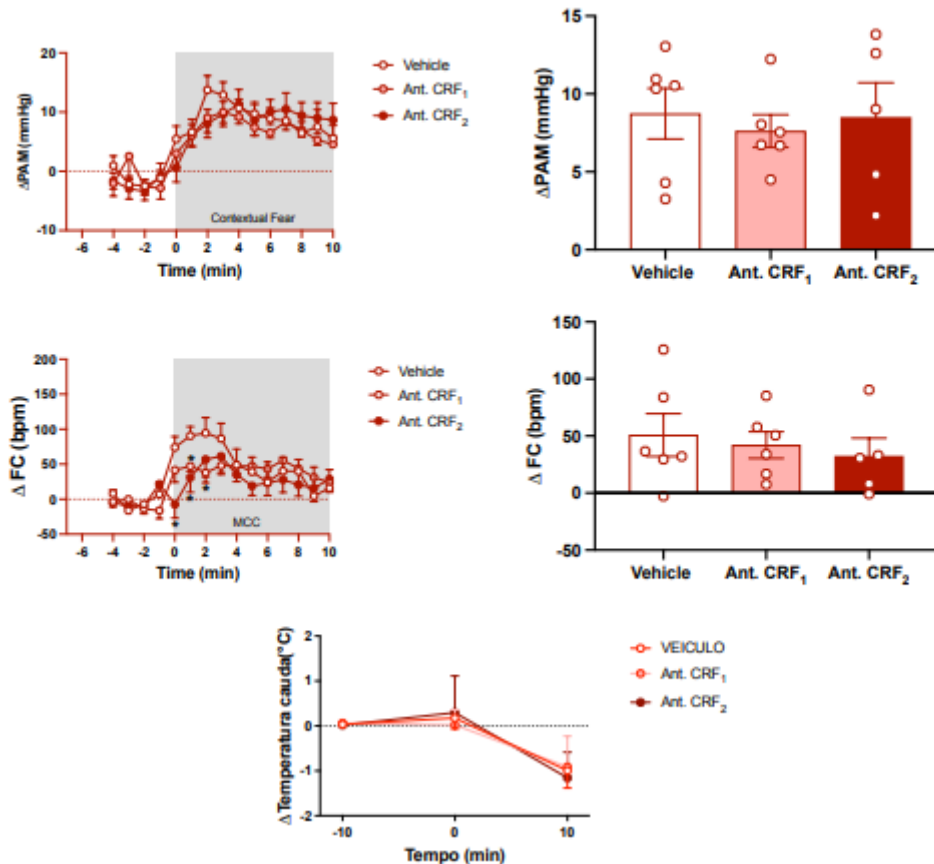


Figura 16 - Respostas cardiovasculares durante a reexposição ao contexto condicionado aversivamente. Curvas temporais (gráfico à esquerda e no final do painel) de variação da pressão arterial média (Δ PAM), frequência cardíaca (Δ FC) e temperatura cutânea da cauda (Δ temperatura) durante a reexposição ao contexto condicionado aversivamente em animais submetidos à microinjeção unilateral no hemisfério esquerdo do CPFm de veículo (100nL, n=8), CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF1, 5nmol/100nL, Ant. CRF1, n=6) ou antisauvagine-30 (antagonista seletivo do receptor CRF2, 5nmol/100nL, Ant. CRF2, n=5). Valores médios de Δ PAM e Δ FC durante toda a sessão (gráfico à direita). Os valores em todos os gráficos representam a média $\pm$ EPM. ANOVA bifatorial (curva temporal) ou ANOVA monofatorial (graficos de barras). * P<0,05, ANOVA bifatorial seguida do pós-teste de Dunnet

6.6. Efeito da microinjeção unilateral de CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF1) ou de antisauvagine-30 (antagonista seletivo do receptor CRF2) no hemisfério DIREITO do CPFm nas respostas condicionadas ao contexto

A análise das curvas temporais do comportamento de congelamento durante a reexposição ao contexto condicionado aversivamente não indicou efeito dos fatores tempo ($F_{(3,006, 12.02)} = 0.9185$, $P=0,4614$) ou tratamento ($F_{(1,4)} = 0,07523$; $P=0,7975$) ou interação entre o tempo *versus* o tratamento ($F_{(9,36)} = 1,679$; $P=0,1303$) (Fig. 17, Painel Superior). A análise dos valores médios de congelamento durante todo o período de reexposição ao contexto aversivo também não indicou diferenças entre os grupos experimentais ($t=0,2743$, $df=4$; $P=0,7975$). (Fig. 17, Painel Superior). Além disso, a

análise dos comportamentos ativos como a frequência de autolimpeza ($t=1,251$, $df=4$; $P=0,2791$), levantamentos ($t=0,5744$, $df=4$; $P=0,5965$) e cruzamentos ($t=0,3162$, $df=4$; $P=0,7676$) durante a reexposição ao contexto condicionado aversivamente também não indicou diferenças entre os grupos (Fig. 17, Painel Inferior).

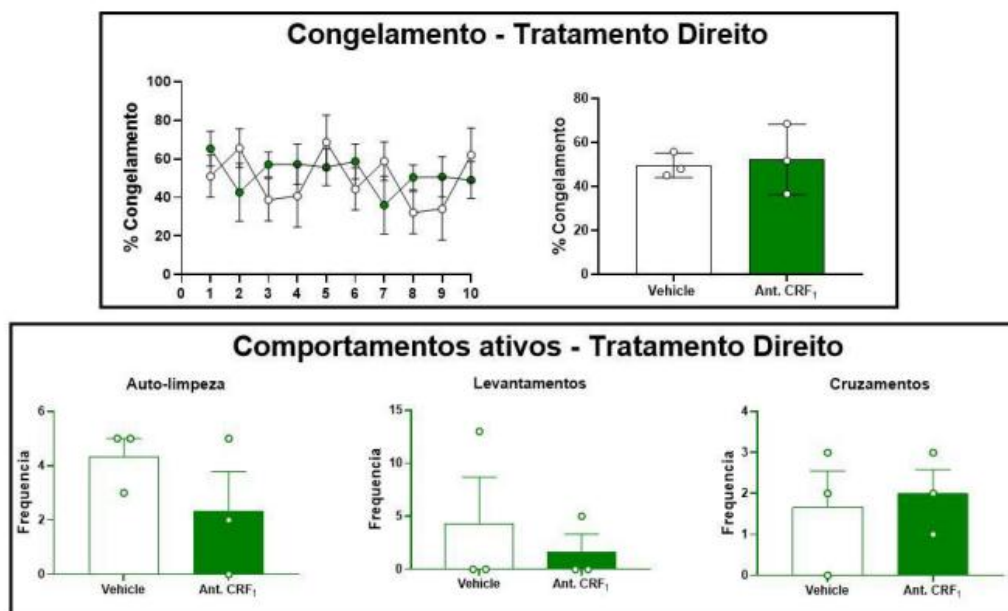


Figura 17 - Respostas comportamentais durante a reexposição ao contexto condicionado aversivamente. (Superior) Curvas temporais (grafico à esquerda) e valores médios durante toda a sessão (grafico à direita) do % de congelamento durante a reexposição à caixa de condicionamento em animais submetidos à microinjeção unilateral no CPFm direito de veículo (100nL, $n=3$) ou de CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF₁, 5nmol/100nL, Ant. CRF₁, $n=3$). Os valores em todos os gráficos representam a média±EPM. ANOVA bifatorial (curva temporal, grafico à esquerda) ou teste *t Student* (grafico de barras à direita). (Inferior) Frequência de manifestação de comportamentos de auto-limpeza, levantamentos e cruzamentos durante a reexposição à câmara de condicionamento em animais submetidos à microinjeção unilateral no hemisfério direito do CPFm de veículo ($n=3$) ou CP376395 ($n=3$). Os valores em todos os gráficos representam a média±EPM. Teste *t Student*.

A análise das curvas temporais de variação da PAM e FC durante a reexposição ao contexto condicionado aversivamente não indicou efeito do tratamento (PAM: $F_{(1,4)} = 0,1606$, $P=0,7090$; FC: $F_{(1,4)} = 0,4418$, $P=0,5426$), do tempo (PAM: $F_{(1,386, 5,543)} = 4,436$, $P=0,0779$; FC: $F_{(2,219, 8,876)} = 4,005$, $P=0,0546$) ou interação entre os fatores tratamento *versus* tempo (PAM: $F_{(14,56)} = 0,7337$, $P=0,7320$; FC: $F_{(14,56)} = 0,1,147$, $P=0,3371$) (Fig. 18). Além disso, a análise dos valores médios de variação da PAM ($t=0,6615$, $df=4$; $P=0,5444$) e FC ($t=0,5953$, $df=4$; $P=0,5837$) durante todo o período de reexposição ao contexto aversivo não indicou efeito significativo pré-tratamento farmacológico unilateralmente no hemisfério direito com o antagonista seletivo do receptor CRF₁ (Fig. 18). Por fim, a análise das curvas temporais de queda da temperatura cutânea da cauda desencadeada pelo MCC indicou efeito do tempo ($F_{(2,8)} = 4,612$; $P=0,0465$), mas sem influência do pré-tratamento farmacológico unilateralmente no hemisfério direito com o

antagonista seletivo do receptor CRF₁ ($F_{(1,4)} = 0,1516$; $P = 0,7168$) ou interação entre os fatores tratamento *versus* tempo ($F_{(2,8)} = 0,5960$; $P = 0,5738$) (Fig. 18).

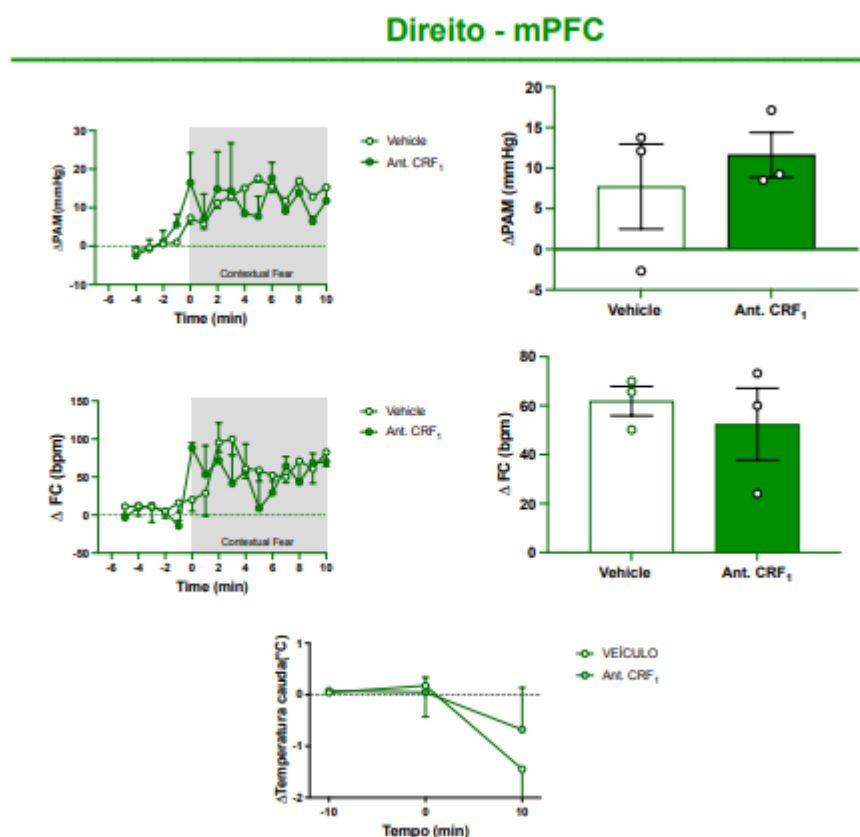


Figura 18 - Respostas cardiovasculares durante a reexposição ao contexto condicionado aversivamente. Curvas temporais (gráfico à esquerda) de variação da pressão arterial média (Δ PAM), frequência cardíaca (Δ FC) e temperatura cutânea da cauda (Δ temperatura cutânea) durante a reexposição ao contexto condicionado aversivamente em animais submetidos à microinjeção unilateral no hemisfério direito do CPFm de veículo (100nL, $n = 3$) ou CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF₁, 5nmol/100nL, Ant. CRF₁, $n = 3$). Valores médios de Δ PAM e Δ FC durante toda a sessão (gráfico à direita). Os valores em todos os gráficos representam a média $\pm$ EPM. ANOVA bifatorial (curvas temporais, gráficos à esquerda) ou teste t Student (gráficos de barras à direita).

7. DISCUSSÃO

A Tabela 3 sumariza os achados obtidos no período referente ao presente relatório referentes ao envolvimento da neurotransmissão CRFérgica no controle das respostas comportamentais, cardiovasculares e sobre a ativação neuronal local em animais sujeitos ao MCC.

Tabela 3 – Sumário dos efeitos dos pré-tratamentos farmacológicos bilateral ou unilateral nos hemisférios esquerdo ou direito do CPFm ventral nas respostas comportamentais (congelamento, cruzamentos, levantamentos e auto-limpeza), cardiovasculares (resposta pressora e taquicárdica) e de queda da temperatura cutânea da cauda (redução da temperatura cutânea) observados durante a reexposição ao contexto condicionado aversivamente (medo condicionado ao contexto, MCC). Também é sumarizado os achados acerca do efeito dos tratamentos farmacológicos sobre a ativação neuronal em animais submetidos ao protocolo de MCC.

	Bilateral	Hemisfério esquerdo	Hemisfério direito
Respostas comportamentais			
Congelamento	↑ (ASV-30)*	↑ (ASV-30)	
Cruzamentos	=	=	
Levantamentos	=	=	
Auto-limpeza	=	=	
Respostas cardiovasculares e autônomas			
Efeito pressor	↓ (CP376395)*	=	=#
Taquicardia	=	↓ (CP376395 e ASV-30)	=#
Redução temperatura cutânea	=	=	=#
Número de neurônios positivos para proteína Fos^{&}			
Efeito tratamento em animais submetidos MCC	=	↑ (CP376395 e ASV-30)	↑ (ASV-30)

↑, aumento da resposta; ↓, diminuição/inibição do efeito; =, sem efeito significativo. Em parênteses é apresentado o fármaco que causou o efeito.

*Efeito identificado somente por meio da comparação individualizada dos grupos veículo e do antagonista em que o efeito foi identificado.

& dados apresentados no relatório anterior, mas são destacados aqui devido à relevância para a discussão dos achados obtidos no período referente ao presente relatório

Dados preliminares (n=3/grupo)

ASV-30, antisauvagine-30 (antagonista seletivo receptor CRF₂); CP376395, antagonista seletivo receptor CRF₁

7.1. Lateralização funcional no controle pelo CPFm das respostas de congelamento e cardiovasculares desencadeadas pelo MCC

Nossos resultados fornecem a primeira evidência de uma lateralização funcional no controle da resposta comportamental desencadeada pelo o MCC no CPFm. De fato, nós observamos que a microinjeção do inibidor pré-sináptico não-seletivo (CoCl₂) bilateralmente ou unilateralmente no hemisfério direito do CPFm reduziu o comportamento de congelamento durante a reexposição ao contexto condicionado aversivamente. O efeito no comportamento de congelamento foi seguido por uma diminuição nas respostas pressoras e taquicárdicas em animais submetido à microinjeção bilateral (mas não unilateral) de CoCl₂ no CPFm. Por outro lado, a inibição sináptica não-seletiva no CPFm esquerdo não afetou as respostas cardiovasculares e comportamental desencadeadas pelo MCC.

Resstel e colaboradores (2006) relataram previamente que a microinjeção bilateral de CoCl₂ (inibidor pré-sináptico não-seletivo) no CPFm diminuiu tanto o congelamento quanto as respostas pressora e taquicárdica durante a reexposição à câmara de condicionamento em ratos. Nesse sentido, os resultados relatados aqui reproduzem essas descobertas anteriores ao indicar um papel proeminente do CPFm na expressão das respostas comportamental e cardiovasculares desencadeadas pelo MCC. Esta evidência

está também em linha com dados anteriores de que a lesão bilateral do CPFm reduziu a taquicardia (mas não o efeito pressor) e o comportamento de congelamento desencadeados pelo medo condicionado ao som (Fryszak; Neafsey, 1994b). Também vale a pena ser mencionado estudos prévios que investigaram o papel de mecanismos neuroquímicos locais e que utilizaram abordagens genéticas para manipular o CPFm e indicaram um papel desta área cortical no controle das respostas cardiovasculares e de congelamento ao MCC (Ferreira-Junior et al., 2012b; Moraes Resstel; De Aguiar Correa; Guimaraes, 2008a; Terzian et al., 2014; Uliana et al., 2020), bem como nas respostas pressoras e taquicárdicas a estímulos aversivos não-condicionados (Fassini; Resstel; Corrêa, 2016; Müller-Ribeiro et al., 2012; Schaeuble et al., 2019).

Uma lateralização funcional foi relatada no cérebro humano, de modo que o hemisfério direito parece estar relacionado ao processamento afetivo e emocional e a manifestação de alterações fisiológicas e mudanças comportamentais relacionadas a emoções negativas (Cerqueira; Almeida; Sousa, 2008b; Czéh et al., 2007; Davidson, 2004; Rotenberg, 2004; Sullivan, 2004b). Em acordo com as evidências obtidas em humanos, estudos em roedores demonstraram um papel proeminente do hemisfério direito nas respostas fisiológicas e comportamentais a estímulos aversivos, e o CPFm parece ser uma região cortical do encéfalo onde esta lateralização se manifesta (Costa et al., 2016b; Santos-Costa et al., 2021; Sullivan; Gratton, 1999b; Victoriano et al., 2020). Neste sentido, a evidência relatada aqui de que a microinjeção unilateral de CoCl_2 no CPFm direito reduziu o congelamento durante a reexposição à câmara de condicionamento fornece informações adicionais em relação a lateralização funcional no CPFm ao indicar pela primeira vez que o CPFm direito está envolvido na expressão de comportamentos relacionadas ao medo condicionado. Nossos achados também estão de acordo com evidências anteriores de que a lesão ou inibição química com CoCl_2 do CPFm direito causou efeitos do tipo ansiolítico no LCE (Costa et al., 2016b; Santos-Costa et al., 2021; Sullivan; Gratton, 2002b). Portanto, o CPFm direito parece ser necessário e suficiente para a expressão de comportamentos defensivos evocados tanto por estímulos aversivos condicionados quanto não-condicionados.

Inesperadamente, a microinjeção unilateral de CoCl_2 no CPFm direito não afetou as alterações cardiovasculares observadas durante a reexposição ao contexto aversivo. Desse modo, a lateralização no controle do comportamento de congelamento parece estar dissociada da regulação das respostas cardiovasculares ao MCC no CPFm. Considerando que a administração bilateral de CoCl_2 no CPFm diminuiu as respostas pressora e

taquicárdica, nossos achados sugerem que a expressão das respostas cardiovasculares durante a reexposição ao contexto condicionado aversivamente é regulado bilateralmente no CPFm. Um controle dissociado do comportamento de congelamento e das respostas cardiovasculares desencadeadas pelo MCC foi relatado em outras áreas do encéfalo. Por exemplo, a microinjeção bilateral de CoCl_2 no hipocampo dorsal 10 minutos antes da reexposição à câmara de condicionamento reduziu significativamente as respostas cardiovasculares, porém sem afetar a resposta comportamental de congelamento (Resstel et al., 2008b). Além disso, uma regulação diferencial de alterações comportamentais e cardiovasculares causadas por estímulos aversivos não-condicionados, como por exemplo o estresse de restrição, também foram relatados anteriormente em várias regiões encefálicas, incluindo o hipocampo, a área septal lateral (ASL), o núcleo paraventricular do hipotálamo (NPH) e o núcleo do leito da estria terminal (NLET) (Gouveia et al., 2016; Reis et al., 2011; Scopinho et al., 2013).

O hemisfério esquerdo tem sido associado às funções motoras e de linguagem, a comportamentos de apetite e emoções positivas (Cerqueira et al., 2007; Cerqueira; Almeida; Sousa, 2008b; Czéh et al., 2007; Davidson, 2004; Rotenberg, 2004). Nesse sentido, estudos em roedores forneceram evidências de que a modulação das emoções pelo o CPFm esquerdo pode ser mediado por uma inibição do CPFm direito. Por exemplo, um estudo anterior identificou que a inibição do CPFm esquerdo com CoCl_2 causou efeito do tipo ansiogênico no LCE (Costa et al., 2016b), no qual foi acompanhado por maior ativação neuronal contralateral e foi inibido pelo antagonismo de receptores glutamatérgicos no CPFm direito (Santos-Costa et al., 2021). Além disso, alguns estudos indicaram que a manifestação de evitação social e as consequências comportamentais (por exemplo, efeito do tipo ansiogênico) decorrentes da exposição a estressores pode estar relacionado a uma atividade/função reduzida do CPFm esquerdo (Canto-de-Souza et al., 2021; Czéh et al., 2007; Lee et al., 2015). Apesar dessas evidências, não identificamos um efeito da inibição sináptica unilateral no CPFm esquerdo no congelamento e nas alterações cardiovasculares durante a reexposição ao contexto de condicionamento. Portanto, nossos achados indicam que o papel contrarregulador do CPFm esquerdo na expressão da ansiedade inata (Costa et al., 2016b; Santos-Costa et al., 2021) e nas alterações comportamentais causadas por estressores (Canto-de-Souza et al., 2021; Lee et al., 2015) parece não se manifestar nas respostas comportamental e cardiovasculares relacionadas ao MCC. No entanto, vale ressaltar que o CPFm esquerdo pode ser suficiente para a aprendizagem de estímulos não-aversivos. Por exemplo, um

estudo anterior identificou que a microinjeção local de agonistas e antagonistas de receptores dopaminérgicos no CPFm esquerdo, mas não no hemisfério direito, afetou o desempenho no teste de reconhecimento de objetos novos (Willner et al., 2019)

Em resumo, os resultados obtidos no presente estudo indicam uma lateralização funcional no processamento pelo CPFm do comportamento de congelamento durante a reexposição ao contexto condicionado aversivamente, sendo o hemisfério direito desta estrutura cortical necessário e suficiente para a expressão deste comportamento. No entanto, o controle das respostas cardiovasculares parece estar dissociado do comportamento de congelamento, de modo que nossos resultados sugerem que a regulação desta resposta fisiológica do MCC é processada bilateralmente no CPFm. Finalmente, o CPFm esquerdo parece não ser relevante para a regulação unilateral do congelamento e das respostas cardiovasculares desencadeadas pelo MCC.

7.2. Efeito do tratamento bilateral ou unilateral do CPFm com antagonistas seletivos dos receptores CRFérgicos sobre a ativação neuronal local em animais expostos ao protocolo de MCC

Nós também identificamos que o tratamento unilateral, mas não bilateral, com antagonistas seletivos dos receptores CRFérgicos afetou a ativação neuronal local no CPFm em animais expostos ao MCC. Nesse sentido, nossos resultados forneceram evidências de que a microinjeção unilateral do antagonista seletivo do receptor CRF₂ no hemisfério direito ou esquerdo aumentou o número de células marcadas para a proteína Fos ipsilateralmente em relação ao tratamento, ao passo que o antagonista do receptor CRF₁ elevou a ativação neuronal ipsilateral somente quando injetado no hemisfério esquerdo. Segue abaixo discussão referente aos achados de lateralização funcional no controle das respostas ao MCC evidenciados no protocolo de tratamento do CPFm com CoCl₂, bem como dos efeitos do tratamento do CPFm com antagonistas seletivos dos receptores CRFérgicos sobre a ativação neuronal local em animais expostos ao protocolo de MCC.

Os dados obtidos no período referente ao presente relatório indicam uma influência inibitória dos receptores CRF₁ presentes no hemisfério esquerdo e dos receptores CRF₂ nos hemisférios direito e esquerdo sobre a ativação neuronal local ipsilateral em relação ao tratamento do CPFm de animais submetidos ao protocolo de MCC. O receptor CRF₁ foi demonstrado ser expresso em neurônios piramidais

glutamatérgicos (Gallopín et al., 2006b; Refojo et al., 2011b) e em terminais sinápticos (Yarur et al., 2020) no CPFm. Os nossos achados estão em linha com evidências prévias de que a ativação desse receptor reduziu correntes pós-sinápticas excitatórias (EPSCs) (Orozco-Cabal et al., 2008) e facilitou correntes pós-sinápticas inibitórias (IPSC) em neurônios piramidais do CPFm (Alizamini et al., 2022; Lv et al., 2024), sendo esse último efeito mediado por uma facilitação das correntes do receptor GABA_A (Lv et al., 2024). Entretanto, é importante salientar que o receptor CRF₁ também parece possuir ações excitatórias no CPFm, uma vez que foi encontrado que a ativação desse receptor localizado em terminais pré-sinápticos pode aumentar a liberação de glutamato e a frequência de EPSCs (Alizamini et al., 2022; Yarur et al., 2020).

A expressão do receptor CRF₂ foi identificada exclusivamente em terminais pré-sinápticos no CPFm (Yarur et al., 2020). Foi demonstrado que a ativação desses receptores pré-sinápticos causou diminuição na liberação de glutamato e dos potenciais de campo locais no CPFm (Yarur et al., 2021, 2020). Esses achados indicando uma ação inibitória do receptor CRF₂ no CPFm também suportam os nossos dados.

Como discutido acima, estudos prévios em roedores forneceram evidências de que o controle de respostas comportamentais pelo hemisfério esquerdo do CPFm parece ser mediado por uma inibição contralateral do CPFm direito (Cerqueira; Almeida; Sousa, 2008b; Santos-Costa et al., 2021). Entretanto, em contradição a esses achados, nós não identificamos efeito na ativação neuronal contralateral nos animais sujeitos ao antagonismo dos receptores CRF₁ ou CRF₂ nos hemisférios direito ou esquerdo do CPFm. Nesse sentido, os achados reportados no presente relatório indicam que um eventual controle unilateral dessas respostas do MCC por mecanismos CRFérgicos no CPFm parece ser independente de uma modulação contralateral.

Pode-se notar que o número de células marcadas para a proteína Fos foi maior nos animais submetidos ao procedimento para microinjeção bilateral em relação aos animais submetidos ao tratamento unilateral. Essa diferença fica evidente nas fotos de animais representativos ilustrando a marcação para a proteína Fos (*Figuras 8A, 9A e 10A*). Essa disparidade não está relacionada com diferenças na área analisada, já que os valores obtidos de células marcadas foram corrigidos pela área quantificada (*dados expressos como “número de células Fos/mm²”*). Desse modo, as razões para essa discrepância não estão claras para nós. Uma possibilidade seria diferenças no protocolo experimental, já que os animais submetidos ao tratamento bilateral tiveram duas cânulas intra-cerebrais implantadas e foram submetidos ao procedimento de microinjeção duas vezes

(hemisférios direito e esquerdo) no dia do experimento; ao passo que para as injeções unilaterais foi implantada uma cânula unilateral, e os animais passaram pelo procedimento de injeção somente uma vez. *De qualquer maneira, é importante salientar que as diferenças parecem ser consistentes em todos os grupos experimentais em cada condição. Desse modo, considerando que a proposta foi avaliar o efeito dos tratamentos em cada condição experimental individualmente (i.e., bilateral ou unilateral nos hemisférios direito ou esquerdo), parece que essa discrepância não afetou a análise do efeito do tratamento com os antagonistas de receptores CRFérgicos sobre a ativação neuronal local em cada condição experimental.*

Em suma, os dados obtidos nesse protocolo indicam uma influência inibitória dos receptores CRFérgicos na ativação neuronal local no CPFm durante a exposição ao protocolo de MCC, e esse efeito parece depender do subtipo de receptor e do hemisfério encefálico.

7.3. Efeito do tratamento bilateral ou unilateral do CPFm com antagonistas seletivos dos receptores CRFérgicos sobre a ativação neuronal local em animais expostos ao protocolo de MCC

Os dados obtidos no período referente ao presente relatório indicam uma influência inibitória dos receptores CRF₁ presentes no hemisfério esquerdo e dos receptores CRF₂ nos hemisférios direito e esquerdo sobre a ativação neuronal local ipsilateral em relação ao tratamento do CPFm de animais submetidos ao protocolo de MCC. O receptor CRF₁ foi demonstrado ser expresso em neurônios piramidais glutamatérgicos (Gallopín et al., 2006b; Refojo et al., 2011b) e em terminais sinápticos (Yarur et al., 2020) no CPFm. Os nossos achados estão em linha com evidências prévias de que a ativação desse receptor reduziu correntes pós-sinápticas excitatórias (EPSCs) (Orozco-Cabal et al., 2008) e facilitou correntes pós-sinápticas inibitórias (IPSC) em neurônios piramidais do CPFm (Alizamini et al., 2022; Lv et al., 2024), sendo esse último efeito mediado por uma facilitação das correntes do receptor GABA_A (Lv et al., 2024). Entretanto, é importante salientar que o receptor CRF₁ também parece possuir ações excitatórias no CPFm, uma vez que foi encontrado que a ativação desse receptor localizado em terminais pré-sinápticos pode aumentar a liberação de glutamato e a frequência de EPSCs (Alizamini et al., 2022; Yarur et al., 2020).

A expressão do receptor CRF₂ foi identificada exclusivamente em terminais pré-sinápticos no CPFm (Yarur et al., 2020). Foi demonstrado que a ativação desses

receptores pré-sinápticos causou diminuição na liberação de glutamato e dos potenciais de campo locais no CPFm (Yarur et al., 2021, 2020). Esses achados indicando uma ação inibitória do receptor CRF₂ no CPFm também suportam os nossos dados.

Como discutido acima, estudos prévios em roedores forneceram evidências de que o controle de respostas comportamentais pelo hemisfério esquerdo do CPFm parece ser mediado por uma inibição contralateral do CPFm direito (Cerqueira; Almeida; Sousa, 2008b; Santos-Costa et al., 2021). Entretanto, em contradição a esses achados, nós não identificamos efeito na ativação neuronal contralateral nos animais sujeitos ao antagonismo dos receptores CRF₁ ou CRF₂ nos hemisférios direito ou esquerdo do CPFm. *No próximo período nós iremos investigar os efeitos do antagonismo seletivo dos receptores CRFérgicos bilateralmente e unilateralmente no CPFm sobre as respostas comportamental de congelamento e cardiovasculares desencadeadas pelo MCC (para detalhes, ver seção 10).* Nesse sentido, os achados reportados no presente relatório indicam que um eventual controle unilateral dessas respostas do MCC por mecanismos CRFérgicos no CPFm parece ser independente de uma modulação contralateral.

Pode-se notar que o número de células marcadas para a proteína Fos foi maior nos animais submetidos ao procedimento para microinjeção bilateral em relação aos animais submetidos ao tratamento unilateral. Essa diferença fica evidente nas fotos de animais representativos ilustrando a marcação para a proteína Fos (*Figuras 8A, 9A e 10A*). Essa disparidade não está relacionada com diferenças na área analisada, já que os valores obtidos de células marcadas foram corrigidos pela área quantificada (*dados expressos como “número de células Fos/mm²”*). Desse modo, as razões para essa discrepância não estão claras para nós. Uma possibilidade seria diferenças no protocolo experimental, já que os animais submetidos ao tratamento bilateral tiveram duas cânulas intra-cerebrais implantadas e foram submetidos ao procedimento de microinjeção duas vezes (hemisférios direito e esquerdo) no dia do experimento; ao passo que para as injeções unilaterais foi implantada uma cânula unilateral, e os animais passaram pelo procedimento de injeção somente uma vez. *De qualquer maneira, é importante salientar que as diferenças parecem ser consistentes em todos os grupos experimentais em cada condição. Desse modo, considerando que a proposta foi avaliar o efeito dos tratamentos em cada condição experimental individualmente (i.e., bilateral ou unilateral nos hemisférios direito ou esquerdo), parece que essa discrepância não afetou a análise do efeito do tratamento com os antagonistas de receptores CRFérgicos sobre a ativação neuronal local em cada condição experimental.*

Em suma, os dados obtidos nesse protocolo indicam uma influência inibitória dos receptores CRFérgicos na ativação neuronal local no CPFm durante a exposição ao protocolo de MCC, e esse efeito parece depender do subtipo de receptor e do hemisfério encefálico.

7.4. Efeito da microinjeção BILATERAL no CPFm de antagonistas de receptores CRFérgicos nas respostas condicionadas ao contexto

Com relação aos dados obtidos durante o período referente ao presente relatório, nós observamos com a microinjeção bilateral no CPFm de antisauvagine-30 (antagonista seletivo do receptor CRF₂) aumentou a expressão do comportamento de congelamento durante a reexposição ao contexto condicionado aversivamente, ao passo que o tratamento com CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF₁) reduziu a resposta pressora. Os achados do tratamento bilateral com o antagonista do receptor CRF₂ sobre a resposta de congelamento contrastam com dados publicados recentemente (Gomes-de-Souza et al., 2024), bem como com dados prévios de Resstel e colaboradores (2006), em que foi observado que a microinjeção bilateral de CoCl₂ (inibidor sináptico não-seletivo) no CPFm diminuiu esse comportamento durante a reexposição à caixa em que os animais receberam choque previamente. Entretanto, é importante destacar evidências prévias de que o receptor CRF₂ é expresso exclusivamente em terminais pré-sinápticos no CPFm (Yarur et al., 2020), e que a ativação desse receptor pré-sináptico causou diminuição na liberação de glutamato e nos potenciais de campo locais no CPFm, o que sugere um efeito local predominantemente inibitório. A ideia de uma ação inibitória do receptor CRF₂ é suportada por dados desse projeto reportados no relatório anterior em que o tratamento unilateral nos hemisférios direito ou esquerdo com antagonista desse receptor em animais submetidos ao protocolo de MCC aumentou a ativação neuronal local (*Tabela 2*). Desse modo, em conjunto com os dados reportados no relatório em animais sujeitos ao tratamento bilateral com CoCl₂, as evidências do presente projeto indicam que a ativação do receptor CRF₂ parece ser um mecanismo contra-regulatório no CPFm sobre as ações de outros mecanismos neuroquímicos locais que medeiam o envolvimento do CPFm na expressão da resposta de congelamento durante o MCC através de um aumento na ativação neuronal local. Nesse sentido, estudo prévios indicaram um envolvimento das neurotransmissões glutamatérgica, colinérgica, nitrérgica e endovanilóide nas respostas do MCC (Fedoce et al., 2016; Moraes Resstel; De Aguiar Correa; Guimaraes, 2008b; Terzian et al., 2014; Uliana et al., 2020). Importante destacar que foi relatado que a

neurotransmissão endocanabinoide local, atuando via o receptor CB₁, também parece atuar no CPFm inibindo a expressão da resposta de congelamento desencadeada pelo MCC (Lisboa et al., 2010a; Uliana et al., 2020). Entretanto, uma possível interação entre as neurotransmissões CRFérgicas e endocanabinoide nunca foi documentada, de modo que estudos futuros são necessários para investigar se os efeitos da ativação dos receptores CRF₂ e CB₁ sobre as respostas do MCC são sinérgicas ou parte de uma mesma via de sinalização.

O efeito de redução no comportamento de congelamento desencadeado pelo MCC nos animais sujeitos ao tratamento bilateral com CoCl₂ descritos acima (Gomes-de-Souza et al., 2024; Resstel et al., 2006b) foi seguido por uma diminuição nas respostas pressoras e taquicárdicas observadas durante a reexposição ao contexto condicionado aversivamente. Nós observamos que o tratamento bilateral com o antagonista seletivo do receptor CRF₁ reduziu a resposta pressora ao MCC, porém sem afetar a taquicardia. Desse modo, os dados obtidos no período fornecem evidências de que a neurotransmissão CRFérgica atuando via ativação do receptor CRF₁ parece mediar, ao menos em parte, o controle pelo CPFm das respostas cardiovasculares ao MCC. Evidências prévias indicaram que a ativação do receptor CRF₁ em neurônios piramidais do CPFm reduziu correntes pós-sinápticas excitatórias (EPSCs) (Orozco-Cabal et al., 2008) e facilitou correntes pós-sinápticas inibitórias (IPSC) (Alizamini et al., 2022; Lv et al., 2024), o que indica efeitos predominantemente inibitórios na atividade neuronal local no CPFm. Dados do presente estudo reportados no relatório anterior estão em linha com esses achados, uma vez que observamos que o antagonismo do receptor CRF₁ unilateralmente no hemisfério esquerdo aumentou a ativação neuronal local. Entretanto, o receptor CRF₁ também parece possuir ações excitatórias no CPFm, uma vez que foi documentado que a ativação desse receptor localizado em terminais pré-sinápticos pode aumentar a liberação de glutamato e a frequência de EPSCs (Alizamini et al., 2022; Yarur et al., 2020). Além disso, os dados relatados acima não evidenciaram efeito do tratamento bilateral com o antagonista do receptor CRF₁ sobre a ativação neuronal local (*Tabela 2*). Desse modo, é possível que o envolvimento do receptor CRF₁ CPFm na expressão da resposta pressora ao MCC seja mediado por mecanismos que aumentam a ativação neuronal local. Além disso, os nossos dados sugerem que o controle pelo CPFm da resposta taquicárdica parece ser mediada por mecanismos neuroquímicos independentes da neurotransmissão CRFérgica.

7.5. Efeito da microinjeção unilateral no HEMISFÉRIO ESQUERDO do CPFm de antagonistas de receptores CRFérgicos nas respostas condicionadas ao contexto

Nós descrevemos no presente relatório que o bloqueio sináptico não-seletivo do CPFm esquerdo por meio da microinjeção unilateral no hemisfério esquerdo de CoCl_2 (inibidor sináptico não-seletivo) não afetou as respostas comportamentais e cardiovasculares ao MCC. Desse modo, o aumento no comportamento de congelamento nos animais sujeitos ao antagonismo do receptor CRF_2 no CPFm esquerdo e a redução da resposta taquicárdica após o antagonismo dos receptores CRF_1 ou CRF_2 contrastam com a ausência de efeito da inibição sináptica não-seletiva. Considerando a ausência de efeito com o bloqueio sináptico não-seletivo, uma possibilidade seria que os efeitos da neurotransmissão CRFérgica obtidos no presente estudo sejam contraregulados pela ação oposta de outros mecanismos neuroquímicos locais, o que explicaria a ausência de efeito após o bloqueio sináptico não seletivo (ou seja, ambos os mecanismos estariam inibidos).

Como discutido acima, a expressão do receptor CRF_2 foi identificada exclusivamente em terminais pré-sinápticos no CPFm (Yarur et al., 2020), e a ativação desse receptor causou diminuição na liberação de glutamato e dos potenciais de campo locais no CPFm (Yarur et al., 2021, 2020). Desse modo, os efeitos do CRF_2 sobre o comportamento de congelamento e a taquicardia podem estar relacionados com uma influência inibitória sobre mecanismos excitatórios glutamatérgicos locais. Essa ideia é reforçada por nossos dados de que o antagonismo do receptor CRF_2 no CPFm esquerdo aumentou a ativação neuronal ipsilateralmente (*Tabela 2*).

Com relação ao controle da taquicardia pelo receptor CRF_1 no CPFm esquerdo, nós descrevemos que o antagonismo desse receptor no CPFm esquerdo causou aumento da ativação neuronal local ipsilateralmente ao tratamento, o que sugere uma ação predominantemente inibitória. Evidências prévias indicaram que as ações inibitórias do receptor CRF_1 no CPFm parece estar relacionado com a ativação do receptor em neurônios piramidais (isto é, pós-sinápticamente) (Alizamini et al., 2022; Lv et al., 2024; Orozco-Cabal et al., 2008). Desse modo, assim como no caso do controle mediado pelo receptor CRF_2 , o envolvimento do receptor CRF_1 na resposta de taquicardia parece ser contraregulado por mecanismos excitatórios locais atuando no hemisfério esquerdo do CPFm.

Nossos achados descritos também indicaram que o antagonismo dos receptores CRF_1 ou CRF_2 no CPFm esquerdo não causou alteração na ativação neuronal contralateralmente (i.e., no hemisfério direito). Desse modo, contrário à nossa hipótese

inicial de que o hemisfério esquerdo fornece uma ação inibitória sobre o hemisfério direito no CPFm, esses achados fornecem evidências de que a regulação das respostas ao MCC pelos receptores CRF no CPFm esquerdo é independente de uma modulação na atividade do CPFm direito.

7.6. Efeito da microinjeção unilateral no HEMISFÉRIO DIREITO do CPFm de antagonistas de receptores CRFérgicos nas respostas condicionadas ao contexto

Nós apresentamos no presente relatório dados preliminares (n=3/grupo) relativos ao efeito do antagonismo do receptor CRF₁ no CPFm direito sobre as respostas ao MCC. Nós observamos que a microinjeção unilateral no hemisfério direito do CPFm de CP376395 (antagonista seletivo do receptor CRF₁) não causou alterações estatisticamente significativas sobre o comportamento de congelamento e as respostas cardiovasculares durante a reexposição ao contexto condicionado aversivamente. O tratamento também não afetou os comportamentos de autolimpeza, levantamentos e cruzamentos. Como citado anteriormente, apesar do encerramento da bolsa PD-FAPESP, o pesquisador dará continuidade ao desenvolvimento desse projeto por meio de uma bolsa PIPD-CAPES, de modo que nós planejamos CONCLUIR nos próximos meses os experimentos para avaliação do envolvimento de receptores CRF no CPFm direito nas respostas cardiovasculares e comportamentais ao MCC.

8. ASPECTOS GERAIS

Um importante aspecto a ser destacado é a dissociação no controle das respostas de congelamento e cardiovasculares ao MCC pela neurotransmissão CRFérgica no CPFm. Essa dissociação foi observada no efeito do tratamento bilateral com o antagonista do receptor CRF₂ sobre a resposta de congelamento e do antagonista do receptor CRF₁ sobre a resposta pressora. Efeitos diferentes dos antagonistas dos receptores CRF sobre as respostas de congelamento e a taquicardia ao MCC também foi evidenciado com o tratamento unilateral no hemisfério esquerdo do CPFm (*para detalhes, ver Tabela 2*). Um controle dissociado das respostas cardiovasculares e de congelamento evocadas por CFC foi relatado em outras áreas encefálicas. Por exemplo, a microinjeção bilateral de CoCl₂ no hipocampo dorsal 10 minutos antes da reexposição à câmara de choque reduziu significativamente as respostas cardiovasculares, porém sem afetar a resposta de congelamento (Resstel et al., 2008b). Foi também reportado um papel oposto da matéria cinzenta periaqueductal ventrolateral nas respostas comportamentais e cardiovasculares ao MCC, de modo que essa região do tronco cerebral estaria envolvida na expressão do

comportamento de congelamento em paralelo a um papel inibitório sobre a resposta de FC (porém sem afetar a resposta pressora) (Walker; Carrive, 2003). Em conjunto, esses dados fornecem evidências da existência de circuitos encefálicos específicos envolvidos na expressão das respostas comportamentais e cardiovasculares ao MCC, incluindo vias paralelas para a expressão das respostas pressora e taquicárdica. Desse modo, os dados documentados no presente relatório sugerem que o CPFm através da ação da neurotransmissão CRFérgica parece atuar de maneira específica nos vários circuitos envolvidos na expressão das reações de defesa ao MCC.

9. CONCLUSÃO

Em resumo, os resultados obtidos no presente estudo indicam uma lateralização funcional no processamento pelo CPFm do comportamento de congelamento durante a reexposição ao contexto condicionado aversivamente, sendo o hemisfério direito desta estrutura cortical necessário e suficiente para a expressão deste comportamento.

Adicionalmente, os dados moleculares indicam uma influência inibitória dos receptores CRFérgicos na ativação neuronal local no CPFm durante a exposição ao protocolo de MCC, e esse efeito parece depender do subtipo de receptor e do hemisfério encefálico.

E além disso, evidenciamos um envolvimento da neurotransmissão CRFérgica do CPFm nas respostas de congelamento e cardiovasculares ao MCC. Esse controle parece ser lateralizado e envolver ambos os receptores CRFérgicos (isto é, receptores CRF₁ e CRF₂). Além disso, o controle das respostas comportamentais e cardiovasculares parece ser dissociado, de modo que os receptores CRF₁ e CRF₂ parecem participar de circuitos paralelos envolvidos na expressão das respostas de congelamento, pressora e taquicárdica.

10. DIFICULDADES ENCONTRADAS NO PERÍODO

Durante o período referente a bolsa de pós-doutorado tivemos algumas dificuldades que resultaram em atraso na execução do projeto. A seguir, uma breve explanação acerca das dificuldades encontradas.

Inicialmente, tivemos problemas durante a fase de padronização do medo condicionado ao contexto no laboratório (*lembrando que esse era um modelo experimental novo a ser implantado no grupo de pesquisa*). A dificuldade inicialmente centrou-se no processo de aquisição da caixa de condicionamento e adequação do aparato de condicionamento. Nesse sentido, para agilizar o início do desenvolvimento do projeto antes da compra de uma caixa de condicionamento, nós trabalhamos junto à empresa AVS projetos (São Carlos/SP) para adaptar duas caixas de condicionamento operante que tínhamos disponíveis no laboratório e não estavam sendo utilizadas. A estratégia funcionou, mas durante o processo foi necessário vindas do técnico da empresa ao nosso laboratório e idas nossas até São Carlos para a realização de alguns ajustes até que a caixa estivesse funcionando adequadamente. Após o funcionamento adequado da caixa de condicionamento, nós também gastamos mais tempo do que o planejado na

padronização do modelo experimental, e essa etapa foi concluída com a colaboração importante do Prof. Dr. Leonardo Resstel (FMRP/USP). Na padronização, estabelecemos protocolos de medo condicionado ao contexto de baixa e alta intensidade. Para o protocolo de baixa intensidade foi estabelecida a corrente de 0,9 mA/2s (3 choques), na qual gerou resposta de congelamento em torno de 50% durante a sessão teste do protocolo (Figura 11), ao passo que para o protocolo de alta intensidade usamos parâmetros como apresentado na proposta inicial (1,5 mA/3s, 6 choques), que resultou em 80% de congelamento durante a reexposição ao contexto aversivo (Figura 11). A padronização de diferentes intensidades de protocolo é relevante, ao viabilizar a adequação do protocolo de acordo com o objetivo do estudo (por exemplo, uso de protocolo de baixa intensidade pode ser mais adequado em situações de intervenções em que se espera facilitação da resposta emocional condicionada).

Figura 11 - Valores médios de % congelamento durante todo o período de reexposição ao contexto condicionado aversivamente em aniamis submetidos ao protocolo MCC de baixa intensidade (3 choques de 0,9 mA/2seg durante a sessão de condicionamento) e de alta intensidade (6 choques de 1,5 mA/3seg durante a sessão de condicionamento). A ANOVA monofatorial ($F_{(2,10)} = 60,89$; $P < 0,0001$) seguida do pós-teste de Bonferroni indicou efeito dos protocolos de baixa ($P < 0,0001$) e alta ($P < 0,0001$) intensidade em relação aos animais não-condicionados (controle). Os valores representam a média $\pm$ EPM.

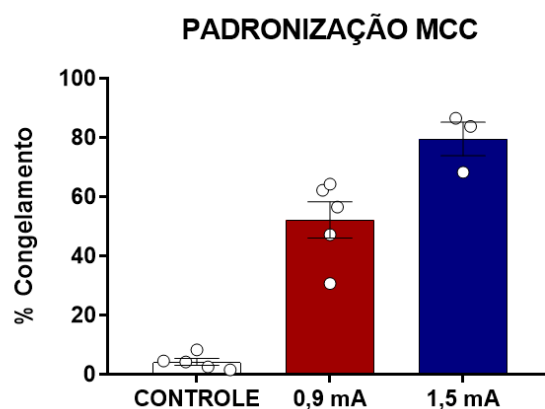


Figura 11 - Valores médios de % congelamento durante todo o período de reexposição ao contexto condicionado aversivamente em aniamis submetidos ao protocolo MCC de baixa intensidade (3 choques de 0,9 mA/2seg durante a sessão de condicionamento) e de alta intensidade (6 choques de 1,5 mA/3seg durante a sessão de condicionamento). A ANOVA monofatorial ($F_{(2,10)} = 60,89$; $P < 0,0001$) seguida do pós-teste de Bonferroni indicou efeito dos protocolos de baixa ($P < 0,0001$) e alta ($P < 0,0001$) intensidade em relação aos animais não-condicionados (controle). Os valores representam a média $\pm$ EPM.

Cabe também destacar que durante o desenvolvimento do projeto foi necessário a realização de experimentos adicionais em relação àqueles planejados inicialmente. Por exemplo, nós tivemos que repetir duas vezes os experimentos para avaliação do efeito do

tratamento unilateral do hemisfério esquerdo do CPFm com CoCl_2 , uma vez que apesar dos animais apresentarem as respostas típicas de aumento da pressão arterial e comportamento de congelamento durante a reexposição ao contexto condicionado aversivamente, a resposta taquicárdica não foi expressa em nenhum dos grupos experimentais. Essa característica de resposta fez parte de um problema maior que afetou outros modelos experimentais do grupo (por exemplo, estresse de restrição), em que os animais também não manifestavam resposta de aumento da frequência cardíaca, e pareceu estar relacionado com características peculiares de alguns lotes de animais. Apesar do problema ter sido sanado, isso acarretou atraso no desenvolvimento do estudo.

Outra dificuldade encontrada foi em relação aos dados de congelamento. Ao comparar os % de congelamento dos dados apresentados no presente relatório em relação àqueles apresentados no relatório anterior nos animais tratados com CoCl_2 (dados apresentados neste relatório), pode-se notar que a expressão desse comportamento foi reduzida (40% *versus* 70-80%). Uma diferença em relação aos dois estudos foi o local onde os animais foram adquiridos. No segundo semestre de 2023 a UNESP interrompeu o fornecimento de ratos durante um processo de transição para a produção de animais em um novo prédio sob novas condições sanitárias (SPF). Por conta disso, os experimentos avaliando o efeito do CoCl_2 (dados apresentados no relatório anterior) usaram animais do antigo Biotério de Produção da UNESP (Botucatu/SP) (1º semestre 2023) e da Empresa Anilab (Paulínia/SP) (2º semestre 2023). Nós não notamos diferenças no comportamento dos animais obtidos do antigo biotério da UNESP e da Empresa Anilab nos experimentos realizados ao longo de 2023, como pode ser notado pela homogeneidade dos dados reportados no relatório anterior. A partir do início de 2024 nós passamos a adquirir os animais do novo Biotério de Produção da UNESP (Botucatu/SP), e nos chamou a atenção a redução no comportamento de congelamento nos experimentos realizados nesse ano em relação aos dados obtidos em 2023.

Para avaliar possíveis diferenças na expressão das respostas condicionadas nos animais oriundos do novo Biotério de Produção da UNESP em relação ao de animais fornecidos pela Empresa Anilab, nós comparamos a resposta de congelamento ao MCC nesses animais. Como apresentado na **Figura 18**, para o mesmo protocolo de MCC, os animais oriundos de Botucatu tiveram uma redução na expressão do comportamento de congelamento em relação aos animais da Empresa Anilab. Nós não avaliamos as respostas cardiovasculares nesse teste, visto que as respostas pressora ($\sim 10\text{mmHg}$) e taquicárdica

(~40mmHg) foram similares nos dados apresentados no presente relatório e no relatório anterior. Desse modo, os animais fornecidos pelo novo Biotério de Produção da UNESP parecem apresentar algum tipo de prejuízo na expressão do comportamento de congelamento, o que parece não ser refletida nas outras respostas defensivas. As razões para a diferença não estão totalmente claras (a linhagem, sexo e idade foram as mesmas), mas a condição de manutenção (convencional x SPF) pode ser um fator.

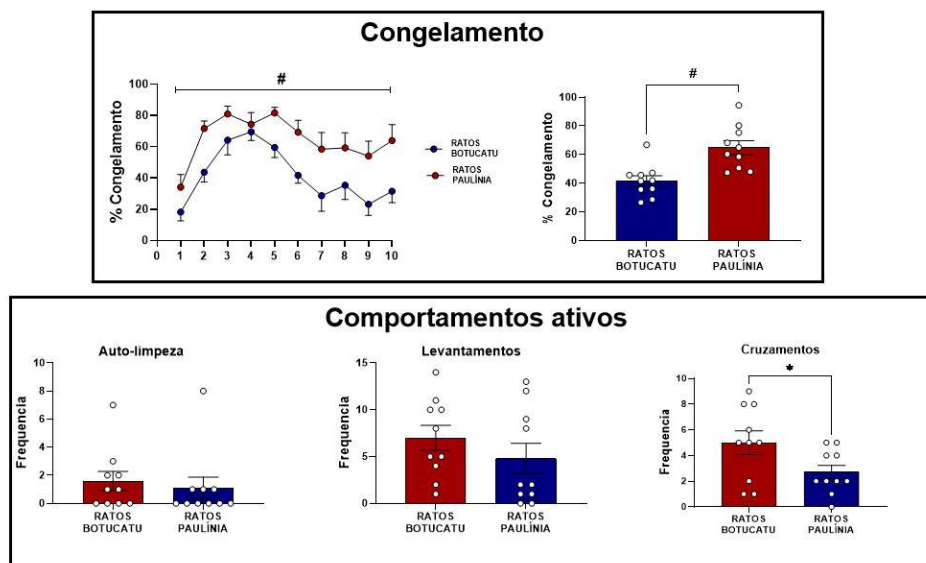


Figura 18 - (Superior) Curvas temporais e valores médios durante toda a sessão do % de congelamento durante a reexposição à caixa de condicionamento em animais obtidos do novo biotério de criação da UNESP (ratos Botucatu, n=10) e da Empresa Anilab (ratos Paulínia, n=10). Os valores em todos os gráficos representam a média±EPM. # $P < 0,05$, ANOVA bifatorial para a curva temporal (gráfico à esquerda) e teste *t Student* para o gráfico de barras (gráfico à direita). **(Inferior)** Frequência de manifestação de comportamentos de limpeza (grooming), levantamentos (rearing) e cruzamentos durante a re-exposição à câmara de condicionamento em animais obtidos do novo biotério de criação da UNESP (ratos Botucatu, n=10) e da Empresa Anilab (ratos Paulínia, n=10). Os valores em todos os gráficos representam a média±EPM. * $P < 0,05$, teste *t Student*.

*De qualquer maneira, considerando que todos os dados documentados no presente relatório foram obtidos dos animais fornecidos pelo novo biotério da UNESP, nós não acreditamos que a diferença na manifestação do comportamento de congelamento em relação aos animais de outras fontes tenha afetado a investigação do envolvimento de receptores CRF no CPFm nesse comportamento (já que o comportamento foi consistente ao longo de todos os experimentos). Nesse sentido, é importante destacar que o % de congelamento obtido no dado apresentado na **Figura 18** ($42 \pm 3\%$) é superior em relação àquele obtido durante a padronização do modelo de MCC em animais expostos à caixa de condicionamento, mas que não receberam choque*

anteriormente (i.e., animais não-condicionados) ($4\pm 1\%$), o que indica que o protocolo de MCC foi efetivo em induzir respostas condicionadas nos animais do novo biotério da UNESP. As respostas cardiovasculares similares nos dados obtidos no período anterior em relação aos dados apresentados no presente relatório reforçam a ideia de efetividade do protocolo de MCC nos dados obtidos no período referente ao presente relatório. Além disso, estudos prévios avaliaram mecanismos neurobiológicos nas respostas ao MCC em condições experimentais com % congelamento similares àqueles obtidos no presente estudo (Lisboa et al, nt J Neuropsychopharmacol 13(9):1163-73, 2010; Fedoce et al, Psychopharmacology 233(2):267-80, 2016; Borges-Assis et al, Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 125:110739, 2023).

Uma outra dificuldade encontrada foi a inviabilização da execução do projeto do Estágio em Pesquisa no Exterior – BEPE, pois o aluno iria aprender as técnicas de análises morfológicas que consistem em procedimentos estereológicos e análise de arborização dendrítica (ver itens 3.11.1 e 3.11.2) que ficou impossibilitado a execução desses procedimentos. Segue abaixo a justificativa enviada e aprovada no relatório científico da bolsa BEPE (nº processo FAPESP: 2023/00542-0).

O Dr. Lucas chegou em Braga/Portugal no dia 01 de junho de 2023, mesmo dia em que se apresentou no Instituto de Ciências da Vida e Saúde (ICVS) da Universidade do Minho e foi recebido pelo supervisor do exterior. Nesse primeiro contato o bolsista foi autorizado a acompanhar os demais alunos do laboratório, de modo a visualizar algumas técnicas, além de participar das reuniões do grupo. Nas semanas seguintes, durante a discussão com o supervisor do exterior para elaborar estratégias para o início da execução do projeto proposto, foi informado da necessidade de realização de treinamentos para o acesso ao biotério e realização dos experimentos usando animais. No entanto, a coordenadoria responsável pelo oferecimento do curso passou por um período de recesso no mês de julho/2023, além de recesso de férias no mês de agosto/2023, o que impossibilitou o bolsista de iniciar o treinamento. Nesse período houveram várias tentativas por parte do supervisor do exterior em garantir um acesso temporário para o bolsista até que o treinamento fosse realizado, porém sem sucesso.

Assim, tão logo a coordenadoria retomou o oferecimento dos treinamentos em setembro/2023 o bolsista participou da formação de iniciação do biotério do ICVS, com duração de 2 horas. Durante esse curso foram esclarecidas as dúvidas do bolsista acerca

do processo de treinamento para o uso de animais em pesquisa, sendo informado que para iniciar os seus experimentos ele teria que finalizar o 19º curso de Ciências de Animais de Laboratório, que foi ministrado no período de 26 de fevereiro à 08 de março de 2024 pela ICVS/Universidade de Braga. Foi esclarecido que para a realização de experimentos envolvendo animais o pesquisador necessita da capacitação teórico-prática oferecida por esse curso, de modo a atender as recomendações da Comissão Europeia para o quadro de educação e formação, abrangendo módulos de formação necessários para pessoas de todas as funções a), b), c), d), conforme estabelecido no Artigo 23 da Diretiva 2010/63/UE (incluindo legislação nacional) ou no Artigo 31º do Decreto-Lei 113/2013 de 7 de agosto. Considerando que a vigência da bolsa BEPE encerra em 30 de abril de 2024, e a formação necessária para a realização dos experimentos encerraria em março/2024, tornou-se inviável a execução do projeto proposto. O supervisor do exterior tentou buscar alternativas para o desenvolvimento do projeto, como a realização do treinamento em outras Instituições de Portugal (ex. Universidade do Porto), porém essa opção também se mostrou inviável em garantir acesso do bolsista aos animais em tempo razoável para a execução do projeto. Diante disso, em comum acordo o supervisor do exterior (ver carta em anexo 1), supervisor do Brasil e o bolsista chegaram ao consenso de que a interrupção da bolsa BEPE seria a melhor decisão.

Vale ressaltar que apesar do impedimento na realização dos experimentos propostos no projeto BEPE, durante o período em que esteve no exterior o bolsista auxiliou outros alunos do laboratório, o que forneceu contato com a rotina do laboratório e as técnicas desenvolvidas pelo grupo. Além disso, participou de evento local da Universidade do Minho (Retiro de Verão 2023 do ICVS), realizado entre os dias 28 e 29 de junho de 2023 no Mosteiro de Tibães (Braga/Portugal), em que teve contato com outras linhas de pesquisa e estudos desenvolvidas na Instituição.

Gostaríamos de destacar que o encerramento antecipado da vigência da bolsa BEPE já foi analisado e aprovado pela FAPESP (por gentileza, ver documento anexado no final desse relatório).

Por fim, com o intuito de esclarecer e concluir a finalização dos protocolos descritos neste relatório, informamos que há um projeto regular FAPESP em vigência sob minha supervisão (processo nº 2020/06260-3), o qual está diretamente vinculado ao projeto de pós-doutorado que originou o presente relatório. O Dr. Lucas Gomes de Souza,

atualmente bolsista de pós-doutorado (CAPES), encontra-se em fase de execução dos ensaios experimentais destinados à análise da expressão gênica dos receptores CRF₁ e CRF₂ em neurônios ativados do CPFm em resposta à estimulação do MCC (*correspondente ao objetivo 2 da proposta inicial*). Conforme o planejamento inicial, essas análises estão sendo conduzidas pelo Dr. Lucas no laboratório do Prof. Fábio Cruz, na Escola Paulista de Medicina da UNIFESP, no âmbito do projeto de pós-doutorado apoiado pela FAPESP (processo nº 2020/11827-7). Adicionalmente, os experimentos referentes à investigação do papel dos receptores CRF₁ e CRF₂ no CPFm ventral, bem como à avaliação das respostas de congelamento e cardiovasculares induzidas pelo MCC em um modelo de estresse crônico, também foram realizados pelo referido pesquisador. Assim, mesmo com a finalização do presente processo, permanecemos comprometidos em relatar os resultados obtidos à FAPESP, conforme previsto no escopo do projeto regular mencionado.

10. OUTRAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS PELO BOLSISTA NO PERÍODO

10.1. Outras atividades relacionadas ao desenvolvimento do projeto

Além dos dados descritos acima, no período também foram finalizados os experimentos para análise da expressão gênica dos receptores CRF₁ e CRF₂ em neurônios ativados do CPFm pelo MCC (*objetivo 2 da proposta inicial*). Para essa análise foi realizada a separação dos neurônios ativados por meio da técnica de citometria de fluxo [*Classificação celular ativada pela fluorescência (FACS)*], seguida da análise RT-qPCR para investigar a expressão gênica dos receptores CRFérgicos nas células separadas. Essas análises foram realizadas em colaboração com o Prof. Fábio Cruz da EPM-UNIFESP. As amostras do CPFm já foram coletadas e encaminhadas para o laboratório do Prof. Fábio Cruz, de modo que o Dr. Lucas irá para o laboratório do Prof. Fábio Cruz para executar os ensaios e análises dos dados.

10.1. Atividades científicas

- Participação como Banca Examinadora do Trabalho de Conclusão do Curso de Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP, do trabalho intitulado "PADRÃO DE USO DE BENZODIAZEPÍNICOS NO BRASIL: UMA REVISÃO NARRATIVA", de autoria do acadêmico Alessandro de Paula Alves, em 11 de dezembro de 2024. (*o certificado de participação foi anexado em "outros documentos"*).
- Participação como Banca Examinadora do Trabalho de Conclusão do Curso de Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP, do trabalho intitulado "AVALIAÇÃO DA MEMÓRIA DE CURTO E LONGO PRAZO EM RESPOSTA A UM ANTAGONISTA DE RECEPTORES HISTAMINÉRGICOS H3 EM RATOS", de autoria da acadêmica Ghutyara Gabriela Moreira da Silva, em 13 de dezembro de 2024. (*o certificado de participação foi anexado em "outros documentos"*).

- Participação como Banca Examinadora do Tese de Sarah Jauregui Zela, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Centro-Oeste com o trabalho intitulado “Desenvolvimento de Cocristais de Lamotrigina e Avaliação In Vitro/In silico/In Vivo”, em 12 de julho de 2024. *(o certificado de participação foi anexado em “outros documentos”)*.
- Participação como Banca Examinadora do Trabalho de Conclusão do Curso de Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP, do trabalho intitulado "PADRÃO DE USO DE BENZODIAZEPÍNICOS NO BRASIL: UMA REVISÃO NARRATIVA", de autoria do acadêmico Alessandro de Paula Alves, em 11 de dezembro de 2024. *(o certificado de participação foi anexado em “outros documentos”)*.
- Participação como Banca Examinadora do Trabalho de Conclusão do Curso de Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP, do trabalho intitulado "AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DE RECEPTORES HISTAMINÉRGICOS H₃ AO FÁRMACO ANTAGONISTA OPH CMP₄ PARA TRATAMENTO DE MEMÓRIA A CURTO E LONGO PRAZO EM RATOS", de autoria da acadêmica Mayara Alcatrão Augusto, em 14 de dezembro de 2023. *(o certificado de participação foi anexado em “outros documentos”)*.
- Participação como Banca Examinadora do Trabalho de Conclusão do Curso de Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP, do trabalho intitulado "AVALIAÇÃO DO HIPOCAMPO EM RESPOSTAS DEFENSIVAS DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO ESTRESSE DE DERROTA PSICOSSOCIAL", de autoria do acadêmico Vitor Gonçalves Garcia, em 15 de dezembro de 2023. *(o certificado de participação foi anexado em “outros documentos”)*.

11. BIBLIOGRAFIA

ALIZAMINI, Mirmohammadali Mirramezani *et al.* Corticotropin-releasing factor receptor 1 in infralimbic cortex modulates social stress-altered decision-making. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 116, p. 110523, jun. 2022.

ANDREW, R. J. Neural and behavior plasticity. The use of the chick as a model. 1o ed. Oxford: Editora Oxford University Press, 1991.

BALE, Tracy L.; VALE, Wylie W. CRF AND CRF RECEPTORS : Role in Stress Responsivity and Other Behaviors . *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 44, n. 1, p. 525–557, 2004.

BECK, C. H. M.; FIBIGER, H. C. Conditioned fear-induced changes in behavior and in the expression of the immediate early gene c-fos: With and without diazepam pretreatment. *Journal of Neuroscience*, v. 15, n. 1 II, p. 709–720, 1995.

BEHAN, D. P. *et al.* Modulatory Actions of Corticotropin-releasing Factor-binding Proteina. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 780, n. 1, p. 81–95, jun. 1996.

BIJLSMA, E. Y. *et al.* Local repeated corticotropin-releasing factor infusion exacerbates anxiety- and fear-related behavior: differential involvement of the basolateral amygdala and medial prefrontal cortex. *Neuroscience*, v. 173, p. 82–92, jan. 2011.

BITTENCOURT, Jackson C. *et al.* Urocortin Expression in Rat Brain: Evidence Against a Pervasive Relationship of Urocortin-Containing Projections With Targets Bearing Type 2 CRF Receptors. *The Journal of Comparative Neurology*, v. 415, n. 3, p. 285–312, 20 dez. 1999.

BLESSING, W. W. Lower brainstem pathways regulating sympathetically mediated changes in cutaneous blood flow. *Cellular and molecular neurobiology*, v. 23, n. 4–5, p. 527–38, out. 2003.

BRASIL, Taíz F. S.; FASSINI, Aline; CORRÊA, Fernando M. AT1 and AT2 Receptors in the Prelimbic Cortex Modulate the Cardiovascular Response Evoked by Acute

Exposure to Restraint Stress in Rats. *Cellular and Molecular Neurobiology*, v. 38, n. 1, p. 305–316, 2017.

BUSNARDO, Cristiane *et al.* Paraventricular nucleus of the hypothalamus glutamate neurotransmission modulates autonomic, neuroendocrine and behavioral responses to acute restraint stress in rats. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, v. 23, n. 11, p. 1611–22, nov. 2013.

BUSNARDO, Cristiane *et al.* Nitrergic neurotransmission in the paraventricular nucleus of the hypothalamus modulates autonomic, neuroendocrine and behavioral responses to acute restraint stress in rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 90, p. 16–27, mar. 2019.

CANTERAS, Newton S.; GRAEFF, Frederico G. Executive and modulatory neural circuits of defensive reactions: implications for panic disorder. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, v. 46 Pt 3, p. 352–64, out. 2014.

CANTERAS, Newton Sabino *et al.* Neuroanatomy of anxiety. *Current topics in behavioral neurosciences*, v. 2, p. 77–96, 2010.

CANTO-DE-SOUZA, Lucas *et al.* Daily Optogenetic Stimulation of the Left Infralimbic Cortex Reverses Extinction Impairments in Male Rats Exposed to Single Prolonged Stress. *Frontiers in behavioral neuroscience*, v. 15, p. 780326, 2021.

CARBONI, Lucia *et al.* Increased expression of CRF and CRF-receptors in dorsal striatum, hippocampus, and prefrontal cortex after the development of nicotine sensitization in rats. *Drug and Alcohol Dependence*, v. 189, p. 12–20, ago. 2018.

CARRIVE, Pascal. Conditioned fear to environmental context: cardiovascular and behavioral components in the rat. *Brain Research*, v. 858, n. 2, p. 440–445, mar. 2000.

CERQUEIRA, J. J. *et al.* The Prefrontal Cortex as a Key Target of the Maladaptive Response to Stress. *Journal of Neuroscience*, v. 27, n. 11, p. 2781–2787, 14 mar. 2007.

CERQUEIRA, João J.; ALMEIDA, Osborne F. X.; SOUSA, Nuno. The stressed prefrontal cortex. Left? Right! *Brain, Behavior, and Immunity*, v. 22, n. 5, p. 630–638, 2008a.

CERQUEIRA, João J.; ALMEIDA, Osborne F. X.; SOUSA, Nuno. The stressed prefrontal cortex. Left? Right! Brain, Behavior, and Immunity, v. 22, n. 5, p. 630–638, 2008b.

CHALMERS, D. T.; LOVENBERG, T. W.; DE SOUZA, E. B. Localization of novel corticotropin-releasing factor receptor (CRF2) mRNA expression to specific subcortical nuclei in rat brain: Comparison with CRF1 receptor mRNA expression. Journal of Neuroscience, v. 15, n. 10, p. 6340–6350, 1995.

CHAN, R. K. W.; VALE, W. W.; SAWCHENKO, P. E. Paradoxical activational effects of a corticotropin-releasing factor-binding protein “ligand inhibitor” in rat brain. Neuroscience, v. 101, n. 1, p. 115–129, out. 2000.

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

CHEN, Peng *et al.* Prefrontal Cortex Corticotropin-Releasing Factor Neurons Control Behavioral Style Selection under Challenging Situations. Neuron, v. 106, n. 2, p. 301–315.e7, 2020.

CHEN, R. *et al.* Expression cloning of a human corticotropin-releasing-factor receptor. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 90, n. 19, p. 8967–8971, 1993.

COSTA, N. S. *et al.* Functional lateralization of the medial prefrontal cortex in the modulation of anxiety in mice: Left or right? Neuropharmacology, 11 abr. 2016a.

COSTA, N. S. *et al.* Functional lateralization of the medial prefrontal cortex in the modulation of anxiety in mice: Left or right? Neuropharmacology, v. 108, p. 82–90, set. 2016b.

CRAWLEY, Jacqueline N. *et al.* Behavioral investigation of the coexistence of substance P, corticotropin releasing factor, and acetylcholinesterase in lateral dorsal tegmental neurons projecting to the medial frontal cortex of the rat. Peptides, v. 6, n. 5, p. 891–901, set. 1985.

CRESTANI, Carlos C. Emotional Stress and Cardiovascular Complications in Animal Models: A Review of the Influence of Stress Type. *Frontiers in Physiology*, v. 7, n. June, 2016a.

CRESTANI, Carlos C. Emotional Stress and Cardiovascular Complications in Animal Models: A Review of the Influence of Stress Type. *Frontiers in physiology*, v. 7, p. 251, 24 jun. 2016b.

CZÉH, Boldizsár *et al.* Chronic social stress inhibits cell proliferation in the adult medial prefrontal cortex: Hemispheric asymmetry and reversal by fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology*, v. 32, n. 7, p. 1490–1503, 2007.

DAMPNEY, Roger A. L. Central mechanisms regulating coordinated cardiovascular and respiratory function during stress and arousal. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, v. 309, n. 5, p. R429-43, set. 2015.

DAVIDSON, Ricard J. Anterior electrophysiological asymmetries, emotion, and depression: Conceptual and methodological conundrums. *Psychophysiology*, v. 35, n. 5, p. S0048577298000134, set. 1998.

DAVIDSON, Richard J. What does the prefrontal cortex “do” in affect: perspectives on frontal EEG asymmetry research. *Biological psychology*, v. 67, n. 1–2, p. 219–33, out. 2004.

DEAKIN, J. F. William; GRAEFF, Frederico G. 5-HT and mechanisms of defence. *Journal of Psychopharmacology*, v. 5, n. 4, p. 305–315, 1991.

DEDIC, Nina; CHEN, Alon; DEUSSING, Jan M. The CRF Family of Neuropeptides and their Receptors - Mediators of the Central Stress Response. *Current molecular pharmacology*, v. 11, n. 1, p. 4–31, 2018.

DEUSSING, Jan M.; CHEN, Alon. The corticotropin-releasing factor family: Physiology of the stress response. *Physiological Reviews*, v. 98, n. 4, p. 2225–2286, 2018.

DOUGLAS, R.; MARTIN, K. A. C. Neocortex. In *The Synaptic Organization of the Brain*. 3rd. ed. [S.l.]: Oxford: Oxford University Press, 1990.

FANOUS, S. *et al.* Role of Orbitofrontal Cortex Neuronal Ensembles in the Expression of Incubation of Heroin Craving. *Journal of Neuroscience*, v. 32, n. 34, p. 11600–11609, 22 ago. 2012.

FANSELOW, Michael S. Conditional and Unconditional Components of Post-Shock Freezing. *Pavlov.J. Biol. Sci.*, v. 85, p. 177–182, 1980.

FANSELOW, Michael S. Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. *Behavioural Brain Research*, v. 110, n. 1–2, p. 73–81, jun. 2000.

FASSINI, Aline; RESSTEL, Leonardo B. M.; CORRÊA, Fernando M. A. Prelimbic cortex GABA A receptors are involved in the mediation of restraint stress-evoked cardiovascular responses. *Stress*, v. 19, n. 6, p. 576–584, 1 nov. 2016.

FEDOCE, A. G. *et al.* M3 muscarinic receptor in the ventral medial prefrontal cortex modulating the expression of contextual fear conditioning in rats. *Psychopharmacology*, v. 233, n. 2, p. 267–280, 31 jan. 2016.

FERREIRA-JUNIOR, Nilson C. *et al.* Medial prefrontal cortex endocannabinoid system modulates baroreflex activity through CB(1) receptors. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, v. 302, n. 7, p. R876–85, 2012a.

FERREIRA-JUNIOR, Nilson C. *et al.* Medial prefrontal cortex endocannabinoid system modulates baroreflex activity through CB(1) receptors. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, v. 302, n. 7, p. R876–85, 2012b.

FRASNELLI, Elisa. Brain and behavioral lateralization in invertebrates. *Frontiers in Psychology*, v. 4, n. DEC, p. 1–10, 2013.

FRYSZTAK, Robert J.; NEAFSEY, Edward J. The effect of medial frontal cortex lesions on cardiovascular conditioned emotional responses in the rat. *Brain Research*, v. 643, n. 1–2, p. 181–193, 1994a.

FRYSZTAK, Robert J.; NEAFSEY, Edward J. The effect of medial frontal cortex lesions on cardiovascular conditioned emotional responses in the rat. *Brain Research*, v. 643, n. 1–2, p. 181–193, 1994b.

GABBOTT, Paul L. A. *et al.* Local-circuit neurones in the medial prefrontal cortex (areas 25, 32 and 24b) in the rat: Morphology and quantitative distribution. *The Journal of Comparative Neurology*, v. 377, n. 4, p. 465–499, 27 jan. 1997.

GALLOPIN, Thierry *et al.* Cortical Sources of CRF, NKB, and CCK and Their Effects on Pyramidal Cells in the Neocortex. *Cerebral Cortex*, v. 16, n. 10, p. 1440–1452, 1 out. 2006a.

GALLOPIN, Thierry *et al.* Cortical Sources of CRF, NKB, and CCK and Their Effects on Pyramidal Cells in the Neocortex. *Cerebral Cortex*, v. 16, n. 10, p. 1440–1452, 1 out. 2006b.

GAO, He-Ren; GAO, He-Yuan. Cardiovascular functions of central corticotropin-releasing factor related peptides system. *Neuropeptides*, v. 75, p. 18–24, jun. 2019.

GIUSTINO, Thomas F.; MAREN, Stephen. Noradrenergic modulation of fear conditioning and extinction. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, v. 12, n. March, p. 1–20, 2018.

GOMES-DE-SOUZA, Lucas *et al.* Involvement of endocannabinoid neurotransmission in the bed nucleus of stria terminalis in cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. *British journal of pharmacology*, v. 173, n. 19, p. 2833–44, 2016.

GOMES-DE-SOUZA, Lucas *et al.* Cannabinoid receptor type 1 in the bed nucleus of the stria terminalis modulates cardiovascular responses to stress via local N-methyl-D-aspartate receptor/neuronal nitric oxide synthase/soluble guanylate cyclase/protein kinase G signaling. *Journal of Psychopharmacology*, v. 01, 2020.

GOMES-DE-SOUZA, Lucas *et al.* Functional lateralization in the medial prefrontal cortex control of contextual conditioned emotional responses in rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 133, p. 111015, jul. 2024.

GOUVEIA, Marianna K. *et al.* Dissociation in control of physiological and behavioral responses to emotional stress by cholinergic neurotransmission in the bed nucleus of the stria terminalis in rats. *Neuropharmacology*, v. 101, p. 379–388, 2016.

GROENEWEGEN, H. J. Organization of the afferent connections of the mediodorsal thalamic nucleus in the rat, related to the mediodorsal-prefrontal topography. *Neuroscience*, v. 24, n. 2, p. 379–431, 1988.

GUAN, Xiaowei *et al.* Corticotropin-releasing factor receptor type-2 is involved in the cocaine-primed reinstatement of cocaine conditioned place preference in rats. *Behavioural Brain Research*, v. 258, p. 90–96, jan. 2014.

GUEZ-BARBER, D. *et al.* FACS Identifies Unique Cocaine-Induced Gene Regulation in Selectively Activated Adult Striatal Neurons. *Journal of Neuroscience*, v. 31, n. 11, p. 4251–4259, 16 mar. 2011.

GUEZ-BARBER, Danielle *et al.* FACS purification of immunolabeled cell types from adult rat brain. *Journal of Neuroscience Methods*, v. 203, n. 1, p. 10–18, jan. 2012.

HAUGER, Richard L. *et al.* International Union of Pharmacology. XXXVI. Current Status of the Nomenclature for Receptors for Corticotropin-Releasing Factor and Their Ligands. *Pharmacological Reviews*, v. 55, n. 1, p. 21–26, 1 mar. 2003.

HENCKENS, M. J. A. G. *et al.* CRF receptor type 2 neurons in the posterior bed nucleus of the stria terminalis critically contribute to stress recovery. *Molecular Psychiatry*, v. 22, n. 12, p. 1691–1700, 23 dez. 2017.

HERMAN, James P. *et al.* Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical stress response. *Comprehensive Physiology*. *Comprehensive Physiology*, v. 6, n. 2, p. 603–621, 2016.

HERMAN, James P.; TASKER, Jeffrey G. Paraventricular hypothalamic mechanisms of chronic stress adaptation. *Frontiers in Endocrinology*, v. 7, n. OCT, p. 1–10, 2016.

HOSTETLER, Caroline M.; RYABININ, Andrey E. The crf system and social behavior: A review. *Frontiers in Neuroscience*, v. 7, n. 7 MAY, p. 1–15, 2013.

HOTT, Sara C. *et al.* Both $\alpha 1$ - and $\beta 1$ -adrenoceptors in the bed nucleus of the stria terminalis are involved in the expression of conditioned contextual fear. *British journal of pharmacology*, v. 167, n. 1, p. 207–21, set. 2012.

HOWLAND, John G. *et al.* The rodent medial prefrontal cortex and associated circuits in orchestrating adaptive behavior under variable demands. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, v. 135, p. 104569, abr. 2022.

HUPALO, Sofiya *et al.* Prefrontal corticotropin-releasing factor (CRF) neurons act locally to modulate frontostriatal cognition and circuit function. *Journal of Neuroscience*, v. 39, n. 11, p. 2080–2090, 2019.

HUPALO, Sofiya; BERRIDGE, Craig W. Working memory impairing actions of Corticotropin-Releasing Factor (CRF) neurotransmission in the prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology*, v. 41, n. 11, p. 2733–2740, 2016.

HURLEY, Karen M. *et al.* Efferent projections of the infralimbic cortex of the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, v. 308, n. 2, p. 249–276, 8 jun. 1991.

HWA, Lara S. *et al.* Predator odor increases avoidance and glutamatergic synaptic transmission in the prelimbic cortex via corticotropin-releasing factor receptor 1 signaling. *Neuropsychopharmacology*, v. 44, n. 4, p. 766–775, 23 mar. 2019.

JAFERI, Azra; BHATNAGAR, Seema. Corticotropin-releasing hormone receptors in the medial prefrontal cortex regulate hypothalamic–pituitary–adrenal activity and anxiety-related behavior regardless of prior stress experience. *Brain Research*, v. 1186, p. 212–223, dez. 2007.

JAHN, Olaf *et al.* Three-amino acid motifs of urocortin II and III determine their CRF receptor subtype selectivity. *Neuropharmacology*, v. 47, n. 2, p. 233–242, 2004.

JOHNSTONE, T. *et al.* Failure to Regulate: Counterproductive Recruitment of Top-Down Prefrontal-Subcortical Circuitry in Major Depression. *Journal of Neuroscience*, v. 27, n. 33, p. 8877–8884, 15 ago. 2007a.

JOHNSTONE, Tom *et al.* Failure to regulate: counterproductive recruitment of top-down prefrontal-subcortical circuitry in major depression. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 27, n. 33, p. 8877–84, 15 ago. 2007b.

KETCHESIN, Kyle D.; HUANG, Nicholas S.; SEASHOLTZ, Audrey F. Cell Type-Specific Expression of Corticotropin-Releasing Hormone-Binding Protein in GABAergic Interneurons in the Prefrontal Cortex. *Frontiers in Neuroanatomy*, v. 11, 10 out. 2017.

KETCHESIN, Kyle D.; STINNETT, Gwen S.; SEASHOLTZ, Audrey F. Binge Drinking Decreases Corticotropin-Releasing Factor-Binding Protein Expression in the Medial Prefrontal Cortex of Mice. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, v. 40, n. 8, p. 1641–1650, ago. 2016.

KOZLOWSKA, Kasia *et al.* Fear and the Defense Cascade: Clinical Implications and Management. *Harvard Review of Psychiatry*, v. 23, n. 4, p. 263–287, 2015.

KUBOTA, Yoshiyuki *et al.* Selective Coexpression of Multiple Chemical Markers Defines Discrete Populations of Neocortical GABAergic Neurons. *Cerebral Cortex*, v. 21, n. 8, p. 1803–1817, ago. 2011.

LEE, Eunee *et al.* Left brain cortical activity modulates stress effects on social behavior. *Scientific Reports*, v. 5, p. 1–10, 2015.

LEMOS, José Inácio; RESSTEL, Leonardo Barbosa; GUIMARÃES, Francisco Silveira. Involvement of the prelimbic prefrontal cortex on cannabidiol-induced attenuation of contextual conditioned fear in rats. *Behavioural Brain Research*, v. 207, n. 1, p. 105–111, 2010.

LEVY, Jerre. the Mammalian Brain and the Adaptive Advantage of Cerebral Asymmetry. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 299, n. 1, p. 264–272, 1977.

LISBOA, Sabrina F. *et al.* Cannabinoid CB1 receptors in the medial prefrontal cortex modulate the expression of contextual fear conditioning. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, v. 13, n. 9, p. 1163–1173, out. 2010a.

LISBOA, Sabrina F. *et al.* Cannabinoid CB1 receptors in the medial prefrontal cortex modulate the expression of contextual fear conditioning. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, v. 13, n. 09, p. 1163–1173, 29 out. 2010b.

LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001.

LOVENBERG, Timothy W. *et al.* Cloning and characterization of a functionally distinct corticotropin-releasing factor receptor subtype from rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 92, n. 3, p. 836–840, 1995.

LV, Su-Su *et al.* Corticotropin-releasing hormone neurons control trigeminal neuralgia-induced anxiodepression via a hippocampus-to-prefrontal circuit. *Science advances*, v. 10, n. 3, p. eadj4196, 19 jan. 2024.

MARDINLY, A. R. *et al.* Sensory experience regulates cortical inhibition by inducing IGF1 in VIP neurons. *Nature*, v. 531, n. 7594, p. 371–375, 9 mar. 2016.

MAREK, Roger; SUN, Yajie; SAH, Pankaj. Neural circuits for a top-down control of fear and extinction. *Psychopharmacology*, v. 236, n. 1, p. 313–320, 2019.

MAREN, Stephen; PHAN, K. Luan; LIBERZON, Israel. The contextual brain: implications for fear conditioning, extinction and psychopathology. *Nature reviews. Neuroscience*, v. 14, n. 6, p. 417–28, jun. 2013.

MCDONALD, A. J.; MASCAGNI, F.; GUO, L. Projections of the medial and lateral prefrontal cortices to the amygdala: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study in the rat. *Neuroscience*, v. 71, n. 1, p. 55–75, mar. 1996.

MCDUGALL, Stuart J.; WIDDOP, Robert E.; LAWRENCE, Andrew J. Central autonomic integration of psychological stressors: Focus on cardiovascular modulation. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, v. 123, n. 1–2, p. 1–11, 2005.

MCEWEN, Bruce S. Neurobiological and Systemic Effects of Chronic Stress. Chronic stress (Thousand Oaks, Calif.), v. 1, 2017.

MCKLVEEN, J. M.; MYERS, B.; HERMAN, J. P. The Medial Prefrontal Cortex: Coordinator of Autonomic, Neuroendocrine and Behavioural Responses to Stress. Journal of Neuroendocrinology, v. 27, n. 6, p. 446–456, 2015.

MCKLVEEN, Jessica M. *et al.* “Braking” the Prefrontal Cortex: The Role of Glucocorticoids and Interneurons in Stress Adaptation and Pathology. Biological Psychiatry, v. 86, n. 9, p. 669–681, 2019.

MERALI, Z. Dysregulation in the Suicide Brain: mRNA Expression of Corticotropin-Releasing Hormone Receptors and GABAA Receptor Subunits in Frontal Cortical Brain Region. Journal of Neuroscience, v. 24, n. 6, p. 1478–1485, 11 fev. 2004.

MERALI, Zul *et al.* Effects of corticosterone on corticotrophin-releasing hormone and gastrin-releasing peptide release in response to an aversive stimulus in two regions of the forebrain (central nucleus of the amygdala and prefrontal cortex). European Journal of Neuroscience, v. 28, n. 1, p. 165–172, 2008.

MIGUEL, Tarciso Tadeu; GOMES, Karina Santos; NUNES-DE-SOUZA, Ricardo Luiz. Tonic modulation of anxiety-like behavior by corticotropin-releasing factor (CRF) type 1 receptor (CRF1) within the medial prefrontal cortex (mPFC) in male mice: Role of protein kinase A (PKA). Hormones and Behavior, v. 66, n. 2, p. 247–256, 2014.

MORAES RESSTEL, L. B.; DE AGUIAR CORREA, F. M.; GUIMARAES, F. S. The Expression of Contextual Fear Conditioning Involves Activation of an NMDA Receptor-Nitric Oxide Pathway in the Medial Prefrontal Cortex. Cerebral Cortex, v. 18, n. 9, p. 2027–2035, 1 set. 2008a.

MORAES RESSTEL, L. B.; DE AGUIAR CORREA, F. M.; GUIMARAES, F. S. The Expression of Contextual Fear Conditioning Involves Activation of an NMDA Receptor-Nitric Oxide Pathway in the Medial Prefrontal Cortex. Cerebral Cortex, v. 18, n. 9, p. 2027–2035, 1 set. 2008b.

MÜLLER-RIBEIRO, Flávia Camargos de Figueirêdo *et al.* Contribution of infralimbic cortex in the cardiovascular response to acute stress. American Journal of Physiology-

Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, v. 303, n. 6, p. R639–R650, 15 set. 2012.

NEAFSEY, Edward J.; HURLEY-GIUS, Karen M.; ARVANITIS, Dimitrios. The topographical organization of neurons in the rat medial frontal, insular and olfactory cortex projecting to the solitary nucleus, olfactory bulb, periaqueductal gray and superior colliculus. *Brain Research*, v. 377, n. 2, p. 261–270, jul. 1986.

NGUYEN, Ngoc Khoi *et al.* Conditional CRF receptor 1 knockout mice show altered neuronal activation pattern to mild anxiogenic challenge. *Psychopharmacology*, v. 188, n. 3, p. 374–385, 5 out. 2006.

OHATA, Hisayuki; SHIBASAKI, Tamotsu. Microinjection of Different Doses of Corticotropin-releasing Factor into the Medial Prefrontal Cortex Produces Effects Opposing Anxiety-related Behavior in Rats. *Journal of Nippon Medical School*, v. 78, n. 5, p. 286–292, 2011.

OROZCO-CABAL, Luis *et al.* Dopamine and Corticotropin-Releasing Factor Synergistically Alter Basolateral Amygdala-to-Medial Prefrontal Cortex Synaptic Transmission: Functional Switch after Chronic Cocaine Administration. *The Journal of Neuroscience*, v. 28, n. 2, p. 529–542, 9 jan. 2008.

PAXINOS, G.; WATSON, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, San Diego, v. 3rd, 1997.

PENTKOWSKI, Nathan S. *et al.* Cortagine infused into the medial prefrontal cortex attenuates predator-induced defensive behaviors and Fos protein production in selective nuclei of the amygdala in male CD1 mice. *Hormones and Behavior*, v. 64, n. 3, p. 519–526, ago. 2013.

PERRIN, Marilyn *et al.* Identification of a second corticotropin-releasing factor receptor gene and characterization of a cDNA expressed in heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 92, n. 7, p. 2969–2973, 1995.

POTTER, E. *et al.* The central distribution of a corticotropin-releasing factor (CRF)-binding protein predicts multiple sites and modes of interaction with CRF. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 89, n. 9, p. 4192–4196, 1 maio 1992.

RADULOVIC, Jelena; SYDOW, Sabine; SPIESS, Joachim. Characterization of native corticotropin-releasing factor receptor type 1 (cRFR1) in the rat and mouse central nervous system. *Journal of Neuroscience Research*, v. 54, n. 4, p. 507–521, 15 nov. 1998.

REFOJO, D. *et al.* Glutamatergic and Dopaminergic Neurons Mediate Anxiogenic and Anxiolytic Effects of CRHR1. *Science*, v. 333, n. 6051, p. 1903–1907, 30 set. 2011a.

REFOJO, D. *et al.* Glutamatergic and Dopaminergic Neurons Mediate Anxiogenic and Anxiolytic Effects of CRHR1. *Science*, v. 333, n. 6051, p. 1903–1907, 30 set. 2011b.

REIS, Daniel G. *et al.* Behavioral and autonomic responses to acute restraint stress are segregated within the lateral septal area of rats. *PLoS ONE*, v. 6, n. 8, 2011.

RESSLER, Kerry J. *et al.* Post-traumatic stress disorder: clinical and translational neuroscience from cells to circuits. *Nature reviews. Neurology*, v. 18, n. 5, p. 273–288, maio 2022.

RESSTEL, L. B. M. *et al.* Involvement of medial prefrontal cortex neurons in behavioral and cardiovascular responses to contextual fear conditioning. *Neuroscience*, v. 143, n. 2, p. 377–385, 2006a.

RESSTEL, L. B. M. *et al.* Involvement of medial prefrontal cortex neurons in behavioral and cardiovascular responses to contextual fear conditioning. *Neuroscience*, v. 143, n. 2, p. 377–385, 2006b.

RESSTEL, L. B. M. *et al.* Anxiolytic-like effects induced by acute reversible inactivation of the bed nucleus of stria terminalis. *Neuroscience*, v. 154, n. 3, p. 869–876, 2008a.

RESSTEL, L. B. M.; CORRÊA, F. M. A. Involvement of the medial prefrontal cortex in central cardiovascular modulation in the rat. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, v. 126–127, p. 130–138, 2006.

RESSTEL, Leonardo B. M. *et al.* Effects of reversible inactivation of the dorsal hippocampus on the behavioral and cardiovascular responses to an aversive conditioned context. *Behavioural Pharmacology*, v. 19, n. 2, p. 137–144, mar. 2008b.

RESSTEL, Leonardo B. M.; CORREA, Fernando M. A.; GUIMARÃES, Francisco Si. The expression of contextual fear conditioning involves activation of an NMDA receptor-nitric oxide pathway in the medial prefrontal cortex. *Cerebral Cortex*, v. 18, n. 9, p. 2027–2035, 2007.

ROBINSON, Robert G. *et al.* Mood disorders in stroke patients. *Brain*, v. 107, p. 81–93, 1984.

ROELOFS, Karin. Freeze for action: Neurobiological mechanisms in animal and human freezing. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 372, n. 1718, 2017.

ROELOFS, Karin; DAYAN, Peter. Freezing revisited: coordinated autonomic and central optimization of threat coping. *Nature reviews. Neuroscience*, v. 23, n. 9, p. 568–580, set. 2022.

ROGERS, Lesley J. Evolution of hemispheric specialization: Advantages and disadvantages. *Brain and Language*, v. 73, n. 2, p. 236–253, 2000.

ROGERS, Lesley J.; ZUCCA, Paolo; VALLORTIGARA, Giorgio. Advantages of having a lateralized brain. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 271, n. SUPPL. 6, p. 420–422, 2004.

ROTENBERG, Vadim S. The peculiarity of the right-hemisphere function in depression: solving the paradoxes. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 28, n. 1, p. 1–13, jan. 2004.

ROZESKE, R. R. *et al.* Prefrontal neuronal circuits of contextual fear conditioning. *Genes, brain, and behavior*, v. 14, n. 1, p. 22–36, jan. 2015.

RUBIO, F. J. *et al.* Context-Induced Reinstatement of Methamphetamine Seeking Is Associated with Unique Molecular Alterations in Fos-Expressing Dorsolateral Striatum Neurons. *Journal of Neuroscience*, v. 35, n. 14, p. 5625–5639, 8 abr. 2015.

SÁNCHEZ, M. M. *et al.* Autoradiographic and in situ hybridization localization of corticotropin-releasing factor 1 and 2 receptors in nonhuman primate brain. *The Journal of comparative neurology*, v. 408, n. 3, p. 365–77, 7 jun. 1999.

SANTOS, Abel Matos; CASTRO, Come D. E. *Stress*. v. 4, p. 675–690, 1998.

SANTOS-COSTA, Nathália *et al.* Glutamatergic Neurotransmission Controls the Functional Lateralization of the mPFC in the Modulation of Anxiety Induced by Social Defeat Stress in Male Mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, v. 15, 23 ago. 2021.

SCHAEUBLE, Derek *et al.* Prefrontal Cortex Regulates Chronic Stress-Induced Cardiovascular Susceptibility. *Journal of the American Heart Association*, v. 8, n. 24, 17 dez. 2019.

SCHREIBER, Allyson L. *et al.* Corticotropin-releasing factor in ventromedial prefrontal cortex mediates avoidance of a traumatic stress-paired context. *Neuropharmacology*, v. 113, p. 323–330, fev. 2017.

SCHREIBER, Allyson L. *et al.* Predator odor stress blunts alcohol conditioned aversion. *Neuropharmacology*, v. 144, p. 82–90, jan. 2019.

SCHREIBER, Allyson L.; GILPIN, Nicholas W. Corticotropin-Releasing Factor (CRF) Neurocircuitry and Neuropharmacology in Alcohol Drinking. *In: Handb Exp Pharmacol. [S.l.: S.n.]*. p. 435–471.

SCOPINHO, América A. *et al.* Dorsal and Ventral Hippocampus Modulate Autonomic Responses but Not Behavioral Consequences Associated to Acute Restraint Stress in Rats. v. 8, n. 10, p. 2–11, 2013.

SHIMIZU, Nobuaki *et al.* CRF receptor antagonist attenuates stress-induced noradrenaline release in the medial prefrontal cortex of rats. *Brain Research*, v. 654, n. 1, p. 145–148, ago. 1994.

SMAGIN, Gennady N. *et al.* CRF Receptor Antagonist Attenuates Immobilization Stress-Induced Norepinephrine Release in the Prefrontal Cortex in Rats. *Brain Research Bulletin*, v. 42, n. 6, p. 431–434, 1997.

SPIESS, J. *et al.* Primary structure of corticotropin-releasing factor from ovine hypothalamus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 78, n. 10 I, p. 6517–6521, 1981.

STERLING, Peter. Allostasis: a model of predictive regulation. *Physiology & behavior*, v. 106, n. 1, p. 5–15, 12 abr. 2012.

SULLIVAN, R. M. Hemispheric asymmetry in stress processing in rat prefrontal cortex and the role of mesocortical dopamine. *Stress*, v. 7, n. 2, p. 131–143, 2004a.

SULLIVAN, R. M. Hemispheric asymmetry in stress processing in rat prefrontal cortex and the role of mesocortical dopamine. *Stress*, v. 7, n. 2, p. 131–143, 2004b.

SULLIVAN, Ron M.; GRATTON, Alain. Lateralized effects of medial prefrontal cortex lesions on neuroendocrine and autonomic stress responses in rats. *Journal of Neuroscience*, v. 19, n. 7, p. 2834–2840, 1999a.

SULLIVAN, Ron M.; GRATTON, Alain. Lateralized effects of medial prefrontal cortex lesions on neuroendocrine and autonomic stress responses in rats. *Journal of Neuroscience*, v. 19, n. 7, p. 2834–2840, 1999b.

SULLIVAN, Ron M.; GRATTON, Alain. Behavioral effects of excitotoxic lesions of ventral medial prefrontal cortex in the rat are hemisphere-dependent. *Brain Research*, v. 927, n. 1, p. 69–79, 2002a.

SULLIVAN, Ron M.; GRATTON, Alain. Prefrontal cortical regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal function in the rat and implications for psychopathology: Side matters. *Psychoneuroendocrinology*, v. 27, n. 1–2, p. 99–114, 2002b.

SWANSON, L. W. *et al.* Organization of Ovine Corticotropin-Releasing Factor Immunoreactive Cells and Fibers in the Rat Brain: An Immunohistochemical Study. *Neuroendocrinology*, v. 36, n. 3, p. 165–186, 1983.

TAKAGISHI, Masamitsu; CHIBA, Tanemichi. Efferent projections of the infralimbic (area 25) region of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tracer PHA-L study. *Brain Research*, v. 566, n. 1–2, p. 26–39, dez. 1991.

TAN, Laura A. *et al.* Distribution of corticotropin-releasing factor (CRF) receptor binding in the mouse brain using a new, high-affinity radioligand, [125 I]-PD-Sauvagine. *Journal of Comparative Neurology*, v. 525, n. 18, p. 3840–3864, 15 dez. 2017a.

TAN, Laura A. *et al.* Distribution of corticotropin-releasing factor (CRF) receptor binding in the mouse brain using a new, high-affinity radioligand, [125 I]-PD-Sauvagine. *Journal of Comparative Neurology*, v. 525, n. 18, p. 3840–3864, 15 dez. 2017b.

TERZIAN, Ana Luisa B. *et al.* Medial prefrontal cortex Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 (TRPV1) in the expression of contextual fear conditioning in Wistar rats. *Psychopharmacology*, v. 231, n. 1, p. 149–157, 7 jan. 2014.

TERZIAN, Ana Luisa B.; MICALE, Vincenzo; WOTJAK, Carsten T. Cannabinoid receptor type 1 receptors on GABAergic vs. glutamatergic neurons differentially gate sex-dependent social interest in mice. *European Journal of Neuroscience*, v. 40, n. 1, p. 2293–2298, jul. 2014.

TIMOFEEVA, Elena; HUANG, Qingling; RICHARD, Denis. Effects of Treadmill Running on Brain Activation and the Corticotropin-Releasing Hormone System. *Neuroendocrinology*, v. 77, n. 6, p. 388–405, 2003.

ULIANA, Daniela L. *et al.* Differential modulation of the contextual conditioned emotional response by CB1 and TRPV1 receptors in the ventromedial prefrontal cortex: Possible involvement of NMDA/nitric oxide-related mechanisms. *Journal of Psychopharmacology*, 2020.

ULRICH-LAI, Yvonne M.; HERMAN, James P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 10, n. 6, p. 397–409, 13 jun. 2009.

URIBE-MARIÑO, Andrés *et al.* Prefrontal Cortex Corticotropin-Releasing Factor Receptor 1 Conveys Acute Stress-Induced Executive Dysfunction. *Biological Psychiatry*, v. 80, n. 10, p. 743–753, nov. 2016.

VALE, W. *et al.* Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science*, v. 213, n. 4514, p. 1394–1397, 18 set. 1981.

VALLORTIGARA, Giorgio. Comparative neuropsychology of the dual brain: A stroll through animals' left and right perceptual worlds. *Brain and Language*, v. 73, n. 2, p. 189–219, 2000.

VAN DER KOOY, Derek *et al.* Visceral cortex: A direct connection from prefrontal cortex to the solitary nucleus in rat. *Neuroscience Letters*, v. 33, n. 2, p. 123–127, 1982.

VAN PETT, Kasia *et al.* Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse. *The Journal of Comparative Neurology*, v. 428, n. 2, p. 191–212, 11 dez. 2000.

VERTES, Robert P. Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse (New York, N.Y.)*, v. 51, n. 1, p. 32–58, jan. 2004.

VIANNA, Daniel M. L.; CARRIVE, Pascal. Changes in cutaneous and body temperature during and after conditioned fear to context in the rat. *The European journal of neuroscience*, v. 21, n. 9, p. 2505–12, maio 2005.

VICTORIANO, Gabriel *et al.* Inhibition of the left medial prefrontal cortex (mPFC) prolongs the social defeat-induced anxiogenesis in mice: Attenuation by NMDA receptor blockade in the right mPFC. *Behavioural Brain Research*, v. 378, p. 112312, jan. 2020.

VIDAL-GONZALEZ, Ivan *et al.* Microstimulation reveals opposing influences of prelimbic and infralimbic cortex on the expression of conditioned fear. *Learning and Memory*, v. 13, n. 6, p. 728–733, 2006.

VITA, Natalio *et al.* Primary structure and functional expression of mouse pituitary and human brain corticotrophin releasing factor receptors. *FEBS Letters*, v. 335, n. 1, p. 1–5, 1993.

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

WELLMAN, Cara L.; BOLLINGER, Justin L.; MOENCH, Kelly M. Effects of stress on the structure and function of the medial prefrontal cortex: Insights from animal models. 1. ed. [S.l.]: Elsevier Inc., 2020. v. 150

WESTPHAL, Nicole J.; SEASHOLTZ, Audrey F. CRH-BP: the regulation and function of a phylogenetically conserved binding protein. p. 1878–1891, 2006.

WILLNER, Paul *et al.* Validation of chronic mild stress in the Wistar-Kyoto rat as an animal model of treatment-resistant depression. *Behavioural pharmacology*, v. 30, n. 2 and 3- Spec Issue, p. 239–250, 2019.

WREE, Andreas *et al.* Modification of callosal afferents of the primary visual cortex ipsilateral to the remaining eye in rats monocularly enucleated at different stages of ontogeny. *Cell and Tissue Research*, v. 242, n. 2, nov. 1985.

YARUR, H. E. *et al.* Functional Interplay of Type-2 Corticotrophin Releasing Factor and Dopamine Receptors in the Basolateral Amygdala-Medial Prefrontal Cortex Circuitry. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, v. 24, n. 3, p. 221–228, 17 mar. 2021.

YARUR, Hector E. *et al.* Inhibitory Control of Basolateral Amygdalar Transmission to the Prefrontal Cortex by Local Corticotrophin Type 2 Receptor. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, v. 23, n. 2, p. 108–116, 25 mar. 2020.