

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

LABORATÓRIO DE FARMACOLOGIA

Daniela Pereira de Freitas

**Papel dos receptores CRF1 da matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPd)
de camundongos submetidos ao teste de exposição ao rato (RET).**

Araraquara, 2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

Papel dos receptores CRF1 da matéria cinzenta periaquedutal (MCP) de camundongos submetidos ao teste de exposição ao rato (RET).

Trabalho de Conclusão de Curso do
Curso de Graduação em Farmácia-
Bioquímica da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Araraquara, da
Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho” – UNESP, para
obtenção do grau de Farmacêutico-
Bioquímico.

Aluna: Daniela Pereira de Freitas

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza

Co-orientador: Diego Cardozo Mascarenhas

Araraquara 2016

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza por me aceitar em seu grupo de pesquisa, pela orientação e todo o apoio para a realização deste trabalho.

Ao Co-orientador Diego Cardozo Mascarenhas pelo amparo em todas as situações em que precisei, pelos treinamentos técnicos e práticos e por me ajudar a entender grande parte da realidade acadêmica em relação à pesquisa, muito além do curso.

Aos integrantes do laboratório de Neuropsicofarmacologia por me auxiliarem quando precisei e pela vivência que tivemos.

Às técnicas do laboratório, Elisabete e Rosana, pelo carinho e pelos treinamentos oferecidos assim que iniciei o estágio, fundamentais para o desenvolvimento do projeto.

Aos meus pais, irmão e namorado por estarem do meu lado em todas as situações e me apoiarem sempre.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, por oferecer a estrutura necessária ao desenvolvimento deste trabalho e por todo o conhecimento.

Ao CNPQ pelo financiamento deste projeto de pesquisa durante minha Iniciação Científica.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Aparato do RET ilustrando o compartimento da superfície (região aversiva) e os compartimentos da toca conectada à superfície pelo túnel (regiões protegidas).....	13
Figura 2: Representação esquemática dos sítios de microinjeção na MCP.....	16
Figura 3: Efeitos do CP (0, 0,75, 1,5 ou 3,0 nmol) intra-MCPd nos comportamentos espaço-temporais de camundongos expostos ao RET. N=3-8. *P<0,05 comparado com grupo veículo.....	18
Figura 4: Efeitos do CP (0, 0,75, 1,5 ou 3,0 nmol) intra-MCPd nos comportamentos complementares de camundongos expostos ao RET. N=3-8. *P<0,05 comparado com grupo veículo.....	19

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
2. OBJETIVO	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.1. Sujeitos	11
3.2. Fármacos	12
3.3. Cirurgia e administração de droga na MCPd	12
3.4. Aparato do RET	13
3.5. Análise Comportamental	14
3.6. Histologia	15
3.7. Estatística	15
3.8. Delineamento Experimental	15
4. RESULTADOS	16
4.1. Sítio de Injeção	16
4.2. Resultados do Experimento	17
5. DISCUSSÃO	20
6. CONCLUSÃO	23
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24

RESUMO

Dados na literatura demonstram que o Fator de Liberação de Corticotropina (CRF – do inglês *corticotropin releasing factor*) é um neurotransmissor importante na modulação das reações de defesa que animais exibem frente a estímulos aversivos. Vários estudos têm investigado os substratos neurais envolvidos na neurobiologia destas reações de defesa e muitos têm destacado a participação da matéria cinzenta periaquedutal (MCP) do mesencéfalo. Neste sentido, injeções de CRF na porção dorsal da MCP (MCPd) sugerem um efeito ansiogênico seletivo para receptores CRFérgicos do tipo 1 (CRF1) em camundongos expostos ao teste de ansiedade do labirinto em cruz elevado (LCE). Além disso, o bloqueio dos receptores CRF1 revelaram uma modulação tônica CRFérgica no córtex pré-frontal medial (CPFm) de camundongos, porém falhou em revelar quaisquer efeitos na MCPd destes roedores expostos ao labirinto em cruz elevado (LCE). Assim, levantamos a hipótese de que um teste de ansiedade potencialmente mais aversivo que o LCE recrutaria uma quantidade maior de CRF endógeno o qual poderia revelar efeitos deste antagonista quando infundido na MCPd de camundongos. Para tanto, camundongos após 3 dias de habituação foram submetidos à injeção intra-MCPd do antagonista de CRF1 - CP (0; 0,75; 1,5; ou 3,0 nmol) e dez minutos em seguida foram expostos ao teste de exposição ao rato (RET – do inglês *rat exposure test*). O tratamento com o antagonista de CRF1 (CP) aumentou as entradas (0,75 nmol) e o tempo de permanência (0,75-3,0 nmol) dos camundongos na superfície do RET, local mais aversivo do aparato (próximo ao predador), além de diminuir o tempo na toca (0,75-3,0 nmol), local menos aversivo sugerindo um efeito ansiolítico. Além disso, os comportamentos

complementares como a frequência de levantamento e o tempo de contato corroboraram as medidas espaço-temporais. Parece haver um tônus CRFérgico na MCPd na modulação de comportamentos defensivos de camundongos quando expostos ao RET.

1. INTRODUÇÃO

O medo e a ansiedade são estados emocionais correlacionados, qualificados subjetivamente como não prazerosos e desagradáveis acompanhados por sentimento de apreensão e insegurança e um conjunto de alterações comportamentais, fisiológicas e cognitivas subjetivas (GRAEFF, 1990). Lader (1981) atribuiu como causa principal da ansiedade a expectativa de um perigo iminente e indefinido, porém sem que uma ameaça real seja identificada ou, quando existente, considerada como desproporcional à intensidade da emoção. Graeff (1990) cita como uma das raízes principais da ansiedade o sentimento de medo por ser encontrado praticamente em todas as espécies, cuja função é sinalizar e preparar o organismo para situações de ameaça ou perigo. A diferença entre os dois estados emocionais pode ser caracterizada em relação aos estímulos e/ou situações que os desencadeiam, de forma que o medo surgiria diante de situações claras e evidentes de ameaça e perigo, enquanto a ansiedade seria desencadeada por situações onde o perigo é apenas potencial, vago e incerto (BLANCHARD et al., 1990).

O estudo sistemático da ansiedade e do medo tomou grande impulso a partir dos trabalhos originais de Charles Darwin publicados no seu livro *The Expression of Emotions in Man and Animals* (1872, Apud ZANGROSSI; GRAEFF, 2004). A partir de então, a abordagem evolucionária proposta por Darwin tem permeado muitas das teorias sobre a função e a importância que as emoções desempenham para as diferentes espécies. Por esta abordagem, o homem, tendo outros animais como ancestrais, compartilharia com estes suas emoções, possibilitando que comparações entre o seu comportamento e o de outros animais fossem traçadas (ZANGROSSI; GRAEFF, 2004). Com base nesses achados, postula-se que medo e ansiedade são emoções decorrentes das respostas dos animais frente a estímulos

aversivos que lhes apresentem perigo ou ameaça à sobrevivência. Tais estímulos, como por exemplo, o ataque de um predador ou confrontos com co-específicos, podem resultar na exibição de reações de defesa (ou respostas comportamentais defensivas, por exemplo: luta, fuga, imobilidade, vocalização), coordenadas pela ativação de determinadas áreas encefálicas que conjuntamente compõem o sistema encefálico de defesa, com objetivo de manter e proteger a vida (GRAEFF, 1990). Outros estímulos ambientais, tais como altura excessiva, iluminação intensa, tempestades, incêndio, exposição a lugares novos, também são caracterizados como aversivos e podem eliciar tais reações, que são compostas por fuga e/ou ataque defensivo (luta), esquiva ativa e inibitória, congelamento (freezing) e avaliação de risco (BLANCHARD et al., 1993; BLANCHARD; BLANCHARD, 2003).

As reações de defesa são a base de estudo para a compreensão de emoções como o medo e a ansiedade e são orquestradas pelo sistema cerebral de defesa e processadas por regiões encefálicas tais como a amígdala, o hipotálamo e a matéria cinzenta periaquedutal (MCP).

Estas reações, somadas às alterações endógenas como liberação de hormônios e neurotransmissores, sinalizam que o organismo está preparado para responder àquela ameaça, seja fugindo ou enfrentando-a, dependendo da natureza da ameaça e a estratégia adotada. Embora tais alterações sejam importantes diante de um contexto ou situação aversivos, tornam-se mal adaptadas em condições que não oferecem perigo nem hostilidade ao indivíduo. Em se tratando da espécie humana, estas respostas defensivas eliciadas podem indicar a ocorrência de transtornos de ansiedade. (BLANCHARD et al., 2001; GRAY; MCNAUGHTON, 2000; MCNAUGHTON; CORR, 2004). Nesse contexto, quando o medo e a ansiedade superam níveis considerados de normalidade, interferindo com o

cotidiano do indivíduo, passam a ser consideradas patologias do sistema de defesa humano. Portanto, numa perspectiva evolutiva, a investigação do comportamento defensivo em vários mamíferos (como os roedores) é de crucial importância para a compreensão dos mecanismos neurobiológicos subjacentes aos estados de medo e ansiedade (GRAY; MACNAUGHTON, 2000; BLANCHARD et al., 2001; GRAEFF; ZANGROSSI, 2002). Com relação aos substratos neurais envolvidos nestas manifestações, cabe destacar estruturas prosencefálicas, como o complexo amigdaloide e o córtex pré-frontal e estruturas mesencefálicas, como núcleos da rafe e a MCP (GRAY; MACNAUGHTON, 2000). Esta última tem sido destacada como um dos principais substratos da aversão no sistema nervoso central (GRAEFF, 2004), demonstrando importância na mediação de comportamentos defensivos, haja vista o envolvimento de diferentes neurotransmissores neste sítio na mediação de respostas comportamentais e autonômicas frente ao estresse, medo e ansiedade (BANDLER; DEPAULIS, 1991; BEHBEHANI, 1995; BRANDÃO, 2004; GRAEFF et al., 1993; GRAEFF, 2004; MIGUEL; NUNES-DE-SOUZA, 2006; 2011). Além disso, a estimulação química ou elétrica da MCP provoca vigorosas respostas somatomotoras, acompanhadas de simpatoexcitação e antinocicepção (diminuição da percepção dolorosa) (BANDLER; DEPAULIS, 1991; BEHBEHANI, 1995; LOVICK, 2000; MORGAN; WHITNEY; GOLD, 1998), de maneira semelhante àquelas exibidas em situações aversivas ou ameaçadoras proximais (DEAKIN; GRAEFF, 1991).

A MCP é uma estrutura que circunda o aqueduto mesencefálico, sendo dividida anatômica e funcionalmente ao longo do eixo rostrocaudal em quatro colunas, denominadas de acordo com a posição em relação ao aqueduto, em dorsomedial (MCPdm), dorsolateral (MCPdl), lateral (MCPI) e ventrolateral (MCPvl) (CARRIVE, 1993; BANDLER E SHIPLEY, 1994). Tal condição sugere que essa

estrutura esteja interligada a um grande número de circuitos neurais responsáveis pela modulação e coordenação de muitas funções fundamentais para a sobrevivência do organismo. De fato, a MCP está envolvida com a modulação de reações de defesa relacionadas ao medo e a ansiedade, processamento de informação dolorosa, controle motor e cardiovascular (BEHBEHANI, 1995). O estudo das reações de defesa tem levado a um crescente interesse pelo desenvolvimento de modelos animais voltados à investigação de estados emocionais potencialmente associados a desordens psiquiátricas. Dessa forma, torna-se clara a contribuição dos testes em animais para a compreensão da neurobiologia de diversos distúrbios mentais/emocionais (ZANGROSSI; GRAEFF, 2004).

Resultados recentes do nosso laboratório mostraram o envolvimento do sistema CRFérgico na modulação destas reações de defesa. O CRF (do inglês – *corticotropin releasing factor*) é um neuropeptídeo liberado em resposta ao estresse, sendo denominado por muitos pesquisadores como “hormônio do estresse”. Ele é um neurotransmissor importante na modulação das reações de defesa que animais exibem frente a estímulos aversivos. Vários estudos têm investigado os substratos neurais envolvidos na neurobiologia destas reações de defesa e muitos têm destacado a participação da matéria cinzenta periaquedutal (MCP) do mesencéfalo. Existem receptores CRFérgicos dos tipos 1 e 2 na MCP, nos quais ele atua. Seu envolvimento com a ansiedade tem sido observado em estudos que demonstraram efeitos ansiogênicos após injeções intracerebroventricular (i.c.v.) e intra-MCP desse peptídeo em ratos e camundongos expostos ao LCE (BALDWIN et al., 1991; MARTINS; MARRAS; GUIMARÃES, 1997; MIGUEL; NUNES-DE-SOUZA, 2011).

Assim, injeções na porção dorsal da matéria cinzenta periaquedutal (MCPd) do neuropeptídeo aumentam a esquia dos braços abertos do labirinto em cruz

elevado (LCE) em camundongos, um efeito que foi completamente bloqueado pela injeção local do antagonista de receptores CRFérgicos do tipo1 (CRF1), o NBI 27514, porém não do antagonista de receptores do tipo 2 (CRF2), sugerindo a participação do CRF1 da MCPd na modulação das reações de defesa em camundongos expostos ao LCE (MIGUEL & NUNES-DE-SOUZA, 2011).

Estudos anteriores do nosso laboratório consistiram na construção de uma curva dose resposta para o antagonista de receptores CRFérgicos do tipo 1 (CP – 0,75, 1,5 e 3,0 nmol) intra-MCP sobre seus efeitos na ansiedade de camundongos expostos ao LCE (dados não publicados). Nesse contexto, nenhuma das doses utilizadas levou a efeitos intrínsecos sobre a ansiedade desses animais. Assim, embora existam evidências de que a ativação de receptores CRF1 provoque efeitos pró-aversivos (LITVIN et al, 2007; CARVALHO-NETTO et al, 2007), o oposto parece não ser verdadeiro. Em outras palavras, o bloqueio de receptores CRF1 da MCP não produziu *per se* alteração da ansiedade avaliada no LCE.

Qualquer evidência contrária a ausência de efeitos do CP376395 poderia contribuir para um papel diferencial dos mecanismos CRFérgicos da MCPd na modulação da ansiedade de camundongos. Neste sentido levantamos a hipótese que um modelo de ansiedade potencialmente mais aversivo poderia liberar CRF endógeno suficiente para revelar efeitos deste antagonista (CP).

Neste contexto, em recente avaliação etofarmacológica do emprego do teste de exposição ao rato (RET – do inglês *rat exposure test*), mostramos que o perfil comportamental defensivo do camundongo é sensível, sobretudo ao tratamento agudo com benzodiazepínico potente (alprazolam) (CAMPOS et al., 2013), sugerindo que o RET poderia ser considerado potencialmente mais aversivo que o LCE, dado que benzodiazepínicos clássicos (por exemplo o diazepam), que

atenuam a ansiedade de animais no LCE, não alteraram o comportamento de camundongos no RET (CAMPOS et al., 2013). Logo, nosso intuito foi o de investigar eventuais efeitos do antagonista de receptores CRF1, *per se*, na modulação das reações de defesa de camundongos expostos a um teste de ansiedade mais aversivo que o LCE, o teste do RET. Esse modelo animal permite avaliar os comportamentos defensivos, através da interação presa-predador.

2. OBJETIVO

O objetivo do projeto foi avaliar o papel dos receptores CRF1 da MCPd, através da infusão do antagonista seletivo CP376395, em camundongos expostos ao RET.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Sujeitos

Foram utilizados camundongos albinos machos (25-35g), provenientes do biotério central da Universidade Estadual Paulista – UNESP, mantidos em situações controladas de temperatura ($23 \pm 1^{\circ}\text{C}$), umidade ($55 \pm 5\%$) e luz (ciclo de 12/12 horas, luzes acesas às 07:00 e apagadas às 19:00). Os animais possuíam livre acesso ao alimento e à água, exceto durante os curtos períodos de teste. Os protocolos experimentais foram realizados em conformidade com os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovado pelo Comitê de Ética local (CEUA) 43/2015. Todo esforço foi feito a fim de minimizar o sofrimento animal.

3.2 Fármaco

Foi utilizado o antagonista de receptores CRFérgicos do subtipo 1, CP 396375 (Tocris Bioscience), nas doses de 0,75; 1,5 e 3,0 nmol. O fármaco foi diluído em solução de cloreto de sódio a 0,9% (salina). (MIGUEL; NUNES-DE-SOUZA, 2008). O volume final de injeção foi de 0,2 μ L.

3.3 Cirurgia e administração de droga na MCPd

Camundongos foram submetidos à cirurgia estereotóxica unilateral para receberem implantação intracraniana de cânula guia (26 gauge – aço inoxidável) de 7,0 mm de comprimento, após anestesia com Cetamina + Xilazina 100 e 10mg/kg, respectivamente. A cânula foi fixada no crânio do animal com cimento acrílico e as coordenadas estereotóxicas para implantação da cânula guia na MCP foram baseadas no Atlas de Paxinos e Franklin (2001). As coordenadas foram: 4,1 mm posterior e 1,4 mm lateral ao bregma (encontro das suturas) e 2,3 mm ventral à superfície do crânio, com a agulha ajustada para ângulo de 26 graus. Após a cirurgia os animais receberam uma injeção de anti-inflamatório (Megluminato de Flunixinina – Intervet Schering–Plough, Rio de Janeiro, na dose de 3,5 mg/kg pela via subcutânea) seguida de pentabiótico (Pentabiótico Veterinário – Fort Dodge Saúde Animal Ltda. pela via intramuscular na dose de 56,7 mg/kg) a fim de prevenir infecções. A ponta da cânula guia foi posicionada a + 1,0 mm dorsal à estrutura alvo. A injeção das soluções na MCP foi feita de cinco a sete dias após a cirurgia (período de recuperação dos animais) e ocorreu através da inserção de uma agulha (33 gauge) de 8,0 mm de comprimento no interior da cânula guia, conectada, por meio de um tubo de polietileno (PE-10), a uma micro seringa (marca Hamilton), através da qual foi injetado um volume total de 0,2 μ L. Após a microinjeção, a agulha de injeção

permaneceu por mais 30 segundos no interior da cânula guia para garantir o escoamento e infusão das soluções, e durante todo o procedimento de injeção o animal foi contido gentilmente pelo experimentador através de uma flanela. O movimento de uma pequena bolha de ar no tubo de polietileno durante as injeções confirmou o fluxo da solução.

3.4 Aparato do RET

O aparato é composto por uma caixa de acrílico transparente medindo 46 (comprimento) x 24 (largura) x 21 (altura) centímetros (caixa de exposição) coberta por uma tampa de acrílico preto. A caixa de exposição é dividida em dois compartimentos de igual tamanho (superfície e compartimento do predador) por uma tela de arame. Além disso, uma toca medindo 12 x (comprimento) x 7 (largura) x 7 (altura) centímetros e feita de acrílico preto em 3 faces e de acrílico transparente em 1 face (para permitir a filmagem) é conectada à superfície através de um túnel de acrílico transparente (4,4 cm diâmetro, 13 cm comprimento) (Figura 1).

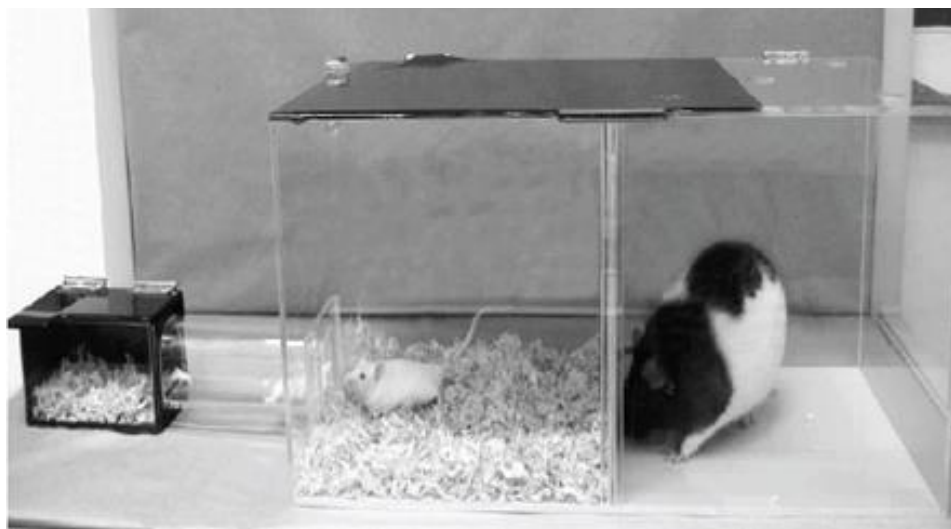


Figura 1: Aparato do RET ilustrando o compartimento da superfície (região aversiva) e os compartimentos da toca conectada à superfície pelo túnel (regiões protegidas).

3.5 Análise Comportamental

No dia do Experimento animais foram expostos individualmente ao RET por dez minutos e filmados durante todo o tempo. Todos os experimentos foram filmados através de um aparato filmadora/DVD/TV integrados. Esse material foi arquivado em DVDs, que foram analisados posteriormente por um observador treinado (confiabilidade $\geq 90\%$). Essa análise foi feita com auxílio do programa X-Plo-RAT (versão 2005), o qual permite análises espaço-temporal e comportamentais. Ao final da análise, o programa gera tabelas quantificando todos os parâmetros avaliados.

Os comportamentos analisados no RET envolveram as medidas convencionais espaço-temporais, que correspondem à frequência de entradas em cada compartimento (toca, túnel e superfície) do aparato (a entrada em um compartimento foi definida como a entrada com todas as quatro patas para dentro da área) e duração do tempo gasto nestes compartimentos. Além das medidas espaço-temporais, foram também registradas as medidas complementares como, frequência de levantamento (movimento exploratório na qual o animal retira as duas patas dianteiras do chão e se estica estendendo o corpo), tempo de escalada na tela de arame, tempo de congelamento, tempo de grooming (comportamento de auto-limpeza), tempo de contato com a tela de arame e frequência de ocultação defensiva (comportamento que o animal se esconder do predador, trazendo à sua frente maravalha do compartimento toca no sentido de evitar que seja visto).

3.6 Histologia

Após o término dos experimentos, todos os animais receberam injeção central de uma solução de 1% de azul de Evans (procedimento semelhante ao descrito no item 3.3) para checar se a cirurgia atingiu o local desejado para ação da droga. Após o sacrifício em câmara de CO₂, os animais foram então decapitados, seus encéfalos removidos e acomodados em recipientes contendo solução de formalina (10%) para posteriormente sofrerem secções coronais ao longo do trajeto da cânula com o auxílio de um criostato (Leica CM 1850). As secções foram inspecionadas com o uso de um microscópio (Leica DM LB) e a visualização da dispersão do azul de Evans indicou o local da injeção da droga durante o experimento.

3.7 Estatística

Os resultados do experimento foram inicialmente submetidos ao teste de homogeneidade de Levene e posteriormente submetidos à análise de variância ANOVA unifatorial (fator: tratamento). Nos casos de valores significantes de p foram realizadas comparações post-hoc através do teste de comparações múltiplas de Duncan. Valores de p iguais ou inferiores a 0,05 ($p \leq 0,05$) foram considerados significativos.

3.8 Delineamento experimental

Cinco dias após a cirurgia para implantação de cânula guia, todos os animais foram habituados ao aparato do RET por 3 dias consecutivos durante 10 minutos com livre acesso aos compartimentos (toca, túnel e superfície) sem a presença do predador. No quarto dia os animais receberam a infusão de CP376395 (0; 0,75; 1,5 ou 3,0 nmol) intra-MCPd. Dez minutos após o tratamento, os animais foram expostos

ao aparato, agora com a presença do predador (rato macho Long Evans) do outro lado da tela de arame e tiveram os comportamentos espaço-temporais e complementares registrados em vídeo durante 10 minutos para posterior análise.

4. RESULTADOS

4.1 Sítio de injeção

A Figura 2 representa um desenho esquemático de um corte histológico que contem a matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPd), envolvendo as colunas dorso-medial e dorso-lateral, estrutura alvo dos experimentos realizados neste trabalho.

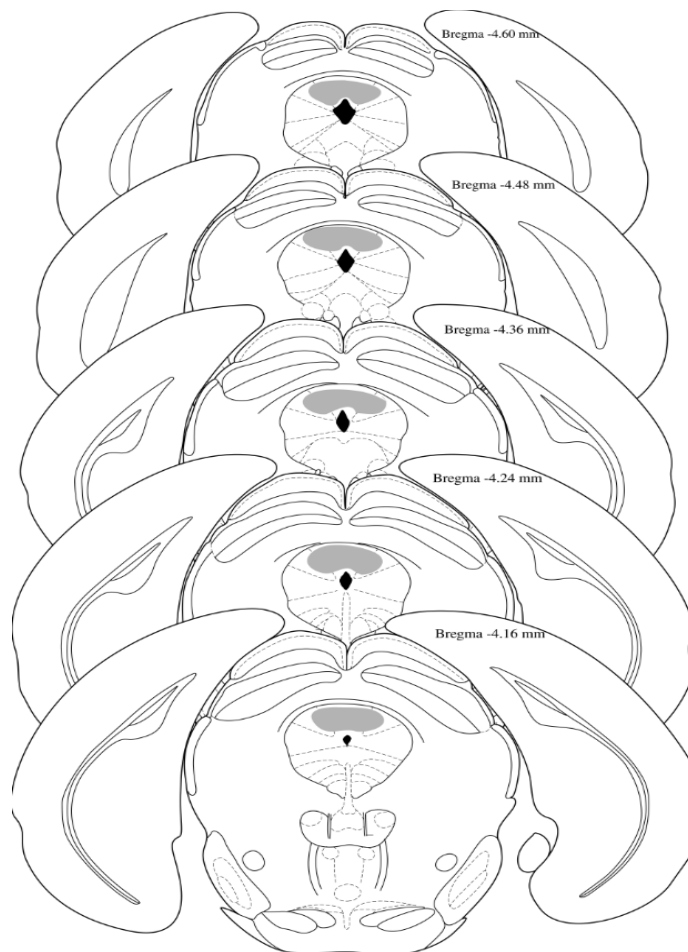


Figura 2: Representação esquemática da área considerada positiva (região cinza) para os sítios de microinjeção na MCPd.

4.2 Efeito ansiolítico do antagonista CRF1 intra-MCPd de camundongos expostos ao RET

A Figura 3 mostra a análise espaço-temporal de camundongos tratados intra-MCPd com CP (0; 0,75; 1,5 ou 3,0 nmol) e expostos ao RET. A ANOVA unifatorial revelou significância para a entrada na superfície ($F_{3,18}=3,02$; $p<0,05$), para o tempo na toca ($F_{3,18}=5,25$; $p<0,05$) e tempo na superfície ($F_{3,18}=4,19$; $p<0,05$). O teste de comparações múltiplas de Duncan confirmou um aumento das entradas na superfície no grupo tratado com CP 0,75 em comparação com o veículo ($p<0,05$). Ainda todas as doses aumentaram o tempo de permanência dos animais na superfície, resultado esse que se refletiu na toca, onde o tratamento com CP diminuiu o tempo de permanência neste compartimento em todas as doses utilizadas ($p<0,05$).

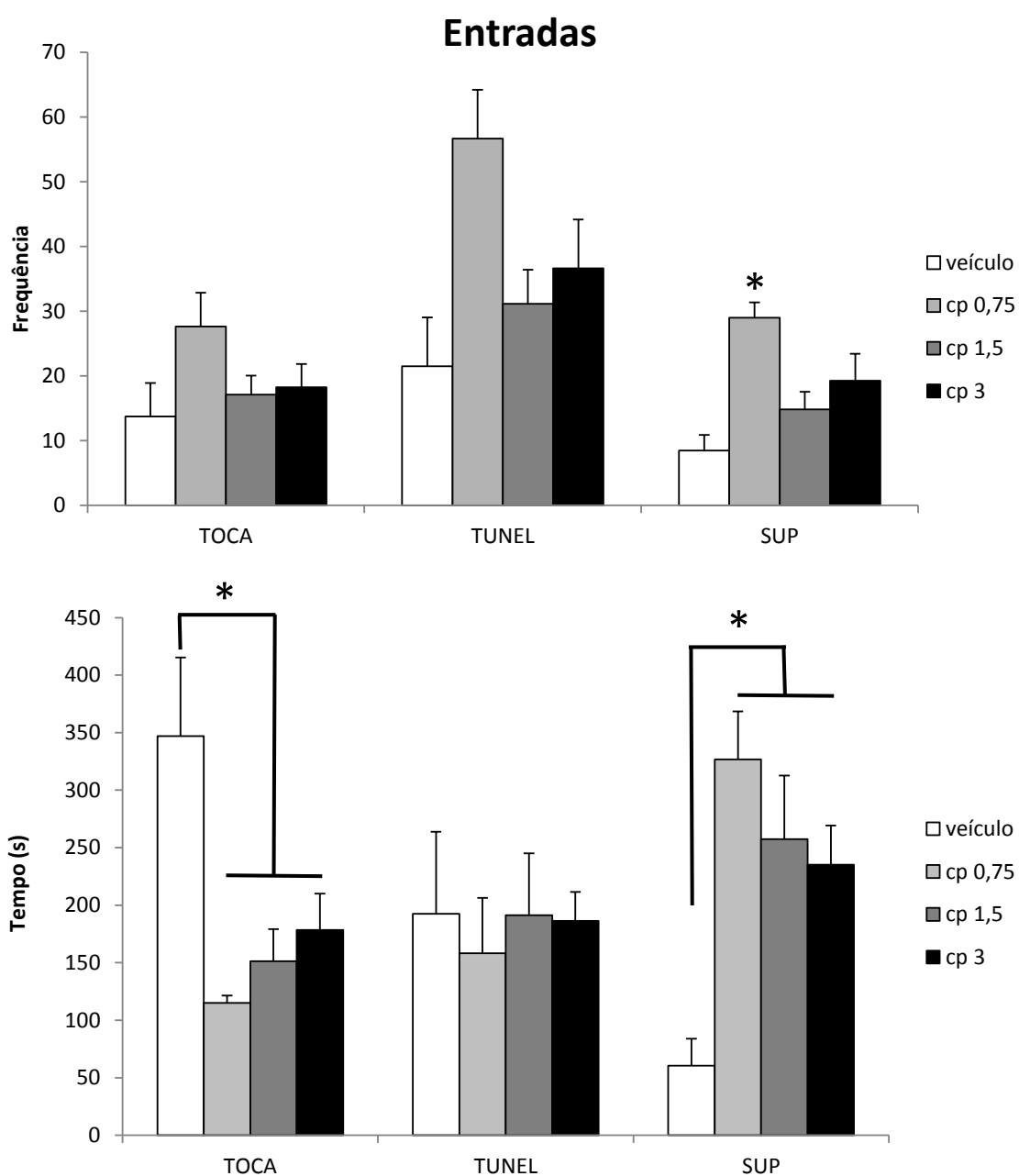


Figura 3: Efeitos do CP (0, 0,75, 1,5 ou 3,0 nmol) intra-MCPd nos comportamentos espaço-temporais de camundongos expostos ao RET. N=3-8. *P<0,05 comparado com grupo veículo.

A Figura 4 reporta a análise complementar dos camundongos tratados com CP (0; 0,75; 1,5 ou 3,0 nmol) intra-MCPd e expostos ao RET. A ANOVA unifatorial não revelou significância para os comportamentos analisados, porém devido a valores de P próximos a significância, a análise post-hoc foi realizada e revelou

diferenças significativas para os parâmetros levantamento (Fig. 4A) e contato (Fig. 4B) nos animais tratados com CP 0,75 ($p<0,05$).

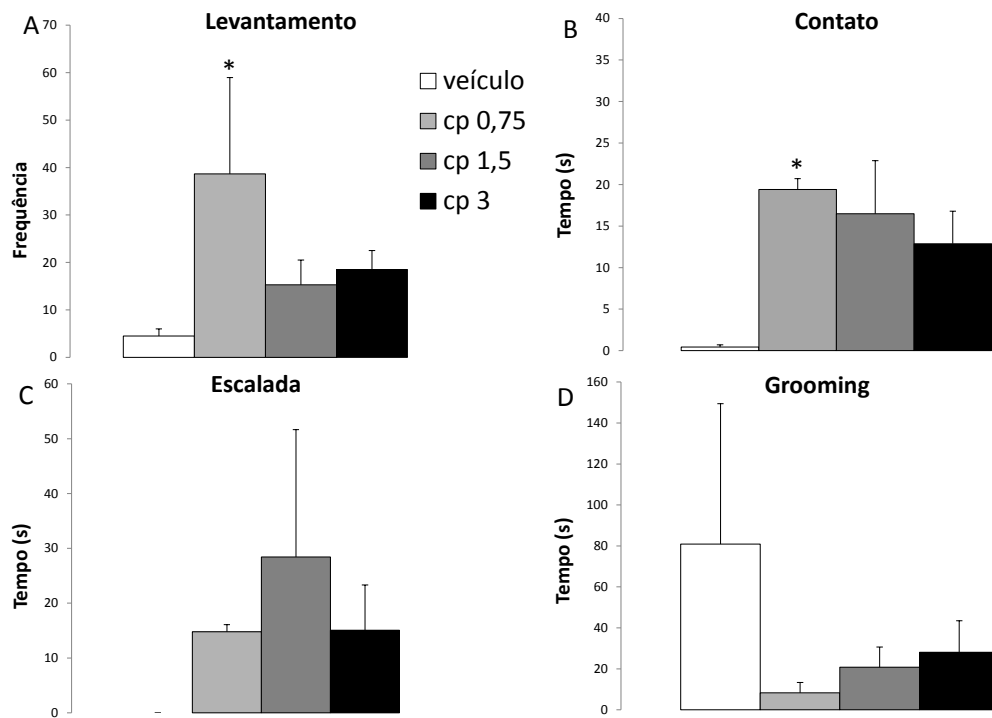


Figura 4: Efeitos do CP (0, 0,75, 1,5 ou 3,0 nmol) intra-MCPd nos comportamentos complementares de camundongos expostos ao RET. N=3-8. * $P<0.05$ comparado com grupo veículo.

Não houve valores significativos de ocultação defensiva e congelamento para nenhum grupo tratado que justificasse o uso de gráficos e/ou tabelas.

5. DISCUSSÃO

Os principais resultados deste estudo mostram que o bloqueio dos receptores CRF1 na MCPd de camundongos aumentaram as entradas (0,75 nmol) e o tempo gasto (0,75-3,0 nmol) no compartimento da superfície (região aversiva) do RET além de diminuir o tempo na toca (0,75-3,0 nmol). Tais resultados são corroborados pela análise complementar que revelou aumento no levantamento (0,75 nmol) e contato (0,75 nmol) nos camundongos tratados intra-MCPd com CP. Esses resultados sugerem um tônus CRFérgico na MCPd modulando as reações de defesa de camundongos expostos ao RET.

Nos Experimentos realizados é possível observar que o tratamento intra-MCPd com CP (antagonista CRF1) aumentou as entradas (0,75 nmol) e o tempo de permanência (0,75-3,0 nmol) de camundongos no compartimento aversivo do aparato do RET (superfície), além de diminuir o tempo no compartimento protegido (0,75 nmol), sugerindo um efeito ansiolítico.

A análise complementar corroborou as medidas espaço-temporais, sobretudo com o aumento no tempo de contato com a tela de arame nos animais tratados intra-MCPd com CP 0,75 nmol. Isso demonstra uma atenuação da ansiedade dos animais e reforça o efeito ansiolítico, pois além de permanecer maior tempo na superfície (ambiente aversivo), ainda realizaram comportamentos que condizem com o efeito. Ainda neste contexto, o contato sugere um baixo nível de ansiedade uma vez que é um comportamento no qual os animais se levantam em direção ao compartimento do predador e permanecem com as duas patas fixas na tela de arame, local mais aversivo do aparato para o camundongo, na qual do outro lado estava o rato Long Evans (predador natural de camundongos). Na esfera da análise complementar destaca-se também o aumento nos levantamentos no grupo tratado localmente com

CP 0,75 comparado ao grupo veículo. Tal resultado reflete um aumento na análise exploratória nesse grupo de animais, minimizando o viés de prejuízo locomotor comumente associado a drogas ansiolíticas que geralmente possuem características hipnóticas e sedativas.

É possível verificar tendências nos comportamentos de escalada e grooming (autolimpeza), que não foram significativos, provavelmente devido ao elevado erro padrão. Um aumento na escalada no grupo tratado com CP refletiria diminuição de ansiedade. Já a tendência de diminuição no grooming nos grupos tratados com CP, se confirmada, indicaria que a neurotransmissão CRFérgica participa de reações de defesa mais sutis, uma vez que o comportamento de autolimpeza parece refletir uma tentativa de diminuição de odor para o predador. Somente uma abordagem experimental aumentando o número de animais poderia confirmar ou refutar tais tendências.

É relevante citar alguns comportamentos observados no grupo controle do experimento. Esses animais geralmente apresentaram um comportamento de esquiva do predador, no sentido de que quando o predador se movimentava ou se apresentava mais ativo, os camundongos que estavam na superfície se dirigiam à toca rapidamente em um comportamento de fuga, indicando o ambiente ansiogênico gerado pelo aparato do RET. Porém esse comportamento não foi observado com clareza nos grupos tratados, resultado que corrobora o efeito ansiolítico gerado pelo CP. Embora esse tipo de comportamento não foi quantificado, é importante a visão do pesquisador durante o experimento, tanto na interpretação dos resultados, quanto para que os próximos estudos se atentem também à essas observações.

Diante dos estudos no nosso laboratório, esses resultados mostram a importância da investigação do papel dos receptores CRF1 na MCPd, através da

infusão do antagonista seletivo CP376395, em camundongos expostos ao RET; já que outros resultados do nosso laboratório mostraram ausência de efeitos do tratamento intra-MCPd do antagonista CRFérgico do tipo 1, CP376395, no comportamento de camundongos expostos ao LCE (MIGUEL & NUNES-DE-SOUZA, 2011). Sendo assim o uso do RET pode contribuir para um papel diferencial dos mecanismos CRFérgicos da MCPd na modulação da ansiedade, pois os resultados demonstraram que o bloqueio dos receptores CRF1 da MCPd de camundongos produz um efeito ansiolítico em camundongos expostos ao modelo do RET. Sendo assim, parece que o paradigma do RET possivelmente recruta CRF endógeno o suficiente para revelar efeitos do antagonismo de CRF1 na MCPd de camundongos.

Pelo menos duas evidências parecem convergir para confirmar a hipótese de que o RET é potencialmente um modelo de ansiedade mais aversivo que o LCE; (i) o trabalho de Campos e colaboradores (2013) mostrou através de abordagens farmacológicas que benzodiazepínicos clássicos que atenuam a ansiedade de roedores no LCE não possuíam efeitos no RET. Em contrapartida, o alprazolam (benzodiazepínico mais potente) atenuou as reações de defesa de camundongos expostos ao RET. Somando-se à isso (ii) os atuais resultados permitem traçar um paralelo em relação ao perfil de efeito do CP (antagonista CRF1) nos dois modelos em questão, e de maneira robusta, revelou ansiólise somente quando infundido na MCPd de camundongos expostos ao RET.

6. CONCLUSÃO

Parece haver um tônus CRFérgico na MCPd na modulação de comportamentos defensivos de camundongos quando expostos ao RET. Tais resultados, somados a outras abordagens farmacológicas (CAMPOS et al., 2013), sugerem que o RET é potencialmente mais aversivo que o LCE.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALDWIN, H.A., et al. CRF antagonist reverses the "anxiogenic" response to ethanol withdrawal in the rat. **Psychopharmacology**, v.103, p.227-32, 1991.

BANDLER, R.; SHIPLEY, M.T. Columnar organization in midbrain periaqueductal gray: modules of emotional expression? **Trends Neurosci.** New York, v.17, n.9, p.379- 389, 1994.

BANDLER, R.; DEPAULIS, A.A. Midbrain periaqueductal gray control of defensive behavior in the cat and rat. In: DEPAULIS, A.; BANDLER, R. **The midbrain periaqueductal gray matter: functional, anatomical and neurochemical organization.** New York: Plenum Press, p.175-98, 1991.

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

BLANCHARD, D.C., et al. Human defensive behaviors to threat scenarios show parallels to fear- and anxiety-related defense patterns of non-humans mammals. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, 25:7-8, 2001.

BLANCHARD R.J, et al. Defensive system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. **Behav. Brain Res.**, v.58, n.1-2, p.155-65, 1993.

BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C. Bringing natural behaviors into the laboratory: a tribute to Paul McLean. **Physiol. Behav.**, v.79, n.3, p.515-24, 2003.

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

BRANDÃO, M.L. Mecanismos Básicos e Motivacionais da Dor. In: **As bases biológicas do comportamento: Introdução à neurociência.** São Paulo: EPU, p.141-46, 2004.

CAMPOS, K.F.C.; AMARAL, V.C.S.; RICO, J.L.; MIGUEL, T.T.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Ethopharmacological evaluation of the rat exposure test: a prey-predator interaction test. **Behav. Brain Res.**, 240:160-70, 2013.

CARRIVE, P. The periaqueductal gray and defensive behavior: functional significance and neuronal organization. **Behav Brain Res.** Amsterdam, v.58, n.1-2, p.27-47, 1993.

CARVALHO-NETTO, E. F.; LITVIN, Y.; NUNES-DE-SOUZA, R. L.; BLANCHARD, D. C; BLANCHARD, R. J. Effects of intra-PAG infusion of ovine CRF on defensive behaviors in Swiss-Webster mice. **Behav. Brain Res.**, 176:222–229, 2007.

DEAKIN, J. F. W.; GRAEFF, F. G. 5-HT and mechanisms of defense. **Psychopharmacology**, v.5, n.4, p.305-15, 1991.

GRAEFF, F.G. Brain defense system and anxiety. In: ROTH, M.; BURROUS, G.P.; NOYES, R. **Handbook of anxiety**, Amsterdam: Elsevier, p.307-54, 1990.

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

GRAEFF, F.G. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. **Neurosci.Biobehav.Rev.**, v.28, n.3, p.239-59, 2004.

GRAEFF, F. G.; ZANGROSSI, JR. H. Animal models of anxiety. In: D'HAENEN.; DEN BOER, J.A.; WILLER, P. Eds. **BiologPsychiatr**. John Willer& Sons Ltd. 2002, p.1-15.

GRAY, J.A.; MCNAUGHTON, N. The Neuropsychology of Anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system, **2a Ed. Oxford: Oxford University Press**, 2000.

LADER, M.H. Clinical anxiety and the benzodiazepines. In: Neuropharmacology of Central Nervous Sistem and Behavioral Disorders. Palmer GC, ed., **Academyc Pres**. New York, p.225-241, 1981.

LITVIN, Y. PENTOWSKY, N.S., BLANCHARD, D.C., BLANCHARD, R.J. CRF type 1 receptors in the dorsal periaqueductal gray modulate anxiety-induced defensive behaviors. **HormBehav.**, 52(2):244-51, 2007.

LOVICK, T.A. Panic disorder a malfunction of multiple control systems within the midbrain periaqueductal gray matter? **Neuroscientist**, v.6, p.48-58, 2000.

MARTINS, A.P.; MARRAS, R.A.; GUIMARÃES, F.S. Anxiogenic effect of corticotropin-releasing hormone in the dorsal periaqueductal gray. **Neuroreport**, v.8, p.3601-4, 1997.

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

MIGUEL, T.T.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Anxiogenic-like effects induced by NMDA receptor activation are prevented by inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the periaqueductal gray in mice. **Brain Res.**, 1240:39-46, 2008

MIGUEL, T.T.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Defensive behavior and antinociception induced by NMDA injection into the periaqueductal gray depend on nitric oxide synthesis. **Brain Res.**, v.1076, p.42-8, 2006.

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

MORGAN, M.M.; WHITNEY, P. K.; GOLD, M.S. Immobility and flight associated with antinociception produced by activation of the ventral and lateral/dorsal region of the rat periaqueductal gray. **Brain Res.**, v.804, p.159-166, 1998

RODGERS, R.J. Neuropharmacological aspects of adaptive pain inhibition in murine victims of aggression. **Agress. Behav.**, 21:29-39, 1995.

ZANGROSSI JR, H.; GRAEFF, F.G. Modelos Animais. In: HETEM, L.A.B.; GRAEFF, F.G. **Transtornos de Ansiedade**, 1a. ed.,p.55-73, São Paulo: Editora Atheneu, 2004.