ISABEL CRISTINA CÉSPEDES

**PRESENÇA DA PROTEÍNA Fos EM REGIÕES DO SISTEMA
NERVOSO CENTRAL DE ROEDORES SUBMETIDOS OU NÃO AO
ALPRAZOLAM APÓS CHOQUE E RESTRIÇÃO**

**Tese apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade
de São Paulo, para obtenção do Título
de Doutor em Ciências Morfofuncionais**

**São Paulo
2007**

ISABEL CRISTINA CÉSPEDES

**PRESENÇA DA PROTEÍNA Fos EM REGIÕES DO SISTEMA
NERVOSO CENTRAL DE ROEDORES SUBMETIDOS OU NÃO AO
ALPRAZOLAM APÓS CHOQUE E RESTRIÇÃO**

**Tese apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade
de São Paulo, para obtenção do Título
de Doutor em Ciências Morfofuncionais**

**Área de concentração:
Anatomia**

**Orientador:
Prof. Dr. Jackson Cioni Bittencourt**

**São Paulo
2007**

Autorização para Reprodução e Divulgação

Para fins acadêmicos e científicos () **está autorizada**, a partir de ____/____/____ a reprodução () total ou () parcial por processos fotocopiadores e a partir de ____/____/____ a disponibilização () total ou () parcial em meios eletrônicos.

Se parcial, discriminar paginação, ilustração etc

() **não está autorizada**

Assinatura do Autor: _____

Ciência do Orientador: _____

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais
Universidade de São Paulo - Instituto de Ciências Biomédicas

Candidato(a): **ISABEL CRISTINA CÉSPEDES**

Tese: **PRESENÇA DA PROTEÍNA Fos EM REGIÕES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE ROEDORES SUBMETIDOS OU NÃO AO ALPRAZOLAM APÓS CHOQUE E RESTRIÇÃO**

Orientador: **PROF. DR. JACKSON CIONI BITTENCOURT**

A Comissão Julgadora dos Trabalhos de Defesa da **Tese de Doutorado**, em sessão pública realizada a/...../....., considerou,

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

1) Examinador(a)

Assinatura:

Nome:

Instituição:

2) Examinador(a)

Assinatura:

Nome:

Instituição:

3) Examinador(a)

Assinatura:

Nome:

Instituição:

4) Examinador(a)

Assinatura:

Nome:

Instituição:

5) Presidente

Assinatura:

Nome:

Instituição:

DEDICATÓRIA

À DEUS, que me guiou até hoje.

**“....nem a morte, nem a vida, nem anjos, nem governos, nem coisas presentes, nem coisas por vir, nem poderes, nem altura, nem profundidade, nem qualquer outra criação será capaz de nos separar do amor de Deus.”
(Romanos, 8: 38- 39)**

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jackson C. Bittencourt, que aceitou generosamente o desafio de ensinar e assumir a responsabilidade por uma aluna com metade do prazo para execução do trabalho. Graças a ele pude aprender a trabalhar com aquilo a que tenho idealismo, e com sua paciência aprendi a utilizar as melhores técnicas para o desenvolvimento do trabalho. Ele é um exemplo de constante equilíbrio, educação e sabedoria em tratar com o outro.

Agradeço a Carlos Eduardo Panfilio, pelo companheirismo, trabalho, carinho, paciência, lealdade e amor nesta importante etapa da minha vida. Que me deu força para continuar apesar dos desafios.

Aos meus pais, que fizeram de mim quem sou.

À Profa. Dra. Carol F. Elias, que me ensinou generosamente e de uma forma maravilhosa algumas das técnicas aqui utilizadas, não apenas isso, mas sempre esteve disposta a me ajudar, colaborar e ensinar. Você é um verdadeiro exemplo acadêmico.

A minha querida amiga Anne Pierre, pelo conhecimento que me passou, pelo trabalho, paciência, dedicação, e muita amizade e carinho por mim e por meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Sérgio Palma (UNESP- Rio Claro) e ao seu pessoal, que se dispuseram a trabalhar em prol deste trabalho, com muito profissionalismo, carinho e dedicação. O Prof. Palma é também um dos grandes exemplos que

temos dentro de nossas universidades, com uma vasta experiência e conhecimento, associadas a muita humildade.

Aos meus colegas de pós-graduação, por me terem me ajudado sempre que necessário, terem sido dispostos e leais: Luciane Sita, Luciana Vasconcelos, Bruno Rodrigues, Suzana Souto, José Donato Jr., e outros. Também à Amanda e à Jô, não só pelo apoio técnico, mas pelo apoio emocional que sempre me deram, sem elas este trabalho não estaria concluído.

Ao funcionário do biotério do departamento de anatomia Renivaldo de Souza, por sua extrema colaboração, sensibilidade, educação, simpatia e esforço com que trata do seu trabalho, dos animais e de todos os usuários do biotério.

Às secretárias Cristina (secretária do museu de anatomia) e Cristiane (secretária do departamento de anatomia), que ao longo de todos estes anos me deram muita atenção, ajuda e carinho. À secretária Patrícia (do programa de pós-graduação do departamento de anatomia), que me ajudou nesta etapa final. E ao Celso Dias Pereira (funcionário da pós-graduação do Instituto de Ciências Biomédicas), que foi muito gentil e profissional em resolver problemas burocráticos que surgiram. À Rosana, responsável pelas análises estatísticas do departamento, que foi extremamente gentil e eficiente em analisar nossos resultados rapidamente.

Ao Instituto de Ciências Biomédicas e à Universidade de São Paulo, que foi minha casa para minha formação na graduação, mestrado e doutorado, com tantos anos de aprendizado e trabalho nesta grande instituição.

À CAPES, que me apoiou tanto no projeto do mestrado, quanto parcialmente do doutorado.

EPÍGRAFE

*É com stress que a vida começa.
É o stress que a torna intensa.
É com ele que a vida acaba.*

(Auriol, 1970)

RESUMO

O estresse é uma condição física comum para o organismo, já que representa os ajustes corporais a qualquer alteração interna ou externa que exija adaptação do organismo, do ponto de vista autonômico, neuroendócrino e comportamental. O CRF tem um papel chave nesta resposta, já que é o regulador principal do eixo HPA, gerando respostas neuroendócrinas, autonômicas, comportamentais e imunológicas ao estresse, através da ativação de receptores CRF1 e CRF2 espalhados por diversas partes do encéfalo e fora dele. Dentro da família do CRF de neuropeptídeos, tem-se a Ucn-I com funções paralelas na resposta ao estresse e tem sido fortemente relacionada aos estados de ansiedade. A principal fonte do CRF é o PVH, e da Ucn-I é o EW. O CRF tem maior afinidade ao CRF1 e a Ucn-I ao CRF2. Tem-se relatado que os fármacos benzodiazepínicos, sendo o mais usado o alprazolam, tem sua ação através da inibição das áreas CRF imunorreativas, tendo um efeito inibitório sobre o CRF e um efeito ainda discutido sobre a Ucn-I. Desta forma, para análise das áreas relacionadas à resposta ao estresse (através da imunorreatividade da proteína Fos), sua relação com a expressão do mRNA do CRF e da Ucn-I no PVH e EW respectivamente, e o efeito inibitório sobre as áreas e os neuropeptídeos através do alprazolam, foi realizado este experimento, onde ratos foram submetidos aos estresses de restrição e eletrochoque, e neste último, associado ou não ao alprazolam. Houve uma resposta diferenciada das áreas estudadas para cada tipo de estresse, sendo que no estresse de restrição as áreas com maior imunorreatividade da proteína Fos foram: PVH e AMIme, e no estresse de eletrochoque, as áreas com maior imunorreatividade da proteína Fos foram: AMIme e PAGdl. Nos animais submetidos ao alprazolam obtivemos uma baixa imunorreatividade nas áreas PVH, PAGlat e CC no grupo restrição e, PVH, LSV e PAGlat no grupo choque, com alta imunorreatividade nas áreas EW e LSV no grupo restrição e PAGdl no grupo choque. Na análise específica do mRNA do CRF, o fármaco gerou uma diminuição de sua expressão no PVH no grupo restrição e um aumento no grupo choque, sendo que para a Ucn-I, gerou um aumento da expressão do mRNA da Ucn-I no EW no grupo restrição e uma diminuição no grupo choque.

ABSTRACT

The stress is a usual physical and/or psychological condition for the organism, representing the adjustment to any internal or external alterations that demand adaptation. The CRF have a key role in this reply, since it is the main regulator of the HPA axis, producing neuroendocrine, autonomic, behavioral and immunological responses, through the activation of the CRF1 and CRF2 receptors distributed in different parts of the prosencephalon and in the periphery. The UCN-I neuropeptide belongs to the CRF family of peptides and probably has parallel roles in the stress response and have been strongly related to the anxiety conditions. The main site of the CRF expression is the PVH, and for Ucn-I is the EW. The CRF has greater affinity to the CRF1 and Ucn-I for CRF2. In the literature some authors have related the benzodiazepines, mainly the alprazolam, to the inhibition of the CRF-immunoreactivity areas. Therefore, performing an inhibitory effect on the CRF expression and a possibly effect on the Ucn-I. Thus, we are intending with this project to analyze the stress related areas (by the presence of Fos protein), and its relationship with the CRF mRNA and Ucn-I mRNA in the PVH and EW respectively, and the possible effect on the areas and their neuropeptides by alprazolam. These experiments were realized with rats submitted to the restraint and electroshock stress, associated or not to alprazolam. The responses were differentiated in the stress related areas. The restraint stress showed greater Fos-immunoreactivity in the following areas: PVH and AMIme. The electroshock stress showed greater Fos-immunoreactivity in the following areas: AMIme and PAGdl. The alprazolam had an inhibition effect in the following areas: PVH, PAGlat and CC in the restraint group, and PVH, LSV and PAGlat in the electroshock group. However, the alprazolam had an excitatory effect in the following areas: EW and LSV in the restraint group, and PAGdl in the electroshock group. The analysis of CRF mRNA, showed that the alprazolam caused reduction in the PVH in the restraint group and increase in the electroshock group, but the alprazolam did not caused increase in Ucn-I mRNA expression in the EW in the restraint group, with reduction in the electroshock group.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH= hormônio adrenocorticotrófico
AMI= amígdala
AMIce= amígdala central
AMIme= amígdala medial
BNST= núcleo intersticial da estria terminal
BNSTpr= parte principal do núcleo intersticial da estria terminal
CC= córtex do cíngulo
CRF= fator liberador de corticotropina
CRF₁= receptor de CRF tipo 1
CRF₂= receptor de CRF tipo 2
EW= núcleo de Edinger-Westphal
HPA= eixo hipotálamo-hipófise-supra-renal
HT= hipotálamo
icv= intracerebroventricular
LHA= área hipotalâmica lateral
LSO= parte lateral do núcleo superior da oliva
LS= núcleo septal lateral
LSV= núcleo ventral do septo lateral
PAG= substância cinzenta periaquedutal
PAGdl= parte dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal
PAGdm= parte dorsomedial da substância cinzenta periaquedutal
PAGlat= parte lateral da substância cinzenta periaquedutal
PVH= núcleo paraventricular do hipotálamo
SO= núcleo supra-óptico
Svg= sauvagina
Ucn= urocortina
Ucn-I-ir= Ucn imunorreativa
Uro= urotensina

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1- imunorreatividade Fos: imagens de referência para imunorreatividade.....	44
FIGURA 2- imunorreatividade Fos: PVH.....	45
FIGURA 3- imunorreatividade Fos:EW.....	46
FIGURA 4- imunorreatividade Fos: AMIce	47
FIGURA 5- imunorreatividade Fos: AMIme.....	48
FIGURA 6- imunorreatividade Fos: LSV.....	49
FIGURA 7- imunorreatividade Fos:BNST.....	50
FIGURA 8- imunorreatividade Fos: PAGdm.....	51
FIGURA 9- imunorreatividade Fos: PAGdl.....	52
FIGURA 10- imunorreatividade Fos: PAGlat.....	53
FIGURA 11- imunorreatividade Fos: CC.....	54
FIGURA 12- hibridização <i>in situ</i> : PVH.....	58
FIGURA 13- hibridização <i>in situ</i> : EW.....	59

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

1- INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2- PROPOSIÇÃO.....	26
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1- Grupos.....	29
3.2- Modelos Laboratoriais de Estresse.....	30
3.3- Anestesia.....	32
3.4- Perfusão.....	32
3.5- Microtomia.....	33
3.6- Imunohistoquímica para Proteína Fos.....	33
3.7- Coloração com Tionina pelo Método de Nissl.....	35
3.8- Hibridização <i>in situ</i> (ISH).....	35
4- RESULTADOS.....	39
4.1- Imunorreatividade da Proteína Fos.....	40
4.2- Expressão do mRNA do CRF e do mRNA da Ucn-I.....	55
5- DISCUSSÃO.....	60
6- CONCLUSÃO.....	79
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

O termo estresse é a tradução para o termo “stress”, da língua inglesa, que significa força, esforço intenso, pressão. Esta palavra inglesa foi empregada por H. Selye (1936) para exprimir o estado reacional de um organismo submetido à ação de um excitante qualquer. Algumas outras palavras podem denotar a idéia de estresse como: agressão, estimulação, acometimento, choque, constrangimento, abalo, pressão, tensão, emoção, comoção, desequilíbrio, depressão, indisposição, etc. O excitante, que Selye chamou de estressor, pode ser animado (microorganismo), físico (frio), químico (veneno), um distúrbio ou uma lesão orgânica (hemorragia) ou nervoso (esforço, emoção agradável ou desagradável) (Garnier & Delamare, 1984).

H. Selye (1936), distingue dois tipos de estresse: o estresse positivo, favorável, que ele denominou “selfish” ou “estresse de auto-preservação” ou “egoísmo altruístico”, e o estresse negativo, desagradável, que ele chamou de “distress” ou “angústia”. Toda sensação que coloca o organismo em estado de alerta, que o torna mais vigilante, que tensiona os seus músculos, que acelera a respiração e a circulação, constitui um estresse. Dessa maneira o corpo está pronto para reagir: combater ou fugir. Esta reação pode ser adaptada ou não, útil ou inútil, ou até mesmo nociva.

Se a sobrevivência dos primeiros homens era mais garantida para aqueles que reagiam rápido, de forma intensa e freqüente, a competição atual (que aliás é uma grande fonte de estresse) faz com que haja maior sobrevivência daqueles que só sabem reagir raramente e de maneira pouco intensiva (Auriol, 1970).

Na última década, o conhecimento das várias alterações fisiológicas que ocorrem após a exposição do organismo ao estímulo estressor ou estressante, tem aumentado significativamente, principalmente com relação ao papel de certas vias neurais e suas

substâncias reguladoras que possam estar envolvidas na resposta ao estresse, incluindo neuropeptídeos relacionados à regulação endócrina.

O mais importante desses neuropeptídeos é o CRF (corticotropin-releasing factor ou fator liberador de corticotrofina), o componente hipotalâmico do eixo hipotálamo-hipófise-supra-renal (comumente representado por HPA- hypothalamus-pituitary-adrenal axis). Em 1981, o CRF, com 41 amino-ácidos, foi isolado do hipotálamo ovino a partir de células da hipófise anterior (Vale *et al.*, 1981; Dunn & Berridge, 1990; Hauger & Dautzenberg, 1999; Smagin *et al.*, 2001; Hauger *et al.*, 2003). Como o CRF demonstrou provocar respostas neuroendócrinas, autonômicas, comportamentais e imunológicas ao estresse (Owens & Nemeroff, 1991), foi hipotetizado que ele contribuiria no desenvolvimento das reações corporais ao estresse e nas desordens afetivas, por super-ativar seus receptores expressos em neurônios no neocórtex, amígdala e seus neurocircuitos estendidos (amígdala estendida), e núcleos do tronco encefálico (Hauger *et al.*, 2003).

O CRF é liberado na eminência mediana no interior do sistema porta-hipofisal a partir de um estímulo estressante, e participa da regulação fisiológica da secreção de ACTH hipofisal (Brown *et al.*, 1985). É sintetizado por neurônios com corpos celulares nos núcleos paraventriculares do hipotálamo (PVH) (Bloom *et al.*, 1982; Bugnon *et al.*, 1982; Olschowka *et al.*, 1982; Swanson *et al.*, 1983; Roth *et al.*, 1983; Joseph & Knigge, 1983; Merchenthaler *et al.*, 1983). A lesão do núcleo PVH reduz o CRF na eminência mediana em 90%, com um resultado de 80% na redução do ACTH liberado após estresse provocado por exposição ao éter (Bruhn *et al.*, 1984). Tem-se demonstrado que o CRF provoca mudanças na atividade do sistema nervoso autônomo, que são similares àsquelas produzidas por uma variedade de estímulos estressantes como: elevação nas concentrações plasmáticas de adrenalina e noradrenalina (Brown *et al.*, 1982), aumento dos batimentos cardíacos e aumento da pressão arterial média (Fisher *et al.*, 1982).

O CRF também mostra larga distribuição extra-hipotalâmica, que fornece suporte a ajustes comportamentais e autonômicos complementares em uma variedade de padrões de estresse. Enquanto as projeções do PVH para a eminência mediana representam a maior fonte de CRF encefálica, células extra-hipotalâmicas que apresentam marcação para o CRF têm sido visualizadas no núcleo do tracto solitário, no *locus coeruleus*, na área tegmental ventral, no núcleo central da amígdala, no núcleo intersticial da estria terminal, na área pré-óptica, no núcleo da banda diagonal de Broca, hipocampo e como inter-neurônios corticais espalhados (Swanson *et al.*, 1983; Merchenthaler, 1984; Petrusz *et al.*, 1985; Sakanaka *et al.*, 1987; Gray & Magnuson, 1992; Koob *et al.*, 1994; De Souza, 1995; Steckler & Holsboer, 1999; Eckart *et al.*, 2002). No tecido periférico, o mRNA do CRF e seu peptídeo codificado são expressos nos ovários, testículos, baço, timo e placenta (Thompson *et al.*, 1987; Aird *et al.*, 1993).

O CRF apresenta grande homologia à urotensina I (Uro), um peptídeo de 41 aminoácidos (aa.) originalmente isolado da urófise de peixes teleósteos *Catostomus commersoni* (Lederis *et al.*, 1982), e também à sauvagina (Svg), um peptídeo com 40 aa. isolado da pele da rã *Phyllomedusa sauvagei* (Montecucchi *et al.*, 1980). Estes peptídeos foram considerados os homólogos não mamíferos do CRF, baseado em suas similaridades estruturais e funcionais. Todos os três peptídeos podem estimular a secreção de ACTH *in vitro* e *in vivo* no rato (Vale *et al.*, 1983).

A partir da caracterização dos genes que codificam os peptídeos homólogos ao CRF no peixe teleósteo (Okawara *et al.*, 1988) e na rã (Stenzel-Poore *et al.*, 1992), revelando a existência destes dois membros da família CRF nestas classes de vertebrados, levantou-se a possibilidade de que peptídeos homólogos à Uro/Svg poderiam existir em mamíferos. Usando uma sonda do cDNA da Uro de carpa, foi isolado um único cDNA de rato que codifica um precursor e um peptídeo, que foi nomeado Urocortina (Ucn) (Vaughan *et al.*, 1995). A Ucn de rato, similar aos membros da família de ligantes CRF, liga-se aos receptores de CRF

(Vaughan *et al.*, 1995; Lovenberg *et al.*, 1995; Perrin *et al.*, 1995; Kishimoto *et al.*, 1995; Stenzel *et al.*, 1995). Posteriormente, foram isolados outros dois peptídeos dessa família, sendo denominados Ucn-II (Hsu & Hsueh, 2001; Inoue *et al.*, 2003) e Ucn-III (Hsu & Hsueh, 2001; Lewis *et al.* 2001), com o primeiro peptídeo passando a ser denominado Urocortina-I (Hauger *et al.*, 2003).

A família CRF de peptídeos em mamíferos consiste atualmente de 4 ligantes primários endógenos: CRF (41 aa.) (Vale *et al.*, 1981), Ucn-I (40 aa.) (Vaughan *et al.*, 1995), Ucn-II (38 aa., também conhecido como peptídeo “stresscopina”-relacionado) (Hsu & Hsueh, 2001; Inoue *et al.*, 2003), e Ucn-III (Hsu & Hsueh, 2001; Lewis *et al.* 2001) (também conhecido como “stresscopina”) (38 aa.).

As células que expressam o RNA mensageiro (RNAm) da Ucn-I e o peptídeo, estão localizados principalmente no núcleo de Edinger-Westphal (EW) e núcleo lateral superior da oliva (LSO). Outros núcleos também apresentaram células Ucn-I-imunorreativas (Ucn-I-ir): núcleo supra-óptico (SO), núcleo paraventricular do hipotálamo (PVH), área hipotalâmica lateral (AHL), hipocampo e núcleos motores de nervos cranianos, especialmente em animais tratados com colchicina (Kozicz *et al.*, 1998; Bittencourt *et al.*, 1999).

As projeções Ucn-I-imunorreativas (Ucn-I-ir) no encéfalo são predominantemente descendentes e largamente consistentes com as projeções centrais atribuídas aos núcleos EW e LSO. Embora os neurônios dos núcleos de EW e LSO não sejam conhecidos por projetarem-se para o prosencéfalo, neurônios Ucn-I-ir do núcleo de EW mostraram projeções para o núcleo septal lateral, o qual aloja um proeminente campo terminal Ucn-I-ir, assim como intensa expressão do RNAm do CRF₂. Sua participação nos mecanismos relacionados ao estresse parece derivar principalmente das projeções para a coluna intermediolateral da medula espinal, para o núcleo do tracto solitário e, para o PVH (Bittencourt *et al.*, 1999).

As ações dos peptídeos da família CRF são mediadas via interação com receptores CRF distintos (Grigoriadis *et al.*, 1996). Dois membros da família de receptores para CRF são bem conhecidos e consistem de moléculas acopladas à proteína G de domínio transmembranar. O primeiro, CRF₁ (ou CRF-R1) foi clonado e funcionalmente caracterizado em várias espécies (Chang *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1993; Perrin *et al.*, 1993; Palchaudhuri *et al.*, 1998). O CRF liga-se a este receptor com alta afinidade e é positivamente ligado à adenilciclase. O CRF₁ de rato é encontrado na hipófise e no sistema nervoso central e parece mediar efeitos neuroendócrinos e neuromoduladores do CRF (De Souza *et al.*, 1985; Potter *et al.*, 1994; Chalmers *et al.*, 1995; Baram *et al.*, 1997; Radulovic *et al.*, 1998). Os análogos ao CRF como a Ucn-I, Uro I e Svg também estão aptos a estimular o acúmulo de AMP cíclico intracelular com similar potência (Kishimoto *et al.*, 1995; Lovenberg *et al.*, 1995; Vaughan *et al.*, 1995; Donaldson *et al.*, 1996; Liaw *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 1996).

O segundo tipo de receptor, CRF₂, é encontrado em pelo menos três subtipos em humanos e ratos: CRF_{2α}, CRF_{2β} e CRF_{2γ}, um dos quais, CRF_{2α}, é encontrado primariamente no sistema nervoso central (Lovenberg *et al.*, 1995; Kostich *et al.*, 1998). Os subtipos CRF_{2α} e CRF_{2β} são proteínas de 411 e 431 amino-ácidos respectivamente. Os subtipos diferem na região N-terminal e são 70% homólogos ao CRF₁. O CRF_{2α} foi encontrado restrito à discretas regiões do cérebro, incluindo hipotálamo (núcleos ventromedial, paraventricular e supra-óptico), núcleo septal lateral, hipocampo, mas não na hipófise (Chalmers *et al.*, 1995; Lovenberg *et al.*, 1995), enquanto que o CRF_{2β} foi principalmente encontrado nos órgãos periféricos como no coração, pulmão, e músculo esquelético e no plexo coróide do cérebro (Chalmers *et al.*, 1995; Kishimoto *et al.*, 1995; Perrin *et al.*, 1995). Em contraste ao CRF₁, ambos os subtipos do CRF2 foram considerados altamente seletivos para Svg, Uro I e Ucn-I (Kishimoto *et al.*, 1995; Lovenberg *et al.*, 1995; Vaughan *et al.*, 1995; Donaldson *et al.*, 1996; Liaw *et al.*, 1996). Levando-se em conta que, segundo os relatos, as projeções Ucn-I-ir

encontram-se em regiões cerebrais que coincidem com a expressão do CRF₂, tem sido postulado que a Ucn-I seja o ligante natural para o CRF₂, enquanto que o CRF parece ser o ligante natural para o CRF₁ (Vaughan *et al.*, 1995; Donaldson *et al.*, 1996).

Muitas observações, incluindo a falta de projeções de Ucn-I-ir com alvos que expressam CRF₂, suportam a existência de peptídeos adicionais semelhantes ao CRF no cérebro de mamífero.

A farmacologia do CRF torna-se mais complexa pela existência de uma proteína CRF-ligante que reconhece (e neutraliza) o CRF e a Ucn-I, embora isto não ocorra com a Urocortina II e III (Behan *et al.*, 1995; Seasholtz *et al.*, 2001; Eckart *et al.*, 2002).

Os efeitos dos peptídeos da família CRF sobre os estados psíquicos têm sido objeto de vários estudos. Experimentos com animais submetidos a várias condições estressantes (restrição aos movimentos, exposição aguda ao éter, estímulos sonoros agudos, eletrochoque, estresse social, uso de labirinto e outros), assim como animais deficientes de receptores CRF, têm ajudado a elucidar certas condições patológicas, relacionando o CRF ao equilíbrio endócrino e autônomo do organismo (Alexander *et al.*, 1988; Neylan, 1998; Turnbull *et al.*, 1999).

Embora as funções do CRF sejam relativamente bem conhecidas primordialmente associadas às respostas ao estresse, ao sistema endócrino e ao sistema nervoso autônomo entre outras, o papel da Ucn-I ainda necessita de mais estudos. A administração central da Ucn-I tem mostrado induzir uma variedade de efeitos, incluindo a supressão da alimentação (Spina *et al.*, 1996) e modulação da motilidade gástrica (Kihara *et al.*, 2001). Uma injeção ICV (intracerebroventricular) de Ucn-I pode induzir efeitos sobre a locomoção e a ansiedade (Moreau *et al.*, 1997; Slawecki *et al.*, 1999), sugerindo que, similarmente ao CRF, a Ucn-I seja um agente ansiogênico no cérebro. Contudo, como a Ucn-I pode ligar-se e ativar ambos os

tipos de receptores CRF, a administração da Ucn-I pode ativar receptores não seletivos em áreas onde a Ucn-I endógena possa não existir.

Uma das condições patológicas mais associadas aos peptídeos da família CRF é o estado de ansiedade. A Ucn-I também tem sido associada à esta condição. Moreau *et al.* (1997) mostrou que ratos injetados intracerebroventricularmente com Ucn-I apresentaram comportamento semelhante ao estado de ansiedade 30 minutos após a injeção, no labirinto elevado. Sajdyk *et al.* (2000), demonstrou que a Ucn-I administrada diretamente no núcleo basolateral da amígdala de rato Wistar, pode também provocar comportamento semelhante ao estado de ansiedade no teste de interação social. Além disso, injeções repetidas de uma dose subliminar da Ucn-I dada diariamente por três dias consecutivos, leva a um pré-estado (“priming”) da ansiedade, até que no terceiro dia de administração a Ucn-I provoca comportamento semelhante ao estado de ansiedade. O desenvolvimento deste comportamento “priming” é similar à sintomatologia vista em pacientes na desordem do pânico, um subtipo de ansiedade, em que ocorre aumento da sensibilidade ao lactato de sódio, que pode ser usado como modelo de experimentos de ansiedade. Recentes experimentos revelaram que a Ucn-I em ratos em pré-ansiedade (“primed”) quando comparado aos ratos desprovidos do estado de pré-ansiedade (“sham-primed”), desenvolveram uma sensibilidade a infusões de lactato de sódio (Reiman *et al.*, 1984; Liebowitz *et al.*, 1986; Reiman *et al.*, 1989). Outro efeito provocado pelo aumento da concentração de Ucn-I nos animais submetidos aos testes de concentração do peptídeo, são os efeitos de anorexia ou de supressão do apetite. Spina *et al.* (1996) relataram que, 10 nanogramas de injeção ICV de Ucn-I, foram efetivas em diminuir a ingestão de comida em ratos privados de alimentação e em ratos com alimentação livre. Como a Ucn-I liga-se com maior afinidade ao receptor CRF₂, é mais potente que o CRF em suprimir o apetite, mas é menos potente que o CRF em produzir os efeitos de ativação comportamental e ansiogênicos. Benoit *et al.*, (2000) relataram que a administração de 1.0 µg de Ucn-I no

terceiro ventrículo provocou uma redução na alimentação em ratos Long-Evans. Neste estudo, comparou-se os efeitos aversivos no teste de aversão condicionado entre o CRF e a Ucn-I, concluindo-se que apenas o CRF provoca estes efeitos e não a Ucn-I. Segundo Hope *et al.* (2000), a administração periférica de Ucn-I em mamíferos *Sminthopsis crassicaudata* (marsupiais), diminuiu a ingestão de comida de forma mais potente que o CRF, através dos receptores CRF₂, já que no estudo foi utilizado um antagonista aos receptores CRF₁.

Conforme descrito até agora, através dos peptídeos da família CRF, os núcleos PVH e EW estão entre as importantes estruturas relacionadas às respostas ao estresse (Kozicz *et al.*, 1998).

Uma importante região amplamente discutida por sua relação com as funções comportamentais e emocionais do organismo é a amígdala (AMI). Já foi citado anteriormente que na AMI encontram-se neurônios CRF e que esta também possui receptores CRF pós-sinápticos. A AMI possui uma citoarquitetura complexa, dividida em vários núcleos. Suas funções comportamentais e regulatórias incluem: emoção, memória, comportamento social como reprodução e agressão, e modulação dos sistemas autônomo e neuroendócrino. Experimentos de natureza heterogênea têm mostrado o papel da AMI através de estudos comportamentais, farmacológicos e psicológicos (Pitkanen *et al.*, 2000; Swanson, 2003).

Das áreas e neuropeptídeos acima mencionados e relacionados à resposta ao estresse, autores como ¹Skelton *et al.* (2000), estudaram os efeitos do uso do fármaco ansiolítico alprazolam sobre as áreas CRF-érgicas e Ucn-I-érgicas.

Os benzodiazepínicos, uma classe de drogas que potencializa o fluxo de Cl⁻ mediado pelo GABA, têm sido usados clinicamente como ansiolíticos desde 1960, e produzem muitos efeitos opostos àqueles após a administração central do CRF. Estas drogas têm demonstrado uma ação supressora sobre o eixo hipotálamo-hipófise-supra-renal (Krulik & Cerny, 1971; Kalogeras *et al.*, 1990; Rorher *et al.*, 1994; Cowley *et al.*, 1995), por atenuar a ativação do

CRF neuronal estresse-induzido (*c-fos*), assim como o aumento subsequente na produção do CRF (m-RNA) e sua liberação (Imaki *et al.*, 1995; Pich *et al.*, 1995), e bloquear ou diminuir os efeitos ansiogênicos do CRF, mensurados comportamentalmente (Britton *et al.*, 1985; Swerdlow *et al.*, 1986; Dunn & File, 1987). Conforme relato de ¹Skelton *et al.* (2000), este fármaco parece produzir efeitos opostos comparando-se o CRF e a Ucn-I, diminuindo a expressão do mRNA do CRF e aumentando a expressão do mRNA da Ucn-I.

Os neurônios respondem a estímulos extracelulares através da expressão de certos genes de resposta imediata. A transcrição da proteína Fos a partir do gene *c-fos*, está entre as primeiras proteínas a aparecerem. O rápido acúmulo desta proteína, combinado com métodos imunoistoquímicos, pode oferecer a possibilidade de detecção do nível de atividade celular (Chaudhuri, 1997). Sendo assim, o estudo da imunorreatividade da proteína Fos tem sido utilizado como um marcador da atividade neuronal (Bullitt, 1990), inclusive na análise de grupos neuronais específicos em resposta aos estímulos de estresse (Titze-de-Almeida *et al.*, 1994).

O estudo do estresse envolve, além dos peptídeos da família CRF (CRF e Ucn-I) e os principais núcleos a eles relacionados, outras estruturas encefálicas que participam dos mecanismos corporais relacionados a este estado corporal. Para a análise da resposta dos neurônios CRFérgicos no PVH e Ucn-I-érgicos no EW e de outras áreas encefálicas relacionadas ao estresse através da expressão da proteína Fos, os animais foram submetidos aos modelos laboratoriais de estresse de restrição, de perfil psicológico (Ceccatelli *et al.*, 1989) e de eletrochoque, de perfil físico (Turnbull *et al.*, 1999). Para a análise dos efeitos do fármaco benzodiazepínico alprazolam sobre estas respostas, estes modelos de estresse foram também associados ao uso deste fármaco (¹Skelton *et al.*, 2000).

2. PROPOSIÇÃO

Analisar, através do método de imunistoquímica, a presença da proteína Fos no encéfalo de ratos submetidos aos modelos laboratoriais de estresse agudo de restrição ou eletrochoque, submetidos ou não ao uso do fármaco alprazolam, e através do método de hibridização *in situ*, a expressão do mRNA do CRF e Ucn-I nas áreas encefálicas a eles relacionadas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Para estimularmos as áreas que respondem ao estresse em ratos, utilizamos duas metodologias: exposição ao estresse através do método laboratorial de restrição, de perfil psicológico (Ceccatelli *et al.*, 1989), que vem sendo amplamente utilizado pela comunidade científica, e através de eletrochoque, de perfil físico (Turnbull *et al.*, 1999), fazendo uso de doses agudas de alprazolam, segundo relato de ¹Skelton *et al.*, (2000).

3.1 Grupos

Os animais tiveram acesso à ração e água *ad libitum*, permaneceram em ambiente com temperatura controlada entre $21 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e com ciclo de claro/escuro mantido de 12/ 12 horas (luzes são apagadas às 18:00 hs), no Biotério do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética do Instituto de Ciências Biomédicas da USP sob o número de protocolo 091 – Comissão de Ética em Experimentação Animal – ICB - USP.

Foram utilizados 25 ratos machos Sprague-Dawley, com aproximadamente 60 dias de vida, e peso médio de 240 a 310 gramas, distribuídos da seguinte forma:

- a) 5 animais foram submetidos ao estresse por restrição
- b) 5 animais foram submetidos ao estresse através de eletrochoque
- c) 5 animais, juntamente com o estresse através de restrição, receberam 1 dose aguda de alprazolam de 10 mg/kg [protocolo estabelecido a partir do relato de ¹Skelton *et al.*, (2000)]
- d) 5 animais, juntamente com o estresse através de eletrochoque, receberam 1 dose aguda de alprazolam de 10 mg/kg [protocolo estabelecido a partir do relato de ¹Skelton *et al.*, (2000)]

- e) 5 animais não foram submetidos aos modelos laboratoriais de estresse e ao alprazolam, formando o grupo controle

Séries dos cortes dos encéfalos dos animais acima mencionados, foram submetidas à imunoistoquímica para a proteína Fos, para análise das áreas encefálicas relacionadas a estes tipos de estímulos estressantes, assim como outras séries foram submetidas ao método de hibridização *in situ* para análise das áreas encefálicas relacionadas ao CRF e à Ucn-I.

3.2 Modelos Laboratoriais de Estresse

- a) animais submetidos ao estresse agudo por restrição: foram imobilizados em tubos plásticos de PVC transparente, com uma das extremidades obstruída por uma placa de PVC perfurada, lado este que ficou a cabeça do animal para permitir sua respiração normal, e outra extremidade com uma placa removível, que foi usada para colocação e retirada do animal; o tubo apresenta as seguintes dimensões: 210mm comprimento x 55 mm de diâmetro interno; os animais foram mantidos confinados no interior do tubo por 1 hora em uma única vez, para o estresse agudo (Ceccatelli *et al.*, 1989);
- b) animais submetidos ao estresse agudo por eletrochoque: foram colocados individualmente em uma gaiola com aproximadamente 30cm x 20cm de largura e aproximadamente 40 cm de altura; as paredes laterais ou verticais da gaiola eram de PVC branco fosco, sem acesso visual externo para o animal; a base era composta por uma grade de barras metálicas paralelas, aproximadamente com 0,5 cm de distância entre cada uma, onde passou a corrente elétrica; esta base metálica manteve-se ligada através de fios condutores, a uma fonte de energia, com a presença de controladores de amperagem e de tempo de descarga (esta gaiola foi gentilmente cedida pelo Prof. Gilberto F. Xavier do Instituto de Biociências-USP); assim, cada animal permaneceu por 30 minutos na gaiola,

submetido a uma corrente de 1mA a cada 30 s e duração de 1s por vez; esta miliamperagem, segundo relato de Turnbull *et al.* (1999), é suficiente para promover um estímulo de estresse sem causar dano físico nas patas do animal;

- c) animais submetidos ao estresse agudo por restrição e ao fármaco alprazolam: além do estímulo de restrição, os animais foram submetidos a uma dose aguda de alprazolam através de injeção subcutânea do fármaco na dose de 10mg/kg em cada animal, 20 minutos antes do início do estímulo de restrição, período que segundo o fabricante alcança o pico de sua ação; esta foi a dose máxima utilizada por ¹Skelton *et al.* (2000), sem prejuízo ao animal, mas com interferência sobre as áreas relacionadas ao CRF e à Ucn-I;
- d) animais submetidos ao estresse agudo por eletrochoque e ao fármaco alprazolam: além do estímulo de eletrochoque, os animais foram submetidos a uma dose aguda de alprazolam através de injeção subcutânea do fármaco na dose de 10mg/kg em cada animal, 20 minutos antes do início do estímulo de eletrochoque, período que segundo o fabricante alcança o pico de sua ação; esta foi a dose máxima utilizada por ¹Skelton *et al.* (2000), sem prejuízo ao animal, mas com interferência sobre as áreas relacionadas ao CRF e à Ucn-I;
- e) os animais do grupo controle não foram submetidos aos modelos laboratoriais de estresse, sendo que o seu período de manutenção em laboratório antes do sacrifício acompanhou em média o tempo decorrido para os animais dos grupos acima;

Os animais dos cinco grupos foram perfundidos e sacrificados para remoção dos encéfalos e posterior processamento imunoistoquímico. Os animais dos grupos a, b, c e d foram sacrificados 2 horas após o término do estímulo correspondente, levando-se em conta o tempo para imunorreatividade da proteína Fos. Os animais do grupo e foram sacrificados no

início do experimento para não sofrerem qualquer influência estressante por parte dos outros animais estressados.

3.3 Anestesia

Os animais foram anestesiados através de injeção intraperitoneal de uma dose de 1mL de hidrato de cloral a 35%, para se atingir um estado profundo de anestesia antes da perfusão.

3.4 Perfusão

Para a realização da perfusão, foi criado um acesso na região do processo xifóide do animal, com tesoura. O processo xifóide foi cortado, o diafragma separado, e foi rebatido o plastrão torácico. A seguir o pulmão foi afastado para se clipar a aorta torácica. A partir de então, o ápice do coração foi perfurado (VE), inserindo-se uma cânula de perfusão com solução salina a 0,9%. O átrio direito foi também perfurado, e então se iniciou a perfusão com a solução salina até que não houvesse mais sangue aparente no sistema vascular do animal (cerca de 100 ml em 1 minuto). A seguir fez-se a perfusão com fixador de formaldeído a 4% em solução aquosa (a partir de paraformaldeído aquecido a 60-65⁰C), pH 9,5 a 4°C (cerca de 750-900 ml) por 25 minutos, através de bomba.

Depois de cortada a cabeça do animal ao nível da medula espinal cervical, os encéfalos foram retirados da caixa craniana e pós-fixados durante 1 hora em 50mL do fixador à temperatura de 4°C. Após este período, eles foram colocados em solução tampão fosfato de potássio – KPBS - em salina 0,9% (pH 7,4), com 20% de sacarose para crioproteção, durante aproximadamente 18 horas.

3.5 Microtomia

Os encéfalos, após o emblocamento, foram seccionados em cortes frontais de 30µm com um micrótomo de congelamento, de forma a produzir 5 séries de cada encéfalo em 5 compartimentos diferentes, colocados em solução de anti-congelante (sacarose diluída em uma solução de PBS + etilenoglicol + água). O tecido foi então guardado em solução de anti-congelante em *freezer* a -20°C até serem usados.

3.6 Imunoistoquímica para Proteína Fos

As séries de secções do encéfalo foram submetidas à imunoistoquímica para proteína Fos.

As secções foram retiradas da solução anti-congelante e lavadas por 2 vezes de 10 minutos cada, em solução salina tamponada com potássio-fosfato (KPBS) à temperatura ambiente, sob agitação constante (agitador orbital ajustável, Fischer Scientific, USA, a 70 rotações por minuto).

Para a neutralização da peroxidase endógena, as secções foram lavadas por 30 minutos sob agitação em uma solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 0,3% em KPBS+Triton X-100 e então foram lavadas por pelo menos 5 vezes de 10 minutos em KPBS.

A seguir, as secções foram pré-incubadas por 60 minutos em uma solução composta por soro normal de cabra (2,0%, Jackson ImmunoResearch Laboratories) e Triton X-100 (0,3%, Sigma) diluídos em KPBS. As secções permaneceram nesta solução sob agitação constante no agitador orbital em temperatura ambiente, com o intuito de melhorar a penetração do anticorpo no tecido e bloquear ligações inespecíficas.

Após isso, as séries foram encubadas em anticorpo primário (anti-Fos - Oncogene) policlonal feito em coelho, diluído em KPBS+Triton X-100, contendo albumina de soro bovino (BSA, 1%, Sigma) em uma concentração de 1:20.000.

As secções mergulhadas na solução do anticorpo primário, ficaram sob agitação constante no agitador orbital, colocado na geladeira (4°C), durante 48 horas. A seguir, as secções foram retiradas da solução do anticorpo primário, e lavadas por 2 vezes de 10 minutos em solução de KPBS à temperatura ambiente e sob agitação constante.

A detecção do anticorpo primário foi obtida pelo método da imunoperoxidase indireta usando a técnica do complexo avidina-biotina (ABC) (Hsu & Raine, 1981). As secções foram colocadas em solução de anticorpo secundário biotinilado (imunoglobulinas G conjugadas à biotina) anti-coelho feito em cabra (Vector, EUA) a uma concentração de 1:1000, diluído em KPBS+Triton X-100. As secções mergulhadas na solução do anticorpo secundário ficaram sob agitação constante no agitador orbital à temperatura ambiente por 60 minutos. A seguir, as secções foram retiradas desta solução e lavadas por 2 vezes de 10 minutos em KPBS à temperatura ambiente, sob agitação constante.

Finalmente as secções foram mergulhadas em uma solução de avidina e em uma solução de biotina peroxidase (Vector, EUA), alternadamente, diluídas em KPBS a uma concentração de 1:500 por 30 minutos. As secções mergulhadas nessa solução ficaram sob agitação constante, à temperatura ambiente por 60 minutos. Após isso, foram lavadas por 2 vezes de 10 minutos em KPBS à temperatura ambiente, ainda sob agitação constante.

A reação imunoistoquímica foi revelada utilizando-se a 3,3'diaminobenzidina tetrahydroclorato (DAB 0,05%, Sigma) e o níquel como cromógenos, e H₂O₂ (0,01%, Sigma) durante 10 minutos.

3.7 Coloração pelo Método de Nissl

Para a coloração dos cortes montados em lâminas histológicas, foi utilizado o método de Nissl usando o corante Tionina 0,25%, para evidenciar a citoarquitetura do tecido nervoso e a identificação de núcleos e/ou tratos para ser usado como referência.

Em seguida os cortes montados nas lâminas e já corados, foram cobertos por lamínulas histológicas usando-se o meio de montagem DPX.

Os resultados foram analisados em microscópio Leica DMR.

3.8 Hibridização *in situ* (ISH)

3.8.1 Transcrição da Sonda marcada com ^{35}S

Tanto para o mRNA do CRF quanto da Ucn-I, foram colocados em tubos livres de RNases (eppendorf) os seguintes elementos: 4 μL de tampão de transcrição 5x (Promega), 2 μL de DTT 100 mM, 0,6 μL de RNAsin (Promega), 5,5 μL de ΔNTP (Promega), 1 μL de cDNA linearizado (gentilmente cedido pelos Drs. W. Vale e J. Vaughan), 2,5 μL de $\text{UTP-}^{35}\text{S}$ (Amershan) e 2 μL de RNA polimerase (Promega), sendo SP6 para mRNA do CRF e T7 para mRNA da Ucn-1, que foram encubados da seguinte forma: para CRF por 1 hora, para Ucn-I por 30 minutos.

Para clivar o cDNA foram acrescentados à solução 1 μL de RQ1-DNase (Promega) e mais 1 μL de RNAsin (Promega), sendo a solução mantida a 37 °C durante 15 minutos. Em seguida, a sonda foi purificada utilizando-se uma micro-coluna (ProbeQuant G-50 Micro Columns-Amershan), e a incorporação do radioisótopo foi medida com o auxílio de um Cintilador (Tri-Carb 2100 TR-Liquid Scintillation Analyser), de contagem de ondas β .

3.8.2 Pré-Tratamento do Tecido

Uma série de secções dos encéfalos dos animais de cada grupo foram montadas em lâminas polarizadas (Fisher/ Plus) e deixadas para secar ao ar livre, sendo estocadas durante uma noite a -20 °C.

Foram então lavadas em solução de formaldeído (Synth) a 4% em PBS durante 5 minutos e lavadas duas vezes em PBS por 10 minutos. Em seguida, foram encubadas em solução composta de proteinase K (0,5 µg/mL – Life Technologies), EDTA (0,05 – pH 8,0 – Sigma), Tris HCl (0,1 M – pH 8,0 – Amresco), a 37 °C durante 30 minutos, e enxaguadas em água tratada previamente com dietilpirocarbonato.

Iniciou-se, então, a acetilação onde o tecido foi lavado em TEA-HCl (Avocado-Research) durante 10 minutos e acetilado em solução composta por anidrido acético 2,5 µL/mL de TEA-HCl durante mais 10 minutos. As lâminas foram então lavadas em 2X SSC (Invitrogen), desidratadas em álcool (Synth) 70% durante 1 minuto, 80% durante 1 minuto, 95% durante 2 minutos, 100% durante 1 minuto, e durante 5 minutos em xilol. A seguir foram submetidas ao álcool 100% durante 1 minuto e ao álcool 95% por mais 1 minuto, sendo deixadas para secar ao ar livre.

3.8.3 Hibridização

A preparação da ribossonda foi feita aquecendo-se 2x Ribo HB a 10^6 cpm/mL de riboprobe ^{35}S em 50%, formamida 50% e tiosulfato-sódio 1% (Synth) e 15 µL de DTT 5M 2%. A solução foi então aquecida a 90 °C durante 5 minutos e resfriada no gelo durante mais 5 minutos.

A seguir, foi aplicado nas lâminas dos tecidos pré-tratados, 120 µL da solução contendo a riboprobe ^{35}S . As lâminas foram cobertas com lamínulas (22x60 mm- Hybrislip-Sigma) e encubadas durante aproximadamente 18 horas sobre papel umidificado com 2X SSC a 57 °C.

3.8.4 Pós-Hibridização

No dia seguinte, as lamínulas foram removidas em solução de 2X SSC e as lâminas foram encubadas em RNase A (20 µg/mL RNase Buffer – USB) durante 30 minutos à temperatura ambiente. A seguir foram lavadas durante 30 minutos em RNase Buffer (NaCl 10% 5M; Tris 4% HCl 1M pH 8,0; 0,2% EDTA 0,5M pH 8,0, em água estéril), e durante 10 minutos em 2X SSC.

As lâminas foram colocadas em nova solução de 2X SSC por uma hora a 50 °C, lavadas em solução de 0,2X SSC e, por uma hora, em solução de 0,2X SSC a 55 °C. Foram lavadas novamente em solução de 0,2X SSC por mais uma hora.

Os cortes foram então desidratados em bateria de álcool de graduação ascendente e deixados para secar ao ar livre. Após isso, foram colocadas em um cassete (X-Ray Intensifying Screens-Hight Plus, Optex) com filme auto-radiográfico (Biomax MR Film 20,3x25,4 cm, Kodak) durante 2 dias.

3.8.5 Revelação do Filme e das Lâminas

O filme auto-radiográfico foi revelado sendo colocado por 2 minutos em solução reveladora, enxaguado e colocado em solução fixadora durante 2 minutos.

As lâminas foram postas em emulsão fotográfica (Kodak) e deixadas em ambiente escuro durante duas semanas. Após isso, foram reveladas à semelhança do filme autoradiográfico, desidratadas e cobertas com lamínulas com o meio de montagem DPX. Os resultados foram analisados em microscópio Leica DMR.

3.8.6 Coloração pelo Método de Nissl

Para a coloração dos cortes montados em lâminas histológicas, foi utilizado o método de Nissl usando o corante Tionina 0,25%, para ser usado como contracoloração da hibridização.

Em seguida os cortes montados nas lâminas e já corados, foram cobertos por lamínulas histológicas usando-se o meio de montagem DPX.

Os resultados foram analisados em microscópio Leica DMR.

4. RESULTADOS

A partir da análise do material oriundo dos animais dos grupos citados, processado de acordo com as técnicas descritas, tem-se o resultado da imunorreatividade da proteína Fos em áreas encefálicas específicas, sendo selecionadas aquelas que, através de literatura científica atual, mais se relacionam às respostas ao estresse. Também foi analisada a expressão do mRNA do CRF e da Ucn-I em áreas específicas relacionadas a estes peptídeos, através de sonda marcada com material radioativo no método de hibridização *in situ*.

4.1 Imunorreatividade da Proteína Fos (figuras 1 a 11)

A imunorreatividade da proteína Fos evidenciada pelo método de imunoistoquímica, foi analisada nas diversas regiões do encéfalo do animal relacionadas aos estados de estresse, mostrando uma expressão diferenciada para cada região. Desta forma, foi usado na descrição dos resultados a seguinte codificação de caráter comparativo para uma análise qualitativa, conforme figura 1:

- = não houve imunorreatividade significativa
- X = pequena imunorreatividade
- XX = média imunorreatividade
- XXX = grande imunorreatividade

Esses resultados comparativos estão agrupados na tabela abaixo, sendo a seguir descritos e comentados dentro dos Resultados (figuras 2 a 11).

ÁREA	animal controle	animal restrição	animal restrição/ alprazolam	animal choque	animal choque/ alprazolam
N. Paraventricular do Hipotálamo- PVH (figura 2)	-	xxx	x	xx	x
N. Edinger-Westphal- EW (figura 3)	-	xx	xxx	x	xx
Amígdala					
central- AMIce (figura 4)	-	x	xx	-	xx
medial- AMIme (figura 5)	-	xxx	xx	xxx	xx
N. Septal Lateral (parte ventral)- LSV (figura 6)	-	xx	xxx	x	x
N. Intersticial da Estria Terminal-BNSTpr (parte principal) (figura 7)	-	x	-	-	-
Substância Cinzenta Periaquedutal					
dorsomedial- PAGdm (figura 8)	-	xx	xx	xx	xx
dorsolateral- PAG dl (figura 9)	-	xx	xx	xxx	xxx
lateral- PAGlat (figura 10)	-	x	x	x	x
Córtex do Cíngulo- CC (figura 11)	-	xx	x	x	-

Conforme listado anteriormente, a imunorreatividade da proteína Fos foi identificada em diversas regiões encefálicas relacionadas ao comportamento e estresse. Como já relatado, a expressão desta proteína avaliada por sua imunorreatividade representa uma ativação neuronal destas áreas. Esta imunorreatividade mostrou variações quanto aos grupos de animais e seus modelos de estresse dentro de uma mesma área a ser considerada. No grupo controle não houve imunorreatividade significativa para qualquer área a ser considerada.

O PVH (figura 2), cuja parte parvocelular libera o CRF e ativa o eixo HPA, mostrou grande ou considerável imunorreatividade da proteína Fos no grupo restrição, média imunorreatividade no grupo choque e pequena imunorreatividade nos grupos submetidos ao fármaco alprazolam (restrição/alprazolam e choque/alprazolam). O grupo controle não mostrou imunorreatividade significativa.

No EW (figura 3), maior representante da localização de Ucn-I, a imunorreatividade da proteína Fos mostrou-se da seguinte forma: grande para o grupo restrição/alprazolam, média para os grupos restrição e choque/alprazolam, e pequena expressão para o grupo choque, com imunorreatividade não significativa para o grupo controle.

A imunorreatividade da proteína Fos na AMI, um centro processador fundamental da emoção e suas expressões, bem como olfação e funções viscerais, em algumas de suas divisões (conforme será visto adiante), mostrou diferenças entre os grupos de animais. Na AMIce (figura 4), houve média imunorreatividade da proteína Fos nos animais dos grupos submetidos ao fármaco alprazolam (restrição/alprazolam e choque/alprazolam), sendo que nos animais do grupo restrição houve pequena imunorreatividade e nos grupos controle e choque não houve imunorreatividade significativa. Na AMIme (figura 5), os grupos restrição e choque apresentaram grande imunorreatividade, sendo que nos grupos submetidos ao alprazolam (restrição/alprazolam e choque/alprazolam) houve média imunorreatividade e, sem imunorreatividade significativa no grupo controle.

No LSV, núcleo este relacionado às respostas do sistema nervoso autônomo às variações emocionais (conforme será visto adiante), (figura 6), também mostrou variações na imunorreatividade da proteína Fos entre os grupos. O grupo restrição/alprazolam com grande imunorreatividade, o grupo restrição com média imunorreatividade, e os grupos submetidos ao fármaco (restrição/alprazolam e choque/alprazolam) com pequena imunorreatividade, com grupo controle com imunorreatividade não significativa.

O BNSTpr, relacionado ao comportamento quimio-investigatório e sexual (visto adiante), (figura 7), mostrou imunorreatividade da proteína Fos apenas no grupo restrição, com pequena imunorreatividade, sendo que nos demais grupos não houve imunorreatividade significativa.

A PAG está relacionada à via da dor e na expressão de respostas defensivas (visto adiante). É dividida nas partes: dorsomedial, dorsolateral e lateral. Na PAGdm (figura 8), a imunorreatividade da proteína Fos mostrou-se média nos animais que receberam alprazolam (restrição/alprazolam e choque/alprazolam) e pequena nos animais restrição e choque, com o grupo controle sem imunorreatividade significativa. Na PAGdl (figura 9), foi observado uma imunorreatividade grande nos grupos choque e choque/alprazolam e média nos grupos restrição e restrição/alprazolam, sem imunorreatividade significativa no grupo controle. Na PAGlat (figura 10), três grupos mostraram pequena imunorreatividade, sendo restrição/alprazolam, choque e choque alprazolam, e o grupo restrição mostrou média imunorreatividade, sem resultado significativo no grupo controle.

O CC (figura 11), relacionado ao comportamento e respostas autônomas ao estresse, mostrou a seguinte resposta através da imunorreatividade da proteína Fos: grupo restrição com média imunorreatividade e grupo restrição/alprazolam com pequena imunorreatividade, grupo choque com pequena imunorreatividade e grupo choque/alprazolam sem imunorreatividade significativa, assim como o grupo controle.

Figura 1. Imagens de referência para a imunorreatividade da proteína Fos.

- A= alta densidade da imunorreatividade (xxx)**
- B= média densidade da imunorreatividade (xx)**
- C= baixa densidade da imunorreatividade (x)**
- D= imunorreatividade não significativa (-)**

Figura 2. Imunorreatividade da proteína Fos no PVH. Fotomicrografia de campo claro de cortes do hipotálamo corados pelo método de Nissl e pelo método de imunoperoxidase para a proteína Fos evidenciando o PVH. A, animal controle; B, animal restrição; C, animal restrição/alprazolam; D, animal choque; E, animal choque/alprazolam. Referências: *, subdivisão magnocelular do PVH; 3V, III ventrículo.

Aumento original de 200x.

Figura 3. Imunorreatividade da proteína Fos no EW. Fotomicrografia de campo claro de cortes do EW corados pelo método de Nissl e pelo método de imunoperoxidase para a proteína Fos. A, animal controle; B, animal restrição; C, animal restrição/alprazolam; D, animal choque; E, animal choque/alprazolam. Referência: *, núcleo oculomotor. Aumento original de 200x.

Figura 4. Imunorreatividade da proteína Fos no AMIce. Fotomicrografia de campo claro de cortes do AMIce corados pelo método de Nissl, e pelo método de imunoperoxidase para a proteína Fos. A, animal controle; B, animal restrição; C, animal restrição/alprazolam; D, animal choque; E, animal choque/alprazolam. Aumento original de 200x.

Figura 5. Imunorreatividade da proteína Fos no AMIme. Fotomicrografia de campo claro de cortes do AMIme corados pelo método de Nissl, e pelo método da imunoperoxidase para a proteína Fos. A, animal controle; B, animal restrição; C, animal restrição/alprazolam; D, animal choque; E, animal choque/alprazolam. Referência: *, trato óptico. Aumento original de 200x.

Figura 6. Imunorreatividade da proteína Fos no LSV. Fotomicrografia de campo claro de cortes do septo lateral evidenciando a parte ventral corados pelo método de Nissl, e pelo método de imunoperoxidase para a proteína Fos. A, animal controle; B, animal restrição; C, animal restrição/alprazolam; D, animal choque; E, animal choque/alprazolam. Referência: *, ventrículo lateral.

Figura 7. Imunorreatividade da proteína Fos no BNST. Fotomicrografia de campo claro de cortes do BNST corados pelo método de Nissl e pelo método de imunoperoxidase para a proteína Fos evidenciando sua parte principal . A, animal controle; B, animal restrição; C, animal restrição/alprazolam; D, animal choque; E, animal choque/alprazolam. Referência: *, ventrículo lateral. Aumento original de 200x.

Figura 8. Imunorreatividade da proteína Fos na PAGdm. Fotomicrografia de campo claro de cortes da PAG corados pelo método de Nissl pelo método de imunoperoxidase para a proteína Fos evidenciando sua parte dorsomedial. A, animal controle; B, animal restrição; C, animal restrição/alprazolam; D, animal choque; E, animal choque/alprazolam. Referência: *, aqueduto cerebral. Aumento original de 200x.

Figura 9. Imunorreatividade da proteína Fos na PAGdl. Fotomicrografia de campo claro de cortes da PAG corados pelo método de Nissl e pelo método de imunoperoxidase para a proteína Fos evidenciando sua parte dorsolateral. A, animal controle; B, animal restrição; C, animal restrição/alprazolam; D, animal choque; E, animal choque/alprazolam. Referência: *, aqueduto cerebral. Aumento original de 200x.

Figura 10. Imunorreatividade da proteína Fos na PAGlat. Fotomicrografia de campo claro de cortes da PAG corados pelo método de Nissl e pelo método de imunoperoxidase para a proteína Fos evidenciando sua parte lateral. A, animal controle; B, animal restrição; C, animal restrição/alprazolam; D, animal choque; E, animal choque/alprazolam. Referência: *, aqueduto cerebral. Aumento original de 200x.

4.2 Expressão do mRNA do CRF e do mRNA da Ucn-I (figuras 12 e 13)

Valores de Densidade Óptica:

ÁREA	animais grupo controle	animais grupo restrição	animais grupo restrição/ alprazolam	animais grupo choque	animais grupo choque/ alprazolam
n. paraventricular do hipotálamo	1.396.881,85* 949.681,79 979.419,68 1.049.662,72 582.429,67 média= 991.615,14	1.244.266,53 1.464.307,24 1.263.204,91 1.521.855,33 1.030.998,51* média= 1.304.926,50	368.259,87* 988.209,18 1.008.958,99 1.224.585,40 1.263.256,48 média= 970.653,98	1.109.599,02 1.141.943,17 1.151.309,25 949.671,11 549.419,78* média= 962.388,47	1.358.799,52 1.073.054,51* 1.274.312,60 1.420.112,21 1.539.142,09 média= 1.333.084,19
n. de Edinger- Westphal	555.550,29 613.093,72 703.842,26 641.294,83 378.649,26 média= 578.486,07	817.027,46 800.061,66 654.593,23 963353,80 ** média= 808.759,04	1.306.560,99 1.083.874,01 816.883,06 584.210,05 ** média= 947.882,02	1.044.672,92 1.020.376,55 666.172,73 754.965,78 951.283,32 média= 887.494,26	758.305,22 782.470,91 846.365,40 869.528,21 825.532,15 média= 816.440,38

* valores retirados da análise estatística por se apresentarem com padrão desigual ao perfil do grupo

**animais não considerados por problemas técnicos de análise das lâminas de hibridização *in situ* correspondentes a estes;

Como pode ser observado na tabela acima, foi analisado, através do método de hibridização *in situ*, a expressão do mRNA tanto do CRF quanto da Ucn-I, no PVH (neurônios CRF-érgicos) e no EW (neurônios Ucn-I-érgicos). Desta forma, pôde-se analisar a resposta destes neuropeptídeos aos modelos de estresse utilizados, e a influência do fármaco alprazolam. As lâminas de hibridização foram fotografadas em campo escuro e após isso, foram coletados os valores de densidade óptica de cada foto, subtraindo-se os valores de “back-ground” de cada uma, para obtenção de um valor de densidade óptica real.

Conforme observado através dos valores de densidade óptica, os animais dos grupos restrição e choque/alprazolam tiveram uma resposta maior do CRF, sendo que os grupos restrição/alprazolam e mostraram uma resposta semelhante ao grupo controle (figura 12).

Com relação à Ucn-I, o grupo restrição/alprazolam mostrou maior expressão, seguido pelo grupo choque, este seguido pelo grupo choque/alprazolam e, com o menor nível de expressão, o grupo restrição. O grupo controle, que representa a referência da densidade óptica neste caso, mostrou uma densidade óptica bem inferior aos demais grupos (figura 13).

Pelo método estatístico de Análise de Variância com Um Fator seguido por Comparação Múltipla pelo Método de Tukey, tem-se os seguintes valores:

Núcleo Paraventricular do Hipotálamo (PVH)

diferenças de densidade óptica real estatisticamente significantes:

- Grupos Restrição e Controle = 483110,0 (maior expressão no grupo restrição)
- Grupos Choque/Alprazolam e Controle= 507793,0 (maior expressão no grupo
choque/alprazolam)
- Grupos Choque/Alprazolam e Choque= 332461,0 (maior expressão no grupo
choque/alprazolam)

Sob a análise estatística, tem-se o grupo choque/alprazolam com a maior expressão do mRNA do CRF, seguido pelo grupo restrição, em valores acima daquele observado para o grupo controle. Ainda houve variação estatisticamente considerável entre os grupos choque e choque/alprazolam, com menor expressão para o grupo choque, porém sem variação estatisticamente considerável entre os grupos restrição e restrição/alprazolam.

Núcleo de Edinger-Westphal

diferenças de densidade óptica real estatisticamente significantes (em log):

- Grupos Choque e Controle = 0,434058 (maior expressão no grupo choque)
- Grupos Restrição/Alprazolam e Controle= 0,470776 (maior expressão no grupo
restrição/alprazolam)

Sob a análise estatística, tem-se o grupo restrição/alprazolam com a maior expressão do mRNA da Ucn-I, seguido pelo grupo choque, em valores acima daquele observado para o grupo controle. Não houve variação estatisticamente considerável entre os grupos restrição e choque/alprazolam com o grupo controle, ou ainda na comparação entre os grupos experimentais.

Figura 12. Hibridização *in situ* para análise da expressão do mRNA do CRF no PVH. Fotomicrografia de campo escuro de cortes do hipotálamo expressando sonda marcada com ^{35}S CRF no PVH. A, animal controle; B, animal restrição; C, animal restrição/alprazolam; D, animal choque; E, animal choque/restrrição. Referência: 3V, III ventrículo. Aumento original de 100x.

Figura 13. Hibridização *in situ* para análise da expressão do mRNA da Ucn-I no EW. Fotomicrografia de campo escuro de cortes do EW expressando sonda marcada com ^{35}S Ucn-I. A, animal controle; B, animal restrição; C, animal restrição/alprazolam; D, animal choque; E, animal choque/restrrição. Referência: 3N, núcleo oculomotor; FLM, fascículo longitudinal medial. Aumento original de 100x.

5. DISCUSSÃO

De maneira geral, qualquer mudança significativa, real ou percebida pelo organismo, resulta em uma cascata neuroendócrina de eventos que provocam a secreção de glicocorticóides do córtex supra-renal. Estes eventos não específicos servem para mobilizar uma bem caracterizada variedade de respostas emergenciais ou estressantes, que envolvem um grande número de processos metabólicos e sistêmicos por parte do organismo. Isto se dá principalmente através de mecanismos comportamentais, autonômicos e neuroendócrinos (Sawchenko, 1991).

O foco de qualquer consideração das respostas adaptativas e estressantes é o hipotálamo. O núcleo paraventricular do hipotálamo (PVH) contém células neurosecretoras magnocelulares e parvocelulares, através das quais o cérebro controla a secreção dos lobos posterior e anterior da hipófise, respectivamente, e células que influenciam diretamente os neurônios pré-ganglionares do tronco encefálico e medula espinal (Sawchenko, 1991). Este papel do PVH na resposta ao estresse pôde ser comprovado em nossos resultados, onde o PVH respondeu de forma considerável aos estímulos de restrição e choque, com menor resposta da imunorreatividade da proteína Fos ao estímulo de choque em relação ao estímulo de restrição. Esta resposta mostrou-se relacionada aos seus neurônios CRF-érgicos (principal neuropeptídeo na resposta neuroendócrina ao estresse), já que a análise da presença do mRNA do CRF no PVH, mostrou o mesmo padrão que na expressão Fos, com menor resposta ao estímulo de choque quando comparado ao estímulo de restrição. Kovács & Sawchenko (1996) obtiveram a imunorreatividade da proteína Fos no PVH e a expressão do mRNA do CRF após o estímulo de estresse agudo de exposição de ratos ao éter, assim como Morin *et al.* (1999) também relataram a marcação do CRF no PVH em ratos tratados com colchicina, e Keenev *et al.* (2006) mostraram o aumento do mRNA do CRF no PVH de ratos submetidos a repetidas derrotas sociais (animais em condição de subordinação). Estes relatos, associados aos nossos resultados, comprovam a resposta do PVH através da liberação do CRF aos diversos

estímulos estressantes, mostrando uma resposta maior ao estímulo estressante de desconforto psicológico (restrição) do que o estímulo estressante de desconforto físico (choque).

O núcleo de Edinger-Westphal (EW) é uma compacta estrutura mesencefálica colinérgica, primariamente caracterizada por seu envolvimento na adaptação oculomotora e miose, sendo que em humanos corresponde ao núcleo oculomotor acessório e em ratos é um núcleo a parte deste (Warwick, 1954; Westphal, 1887; Klooster & Vrensen, 1998; Buttner-Ennever *et al.*, 2001). Entretanto, suas projeções são mais complexas do que sua associação apenas com funções oculomotoras (Loewy & Saper, 1978; Vaughan *et al.*, 1995; Bittencourt *et al.*, 1999). Portanto, o EW pode estar envolvido em outras funções, incluindo termoregulação, nocicepção, ansiogênese e comportamento alimentar (Innis & Aghajanian, 1986; Smith *et al.*, 1998; Weninger *et al.*, 1999; Weltemier & Ryabinin, 2005). Em nossos resultados, pôde-se observar a resposta do EW aos estímulos de estresse por nós empregados, com imunorreatividade da proteína Fos no grupo restrição maior que no grupo choque. Entretanto, o EW expressou o mRNA da Ucn-I no grupo choque de forma mais considerável em relação ao controle do que o grupo restrição. Esses resultados concordam com relatos de Gaszner *et al.* (2004) que mostraram a resposta da Ucn-I no EW após os estímulos estressantes de injeção de lipopolissacarídeo, exposição ao éter e restrição em ratos sem, no entanto, haver uma resposta após uma hemorragia hipotensiva e hiperosmótica. Bachtell *et al.*, (2004) também relacionaram o EW à resposta ao estresse, ao observar que, após lesão neste núcleo, ratos diminuíram sua preferência à ingestão de etanol. Kozicz *et al.* (2004), relataram que a Ucn-I e o CRF respondem ao estresse, mas são inversamente regulados em suas atividades em teste de hiperatividade crônica do eixo hipotálamo-hipófise-supra-renal, onde camundongos com hipersecreção de CRF mostraram resposta menor ou reduzida da Ucn-I, o que concorda com nossos resultados com relação à expressão do mRNA do CRF e Ucn-I, onde no grupo restrição houve um aumento da expressão do CRF no PVH e uma

diminuição da expressão da Ucn-I no EW, se comparado ao grupo choque, onde menor expressão do CRF no PVH levou a uma maior expressão da Ucn-I no EW. Porém, a partir da análise dos níveis de imunorreatividade da proteína Fos no PVH em comparação ao EW, no grupo restrição ambos tiveram um aumento da imunorreatividade com relação ao grupo choque. Do ponto de vista fisiológico e comportamental, ²Skelton *et al.* (2000) relataram que a administração central de Ucn-I provoca efeitos semelhantes aos do CRF. Porém, o mesmo trabalho relata que há uma convergência muito pequena na neuroanatomia do CRF e Ucn-I, sugerindo papéis funcionais diferentes no organismo. Com esta administração central de Ucn-I em ratos (1 µg), pôde-se notar: diminuição do apetite ou ingestão de comida, diminuição da ansiedade (interação social e entradas no labirinto elevado), aumento da atividade geral (alerta, postura, movimentos, vocalização), diminuição da função imunológica e diminuição da ingestão de água. Turnbull *et al.* (1999), avaliaram os níveis sanguíneos de ACTH em ratos após injeção intracerebroventricular (0.09-9.0 nmol/kg) de CRF e Ucn-I, sendo que a Ucn-I provocou uma maior secreção de ACTH que o CRF nas doses testadas. Em outro momento, os animais foram submetidos ao estímulo de eletrochoque (protocolo utilizado neste trabalho), e observou-se que, após a administração intra-venosa de antagonista ao CRF houve grande diminuição do ACTH após o estímulo, mas com a administração de antagonista à Ucn-I, não houve decréscimo dos níveis de ACTH, mostrando que o CRF é o grande regulador da secreção hipofisal de ACTH em condições de estresse. Estes dados concordam com nossos resultados, já que sob o mesmo estímulo de eletrochoque do trabalho citado, obtivemos uma maior imunorreatividade da proteína Fos no PVH do que no EW tanto quanto para o estímulo de restrição. Porém, com relação à expressão do mRNA do CRF no PVH e da Ucn-I no EW, nossos dados são conflitantes, variando com o tipo de estímulo, restrição ou choque.

Comparando-se de forma geral estes dois importantes peptídeos da família CRF, relacionados ao estresse e comportamento, Kozicz (2007) em trabalho de revisão sobre o

assunto, cita que o CRF e Ucn-I participam de dois circuitos neuronais separados, mas funcionalmente inter-relacionados, que são reguladores coordenados das respostas ao estresse agudo, mas são inversamente associados durante as respostas ao estresse crônico, e que esta complexa associação está associada aos casos de ansiedade, depressão maior e uso ou abuso de drogas. Bittencourt & Sawchenko (2000), realizaram considerável comparação entre a presença de imunorreatividade da proteína Fos em grande número de regiões encefálicas, após administração intracerebroventricular de CRF e Ucn. Assim o CRF mostrou gerar respostas em áreas como o manto cortical, grupos celulares envolvidos no processamento da informação sensorial e o cerebelo e em muitas de suas aferências e eferências. Ainda, tanto CRF quanto Ucn-I geraram resposta a partir de grupos celulares que estão envolvidos no controle autônomo central, incluindo amígdala central, PVH e grupos celulares catecolaminérgicos do tronco encefálico. Analisando a relação entre os peptídeos CRF e Ucn-I e o estresse, o papel do CRF é bem conhecido por provocar respostas comportamentais e autonômicas (simpato-supra-renal) em resposta ao estresse através da ativação do eixo HPA. Com relação à Ucn-I, este peptídeo também teria uma relação com o eixo HPA já que é mais potente do que o CRF em promover a secreção de ACTH, sendo ainda mais potente em inibir a ingestão de comida, porém menos potente no desenvolvimento dos estados de ansiedade (Vaughan *et al.*, 1995; Spina *et al.*, 1996).

A amígdala ou corpo amigdalóide é uma massa de substância cinzenta localizada na parte medial do lobo temporal, que tem sido relacionada a uma série de funções comportamentais, emocionais e viscerais, sendo considerada um importante componente do sistema límbico (Braak *et al.*, 1994; Rezaie *et al.*, 1996; Gloor, 1997; Swanson, 2000; Berretta, 2005). Tem sido relacionada ao CRF e à Ucn-I pela presença de receptores CRF e pelas conexões com as áreas encefálicas que expressam estes peptídeos. Além disso, representa a maior fonte de CRF extra-hipotalâmica. Durante períodos de estresse, o CRF

liberado na amígdala e a ativação de receptores CRF locais, têm sido considerados como substrato das alterações estresse-induzidas no comportamento afetivo (Shekhar *et al.*, 2005). Beretta (2005) relatou que a amígdala tem um papel crucial na modulação e administração das respostas orgânicas aos eventos aversivos e estressantes. Esta resposta poderia ser concebida como o resultado de dois componentes independentes: o primeiro é representado pelos centros amigdalóides de controle das respostas viscerais e motoras para auxiliar o organismo a lidar com o evento presente; o segundo é a aquisição e modulação de relativa memória ao estímulo estressante e seu contexto, essencial para a capacidade do organismo em prever exposições futuras ao estímulo similar para evitá-lo ou contra-atacá-lo efetivamente. Desta forma, pode-se esperar uma resposta da amígdala aos estímulos estressantes, sendo que a análise desta resposta leva em conta a divisão da amígdala em algumas partes principais: central, medial, basolateral, basomedial e cortical (Gloor, 1997). Na análise de nossos resultados, foram analisadas apenas as partes que têm sido mais associadas às respostas ao estresse: amígdala central e amígdala medial.

A AMIce não respondeu ao estímulo de choque em nossos resultados, mas respondeu de forma discreta ao estímulo de restrição. Beaulieu *et al.* (1985) relatou que a lesão bilateral da AMIce em ratos, levou a uma baixa concentração do ACTH no sangue mesmo após o estímulo de restrição do animal, relacionando esta parte da amígdala à ativação do eixo HPA, descrito também por Feldman *et al.* (2000). Relatos ainda relacionam a AMIce ao sistema CRF/Ucn-I, onde esta parte da amígdala mostrou possuir os receptores CRF₁, com ativação da AMIce através do CRF, e receptores CRF₂, com inibição da AMIce através da Ucn-I, provocando distúrbios comportamentais (Liu *et al.*, 2004). Sinnayah *et al.* (2003) porém, mostraram que a injeção intracerebroventricular de Ucn-I promove aumento da imunorreatividade da proteína Fos na AMIce de ratos com redução da ingestão de comida e água, sugerindo um papel de controle da homeostase energética e do fluido corporal a esta

parte da amígdala, e Pawlyk *et al.* (2006), mostraram que microinjeções de CRF na AMIce provoca alterações no sono REM. Também Compaan *et al.* (1996), mostraram que o uso de flesinoxan em até 3.0 mg/kg (um agonista do receptor 5-HT1A da serotonina, que reduz a ansiedade e ativa o eixo HPA) em ratos por uma hora, aumentou a imunorreatividade da proteína Fos na AMIce assim como provocou a ativação do eixo HPA, sugerindo que a AMIce tenha uma relação moduladora direta com as ações do eixo HPA. Liu *et al.* (2004), relataram que a amígdala central tem um papel essencial na circuitaria da ansiedade, memória, estresse, esquizofrenia e recompensa emocional. Ghashghaei & Barbas (2002), através do uso de traçadores no encéfalo de macacos rhesus, analisou as vias de interação entre a amígdala e outras regiões encefálicas. Estes mesmos autores relataram que no caso da AMIce, pôde observar significativa projeção inibitória desta parte em direção ao hipotálamo e estruturas autonômicas do tronco encefálico. Saphier *et al.* (1988) relatou a inibição da atividade da AMIce em ratos após estímulo estressante acústico. Pelos relatos, nota-se uma inadequada definição correta da relação da AMIce com o eixo HPA e o estresse, com relatos de uma relação direta nas respostas ao estresse pelo CRF e pela AMIce em conjunto, mas também com relatos de uma ação inibitória da AMIce sobre o eixo HPA ou ainda uma ação inibitória de um estresse acústico sobre a AMIce. Por nossos resultados conclui-se que a AMIce é de forma pouco intensa ativada pelo estímulo estressante psicológico (restrição) sem ser ativada pelo estímulo estressante físico (choque).

No caso da AMIme, a expressão Fos em nossos resultados mostrou-se de forma bastante considerável nos animais dos grupos restrição e choque. Saphier *et al.* (1988), relataram que o estímulo elétrico na AMIme provocou uma ativação no PVH, associando esta área com o eixo HPA. Também Tanaka *et al.* (1997), através do uso de traçadores retrógrados, relataram que neurônios nitrérgicos da AMIme inervam diretamente o PVH e regulam a liberação de CRF e vasopressina. Foi descrito por Mayes (2006), o equilíbrio que

deve haver entre o comportamento emocional e a performance cognitiva, que estão integrados através de muitos sistemas neurais dopaminérgicos e adrenérgicos. Para este autor, o sistema amigdalóide é a região chave para o estímulo inicial de regiões corticais e a AMIme parece ter um papel especialmente chave na mediação de resposta ao medo. Esta associação da AMIme ao medo também foi relatada por Takahashi *et al.* (2007), que demonstraram que lesões na AMIme produziram em ratos significativa redução do comportamento de medo não condicionado ao odor de gato. Herdade *et al.* (2006) também relacionaram a AMIme, através da exposição de ratos Wistar ao estímulo elétrico ou ao labirinto elevado, ao comportamento animal em suas reações defensivas de “congelamento” ou ataque de risco, mas principalmente na reação de fuga, estando relacionada ao desenvolvimento de ataques de pânico. Yoshida *et al.* (2002), relataram que a inibição GABAérgica através de microinjeção na AMIme de ratos anestesiados, promove uma inibição da via simpática com a diminuição da pressão arterial e da frequência cardíaca, mostrando seu papel na regulação hemodinâmica do sistema límbico. Os relatos descritos fornecem os subsídios necessários para explicarmos a grande ativação da AMIme em nossos resultados, a partir dos dois tipos de estímulos estressantes.

A área septal, situada abaixo do rostro do corpo caloso, anteriormente à lâmina terminal e à comissura anterior, compreende grupos de neurônios de disposição subcortical conhecidos como núcleos septais. Alguns desses neurônios se estendem até a base do septo pelúcido. A área septal tem conexões extremamente amplas e complexas, destacando-se suas projeções para o hipotálamo e para a formação reticular, através do feixe prosencefálico medial. Lesões bilaterais da área septal em animais causam a chamada “raiva septal”, caracterizada por uma hiperatividade emocional, ferocidade e raiva diante de condições que normalmente não modificariam o comportamento do animal. Há também um grande aumento da sede. Estimulações da área septal causam alterações na pressão arterial e no ritmo respiratório, mostrando seu papel na regulação de atividades viscerais. Por outro lado, as

experiências de auto-estima mostram que a área septal é um dos centros do prazer no cérebro (Swanson, 1977; Ribas, 2007). A parte lateral da área septal é dividida em três núcleos principais: núcleo septal lateral ventral, núcleo septal lateral intermédio e núcleo septal lateral dorsal (Paxinos & Watson, 1998). Nossos resultados demonstraram a imunorreatividade da proteína Fos após os estímulos estressantes apenas no núcleo septal lateral ventral (LSV), com a imunorreatividade no grupo restrição maior que no grupo choque. A literatura tem demonstrado a presença de receptores CRF₂ na área septal lateral, e um extenso campo terminal de fibras Ucn-I-ir nesta área (Bittencourt *et al.*, 1999). Além disso, fibras CRF-érgicas projetam-se do hipotálamo para o septo lateral (Sakanaka *et al.*, 1988). Porém, lesões da área septal lateral, não afetaram o potencial CRF. A ativação dos receptores CRF₂ no septo lateral por altas doses de CRF, está associada a um comportamento de ansiedade diante de respostas a tarefas que mensurem o medo não condicionado, enquanto que a ativação dos receptores CRF₂ no septo lateral em baixas doses, leva a um comportamento de aprendizado diante de tais tarefas (Skelton & Holsboer, 1999). Henry *et al.* (2006), demonstraram que a ação ansiogênica ativada via receptores CRF₂ presentes no septo lateral depende inicialmente do estado de estresse basal do rato. Isto porque, após a administração de Ucn-II em doses variadas no septo lateral e o uso de testes comportamentais como restrição, campo aberto e caixas claro/escuro, sendo estímulos de menor ou maior de estresse, mostraram resultados diferentes com relação ao estado de ansiedade. Os animais submetidos a um menor estímulo de estresse desenvolveram um estado de ansiedade com 240 pmol de Ucn-II, e os animais submetidos a um maior estímulo de estresse desenvolveram um estado de ansiedade com 48 pmol de Ucn-II. Isto nos leva a concluir que a ativação da área septal com relação à ansiedade varia consideravelmente de acordo com o tipo de estresse ao qual certo organismo é submetido. Este relato talvez possa explicar a variação em nossos resultados entre os dois tipos de estímulos estressantes.

Johnston (1923), demonstrou que a parte centromedial da amígdala se estende posteriormente por meio de colunas de células neuronais dispostas ao longo da estria terminal (feixe de fibras eferentes que partem da amígdala em direção ao hipotálamo) até o núcleo intersticial da estria terminal (bed nucleus of stria terminalis- BNST), que se localiza na porção posterior dos núcleos estriado e pálido ventrais, em topografia imediatamente inferior à cabeça do núcleo caudado. Em complementação a essa extensão dorsal, De Olmos & Heimer (1999), demonstraram existir também uma extensão ou componente ventral da porção centromedial da amígdala, disposta sob o núcleo lentiforme e posteriormente ao sistema estriado-palidal ventral, e que também termina no núcleo da estria terminal. Dada a disposição semicircular da estria terminal, disposta entre o núcleo caudado e o tálamo, e a disposição ântero-basal do componente ventral, a amígdala centromedial passou a ser definida como um verdadeiro *continuum* em forma de um anel disposto em torno da cápsula interna e do tálamo, e denominada de amígdala estendida. A amígdala estendida é, portanto, formada pela amígdala centromedial, pelo núcleo intersticial da estria terminal, e pelos corredores celulares dorsal (componente supracapsular, estria terminal) e ventral (componente sublentiforme) que nele terminam. Assim como o núcleo estriado ventral, a amígdala estendida recebe aferências principalmente das áreas não-isocorticais do grande lobo límbico e se projeta basicamente sobre o hipotálamo. Quanto ao papel relevante da amígdala em relação às emoções e ao comportamento, é importante ressaltar que a sua parte centromedial não se projeta para o estriado, e sim, para o hipotálamo e tronco encefálico. Através dessas eferências, toda a amígdala estendida exerce as suas influências sobre as áreas neurais que geram os componentes autonômicos, endócrinos e somatomotores das experiências emocionais, que regulam as atividades básicas de beber, comer e pertinentes ao comportamento sexual (Ribas, 2007). Em nossos resultados, o BNST em sua parte principal, apresentou uma resposta de imunorreatividade da proteína Fos apenas nos animais do grupo restrição, ainda com baixa

imunorreatividade, não ocorrendo para o grupo choque. Esses resultados podem ser explicados por Toufexis (2007), que relatou que as respostas emocionais a situações de curto prazo, como o medo condicionado semelhante a Pavlovian, requer ativação da AMIce, enquanto que respostas emocionais contextuais de longo prazo, são dependentes do BNST. Nossos estímulos representam situações de curto prazo. Também Davis (2006), relatou que estímulos como a exposição de ratos à luz brilhante ou à ambiente com contexto temível, ambos de longa duração, ativam a AMIbla (amígdala basolateral), que envia projeções para o BNST, que envia suas projeções para a AMIce. Além disso, através da ativação destas estruturas via administração direta de CRF, revelou-se que o AMIce estaria relacionado ao comportamento específico de medo e o BNST ao comportamento de ansiedade. Waddell *et al.* (2006), realizaram experimento com quatro grupos de animais com exposições de curto e longo prazo ao labirinto zero elevado, com ou sem lesão do BNST bilateralmente. Estes autores concluíram que a exposição de longo prazo ao estresse gera um comportamento de ansiedade, e que exposição de curto prazo ao estresse, gera um comportamento de medo, e que a lesão bilateral do BNST atenuou o estado de ansiedade. Bangasser *et al.* (2005), provocaram lesões bilaterais no BNST e após isso submeteram ratos a estímulos estressantes agudos. Através da análise dos animais com ou sem lesão bilateal do BNST, os autores discutiram sobre as persistentes mudanças no BNST que são necessárias para aumentar o aprendizado após o evento estressante ter cessado. Isto porque, os animais com lesão no BNST não desenvolveram um condicionamento após a exposição ao estressor, sugerindo então este papel de aprendizado ou condicionamento bastante marcado para o BNST. Vyas *et al.* (2003), relataram um aumento na arborização dendrítica nos neurônios do BNST em ratos após estresse de restrição crônico, e Hammack *et al.* (2004) relataram a relação do BNST com estímulos de longa duração de eletrochoque, onde os ratos diminuíram seu potencial de congelamento e aumentaram as ações de tentativa de escape.

A substância cinzenta periaquedutal (PAG) é uma massa de substância cinzenta que envolve o aqueduto cerebral no mesencéfalo. Tem sido envolvida em mecanismos analgésicos, autonômicos, vocalização, reações de raiva, medo, movimento e memória. Possui várias formas de divisão de acordo com o autor, sendo que utilizamos a sua divisão em colunas dorsal (dorsomedial e dorsolateral) e lateral (Dennis & Meller, 1993; Fendt, 1998; Coimbra *et al.*, 2006). Nossos resultados demonstraram que a PAGdm e a PAGdl apresentaram uma imunorreatividade da proteína Fos de forma razoável, praticamente equivalentes entre os grupos restrição e choque, com exceção do grupo choque e a PAGdl, que mostrou uma imunorreatividade mais elevada. Já a PAGlat demonstrou pequena imunorreatividade nos dois grupos. Trabalhos relacionaram a PAG de forma geral ao estresse, sendo que Turek & Ryabinin (2005) demonstraram a expressão *c-fos* na PAG em ratos submetidos ao estresse de restrição e Yoshida *et al.* (2002) demonstraram o aumento da expressão Fos na PAG de ratos submetidos ao estresse de oscilações na temperatura ambiente. Ainda Bowers *et al.* (2003) demonstraram a presença de neurônios CRF-érgicos e receptores CRF na PAG, onde a microinjeção de CRF neste local promoveu um efeito excitatório sobre a via analgésica descendente da PAG. Johnson *et al.* (2004) relataram que a PAGlat possui neurônios serotoninérgicos e que estaria envolvida no comportamento “congelante” ou “no go”, e que a PAGdl possui neurônios adrenérgicos simpato-excitatórios que facilitariam as respostas autonômicas, endócrinas e comportamentais ao estresse. A serotonina liberada pela PAGlat teria um papel inibitório sobre a atividade simpática estresse-induzida pela PAGdl. Isto poderia explicar o fato de que, em nossos resultados, o efeito simpato-inibitório da PAGlat foi menos ativo e que as ações da PAGdl simpato-excitatórios foram ativados de forma mais abundante. Adamec *et al.* (2003), relataram que ratos submetidos ao estresse de predador mostraram um aumento na resposta da PAGlat através da expressão da proteína ligante ao elemento responsivo pelo cAMP fosforilado, e que através das conexões entre a

PAGlat e a amígdala central, houve uma ativação desta última com resposta ao estímulo, dando assim a PAGlat um papel ativador em resposta ao estímulo estressante relacionado à presença de predador. Wiedenmayer *et al.* (2000), também relacionaram as respostas da PAGlat à presença de predadores, em testes de exposição de ratos jovens a ratos machos adultos não familiares. Neste caso, pela comparação entre o grupo de ratos com ou sem lesão na PAGlat, pode-se sugerir que esta parte da PAG está relacionada com aspectos de vocalização, analgesia e imobilidade em resposta ao predador, estímulo diferente do utilizado em nosso trabalho. A PAGdm, segundo relato de Carvalho-Netto *et al.* (2007), ao receber a injeção de CRF ovino em camundongos submetidos a duas situações de estresse-predador, pôde observar que na situação defensiva de baixa intensidade para o camundongo (teste de exposição ao rato), é mais sensível à ação do CRF ovino, do que no caso de ameaça de alta intensidade (bateria de testes defensivos do camundongo), dando à PAGdm um consonante papel no sistema CRF na regulação da emoção. Todos os animais, incluindo humanos, reagem com estratégias emocionais distintas aos diferentes tipos de estresse. Estratégias ativas (confrontar, luta, fuga) são evocadas se o estressor é controlável ou escapável. Estratégias passivas (imobilidade, diminuição da resposta ao movimento, passividade) são normalmente utilizadas se o estressor é inescapável e facilitar a recuperação e cicatrização. Substratos neurais fazem a mediação entre as respostas ativas e passivas, tendo sido identificados na colunas da PAG. Estratégias ativas são coordenadas pelas colunas dorsomedial e dorsolateral, e estratégias passivas pela coluna lateral (Keay & Bandler, 2001). Em nossos resultados, pela resposta nas colunas dorsomedial e dorsolateral aumentadas em relação à coluna lateral, demonstra-se que os animais tiveram uma atitude ativa diante dos estímulos estressantes.

O giro do cíngulo faz parte do mesocórtex que juntamente com o arquicórtex e paleocórtex, constituem o chamado allocórtex, que é o córtex mais antigo do ponto de vista filogenético e constitui cerca de 10% do córtex cerebral. A estimulação do giro do cíngulo

provoca respostas indicativas do sistema nervoso autônomo (Noback *et al.*, 1999). Em nossos resultados a imunorreatividade do giro do cíngulo mostrou-se maior no grupo restrição em comparação ao grupo choque. Segundo Halász *et al.* (2006), ratos submetidos ao estresse psicológico (contato sensorial com o intruso) e estresse físico (encontros agressivos), mostraram um aumento na expressão *c-fos* no CC, o que está de acordo com nossos resultados, com a diferença de que em nossos achados o estímulo físico do choque apresentou uma resposta menor. Damsa *et al.* (2005) realizaram uma análise através de exames por imagem, do cérebro de pacientes com história de trauma psicológico. Os resultados foram a observação de uma diminuição do hipocampo, hiper-reatividade da amígdala e menor ativação do CC. Estes achados sugerem que a hiper-reatividade na amígdala corresponde a um conjunto de sintomas de ansiedade e desordens de estresse pós-traumático, enquanto que a menor ativação do giro do cíngulo, reflete a gradual extinção de uma resposta emocional condicionada. Steckler & Holsboer (1999), relataram sobre a presença de receptores CRF₁ e CRF_{2α} no CC em macacos mas não em ratos. Os autores associaram o CC à mediação de processos emocionais como medo, ansiedade e pânico, através da ativação de receptores CRF₁.

Através da discussão e análise das estruturas acima citadas, as quais mostraram em nosso experimento estarem interrelacionadas ao sistema encefálico de resposta ao estresse participando do controle neuroendócrino, autonômico e comportamental, e pudemos notar que a grande maioria delas está relacionada ao sistema da família CRF de peptídeos (CRF e Ucn-I). Com relação aos benzodiazepínicos, fármacos ansiolíticos os mais usados há décadas, Kalogeras *et al.* (1990) publicaram um trabalho onde relacionou o CRF aos quadros de depressão em macacos rhesus, e que a administração do CRF produziu os efeitos da depressão como hipercortisolismo, hipogonadismo, diminuição da libido, anorexia, ansiedade intensa. Neste relato, o fármaco alprazolam foi administrado em dosagens de 0,3 mg/kg, que gerou

uma supressão do eixo hipotálamo-hipófise-supra-renal, com diminuição do ACTH plasmático. Em 1994, Rohrer *et al.* desenvolveram um experimento onde mulheres receberam 0,5 mg de alprazolam e foram submetidas a experiências estressantes. Eles demonstraram que no grupo que não recebeu alprazolam, o nível sanguíneo de ACTH aumentou consideravelmente, enquanto que no grupo que recebeu alprazolam, houve apenas uma discreta alteração. Ainda Imaki *et al.* (1995) relataram que em ratos submetidos ao estresse de restrição sem fármaco, houve aumento do mRNA do CRF no núcleo paraventricular do hipotálamo, que foi inibido nos ratos submetidos ao estresse de restrição e que receberam 5 a 10 mg/kg do benzodiazepínico clordiazepóxido. Giordano *et al.* (2006), também relataram sobre o efeito do alprazolam como agonista do receptor GABA-A, e mostraram um grande efeito inibitório sobre o eixo HPA, em animais com ou sem estímulos estressantes, demonstrando sua eficácia nas desordens do pânico e depressão, onde uma hiper-ativação deste eixo está presente. Entretanto, ¹Skelton *et al.* (2000) publicaram que a administração aguda e crônica de alprazolam promoveram a inibição do eixo hipotálamo-hipófise-supra-renal com diminuição do mRNA do CRF na amígdala central e basolateral, mas provocou um aumento do mRNA da Ucn-I no núcleo de Edinger-Westphal e sua ligação no CRF₂ da área septal lateral e hipotálamo ventromedial. Pomara *et al.* (2004) mostraram que a administração crônica de 3 semanas de outro benzodiazepínico, o lorazepam, em humanos, provocou uma ativação do eixo hipotálamo-hipófise-supra-renal na interdose, o que contribui para a dependência química. Em 2005, Pomara *et al.* relataram que após a retirada do alprazolam de homens e mulheres que fizeram uso crônico do fármaco, houve um aumento dos efeitos do eixo hipotálamo-hipófise-supra-renal, reforçando o fato de que pode estar aí o risco de dependência. Hogan *et al.* (2005) propuseram o fato de que um antagonista direto do CRF₁ traria os efeitos dos benzodiazepínicos, com diminuição de seus efeitos colaterais de sedação, ataxia e déficits cognitivos. Gonzalez-Pardo *et al.* (2006) relataram que o alprazolam e

outros benzodiazepínicos provocaram mudanças seletivas nas estruturas límbicas e não-límbicas, com efeito inibitório sobre o núcleo mamilar, tálamo ântero-ventral, giro denteado e amígdala basolateral, e efeito excitatório sobre o córtex pré-límbico e cingulado. Diante destes relatos, em nossos experimentos analisamos o efeito do alprazolam na dosagem de 10 mg/kg de forma aguda em ratos, associado aos estresses de restrição e choque, possibilitando desta forma uma análise comparativa do efeito isolado do estresse sobre o animal, e este sob efeito do alprazolam. Em algumas das estruturas já detalhadas e aqui estudadas, houve um efeito inibitório do fármaco analisado pela imunorreatividade da proteína Fos, sendo: PVH, AMIme, BNST e córtex do cíngulo, para os grupos relacionados ao estresse psicológico de restrição; e, PVH, AMIme e córtex do cíngulo, para os grupos relacionados ao estresse físico do eletrochoque. Em outras estruturas, houve um efeito oposto, com aumento da imunorreatividade da proteína Fos nos animais que receberam o fármaco, sendo: EW, AMIce e LSV para os grupos relacionados ao estresse psicológico de restrição; e, EW e AMIce para os grupos relacionados ao estresse físico do eletrochoque. Ainda em outras estruturas, o fármaco não alterou a imunorreatividade da proteína Fos comparando-se os animais submetidos ao estresse e com ou sem a associação do fármaco, sendo: PAGdm, PAGdl e PAGlat para os grupos relacionados ao estresse de restrição; e, LSV, BNST, PAGdm, PAGdl e PAGlat para os grupos relacionados ao estresse de eletrochoque.

Nos resultados relacionados à expressão do mRNA do CRF e Ucn-I no PVH e EW, os animais submetidos ao estresse de restrição e ao fármaco, demonstraram um efeito inibitório do fármaco à expressão do CRF no PVH, e os animais submetidos ao estresse de eletrochoque e ao fármaco, demonstraram um efeito estimulatório do fármaco à expressão do CRF no PVH. Os animais submetidos ao estresse de eletrochoque e ao fármaco, demonstraram um efeito estimulatório do fármaco à expressão da Ucn-I no EW, e os animais submetidos ao estresse de eletrochoque e ao fármaco, demonstraram um efeito inibitório do fármaco à expressão da

Ucn-I no EW. Os resultados relacionados ao grupo dos animais submetidos à restrição, estão de acordo com relato de ¹Skelton *et al.*, (2000), que analisou a relação entre o alprazolam e o CRF e a Ucn-I, porém eles utilizaram ratos não submetidos a estímulos estressantes.

De forma sucinta, podemos dizer que através da análise por métodos imunoistoquímicos da imunorreatividade da proteína Fos (como método de detecção de atividade neuronal) no encéfalo de ratos submetidos a estímulos estressantes, com ou sem a administração do fármaco benzodiazepínico alprazolam, podemos concluir:

1- GRUPO RESTRIÇÃO

- 1.1- áreas com pequena imunorreatividade= AMIce, BNST e PAGlat
- 1.2- áreas com média imunorreatividade= EW, LSV, PAGdm, PAGdl e CC
- 1.3- áreas com grande imunorreatividade= PVH e AMIme
- 1.4- áreas sem imunorreatividade significativa= -----

2- GRUPO CHOQUE

- 2.1- áreas com pequena imunorreatividade= EW, LSV, PAGlat e CC
- 2.2- áreas com média imunorreatividade = PVH e PAGdm
- 2.3- áreas com grande imunorreatividade = AMIme e PAGdl
- 2.4- áreas sem imunorreatividade significativa= AMIce e BNST

3- GRUPO RESTRIÇÃO/ALPRAZOLAM

- 3.1- áreas com pequena imunorreatividade= PVH, PAGlat e CC
- 3.2- áreas com média imunorreatividade= AMIce, AMIme, PAGdm e PAGdl
- 3.3- áreas com grande imunorreatividade= EW e LSV
- 3.4- áreas sem imunorreatividade significativa= BNST

4- GRUPO CHOQUE/ ALPRAZOLAM

4.1- áreas com pequena imunorreatividade= PVH, LSV e PAGlat

4.2- áreas com média imunorreatividade = EW, AMIce, AMIme e PAGdm

4.3- áreas com grande imunorreatividade = PAGdl

4.4- áreas sem imunorreatividade significativa= BNST e CC

5- GRUPO CONTROLE

5.1- nenhuma área analisada nos outros grupos demonstrou significativa imunorreatividade da proteína Fos neste grupo

Através da análise dos valores médios da densidade óptica da expressão do mRNA do CRF no PVH e do mRNA da Ucn-I no EW, através do método de hibridização *in situ*, podemos concluir:

1- GRUPO RESTRIÇÃO E RESTRIÇÃO/ALPRAZOLAM:

>maior expressão do mRNA do CRF no PVH no grupo restrição sem alprazolam

>maior expressão do mRNA da Ucn-I no EW no grupo restrição/alprazolam

2- GRUPO CHOQUE E CHOQUE/ALPRAZOLAM:

>maior expressão do mRNA do CRF no PVH no grupo choque/alprazolam

>maior expressão do mRNA da Ucn-I no EW no grupo choque sem alprazolam

Através da análise estatística da densidade óptica da expressão do mRNA do CRF no PVH e do mRNA da Ucn-I no EW, através do método de hibridização *in situ*, pudemos concluir:

Núcleo Paraventricular do Hipotálamo (PVH)

diferenças de densidade óptica real estatisticamente significantes:

- Grupos Restrição e Controle = 483110,0 (maior expressão no grupo restrição)
- Grupos Choque/Alprazolam e Controle= 507793,0 (maior expressão no grupo
choque/alprazolam)
- Grupos Choque/Alprazolam e Choque= 332461,0 (maior expressão no grupo
choque/alprazolam)

Núcleo de Edinger-Westphal

diferenças de densidade óptica real estatisticamente significantes (em log):

- Grupos Choque e Controle = 0,434058 (maior expressão no grupo choque)
- Grupos Restrição/Alprazolam e Controle= 0,470776 (maior expressão no grupo
restrição/alprazolam)

6. CONCLUSÃO

A partir da análise de nossos resultados podemos concluir que:

- 1- O estresse de restrição provocou nos animais uma maior imunorreatividade da proteína Fos nas regiões encefálicas correspondentes ao PVH e ao AMIme.
- 2- Com a administração do fármaco alprazolam nos animais do grupo restrição, houve uma diminuição da imunorreatividade da proteína Fos no PVH e no AMIme, com maior diminuição sobre o PVH, e um aumento da imunorreatividade das áreas encefálicas correspondentes ao EW e ao LSV.
- 3- O estresse de eletrochoque provocou nos animais uma maior imunorreatividade da proteína Fos nas regiões encefálicas correspondentes ao AMIme e PAGdl.
- 4- Com a administração do fármaco alprazolam nos animais do grupo eletrochoque, houve uma diminuição da imunorreatividade da proteína Fos apenas na área correspondente ao AMIme, sem alteração da área PAGdl, permanecendo esta como a área com maior imunorreatividade em resposta ao eletrochoque associado ao alprazolam.
- 5- Com a análise estatística da densidade óptica das áreas correspondentes ao PVH e ao EW na expressão do mRNA do CRF e da Ucn-I respectivamente, houve maior expressão do mRNA do CRF no PVH no grupo restrição, dos animais não submetidos ao fármaco alprazolam, e no grupo choque maior expressão nos animais submetidos ao fármaco. A maior expressão do mRNA da Ucn-I no EW no grupo restrição, ocorreu nos animais submetidos ao fármaco, e no grupo choque nos animais não submetidos ao fármaco.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMEC, R.E., BLUNDELL, J., BURTON, P. Phosphorylated cyclic AMP response element binding protein expression induced in the periaqueductal gray by predator stress: its relationship to the stress experience, behavior and limbic neural plasticity. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, 27 (8): 1243-1267, 2003

AIRD, F., CLEVINGER, C. V., PRYSTOWSKY, M. B., REDEI, E. Corticotropin-releasing factor mRNA in rat thymus and spleen. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 90: 7104-7108, 1993

ALEXANDER, S.L., IRVINE, C.H., LIVESEY, J.H., DONALD, R.A. Effect of isolation stress on concentration of arginine vasopressin, alpha-melanocyte-stimulating hormone and ACTH in the pituitary venous effluent of the normal horse. **J. Endocrinol.**, 116 (3): 324-334, 1988

AURIOL, B. M. **Prolégomènes à une Yogathérapie de Groupe**. Tese Doutorado: Université de Toulouse: Faculte de Medicine, 1970

BACHTELL, R.K., WEITEMIER, A.Z., RYABININ, A.E. Lesions of the Edinger-Westphal Nucleus in C57BL/6J Mice Disrupt Ethanol-Induced Hypothermia and Ethanol Consumption. **Eur J Neurosci**, 20 (6): 1613-23, 2004

BANGASSER, D.A., SANTOLLO, J., SHORS, T.J. The Bed Nucleus of the Stria Terminalis is Critically Involved in Enhancing Associative Learning After Stressful Experience. **Behav Neurosci**, 119 (6): 1149-1166, 2005

BARAM, T. Z., CHALMERS, D. T., CHEN, C., KOUTSOUKOS, Y., DE SOUZA, E. B. The CRF1 receptor mediates the excitatory actions of corticotropin releasing factor (CRF) in the developing rat brain: *in vivo* evidence using a novel, selective, non-peptide CRF receptor antagonist. **Brain Res**, 770: 89-95, 1997

BEAULIEU, S., DI PAOLO, T., BARDEN, N. Implication of the Serotonergic System in the Decreased ACTH Response to Stress after Lesion of the Amygdaloid Central Nucleus. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, 9 (5-6): 665-9, 1985

BEHAN, D. P., HEINRICHS, S. C., TRONCOSO, J. C., LIU, X., KAWAS, C. H., LING, N., DE SOUZA, E. B. Displacement of corticotropin-releasing factor from its binding protein as a possible treatment for Alzheimer's disease. **Nature**, 378: 284-287, 1995

BENOIT, S. C., THIELE, T. E., HEINRICHS, S. C., RUSHING, P. A., BLAKE, K. A., STEELEY, R. J. Comparison of central administration of corticotropin-releasing hormone and urocortin on food intake, conditioned taste aversion, and *c-Fos* expression. **Peptides**. 21: 345-351, 2000

BERRETTA, S. Cortico-amygdala circuits: role in the conditioned stress response. **Stress**, 8 (4): 221-232, 2005

BITTENCOURT, J.C. & SAWCHENKO, P.E. Do Centrally Administered Neuropeptides Access Cognate Receptors?: An Analysis in the Central Corticotropin-Releasing Factor System. **The Journal of Neuroscience**, 20 (3): 1142-1156, 2000

BITTENCOURT, J. C., VAUGHAN, J., ARIAS, C., RISSMAN, R. A., VALE, W. W., SAWCHENKO, P. E. Urocortin expression in rat brain: Evidence against a pervasive relationship of urocortin-containing projections with targets bearing Type 2 CRF receptors. **J. Comp. Neurol.**, 415: 285-312, 1999

BLOOM, F. E., BATTENBERG, E. L. F., RIVIER, J., VALE, W. W. Corticotropin-releasing factor (CRF): Immunoreactive neurons and fibers in rat hypothalamus. **Regul. Pept.**, 4: 43-47, 1982

BOWERS, L.K., SWISHER, C.B., BEHBEHANI, M.M. Membrane and synaptic effects of corticotropin-releasing factor on periaqueductal gray neurons of the rat. **Brain Res**, 981 (1-2): 52-57, 2003

BRAAK, H., BRAAK, E., YILMAZER, D., DE VOS, R., JANSEN, E., BOHL, J. Amygdala pathology in Parkinson's disease. **Acta Neuropathol (Berl)**, 88: 493-500, 1994

BRITTON, K., MORGAN, J., RIVIER, J., VALE, W., KOOB, G. F. Chlordiazepoxide attenuates CRF-induced response suppression in the conflict test. **Psychopharmacology (Berl)**, 86:170 –174, 1985

BROWN, M. R., FISHER, L. A., SPIESS, J., RIVIER, C., RIVIER, J., VALE, W. W. Corticotropin-releasing factor: actions on the sympathetic nervous system and metabolism. **Endocrinology**, 111: 928-931, 1982

BROWN, M. R., FISHER, L. A., WEBB, V., VALE, W. W., RIVIER, J. E. Corticotropin-releasing factor: a physiologic regulator of adrenal epinephrine secretion. **Brain Research**, 328: 355-357, 1985

BRUHN, T. O., PLOTSKY, P. M., VALE, W. W. Effect of paraventricular lesions on corticotropin-releasing factor (CRF)-like immunoreactivity in the stalk-median eminence: Studies on the adrenocorticotropin response to ether stress and exogenous CRF. **Endocrinology**, 114: 57-62, 1984

BUGNON, F. E., FELLMAN, D., GOUGET, A., CARDOT, J. Ontology of the corticoliberin neuroglandular system in rat brain. **Nature**, 298: 159-160, 1982

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

BUTTNER-ENNEVER, J.A., HORN, A.K., SCHERBERGER, H., D'ASCANIO, P. Motoneurons of twitch and nontwitch extraocular muscle fibers in the abducens, trochlear, and oculomotor nuclei of monkeys. **J Comp Neurol.**, 24 (438): 318-335, 2001

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 (2): 222-229, 2007

CECCATELLI, S., VILLAR, M. J., GODSTEIN, M., HÖKFELT, T. Expression of c-Fos immunoreactivity in transmitter-characterized neurons after estresse. **Neurobiology**, 86: 9569-9573, 1989

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. **J Neurosci**, 15: 6340-6350, 1995

CHANG, C. P., PEARSE, R. V. II, O'CONNELL, S., ROSENFELD, M. G. Identification of a seven trans-membrane helix receptor for corticotropin-releasing factor and sauvagine in mammalian brain. **Neuron**, 11: 1187-1195, 1993

CHAUDHURI A. Neural activity mapping with inducible transcription factors. **Neuroreport** 8: 8:13, 1997

CHEN, Y., LEWIS, K. A., PERRIN, M. H., VALE, W. W. Expression cloning of a human corticotropin-releasing-factor receptor. **Proc Natl Acad Sci USA**, 90: 8967-8971, 1993

COIMBRA, N.C., DE OLIVEIRA, R., FREITAS, R.L., RIBEIRO, S.J., BORELLI, K.G., PACAGNELLA, R.C., MOREIRA, J.E., DA SILVA, L.A., MELO, L.L., LUNARDI, L.O., BRANDÃO, M.L. Neuroanatomical approaches of the tectum-reticular pathways and immunohistochemical evidence for serotonin-positive perikarya on neuronal substrates of the superior colliculus and periaqueductal gray matter involved in the elaboration of the defensive behavior and fear-induced analgesia. **Exp Neurol.**, 197 (1): 93-112, 2006

COMPAAN, J.C., GROENINK, L. VAN DER GUGTEN, J., MAES, R.A., OLIVIER, B. 5HT1A receptor agonist flesinoxan enhances Fos immunoreactivity in rat central amygdala, bed nucleus of the stria terminalis and hypothalamus. **Eur J Neurosci**, 8 (11): 2340-2347, 1996

COWLEY, D. S., ROY-BYRNE, P. P., RADANT, A., RITCHIE, J.C., GREENBLATT, D. J., NEMEROFF, C. B., HOMMER, D. W. Benzodiazepine sensitivity in panic disorder: effects of chronic alprazolam treatment. **Neuropsychopharmacology**, 12:147-157, 1995

DAMSA, C., MARIS, S., PULL, C.B. NEW FIELDS OF RESEARCH IN POSTTRAUMATIC STRESS DISORDER: BRAIN IMAGING. **Curr Opin Psychiatry**, 18 (1): 55-64, 2005

DAVIS, M. Neural Systems Involved in Fear and Anxiety Measured with Fear-Potentiated Startle. **Am Psychol.**, 61 (8): 741-756, 2006

DE OLMOS, J.S. & HEIMER L. The concept of ventral striatopallidal system and extended amygdala. **Ann N Y Acad Sci.**, 877:1-32, 1999

DE SOUZA, E. B., INSEL, T. R., PERRIN, M. H., RIVIER, J., VALE, W. W., KUCHAR, M. J. Corticotropin-releasing factor receptors are widely distributed within the rat central nervous system: an autoradiographic study. **J Neurosci.**, 5: 3189-3203, 1985

DE SOUZA, E. B. Corticotropin-releasing factor receptors: physiology, pharmacology, biochemistry and role in central nervous system and immune disorders. **Psychoneuroendocrinology**, 20: 789-819, 1995

DENNIS, B.J. & MELLER, S.T. Investigations on the periaqueductal gray (PAG) of the rabbit: with consideration of experimental procedures and functional roles of the PAG. **Prog Neurobiol.**, 41 (4): 403-434, 1993

DONALDSON, C. J., SUTTON, S. W., PERRIN, M. H., CORRIGAN, A. Z., LEWIS, K. A., RIVIER, J. E., VAUGHAN, J. M., VALE, W. W. Cloning and characterization of human urocortin. **Endocrinology**, 137 (5): 2167-2170, 1996

DUNN, A. J. & FILE, S. E. Corticotropin-releasing factor has an anxiogenic action in the social interaction test. **Horm Behav**, 21:193-202, 1987

DUNN, A. J., BERRIDGE, C. W. Physiological and behavioral responses of corticotropin releasing factor administration: is CRF a mediator of anxiety or stress responses? **Brain Res Rev**, 15: 71-100, 1990

ECKART, K., JAHN, O., RADULOVIC, J., RADULOVIC, M., BLANK, T., STIEDL, O., BRAUNS, O., TEZVAL, H. ZEYDA, T., SPIESS, J. Pharmacology and biology of corticotropin-releasing factor (CRF) receptors. **Receptors Channels**, 8: 163-177, 2002

FELDMAN, S., NEWMAN, M.E., WEIDENFELD, J. Effects of adrenergic and serotonergic agonists in the amygdala on the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. **Brain Res Bull**, 52 (6): 531-536, 2000

FENDT, M. Different regions of the periaqueductal grey are involved differently in the expression and conditioned inhibition of fear-potentiated startle. **Eur J Neurosci**, 10 (12): 3876-3884, 1998

FISHER, L. A., RIVIER, J., RIVIER, C., SPIESS, J., VALE, W. W., BROWN, M. R. Corticotropin-releasing factor (CRF): central effects on mean arterial pressure and heart rate in rats. **Endocrinology**, 110: 2222-2224, 1982

GARNIER, Marcel & DELAMARE, Valery. **Dicionário de Termos Técnicos de Medicina**, 20^a. ed. São Paulo: Organização Andrei Editora Ltda., 1984. 413 p.

GASZNER, B., CSERNUS,V., KOZICZ, T. Urocortinergic neurons respond in a differentiated manner to various acute stressors in the Edinger-Westphal nucleus in the rat. **J Comp Neurol**, 480 (2): 170-179, 2004

GHASHGHAEE, H.T. & BARBAS, H. Pathways for emotion: interactions of prefrontal and anterior temporal pathways in the amygdala of the rhesus monkey. **Neuroscience**, 115 (4): 1261-79, 2002

GIORDANO, R., PELLEGRINO, M., PICU, A., BONELLI, L., BALBO, M., BERARDELLI, R., LANFRANCO, F., GHICO, E., ARVAT, E. Neuroregulation of the Hypothalamus-Pituitary-Adrenal (HPA) axis in Humans: Effects of GABA-Mineralocorticoid, and GH-Secretagogue-Receptor Modulation. **Scientific World Journal**, 17 (6): 1-11, 2006

GLOOR, P. The amygdaloid system. In: Gloor P. **The temporal lobe and limbic system**. New York: Oxford University Press., pp.591-721, 1997

GONZALEZ-PARDO, H., CONEJO, N.M., ARIAS, J.L. Oxidative metabolism of limbic structures after acute administration of diazepam, alprazolam and zolpidem. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, 30 (6): 1020-1026, 2006

GRAY, T. S. & MAGNUSON, D. J. Peptide immunoreactive neurons in the amygdale and the bed nucleus of the stria terminalis project to the midbrain central gray in the rat. **Peptides**, 13: 451-460, 1992

GRIGORIADIS, D. E., LOVENBERG, T. W., CHALMERS, D. T., LIAW, C., DE SOUZA, E. B. Characterization of corticotropin-releasing factor receptor subtypes. **Ann NY Acad Sci**, 780: 60-80, 1996

HALÁSZ, J. TÓTH, M., KALLÓ, I., LIPOSITS, Z., HALLER, J. The Activation of Prefrontal Cortical Neurons in Aggression a Double labeling Study. **Behav Brain Res.**, 175 (1): 166-175, 2006

HAMMACK, S.E., RICHEV, K.J., WATKINS, L.R., MAIER, S.F. Chemical lesion of the Bed Nucleus of the Stria Terminallis Blocks the Behavioral Consequences of Uncontrollable Stress. **Behav Neurosci**, 118 (2): 443-448, 2004

HAUGER, R. L. & DAUTZENBERG, F. M. Regulation of the stress response by corticotropin-releasing factor receptors, in **Physiology and Medicine**, Humana Press, Inc., Totowa, NJ, 261-286, 1999

HAUGER, R. L., GRIGORIADIS, D. E., DALLMAN, M. F., PLOTSKY, P. M., VALE, W. W., DAUTZENBERG, F. M. International Union of Pharmacology. XXXVI. Current Status of the Nomenclature for Receptors for Corticotropin-Releasing Factor and Their Ligands. **Pharmacol. Rev.**, 55:21-26, 2003

HENRY, B.A., VALE, W., MARKOU, A. The Effect of Lateral Septum Corticotropin-Releasing Factor Receptor 2 Activation on Anxiety is Modulated by Stress. **J Neurosci**, 26 (36): 9142-9152, 2006

HERDADE, K.C., STRAUSS, C.V., ZANGROSSI JUNIOR, H., VIANA, M.B. Effects of Media Amygdala Inactivation on a Panic-Related Behavior. **Behav Brain Res**, 172 (2): 316-323, 2006

HOGAN, J.B., HODGES, D.B.JR., LELAS, S., GILLIGAN, P.J., MC ELROY, J.F., LINDNER, M.D. Effects of CRF1 receptor antagonists and benzodiazepines in the Morris water maze and delayed non-matching to position tests. **Psychopharmacology**, 178 (4): 410-419, 2005

HOPE, P. J., TURNBULL, H., FARR, S., MORLEY, J. E., RICE, K. C., CHROUSOS, G. P., TORPY, D. J., WITTERT, G. A. Peripheral administration of CRF and urocortin: effects on food intake and the HPA axis in the marsupial *Sminthopsis crassicaudata*. **Peptides**. 21: 669-677, 2000

HSU, S. M. & RAINE, L., Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. **J Histochem Cytochem**, 29(4): 577-80, 1981

HSU, S. Y. & HSUEH, A. J. W. Human stresscopin and stresscopin-related peptide are selective ligands for the type 2-corticotropin-releasing hormone receptor. **Nat. Med.**, 7: 1-7, 2001

IMAKI, T., WANG, X. Q., SHIBASAKI, T., HARADA, S., CHIKADA, N., TAKAHASHI, C., NARUSE, M., DEMURA, H. Chlordiazepoxide attenuates stress-induced activation of neurons, corticotropin-releasing factor (CRF) gene transcription and CRF biosynthesis in the paraventricular nucleus (PVN). **Mol Brain Res**, 32:261-270, 1995

INNIS, R.B. & AGHAJANIAN, G.K. Cholecystokinin-containing and nociceptive neurons in rat Edinger-Westphal nucleus. **Brain Res.**, 363: 230-238, 1986

INOUE, K., VALDEZ, G. R., REYES, T. M., REINHARDT, L. E., TABARIN, A., RIVIER, J. Human Ucn II, a selective agonist for the Type 2 corticotropin-releasing factor receptor, decreases feeding and drinking in the rat. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 305: 385-393, 2003

JOHNSON, P.L., LIGHTMAN, S.L., LOWRY, C.A. A functional subset of serotonergic neurons in the rat ventrolateral periaqueductal gray implicated in the inhibition of sympathoexcitation and panic. **Ann N Y Acad Sci**, 1018: 58-64, 2004

JOHNSTON, J.B. Further contribution to the study of the evolution of the forebrain. **J Comp Neurol**, 35:337-481, 1923

JOSEPH, S. A. & KNIGGE, K. M. Corticotropin-releasing factor: Immunohistochemical localization in rat brain. **Neurosci. Lett.**, 35: 135-139, 1983

KALOGERAS, K. T., CALOGERO, A. E., KURIBAYASHI, T., KAHN, J., GALLUCCI, W. T., KLING, M. A., CHROUSOS, G. P., GOLD, P. W. *In vitro* and *in vivo* effects of the triazolobenzodiazepine alprazolam on hypothalamic-pituitary-adrenal function: pharmacological and clinical implications. **J Clin Endocrinol Metab**, 70:1462-1471, 1990

KEAY, K.A. & BANDLER, R. Parallel Circuits Mediating Distinct Emotional Coping Reactions to Different Types of Stress. **Neurosci Biobehav Rev.**, 25 (7-8): 669-678, 2001

KEENEV, A., JESSOP, P.S., HARBUZ, M.S., MARSDEN, C.A., HOGG, S., BLACKBURN-MUNRO, R.E. Differential Effects of Acute and Chronic Social Defeat Stress on Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Function and Hippocampal Serotonin Release in Mice. **J Neuroendocrinol.**, 18 (5): 330-338, 2006

KIHARA, N. (*et al.*). Effects of central and peripheral urocortin on fed and fasted gastroduodenal motor activity in conscious rats. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, 280: G406-G419, 2001

KISHIMOTO, T., PEARSE, R. V. II, LIN, C. R., ROSENFELD, M. G. A sauvagine/corticotropin-releasing factor receptor expressed in heart and skeletal muscle. **Proc Natl Acad Sci USA**, 92: 1108-1112, 1995

KLOOSTER, J. & VRENSSEN, G.F. New indirect pathways subserving the pupillary light reflex: projections of the accessory oculomotor nuclei and the periaqueductal gray to the Edinger-Westphal nucleus and the thoracic spinal cord in rats. **Anat Embryol (Berl)**, 198 (2): 123-132, 1998

KOOB, G. F., HEINRICHS, S. C., MENZAHGHI, F., PICH, E. M., BRITTON, K. T. Corticotropin releasing factor, stress, and behavior. **Semin. Neurosc.**, 6: 221-229, 1994

KOSTICH, W. A., CHEN, A., SPERLE, K., LARGENT, B. L. Molecular identification and analysis of a novel human corticotropin-releasing factor (CRF) receptor: the CRF2gamma receptor. **Mol Endocrinol**, 12: 1077-1085, 1998

KOVACS, K. J. & SAWCHENKO, P. E. Sequence of Stress-Induced Alterations in Indices of Synaptic and Transcriptional Activation in Parvocellular Neurosecretory Neurons. **The Journal of Neuroscience**, 16 (1): 262-273, 1996

KOZICZ, T. On the Role of Urocortin 1 in the Non-Preganglionic Edinger-Westphal Nucleus in Stress Adaptation. **Gen Comp Endocrinol.**, available online 11 april, 2007

KOZICZ, T., KOROSI, A., KORSMAN, C., TILBURG-OUWENS, D., GROENINK, L., VEENING, J., VAN DER GUGTEN, J., ROUBOS, E., OLIVIER, B. Urocortin expression in the Edinger-Westphal nucleus is down-regulated in transgenic mice over-expressing neuronal corticotrophin-releasing factor. **Neuroscience**, 123 (3): 589-594, 2004

KOZICZ, T., YANAIHARA, H., ARIMURA, A. Distribution of urocortin-like immunoreactivity in the Central Nervous System of the Rat. **The Journal of Comparative Neurology**, 391: 1-10, 1998

KRULIK, R. & CERNY, M. Effects of chlordiazepoxide on stress in rats. **Life Sci**, 10:145–151, 1971

LEDERIS, K., LETTER, A., MACMASTER, D., MOORE, G. Complete amino acid sequence of urotensin I, a hypotensive and corticotropin-releasing neuropeptide from *Catostomus*. **Science**, 218: 162-164, 1982

LEWIS, K., LI, C., PERRIN, M. H., BLOUNT, A., KUNITAKE, K., DONALDSON, C. Identification of urocortin III, an additional member of the corticotropin-releasing factor (CRF) family with high affinity for the CRF2 receptor. **Proc Natl Acad Sci USA**, 98: 7570-7575, 2001

LIAW, C. W., LOVENBERG, T. W., BARRY, G., OLTERS DORF, T., GRIGORIADIS, D. E., DE SOUZA, E. B. Cloning and characterization of the human corticotropin-releasing factor- 2 receptor complementary deoxyribonucleic acid. **Endocrinology**, 137: 72-77, 1996

LIEBOWITZ, M. R., GORMAN, J. M., FYER, A., DILLON, D., LEVITT, M., KLEIN, D. F. Possible mechanisms for lactate's induction of panic. **Am. J. Psychiat.**, 143: 495-502, 1986

LIU, J., YU, B., NEUGEBAUER, V., GRIGORIADIS, D.E., RIVIER, J., VALE, W.W., GALLAGHER, P.S., GALLAGHER, J.P. Corticotropin-Releasing Factor and Urocortin I

Modulate Excitatory Glutamatergic Synaptic Transmission. **The J Neuroscience**, 24 (16): 4020-4029, 2004

LOEWY, A.D. & SAPER, C.B. Edinger-Westphal Nucleus: Projections to the Brain Stem and Spinal Cord in the Cat. **Brain Res.**, 150 (1): 1-27, 1978

LOVENBERG, T. W., LIAW, C. W., GRIGORIADIS, D. E., CLEVINGER, W., CHALMERS, D. T., DE SOUZA, E. B., OLTERSDORF, T. Cloning and characterization of a functionally distinct corticotropin-releasing factor receptor subtype from rat brain. **Proc Natl Acad Sci USA**, 92: 856-840, 1995

MACHADO, Angelo B. M. **Neuroanatomia Funcional**. 2ª. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2007.

MAYES, L.C. Arousal Regulation, Emotional Flexibility, Medial Amygdala Function, and the Impact of Early Experience: Comments on the Paper of Lewis et al. **Ann N Y Acad Sci**, 1094: 178-192, 2006

MERCHENTHALER, I., VIGH, S., PETRUSZ, P, SCHALLY, A.V. The Paraventriculo-Infundibular Corticotrofin Releasing Factor (CRF) Pathway as Revealed by Immunocytochemistry in Long-Term Hypophysectomized or Adrenalectomized Rats. **Regul Pept.**, 5 (4): 295-305, 1983

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

MONTECUCCHI, P. C., ANASTASI, A., deCASTIGLIONE, R., ERSPAMER, V. Isolation and amino acid composition of sauvagine. **Int J Pep Prot Res**, 16: 191-199, 1980

MOREAU, J. L., KILPATRICK, G., JENCK, F. Urocortin, a novel neuropeptide with anxiogenic-like properties. **Neuroreport**, 8: 1697-1701, 1997

MORIN, S.M., LING, N., LIU, X.J., KAHL, S.D., GEHLERT, D.R. **Neuroscience**, 92 (1): 281-291, 1999

NEYLAN, T.C. Hans Selye and the Field of Stress Research. **Neuropsychiatry Classics**, 10 (2): 230-231, 1998

NOBACK, C.R., STROMIGER, N.L., DEMAREST, R.J. **Neuroanatomia: Estrutura e Função do Sistema Nervoso Humano**. Ed. Premier, 5ª. ed., pp: 319, 1999

OKAWARA, Y., MORLEY, S. D., BURZIO, L. O., ZWIERS, H., LEDERIS, K., RICHTER, D. Cloning and sequence analysis of cDNA for corticotropin-releasing factor precursor from the teleost fish *Catostomus commersoni*. **Proc Natl Acad Sci USA**, 85: 8439-8443, 1988

OLSCHOWKA, J. A., O'DONOHUE, T. L., MUELLER, G. P., JACOBOWITZ, D. M. Hypothalamic and extrahypothalamic distribution of CRF-like immunoreactive neurons in the rat brain. **Neuroendocrinology**, 35: 305-311, 1982

OWENS, M. J. & NEMEROFF, C. B. Physiology and pharmacology of corticotrophin-releasing factor. **Pharm Rev.**, 43: 425-73, 1991

PALCHAUDHURI, M. R., WILLE, S., MEVENKAMP, G., SPIESS, J., FUCHS, E., DAUTZENBERG, F. M. Corticotropin-releasing factor receptor type 1 from *Tupaia belangeri*-cloning, functional expression and tissue distribution. **Eur J Biochem**, 258: 78-84, 1998

PAXINOS, G. & WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. San Diego: Academic Press, 1998.

PAWLIK, A.C., SANFORD, L.D., BRENNAN, F.X., MORRISON, A.R., ROSS, R.J. Corticotropin-releasing factor microinjection into the central nucleus of the amygdala alters REM sleep. **Pharmacological Reports**, 58: 125-130, 2006

PERRIN, M., DONALDSON, C., CHEN, R., LEWIS, K. A., VALE, W. W. Cloning and functional expression of a rat corticotropin releasing factor (CRF) receptor. **Endocrinology**, 133: 3058-3061, 1993

PERRIN, M., DONALDSON, C., CHEN, R., BLOUNT, A., BERGGREN, T., BILEZIKJIAN, L., SAWCHENKO, P., VALE, W. W. Identification of a second corticotropin-releasing factor receptor gene and characterization of a cDNA expressed in heart. **Proc Natl Acad Sci USA**, 92: 2969-2973, 1995

PETRUSZ, P., MERCHENTHALER, I., MADERDRUT, J. L., HEITZ, P. U. Central and peripheral distribution of corticotropin-releasing factor. **Fed. Proc., Fed. Am. Soc. Exp. Biol.**, 44: 229-235, 1985

PICH, E. M., LORANG, M., YEGANEH, M., RODRIGUEZ DE FONSECA, F., RABER, J., KOOB, G. F., WEISS, F. Increase of extracellular corticotropinreleasing factor-like immunoreactivity levels in the amygdala of awake rats during restraint stress and ethanol withdrawal as measured by microdialysis. **J Neurosci**, 15:5439 –5447, 1995

PITKANEN, A., JOLKKONEN, E., KEMPPAINEN, S. Anatomic Heterogeneity of the rat amygdaloid complex. **Folia Morphol**, 59 (1): 1-23, 2000

POMARA, N., WILLOUGHBY, L.M., RITCHIE, J.C., SIDTIS, J.J., GREENBLATT, D.J., NEMEROFF, C.B. Interdose elevation in plasma cortisol during chronic treatment with alprazolam but not lorazepam in the elderly. **Neuropsychopharmacology**, 29 (3): 605-611, 2004

POMARA, N., WILLOUGHBY, L.M., RITCHIE, J.C., SIDTIS, J.J., GREEN BLATT, D.J., NEMEROFF, C.B. Sex-related elevation in cortisol during chronic treatment with alprazolam associated with enhanced cognitive performance. **Psychopharmacology**, 182 (3): 414-419, 2005

POTTER, E., SUTTON, S., DONALDSON, C., CHEN, R., PERRIN, M., LEWIS, K., SAWCHENKO, P. E., VALE, W. W. Distribution of corticotropin-releasing factor receptor mRNA expression in the rat brain and pituitary. **Proc Natl Acad Sci USA**, 91:8777-8781, 1994

RADULOVIC, J., SYDOW, S., SPIESS, J. Characterization of native corticotropin-releasing factor receptor type 1 in the rat and mouse central nervous system. **J Neurosc Res**, 54:507-521, 1998

REIMAN, E. M., RAICHLE, M. E., BUTLER, F. K., HERSCOVICH, P., ROBINS, E. A focal brain abnormality in panic disorder, a severe form of anxiety. **Nature**. 310: 683-685, 1984

REIMAN, E. M., RAICHLE, M. E., ROBINS, E., MINTUM, M. A., FUSSELMAN, M. J., FOX, P. T., PRICE, P. J. L., HACKMAN, K. A. Neuroanatomical correlates of a lactate-induced anxiety attack. **Arch. Gen. Psychiat.**, 46: 493-500, 1989

REZAIE, P., CAIRNS, N.J., CHADWICK, A., LANTOS, P.L. Lewy bodies are located preferentially in limbic areas in diffuse Lewy body disease. **Neurosci Lett**, 212: 111-4, 1996

RIBAS, G. C. As bases neuroanatômicas do comportamento: histórico e contribuições recentes. **Rev Bras Psiquiatr**, 29(1):63-71, 2007

ROHRER, T., VON RICHTHOFEN, V., SCHULZ, C., BEYER, J., LEHNERT, H. The stress-, but not corticotropin-releasing hormone-induced activation of the pituitary–adrenal axis in man is blocked by alprazolam. **Horm Metab Res**, 26:200 –206, 1994

ROTH, K. A., WEBER, E., BARCHAS, J. D., CHANG, D., CHANG, J. K. Immunoreactive dynorphin-(1-8) and corticotropin-releasing factor in a subpopulation of hypothalamic neurons. **Science**, 219: 189-191, 1983

SAJDYK, T. J. & GEHLERT, D. R. Astressin, a corticotropin releasing factor antagonist, reverses the anxiogenic effects of urocortin when administered into the basolateral amygdala. **Brain Research**, 877: 226-234, 2000

SAKANAKA, M., MAGARI, S., SHIBASAKI, T., LEDERIS, K. Corticotropin Releasing Factor-Containing Afferents to the Lateral Septum in the Rat Brain. **J Comp Neurol**, 270: 404-415, 1988

SAKANAKA, M., SHIBASAKI, T., LEDERIS, K. Corticotropin releasing factor-like immunoreactivity in the rat brain as revealed by a modified cobalt-glucose oxidase-diaminobenzidine method. **J. Comp. Neurol.**, 260: 256-298, 1987

SAPHIER, D., MOR, G., FELDMAN, S. Neurogenic stimuli alter preoptic area and amygdala unit activity: central effects of olfactory projections on paraventricular nucleus units. **Exp Neurol**, 100 (1): 71-82, 1988

SAWCHENKO, P. E. Stress, Neuropeptides, and Systemic Disease. **In: Academic Press, San Diego-California**, pp: 3-17, 1991

SAWCHENKO, P.E. Toward a new neurobiology of energy balance, appetite, and obesity: the anatomists weigh in. **J Comp Neurol.**, 402 (4): 435-441, 1998

SEASHOLTZ, A. F., BURROWS, H. L., KAROLYI, I. J., CAMPER, S. A. Mouse models of altered CRH-binding protein expression. **Peptides**, 22: 743-751, 2001

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

SHEKHAR, A., TRUITT, W., RAINNIE, D., SAJDYK, T. Role of Stress, Corticotrophin Releasing Factor (CRF) and Amygdala Plasticity in Chronic Anxiety. **Stress**, 8 (4): 209-219, 2005

SINNAYAH, P. BLAIR-WEST, J.R., MCBURNIE, M.I., MCKINLEY, M.J., OLDFIELD, B.J., RIVIER, J., VALE, W.W., WALKER, L.L., WEISINGER, R.S., DENTON, D.A. The effect of urocortin on ingestive behaviours and brain Fos immunoreactivity in mice. **European Journal of Neuroscience**, 18: 373-382, 2003

SKELTON, T. & HOLSBOER, F. Corticotropin-Releasing Hormone Receptor Subtypes and Emotion. **Biol Psychiatry**, 46: 1480-1508, 1999

¹SKELTON, K. H., NEMEROFF, C. B., KNIGHT, D. L., OWENS, M. J. Chronic Administration of the Triazolobenzodiazepine Alprazolam Produces Opposite Effects on Corticotropin-Releasing Factor and Urocortin Neuronal Systems. **The Journal of Neuroscience**, 20(3):1240-1248, 2000

²SKELTON, K. H., OWENS, M. J., NEMEROFF, C. B. The Neurobiology of Urocortin. **Regulatory Peptides**, 93: 85-92, 2000

SLAWECHI, C. J., SOMES, C., RIVIER, J. E., EHLERS, C. L. Neurophysiological effects of intracerebroventricular administration of urocortin. **Peptides**, 20: 211-218, 1999

SMAGIN, G. N., HEINRICHS, S. C., DUNN, A. J. The role of CRH in behavioral responses to stress. **Peptides**, 22: 713-724, 2001

SMITH, J.E., JANSEN, A.S., GILBEY, M.P., LOEWY, A.D. CNS cell groups projecting to sympathetic outflow of tail artery: neural circuits involved in heat loss in the rat. **Brain Res.**, 786: 153-164, 1998

SPINA, M., MERLO-PICH, E., CHAN, R. K., BASSO, A. M., RIVIER, J., VALE, W. W., KOOB, G. F. Appetite-suppressing effects of urocortin, a CRF-related neuropeptide. **Science**, 273: 1561-1564, 1996

STECKLER, T. & HOLSBOER, F. Corticotropin-releasing hormone receptor subtypes and emotion. **Biol. Psychiatry**, 46: 1480-1508, 1999

STENZEL, P., KESTERSON, R., YEUNG, Y., CONE, R. D., RITTENBERG, M. B., STENZEL-POORE, M. P. Identification of the murine receptor for corticotropin-releasing hormone expressed in the heart. **Mol Endocrinol**, 9: 637-645, 1995

STENZEL-POORE, M. P., HELDWEIN, K. A., STENZEL, P., LEE, S., VALE, W. W. Characterization of genomic corticotropin-releasing factor gene from *Xenopus laevis*: two members of the CRF family exist in amphibians. **Mol Endocrinol**, 6: 1716-1724, 1992

SWANSON, L.W. The Anatomical Organization of Septo-Hippocampal Projections. **Ciba Found Symp**, 58: 25-48, 1977

SWANSON, L. W., SAWCHENKO, P. E., RIVIER, J., VALE, W. W. Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: An immunohistochemical study. **Neuroendocrinology**, 36: 165-186, 1983

SWANSON, L.W. Cerebral hemisphere regulation of motivated behavior. [Review]. **Brain Res**, 886: 113-64, 2000

SWANSON, L.W. The amygdala and its place in the cerebral hemisphere. **Ann N Y Acad Sci**, 985: 174-184, 2003

SWERDLOW, N. R., GEYER, M. A., VALE, W. W., KOOB, G. F. Corticotropin releasing factor potentiates acoustic startle in rats: blockade by chlordiazepoxide. **Psychopharmacology (Berl)**, 88:147–152, 1986

TAKAHASHI, L.K., HUBBARD, D.T., LEE, I., SIPES, S.M. Predator Odor-Induced Conditioned Fear Involves the Basolateral and Medial Amygdala. **Behav Neurosci**, 121 (1): 100-110, 2007

TANAKA, M., IKEDA, T., HAYASHI, S., IJIMA, N., AMAYA, F., HISA, Y., IBATA, Y. Nitrgic neurons in the medial amygdala project to the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. **Brain Res.**, 777 (1-2), 13-21, 1997

THOMPSON, R. C., SEASHOLTZ, A. F., HERBERT, E. Rat Corticotropin-releasing hormone gene: Sequence and tissue-specific expression. **Mol. Endocrinol.**, 1: 363-370, 1987

TITZE DE ALMEIDA, R., SHIDA, H., GUIMARÃES, F.S., DEL-BEL, E.A.. Stress-induced expression of c-fos proto-oncogene in the hippocampal formation. **Braz J Med Biol Res** 27: 1087-1088, 1994

TOUFEXIS, D. Region and Sex Specific Modulation of Anxiety Behaviours in the Rat. **J Neuroendocrinol**, 19 (6): 461-473, 2007

TUREK, V.F. & RYABININ, A.E. Expression of *c-fos* in the mouse Edinger-Westphal nucleus following ethanol administration is not secondary to hypothermia or stress. **Brain Res**, 1063 (2): 132-139, 2005

TURNBULL, A. V., VAUGHAN, J., RIVIER, J. E., VALE, W. W., RIVIER C. Urocortin Is Not a Significant Regulator of Intermittent Electrofootshock-Induced Adrenocorticotropin Secretion in the Intact Male Rat. **The Endocrine Society**, 140 (1): 71-78, 1999

VALE, W. W., SPIESS, J., RIVIER, C. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and β -endorphin. **Science**, 213: 1394-7, 1981

VALE, W. W., VAUGHAN, J. , YAMAMOTO, G., BRUHN, T., DOUGLAS, C., DALTON, D., RIVIER, C., RIVIER, J. Assay of corticotropin-releasing factor. In: **Conn PM (ed) Academic Press, NY**, vol. 103H: 565-577, 1983

VAUGHAN, G. R., DONALDSON, C., BITTENCOURT, J., PERRIN, M. H., LEWIS, K., SUTTON, S. Urocortin, a mammalian neuropeptide related fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor. **Nature**, 378: 287-292, 1995

VYAS, A., BERNAL, S., CHATTARJI, S. Effects of Chronic Stress on Dendritic Arborization in the Central and Extended Amygdala. **Brain Res.**, 965 (1-2): 290-294, 2003

WADDELL, J., MORRIS, R.W., BOUTON, M.E. Effects of Bed Nucleus of the Stria Terminalis Lesions on Conditioned Anxiety: Aversive Conditioning with Long-Duration Conditional Stimuli and Reinstatement of Extinguished Fear. **Behav Neurosci**, 120 (2): 324-336, 2006

WARWICK, R.B. The ocular parasympathetic nerve supply and its mesencephalic sources. **J. Anat.**, 88: 71-93, 1954

WEITEMIER, A.Z. & RYABININ, A. F. Lesions of the Edinger-Westphal Nucleus Alter Food and Water Consumption. **Behav Neurosci**, 119 (5): 1235-1243, 2005

WENINGER, S.C., DUNN, A.J., MUGLIA, L.J., DIKES, P.L., MICZEK, K.A., SWIERGIEL, A.H., BERRIDGE, C.W., MAJZOUB, J.A. Stress-induced behaviors require the corticotropin-releasing hormone (CRH) receptor, but not CRH. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA** **96**, 8283-8288, 1999

WESTPHAL, C. Ueber einen Fall von Chronischer progressive Lahmung des Augenmuskeln (Ophthalmoplegia externa) nebst Beschreibung von Ganglienzellengruppen in Bereich des Oculomotoriuskerns. **Arch Psychiatrie Nervenheilk**, 98: 846-871, 1887

WIEDENMAYER, C.P., GOODWIN, G.A., BARR, G.A. The Effect of Periaqueductal Gray Lesions on Responses to Age-Specific Threats in Infant Rats. **Brain Res Dev Brain Res.**, 120 (2): 191-198, 2000

YOSHIDA, K., MARUYAMA, M., HOSONO, T., NASASHIMA, K., FUKUDA, Y., GERSTBERGER, R., KANOSUE, K. Fos expression induced by warming the preoptic area in rats. **Brain Res**, 933 (2): 109-117, 2002

YOSHIDA, S., MATSUBARA, T., UEMURA, A., IGUCHI, A., HOTTA, N. Role of medial amygdala in controlling hemodynamics via GABA (A) receptor in anesthetized rats. **Circ J**, 66 (2): 197-203, 2002

YU, J., XIE, L. Y., ABOU-SAMRA, A. B. Molecular cloning of a type a chicken corticotropin-releasing factor receptor with high affinity for urotensin I. **I. Endocrinology**, 137: 192-197, 1996