Juliano Genaro Perfetto

Bloqueio dos receptores β 1-adrenérgicos periféricos impede o desenvolvimento da ansiedade tardia induzida por estresse em ratos Wistar.

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências.

São Paulo
2016

Juliano Genaro Perfetto

Bloqueio dos receptores β 1-adrenérgicos periféricos impede o desenvolvimento da ansiedade tardia induzida por estresse em ratos Wistar.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Carolina Demarchi Munhoz

Versão original

São Paulo
2016

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Perfetto, Juliano Genaro.

Bloqueio dos receptores $\beta 1$ adrenérgicos periféricos impede o desenvolvimento da ansiedade tardia induzida por estresse em ratos Wistar / Juliano Genaro Perfetto. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Profa. Dra. Carolina Demarchi Munhoz.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Mecanismos neurais e comportamentais na ansiedade tardia induzida por estresse.

Versão do título para o inglês: The blockage of peripheral $\beta 1$ adrenergic receptors prevents the restraint stress-induced long-lasting anxiety in Wistar rats.

1. Ansiedade 2. Estresse psicológico 3. Receptores adrenérgicos 4. Complexo basolateral da amígdala 5. Glicocorticoides 6. Excitabilidade neuronal I. Munhoz, Profa. Dra. Carolina Demarchi II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB041/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Juliano Genaro Perfetto.

Título da Dissertação: Bloqueio dos receptores $\beta 1$ adrenérgicos periféricos impede
o desenvolvimento da ansiedade tardia induzida por estresse
em ratos Wistar.

Orientador(a): Profa. Dra. Carolina Demarchi Munhoz.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **131** nas fls. **12** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Carolina Demarchi Munhoz**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Efeito do propranolol, metirapona e da mifepristona na evolução da ansiedade induzida por estresse em ratos wister: investigação da plasticidade neuronal na amígdala basolateral*" do qual participam o(s) aluno(s) Juliano Genaro Perfetti, Leonardo Santana Novaes, Nilton Barreto dos Santos, Érica de Almeida Duque, Dielly Catrina Favacho Lopes, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em **17.12.2013**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 18 de dezembro de 2013.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA- ICB/USP

Prof. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

Agradecimentos

Gostaria de oferecer meus sinceros agradecimentos:

À Professora Carolina Demarchi Munhoz pela oportunidade oferecida em seu laboratório, pelo suporte científico, pelo apoio profissional e pela amizade.

À todos os Professores e companheiros de classe da Universidade Federal de São Paulo pela dedicada formação dos alunos do curso de Ciências Biomédicas, em especial à Professora Maria Gabriela Menezes de Oliveira.

Ao Professor Cristoforo Scavone e a todos os colegas do Laboratório de Neurofarmacologia Molecular pela colaboração científica e apoio técnico.

À Professora Simone Motta e ao Professor Newton Sabino Canteras e colegas de Laboratório pela colaboração científica e apoio técnico.

À Professora Rosana Camarini e ao Professor Luiz Roberto Giorgetti de Britto pelas indicações dadas no exame de qualificação.

À Guiomar e Aninha pelo suporte técnico oferecido.

Aos amigos de laboratório Leonardo, Nilton, Dielly, Jennifer, Érica, Eduardo, Marília, Fernando e Rodrigo pelas discussões científicas no ambiente de trabalho.

À CAPES pelo apoio financeiro.

À minha mãe, meu pai, irmãos e tios pelo amor e dedicação.

Ao Sr. Ricardo Kovacs e Livia Abramo pelo incentivo.

Aos amigos Marcos, Alexandre, Rogério, Renato, Éric, Igor, Roberta e Karina pela aprendizagem diário.

Aos “gatitos” por me receberem em casa sempre com festa.

À minha esposa pelo carinho, apoio, amor, compreensão, conselhos, opiniões, críticas, e, sobretudo, por estar sempre ao meu lado.

RESUMO

Perfetto, JG. Bloqueio dos receptores $\beta 1$ adrenérgicos periféricos impede o desenvolvimento da ansiedade tardia induzida por estresse em ratos Wistar.[dissertação (Mestrado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

A ansiedade desencadeia, em sua condição patológica, diversas transformações endócrinas, comportamentais e neuronais. O estresse, causa importante dessa patologia, não somente ativa o eixo HPA (hipotálamo-pituitária-adrenal), liberando hormônios como os glicocorticoides (GCs) e epinefrina (Epi), como também promove a liberação de neurotransmissores, a citar, a norepinefrina (NE). No sistema nervoso central (SNC), a alteração da excitabilidade/arquitetura de neurônios de regiões como córtex pré-frontal, hipocampo e complexo basolateral da amígdala (BLA) decorrentes de um evento estressante é bem estabelecida, destacando-se o papel dos receptores de glicocorticoides (GR) e de NE. O BLA, centro de regulação autonômica, comportamental e hormonal pós-estresse, expressa tanto GR quanto receptores NE, ambos com papel fundamental na mediação do remodelamento neuronal. Entretanto, faltam estudos sobre a comunicação periferia-SNC no estabelecimento da ansiedade e, principalmente, sobre a possível função de receptores $\beta 1$ -adrenérgicos periféricos na evolução dessa patologia. Além disso, investigações sobre a persistência temporal das mudanças morfológicas e biomoleculares pós-estresse no BLA também são escassas. Desse modo, neste trabalho, investigamos as possíveis influências periféricas noradrenérgicas, via receptores $\beta 1$ (pela administração do antagonista seletivo atenolol) e dos GCs, via GR (pela administração de metirapona, um inibidor da síntese de GCs) na indução da ansiedade tardia decorrente de estresse agudo. Para isso, utilizamos ratos Wistar (220 – 250 g, 60 dias de idade) e realizamos os testes comportamentais do labirinto em cruz elevado (LCE) ou campo aberto (CA) para a análise do comportamento tipo ansioso. Avaliamos ainda, no BLA dos animais, por *western blot*, a ativação da via de sinalização intracelular MEK-ERK-CREB e a expressão de EGR1, marcador de atividade neuronal; e por ensaio de retardo de mobilidade eletroforética, a ativação do fator de transcrição CREB; e por imunohistoquímica, a quantidade de núcleos neuronais positivos para c-fos. Os ensaios comportamentais e as análises bioquímicas foram realizados sempre 10 dias após o estresse agudo de contenção (2h). Aqui, observamos que a exposição ao estresse agudo por contenção induziu um estado do tipo ansioso tardio e que o tratamento prévio com atenolol impediu este efeito nos animais estressados. Além disso, o estresse aumentou a expressão de EGR-1, indicando aumento da atividade neuronal no BLA, efeitos não encontrados nos animais tratados com atenolol. Não encontramos alterações na fosforilação de ERK, na ativação de CREB e na expressão de c-Fos. Nossos dados sugerem, portanto, que a sinalização adrenérgica/noradrenérgica periférica pode ter relevante função na modulação do comportamento do tipo ansioso tardio (10 dias) induzido por um único estresse de contenção.

Palavras-chave: estresse psicológico, ansiedade, receptores adrenérgicos, complexo basolateral da amígdala, excitabilidade neuronal.

ABSTRACT

Perfetto, JG. The blockage of peripheral β 1-adrenergic receptors prevents the restraint stress-induced long-lasting anxiety in wistar rats. [Masters Thesis (Pharmacology)]. São Paulo: Biomedical Science Institut, São Paulo University; 2016.

Pathological anxiety triggers several endocrinal, neuronal and behavioural alterations. Stress, an important cause of this pathology, activates the HPA axis (hypothalamus-hypophysis-adrenal axis), releasing hormones such as glucocorticoids (GCs) and epinephrine (Epi) and neurotransmitters such as norepinephrine (NE). In the central nervous system (CNS), stress-induced changes in excitability/architecture of neurons in the pre-frontal cortex, hippocampus and basolateral complex of amygdala (BLA) are well known, highlighting the central role of GCs receptors (GR) and NE receptors. The BLA, an autonomic, behavioral and hormonal regulatory center, expresses GR and NE receptors, both having crucial role in the neuronal remodeling. Nevertheless, it is necessary more studies about the periphery-CNS communication on the development of stress-induced late anxiety and about the function of the peripheral β 1-adrenergic receptor in this disease progression. In addition, investigation about the intracellular mechanisms related to the stress-induced late anxiety and the morphological and behavior changes are uncommon. Therefore, in this study, using atenolol (β 1 receptor antagonist) and metyrapone (synthesis inhibitor of GCs), we sought to investigate the peripheral influence of β 1-adrenergic receptors and GR, respectively, in the acute (2 h) restraint stress-induced late anxiety, observed 10 days after stress. Male Wistar rats, (220 – 250 g, 60 days old), went through the elevated plus maze or open field tests to verify the anxiety-like behavior. Using *western blot*, we analysed, in the BLA of rats, the MEK-ERK-CREB intracellular signaling activation and EGR-1 expression (neuronal activation marker); by electrophoretic mobility shift assay, we measured the activation of the transcription factor CREB. The behaviors and biomolecular assays were always performed ten days after the acute restraint stress (2 h) session. Here, we have found that stress induced late anxiety-like behavior, an effect not observed in atenolol pre-treated stressed animals. In addition, stress increased EGR-1 expression and, pointing to increased BLA neuronal activity, an effect not found in atenolol pre-treated stressed animals, as well. Acute restraint-stress did not modulate ERK phosphorylation, CREB activation or c-Fos expression in the BLA of rats, disregard atenolol pre-treatment. Our findings suggest that peripheral adrenergic/noradrenergic signaling may have a relevant function in long-lasting anxiety-like behavior (10 days) induced by a single episode of restraint stress.

Keys-words: psychological stress, anxiety, adrenergic receptors, amygdala basolateral complex, neuronal excitability.

Lista de abreviaturas e siglas

AMPA: Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropinoico

ANOVA: Análise de variância

AT: Atenolol

AT/S: Atenolol estresse

BLA: Complexo amigdalóide basolateral

Ca⁺⁺: Íon cálcio

CORT: Corticosterona

CREB: Proteína de ligação aos elementos responsivos ao cAMP (response element binding protein)

CREB-1: Proteína de ligação dos elementos responsivos ao cAMP 1 (cAMP response element binding protein 1)

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DTT: Ditioneitol

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

EGR-1: Proteína de resposta imediata ao crescimento 1 (Early growth response protein 1)

EMSA: Ensaio de retardamento da Mobilidade Eletroforética em Gel

ERK 1/2: Quinase regulada por sinais extracelulares (Extracellular signal-regulated kinase)

GH: Hormônios glicocorticoides

GR: Receptor de glicocorticoide

HEPES: 4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid

HPA: Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

K⁺: Íon potássio

KCl: Cloreto de potássio

KH₂PO₄: Fosfato de potássio monobásico

LA: Núcleo lateral da amígdala

MAPK: Proteína quinase ativada por mitógenos (Mitogen-activated protein kinases)

MEK: Quinase de MAPK (Mitogen-activated protein kinases)

MgCl₂: Cloreto de magnésio

MR: Receptor de mineralocorticoides

mRNA: Ácido ribonucleico (mensageiro)

Na⁺: Íon sódio

Na₂HPO₄: Fosfato de sódio bibásico

NaCl: Cloreto de sódio

NaHCO₃: Bicarbonato de sódio

NE: Noradrenalina

NMDA: N-metil-D-aspartato

PBS: Tampão salina fosfato

PMSF: Fluoreto de fenilmetilsulfonil

Rpm: Rotações por minuto

SAL: Salina

SAL/S: Salina estresse

SDS: Dodecil sulfato sódico

TBE: Tampão Tris/Borato/EDTA

TBS: Tampão Tris-salina

Tris-HCl: Hidroximetil (aminometano-cloridrato) TRIS hydrochloride

Lista de ilustrações

Figura 1 - Esquema ilustrativo do delineamento experimental realizado.....	27
Figura 2 - Estresse agudo de contenção (2 h) promove, após 10 dias, comportamento do tipo ansioso em ratos.....	29
Figura 3 - Administração sistêmica de atenolol, porém não de metirapona, impediu o surgimento do comportamento do tipo ansioso 10 dias após estresse agudo de contenção.....	31
Figura 4 - Distância percorrida pelos animais no teste de LCE e dosagens séricas de CORT, após 10 dias do estresse de contenção.....	32
Figura 5 - Fosforilação de ERK no BLA de animais 10 dias após estresse agudo de contenção, tratados ou não com atenolol.....	34
Figura 6 - Ativação de CREB no BLA de animais 10 dias após estresse agudo de contenção, tratados ou não com atenolol.....	35
Figura 7 - Estresse agudo de contenção promove, 10 dias após, aumento da expressão de EGR-1 no BLA de ratos, efeito não visto nos animais tratados com atenolol.....	36
Figura 8 - Número de núcleos C-FOS positivos no BLA de ratos 10 dias após o estresse de contenção de 2 horas.....	37
Figura 9 - Fotomicrografias ilustrando o efeito, a longo prazo (10 dias), do estresse agudo de contenção e do tratamento com atenolol na expressão de c-fos no BLA de ratos.....	38
Figura 10 - Esquema ilustrativo da comunicação periferia-SNC após liberação de NE decorrente de estresse em ratos.....	41

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivos específicos.....	19
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1 Animais.....	20
3.2 Administração Intraperitoneal dos fármacos.....	20
3.3 Estresse agudo de contenção.....	20
3.4 Teste de ansiedade (LCE e CA).....	21
3.5 Eutanásia dos animais, obtenção e análise do material biológico.....	22
3.5.1 Extração de proteínas citosólicas e nucleares.....	22
3.5.1.1 <i>Determinação da concentração de proteínas.....</i>	<i>23</i>
3.5.2 Análise da concentração de corticosterona sérica.....	23
3.5.3 Ensaio de Western blot.....	23
3.5.4 Revelação e análise do filmes.....	24
3.5.5 Ensaio de retardo da mobilidade eletroforética em gel de poliacríamida (EMSA).....	24
3.5.5.1 <i>Marcação da sonda.....</i>	<i>24</i>
3.5.5.2 <i>Reação de ligação e corrida do gel.....</i>	<i>25</i>
3.6 Ensaio de imunohistoquímica para c-fos.....	25
3.7 Análise estatística dos resultados.....	26
3.8 Delineamento experimental.....	27
4 RESULTADOS.....	28
4.1 Efeitos do estresse agudo de contenção no comportamento do tipo ansioso tardio.....	28
4.2 Participação da NE e de CORT nos efeitos do estresse agudo no comportamento do tipo ansioso tardio	30
4.3 Distância percorrida no LCE e dosagens séricas de CORT dos grupos controles e tratados após 10 dias do estresse.....	31
4.4 Participação da NE e da via ERK-CREB-EGR1 nos efeitos do estresse agudo no comportamento ansioso tardio dos animais	32
4.4.1 <i>Ativação da enzima ERK1/2</i>	<i>33</i>

4.4.2 Ativação do fator de transcrição CREB.....	34
4.4.3 Expressão de EGR1.....	35
4.5 Efeito do estresse de contenção de duas horas na expressão de c-fos no BLA de ratos 10 dias após o estresse.....	37
5 DISCUSSÃO.....	39
6 CONCLUSÕES.....	45
REFERÊNCIAS.....	46

1 INTRODUÇÃO

Segundo o Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, no Brasil, aproximadamente 12% da população é ansiosa, o que representa 24 milhões de brasileiros com ansiedade patológica. O mesmo instituto estima, também, que 23% da população brasileira terá algum tipo de distúrbio relacionado à ansiedade ao longo da vida¹.

A ansiedade é uma qualidade natural dos seres humanos que os prepara para inúmeras situações emergenciais ou de grande impacto. No entanto, a ansiedade patológica caracteriza-se por sensações difusas semelhantes ao medo, muitas vezes sem a existência de um perigo real. Essas sensações são, na maioria dos casos, exageradas quanto à intensidade e duração. Nesse estado, diversas transformações comportamentais, neuronais e endócrinas ocorrem, alterando essa qualidade natural [1-4]. Muitas destas mudanças são originadas por diferentes estímulos estressores [2], a citar: excesso de trabalho, excesso de informações, falta de lazer, trânsito intenso, ou seja, estresses de uma rotina de vida urbanizada que cada vez mais torna-se parte substancial da vida das pessoas. O mesmo ocorre em situações de grande impacto emocional como, por exemplo, um acidente automobilístico, a morte de um parente estimado, um evento de furto ou roubo, entre inúmeros outros incidentes. Assim, de modo geral, o estresse desencadeia respostas fisiológicas imediatas que são preparatórias para situações de desafio (luta, fuga) e também promove alterações adaptativas que podem persistir ao longo do tempo [5]. Desse modo, o tempo é fundamental para que ocorram as mudanças fisiológicas, morfológicas e biomoleculares decorrentes da ansiedade induzida por estresse.

Uma crise de estresse/ansiedade pode surgir por meio de pistas prévias (recordações de eventos estressantes) ou pode simplesmente aparecer sem qualquer pista aparente. Fisiologicamente, a crise de ansiedade ou situações de perigo/estresse ativam o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), liberando hormônios como os glicocorticoides (GCs), importantes no desenvolvimento das alterações neuronais e comportamentais associadas à resposta ao estresse [6-8]. Além disso, o estresse promove ativação do sistema nervoso simpático, desencadeando a liberação de epinefrina (Epi) e norepinefrina (NE) da medula da

¹ Fonte: Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (Ipq-HCFMUSP).

glândula adrenal e NE dos terminais dos nervos simpáticos distribuídos pelo corpo [71]. Alguns dos efeitos dessas liberações são o aumento da pressão arterial e batimentos cardíacos, o aporte de energia estocada para os músculos e inibição da digestão [72]. Uma vez liberados periféricamente, os GCs, por atravessarem a barreira hemato-encefálica, exercem efeitos diretamente sobre estruturas do SNC tal como o complexo basolateral da amígdala (BLA), córtex pré-frontal e hipocampo [71], além do efeito inibitório direto na atividade do eixo HPA, via sistema nervoso central (SNC) [73]. Entretanto, as catecolaminas liberadas periféricamente não passam a barreira hemato-encefálica, e por isso não influenciam diretamente nas estruturas encefálicas envolvidas na regulação da atividade do sistema simpatoadrenal [74]. Essa característica das catecolaminas mostra que o SNC e a periferia (vísceras) estão envolvidos em um constante fluxo de comunicação bilateral (SNC-víscera e víscera-SNC) [63]. Um dos elementos chave dessa comunicação periferia-SNC é o nervo vago, que leva informações viscerais pelas fibras aferentes até estruturas como o núcleo do trato solitário (NTS). Esta estrutura distribui tais informações para outros núcleos do tronco encefálico como o *locus ceruleus* (LC, principal região liberadora de NE no SNC) e para estruturas como tálamo, hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal [75]. Por possuírem receptores, essas informações podem ser moduladas periféricamente pela ativação/bloqueio de receptores beta-adrenérgicos localizados em neurônios aferentes e eferentes do nervo vago [76].

O hipocampo, a amígdala e o córtex pré-frontal possuem projeções neurais recíprocas [9] que evidenciam forte relação interestruturas [4, 10-12] e são amplamente descritos na literatura como estruturas importantes em eventos de medo/ansiedade. Em humanos, alguns estudos com imagens de ressonância magnética também mostraram notável interação entre essas regiões, reforçando a importância delas nos distúrbios de ansiedade [13]. Outras estruturas como NTS, LC, hipotálamo e tálamo também desempenham funções centrais em resposta ao estresse. Porém, uma estrutura chave na detecção da ameaça/estresse e na orquestração das respostas ao estresse entre SNC e periferia é a amígdala. Sob estresse, esta estrutura tanto recebe informações do córtex, tálamo, hipocampo quanto emite informações que promovem ativação de diversas áreas como hipotálamo, sistema nervoso simpático e parassimpático, hipocampo, entre outras [5,71]. Assim, o BLA é um centro de regulação autonômico, comportamental e hormonal, além de modular diferentes regiões envolvidas em memória e

aprendizagem [77]. Essa região está bastante correlacionado à distúrbios desencadeados por estresse como síndrome do pânico [34], transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) [35] e ansiedade [36].

Estudos demonstraram alta densidade de receptores de glicocorticoides (GR) no BLA [14,15] e evidências sugerem que os efeitos do estresse agudo ou crônico se devam às ações dos GCs nessa área [11]. A administração, por exemplo, intra-BLA do hormônio corticosterona (CORT, o principal GCs encontrado em roedores) em ratos é capaz de desencadear uma resposta do tipo ansiosa, bem como provocar aumento da excitabilidade dos neurônios dessa região [16, 17]. Em um estudo, Mitra e Sapolsky (2008) mostraram que uma única dose de CORT é suficiente para induzir ansiedade e alterações morfológicas em neurônios no BLA após 12 dias, mas não 1 dia após sua administração [11]. Os mesmos autores mostraram ainda que a redução da sinalização, via GR, no BLA diminui a ansiedade e bloqueia a hipertrofia dendrítica de seus neurônios decorrente de administração aguda de CORT [18]. Isso não só revela a importância do hormônio no desencadeamento da ansiedade como também que alterações no BLA são graduais e necessitam um intervalo de tempo para ocorrerem.

No BLA, além da existência de GR, existem também receptores adrenérgicos do tipo α_1 , α_2 , β_1 , β_2 e β_3 [19] que atuam de modo importante no desenvolvimento da ansiedade. O receptor β_1 -adrenérgico, objeto de investigação deste trabalho, além da presença no BLA, é encontrado no nervo vago [76], no coração, musculatura lisa gastrointestinal e tecidos adiposos. Ele possui igual afinidade para Epi e NE [82] e é bloqueado seletivamente pelo atenolol e metoprolol.

Como mencionado anteriormente, situações de perigo/estresse ativam tanto o sistema nervoso autonômico simpático, que atua na glândula adrenal e causa a liberação de epinefrina e NE [2], quanto nos neurônios noradrenérgicos do LC, causando a liberação de NE em diversas regiões cerebrais como o BLA e hipocampo [2, 20, 21]. Tanaka e Ishii (2000), sugerem que a liberação de NE no hipotálamo, BLA e LC está envolvida no surgimento da ansiedade em animais submetidos ao estresse [22]. Assim, ambos mediadores (CORT e NE) têm papéis centrais nas alterações neuroendócrinas, morfológicas e comportamentais provocadas pelo estresse. E tais mediadores podem atuar, inclusive, sinergicamente, como mostrado no estudo de Emoto e colaboradores (1993) em que a administração intra cérebro ventricular (ICV) de fator liberador de corticotrofina (CRF), provocou um aumento de metabólito de NE

(3-metoxi-4-hidroxifeniletileneglicol sulfato-MHPG-SO₄) em diversas regiões cerebrais, entre elas o hipocampo, a amígdala, o córtex e o LC [31]. Sabe-se que o estresse ativa neurônios localizados no hipotálamo a liberarem CRF. Este fator, por sua vez, estimula a hipófise a liberar o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) que irá atuar na glândula adrenal promovendo a liberação de hormônios GCs [6]. É importante, portanto, destacar que neurônios noradrenérgicos de tais regiões, além de possuírem receptores de CRF, mantêm importante interação com o eixo HPA [31-32].

Um dos conhecimentos que fundamentam a hipótese desse trabalho em relação à influência dos receptores adrenérgicos periféricos no desenvolvimento do estado tipo ansioso em ratos está na reciprocidade de conexões entre o LC e BLA [23-25], além da comunicação nervo vago, NTS e LC [76], formando, portanto, uma via periferia-SNC (nervo vago-NTS/LC/BLA). Assim, o bloqueio de receptores β 1-adrenérgicos periféricos pelo atenolol (fármaco que não atravessa a barreira hematoencefálica) poderia modular essa via, influenciando o desenvolvimento do estado ansioso. Além disso, sabe-se que neurônios do LC que se projetam diretamente para o BLA são intensamente ativados após o estresse de contenção [26, 27]. Isso reforça, portanto, a idéia de que o LC envia informações sobre o estímulo estressor ao BLA, que modula respostas comportamentais, tais como o destacado envolvimento da ativação noradrenérgica na consolidação de memória, principalmente as de conteúdo emocional aversivo [28-30]. Infusões de NE no BLA, mas não no núcleo central da amígdala, de ratos e camundongos imediatamente após o treino de tarefas com conteúdo emocional aumenta a consolidação da memória nessas tarefas, enquanto que o bloqueio de NE pelo propranolol, antagonista β -adrenoceptor, reduz tal fenômeno [78-79]. Ademais, a NE também tem papel importante na habituação fisiológica (eixo HPA, sistema nervoso autônomo) e comportamental de ratos a estresses repetidos, sendo que a administração de propranolol (antagonista β adrenérgico não seletivo) diminui tal habituação [33].

Como foi descrito acima, o estresse, uma das causas da ansiedade mais estudadas atualmente, provoca alterações no SNC. Dentre estas, vale destacar mudanças na arquitetura e densidade de espinhas dendríticas dos neurônios do BLA, efeitos relacionados à manifestação do estado ansioso [11]. Nessa mesma região, ocorre hipertrofia dendrítica permanente após estresses repetidos, mesmo 3 semanas após o estresse. Em relação à influência do estresse na atividade neuronal,

Rosenkranz et al (2010) [37], mostraram, por eletrofisiologia, que ocorre uma hiperexcitabilidade no núcleo lateral da amígdala após estímulo estressor psicológico, fato que pode ser associado ao estado ansioso. Ao contrário, no hipocampo e no córtex pré-frontal ocorre atrofia neuronal [38], além de um prejuízo no processo de neurogênese e redução do tamanho e da ramificação nos dendritos dos neurônios da mesma região [39-42]. Enquanto o estresse do tipo crônico por 10 dias aumenta o tamanho dos dendritos, ponto de ramificações, número de espinhas, tamanhos das espinhas no BLA, mas não na amígdala central [1, 43, 44], o estresse do tipo agudo (2 horas de contenção) não provoca alongação dendrítica, porém promove formação gradual de novas espinhas com o decorrer do tempo [1] e um único estresse prolongado (2 horas de contenção associado a nado forçado de 20 minutos) pode produzir alterações dendríticas semelhantes às provocadas pelo estresse crônico [45]. Esses dados sugerem, portanto, que as mudanças morfológicas e na excitabilidade neuronais no BLA induzidas pelo estresse podem estar fortemente associadas ao desenvolvimento do estado ansioso em animais.

Além de mudanças na morfologia celular, o estresse pode provocar alterações na bioquímica celular, dentre elas na sinalização intracelular das MAPKs (proteínas quinases ativadas por mitógenos). Um exemplo disso é a ativação da cascata ERK1/2 em diversas áreas do SNC induzidas por estresse agudo, sendo essa ativação componente essencial no controle dos circuitos neurais em respostas emocionais [60, 61]. Além disso, os níveis basais de ERK fosforilada, forma ativa da enzima, podem ser alterados pela ativação dos receptores beta-adrenérgicos [33]. Assim, o estresse agudo aumenta a quantidade de ERK fosforilada, enquanto que estresses repetidos causam uma diminuição, efeito não verificado com o bloqueio de receptores β -adrenérgicos. Isso sugere que a ativação desses receptores e a sinalização que decorre deste evento podem contribuir para habituação psicológica e consequente resiliência [33]. Podemos destacar também envolvimento dessa enzima em alterações sinápticas [53], ativação na amígdala e hipocampo após condicionamento ao medo [54-57] e inibição da consolidação de memória de condicionamento de medo pavloviano após bloqueio da sua fosforilação. Um alvo *downstream* à ativação de ERK é o fator de transcrição CREB, que uma vez fosforilado pela ERK, migra para o núcleo e se liga aos seus elementos responsivos (sítios CRE) nos genes por ele modulados como, por exemplo, o Egr-1. Este é um gene de expressão imediata cujos níveis proteicos se correlacionam à excitabilidade de neurônios. Além do Egr-1, outro

importante indicador de atividade neuronal é o proto-oncogene c-fos, que é esposto em neurônios após despolarização. O produto protéico pode ser detectado em neurônios por técnicas de imunohistoquímica após 20-90 minutos após a excitação neuronal, e desaparece após 4-16 horas [80].

Dentre os mediadores que atuam no BLA, CORT e NE exercem papéis cruciais nas alterações pós-estresse. No entanto, carece na literatura mais estudos sobre a comunicação periferia-SNC no estabelecimento da ansiedade e, principalmente, sobre qual seria a função de receptores adrenérgicos periféricos ($\beta 1$) na evolução dessa patologia. Além disso, faltam estudos comportamentais e biomoleculares que elucidem quais seriam os efeitos, a longo prazo, do estresse na excitabilidade neuronal e na bioquímica celular do BLA. Assim, considerando os atuais estudos na área e reconhecendo a importância do tema na sociedade, consideramos necessário investigar a influência da transmissão noradrenérgica periférica no desenvolvimento da ansiedade tardia (10 dias) induzida por estresse.

2 OBJETIVOS

Sabendo que o estresse pode ser causa de um estado tipo ansioso patológico que desencadeia inúmeras alterações comportamentais, endócrinas e neuronais [1-4], este trabalho teve como objetivo investigar, em ratos wistar, se o estresse agudo é capaz de promover um comportamento do tipo ansioso 10 dias após um único evento estressor (contenção por 2 horas), bem como investigar o papel da transmissão noradrenérgica/adrenérgica e dos glicocorticoides nesse comportamento. Adicionalmente, investigamos se o estresse agudo foi capaz de alterar a excitabilidade neuronal e ativar a via de sinalização intracelular MEK-ERK-CREB no BLA de ratos 10 dias após um único evento estressor.

2.1 Objetivos específicos

- Investigar a participação da NE, via receptores adrenérgicos periféricos $\beta 1$ e dos GCs, via GR, desenvolvimento do comportamento do tipo ansioso tardio (10 dias após estresse) por meio de administração sistêmica de atenolol (antagonista seletivo para o receptor $\beta 1$ adrenérgico) ou metirapona (inibidor de síntese de GCs).
- Investigar no BLA: por *western blot*, a ativação de ERK e a expressão de Egr-1, marcador de atividade neuronal; por ensaio de retardo de mobilidade eletroforética, a ativação do fator de transcrição CREB; e por imunohistoquímica, a excitabilidade de neurônios por meio da proteína c-fos (marcador da atividade neuronal).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados como sujeitos experimentais ratos machos da linhagem *Wistar* provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, obtidos com 2 meses de idade (250-300 g). Os animais foram acondicionados, em grupos de 3, em gaiolas padrão de polipropileno (com medidas de 30 x 37 x 18 cm) por um período de 10 dias. Os animais ficaram alojados com livre acesso à água e ração, em biotério mantido sob ciclo de luminosidade claro-escuro de 12 horas (luz acessa às 6 hs) e sob controle de temperatura (23 ± 2 °C). Os procedimentos experimentais utilizados seguiram as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (n.131, fls.12, livro13) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP) e foram conduzidos de forma a reduzir ao máximo o sofrimento e o número de animais utilizados.

3.2 Administração intraperitoneal dos fármacos

Todos os animais (exceto o grupo controle) receberam tratamento farmacológico do seguinte modo: o grupo atenolol recebeu o fármaco dissolvido em salina (0,9%) em uma concentração final de 5 mg/ml [5, 89, 91]; o grupo metirapona (50 mg/kg) recebeu o fármaco dissolvido em salina. A dose de metirapona escolhida foi baseada em estudos prévios do laboratório (Malta et al, em preparação); o grupo salina recebeu o mesmo volume de solução salina (0,9%) dos grupos atenolol e metirapona. Todos os animais (inclusive o controle) receberam manipulações prévias para minimizar o efeito estressante da injeção. O atenolol é um fármaco hidrofílico que não atravessa a barreira hemato-encefálica [88].

3.3 Estresse agudo de contenção

As sessões de estresse ocorreram no período da manhã, sempre entre 9:00 e 11:00 hs. O aparato utilizado para a contenção dos animais consiste em um cilindro de PVC opaco (marrom) de 20 cm de comprimento e 6 cm de diâmetro, com uma das extremidades fechadas e furos que permitem a circulação de ar. Quando contido, atentamos para que o animal não tivesse suas fezes em contato com o corpo nem que a cauda permanecesse levantada, pois estes fatores poderiam causar um

estímulo estressor mais severo do que o desejado. Os animais ficaram contidos no aparato por um período de 2 hs sob constante observação do experimentador.

3.4 Testes de ansiedade (LCE e CA)

Para a análise do comportamento do tipo ansioso, parte dos animais foram submetidos ao labirinto em cruz elevado (LCE) e outra parte, ao campo aberto (CA) após 10 dias do estresse. Para o LCE, cada animal foi exposto ao labirinto por 5 minutos e eutanasiados imediatamente ou 90 minutos após o teste. O labirinto consiste de dois braços abertos (50 x 10 cm, sem paredes) dispostos em posições opostas e dois braços fechados (50 x 10 cm, circundados por parede de 40 cm de altura), também em posições opostas, de tal forma que os braços abertos fiquem em posição perpendicular aos braços fechados, com um espaço central (10 x 10 cm) que conecte os quatro braços. O aparelho é constituído de madeira tratada com tinta fosca e suspenso a 50 cm do assoalho por um suporte central. Todo procedimento foi filmado por uma câmera de vídeo suspensa sobre o aparelho para posterior análise. Os animais de todos os grupos experimentais foram introduzidos individualmente no centro do labirinto, com total liberdade para poder percorrê-lo ao longo de 5 minutos. Os parâmetros analisados foram a frequência de entradas em braços abertos (razão entre o número de entradas em braços abertos pelo número total de entradas nos braços), a taxa de permanência nos braços abertos (razão entre o tempo despendido nos braços abertos pelo tempo total despendido nos braços) e o numero total de entrada nos braços. A colocação das quatro patas foi o critério para definir a entrada do animal nos braços e/ou no quadrado central do labirinto. Os animais que caíram do labirinto foram excluídos do teste. O teste de campo aberto consiste em uma plataforma circular (61 cm x 45 cm, diâmetro x altura) com o chão dividido em 12 seções equivalentes que representam duas zonas concêntricas: uma central e outra periférica. Cada animal colocado sempre em uma mesma seção de uma área periférica e seus movimentos foram gravados por 5 minutos. O número de entradas no centro (contabiliza-se como entrada quando o animal está com as 4 patas na área central) e o tempo gasto nesta região foram quantificados. Para as análises de distância percorrida, contabilizamos o deslocamento total nos quatro braços do LCE. A contagem foi feita no programa Any Maze, versão 4.99. Os animais foram testados entre 8 e 12 hs e ao término de cada teste, os aparatos foram limpos com uma solução

de álcool a 5% para minimizar a influência de eventuais odores deixados pelos animais.

3.5 Eutanásia dos animais, obtenção e análise do material biológico

Os animais foram eutanasiados por decapitação e o encéfalo rapidamente retirado em solução fria de tampão salina-fosfato (NaCl 137 mM, KCl 2,68 mM, KH_2PO_4 1,27 mM, Na_2HPO_4 8,06 mM). Para auxiliar a dissecação da amígdala, os encéfalos ficaram acondicionados em uma matriz encefálica acrílica de corte coronal de espessura de 1 mm (Zivic Laboratories Inc., Portersville, P.A., USA), própria para dissecação de estruturas pequenas em tecido fresco. O BLA foi dissecado bilateralmente sobre uma placa gelada e imerso em nitrogênio líquido. As estruturas encefálicas foram estocadas a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ para uso posterior. O soro dos animais foi obtido a partir da coleta de sangue do tronco do animal no momento da decapitação, com o auxílio de um funil de vidro, em um tubo cônico de 15 mL, após centrifugação à 4.000 g por um período de 10 minutos.

3.5.1 Extração de proteínas citosólicas e nucleares

As estruturas encefálicas armazenadas a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ foram descongeladas e homogeneizadas por contato direto vidro-vidro em tampão de lise (10 mM HEPES; 1,5 mM MgCl_2 ; 10 mM KCl; 2,5 $\mu\text{g/mL}$ leupeptina; 2,5 $\mu\text{g/mL}$ antipaína; 0,5 mM PMSF; 20 mM pirofosfato de sódio; 30 mM fluoreto de sódio, 5 mM β -glicerofosfato, 0,1 mM DTT e água bidestilada) seguida de centrifugação a 11.000 g por 30 segundos à $4\text{ }^\circ\text{C}$. O sobrenadante, contendo proteínas citoplasmáticas, foi coletado em tubo e armazenado a $-80\text{ }^\circ\text{C}$. O pellet foi, então, ressuspensionado em tampão de extração nuclear (20 mM HEPES; 1,5 mM MgCl_2 ; 300 mM NaCl; 0,25 mM EDTA; 2,5 $\mu\text{g/mL}$ leupeptina; 2,5 $\mu\text{g/mL}$ antipaína; 0,5 mM PMSF; 20 mM pirofosfato de sódio; 30 mM fluoreto de sódio, 5 mM β -glicerofosfato; 25% glicerol e água bidestilada) e incubado por 30 minutos em gelo. Após o período de incubação, o extrato foi centrifugado a 20.000 g por 5 minutos a $4\text{ }^\circ\text{C}$. O sobrenadante, contendo as proteínas nucleares, foi recolhido em tubo e estocado a $-80\text{ }^\circ\text{C}$. As amostras citoplasmáticas e nucleares permaneceram congeladas até o momento da quantificação da concentração de proteínas.

3.5.1.1 Determinação da concentração de proteínas

A dosagem foi realizada através do método de Bradford® [46], utilizando reagente da Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA) e subsequente medição da absorbância no comprimento de onda de 595 nm no equipamento Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader (BioTek instruments, Inc, USA). A comparação com uma curva de diluição de albumina (Bio-Rad Laboratories, Inc, USA) forneceu a concentração de proteínas presente nas amostras.

3.5.2 Análise da concentração de corticosterona sérica

Para a análise dos níveis séricos de corticosterona, utilizamos o kit Corticosterone EIA kit® (Enzo Life Sciences, Inc, UK), de acordo com a orientação do fabricante. As amostras de soro foram diluídas 30 vezes em tampão de ensaio fornecido pelo kit para que se ajustassem à faixa ótima da curva padrão.

3.5.3 Ensaio de Western blot

O ensaio de Western blot foi baseado no descrito por Laemmli (1970) [47]. As proteínas (extrato citosólico para ERK/P-ERK; extrato nuclear para Egr-1) foram ajustadas na quantidade de 5 ou 10 ug com o tampão de amostra (0,125 M tris-HCl; 4% de SDS; 20% v/v glicerol; 0,2 M de DTT; 0,02% de azul de bromofenol; pH 6,8) e fervidas por 5 minutos a 95 °C. O conteúdo total do meio de reação foi aplicado no gel de SDS-poliacrilamida 10% (acrilamida/bisacrilamida (37, 5:1), 10% SDS) para que ocorresse a separação das proteínas contidas na amostra. No mesmo gel foi adicionado um padrão de peso molecular. Para a eletroforese, foi utilizado um tampão de corrida consistindo em 25 mM de tris-base, 0,192 M de glicina, 0,1% de SDS e água bidestilada. O gel foi exposto a eletroforese por aproximadamente 2 hs a 90 V. Ao final da corrida, as proteínas separadas e contidas no gel foram transferidas eletroforeticamente para uma membrana de PVDF (Millipore corporation, Billerica, MA, USA) por aproximadamente 2 hs a 400 mA. Para a transferência foi utilizado um tampão contendo 25 mM de tris-base, 192 mM de glicina, 20% de metanol e água bidestilada. Após a transferência, as membranas foram coradas com solução de vermelho de Ponceau (0,5% Ponceau-S; 5% ácido tricloro acético e água bidestilada) [48], lavadas com água destilada até tirar todo o excesso da solução corante e deixadas por 2 hs à temperatura ambiente em uma solução contendo TBS (100 mM

tris-base; 0,9% NaCl e água bidestilada), 0,5% de leite desnatado e 0,1% de Tween 20 para bloquear ligações inespecíficas com o anticorpo. Após essa etapa, as membranas foram lavadas 5 vezes em solução de TBS-T (TBS; 0,1 % Tween 20) e incubadas com o anticorpo primário diluído em TBS-T “overnight” a 4 °C: anti-Egr-1 (coelho, 1:1000; Santa Cruz Biotechnology Inc, USA), anti-Erk/P-ERK [coelho, (ERK, 1:4000 e P-ERK, 1:2000); Santa Cruz Biotechnolog Inc, USA)]. As membranas foram, então, novamente lavadas 5 vezes com TBS-T e incubadas com os anticorpos secundários anti-coelho [(cabra, (Egr-1,1:40000, ERK/P-ERK, 1:20000; KPL, Kirkegaard & Perry Laboratoies Inc, USA)] por 2 horas. A revelação foi feita através do kit de quimioluminescência ECL-Amersham® (General Eletric Company, USA).

3.5.4 Revelação e análise dos filmes

Os filmes foram revelados em sala escura em máquina de revelação automática Hyper Processor (Amersham Biosciences Piscataway, NJ, EUA). As imagens foram fotocopiadas digitalmente em resolução 600 dpi e a densidade óptica das bandas analisadas com auxílio do programa ImageJ® (Image Processing and Analysis in Java, NIH, MD, USA).

3.5.5 Ensaio de retardo da mobilidade eletroforética em gel de poliacríamida (EMSA)

3.5.5.1 Marcação da sonda

O oligonucleotídeo de DNA contendo a seqüência de ligação para o fator de transcrição do CREB (Promega corporation, Madison, WI, USA; E328b) foi marcado com a adição de γ -32P ATP em uma solução contendo tampão T4 quinase, enzima T4 quinase e água nas concentrações de: 3,5 pmol de oligonucleotídeo, 1U/ μ L de T4 quinase, 1 μ L de γ -32P ATP (111 GBq/mmol) (1 Ci=3,7 GBq), 1 μ L de tampão T4 quinase (10 X) em 10 μ L de volume de reação. Após incubação à 37 °C por 10 minutos, o excesso de γ -32P ATP foi retirado com resina sephadex® (Microspin G-25; Millipore corporation, Billerica, MA, USA), as colunas foram colocadas em um tubo de microcentrifuga e submetidas à centrifugação por 1 minuto a 3.000 rpm. Em seguida, as colunas foram transferidas para um novo tubo e o volume total da sonda marcada foi aplicado no centro da resina. Após centrifugação, o eluato contendo a

sonda foi recolhido e, no dia do ensaio, a atividade da sonda foi determinada. Para o ensaio foi utilizado aproximadamente 22.000 cpm/ μ L.

3.5.5.2 *Reação de ligação e corrida do gel*

Foram adicionados a um tubo de microcentrífuga: 4 μ L de tampão de ligação 5X (MgCl₂ 5 mM; EDTA 2,5 mM; DTT 2,5 mM; NaCl 300 mM; Tris-HCl 50 mM pH 7,5; Poly dIdc 0,25 μ g/ μ L; glicerol 20%); extrato nuclear (3 μ g de proteína); oligonucleotídeo frio em excesso (10 X concentrado em relação à sonda marcada), ou anticorpo específico para as subunidades anti-pCREB (0,02 μ g/ μ L; Santa Cruz Biotechnology, Inc), anti-CREB-1 (0,02 μ g/ μ L; Santa Cruz Biotechnology, Inc), ou o oligonucleotídeo inespecífico TFIID 10 X concentrado em relação à sonda marcada (Promega corporation, Madison, WI, USA; E322B) e H₂O q.s.p. para 20 μ L de volume final (contando com a adição da sonda marcada). O tubo foi incubado por 20 minutos à temperatura ambiente, adicionando-se em seguida a sonda marcada (1 μ L), e novamente o tubo foi incubado por 30 minutos à temperatura ambiente. A corrida foi visualizada com a adição de 1 μ L de azul de bromofenol ao controle negativo. O conteúdo total do meio de reação foi aplicado no gel de poliacrilamida 5,5% [acrilamida/bisacrilamida (37,5:1)]. Para a eletroforese foi utilizado um tampão de corrida consistindo em 0,5 x TBE (1 X TBE = Tris 90 mM, Ácido Bórico 90 mM, EDTA 1 mM). O gel foi corrido por volta de 2 horas a 150-160 V. Ao final da corrida, o gel foi secado procedendo-se em seguida a exposição do filme ao gel em cassete a -80 °C, pelo período de 2 dias, seguida da revelação do filme.

3.6 Ensaio de imunohistoquímica para c-fos

Ratos foram anestesiados com sobredose de Isoflurano e perfundidos intracardialmente com 250 ml de salina (0,9%) seguido por 500 ml de paraformaldeído gelado (4%) em PBS (Ph:7,4). Os cérebros foram removidos, pós fixados por 24 horas e crioprotégidos em solução de sacarose 30%. Secções do cérebro de 40 μ m foram cortadas com um criostato e reservadas em solução anti-freezing em -20°C. Os cortes foram incubados por 48 h em anticorpo primário policlonal de coelhos da proteína c-Fos (San Diego, CA 92121 United States Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) diluído 1:10.000 em solução salina fosfato, 0.3% triton e 3% solução bloqueio de soro de burro. Após lavagens em PBS, os cortes foram incubados em Imunoglobulinas G (IgG) anti-coelho biotiniladas feitas em cabra

(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) diluídas 1:800 em PBS e triton 0,5% durante 2 horas em temperatura ambiente. Cortes foram lavados e incubados no complexo avidina-biotina-peroxidase (0.9% avidin and 0.9% biotin solutions; Vectastain Elite ABC Kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Após 90 min, os cortes foram lavados em PBS e foram reagidos em 3,3-diaminobenzidine (0.5 mg/mL) DAB; Sigma, St Luis, MO, USA); com o cromógeno 0.01% H₂O₂ e 10% nickel–cobalt. Os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas e desidratadas em séries de alcoois, clarificada com xilol e montadas. Nós selecionamos cortes anteriores, mediais e posteriores da região do BLA para contagem das células positivas para c-Fos. Nesses cortes, todo BLA foi delimitado para contagem, sendo que o número de marcações positivas foi dividido pela área analisada. Foi tirada a média de todos os cortes de um mesmo animal, seguindo esse critério para os demais animais. As regiões foram orientadas pelo atlas Paxinos e Watson, 1998. Os cortes foram observados com um microscópio óptico (Olympus BX41), fotografias foram tiradas no formato jpg com aumento de 10 vezes com uma câmera digital (Evolution LC color) conectada ao PC. As contagens foram feitas pelo programa Image-Pro Plus 5.1 [81].

3.7 Análise estatística dos resultados

As diferenças entre os grupos experimentais foram detectadas por análise de variância (ANOVA) de um critério seguido pelo pós-teste de Tukey ou Teste t não pareado com correção de Welch's para comparação de dois grupos. Em todos os casos, foram adotados valores para $p < 0.05$ como estatisticamente significativos. Todas as análises foram realizadas no programa GraphPad Prism® para Windows versão 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA www.graphpad.com).

3.8 Delineamento experimental

Abaixo, apresentamos esquema ilustrativo do delineamento experimental utilizado nesse trabalho.

Figura 1. Esquema ilustrativo do delineamento experimental realizado.

Analizamos a participação dos GCs e NE liberados sistemicamente por exposição ao estresse agudo nas manifestações tardias do comportamento ansioso bem como nas alterações biomoleculares que ocorreram no complexo basolateral da amígdala (BLA). Nesta fase, ratos *Wistar* machos de 60 dias de idade, recebidos do biotério central do ICB, foram acomodados em 2 grupos: estressados (G1) e não estressados (G2). Os animais de cada grupo (G1 e G2) foram aleatoriamente alocados em 3 subgrupos distintos: 1) grupo atenolol (antagonista noradrenérgico $\beta 1$ seletivo 2) grupo metirapona (inibidor da síntese de GCs), 3) grupo salina, totalizando 6 grupos experimentais. Após permanecerem 10 dias no biotério de experimentação para ambientação, todos os animais receberam, por via intraperitoneal, os seguintes tratamentos: 1) atenolol; 2) metirapona; 3) solução salina. Os animais que compõem o G1 foram submetidos ao estresse agudo de contenção por duas horas e retornaram às suas gaiolas moradias. O grupo G2 permaneceu na gaiola moradia, e não recebeu nenhum tipo de estresse. Após 10 dias, todos os animais foram submetidos ao teste labirinto em cruz (LCE) elevado para avaliação do comportamento do tipo ansioso. Terminado o teste, parte dos animais foi imediatamente eutanasiada (decapitação por guilhotina com anestésico isoflurano) e teve seu encéfalo retirado. O BLA foi

dissecado e mantido em -80°C para para futura análise de expressão proteica. Outra parte foi perfundida com solução fixadora de formaldeído (4%) e os encéfalos foram retirados, crioprotégidos e estocados para processamento do material histológico. O campo aberto foi utilizado como teste comportamental complementar.

4 RESULTADOS

4.1 Efeitos do estresse agudo de contenção no comportamento do tipo ansioso tardio

É conhecido na literatura que o estresse de contenção por 2 horas induz um comportamento do tipo ansioso em ratos *Wistar* mesmo após 10 ou 12 dias do evento estressante [1, 49]. Assim, primeiramente, resolvemos replicar esse dado em nossas condições experimentais. Como o delineamento experimental proposto nesse trabalho envolve a administração de fármacos, os animais receberam injeção de salina i.p. e, após 30 minutos, foram submetidos ao estresse de contenção por 2 horas (SAL/S) ou não (SAL) e expostos ao LCE ou CA 10 dias após essa exposição. Utilizando o LCE, como podemos observar na figura 2, o estresse foi capaz de diminuir a porcentagem de entradas (fig.2A; $p=0.08$) e permanência (2C; $p<0.03$) dos animais nos braços abertos em relação aos animais não estressados, assim como foi capaz de diminuir a porcentagem de tempo gasto no centro do campo aberto (fig.2E, $p<0.05$), indicando um comportamento do tipo ansioso. Vale notar que os animais estressados exploram os braços fechados (fig.2B, D) tanto quanto os animais não estressados, indicando não haver alterações de locomoção entre eles.

Figura 2. Estresse agudo de contenção (2 h) promove, após 10 dias, comportamento do tipo ansioso em ratos. Animais controle estressados (SAL/S) apresentaram redução na frequência de entradas (A) e tempo de permanência (C) nos braços abertos quando comparados a animais controle não estressados (SAL). Não houve alteração na exploração dos braços fechados decorrente do estresse (B,D). Animais controle estressados (SAL/S) apresentaram redução na porcentagem de tempo de exploração no centro (E) do teste campo aberto (CA) quando comparados a animais controle não estressados (SAL). Os resultados estão exibidos como média $\pm$ erro padrão. (*) $p < 0.05$ vs SAL. Teste t com correção de Welch's. SAL, $n=10$ e SAL/S, $n=9$ (LCE); SAL, $n=9$ e SAL/S, $N=9$ (CA).

4.2 Participação da NE e de CORT nos efeitos do estresse agudo no comportamento do tipo ansioso tardio

Com a reprodução dos resultados da literatura em nossas condições experimentais, nosso próximo passo foi analisar a participação tanto de NE quanto de CORT no efeito persistente do estresse sobre o comportamento do tipo ansioso. Para tanto, foram feitas administrações (i.p) de atenolol e metirapona em animais submetidos ao estresse ou não, trinta minutos antes do mesmo.

Após dez dias do estresse, como pode ser observado na figura 4, os animais estressados tratados com atenolol (AT/S) apresentaram maior porcentagem de entradas (fig.4A) e permanência (fig.4B) nos braços abertos em relação aos animais estressados não tratados (SAL/S; fig.4B), porém não foi diferente dos animais controle não estressados (SAL), indicando um efeito protetor frente à manifestação do comportamento do tipo ansioso tardio decorrente do estresse. Embora não tenha havido diferença estatisticamente significativa na porcentagem de permanência nos braços abertos entre os animais SAL e SAL/S (Fig.4B), há forte evidência para tal ($P=0.056$), que poderia ser revelada com o aumento do número experimental. Intrigantemente, os animais não estressados tratados com atenolol (AT) comportaram-se de forma semelhante aos animais SAL/S (fig.4A, B). Por outro lado, a inibição da elevação dos níveis sistêmicos de corticosterona, pela ação da metirapona, não teve efeito sobre os animais independente se estressados ou não (fig.4C, D). Ainda que a administração de metirapona não tenha resultado em alterações comportamentais decorrentes ou não do estresse, a ampliação do número experimental faz-se necessária para uma conclusão segura.

Figura 3. Administração sistêmica de atenolol, porém não de metirapona, impediu o surgimento do comportamento do tipo ansioso 10 dias após estresse agudo de contenção. Animais estressados tratados com atenolol (AT/S) apresentaram maior porcentagem de entradas nos braços abertos quando comparados aos animais controle estressados (SAL/S; A) e maior permanência nos braços abertos quando comparados a SAL/S (B). Animais tratados com metirapona, estressados (MET/S) ou não (MET), não apresentaram diferenças na porcentagem de entradas (C) e permanência (D) nos braços abertos quando comparados a animais controles (SAL e SAL/S). Os resultados estão exibidos como média $\pm$ erro padrão, onde (*) $p < 0.05$ vs SAL/S (ANOVA de um fator, seguido pelo teste de Tukey; SAL, $n=9$; SAL/S, $n=9$; AT, $n=8$; AT/S, $n=7$; MET, $n=3$; MET/S, $n=4$).

4.3 Distância percorrida no LCE e dosagens séricas de CORT dos grupos controles e tratados após 10 dias do estresse

No intuito de investigar se o estresse de contenção ou a administração dos fármacos poderiam interferir no deslocamento do animal durante o teste LCE após 10 dias, efeito esse que influenciaria os resultados obtidos, resolvemos contabilizar a distância percorrida pelos animais nos 4 braços existentes durante os 5 minutos de teste. Como podemos observar na fig. 4A, não houve quaisquer diferenças significantes entres os grupos, validando assim os resultados obtidos na fig. 2, 3. Sabe-se que um dos principais mediadores liberados em decorrência de um evento

estressante são os GCs. Eles são importantes no desenvolvimento das alterações neuronais e comportamentais associadas à resposta ao estresse [6-8]. Assim, fizemos dosagens séricas de CORT nos animais 10 dias após o estresse de contensão de 2 horas. Nossa intenção foi investigar se uma possível alteração nesses níveis plasmáticos de CORT poderia estar envolvido com as alterações comportamentais promovidas pelo estresse. Como observado na fig.4B, não houve quaisquer diferenças no nível de corticosterona após 10 dias do estresse.

Figura 4. Distância percorrida pelos animais no teste de LCE e dosagens séricas de CORT, após 10 dias do estresse de contensão. Animais SAL/S, AT e AT/S não apresentaram diferenças estatisticamente significante em relação à na distância percorrida nos braços abertos e fechados no teste LCE (A) e em relação aos níveis séricos de CORT (B) quando comparados ao controle (SAL). Os resultados estão exibidos como média $\pm$ erro padrão (ANOVA de um fator, seguido pelo teste de Tukey; (SAL, n=13; SAL/S, n=13; AT, n=8; AT/S, n=9 para LCE); (SAL, N=7; SAL/S=8, AT=7; AT/S=8 para CORT). Programa Any Maze 4.99 foi utilizado para mensuração da distância percorrida.

4.4 Participação da NE e da via ERK-CREB-Egr-1 nos efeitos do estresse agudo no comportamento ansioso tardio dos animais

Como não observamos uma influência dos GCs no comportamento do tipo ansioso tardio induzido por estresse agudo, ao passo que a NE parece ter um efeito importante nesse paradigma, decidimos nos concentrar nesta via e analisar a influência da inibição dos receptores beta-adrenérgicos nos efeitos neurobiológicos decorrentes do estresse. Já está bem estabelecido na literatura a relação direta entre o aumento da excitabilidade dos neurônios do BLA e os sintomas de ansiedade [37] e que eventos com alto teor emocional (estressores) resultam em um aumento persistente das taxas de despolarização espontâneas de neurônios do BLA [50, 51].

Além de modificações funcionais dos neurônios do BLA pós situações estressantes, o entendimento da plasticidade neuronal característica das síndromes de ansiedade requer a compreensão dos mecanismos de sinalização intracelular a ela relacionados. Uma molécula envolvida nos efeitos induzidos por estresse muito estudada atualmente é a proteína quinase ERK (proteína quinase reguladora de sinais extracelulares), e seus respectivos alvos protéicos.

A partir dos resultados obtidos dos ensaios comportamentais, resolvemos então, investigar, no BLA, o estado de ativação da via ERK-CREB-Egr-1 nos animais controles e estressados, tratados ou não com atenolol. A expressão de Egr-1 foi utilizada como marcador de atividade neuronal, uma vez que este se correlaciona, de modo indireto, com a excitabilidade de neurônios.

4.4.1 Ativação da enzima ERK1/2

Como relatado anteriormente, investigamos a expressão da enzima ERK bem como sua forma fosforilada, no BLA de animais controles e estressados tratados ou não com atenolol. Todas as análises foram realizadas 10 dias após o tratamento e exposição ao estresse. A razão numérica entre a forma fosforilada e a fração total da enzima foi utilizada como índice de sua ativação. Como já conhecido, alterações nessa via de sinalização estão fortemente relacionadas a eventos aversivos como o estresse de contenção [33].

Como podemos observar na figura 7, não houve diferenças na ativação de ERK no BLA entre os quatro grupos experimentais, quando analisados 10 dias após o estresse.

Figura 5. Fosforilação de ERK no BLA de animais 10 dias após estresse agudo de contenção, tratados ou não com atenolol. Razão entre os níveis de pERK e ERK como indicativo de ativação de ERK em ratos tratados com atenolol ou salina, submetidos ao estresse (AT-S e SAL-S) ou não (AT e SAL). Os resultados estão exibidos como média $\pm$ erro padrão. ANOVA de um fator seguido pelo teste de Tukey; $n=4$.

4.4.2 Ativação do fator de transcrição CREB

Um alvo *downstream* à ativação de ERK é o fator de transcrição CREB, que migra para o núcleo da célula após sua fosforilação e transcreve genes (sítios CRE) como o EGR1. Dessa maneira, analisamos a ativação deste fator pelo ensaio de retardo de mobilidade eletroforética em gel de poliacrilamida (EMSA).

Como podemos observar na figura 8, não houve diferenças no nível de ligação de CREB no DNA em células do BLA entre os quatro grupos experimentais. A transiência da via de MAPks e a temporalidade de ativação de CREB podem ser uma explicação para o resultado, obtido 10 dias após o estresse de contenção.

Figura 6. Ativação de CREB no BLA de animais 10 dias após estresse agudo de contenção, tratados ou não com atenolol. Avaliação dos níveis de ligação de CREB no DNA do BLA de ratos tratados com atenolol ou salina, submetidos ao estresse (AT-S e SAL-S) ou não (AT e SAL). Os resultados estão exibidos como média $\pm$ erro padrão. ANOVA de um fator seguido pelo teste de Tukey; SAL-S e SAL, $n=5$; AT-S e AT; $n=4$.

4.4.3 Expressão de *Egr-1*

Um dos genes modulados pela ativação de CREB é o *Egr1*, um gene de expressão imediata cujos níveis protéicos indicam variações na atividade de neurônios.

Nossos resultados, ilustrados na figura 9, mostram que o estresse agudo de contenção promove, 10 dias após, aumento da expressão da proteína *Egr-1*, sugerindo maior atividade neuronal do BLA nesses animais. Animais tratados com atenolol, estressados (AT/S) ou não (AT), apresentaram o mesmo nível de expressão de *Egr-1* quando comparados aos animais controle não estressados (SAL), porém menor quando comparados aos animais estressados não tratados (SAL/S). Esse resultado mostra a importância da NE no aumento da atividade dos neurônios do BLA decorrentes do estresse, podendo explicar um mecanismo através do qual o tratamento prévio com atenolol previniu o desencadeamento do comportamento do tipo ansioso 10 dias após o estresse.

Figura 7. Estresse agudo de contenção promove, 10 dias após, aumento da expressão de Egr-1 no BLA de ratos, efeito não visto nos animais tratados com atenolol. Animais controle estressados (SAL/S) apresentaram níveis mais altos de expressão de Egr-1 quando comparados a animais controle não estressados (SAL). Animais tratados com atenolol estressados (AT/S) ou não (AT) apresentaram níveis de expressão de Egr-1 iguais aos animais SAL, porém menores do que os animais SAL/S. Os resultados estão exibidos como média $\pm$ erro padrão, onde (*) $p < 0.05$ vs SAL e (#) $p < 0.01$ vs SAL/S. (ANOVA de um fator, seguido pelo teste de Tukey $n=4$ para todos os grupos).

4.5 Efeito do estresse de contenção de duas horas na expressão de c-Fos no BLA de ratos 10 dias após o estresse

A proteína c-Fos é um proto-oncogene que é expresso em neurônios após despolarização. Em nossos resultados, fig.9, não encontramos alterações no número de núcleos positivos para c-Fos no BLA de ratos após 10 dias do estresse. Porém, a comparação entre SAL X SAL/S ($p=0.08$) e SAL/S x AT/S ($p=0.06$), por teste t student com correção de Welch's, nos mostra uma tendência de aumento da expressão de c-Fos, efeito abolido pelo tratamento com atenolol. Esse dado corrobora, ainda que parcialmente, nossos dados anteriores em relação ao Egr-1, reforçando a idéia de que mesmo após 10 dias do evento estressor, ainda existe uma indicação de maior atividade de neurônios do BLA. Ilustrações de fotomicrografias desses resultados podem ser vistas na fig.10.

Figura 8. Número de núcleos c-Fos positivos no BLA de ratos 10 dias após o estresse de contenção de 2 horas. Animais controle estressados (SAL/S) não apresentaram diferenças número de núcleos positivos de c-Fos no BLA quando comparados a animais controle não estressados (SAL). Animais tratados com atenolol, estressados (AT/S) ou não (AT), apresentaram número de núcleos c-Fos semelhantes aos animais SAL. Os resultados estão exibidos como média $\pm$ erro padrão. (ANOVA de um fator, seguido pelo teste de Tukey) SAL, n=5; SAL/S, n=5; AT, n=4; AT/S, N=4).

4.6 Ilustração de fotomicrografias mostrando o efeito do estresse de contenção de 2 horas na expressão de c-Fos no BLA de ratos 10 dias após o estresse

Figura 9. Fotomicrografias ilustrando o efeito, a longo prazo (10 dias), do estresse agudo de contenção e do tratamento com atenolol na expressão de c-Fos no BLA de ratos. A) Ilustração da região da amígdala (aumento 4x); B) SAL; C) SAL/S; D) AT; E) AT/S (aumento 10x). Abreviações dos núcleos amígdalares: BLA, núcleo basolateral; Me, núcleo medial; Ce, núcleo central. Setas indicando núcleos positivos para c-fos. Barra de escala representa 100µm. Animais: SAL, salina; SAL/S, salina estresse; AT, atenolol; AT/S, atenolol estresse.

5 DISCUSSÃO

Neste estudo, foram feitos testes comportamentais, manipulações farmacológicas e testes biomoleculares na tentativa de revelar como funcionam parte dos mecanismos neurobiológicos da ansiedade induzida por estresse. Confirmando a literatura, após 10 dias de um evento estressor (contenção de 2 horas), os animais apresentaram comportamento do tipo ansioso. Esse dado sugere que transformações específicas no SNC pelas quais passam os animais submetidos ao estresse de contenção persistem ao longo do tempo. Uma dessas alterações é o aumento do número de espinhos dendríticos em neurônios do BLA, mesmo após dez dias sem qualquer evento estressante adicional. Tais alterações requerem um determinado período de tempo para ocorrer tendo em vista que trabalhos da literatura não mostraram aumento de espinhos dendríticos imediatamente após o estresse [11]. Isso poderia explicar, em parte, o motivo da existência do estado tipo ansioso 10 dias após estresse. No que se refere à alterações hemodinâmicas, o estresse aumenta tanto a pressão arterial média como os batimentos cardíacos em ratos, segundo Crestani et al., 2014 [89]. Este e outros autores ainda demonstraram que a administração de atenolol intra-venoso (i.v) na concentração de 1 mg/kg não afetou o aumento de pressão média decorrente do estresse mas reduziu a taquicardia do animal. Importante ressaltar aqui que tal concentração não afetou parâmetros cardiovasculares basais [89-90]. Supõe-se que a concentração de atenolol utilizada em nossas investigações (5 mg/kg) produza alterações hemodinâmicas semelhantes.

Muitos estudos mostram que situações de alto teor emocional resultam em um aumento persistente das taxas de despolarizações espontâneas de neurônios do BLA [16,17]. E outros que a ativação do BLA de ratos através de estimulações elétricas promove um quadro do tipo ansioso [66], ao passo que o bloqueio da sinalização glutamatérgica, via NMDA, resulta no não surgimento do quadro tipo ansioso nesses animais [67]. A mudança de atividade desses neurônios pode ter como consequência a hiper-responsividade da amígdala. Um estudo com pacientes clinicamente ansiosos mostrou que os voluntários apresentaram um perfil hiper-responsivo da amígdala diante de estímulos visuais com conotações aversivas [69]. Além disso, a excitabilidade de neurônios piramidais do BLA, principais neurônios de projeção, é fortemente regulada pela rede de interneurônios gabaérgicos, e essa hiperexcitabilidade decorrente do estresse vem acompanhada de depressão da inibição gabaérgica [50, 51], sugerindo que tais neurônios podem mediar o

comportamento do tipo ansioso [68]. Sabe-se ainda que o BLA recebe densa inervação noradrenérgica principalmente do LC, e que há aumento dos níveis de NE no BLA após um evento estressante [23]. Há também inervações que partem do BLA para o LC [26], característica que mostra uma forte relação funcional destas estruturas nas modificações advindas do estresse. É interessante destacar que nossos resultados indicam que o estresse provoca uma maior atividade dos neurônios do BLA [maior expressão de *Egr-1*], efeito não verificado nos animais previamente tratados com atenolol, mesmo que estressados. Em relação aos nossos resultados com c-Fos, não encontramos alterações no número de núcleos positivos para c-Fos no BLA de ratos após 10 dias do estresse. Porém, como já citado, a comparação entre SAL X SAL/S ($p=0.08$) e SAL/S x AT/S ($p=0.06$), por teste t student com correção de Welch's, nos mostra uma tendência de aumento da expressão de c-Fos, efeito abolido pelo tratamento com atenolol. Alinhado a isso, Erick, SW et al., 2011 [87], mostrou que houve aumento de c-Fos em regiões como núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e núcleo da amígdala medial (MeA) após estresses repetidos de derrota social. Ademais, o pré-tratamento, subcutaneamente, com propranolol (β -bloqueador não seletivo) impediu a expressão de c-Fos induzida por esse estresse nestas regiões, além de bloquear a manifestação do estado do tipo ansioso decorrente desse estresse. Nossos dados, portanto, mostram que o bloqueio periférico de receptores β_1 adrenérgicos alterou o curso do desenvolvimento do estado do tipo ansioso desencadeado pelo estresse, possivelmente via modulação da atividade dos neurônios do BLA. Esse aporte de NE no BLA pode, portanto, contribuir não somente para a hipertrofia da região como também para sua hiperexcitabilidade, características que juntas explicariam parte do desenvolvimento do estado ansioso em animais estressados. Vale destacar que a função da NE não se vincula somente ao estado ansioso induzido por estresse, mas também com a melhora da aprendizagem e consolidação de memória em tarefas que contenham estímulos aversivos [30], mostrando uma relação entre NE e a persistência de memórias aversivas.

Estudos recentes apontam para o papel das projeções do nervo vago na modulação de distintas formas de ansiedade e medo, já que ele atua como um componente que permite um fluxo de informações no sentido víscera-SNC. A transecção completa das aferências vagais e de metade de suas eferências diminuiu o comportamento tipo ansioso inato em ratos submetidos à testes de ansiedade como campo aberto e labirinto em cruz elevado [63]. Este estudo sugere que tal modificação

de comportamento pode estar relacionada a alterações nos níveis de NE e GABA em áreas do sistema límbico, porém sem que haja alterações na funcionalidade do eixo HPA. É importante destacar que dados obtidos nesse trabalho e em nosso grupo mostram que 10 dias após o estresse, os animais (ansiosos ou não) não apresentam diferenças no que diz respeito aos níveis séricos de CORT.

Existem receptores beta adrenérgico nas vias aferentes do nervo vago que detectam a liberação de epinefrina da glândula adrenal. Esta sinalização ativa projeções de neurônios noradrenérgicos no LC via núcleo do trato solitário [64,65], que recebe grande parte das projeções do nervo vago [63,64]. Assim, a liberação de NE a partir do LC irá alcançar diversas regiões corticais e subcorticais, com destaque para o BLA [63,64]. Como mencionado, no BLA, existem receptores adrenérgicos do tipo α_1 , α_2 , β_1 , β_2 e β_3 [19] que atuam de modo importante no desenvolvimento da ansiedade. O bloqueio de receptores tipo beta impede o efeito sobre o estado ansioso decorrente da estimulação do LC via NE [24]. Assim, a liberação de NE no sistema nervoso central aumenta a transmissão excitatória via receptores β adrenérgicos [70]. Ver ilustração esquemática na Fig.10 abaixo.

Fig.10. Esquema ilustrativo da comunicação periferia-SNC após liberação de NE decorrente de estresse em ratos. Fonte [67].

Vale destacar, novamente, que o nervo vago está associado também a outros efeitos. A sua estimulação elétrica promoveu remodelamento da via BLA infralímbica aumentando a extinção de medo condicionado [62]. Desse modo, nossos resultados com a administração periférica de atenolol pode ser explicado com base nessa hipótese, já que o fármaco bloquearia receptores adrenérgicos β -1 presentes no nervo vago e, conseqüentemente, diminuiria a estimulação do mesmo, resultando em diminuição da liberação de NE no sistema nervoso central pelo LC. Esta alteração na liberação de NE poderia, portanto, influenciar não somente o comportamento do tipo ansioso como também a taxa de despolarização de neurônios de regiões envolvidas, a citar o BLA.

Uma outra proposta de nosso estudo foi verificar a atividade da proteína quinase ERK (proteína quinase reguladora de sinais extracelulares) devido à sua importância nos efeitos induzidos por estresse [52]. Em um estudo de Grissom et al, 2011 [33], a inibição da sinalização noradrenérgica via receptores do tipo β -1 impediu, em parte, a diminuição característica da fosforilação de ERK observada após eventos de alto teor emocional como o estresse. Sabe-se que a ERK1/2 medeia a via de sinalização da superfície celular para o núcleo, promovendo mudanças na expressão de genes como CREB (fator responsivo ao AMP-cíclico) [52]. Além disso, devido à sua importância no remodelamento sináptico [53], ela pode ser ativada em regiões como amígdala e hipocampo após condicionamento ao medo, fato crucial para consolidação de memória emocional [54-57,60]. Outros estudos ainda mostraram que o bloqueio da fosforilação da ERK1/2 impede a consolidação de memória em múltiplas tarefas como memória de medo [58, 59]. Assim, a ativação da enzima ERK1/2 em diversas áreas cerebrais induzidas por estresse agudo é componente essencial no controle do circuito neural em respostas emocionais [60, 61]. Neste trabalho, não encontramos alterações na fosforilação de ERK. Considerando a transiência na ativação da via das MAP quinases, esse resultado era esperado devido ao longo ao tempo decorrido (10 dias) entre o estresse e a verificação do comportamento do tipo ansioso, quando as análises bioquímicas foram realizadas. Essa explicação pode ser reforçada por dados prévios em nosso laboratório (Novaes, L.S; 2016, em preparação) em que houve redução da ativação de ERK imediatamente após o estresse. Conjectura-se, portanto, que a divergência de resultados, obtidos com 10 dias de intervalo, pode ser justificada pela transiência das MAPKs.

Investigamos também o fator de transcrição CREB, um alvo *downstream* à ativação de ERK, que quando fosforilado, migra para o núcleo e se liga aos seus elementos responsivos (sítios CRE) nos genes por ele modulados. O gene EGR1 pode ser transcrito pelo CREB, motivo pelo qual resolvemos investigar uma possível correlação entre esses dois fatores. Sabe-se que um aumento crônico da sinalização de CREB no BLA por transfecção viral gera um quadro do tipo ansioso em animais [83]. Além disso, alguns trabalhos mostram que há aumento persistente da excitabilidade intrínseca de neurônios pela hiperexpressão basal crônica de CREB em fatias de tecido (*slices*) de diversas estruturas encefálicas como, por exemplo, a amígdala [84]. Confirmando o papel de CREB na excitabilidade neuronal, Gruart et al, [85] confirmaram demonstraram o efeito citado acima, em que a redução crônica de CREB em populações neuronais resultou em redução da hiperexcitabilidade. Assim, resolvemos investigar se o estresse agudo poderia modificar a sinalização de CREB no BLA e se tal alteração estaria envolvida com a atividade neuronal. Nesse trabalho, não observamos diferenças nos níveis de ligação de CREB no DNA tanto para os animais controle quanto para os tratados, estressados ou não. Dados prévios desenvolvidos por nosso grupo também não apontaram alterações de atividade de CREB dez dias após o estresse de contenção de 2 horas, mas sim redução imediatamente após o estresse (Novaes, L.S, 2016, em preparação). Novamente, esse resultado pode ser explicado pelo mesmo motivo da ERK, já que ambos (CREB e ERK) fazem parte da mesma via de sinalização. Além disso, alguns estudos indicam que a ativação crônica de CREB, mas não sua modulação aguda, teria efeito sobre o comportamento ansioso [86]. Vale ressaltar também que o Egr-1 é transcrito por outros fatores não analisados neste estudo, dado que poderia explicar a redução de CREB imediatamente após estresse e aumento de Egr-1 após 10 dias do mesmo [92-93].

Para verificar a participação dos glicocorticoides, via GR, na indução da ansiedade tardia induzida por estresse agudo, realizamos o mesmo delineamento feito com atenolol, agora utilizando a metirapona (inibidor da síntese de corticosterona). Alguns estudos mostraram que administrações intra-BLA de corticosterona em ratos provoca resposta tipo ansiosa bem como aumenta a excitabilidade de neurônios desta região [16, 17]. Outro estudo mostrou ainda que uma única dose de CORT é suficiente para induzir ansiedade e alterações neuronais no BLA tardiamente (12 dias) mas não 1 dia após sua administração [11]. Embora

estes e outros trabalhos confirmem a importância da CORT nas alterações comportamentais e bioquímicas pós-estresse, nós não encontramos efeitos da metirapona no estado ansioso sobre os animais independente se estressados previamente ou não. O baixo número de animais por experimento, o “efeito injeção” (em que um pequeno aumento de CORT causado pela injeção poderia interferir nos efeitos tardios induzidos pelo estresse) [49] ou a dose utilizada podem explicar o conflito de informações aqui encontrados.

Sumariamente, neste trabalho, vimos que o bloqueio de receptores adrenérgicos $\beta 1$ periféricos impediu o surgimento do comportamento ansioso 10 dias após o estresse. Os dados obtidos neste estudo somados aos da literatura, portanto, podem revelar um papel dos receptores periféricos adrenérgicos no desenvolvimento do estado do tipo ansioso e na atividade de neurônios centrais do BLA.

6 CONCLUSÕES

Tomados em conjunto, nossos dados são:

- O estresse de contenção de 2 hs induziu um comportamento do tipo ansioso em ratos 10 dias após o estresse, confirmando dados da literatura em nossas condições experimentais.
- A sinalização adrenérgica/noradrenérgica periférica pode ter relevante função na modulação do comportamento do tipo ansioso 10 dias após um único evento estressor, tendo em vista que a administração de atenolol impediu tal manifestação do estado do tipo ansioso.
- O estresse não alterou, após 10 dias, a fosforilação de ERK, a ativação do fator de transcrição CREB e a expressão de c-Fos no BLA de ratos.
- O estresse aumentou a expressão de Egr-1, no BLA, efeito não encontrado com a administração de atenolol.
- Nossos dados com o uso de metirapona não permitem maiores conclusões, como justificado anteriormente.

REFERÊNCIAS*2

1. Mitra R, Jadhav S, McEwen BS, Vyas A, Chattarji S. Stress duration modulates the spatiotemporal patterns of spine formation in the basolateral amygdala. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102(26): 9371-6.
2. Morilak DA, Barrera G, Echevarria DJ, Garcia AS, Hernandez A, Ma S, Petre CO. Role of brain norepinephrine in the behavioral response to stress. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2005; 29(8):1214-24.
3. Schelling G, Kilger E, Roozendaal B, de Quervain DJ, Briegel J, Dagge A, Rothenhäusler HB, Krauseneck T, Nollert G, Kapfhammer HP. Stress doses of hydrocortisone, traumatic memories, and symptoms of posttraumatic stress disorder in patients after cardiac surgery: a randomized study. *Biol Psychiatry*. 2004; 55(6): 627-33.
4. Vyas A, Mitra R, Shankaranarayana Rao BS, Chattarji S. Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *J Neuroscience*. 2002; 22(15): 6810-8.
5. Chang, C.H, A.A. Grace. Amygdala beta-noradrenergic receptors modulate delayed downregulation of dopamine activity following restraint. *J Neuroscience*. 2013;33(4): 1441-50.
6. Herman JP, Figueiredo H, Mueller NK, Ulrich-Lai Y, Ostrander MM, Choi DC, Cullinan WE. Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol*. 2003;24(3):151-80.
7. Herman, J.P., C.M. Prewitt, W.E. Cullinan, Neuronal circuit regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical stress axis. *Crit Rev Neurobiol*. 1996;10(3-4): 371-94.
8. Smith SM, WW. Vale. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues Clin Neurosci*. 2006;8(4):383-95.
9. Thierry AM, Gioanni Y, Dégénétais E, Glowinski J. Hippocampo-prefrontal cortex pathway: anatomical and electrophysiological characteristics. *Hippocampus*. 2000; 10(4):411-9.
10. Kirby ED, Friedman AR, Covarrubias D, Ying C, Sun WG, Goosens KA, Sapolsky RM, Kaufer D. Basolateral amygdala regulation of adult hippocampal neurogenesis and fear-related activation of newborn neurons. *Mol Psychiatry*. 2012; 17(5):527-36.

*2De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 jul 15]. Available from: <http://www.icjme.org>

11. Mitra, R, RM Sapolsky. Acute corticosterone treatment is sufficient to induce anxiety and amygdaloid dendritic hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105(14):5573-8.
12. Wisłowska-Stanek A, Lehner M, Skórzewska A, Maciejak P, Szyndler J, Turzyńska D, Sobolewska A, Płażnik A. Corticosterone modulates fear responses and the expression of glucocorticoid receptors in the brain of high-anxiety rats. *Neurosci Lett*. 2013; 533:17-22.
13. Kim MJ, Loucks RA, Palmer AL, Brown AC, Solomon KM, Marchante AN, Whalen PJ. The structural and functional connectivity of the amygdala: from normal emotion to pathological anxiety. *Behav Brain Res*. 2011; 223(2):403-10.
14. Joels, M. Corticosteroid actions in the hippocampus. *J Neuroendocrinol*. 2001; 13(8):657-69.
15. Gray, TS, EW, Bingaman EW. The amygdala: corticotropin-releasing factor, steroids, and stress. *Crit Rev Neurobiol*. 1996;10(2):155-68.
16. Myers B B, Greenwood-Van M. Corticosteroid receptor-mediated mechanisms in the amygdala regulate anxiety and colonic sensitivity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007; 292(6):G1622-9.
17. Shepard JD, KW Barron, Myers DA. Stereotaxic localization of corticosterone to the amygdala enhances hypothalamo-pituitary-adrenal responses to behavioral stress. *Brain Res*. 2003;963(1-2):203-13.
18. Mitra R, Sapolsky RM. Expression of chimeric estrogen-glucocorticoid-receptor in the amygdala reduces anxiety. *Brain Res*. 2010; 1342:33-8.
19. Silberman Y, Ariwodola OJ, Chappell AM, Yorgason JT, Weiner JL. Lateral paracapsular GABAergic synapses in the basolateral amygdala contribute to the anxiolytic effects of beta 3 adrenoceptor activation. *Neuropsychopharmacology*. 2010; 35(9):1886-96.
20. Aston-Jones G, Shipley MT, Chouvet G, Ennis M, van Bockstaele E, Pieribone V, Shiekhhattar R, Akaoka H, Drolet G, Astier B. Afferent regulation of locus coeruleus neurons: anatomy, physiology and pharmacology. *Prog Brain Res*. 1991; 88:47-75.
21. Rasmussen, K, Strecker RE, Jacobs BL. Single unit response of noradrenergic, serotonergic and dopaminergic neurons in freely moving cats to simple sensory stimuli. *Brain Res*. 1986;369(1-2):336-40.
22. Tanaka M, Yoshida M, Emoto H, Ishii H. Noradrenaline systems in the hypothalamus, amygdala and locus coeruleus are involved in the provocation of anxiety: basic studies. *Eur J Pharmacol*. 2000;405(1-3):397-406.
23. Asan E. The catecholaminergic innervation of the rat amygdala. *Adv Anat Embryol Cell Biol*. 1998;142:1-118.

24. Buffalari DM, Grace AA. Noradrenergic modulation of basolateral amygdala neuronal activity: opposing influences of alpha-2 and beta receptor activation. *J Neurosci.* 2007; 27(45):12358-66.
25. Van Bockstaele EJ, Bajic D, Proudfit H, Valentino RJ. Topographic architecture of stress-related pathways targeting the noradrenergic locus coeruleus. *Physiol Behav.* 2001;73(3):273-83.
26. Abercrombie ED, Jacobs BL. Single-unit response of noradrenergic neurons in the locus coeruleus of freely moving cats. I. Acutely presented stressful and nonstressful stimuli. *J Neurosci.* 1987; 7(9):2837-43.
27. Grant SJ, G. Aston-Jones, Redmond DE. Responses of primate locus coeruleus neurons to simple and complex sensory stimuli. *Brain Res Bull.* 1988; 21(3):401-10.
28. Ferry B, Roozendaal B, McGaugh JL. Basolateral amygdala noradrenergic influences on memory storage are mediated by an interaction between beta- and alpha1-adrenoceptors. *J Neurosci.* 1999;19(12):5119-23.
29. McGaugh JL. The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annu Rev Neurosci.* 2004;27:1-28.
30. McGaugh JL, Roozendaal B. Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain. *Curr Opin Neurobiol.* 2002;12(2):205-10.
31. Emoto H, Tanaka M, Koga C, Yokoo H, Tsuda A, Yoshida M. Corticotropin-releasing factor activates the noradrenergic neuron system in the rat brain. *Pharmacol Biochem Behav.* 1993;45(2):419-22.
32. De Souza EB, Insel TR, Perrin MH, Rivier J, Vale WW, Kuhar MJ. Corticotropin-releasing factor receptors are widely distributed within the rat central nervous system: an autoradiographic study. *J Neurosci.* 1985;5(12):3189-203.
33. Grissom NM, Bhatnagar S. The basolateral amygdala regulates adaptation to stress via beta-adrenergic receptor-mediated reductions in phosphorylated extracellular signal-regulated kinase. *Neuroscience.* 2011;178:108
34. Shekhar A, Sajdyk TS, Keim SR, Yoder KK, Sanders SK Role of the basolateral amygdala in panic disorder. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;877:747-50.
35. Rauch SL, Whalen PJ, Shin LM, McInerney SC, Macklin ML, Lasko NB, Orr SP, Pitman RK. Exaggerated amygdala response to masked facial stimuli in posttraumatic stress disorder: a functional MRI study. *Biol Psychiatry.* 2000;47(9):769-76.
36. Shekhar A, Truitt W, Rainnie D, Sajdyk T. Role of stress, corticotrophin releasing factor (CRF) and amygdala plasticity in chronic anxiety. *Stress.* 2005;8(4):209-19.
37. Rosenkranz JA, Venheim ER, Padival M. Chronic stress causes amygdala hyperexcitability in rodents. *Biol Psychiatry.* 2010;67(12):1128-36.

38. Vyas A, Pillai AG, Chattarji S. Recovery after chronic stress fails to reverse amygdaloid neuronal hypertrophy and enhanced anxiety-like behavior. *Neuroscience*. 2004;128(4):667-73.
39. Conrad CD, Galea LA, Kuroda Y, McEwen BS. Chronic stress impairs rat spatial memory on the Y maze, and this effect is blocked by tianeptine pretreatment. *Behav Neurosci*. 1996;110(6):1321-34.
40. Kim JJ, DM Diamond. The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nat Rev Neurosci*. 2002; 3(6):453-62.
41. Luine V, Villegas M, Martinez C, McEwen BS. Repeated stress causes reversible impairments of spatial memory performance. *Brain Res*.1994;639(1):167-70.
42. Sousa N, Lukoyanov NV, Madeira MD, Almeida OF, Paula-Barbosa MM. Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. *Neuroscience*. 2000; 97(2):253-66.
43. Hill MN, CJ Hillard, McEwen BS. Alterations in corticolimbic dendritic morphology and emotional behavior in cannabinoid CB1 receptor-deficient mice parallel the effects of chronic stress. *Cereb Cortex*. 2011;21(9):2056-64.
44. Vyas A, Jadhav S, Chattarji S. Prolonged behavioral stress enhances synaptic connectivity in the basolateral amygdala. *Neuroscience*. 2006; 143(2):387-93.
45. Cui H, Sakamoto H, Higashi S, Kawata M. Effects of single-prolonged stress on neurons and their afferent inputs in the amygdala. *Neuroscience*. 2008;152(3):703-12.
46. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*.1976; 72:248-54.
47. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(259):680-5.
48. Salinovich O, Montelaro RC. Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem*. 1986;156(2):341-7.
49. Rao RP, Anilkumar S, McEwen BS, Chattarji S. Glucocorticoids protect against the delayed behavioral and cellular effects of acute stress on the amygdala. *Biol Psychiatry*. 2012;72(6):466-75.
50. Isoardi NA, Bertotto ME, Martijena ID, Molina VA, Carrer HF. Lack of feedback inhibition on rat basolateral amygdala following stress or withdrawal from sedative-hypnotic drugs. *Eur J Neurosci*. 2007;26(4):1036-44.

51. Rodríguez Manzanares PA, Isoardi NA, Carrer HF, Molina VA. Previous stress facilitates fear memory, attenuates GABAergic inhibition, and increases synaptic plasticity in the rat basolateral amygdala. *J Neurosci*. 2005;25(38):8725-34.
52. Feld M, Dimant B, Delorenzi A, Coso O, Romano A. Phosphorylation of extra-nuclear ERK/MAPK is required for long-term memory consolidation in the crab *Chasmagnathus*. *Behav Brain Res*. 2005; 158(2):251-61.
53. Sweatt JD. Protooncogenes subserve memory formation in the adult CNS. *Neuron*. 2001;31(5): 671-4.
54. Alonso M, Viola H, Izquierdo I, Medina JH. Aversive experiences are associated with a rapid and transient activation of ERKs in the rat hippocampus. *Neurobiol Learn Mem*. 2002;77(1):119-24.
55. Atkins CM, Selcher JC, Petraitis JJ, Trzaskos JM, Sweatt JD. The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. *Nat Neurosci*. 1998; 1(7):602-9.
56. Pelletier JG, Likhtik E, Filali M, Paré D. Lasting increases in basolateral amygdala activity after emotional arousal: implications for facilitated consolidation of emotional memories. *Learn Mem*. 2005;12(2):96-102.
57. Schafe GE, Swank MW, Rodrigues SM, Debiec J, Doyère V. Phosphorylation of ERK/MAP kinase is required for long-term potentiation in anatomically restricted regions of the lateral amygdala in vivo. *Learn Mem*. 2008; 15(2):55-62.
58. Schafe GE, Atkins CM, Swank MW, Bauer EP, Sweatt JD, LeDoux JE. Activation of ERK/MAP kinase in the amygdala is required for memory consolidation of pavlovian fear conditioning. *J Neurosci*. 2000; 20(21):8177-87.
59. Schafe GE, Nader K, Blair HT, LeDoux JE. Memory consolidation of Pavlovian fear conditioning: a cellular and molecular perspective. *Trends Neurosci*. 2001; 24(9):540-6.
60. LeDoux JE. Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci*. 2000; 23:155-84.
61. Meller E, Shen C, Nikolao TA, Jensen C, Tsimberg Y, Chen J, Gruen RJ. Region-specific effects of acute and repeated restraint stress on the phosphorylation of mitogen-activated protein kinases. *Brain Res*. 2003; 979(1-2):57-64.
62. Peña DF, Childs JE, Willett S, Vital A, McIntyre CK, Kroener S. Vagus nerve stimulation enhances extinction of conditioned fear and modulates plasticity in the pathway from the ventromedial prefrontal cortex to the amygdala. *Front Behav Neurosci*. 2014, Sep,18;8:327.
63. Klarer M, Arnold M, Günther L, Winter C, Langhans W, Meyer U. Gut vagal afferents differentially modulate innate anxiety and learned fear. *J Neurosci*. 2014; May 21;34(21):7067-76.

64. Peña DF, Engineer ND, McIntyre CK. Rapid remission of conditioned fear expression with extinction training paired with vagus nerve stimulation. *Biol Psychiatry*. 2013; (73):1071–1077
65. Fanselow MS. Fear and Anxiety Take a Double Hit From Vagal Nerve Stimulation. *Biol Psychiatry*. 2013;73(11):1043-4.
66. Nieminen SA, Sirviö J, Teittinen K, Pitkänen A, Airaksinen MM, Riekkinen P. Amygdala kindling increased fear-response, but did not impair spatial memory in rats. *Physiol Behav*. 1992;51(4):845-9.
67. Adamec RE, Burton P, Shallow T, Budgell J. Unilateral block of NMDA receptors in the amygdala prevents predator stress-induced lasting increases in anxiety-like behavior and unconditioned startle--effective hemisphere depends on the behavior. *Physiol Behav*. 1999; Jan 1-15;65(4-5):739-51.
68. Sanders SK, Shekhar A. Regulation of anxiety by GABAA receptors in the rat amygdala. *Pharmacol Biochem Behav*. 1995; Dec;52(4):701-6.
69. Bishop SJ, Duncan J, Lawrence AD. State anxiety modulation of the amygdala response to unattended threat-related stimuli. *J Neurosci*. 2004; 24(6):10364-8
70. Ferry B, Magistretti PJ, Pralong E. Noradrenaline modulates glutamate-mediated neurotransmission in the rat basolateral amygdala in vitro. *Eur J Neurosci*. 1997 Jul;9(7):1356-64.
71. Rodrigues SM, LeDoux JE, Sapolsky RM, The influence of stress hormones on fear circuitry. *Annu Rev Neurosci*. 2009;32:289-313.
72. McCarty, Richard PhD; Gold, Paul E. PhD, Catecholamines, Stress, and Disease: A Psychobiological Perspective *Psychosomatic Medicine Issue*; 58(6), November/December 1996;590-597.
73. Herman JP, McKlveen JM, Solomon MB, Carvalho-Netto E, Myers B. Neural regulation of the stress response: glucocorticoid feedback mechanisms. *Braz J Med Biol Res*. 2012 Apr;45(4):292-8.
74. Hardebo JE, Owman C. Barrier mechanisms for neurotransmitter monoamines and their precursors at the blood-brain interface. *Ann Neurol*. 1980; Jul;8(1):1-31.
75. Berthoud HR, Neuhuber WL. Functional and chemical anatomy of the afferent vagal system. *Auton Neurosci*. 2000; Dec 20;85(1-3):1-17.
76. Lawrence AJ, Watkins D, Jarrott B. Visualization of beta-adrenoceptor binding sites on human inferior vagal ganglia and their axonal transport along the rat vagus nerve. *J Hypertens*. 1995; Jun;13(6):631-5.
77. Roozendaal B, McEwen BS, Chattarji S. Stress, memory and the amygdala. *Nat Rev Neurosci*. 2009; Jun;10(6):423-33.

78. Hatfield T, McGaugh JL. Norepinephrine infused into the basolateral amygdala posttraining enhances retention in a spatial water maze task. *Neurobiol Learn Mem.* 1999;Mar;71(2):232-9.
79. Liang KC, McGaugh JL, Yao HY. Involvement of amygdala pathways in the influence of post-training intra-amygdala norepinephrine and peripheral epinephrine on memory storage. *Brain Res.* 1990; Feb 5;508(2):225-33.
80. Bullitt E. Expression of c-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *J Comp Neurol.* 1990; Jun 22;296(4):517-30.
81. Blancas A, González-García SD, Rodríguez K, Escobar C. Progressive anticipation in behavior and brain activation of rats exposed to scheduled daily palatable food. *Neuroscience.* 2014; Sep 27;281C:44-53.
82. Bylund DB. Nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol review.* 1994;46:121-136.
83. Wallace TL, Stellitano KE, Neve RL, Duman RS. Effects of cyclic adenosine monophosphate response element binding protein overexpression in the basolateral amygdala on behavioral models of depression and anxiety. *Biol Psychiatry.* 2004;56(3):151-60.
84. Han MH, Bolaños CA, Green TA, Olson VG, Neve RL, et al. Role of cAMP response element-binding protein in the rat locus ceruleus: regulation of neuronal activity and opiate withdrawal behaviors. *J Neurosci.* 2006, 26(17):4624-9
85. Gruart A, Benito E, Delgado-García JM, Barco A. Enhanced cAMP response element-binding protein activity increases neuronal excitability, hippocampal long-term potentiation, and classical eyeblink conditioning in alert behaving mice. *J Neurosci.* 2012;32(48):17432-41.
86. Pandey SC, Zhang H, Roy A, XU t. Deficits in amygdaloid cAMP-responsive element-binding protein signaling play a role in genetic predisposition to anxiety and alcoholism. *J Clin Invest.* 2005;115(10):2762-73
87. Eric SW, Mark LH, Angela WC, Nicole, DP, La'Tonia MS, Michael TB, Randy JN, Godbout JP, Sheridan JF. Adrenergic Receptor Antagonism Prevents Anxiety-Like Behavior and Microglial Reactivity Induced by Repeated Social Defeat. *The Journal of Neuroscience.* 2011; • 31(17):6277–6288 • 6277
88. Kirch W, Görg KG. Clinical pharmacokinetics of atenolol--a review. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 1982;7(2):81-91.
89. Crestani CC, Tavares RF, Alves FH, Resstel LB, Correa FM. Effect of acute restraint stress on the tachycardiac and bradycardiac responses of the baroreflex in rats. *Stress.* 2010; Jan;13(1):61-72.

90. Dos Reis DG, Fortaleza EA, Tavares RF, Corrêa FM. Role of the autonomic nervous system and baroreflex in stress-evoked cardiovascular responses in rats. *Stress*. 2014; Jul;17(4):362-72.
91. Rodriguez-Romaguera J, Sotres-Bayona F, Muellera D, Gregory JG. Systemic Propranolol Acts Centrally to Reduce Conditioned Fear in Rats Without Impairing Extinction. *Biol Psychiatry*. 2009; May 15;65(10):887–892.
92. Judith-Irina Pagel, Elisabeth Deindl. Disease Progression Mediated by Egr-1 Associated Signaling in Response to Oxidative Stress. *Int J Mol Sci*. 2012;Oct 12;13(10):13104-17
93. Bhattacharyya S, Wu M, Fang F, Tourtellotte W, Feghali-Bostwick C, Varga J. Early growth response transcription factors: key mediators of fibrosis and novel targets for anti-fibrotic therapy. *Matrix Biol*. 2011; May;30(4):235-42