MARÍLIA BRINATI MALTA

Efeitos adaptativos induzidos pelo estresse crônico
imprevisível nos receptores do fator liberador de
corticotrofina tipo 2 e de glicocorticóides no sistema
nervoso central de ratos

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

São Paulo
2012

MARÍLIA BRINATI MALTA

Efeitos adaptativos induzidos pelo estresse crônico
imprevisível nos receptores do fator liberador de
corticotrofina tipo 2 e de glicocorticóides no sistema
nervoso central de ratos

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

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Carolina D. Munhoz

Co-orientador: Prof. Dr. Cristoforo Scavone

Versão original

São Paulo
2012

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

© reprodução total

Malta, Marília Brinati.

Efeitos adaptativos induzidos pelo estresse crônico imprevisível nos receptores do fator liberador de corticotrofina tipo 2 e de glicocorticóides no sistema nervoso central de ratos / Marília Brinati Malta. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Profa. Dra. Carolina Demarchi Munhoz.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Neurofarmacologia.

Versão do título para o inglês: Effects of chronic unpredictable stress on corticotropin releasing factor type 2 and glucocorticoid receptors in the rat brain.

1. Estresse 2. Fator liberador de corticotrofina (CRF) 3. Receptores de glicocorticóides (GR) 4. Noradrenalina 5. Sistema nervoso central (SNC) 6. Comportamento animal I. Munhoz, Profa. Dra. Carolina Demarchi II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB076/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Marília Brinati Malta.

Título da Tese: Efeitos adaptativos induzidos pelo estresse crônico imprevisível nos receptores do fator liberador de corticotrofina tipo 2 e de glicocorticóides no sistema nervoso central de ratos.

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

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

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

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 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **102** nas fls. **36** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Cristoforo Scavone, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **"Efeitos neuroprotetores do estrogênio na potencialização da sinalização inflamatória induzida pelo estresse crônico imprevisível no sistema nervoso central in vivo"** do qual participou(aram) o(s) alunos **Marília Brinati Malta, Elisa Mitiko Kawamoto, Lucília Brochado Lepsch e a pesquisadora Carolina Demarchi Munhoz**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEa)** em **19.09.2006**.

São Paulo, 20 de setembro de 2006.

Prof. Dr. UBRATAN FABRES MACHADO
Coordenador da CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária da CEEA - ICB/USP

<p>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS</p> <p>Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011)3091-7438 e-mail: cep@icb.usp.br</p> <p>COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL</p>
---	---

Decl. CEEA.025/2009.

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 102/06/CEEA, datado de 19.09.06 e por solicitação do Prof. Dr. Cristoforo Scavone, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão de novos procedimentos ao projeto de pesquisa "Efeitos neuroprotetores do estrógeno na potencialização da sinalização inflamatória induzida pelo estresse crônico imprevisível no sistema nervoso central *in vivo*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao referido certificado.

Informo ainda, que o título foi alterado para "*Efeitos neuroprotetores do estrógeno na potencialização da sinalização inflamatória e alteração nos receptores do fator liberador de corticotrofina induzidos pelo estresse crônico imprevisível no sistema nervoso central vivo*".

São Paulo, 18 de maio de 2009.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima
Coordenador da CEEA
ICB/USP

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 **072** nas fls. **105** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Cristoforo Scavone** e Profa. Dra. **Carolina D. Munhoz**, Coordenadores da Linha de pesquisa "*Efeitos adaptativos induzidos pelo estresse crônico imprevisível nos receptores do fator liberador de corticotrofina e de glicocorticóides no sistema nervoso central de ratos*" do qual participam o(s) alunos **Marília B. Malta**, 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 **20.06.2011**, com validade de **3 anos**.

São Paulo, 21 de junho de 2011.

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

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

AGRADECIMENTOS

Quando chegamos ao final do percurso, olhamos para trás e vemos o quanto foi percorrido, o quanto foi conquistado e podemos reconhecer a importância de cada passo, de cada pedra, de cada sombra e de cada pessoa que esteve ao nosso lado nos momentos alegres e nos difíceis. Muitas dessas pessoas talvez não tenham ideia do quanto nos marcaram, afinal de contas os caminhos não mais seguiram juntos, outras caminharam juntas até o fim e estão hoje ao meu lado compartilhando dessa conquista.

A meus pais que me deram o suporte para me tornar a pessoa que sou hoje, por me ensinarem a lutar pelo que quero com responsabilidade, respeito, honestidade, firmeza de caráter com a alegria da reposta das crianças “... a vida é bonita e é bonita...”

À minha família de sangue e de coração, pelo carinho de toda uma vida. À minha querida bisavó, que sempre mostrou garra e doçura até os seus 96 anos de idade.

À Sabrina, a irmã que a vida me deu, o meu muito obrigada por tudo e principalmente por realizar comigo a cada dia a “velha ambição”.

Ao Renato, que aos poucos ganhou meu coração, fazendo aflorar tudo o que sou e por estar ao meu lado para o que der e vier.

Agradeço ao Rafael Marques Porto por ter visto na recém-aluna de graduação em Biologia uma futura pesquisadora. O início, hoje lembrado com saudade traz a lembrança de pessoas queridas.

Ao Prof. Cristoforo Scavone (Cris) e Profa. Carolina Munhoz (Carol) por terem investido em mim, possibilitando uma etapa cheia de aprendizados e conquistas. À Carol, que de uma maneira especial me apoiou e possibilitou a conclusão desse trabalho, muito obrigada.

Ao prof. Jackson C. Bittencourt por abrir as portas do seu laboratório e com isso um novo rumo no meu caminhar e a profa. Luciane Sita, pelas conversas e ajudas. O convívio com vocês foi muito especial, muito obrigada por tudo.

À profa. Rosana Camarini, por ter me acolhido e me permitido viver um pouco da história do seu grupo.

Cabe também agradecer aos demais pesquisadores com quem trabalhei e aprendi muito no decorrer desses 10 anos em laboratórios e para não cometer injustiças, esquecendo-me de alguém, não citarei nomes.

Agradeço aos amigos que fiz durante esse tempo, que fizeram os dias no laboratório e os inúmeros experimentos mais leves e os resultados positivos mais significantes, pois com eles compartilhei o processo das descobertas científicas e uma parte da minha vida. André, André C, Ana Maria, Cecília, Daniel, Guilherme, Letícia, Priscila e Renatinha.

À Jô que, com sua personalidade, me ajudou a ser novamente “otimista” na bancada, que esteve ao meu lado montando as centenas de lâminas nos ensaios de hibridização e imunohistoquímica e tornou os dias mais alegres.

A todos dos Laboratórios de Neurofarmacologia Molecular; Neuroendocrinofarmacologia e Imunomodulação, Neuroanatomia Química e Neuroquímica e Farmacologia Comportamental.

Ao apoio dos técnicos Maria Aparecida Fernandes e Mateus Teixeira.

A aquele que está ao meu lado há quase 13 anos, me ensinando a cada dia as lições mais simples da vida, o Sapeca.

Com muito respeito, a todos os animais utilizados nesse projeto.

Ao apoio financeiro da FAPESP e CNPq.

“Descobri como é bom chegar quando se tem paciência. E para se chegar, onde quer que seja, aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão. É preciso, antes de mais nada, querer”

(Amyr Klink)

RESUMO

Malta MB. Efeitos adaptativos induzidos pelo estresse crônico imprevisível nos receptores do fator liberador de corticotrofina tipo 2 e de glicocorticóides no sistema nervoso central de ratos. [tese (Doutorado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

O estresse é um fenômeno observado e conservado evolutivamente, que tem como objetivo assegurar a sobrevivência do indivíduo. Porém, quando o organismo perde a capacidade de se autorregular, o estresse torna-se uma ameaça. Os efeitos acumulativos do estresse na presença ou não de eventos adversos estão associados a alterações nos diferentes sistemas fisiológicos do indivíduo, que podem predispor o mesmo a doenças sistêmicas e/ou psiquiátricas. O estresse recruta diferentes circuitos neuronais, neuroendócrinos e sistemas fisiológicos resultando em respostas coordenadas compostas por alteração de comportamento, ativação do sistema nervoso autônomo e hormonal, envolvendo principalmente a ativação do eixo HPA, com consequente liberação de glicocorticóides (GCs). Algumas psicopatologias, como ansiedade e depressão, sugerem o envolvimento dos sistemas CRF e noradrenérgico e de níveis elevados de GCs. Este estudo teve como objetivo investigar possíveis alterações na expressão de RNAm do CRF₂ e do nível do receptor de GCs (GR) no SNC de ratos machos expostos por 14 dias ao estresse crônico imprevisível (EI) e, ainda, se essas alterações estariam relacionados a alterações comportamentais como anedonia a ansiedade. Observamos que o EI aumentou os níveis de corticosterona plasmática, que se mantiveram elevados por 24 h após o último estímulo estressor, efeito associado à hipertrofia da glândula adrenal. A manutenção dos níveis elevados de corticosterona se deu pela sinalização do próprio hormônio, como também pela manutenção do eixo HPA pela sinalização noradrenérgica, uma vez que o tratamento dos animais imediatamente antes de cada estressor com metirapona, inibidor da enzima 11 β -hidroxilase e atenolol e fentolamina, antagonistas de receptores β e α -adrenérgicos, respectivamente, impediram tanto o aumento quanto a persistência dos níveis de corticosterona induzidos por EI. Ainda, observamos o aumento induzido por EI na expressão do RNAm de CRF₂ (LSi e VmH) e de GR (LSi, CeA, BST e PVH) em regiões específicas do SNC associadas ao sistema límbico. Tratamento crônico com metirapona ou atenolol e fentolamina foram capazes de inibir o aumento da expressão do RNAm de CRF₂ e dos níveis de GR nos animais submetidos ao EI, de maneira núcleo específica. Não foram observadas alterações comportamentais, quanto à anedonia e ansiedade. Dessa maneira, podemos dizer que o EI utilizado nesse estudo, foi capaz de induzir algumas alterações morfofisiológicas, porém não comportamentais.

Palavras-chave: Estresse. Sistema nervoso central. CRF. Glicocorticóide. Norepinefrina. Comportamento.

ABSTRACT

Malta MB. Effects of chronic unpredictable stress on corticotropin releasing factor type 2 and glucocorticoid receptors in the rat brain. [Ph. D. thesis (Pharmacology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

While acute stress initiates neuronal responses that prepare an organism to adapt to challenges, chronic stress may lead to maladaptive responses that could result in diseases. This process involves activation of a number of different but integrated physiological responses involving the autonomic, endocrine, immune, cardiovascular and reproductive systems, which induce a spectrum of behavioral and homeostatic changes. The HPA axis plays a vital role in stress response, involves the CRF signalization, and culminates in secretion of glucocorticoids (GCs). Evidence suggests the involvement of the CRF system and glucocorticoids levels in stress-related psychiatric disorders like anxiety and major depressive. The aim of this work was to investigate whether chronic unpredictable stress (CUS) could modulate the CRF system, glucocorticoid receptors (GR), and corticosterone levels and whether this was related to anxiety and depression-like behaviors in male rats. Fourteen days of CUS increased corticosterone levels at 24 h after the last CUS and the animals also presented adrenal gland hypertrophy. The maintenance of high levels of corticosterone was mediated by the hormone itself and by noradrenergic signaling that kept the HPA axis activated. In addition, we observed increased of CRF₂ mRNA expression (LSi and VmH) and levels of GR (LSi, CeA, BST and PVH) in CNS specific regions associated with the limbic system. The chronic treatment with inhibitor of GCs synthesis and adrenergic antagonists prevented the CUS effect in CRF₂ mRNA expression and GR levels. No anxiety or depression-like behaviors were observed in rats submitted to CUS. We concluded that CUS caused biochemical alterations since it increased CRF₂ mRNA expression and GR levels in limbic region, but these changes were not able to cause behavioral changes.

Keywords: Stress. CRF. Glucocorticoids. Central nervous system. Norepinephrine. Behavior.

LISTA DE ABREVIATURAS

3v	terceiro ventrículo
5-HT	serotonina
Ach	acetilcolina
ACTH	hormônio adrenocorticotrófico
AF	atenolol e fentolamina
BST	núcleo intersticial da estria terminal
C + AF	animais não submetidos a nenhum estímulo estressor e tratados com atenolol e fentolamina
C + Met	animais não submetidos a nenhum estímulo estressor e tratados com metirapona
cc	corpo caloso
CeA	núcleo central da amígdala
CRF	fator liberador de corticotrofina
CRF ₁	receptor do fator liberador de corticotrofina tipo 1
CRF ₂	receptor do fator liberador de corticotrofina tipo 2
CRF-BP	proteína ligante do fator liberador de corticotrofina (CRF)
E	adrenalina
EA + Met.	animais submetidos ao estresse agudo e tratados com metirapona
EA	estresse agudo
EI + AF	animais submetidos ao estresse crônico imprevisível e tratados com atenolol e fentolamina
EI + Met.	animais submetidos ao estresse crônico imprevisível e tratados com metirapona
EI	estresse crônico imprevisível
EPM	labirinto em cruz elevado
e.p.m.	erro padrão da média
GABA	ácido gama amino butírico
GCs	glicocorticóides
GR	receptor de glicocorticóides
HPA	eixo hipotálamo hipófise adrenal
i.p.	intraperitônio
IOD	intensidade óptica integrada
LC	Locus coeruleus
LS	núcleo septal lateral

LSD	núcleo septal dorsal
LSi	núcleo septal lateral parte intermédia
Met.	Metirapona
MR	receptor de mineralocorticóides
NE	norepinefrina
opt	trato óptico
PVH	núcleo paraventricular di hipotálamo
RNAm	ácido ribonucleico mensageiro
SNC	sistema nervoso central
SP	preferência por sacarose
u.a.	unidade arbitrária
Ucn 2	urocortina 2
Ucn 3	urocortina 3
Ucn	urocortina
VL	ventrículo lateral
VmH	núcleo ventromedial do hipotálamo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Estresse	16
1.2 Circuitaria do estresse	20
1.2.1 CRF E SEUS RECEPTORES	23
1.2.2 GLICOCORTICÓIDES	27
1.3 Estresse e psicopatologias	30
2 OBJETIVOS	33
3 MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1 Animais	34
3.2 Delineamento experimental I – Análise Morfofisiológica	34
3.2.1 MODELOS DE ESTRESSE	35
3.2.1.1 <i>Estresse crônico imprevisível</i>	35
3.2.1.2 <i>Estresse agudo</i>	37
3.2.2 TRATAMENTOS FARMACOLÓGICOS	37
3.2.2.1 <i>Tratamento com metirapona</i>	37
3.2.2.2 <i>Tratamento com antagonista dos receptores adrenérgicos</i>	38
3.2.3 DOSAGEM DE CORTICOSTERONA PLASMÁTICA	38
3.2.3.1 <i>Obtenção do plasma</i>	38
3.2.3.2 <i>Dosagem de corticosterona</i>	39
3.2.4 GLÂNDULA ADRENAL	39
3.2.5 ANÁLISE DOS RECEPTORES CRF ₂ E GR NO ENCÉFALO DE RATOS SUBMETIDOS AO MODELO DE ESTRESSE CRÔNICO IMPREVISÍVEL	39
3.2.5.1 <i>Obtenção do encéfalo</i>	40
3.2.5.2 <i>Expressão de CRF₂ por hibridização in situ no encéfalo de ratos submetidos ao EI</i>	40
3.2.5.2.1 <i>Pré-tratamento dos cortes para hibridização</i>	40
3.2.5.2.2 <i>Preparação da sonda e hibridização</i>	41
3.2.5.2.3 <i>Pós-hibridização</i>	42
3.2.5.2.4 <i>Revelação das lâminas</i>	42
3.2.5.2.5 <i>Análise da expressão do RNAm de CRF₂</i>	43
3.2.5.3 <i>Imunorreatividade ao receptor de glicocorticóide (GR) no encéfalo de ratos submetidos ao EI</i>	44
3.2.5.3.1 <i>Especificidade do anticorpo</i>	44
3.2.5.3.2 <i>Titulação do anticorpo</i>	44
3.2.5.3.3 <i>Ensaio de imunorreatividade ao GR</i>	44

3.2.5.3.4 Análise da marcação de imunorreatividade ao GR	45
3.2.5.4 <i>Dupla marcação: imunorreatividade para GR e hibridização in situ para CRF₂</i>	45
3.2.5.5 <i>Aquisição de imagens</i>	46
3.2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
3.3 Delineamento experimental II – Estudo comportamental	48
3.3.1 TESTE DE PREFERÊNCIA POR SACAROSE.....	49
3.3.2 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	49
4 RESULTADOS	51
4.1 Análise Morfofisiológica	51
4.1.1 DOSAGEM DE CORTICOSTERONA	51
4.1.2 GLÂNDULA ADRENAL	54
4.1.3 ANÁLISE DOS RECEPTORES CRF ₂ E GR NO ENCÉFALO DE RATOS	55
4.1.3.1 <i>Expressão de RNAm do CRF₂ por hibridização in situ em animais submetidos ao EI</i>	55
4.1.3.1.1 Especificidade da sonda	55
4.1.3.1.2 Análise da expressão de RNAm de CRF ₂	55
4.1.3.2 <i>Imunorreatividade ao receptor de glicocorticóide (GR)</i>	60
4.1.3.2.1 Especificidade do anticorpo	60
4.1.3.2.2 Análise da marcação de imunorreatividade ao GR	60
4.1.3.3 <i>Dupla marcação: imunorreatividade para GR e hibridização in situ para CRF₂</i>	66
4.2 Estudo comportamental	68
4.2.1 PREFERÊNCIA POR SACAROSE	68
4.2.2 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	68
4.3 Síntese dos resultados obtidos	70
5 DISCUSSÃO	71
6 CONCLUSÕES	82
REFERÊNCIAS	83

1 INTRODUÇÃO

1.1 Estresse

Nos dias de hoje, discernir o que são acontecimentos do cotidiano e situações estressantes não é uma tarefa fácil. Por vezes nem percebemos quando estamos enfrentando uma situação real de perigo e/ou alerta ou quando este estímulo não é real. Sente-se a palpitação, o aumento de força muscular, perda do apetite e, se a situação persiste, podemos observar o aparecimento de doenças, como as cardiovasculares e autoimunes e até mudanças de comportamento, como por exemplo, deixar de lado o que é prazeroso. Como lidamos com essas situações e suas consequências, a longo prazo, resultam de uma série de alterações fisiológicas e de sinalizações neuronais e hormonais.

O estresse é um fenômeno conservado e observado durante a evolução, que tem como objetivo assegurar a sobrevivência do indivíduo (Goldstein e McEwen, 2002). Porém, quando o organismo perde a capacidade de se autorregular, o estresse torna-se uma ameaça, relacionado muitas vezes à ocorrência de doenças (Béjean e Sultan-Taïeb, 2005; Lightman, 2008).

Doenças relacionadas ao estresse podem levar a um comprometimento das atividades do indivíduo, gerando impacto na saúde pública, seja com gastos relacionados com tratamento e/ou perda de dias de serviço, uma vez que o estresse acomete principalmente pessoas economicamente ativas. Um levantamento realizado por Béjean e Sultan-Taïeb (2005), apontou que os gastos com o tratamento de três doenças (cardiovasculares, musculares e mentais) decorrentes, ao menos em parte, do estresse associado às condições de trabalho, representam de 14% a 24% da verba pública destinada ao tratamento de doenças ocupacionais no sistema público francês. No Brasil, dados do Ministério da Previdência (2009) mostram que 90% dos auxílios doenças acidentário na categoria transtornos mentais e comportamentais referem-se a problemas como estresse, episódios depressivos, alteração de humor e ansiedade. Corroborando esses dados, recente levantamento realizado por Andrade et al. (2012) apontou que cerca de 30% da população da região metropolitana de São Paulo apresenta alguma doença mental, destacando as agrupadas nas categorias de ansiedade (19%) e distúrbios de humor (11%).

O conceito de estresse foi modificado ao longo do tempo, servindo de base para a visão moderna as ideias defendidas por três grandes cientistas. Pioneiramente, Claude Bernard (1813-1878), seguidor da escola grega, considerou a existência de um sensível balanço fisiológico para a manutenção do equilíbrio do indivíduo e baseado nesse conceito, Walter Cannon (1878-1945) cunhou o termo homeostasia, sendo este o estado estável de um sistema fluido e cuja

manutenção envolve controles automáticos, com sinais constantes ou intermitentes como ponto de referência. Cannon descreveu ainda, o sistema simpato-adrenal e a participação da epinefrina na manutenção da homeostase. Nesse período, Hans Selye (1936) descreveu a síndrome adaptativa geral, definindo estresse como a resposta à exposição a agentes nocivos não específicos (estressores). Essa síndrome era composta por três fases: 1) reação de alerta (reação de luta e fuga, com ativação das glândulas adrenais); 2) estágio adaptativo de resistência, com aumento da secreção de glicocorticóides (GCs) (alterações morfológicas e plasticidade) e 3) exaustão (revisado em Le Moal, 2007).

Sabe-se, hoje, que a fase da reação de alerta, também conhecida como reação de luta e fuga, está associada à ação simpato medular, mediada pelos neurotransmissores epinefrina e norepinefrina (NE), com ativação das glândulas adrenais e consequente liberação de GCs. Todas essas reações complexas têm como resultado a promoção da sobrevivência do indivíduo. No caso da resposta ao estresse se prolongar, pode-se evoluir para as outras duas fases, a de adaptação e exaustão, ambas associadas a níveis aumentados GCs. No caso do estágio adaptativo, podem-se observar alterações morfológicas devido à plasticidade dos sistemas, dentre eles, o sistema nervoso central (SNC), que garantem a manutenção do estado de alerta. Uma vez que o estresse persista, a sobrecarga de gasto energético com a manutenção desse estado e, ainda, algumas das alterações morfológicas podem tornar o indivíduo susceptível a doenças, caracterizando a fase de exaustão, quando algumas patologias podem se manifestar (Engelmann et al., 2004).

Devido ao interesse nas consequências do estresse nos organismos e buscando compreender melhor as fases dessa resposta, novos conceitos foram introduzidos e dentre eles destacam-se: alostasia, carga alostática e estado alostático. O conceito de alostasia é definido como um processo adaptativo que ativamente mantém a homeostasia do indivíduo através das mudanças, também consideradas mecanismos homeostáticos. Neste caso, o cérebro orchestra os diferentes mecanismos, podendo ou não incorporar experiências prévias, memórias, antecipação e a reavaliação das necessidades fisiológicas (Korte et al., 2005), envolvendo num primeiro momento os GCs, catecolaminas e citocinas (McEwen e Wingfield, 2003). Por ser um processo ativo, há gasto energético e esse custo foi denominado carga alostática, que se refere ao desgaste fisiológico gerado no organismo em resposta a estímulos estressores (McEwen, 1998).

Na presença do estímulo estressor, é necessária a mobilização de energia extra, podendo levar o indivíduo a uma nova situação de homeostase e, uma vez submetido a novos parâmetros, estabelece-se o estado alostático, que se mantido por tempo prolongado, pode resultar na sobrecarga alostática (McEwen e Wingfield, 2003).

Segundo McEwen e Wingfield (2003), a sobrecarga alostática pode estar relacionada, de maneira simplificada, com a energia ingerida e despendida para a manutenção do organismo. A sobrecarga pode ser diferenciada em dois tipos: 1) a sobrecarga do tipo I que ocorre quando a necessidade energética não é suprida pela ingestão do indivíduo, gerando um balanço energético negativo, que resulta na ativação de um estado de emergência até que o balanço energético torne-se positivo; e 2) a sobrecarga do tipo II que se inicia enquanto a demanda energética é suprida ou excedida, podendo estar associada à alteração do comportamento alimentar, o que pode resultar em alterações metabólicas. Independente do tipo de sobrecarga, encontram-se presentes a secreção de GCs, à ativação do sistema autônomo, neurotransmissores e citocinas inflamatórias dentre outros mediadores alostáticos.

Os efeitos acumulativos da sobrecarga alostática na presença ou não de eventos adversos estão associados a alterações nos diferentes sistemas fisiológicos do indivíduo, que podem predispor o mesmo a doenças. A sociedade moderna parece manter situações crônicas, levando uma maior quantidade de indivíduos a sucumbir aos estados alostáticos e, dependendo da vulnerabilidade individual, desenvolver doenças sistêmicas (cardiovasculares, imunológicas e alguns tipos de câncer) e psiquiátricas (alteração de humor, comportamental e dependência química). Tanto a vulnerabilidade individual às doenças quanto os efeitos do estresse estão vinculados a diversos fatores como, carga genética, desenvolvimento e experiências prévias do indivíduo e a influência de fatores ambientais, como mostra o esquema da Figura 1 (Le Moal, 2007).

Contrapondo-se ao fenótipo vulnerável, com maior suscetibilidade ao desenvolvimento de patologias (sistêmicas ou psiquiátricas), pode-se observar a resiliência, que se refere à habilidade do indivíduo em se adaptar com sucesso ao estresse agudo, traumas e adversidades crônicas (Feder et al., 2009). Esse fenômeno está associado a características genóticas e psicossociais, como emoções positivas, flexibilidade cognitiva, altruísmo, suporte social e estilo de vida (de Kloet, 2008; Sowthwick et al., 2005).

Figura 1- Fatores que influenciam na predisposição às doenças relacionadas ao estresse.

Fonte: modificado de Le Moal (2007).

Buscando compreender os efeitos do estresse, modelos animais foram sendo desenvolvidos permitindo descobertas progressivas dos mecanismos envolvidos no estresse e suas consequências na fisiologia dos organismos. Estes modelos abordam os efeitos induzidos pelo estresse levando-se em conta variáveis, tais como, tipo de estímulo estressor, tempo de exposição e severidade dos estímulos, sempre respaldados por Comitês de Ética em experimentação animal.

Devido à maneira como o estímulo é processado, este pode ser categorizado de diferentes maneiras. Atualmente, a definição mais aceita é a apresentada por Herman e Cullin (1997) que distingue o estresse como processivo ou sistêmico baseada, no envolvimento do sistema límbico no processamento da informação. No caso do estresse processivo, os estímulos requerem o processamento de diferentes informações, evocando memória e, quando comparado com experiências prévias, o indivíduo pode ter uma resposta exacerbada. Já o estresse sistêmico (sem processamento) engloba os estímulos que na presença de ameaça direta à sobrevivência podem, por vias viscerais aferentes, ativar diretamente, o eixo hipotálamo hipófise adrenal (HPA), culminando na secreção de GCs (Herman e Cullin, 1997).

Os modelos podem ser também classificados pelo tempo de exposição aos estímulos estressores em agudo e crônico (ou prolongado). No caso da exposição crônica, um mesmo tipo de estímulo pode ser repetido (estresse crônico previsível) ou o animal pode ser exposto a diferentes estímulos de maneira aleatória, uma ou mais vezes por dia (estresse crônico imprevisível). A escolha para o tipo de modelo a ser utilizado está relacionada ao tipo de alteração que se quer avaliar, se imediata ou relacionada à plasticidade do organismo, associada ao tempo de exposição do mesmo aos mediadores do estresse.

Em roedores, os estímulos inescapáveis sistêmicos como a imobilização, a exposição a temperaturas extremas, jejum e choque elétrico são os mais utilizados em estudos para a indução de neurodegeneração e distúrbios pós-traumáticos (Southwick et al., 1994) e para analisar os efeitos do estresse no sistema imune (Glaser e Kiecolt-Glaser, 2005). Exercício forçado (como natação) e jejum são exemplos de estresse social ou emocional, assim como a superpopulação ou isolamento social (Garcia-Bueno et al., 2008).

Em nosso laboratório, adotamos o modelo de estresse crônico imprevisível (EI), que mescla diferentes tipos de estímulos estressores moderados (processivos e sistêmicos) por um período de 14 dias (tratamento crônico) numa sequência aleatória, e por isso considerado imprevisível (Munhoz et al., 2006). Esse paradigma é o que melhor se aproxima ao cotidiano dos seres humanos, sendo então adotado por reconhecidos grupos de pesquisa na área (Willner, 2005).

1.2 Circuitaria do estresse

O estresse recruta diferentes circuitos neuronais e neuroendócrinos e sistemas fisiológicos resultando em respostas coordenadas compostas por alteração de comportamento, ativação do sistema nervoso autônomo (epinefrina e norepinefrina) e hormonal (ACTH, GCs, catecolaminas adrenais, ocitocina, prolactina e renina), envolvendo principalmente a ativação do eixo HPA (Van de Kar e Blair, 1999). Essa resposta envolve uma interligação eficiente e evolutivamente conservada de sistemas que tem como objetivo manter a integridade do indivíduo (Ulrich-Lai e Herman, 2009).

As respostas neuroendócrinas são consideradas importantes mecanismos de sobrevivência durante o estresse. É consenso a participação do eixo HPA e das catecolaminas adrenais na manutenção do balanço energético bem como o papel do sistema renina-angiotensina na redistribuição do fluxo sanguíneo (Van de Kar e Blair, 1999).

Algumas das alterações fisiológicas observadas durante o estresse são: mobilização energética para manutenção do cérebro e músculos; atenção aguçada e focada para percepção de ameaças; aumento da glicose no cérebro; aumento da potência cardiovascular e frequência respiratória; redistribuição sanguínea; modulação da função imune; inibição do comportamento sexual e fisiologia reprodutiva e inapetência (Carrasco e Van de Kar, 2003).

A circuitaria do estresse é composta por diversas estruturas encefálicas, com liberação de neurotransmissores envolvidos na mediação de respostas neuroendócrinas para a integração da percepção dos estímulos estressores com as funções fisiológicas e comportamentais. Dentre elas, destacam-se o hipotálamo, sistema septo-hipocampal, amígdala, córtex cingulado e pré-frontal e grupos de células catecolaminérgicas do tronco encefálico, principalmente o Locus coeruleus (LC) o núcleo parabraquial e núcleo da Rafe (Van de Kar e Blair, 1999).

A ativação do sistema nervoso autônomo está relacionada às respostas imediatas do estresse, através dos ramos simpático e parassimpático, promovendo uma rápida alteração do estado fisiológico (Reação de luta e fuga). O sistema noradrenérgico, proeminente na modulação do estresse, origina-se de um pequeno agrupado de células localizadas no LC, na medula e na ponte que se projeta para todo o sistema nervoso. Esta distribuição difusa no SCN permite a ação da NE em diferentes circuitos neurais, promovendo efeitos diretos através da sua ação sobre os receptores α e β - adrenérgicos e ainda indiretos, devido a sua ação modulatória, podendo favorecer respostas evocadas por outros neurotransmissores. Dessa maneira, a ativação noradrenérgica pelo estímulo estressor atua facilitando a ordenação e integração das respostas neuroendócrinas, autonômicas, comportamentais e cognitivas (revisado em Morilak et al., 2005).

As vias sensoriais aferentes atingem o sistema reticular ou o tálamo, cuja função é transmitir essas informações para a amígdala e córtex sensorial, que se projetam para o hipocampo e amígdala lateral (revisado em Carrasco e Van de Kar, 2003). A amígdala é subdividida em núcleos, estando o núcleo central da amígdala (CeA) envolvido na resposta comportamental, autonômica e endócrina do estresse (Van de Kar e Blair, 1999). A amígdala, ainda, se projeta para núcleos catecolaminérgicos, como o núcleo dorsal da Rafe, cujos neurônios se projetam e fazem sinapse com neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVH), envolvidos com a síntese e secreção do fator liberador de corticotrofina (CRF). O PVH ainda recebe projeções do CeA e do núcleo intersticial da estria terminal (BST) como ilustrado na Figura 2.

O PVH desempenha um papel fundamental na resposta adaptativa do estresse e pode ser subdividido na porção magnocelular, composta por neurônios secretores de ocitocina e vasopressina, e parvocelular cujos neurônios sintetizam e secretam o CRF (Romier et al., 1993)

que é liberado na eminência mediana e liga-se a seus receptores de membrana nos corticotrofos da hipófise anterior. Como resultado, ocorre o aumento da liberação da pró-opiomelanocortina (POMC), o peptídeo precursor do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e consequentemente o aumento da sua síntese e liberação na circulação sanguínea periférica (Trainer et al., 1995). O ACTH atua sobre seus receptores no córtex da glândula adrenal, resultando na síntese e liberação de GCs, predominantemente corticosterona em roedores e cortisol nos primatas (Akil e Morano, 1995).

Além da ação sobre o eixo HPA, neurônios secretores de CRF do PVH se projetam para as células noradrenérgicas do LC, que controlam a ativação do sistema simpato-adrenal, resultando na liberação de epinefrina/norepinefrina pelas células cromafins da medula adrenal, formando um sistema de retroalimentação positiva com neurônios do PVH denominado CRF-NE-CRF, (Dunn et al., 2004; Koob, 1999) além do aumento de NE em diferentes núcleos encefálicos.

Tanto os neurônios noradrenérgicos quanto os secretores CRF são estimulados por serotonina (5-HT) e acetilcolina (ACh) e inibidos por GCs, ácido gama amino butírico (GABA), ACTH e peptídeos opióides (revisado em Carrasco e Van de Kar, 2003).

A ativação da circuitaria do estresse por tempo prolongado (crônico) recruta vias distintas do estresse agudo e altera os núcleos encefálicos envolvidos no controle do eixo HPA e na resposta autonômica. Evidências neuroquímicas sugerem o aumento da excitabilidade do eixo HPA e do sistema simpato medular; aumento da sensibilidade do LC ao CRF e da enzima tirosina hidroxilase, que consequentemente aumenta a síntese de NE. Algumas dessas alterações estão relacionadas, ainda, com a perda da autorregulação, como no caso dos GCs sobre a hipófise e PVH. Pode-se, ainda, observar atrofia de neurônios hipocampais e do córtex frontal, aumento da expressão de CRF no núcleo CeA e em núcleos autonômicos, resultando na hiperatividade do eixo HPA e aumento da excitabilidade no núcleo paraventricular do tálamo e do PVH (revisado por Ulrich-Lai e Herman, 2009).

Figura 2 – Esquema de parte da circuitaria do estresse baseada nos trabalhos de Gallagher et al. (2008), Herman et al. (2003), Koob (1999), Korosi e Baram (2008), Reul e Holsboer (2002) e Ulrich-Lai e Herman (2009).

Ação excitatória do NE, CRF, 5-HT, ocitocina, vasopressina e ACTH representados em verde na figura.

--- inibição; → ativação entre as estruturas neurais.

Fonte: Malta (2012).

1.2.1 CRF E SEUS RECEPTORES

O CRF é um neuropeptídeo endógeno de 41 aminoácidos, reconhecido por seu papel de integração da resposta neuroendócrina do estresse devido sua ação na regulação do eixo HPA (Vale et al., 1981). Também participa das respostas autonômicas, comportamentais, metabólicas e imunes do estresse (Korozi et al., 2008; Kuperman e Chen, 2008).

Após a descoberta do CRF por Vale et al. (1981), outros peptídeos com estrutura semelhante foram sendo descritos, compondo a família do CRF. A urocortina (Ucn) foi o segundo membro da família a ser identificado (Lederis et al., 1982). Este neuropeptídeo é composto por 40 aminoácidos e é distribuído amplamente no SNC (Bittencourt et al., 1999) e regiões sistêmicas do organismo, tais como trato gastro-intestinal, miócitos cardíacos, timo, fígado e rim (Kageyama et al., 1999). Recentemente, foram descobertas outras duas isoformas da urocortina, a Ucn 2 e Ucn 3, sendo estas discretamente expressas no SNC e com vias distintas das observadas para CRF e Ucn (Hsu e Hsuek, 2001; Lewis et al., 2001; Reyer et al., 2001).

A ação do CRF e das Ucn é exercida via família de receptores de CRF, pertencentes à superfamília de receptores acoplados a proteína-G, caracterizados pela presença de sete domínios transmembrânicos. Na presença do ligante, há ativação da adenilil ciclase através da proteína-G estimulatória (Gs) associada ao aumento de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc); porém os receptores de CRF também podem se associar a outras proteínas-G, incluindo as Gq, Gi, Go (Grammatopoulos et al., 2001). Dessa maneira, os receptores de CRF podem modular diferentes vias de sinalização incluindo as proteínas quinases A, B e C (PKA, PKB e PKC), proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e fluxo de íons cálcio (Ca^{2+}) intracelular, de maneira tecido específica e concentração dependente (Grammatopoulos e Chousos, 2002).

Em mamíferos, os receptores de CRF foram diferenciados em tipos 1 e 2, CRF_1 e CRF_2 respectivamente (Hauger et al., 2003), exibindo 70% de homologia na sequência (Perrin e Vale, 1999). Consistente com a diferença estrutural, os receptores CRF_1 e CRF_2 apresentam também padrões farmacológicos distintos, podendo ser observados tanto em neurônios pré e pós-sinápticos no SNC (Liu et al., 2004; Orozco-Cabal et al., 2008).

O CRF_1 , que possui duas isoformas, α e β , além de alguns subtipos nomeados $c-h$, isolados tanto em tecidos humanos quanto de roedores (Bale e Vale, 2004), é encontrado em neurônios colinérgicos, dopaminérgicos e noradrenérgicos de ratos (Sauvage e Steckler, 2001) e encontra-se amplamente distribuído no SNC em regiões envolvidas com informações sensoriais, processamento de informação e controle motor, além da hipófise.

O CRF_2 é expresso em três subtipos funcionais, α , β e γ (Liaw et al., 1996; Lovenberg et al., 1995). Os subtipos α e β foram isolados tanto em humanos quanto em roedores, e, até o momento, a isoforma γ foi isolada apenas em humanos (Kostich et al., 1998). Enquanto o CRF_1 é amplamente distribuído no SNC, a expressão do $\text{CRF}_{2\alpha}$ é mais restrita, sendo observada no LS, núcleo ventromedial do hipotálamo (VmH), amígdala, núcleo da Rafe e BST (Van Pett et al., 2000). Já o $\text{CRF}_{2\beta}$ é majoritariamente expresso em células não neuronais, incluindo células do coração, músculo esquelético, epidídimo e trato gastrintestinal (Perrin e Vale, 1999). A distribuição dos receptores de CRF no encéfalo de ratos foi demonstrada por Van Pett et al. (2000) e está ilustrada na Figura 3, retirada de Reul e Holsboer (2002).

Os ligantes dos receptores de CRF apresentam afinidades distintas. Enquanto o CRF apresenta maior afinidade ao CRF_1 quando comparado ao CRF_2 , a Ucn 1 apresenta igual afinidade para os receptores, já as Ucn 2 e Ucn 3 são altamente seletivas ao CRF_2 . O CRF também pode ligar-se a proteína ligante do CRF (CRF-BP) que é expressa proeminentemente no encéfalo. Sua distribuição sugere múltiplos sítios de interação com o CRF e pode agir modulando a ligação deste ao receptor (Figura 4, Reul e Holsboer, 2002).

Figura 3 - Distribuição dos receptores do fator liberador de corticotrofina tipo 1 e 2 (CRF₁ e CRF₂) no encéfalo de ratos.

Abreviações: LS, núcleo septal lateral; VMH, núcleo ventromedial do hipotálamo.

Fonte: Reul e Holsboer (2002).

Figura 4 - Esquema de ação dos ligantes CRF e Ucn 1, 2 e 3 sobre os receptores CRF₁ e CRF₂.

Fonte: modificado de Kuperman e Chen (2008)

O CRF é o principal regulador do eixo HPA em condições basais e no estresse, uma vez que é o principal sinalizador do eixo HPA na ativação da síntese de GCs. Esse fator apresenta propriedades ansiogênicas, anorexígenas e coordena as mudanças adaptativas, comportamentais e físicas durante o estresse. Algumas dessas ações são mediadas pela secreção de NE e de neurotransmissores envolvidos com a regulação do humor. Quando presentes nos tecidos periféricos, o CRF pode estar envolvido com o balanço energético e a regulação da resposta imune. O aumento e/ou a secreção crônica do CRF leva a quadros de ansiedade, alterações cardiovasculares, metabólicas e na função imune e nos padrões de sono (Hilhouse e Grammatopoulos, 2006; Koob 1999).

Os demais ligantes da família do CRF, as urocortinas, estão presentes no SNC e tecidos periféricos e suas ações ainda não são bem caracterizadas, entretanto sua distribuição sugere o envolvimento com mecanismos fisiológicos, como a regulação neuroendócrina, o controle do apetite e no sistema cardiovascular, onde influencia a angiogênese e a vascularização (revisado em Hilhouse e Grammatopoulos, 2006).

Durante os últimos anos, diversos estudos utilizando ferramentas farmacológicas, como o uso de antagonistas e peptídeos específicos e animais transgênicos (com deleção ou superexpressão do CRF₁ e/ou CRF₂) foram conduzidos para discriminar o papel dos receptores CRF₁ e CRF₂, uma vez que a distribuição diferencial destes receptores no SNC prevê diferentes funções relacionadas aos processos fisiológicos e comportamentais (Reul e Holsboer, 2002).

Dados experimentais sugerem a participação do CRF₁ na fase aguda da resposta ao estresse, ou seja, na ativação do eixo HPA, enquanto que o CRF₂ parece contribuir para a fase de recuperação, com diminuição gradual da mesma (Reul e Holsboer, 2002), através da ação de outro ligante endógeno do CRF₂, a Ucn 1 (Vaughan et al., 1995; Kozicz et al., 2004; Korosi et al., 2005). Esta ideia é corroborada por estudos em camundongos *knockout* para CRF₂ que apresentam hipersensibilidade ao estresse e aumento do comportamento ansioso (Bale et al., 2000; Coste et al., 2000).

O CRF também apresenta ações extra-hipotalâmicas (Stephens et al., 1988; Stenzel-Poore et al., 1994) que parecem estar associadas às respostas comportamentais do estresse e psicopatologias. A sua função na amígdala é fundamental para a resposta ao estresse e parece contribuir para os estados de medo e ansiedade (Berridge e Dunn, 1987; Britton et al., 1986a,b; Goel e Bale, 2007; Stephens et al., 1988; Todorovic et al., 2007). De fato, dados experimentais mostram que a administração de CRF nos ventrículos cerebrais induz comportamento ansioso em diferentes modelos comportamentais tais como teste de conflito, interação social e estudos no labirinto em cruz elevado (EPM). Ainda, animais com níveis elevados de CRF apresentam

aumento do comportamento ansioso e o uso de antagonista de CRF_1 é capaz de reverter esse comportamento (Shekhar et al., 2005). Todavia, a participação do CRF_2 no comportamento ansioso ainda não foi totalmente elucidada, pois dependendo da região encefálica e do momento no qual é avaliado, esse receptor parece estar relacionado tanto a propriedades ansiogênicas quanto ansiolíticas (Reul e Holsboer, 2002).

1.2.2 GLICOCORTICÓIDES

Os hormônios glicocorticóides (GCs) são esteróides sintetizados pelas glândulas suprarrenais sob a influência do ACTH liberado na corrente sanguínea pela adenohipófise, sendo o produto final da ativação do eixo HPA. Os níveis de GCs estão aumentados durante a fase inicial do ciclo ativo dos animais, obedecendo ao ritmo circadiano, e também durante o estresse, sendo considerado um dos principais hormônios envolvidos na resposta do estresse. Os GCs agem na mobilização energética no fígado, supressão da resposta imune inata, inibição do crescimento muscular e ósseo, potencializam a vasoconstrição mediada pelo sistema nervoso simpático, proteólise e lipólise (Herman et al., 2003) e ainda, no SNC, estão envolvidos no controle do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (função reprodutiva), na depressão, na consolidação de memória dentre outras funções neuronais.

Os efeitos dos GCs são mediados por dois receptores intracelulares que apresentam atividade de fatores de transcrição (efeito genômico): receptores do tipo I ou de mineralocorticóides (MR) e do tipo II ou receptores de glicocorticóides (GR) (Robinson-Rechavi et al., 2001). Os MRs apresentam maior afinidade a corticosterona (cerca de 10 vezes maior) e aldosterona quando comparado ao GR, o que nos permite dizer que, em condições basais, os MRs estão saturados enquanto que na presença de altos níveis de GCs, os GRs estão saturados (pico circadiano e estresse) (Korte et al., 2005). Recentemente, vem sendo discutida a interação dos GCs com receptores específicos de membrana, que atuam de maneira não genômica, produzindo alterações no interior das células, promovendo efeitos dentro de um espaço de tempo mais curto (Groeneweg et al., 2012).

Enquanto inativos, os receptores de glicocorticóides estão presentes no citoplasma na forma de um complexo multi proteico, associado a proteínas de choque térmico (HSP90 e HSP70) e imunofilinas. Uma vez na presença do ligante (GCs), tanto os GR quanto MRs sofrem mudanças conformacionais do receptor com a dissociação das proteínas chaperonas e dimerização do mesmo, que migra para o núcleo onde pode agir de várias maneiras, dentre elas: 1) ligando-se diretamente ao elemento responsivo aos glicocorticoides (sítios GRE) positivos ou

negativos (nGRE) presentes no DNA, 2) interagindo diretamente com outros fatores de transcrição (NF- κ B, AP-1), e 3) ou ainda, interagindo com proteínas envolvidas na maquinaria transcricional (Lu e Cidlowski, 2006; Revollo e Cidlowski, 2009). Independente da maneira pela qual os complexos GCs-GR agem, todas elas culminam na modulação da síntese de proteínas.

Duas isoformas do GRs foram identificadas, a GR α e GR β , produto de *splicing* alternativo do mesmo gene, e elas são distintas quanto à sensibilidade ao ligante. Enquanto GR α tem alta afinidade pelo GCs e é funcional, o GR β é incapaz de se unir ao ligante, podendo ainda agir como um regulador negativo por inibir a ação da atividade endógena do GR α (Lu e Cidlowski, 2006; Oakley et al., 1999). A distribuição diferencial das isoformas, a proporção variável nas diferentes células e tecidos, bem como a probabilidade da formação de heterodímeros, podem estar associadas às ações específicas dos GCs nos diferentes tecidos. Além disso, o recrutamento de co-ativadores e correpresores parece ser de fundamental importância para a ação do GR, direcionando a ação deste receptor na regulação de genes específicos (Szapary et al., 2007).

Além das ações genômicas, têm sido descritos efeitos não genômicos dos GCs, os quais ocorrem devido a interações proteína-proteína e não requerem a dimerização do receptor (De Nicola et al., 1998). Esses efeitos não genômicos são responsáveis pelas ações rápidas dos GCs e podem ocorrer devido a ação desses nos lipídios de membrana, alterando a fluidez; nas proteínas de membrana (como canais iônicos e receptores de neurotransmissor); nas proteínas intracelulares (por exemplo, MAPK e fosfolipases); através da interação proteína-proteína (proteínas pertencentes ao complexo GR-GC, como HSP) e por transportadores de glicocorticóides, também chamados de complexo efetor e reconhecedor de hormônios esteróides (SHERC) que podem iniciar efeitos genômicos e não genômicos (revisado por Haller et al., 2008; Song e Buttgereit, 2006).

No SNC, observa-se o MR em neurônios dos núcleos hipotalâmicos envolvidos no controle de sódio (Joels e de Kloet, 1994), no hipocampo, hipotálamo e córtex cerebral (Ozawa, 2005) enquanto que o GR pode ser encontrado em neurônios e células da glia (Joels e de Kloet, 1994), de regiões límbicas, como LS, e de outras regiões como hipotálamo e núcleo dorsal da Rafe (Ozawa, 2005). Algumas regiões cerebrais apresentam ambos os receptores, como o hipocampo (CA1 e CA2), os neurônios piramidais, a região parvocelular no PVH e córtex frontal (Cintra et al., 1994; Meaney e Aitken, 1985; Patel et al., 2000; Sousa et al., 1989)(Figura 5).

A atividade dos GCs no SNC pode estar associada a ações neuroprotetoras ou neurotóxicas, anti ou pró-inflamatórias, e diversas hipóteses estão sendo formuladas para tentar explicar esse efeito paradoxo. Os GCs exercem diferentes ações dependendo do tipo de receptor ao qual está ligado (MR X GR), dos níveis fisiológicos ou supra fisiológicos desse hormônio e da

duração da exposição, dos tipos celulares do SNC (microglia, astrócitos ou neurônios) e da área estudada (Garcia-Bueno et al., 2008).

Como dito anteriormente, devido à diferença de afinidade, a sinalização MR e GR pode ter efeitos transcricionais distintos, ou até mesmo opostos, dependendo dos níveis de corticosterona. De fato, os efeitos deste hormônio, principalmente no SNC, geram uma curva típica em “U invertido”, onde níveis basais de corticosterona produzem efeitos benéficos, tais como aumento na taxa de perfusão cerebral, utilização de glicose, excitabilidade neuronal e melhora do aprendizado dependente do hipocampo, provavelmente mediados por MR. Entretanto em níveis elevados desse hormônio, em situações de estresse, observam-se efeitos deletérios, possivelmente, mediados por GR (revisado em Sapolsky 2004; Sorrels 2009). Desta maneira, os efeitos do estresse prolongado sobre o SNC estão relacionados a danos cognitivos, tais como prejuízo no aprendizado e memória (Bremner et al., 1993, 1995), à morte neuronal aumentada (McEwen e Sapolsky, 1995), atrofia de estruturas cerebrais como os dendritos dos neurônios piramidais na região CA3 do hipocampo (Magariños et al., 1999; McEwen e Sapolsky, 1995; Sapolsky, 1992) e dos neurônios piramidais do córtex medial pré frontal (Radley et al., 2004).

Figura 5 – Representação esquemática da distribuição dos receptores de MR e GR no encéfalo de ratos.

Receptores GR (●) e MR (▲). Abreviações: LS, núcleo septal lateral; CeA, núcleo central da amígdala; BnST, núcleo intersticial da estria terminal; PVN, núcleo paraventricular do hipotálamo; região CA1, CA2 e CA3 do hipocampo e DG, giro dentado.

Fonte: Kolber et al. (1999).

1.3 Estresse e psicopatologias

O desenvolvimento de patologias associadas ao estresse está relacionado a dois fatores: 1) a sobrecarga alostática a qual o indivíduo está submetido, e que envolve as características intrínsecas ao indivíduo e a forma como este lida com eventos adversos e 2) a resiliência ou resistência ao estresse, ou seja, a capacidade do indivíduo em se adaptar adequadamente a adversidade, seja ela na forma de um estresse agudo, um trauma ou até mesmo eventos mais drásticos e prolongados, como por exemplo, a perda de um ente querido. O indivíduo resiliente não desenvolve patologias associadas ao estresse, porém são observadas alterações fisiológicas e psicológicas (alostasia psicobiológica). Uma vez que o quadro de resiliência se contrapõe ao do desenvolvimento da patologia, estudos recentes buscam compreender melhor esses mecanismos de proteção, que podem ser decorrentes não apenas das características genéticas, mas também de alterações em circuitos neurais e vias moleculares que medeiam os fenótipos resilientes, observados em estudos de comportamento (revisado em Feder et al., 2009).

Muitas vezes, o frágil equilíbrio do organismo (sobrecarga alostática X resiliência) acaba sendo deslocado na presença de uma situação adversa (desafio) ou ainda pela carga alostática prolongada e, com isso, quadros patológicos se estabelecem. No estado alostático é possível observar algumas alterações decorrentes da exposição a estímulos estressores, como alterações hormonais, da resposta do sistema imunológico e nos níveis de neurotransmissores, podendo levar a psicopatologias (distúrbios de humor) e/ou danos neuronais (déficit cognitivo, perda de neurônio hipocampal) (McEwen, 1998; Sapolsky e McEwen, 1995).

Diversas psicopatologias, como ansiedade, depressão, distúrbio do estresse pós-traumático, síndrome do pânico e síndrome de Tourette (revisado em Carrasco e Van de Kar, 2003; Koob, 1999) estão associadas a níveis elevados de GCs, a hiperatividade do eixo HPA, a superprodução de CRF e níveis aumentados de NE. De fato, o tratamento em alguns quadros de ansiedade e depressão envolve não apenas o uso de medicamentos ansiolíticos ou antidepressivos, mas também medicamentos que regulam a síntese de GCs, restabelecendo a ação do eixo HPA, ou ainda antagonistas de GR, como o mifepristone, e noradrenérgicos com ação central, em doses diferentes das prescritas para o controle da hipertensão (Goddard et al., 2010; Watson et al., 2012).

Considerando a circuitaria do estresse e sua complexa sinalização, algumas alterações que podem estar associadas à hiperatividade do eixo HPA podem ser destacadas. Dentre elas, merecem atenção 1) a perda da retroalimentação negativa exercida pelos GCs em estruturas como o hipotálamo e hipófise, e que por sua vez passam, em níveis elevados, a agir nos GR,

alterando o balanço entre MR/GR (de Kloet e Derijk, 2004) e sua expressão em estruturas como o hipocampo (de Kloet et al., 1998); e 2) alterações do sistema CRF, cujos níveis do fator se apresentam elevados no líquido cefalorraquidiano de pacientes com depressão, além de evidências da participação dos receptores CRF_1 e CRF_2 nas alterações comportamentais (Reul e Hoslboer, 2002).

A perda da retroalimentação negativa exercida pelos GCs sobre o eixo HPA resulta na hiperativação do eixo que mantém níveis plasmáticos elevados desse hormônio. Dessa maneira, os GCs passam a agir sobre outras estruturas como LC e amígdala, que através de suas projeções reforçam a ativação do eixo HPA, e ainda atuam em outras estruturas modulando comportamento e sistemas fisiológicos. O aumento desse hormônio a longo prazo, por sua ação no metabolismo pode desencadear doenças metabólicas como a diabetes; já no sistema imune pode agir como imunossupressor ou ainda participar do desenvolvimento de doenças auto imunes, como lúpus (de Kloet e Derijk, 2004)

Sendo o CRF o neuropeptídio integrador da resposta de estresse, participando da ativação do eixo HPA, em quadros de estresse crônico este se encontra em níveis elevados, passando então a agir não apenas no eixo como também nas demais estruturas do SNC via seus receptores CRF_1 e CRF_2 e ainda em tecidos periféricos como musculatura esquelética, fígado e pâncreas (Kupperman e Chen, 2008). Assim, como no caso dos GCs, uma vez ativados cronicamente, estes receptores podem contribuir para o desenvolvimento de patologias, dentre elas ansiedade, abuso de drogas e disfunções metabólicas. Considera-se aqui não apenas a ação via CRF como também dos demais ligantes, como a Ucn que em quadros de estresse encontra-se elevada e age preferencialmente nos CRF_2 , que tem sua ação dependente da distribuição e também das condições ao qual o indivíduo está submetido (Bale e Vale, 2004).

O sistema noradrenérgico também é ativado durante a resposta do estresse, estando relacionado tanto a efeitos periféricos como alterações cardiovasculares, quanto a efeitos centrais, atuando em regiões envolvidas na ativação do eixo HPA (PVH) e no comportamento, onde age através de projeções sobre núcleos do sistema límbico (Koob, 1999; Ulrich e Herman, 2009). Essas projeções podem, ainda, por estimulação contínua sobre núcleos serotoninérgicos modular os níveis da serotonina (5-HT), que se encontram diminuídos em pacientes com quadros de depressão.

Dessa maneira, as sinalizações via CRF e NE estão não só envolvidas na ativação do eixo HPA e na resposta autonômica simpática, como também podem contribuir para as alterações comportamentais associadas a resposta do estresse. Tanto o CRF quanto a NE no SNC interagem e formam um sistema de retroalimentação positivo que não apenas mobiliza energia

para a resposta ao estressor, mas também pode deixar vulnerável a quebra alostática devido à superativação. Devido as projeções límbicas provenientes do PVH, BST e CeA para o LC evidencia-se a participação de componentes emocionais da resposta de estresse, e a ação noradrenérgica nessas mesmas regiões (proveniente do LC) reforça a relação entre o aumento da NE e das alterações comportamentais observadas em quadros psicopatológicos decorrentes da exposição crônica a estímulos estressores (Koob, 1999; Morilak et al., 2005).

Diante da complexidade da circuitaria da resposta do estresse, e os possíveis componentes associados a patologias desencadeadas pelo estresse crônico, o estudo de alterações morfofisiológicas e suas relações com alterações comportamentais pode nos permitir uma melhor abordagem farmacológica e terapêutica no tratamento de pacientes, visando comportamentos pró-resiliência, como por exemplo, o fortalecimento da auto-estima e otimismo (Charney, 2004). Os estudos nessa área tornam-se ainda mais relevante dado ao aumento da população que vive em grandes metrópoles, como São Paulo, que apresenta uma grande variedade de estímulos estressores e já se encontra dentre as cidades com maior índice de doenças mentais relacionadas ao estresse (Andrade et al., 2012).

Mediante o apresentando, propomos nesse trabalho analisar alterações morfofisiológicas decorrentes do modelo de estresse crônico imprevisível (EI) no SNC de ratos machos, explorando a sinalização do GCs e da NE, os quais exercem papéis relevantes na circuitaria do estresse, e ainda, avaliar possíveis alterações comportamentais como ansiedade e anedonia.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi investigar possíveis alterações no sistema nervoso central e no comportamento de ratos machos decorrentes da exposição ao estresse crônico imprevisível (EI) e avaliar a participação dos glicocorticóides e noradrenalina nas mesmas.

Para tanto, dividimos o estudo da seguinte maneira:

- a) avaliar as alterações morfofisiológicas no sistema nervoso central de ratos machos decorrentes da exposição ao estresse crônico imprevisível (EI) quanto a:
 - síntese e liberação de corticosterona plasmática;
 - níveis de RNAm de CRF₂ nos núcleos septal lateral parte intermédia e ventromedial do hipotálamo;
 - expressão de GR em núcleos encefálicos relacionados à circuitaria de resposta ao estresse e/ou sistema límbico como núcleos septal lateral, central da amígdala, intersticial da estria terminal e paraventricular do hipotálamo;
 - colocalização de CRF₂ (RNAm) e GR (proteína) em neurônios do núcleo septal lateral parte intermédia e ventromedial do hipotálamo;
 - participação dos glicocorticóides e noradrenalina nas alterações observadas em animais submetidos ao EI.
- b) avaliar se as alterações morfofisiológicas avaliadas no objetivo (a) resultariam em alterações comportamentais de ratos machos submetidos ao estresse crônico imprevisível (EI) quanto a:
 - anedonia (preferência por consumo de solução de sacarose);
 - comportamento ansioso (labirinto em cruz elevado).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar (total de 180 animais) de 90 a 120 dias fornecidos pelo Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e mantidos no biotério de experimentação do Laboratório de Neurofarmacologia Molecular do Departamento de Farmacologia-Instituto de Ciências Biomédicas, USP/SP.

Os animais foram alojados em gaiolas plásticas totalizando 4 animais por gaiola e mantidos sob condições controladas de temperatura (22 ± 2 °C), ciclo de iluminação 12h/12h claro/escuro e fornecimento de água e ração *ad libitum*. Os procedimentos experimentais foram iniciados após o período de habituação de duas semanas no biotério.

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas, protocolos n° 102/06 (com modificações aceitas em maio/2009) e o registrado sob n° 72 nas fls. 105 do livro 2 (2011).

3.2 Delineamento experimental I – Análise morfofisiológica

Para a análise morfofisiológica do encéfalo de ratos submetidos ao modelo de estresse crônico imprevisível (EI, 14 dias), quanto a expressão de RNAm dos receptores de CRF tipo 2 (CRF₂) e dos níveis de receptores de glicocorticóides (GR), os animais foram separados aleatoriamente em diferentes grupos caracterizados pelo tipo de estresse e tratamento farmacológico aos quais foram submetidos, como pode ser visto no Quadro 1.

Visando analisar o efeito do tempo de exposição ao estresse, os animais foram submetidos ao modelo de estresse agudo ou crônico, que consistiu em uma única exposição a imobilização por 2 h ou a exposições repetidas a diferentes tipos de estresse (estresse crônico imprevisível - EI) por 14 dias, respectivamente. Para analisar o efeito adaptativo da resposta ao estresse, os animais foram eutanasiados 24 h após o último estímulo estressor ou imediatamente após a contenção.

Para avaliar a participação dos glicocorticóides e da noradrenalina nas alterações induzidas por EI, dois grupos de animais foram tratados, durante todo o período do EI, 30 ou 20 min. antes de cada exposição, com metirapona (Met.), inibidor da enzima esteróide 11 β -hidroxilase, responsável pela conversão da 11 β -deoxicorticosterona em corticosterona ou com atenolol e fentolamina (AF), antagonistas de receptores β e α -adrenérgicos, respectivamente.

Quadro 1 - Grupos experimentais e tratamentos realizados.

Grupo experimental	Tratamento farmacológico	Tipo de estresse	Intervalo entre o estímulo estressor e o sacrifício
Estresse agudo			
Controle	-	-	-
EA	-	Estresse agudo	Imediatamente após
EA + Met.	Metirapona	Estresse agudo	Imediatamente após
Estresse crônico – plasticidade da resposta			
Controle	-	-	-
Controle + Met.	Metirapona	-	-
Controle + AF	Atenolol e fentolamina	-	-
EI	-	EI 14 dias	24 horas
EI+ Met.	Metirapona	EI 14 dias	24 horas
EI+ AF	Atenolol e fentolamina	EI 14 dias	24 horas

Grupos separados quanto ao tipo de resposta a ser analisada, efeito agudo do estresse e plasticidade da resposta nos animais submetidos ao estresse crônico imprevisível (EI). EA: estresse agudo (2 h de imobilização); Metirapona 50 mg/kg; Atenolol e fentolamina 5 e 2,5 mg/kg, respectivamente. Abreviações: EA, animais submetidos a estresse agudo; Met., tratamento farmacológico com metirapona; AF, tratamento farmacológico com atenolol e fentolamina.

Fonte: Malta (2012).

3.2.1 MODELOS DE ESTRESSE

3.2.1.1 Estresse crônico imprevisível

No modelo de estresse crônico imprevisível (EI), ratos machos foram submetidos a diferentes estímulos estressores durante 14 dias consecutivos (Munhoz et al., 2006). Os animais do grupo controle foram mantidos nas suas gaiolas moradia durante o período do EI. Os diferentes estímulos estressores encontram-se descritos a seguir, e o cronograma esquematizado no Quadro 2.

Natação forçada: os animais foram colocados individualmente, em tanques de paredes opacas e escuras com capacidade de 60 litros e preenchidos com água a temperatura ambiente (por volta de 25 ± 2 °C) de maneira que a cauda dos animais não tocasse o fundo do tanque. Durante o período em que o animal esteve no tanque, observou-se qualquer sinal de cansaço, e nesse caso, o

mesmo foi imediatamente retirado da água para evitar afogamento. Após o período de natação, os animais foram cuidadosamente secos e recolocados em suas caixas moradia.

Imobilização: o aparato utilizado para a imobilização dos animais consistiu 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 permitissem a circulação de ar. Quando contido, atentou-se para que o animal não entrasse em contato com suas fezes nem que sua cauda permanecesse levantada, pois estes fatores poderiam causar um estímulo estressor mais severo do que o desejado.

Luz apagada e/ou acesa: os animais foram mantidos em suas caixas moradias e acondicionados em uma sala, dentro do próprio biotério, com condições ideais e constantes de temperatura e exaustão. Para o estresse de luz apagada, os animais foram mantidos, ao longo da fase de claro, por períodos de 120 min, em sala escura. Para o estresse de luz acesa, os animais foram mantidos em ambiente iluminado por todo o período de escuro. Ao término dos períodos de estresse, as caixas contendo os animais foram devolvidas à sala do biotério onde estava o grupo controle.

Isolamento frio: os animais, em suas respectivas caixas moradia, foram colocados no refrigerador para que fossem expostos, por 90 min, às condições de temperatura em torno de 4 ± 2 °C e luz apagada. Durante esse período, foi permitido aos animais livre acesso à ração e privação de água. Ao término desse processo, as caixas foram devolvidas à sala do biotério e as garrafas de água recolocadas.

Privação de água e alimento: durante o período de escuro, os animais foram mantidos em suas caixas moradia dentro da sala do biotério juntamente com o grupo controle, e tanto a ração quanto as garrafas de água foram retiradas, por aproximadamente 14 h. Após esse período, água e ração foram repostas.

Quadro 2 - Cronograma dos estímulos estressores utilizados no protocolo de estresse crônico imprevisível (EI).

	Estímulo estressor	Tempo	Período
1° dia	Imobilização	60 min	Tarde
2° dia	Natação forçada	15 min	Manhã
3° dia	Isolamento frio	90 min	Tarde
4° dia	Luz acesa à noite	12 h	Noite
5° dia	Natação forçada	5 min	Manhã
6° dia	Privação de água e alimento	14 h	Noite
7° dia	Imobilização	120 min	Tarde
8° dia	Luz apagada	2 h	Tarde
9° dia	Natação forçada	5 min	Manhã
10° dia	Luz acesa à noite	12 h	Noite
11° dia	Isolamento frio	90 min	Manhã
12° dia	Imobilização	60 min	Tarde
13° dia	Privação de água e alimento	14 h	Noite
14° dia	Imobilização	60 min	Manhã

Fonte: Adaptado de Munhoz (2006)

3.2.1.2 Estresse agudo

Para o estudo do efeito agudo do estresse, os animais foram imobilizados por 2 h no período da manhã (entre 9 e 11 h). O aparato foi o mesmo utilizado no modelo de estresse crônico imprevisível (EI), descrito acima.

3.2.2 TRATAMENTOS FARMACOLÓGICOS

3.2.2.1 Tratamento com metirapona

A metirapona (2-Methyl-1,2-di-3-pyridil-1-propanone; Sigma-Aldrich) é conhecida por inibir a síntese de corticosterona ao se ligar à enzima 11 β -hidroxilase que converte a 11-deoxicorticosterona em corticosterona, principalmente nas glândulas adrenais. Durante os 14 dias

previstos no protocolo de EI, a solução de metirapona foi administrada via injeção intraperitonal (i.p.) na dose de 50 mg/kg de peso corporal, 30 min antes da exposição ao estímulo estressor. A dose utilizada foi determinada após curva dose-resposta realizada em nosso laboratório (dados não apresentados). A solução de metirapona foi preparada segundo Tata e Yamamoto (2008) em solução salina (NaCl 0,9%)/10% etanol. O grupo controle também recebeu injeções de metirapona nas mesmas condições que os animais do grupo EI, porém não foi submetido às sessões de estresse.

3.2.2.2 Tratamento com antagonistas dos receptores adrenérgicos

Durante os 14 dias do protocolo de EI, foram administrados em um grupo de animais, simultaneamente, atenolol (antagonista seletivo dos receptores β -adrenérgicos, Sigma-Aldrich) e fentolamina (antagonista seletivo dos receptores α -adrenérgicos, Sigma-Aldrich) nas doses de 5 mg/kg e 2,5 mg/kg de peso corporal, respectivamente, via i.p. e 20 min antes da exposição ao estímulo estressor (García-Bueno et al., 2008). As soluções de atenolol e fentolamina foram preparadas individualmente em solução salina (NaCl 0,9%). O grupo controle também recebeu injeções de atenolol/fentolamina nas mesmas condições que os animais do grupo EI, porém não foi submetido às sessões de estresse.

3.2.3 DOSAGEM DE CORTICOSTERONA PLASMÁTICA

3.2.3.1 Obtenção do plasma

Para a dosagem de corticosterona, foi coletado sangue no momento do procedimento de perfusão transcardíaca de todos os grupos experimentais, com exceção dos animais utilizados no estudo comportamental em que a coleta foi efetuada no momento da decapitação. Para a obtenção do plasma, o sangue foi coletado na presença de heparina (10% v/v) e posteriormente centrifugado por 15 min a 3500 rpm. O plasma obtido foi transferido para um tubo novo e mantido a -80°C até a realização do ensaio.

3.2.3.2 Dosagem de corticosterona

A dosagem de corticosterona foi determinada através do kit Corticosterone EIA® (Assay Designs, Enzo LifeSciences®, Reino Unido), seguindo as orientações do fabricante. O teste se

baseia na ligação competitiva do anticorpo policlonal anti-corticosterona com a corticosterona presente nas amostras e curva padrão e às moléculas de fosfatase alcalina, as quais apresentam corticosterona ligadas covalentemente. As amostras de plasma (na diluição de 1:30) e a curva padrão foram diluídas em tampão de amostra e adicionadas (em duplicata) à placa sensibilizada com anticorpo anti-IgG de ovelha, juntamente com a solução contendo fosfatase alcalina conjugada com corticosterona (EIA Conjugate®) e anticorpo anti-corticosterona policlonal de ovelha (EIA Antibody®). Após incubação de 2 h a temperatura ambiente, as placas foram lavadas (4 vezes) com tampão de lavagem fornecido pelo kit e, em seguida, foi adicionado o substrato p-Npp (p-nitrophenyl fosfato). Depois de 1 h, a reação enzimática foi interrompida pela adição da solução trissódio fosfato (Stop Solution®), na mesma sequência em que o substrato foi adicionado e a leitura espectrofotométrica foi realizada a 405 nm com o auxílio do aparelho Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader (Bio Tek, Winooski, VT, USA). A densidade óptica foi utilizada para o cálculo das concentrações de corticosterona ($\mu\text{g/dL}$).

3.2.4 GLÂNDULA ADRENAL

Para controle do procedimento de estresse, adicional à dosagem de corticosterona, avaliamos o peso da glândula adrenal dos animais dos grupos controle e EI, como descrito em Bloss et al. (2010). Nesse experimento, após a decapitação em guilhotina, os animais tiveram seu abdome aberto e as glândulas adrenais removidas, secas em papel filtro e em seguida pesadas em balança analítica. A normalização dos valores obtidos foi realizada pelo peso corpóreo de cada animal, e o resultado expresso como a relação glândula adrenal/peso corpóreo (%).

3.2.5 ANÁLISE DOS RECEPTORES CRF_2 E GR NO ENCÉFALO DE RATOS SUBMETIDOS AO MODELO DE ESTRESSE CRÔNICO IMPREVISÍVEL

Todos os experimentos referentes à análise dos receptores de CRF_2 e GR foram realizados no laboratório de Neuroanatomia Química, coordenado pelo Prof. Dr. Jackson C. Bittencourt com o auxílio da especialista de laboratório Joelcimar Martins do Departamento de Anatomia do ICB-USP.

3.2.5.1 Obtenção do encéfalo

Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral (35%, 1 ml, i.p.) e em seguida foi realizada a perfusão transcardíaca. Para tal procedimento, uma agulha foi inserida pelo ventrículo no coração exposto do animal em direção ao ramo ascendente da aorta. Com o auxílio de bomba peristáltica, primeiramente, os animais foram perfundidos com solução salina (NaCl 0,9%; $\pm$ 100 ml/min), para retirar o máximo de sangue do animal, seguida de, aproximadamente, 900 ml/25 min de solução de formaldeído (4%), obtida a partir de paraformaldeído aquecido a 60-65 °C, para a fixação do tecido. Após esse procedimento, os animais foram decapitados, os encéfalos removidos e colocados em solução de formaldeído a 4% e sacarose a 20% por 3 h, em tubos estéreis. Após esse período, foi realizada a troca da solução de fixação contendo sacarose para outra contendo tampão fosfato salina (PBS) livre de RNase também acrescida sacarose (20%), na qual os encéfalos ficaram imersos até o momento do corte. Nos dois dias consecutivos, os encéfalos foram cortados na espessura de 30 μ m em plano coronal, em micrótomo de congelamento. Os cortes foram dispostos em série, em solução *antifreezing* livre de RNase (PBS, 30% etilenoglicol e 20% glicerol) e mantidos a -20 °C até serem utilizados para os ensaios de hibridização *in situ* ou imunohistoquímica.

3.2.5.2 Expressão de CRF₂ por hibridização *in situ* no encéfalo de ratos submetidos ao EI

Para o ensaio de hibridização *in situ*, os cortes foram montados em lâminas polarizadas livres de RNase (Fisher Superfrot Plus®, Fisher Scientific, EUA), utilizando-se PBS livre de RNase e formalina, e armazenadas a -20 °C na presença de cápsulas de sílica.

3.2.5.2.1 Pré-tratamento dos cortes para hibridização

Primeiramente, os cortes foram fixados em solução de formaldeído 4% em PBS por 5 min.; em seguida procedeu-se 2 lavagens com PBS e tratamento com proteinase-K 0,5 μ g/ml (Gibco, Carlsbad – EUA) em solução 0,1 M Tris-HCl e 0,05 M de EDTA por 30 min a 37 °C. A fim de neutralizar a possível ocorrência de íons livres e aumentar a penetração da sonda, os cortes foram lavados em água tratada com dietil pirocarbonato (DEPC) e incubados (10 min) em tampão TEA-HCl (solução de hidrocloreto de trietanolamina pH 8, 0,1 M, TEA-HCl, Research Organics, Cleveland- EUA) seguido de 10 min em solução de TEA-HCl acrescido de anidrido acético 0,1 M (Sigma-Aldrich), para serem acetilados. Os cortes foram lavados 2 vezes em

tampão de citrato de sódio (SSC) 2X/5 min e desidratados em concentrações crescentes de álcool (70, 80, 95 e 100%), seguido de imersão em xilol e por fim em álcool na concentração de 100 e 95%. Após secagem a temperatura ambiente, as lâminas foram imediatamente submetidas ao processo de hibridização ou novamente guardadas a -20 °C na presença de cápsulas de sílica.

3.2.5.2.2 Preparação da sonda e hibridização

Plasmídeos contendo a sequência do RNAm do CRF₂ (Figura 6) foram linearizados por meio das enzimas de restrição Hind III e XbaI (Promega®, Madison – EUA), para a transcrição *in vitro* das sondas senso e antisenso, respectivamente, e isolados com Fenol-Clorofórmio-Álcool isoamílico. Para a marcação das sondas senso e antisenso, foram realizadas transcrições *in vitro* onde os nucleotídeos radioativos, marcados com ³⁵S-UTP (Perkin Elmer, Gensese) foram incorporados utilizando-se as enzimas polimerases T7 (sonda senso) e T3 (sonda antisenso) (Promega). As transcrições foram realizadas a 37 °C por 1 h. O molde de DNA complementar utilizado na transcrição foi removido com a adição de RNasin® (Promega) e RQ1 DNase® (Promega) a 37 °C. Os nucleotídeos não incorporados foram removidos através de passagem da solução por micro-colunas de resina G-50 (Probe Quant G-50, Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway – EUA). Realizado esse procedimento, foi feita a contagem de incorporação do ³⁵S-UTP na sonda em cintilador (TRI-CARB 2100 TR, Packard Instrumental Company, Meriden – EUA).

Para a hibridização, a sonda (10⁶ cpm/ml) foi acrescida ao tampão de hibridização (dextran sulfato, RNA total de levedura, RNA transportador de levedura, solução de Denhardt, esperma de salmão e EDTA em solução salina tamponada com Tris-HCl) e submetida à temperatura de 90 °C por 5 min, seguido de 4 °C por 5 min. Foi acrescido 50% de formamida, 0,1% de lauril sulfato de sódio, 0,1% tiosulfato de sódio e ditioneitol 100 mM (DTT). A solução de hibridização foi adicionada sobre os cortes, que foram cobertos por lamínulas, e incubados por aproximadamente 15 h a 56 °C.

Figura 6 - Esquema do mapa do plasmídeo contendo o inserto com a sequência do CRF₂.

Plasmídeo pBluescript (SK+) contendo o inserto do CRF₂ identificando os sítios das enzimas de restrição (Hind III e Xba I) e polimerases T7 e T3 para a síntese das sequências senso e antiseno, respectivamente. Fonte: Malta (2012) baseado em informações comerciais (Promega) e do laboratório de origem.

3.2.5.2.3 Pós-hibridização

Após o procedimento de hibridização, as lâminulas foram retiradas e procedeu-se o tratamento de pós-hibridização. Primeiramente, os cortes permaneceram em tampão RNase A (500 mM NaCl, 40 mM de Tris-HCl pH 8, 1mM de EDTA pH 8 em água dH₂O) por 30 min à temperatura ambiente. Em seguida foi realizado o tratamento com RNase A, em seu próprio tampão, por 30 min à temperatura ambiente. Após este tempo, os cortes foram rapidamente lavados em tampão de citrato de sódio (solução de SSC 2X) e seguiu-se com o tratamento de adstringência crescente que consistiu em incubações de 1 h cada em solução SSC contendo 1 mM de DTT nas seguintes temperaturas 50 °C, 55 °C e 60 °C. Para finalizar, os cortes foram desidratados em solução de etanol em SSC por 10 min e secos a temperatura ambiente. Por fim, as lâminas foram expostas a filme radiográfico (Kodak Biomax MR, Kodak, Rochester – EUA) em cassetes por 3 dias, o qual foi revelado com solução Reveladora e Fixadora (Kodak) para análise prévia da marcação do tecido pela sonda.

3.2.5.2.4 Revelação das lâminas

Verificada a incorporação da sonda no tecido por meio da análise do filme radiográfico, as lâminas foram mergulhadas em emulsão autorradiográfica (Kodak). Para tanto, a emulsão autorradiográfica foi previamente aquecida em banho a 40 °C em sala escura e úmida e diluída a 50% com água destilada. As lâminas foram mergulhadas vagarosamente na solução e colocadas

para secar em estufa a 37 °C por 3 h. Após este período, as lâminas foram acondicionadas em caixa vedada, para proteção da luz, contendo cápsulas de sílica e mantidas por 20 dias em câmara fria a - 4 °C.

Para a revelação, as lâminas foram expostas à solução Reveladora (Kodak) por 2 min, lavadas em água e em seguida, expostas na solução Fixadora (Kodak) por mais 2 min, ambas a temperatura de 16-18 °C. Por fim, as lâminas foram lavadas abundantemente em água por 15 min. Os cortes foram submetidos à coloração de Nissl (solução de tionina), para visualização da citoarquitetura, desidratadas em concentrações crescentes de etanol (50, 70, 80, 90 e 100%), deslipidificadas em xilol e cobertas com lamínula usando DPX (Aldrich, Milwaukee – EUA) como meio de montagem.

3.2.5.2.5 Análise da expressão do RNAm de CRF₂

A análise da expressão do RNAm foi realizada pela determinação da intensidade óptica integrada (IOD). Para tanto, foram fotografadas as regiões do núcleo septal lateral parte intermédia (LSi, , níveis: 0,70; 0,20 e -0,26 mm a partir do Bregma) e ventromedial do hipotálamo (VmH, níveis -2,30; -3,14 e -3,60 mm a partir do Bregma) no aumento de 10X em campo escuro. Com o auxílio do programa Image-Pro® Plus, determinou-se a área para a quantificação da IOD (IOD da região marcada – IOD da região próxima sem marcação), sendo os dados expressos como a média da IOD $\pm$ erro padrão da média (unidade arbitrária, u.a.) para cada um dos grupos experimentais no nível medial dos núcleos (-0,20 mm e -3,14 mm com referência ao Bregma para o LSi e VmH, respectivamente. Figura 7A e 7B). Para que não houvesse tendência na quantificação da IOD, a análise foi realizada em duplo-cego, ou seja, os grupos experimentais foram renomeados aleatoriamente e só revelados após todo procedimento finalizado.

Figura 7 - Cortes ilustrativos nos núcleos septal lateral parte intermédia e ventromedial do hipotálamo do encéfalo de ratos.

A: Núcleo septal lateral parte intermédia (LSi) e B: núcleo ventromedial do hipotálamo (VmH). Os quadrados representam a área analisada para a determinação da intensidade óptica integrada (IOD) para cada um dos núcleos.

Fonte: Paxinos e Watson (2004).

3.2.5.3 Imunorreatividade ao receptor de glicocorticóide (GR) no encéfalo de ratos submetidos ao EI

3.2.5.3.1 Especificidade do anticorpo

Para avaliar a especificidade da reação, o anticorpo contra o receptor de glicocorticóide (anti-GR; GR M-20: SC-1004; Santa Cruz Biotechnology) foi incubado na presença de diferentes concentrações do peptídeo específico sintético (50, 5, 0,5 e 0 μ g; GR (M-20)P; Santa Cruz Biotechnology) por $\pm$ 18 h, para então se dar prosseguimento ao ensaio de imunorreatividade.

3.2.5.3.2 Titulação do anticorpo

Para determinar a concentração do anticorpo a ser utilizado, foi realizado o procedimento de titulação do anticorpo anti-GR, cujas diluições variaram de 1:1000 à 1:30.000, utilizando cortes provenientes do encéfalo de animal controle, com o tempo de reação fixo em 20 min.

3.2.5.3.3 Ensaio de imunorreatividade

Para o ensaio de imunorreatividade, os cortes foram lavados em tampão potássio-fosfato de sódio 0,02 M (KPBS) por 30 min para a remoção da solução *antifreezing* e tratados com 0,3% de peróxido de hidrogênio (LabSynth®, São Paulo - Brasil) durante 15 min para a neutralização

da peroxidase endógena. Após lavagens sucessivas em KPBS, os cortes foram incubados *free floating* com anticorpo primário anti-GR (1:3.000, Santa Cruz, policlonal, gerado em coelho) diluído em KBPS, 3% de soro normal de burro e 0,3% de Triton X-100 por ± 18 h à temperatura ambiente e sob agitação constante. Após esse período, o tecido foi lavado em KPBS e incubado por 1 h em anticorpo secundário biotinilado anti-coelho (1:800, Vector Laboratories, Burlingame - EUA), lavado em KPBS e, a seguir, incubado no complexo avidina-biotina (1:333, Kit Elite, Vector Laboratories, Burlingame - EUA) por 1 h. Em seguida, os cortes foram lavados em KPBS e em tampão acetato de sódio 0,2 M e submetidos à reação de peroxidase composta por solução de tampão acetato de sódio, cromógeno tetracloreto de diaminobenzidina (DAB, Sigma Chemical, St. Louis - EUA) a 0,02%, sulfato de níquel a 2,5% e peróxido de hidrogênio a 0,003%. A reação foi finalizada com lavagens em tampão acetato de sódio 0,2 M seguida de lavagens em KPBS. Os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas, secos em estufa a 37 °C por pelo menos 18 h, desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico, clareados em xilol e cobertos com lamínulas usando DPX (Aldrich, Milwaukee - EUA) como meio de montagem.

3.2.5.3.4 Análise da marcação de imunorreatividade ao GR

Para a análise da imunorreatividade ao GR, o número de células GR-positivas em núcleos específicos do encéfalo, como septo lateral (LS); núcleo paraventricular do hipotálamo (PVH); núcleo central da amígdala (CeA) e núcleo intersticial da estria terminal (BST) foram contadas manualmente. O aumento utilizado para essa análise foi de 20 X em campo claro, e os valores foram expressos como a média de células marcadas/mm² $\pm$ erro padrão da média (n=6). A área total foi definida pelo produto entre o n° de cortes analisados e área quantificada no aumento de 20 X para cada núcleo, ou seja, 0,278 mm² para os núcleos LS e CeA; 0,06 mm² para BST e 0,04 mm² para PVH.

3.2.5.4 Dupla marcação: imunorreatividade para GR e hibridização *in situ* para CRF₂

Os cortes foram lavados em tampão fosfato salina livre de RNase (PBS) durante 1 h, tratados com 0,3% de peróxido de hidrogênio em PBS durante 15 min para neutralização da peroxidase endógena e novamente lavados em PBS. Previamente à incubação no anticorpo primário, foi realizado o bloqueio de sítios inespecíficos com 1% de soro albumina bovina e 0,3% de Triton X-100 em PBS por 1 h, seguido de adição do anticorpo primário anti-GR (1:3.000). A

incubação ocorreu por aproximadamente 18 h a temperatura ambiente, sob agitação constante. Após este período, os cortes foram lavados em PBS com 0,3% de Triton X-100 e incubados em anticorpo anti-coelho biotilado diluído em solução PBS com 0,3% de Triton X-100 por 1 h à temperatura ambiente. Após a incubação com anticorpo secundário, os cortes foram lavados em PBS e incubados no complexo avidina-biotina (Kit Elite, Vector Laboratories) por 1 h à temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram lavados em PBS e submetidos à reação de peroxidase, fornecida por solução de PBS, cromógeno tetracloreto de diaminobenzidina (DAB, ICN Biomedicals, Aurora – EUA) e 0,01% de peróxido de hidrogênio. A reação foi finalizada com lavagens em PBS e os cortes foram montados em lâminas livres de RNase com aderência eletrostática (Fisher Superfrot Plus®, Fisher Scientific, EUA).

Após secagem, os cortes foram pré-tratados para o procedimento de hibridização *in situ* para CRF₂ como descrito anteriormente. Depois de 20 dias, as lâminas foram reveladas com revelador e fixador Kodak, desidratadas em concentrações crescentes de álcoois, deslipidificadas em xilol e cobertas com lamínula usando DPX (Aldrich, Milwaukee – EUA) como meio de montagem.

Para a análise da colocação desses receptores, observamos o depósito de grãos de prata nas mesmas células marcadas pelo ensaio da imunorreatividade para GR, em campo claro na microscopia de luz.

3.2.5.5 Aquisição de imagem

As lâminas foram observadas em microscópio de luz Leica DMR (Leica, Wetzlar, Alemanha). As imagens foram obtidas em câmera digital acoplada a um computador utilizando o programa NSI Elements BR 3.0. Posteriormente, as mesmas receberam ajustes em relação a brilho, contraste e balanço de cores e foram organizadas em figuras através do programa Adobe Photoshop 5.1.

3.2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Seguindo as orientações de assessoria do Centro de Estatística Aplicada do Instituto de Matemática e Estatística da USP (CEA-IME USP), foi utilizado para comparações múltiplas o teste não paramétrico Kruskal Wallis, uma vez que os grupos foram compostos por um pequeno número de animais (n=6). Quando apropriado, e com o objetivo de comparar as respostas entre

os grupos (dois a dois), foi utilizado o teste de Mann Whitney (detalhes vide Conover, 1980). Foram considerados valores estatisticamente significativos $p < 0,05$.

A análise dos dados obtidos em cada um dos experimentos (IOD para expressão de RNAm de CRF₂, número de células imunorreativas ao GR, dosagem de corticosterona plasmática e peso seco da glândula adrenal) foi feita comparando os grupos experimentais (Quadro 1):

Respostas observadas dentro dos grupos controle, EI e EA:

- Controle **vs** Controle+Met. **vs** Controle+ AF
- EA **vs** EA+Met.
- EI **vs** EI + Met. **vs** EI + AF

Respostas observadas entre os grupos experimentais, dois a dois:

- Controle **vs** EI
- Controle **vs** EA
- EI **vs** EA

3.3 Delineamento experimental II - Estudo Comportamental

Com intuito de avaliar se as alterações morfofisiológicas induzidas pelo estresse crônico imprevisível (EI) eram capazes de alterar o comportamento de ratos machos, um novo lote de ratos foi dividido aleatoriamente nos grupos controle e EI e avaliados quanto a anedonia e/ou ansiedade seguindo o delineamento IIa (baseado no trabalho de Kompagne et al., 2008) e IIb. A anedonia foi avaliada pelo consumo de solução de sacarose e a ansiedade pelo teste do labirinto em cruz elevado (Figura 8A e B).

Figura 8 - Delineamentos para o estudo comportamental dos animais submetidos ao estresse crônico imprevisível.

A

B

A: decurso temporal do delineamento IIa para análise de anedonia e ansiedade. Período de habituação (5 dias, Hab. Sacarose). Análise da preferência pelo consumo de solução de sacarose basal (T1) e teste (T2), 24 h antes e após o período de estresse crônico imprevisível de 14 dias. Teste de ansiedade pelo labirinto em cruz elevado (EPM), 48 h após o último estímulo estressor. Decapitação dos animais (★) e obtenção de sangue e glândula adrenal. n=24/grupo. B: Decurso temporal do delineamento IIb para análise da ansiedade. Animais avaliados em labirinto em cruz elevado (EPM) 24 h após o último estímulo estressor, sacrificados no mesmo dia (★) e obtenção de sangue e glândula adrenal. n=12/grupo.

Fonte: Malta (2012).

3.3.1 TESTE DE PREFERÊNCIA POR SACAROSE

Para o teste de preferência por sacarose, os animais foram expostos, por cinco dias (habituação), à solução de sacarose 1% (w/v) em água de beber (Labsynth®). Para tanto, duas garrafas contendo apenas água e solução de sacarose 1% foram disponibilizadas aos animais *ad libitum* e trocadas duas vezes ao dia quanto à disposição na gaiola. Sempre que necessário, as soluções eram repostas para evitar que os animais não tivessem acesso às duas soluções.

Para analisarmos a influência do EI no consumo de sacarose, o consumo basal (T1) foi determinado 24 h antes do início do protocolo de EI e o teste foi realizado 24 h após o último estímulo estressor (dia teste, T2) para cada animal, segundo modelo proposto por Kompagne et al. (2008). Nesses dois dias, os animais foram privados por 5 h (7 às 12 h) de água e comida e em seguida acondicionados isoladamente em caixas para a avaliação da preferência pelo consumo de sacarose. Para tanto, duas garrafas idênticas contendo água e outra solução de sacarose 1% foram disponibilizadas aos animais por 1 h. Ao fim desse período, as garrafas foram retiradas e os animais foram agrupados novamente na caixa moradia. O volume de solução consumido foi obtido pela diferença de peso (g) das garrafas antes e depois da exposição. Para o cálculo da preferência por sacarose, foi utilizada a razão entre o consumo de solução de sacarose(g)/consumo total(g) x 100. Os valores foram expressos como a média $\pm$ erro padrão (%) e comparados quanto: 1) consumo basal e do dia teste e 2) consumo entre os grupos controle e EI, em cada um dos dois dias. Durante todo o protocolo de EI os animais não foram expostos à solução de sacarose.

3.3.2 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

Para avaliação do comportamento tipo-ansioso dos animais submetidos ao EI, foi utilizado o teste do labirinto em cruz elevado (EPM). Este aparato é formado por quatro braços, dois abertos e dois fechados dispostos perpendicularmente de maneira a formar uma região central (100 cm²) e posicionados a 65 cm de altura do chão. O aparato foi construído em madeira e pintado em azul escuro, para o melhor contraste entre a pelagem dos animais e a plataforma, com as paredes dos braços fechados encaixadas permitindo assim a sua remoção para a limpeza. Os ensaios de ansiedade no labirinto em cruz foram realizados em sala de teste caracterizada por isolamento acústico, iluminação indireta e uma câmera de vídeo acoplada ao computador, localizado externamente.

Após o período de adaptação de 2 h no ambiente onde estava localizada a sala de teste, cada animal foi cuidadosamente retirado da caixa moradia e posicionado na região central do aparato e observado por 5 min. A atividade geral dos animais foi avaliada por meio do sistema de captação de imagens EthoVision (Noldus Information Technology). Esse processo permite a captura da imagem do labirinto em cruz elevado, a partir da qual foi delineada uma arena virtual subdividida em regiões: braços abertos (1 e 2), braços fechados (1 e 2) e região central. O tipo de captação utilizado foi baseado no sistema de subtração, que consiste na geração de contraste entre a cor branca da pelagem do animal e do aparato de cor azul, o que permite visualizá-lo como um objeto em movimento. A análise foi realizada a partir do cálculo da porcentagem de permanência do animal nos braços fechado e aberto, baseado em método proposto por Pellow et al. (1985). Foram desconsiderados os animais que caíram do aparato. Entre cada sessão, o aparato experimental foi limpo com uma solução de álcool 5% a fim de evitar possíveis rastros de odor deixados pelo animal anterior. Além disso, para evitar efeitos circadianos no comportamento dos ratos, os experimentos foram realizados sempre no período entre 8 h e 12 h.

Todos os experimentos referentes ao EPM foram realizados no laboratório de Neuroquímica e Farmacologia Comportamental, coordenado pela Profa. Dra. Rosana Camarini do Departamento de Farmacologia do ICB-USP.

4 RESULTADOS

4.1 Análise morfofisiológica

4.1.1 DOSAGEM DE CORTICOSTERONA

Para verificar o efeito dos estímulos estressores em ratos machos, avaliamos os níveis plasmáticos de corticosterona nos diferentes grupos experimentais, uma vez que o aumento desse hormônio está associado à resposta ao estresse e, em algumas situações, se mantém elevado mesmo na ausência do estímulo (Figura 9).

No grupo de animais submetidos ao estresse agudo, observamos aumento dos níveis de corticosterona plasmática imediatamente após o final do estímulo estressor ($27,3 \pm 3,3 \mu\text{g/dL}$, $p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle ($4,9 \pm 1,0 \mu\text{g/dL}$). O mesmo efeito foi observado nos animais submetidos ao estresse crônico imprevisível, 24 h após o último estímulo estressor ($14,9 \pm 2,2 \mu\text{g/dL}$; $p < 0,05$ quando comparado ao controle), evidenciando a manutenção dos níveis elevados desse hormônio mesmo na ausência do estímulo. Sendo assim, esse foi o intervalo de tempo escolhido para os estudos da expressão de CRF_2 e dos níveis de GR no encéfalo desses animais.

Como a manutenção de níveis elevados de corticosterona pode se dar, no caso dos animais submetidos ao estresse crônico imprevisível, pela ausência da retroalimentação negativa do GCs no eixo HPA ou ainda pela ação noradrenérgica proveniente do LC sobre as células secretoras de CRF no PVH, que mantém a hiperatividade do eixo, um grupo de animais (controle e EI) foi tratado com metirapona (inibidor da síntese de corticosterona) ou com antagonistas dos receptores adrenérgicos [atenolol (β -adrenoceptores) e fentolamina (α -adrenoceptores), AF] 30 ou 20 min antes de cada sessão de estresse, respectivamente.

Para validar uma dose de metirapona capaz de inibir de forma eficiente a síntese de GCs induzida pelo estresse, um grupo de animais foi tratado previamente com Met. (50 mg/kg, 30 min antes) e submetido ao estresse agudo (imobilização por 2 horas). Observamos que, nos animais estressados previamente tratados com Met. (EA + Met., $10,4 \pm 2,6 \mu\text{g/dL}$), os níveis de corticosterona plasmática foram iguais ao do grupo controle ($p > 0,05$) e menores do que nos animais submetidos ao EA ($p < 0,05$). Uma vez que a dose utilizada (50 mg/kg) foi capaz de inibir a ação do estímulo estressor sobre o aumento do GCs, adotamos para os demais grupos (tratamento crônico).

Como podem ser observados na figura R1, os efeitos dos tratamentos com metirapona ou AF foram dependentes da presença dos estímulos estressores, uma vez que nos grupos controle, não submetidos ao EI, (C+ Met. $4,9 \pm 0,9 \mu\text{g/dL}$ e C + AF $4,1 \pm 0,9 \mu\text{g/dL}$) não foi observada alteração nos níveis plasmáticos de corticosterona quando comparado ao grupo controle não tratado ($p > 0,05$).

Já para os animais estressados, tanto os animais submetidos ao EI tratados com metirapona (EI + Met. $2,6 \pm 0,7 \mu\text{g/dL}$) quanto os tratados com antagonistas dos receptores adrenérgicos (EI + AF $3,9 \pm 1,8 \mu\text{g/dL}$) não apresentaram níveis aumentados de corticosterona 24 h após o último estímulo estressor, sendo esses níveis menores que os dos animais submetidos ao EI ($p < 0,05$) e iguais aos dos grupos controle ($p > 0,05$).

Devido ao delineamento utilizado para a avaliação do comportamento tipo-ansioso e da anedonia nos animais submetidos ao EI, foi realizada nova dosagem de corticosterona no intervalo de 24 h e 72 h após a última sessão de estresse.

Decorridas 24 h do último estímulo estressor e exposição ao labirinto em cruz elevado, o nível de corticosterona apresentava-se elevado (EI $14,9 \pm 2,2 \mu\text{g/dL}$) quando comparado ao grupo controle ($3,5 \pm 0,5 \mu\text{g/dL}$; $p < 0,05$) na mesma magnitude daqueles observados nos animais submetidos ao EI, mas que não foram expostos ao labirinto em cruz elevado. Já 72h após o último estímulo estressor, os níveis de corticosterona foram semelhantes aos observados no grupo controle, não estressado ($2,5 \pm 0,4 \mu\text{g/dL}$; $p > 0,05$) (Figura 10).

Figura 9 - Concentração de corticosterona plasmática em ratos submetidos a diferentes estímulos estressores e tratamentos farmacológicos.

Dados apresentados como média $\pm$ e.p.m em $\mu\text{g/dL}$. Grupos: Controle (não submetido a estímulo estressor nem tratamento farmacológico); C+Met. (animal não submetido a estímulo estressor e tratado com metirapona 50 mg/kg por 14 dias); C+ AF (animal não submetido a estímulo estressor e tratado com atenolol e fentolamina 5 e 2,5 mg/kg por 14 dias); EA (animal submetido a estresse agudo e sacrificado imediatamente após); EA + Met. (animal EA tratado com metirapona 50 mg/kg); EI (animal submetido ao protocolo de estresse crônico imprevisível); EI + Met. (animal EI tratado com metirapona 50 mg/kg 30 min. antes de cada exposição ao estímulo estressor) e EI + AF (animal EI tratado com atenolol e fentolamina 5 e 2,5 mg/kg 20 min. antes de cada exposição ao estímulo estressor). Para os grupos submetidos ao EI, dados referentes a concentração de corticosterona 24 h após o último estímulo estressor do protocolo de EI. * $p < 0,05$ comparados ao controle; • $p < 0,05$ comparados a EI ($n=5$); # $p < 0,05$ comparado ao EA 2h. Teste de Kruskal Wallis seguido pelo teste de Mann Whitney (detalhes vide Conover, 1980), $n=6$ animais por grupo experimental.

Fonte: Malta (2012).

Figura 10 - Concentração de corticosterona plasmática em ratos submetidos ou não ao EI e avaliados quanto a alterações comportamentais.

Dados apresentados como média $\pm$ e.p.m em $\mu\text{g/dL}$. Grupos: Controle (não submetidos a estímulos estressores); EI 24 h (animais submetidos ao EI e sacrificados 24 h após o último estímulo estressor, avaliados quanto ansiedade, delineamento IIb) e EI 72 h (animais submetidos ao EI e sacrificados 72 h após o último estímulo estressor, avaliados quanto a anedonia e ansiedade, delineamento IIa) * $p < 0,05$ quando comparado ao controle e # $p < 0,05$ quando comparado ao EI 24h ($n=10$ animais por grupo experimental).

Fonte: Malta (2012).

4.1.2 GLÂNDULA ADRENAL

Como forma adicional de validar o protocolo de EI, também avaliamos o peso seco da glândula adrenal. O aumento da função dessa glândula causa hipertrofia, como podemos observar nos animais avaliados após 24 h do último estímulo estressor ($17,4 \pm 0,8$ e $14,2 \pm 0,8$ % da relação glândula adrenal/peso corpóreo, EI e controle respectivamente; $p < 0,05$; Figura 11A) correlacionando estes dados ao aumento dos níveis de corticosterona plasmática. Porém essa alteração não persistiu após 72 h, uma vez que não houve diferença no peso seco da glândula nos animais EI quando comparados aos animais controles, não estressados ($14,5 \pm 0,5$ % da relação glândula adrenal/peso corpóreo; Figura 11B), e quando níveis de corticosterona plasmática estão iguais ao controle ($p > 0,05$).

Figura 11 - Avaliação da glândula adrenal em animais submetidos ou não ao EI.

Dados apresentados como média da relação glândula adrenal/peso corpóreo $\pm$ e.p.m. em porcentagem (%). A: relação glândula adrenal/peso corpóreo em animais controle e submetidos ao protocolo de EI, sacrificados 24 h após o último estímulo estressor. B: relação glândula adrenal/peso corpóreo em animais controle e submetidos ao protocolo de EI sacrificados 72 h após o último estímulo estressor. Teste T. * $p < 0,05$ quando comparado ao controle ($n = 10$ animais por grupo experimental).

Fonte: Malta (2012).

4.1.3 ANÁLISE DOS RECEPTORES CRF₂ E GR NO ENCÉFALO DE RATOS

4.1.3.1 Expressão CRF₂ por hibridização *in situ* em animais submetidos ao EI

4.1.3.1.1 Especificidade da sonda de CRF₂

Com o intuito de demonstrar a especificidade da sonda, utilizou-se a enzima T7 para sintetizar uma fita de RNA senso, ou seja, com a mesma sequência de nucleotídeos presente no tecido. Dessa maneira, não deve haver pareamento das fitas de RNA (presentes no tecido e sintetizadas).

Como não observamos marcação nos tecidos encefálicos com a sonda senso, podemos concluir que a sonda utilizada nos experimentos apresentados aqui é específica (Figura 12).

4.1.3.1.2 Análise da expressão de RNAm de CRF₂

Como a distribuição do CRF₂ é restrita a certas regiões encefálicas, dentre elas o núcleo septal lateral parte intermédia (LSi) e ventromedial do hipotálamo (VmH), essas foram as áreas analisadas nos ensaios de hibridização *in situ* (Tabela 1; Figuras 13 e 14).

Foi observado aumento da expressão de RNAm do CRF₂ nos animais submetidos ao EI ($1,4 \times 10^6 \pm 1,3 \times 10^5$ u.a. e $2,4 \times 10^6 \pm 2,2 \times 10^5$ u.a. para o LSi e VmH, respectivamente) quando comparado ao grupo controle ($1,0 \times 10^6 \pm 9,4 \times 10^4$ e $7,9 \times 10^5 \pm 1,0 \times 10^5$ para o LSi e VmH, respectivamente ; $p < 0,05$). Esse aumento foi dependente do tempo (14 dias) e da exposição a diferentes estímulos estressores (EI), uma vez que o grupo EA (submetido ao estresse agudo) não apresentou alteração na expressão de RNAm do CRF₂ quando comparado ao controle ($p > 0,05$) tanto em LSi ($1,1 \times 10^6 \pm 1,6 \times 10^5$ u.a.) quanto em VmH ($1,2 \times 10^6 \pm 1,6 \times 10^5$ u.a.).

Os animais tratados previamente tanto com inibidores da síntese de glicocorticóides (EI + Met.) quanto com antagonistas dos receptores α e β -adrenérgicos (EI + AF) apresentaram redução na expressão de RNAm do CRF₂ quando comparados ao grupo EI, sendo os valores para o LSi de $6,4 \times 10^5 \pm 1,7 \times 10^4$ u.a. e $6,5 \times 10^5 \pm 8,6 \times 10^4$ u.a. para os grupos EI + Met. e EI + AF ($p < 0,05$) e para VmH os valores de $6,4 \times 10^5 \pm 1,1 \times 10^5$ u.a. e $1,3 \times 10^6 \pm 2,7 \times 10^5$ u.a. para os grupos EI + Met. e EI + AF ($p < 0,05$), respectivamente.

O tratamento crônico com fentolamina e atenolol (AF) não alterou a expressão de RNAm do CRF₂ no LSi e VmH, entretanto a administração de metirapona (C+ Met.; $1,7 \times 10^6 \pm$

$4,2 \times 10^4$ u.a.) foi capaz de induzir aumento na expressão de RNAm de CRF₂ no VmH dos animais controle, não submetidos a estímulos estressores ($p < 0,05$).

Tabela 1 - Valores da intensidade óptica integrada (IOD) dos níveis de RNAm de CRF₂ no núcleo septal lateral parte intermédia (LSi) e ventromedial do hipotálamo (VmH).

Níveis de RNAm do CRF ₂ – valores da IOD u.a.		
	LSi	VmH
Controle	$1,0 \times 10^6 \pm 9,4 \times 10^4$	$7,9 \times 10^5 \pm 1,0 \times 10^5$
Controle + Met	$6,6 \times 10^5 \pm 1,6 \times 10^5$	$1,7 \times 10^6 \pm 4,2 \times 10^4 *$
Controle + AF	$6,6 \times 10^5 \pm 1,4 \times 10^5$	$5,5 \times 10^5 \pm 1,2 \times 10^5$
EI	$1,4 \times 10^6 \pm 1,3 \times 10^5 *$	$2,4 \times 10^6 \pm 2,2 \times 10^5 *$
EI + Met	$6,4 \times 10^5 \pm 1,7 \times 10^5 \#$	$6,4 \times 10^5 \pm 1,1 \times 10^5 \#$
EI + AF	$6,5 \times 10^5 \pm 8,6 \times 10^4 \#$	$1,3 \times 10^6 \pm 2,7 \times 10^5 \#$
EA	$1,1 \times 10^6 \pm 1,6 \times 10^5$	$1,2 \times 10^6 \pm 1,6 \times 10^5$

Valores apresentados como média da IOD $\pm$ erro padrão em unidades arbitrárias (u.a.).

Teste de Kruskal Wallis seguido pelo teste de Mann Whitney (detalhes vide Conover, 1980), n=6 animais por grupo experimental.

* $p < 0,05$ comparados ao controle; # $p < 0,05$ comparados ao EI.

Fonte: Malta (2012).

Figura 12 - Ensaio de especificidade da sonda para RNAm do CRF₂ no encéfalo de ratos.

Hibridização *in situ* para RNAm do CRF₂ com a sonda da sequência sense (controle negativo). A e B: Fotomicrografias em campo escuro do LSi e VmH nos níveis 0,20 e -3,14 mm com referência ao Bregma respectivamente. C e E: Fotomicrografias em campo claro mostrando a contracoloração pelo método de Nissl do LSi no nível 0,20 mm com referência ao Bregma. D e F: Fotomicrografias em campo claro mostrando a contracoloração pelo método de Nissl do VmH no nível -3,14 mm com referência ao Bregma respectivamente. Células coradas com tionina (Coloração de Nissl). Grãos de prata (preto). Abreviações: LSi, núcleo septal lateral parte intermédia; VL, ventrículo lateral; LSD, núcleo septal dorsal; 3V, terceiro ventrículo; VmH, núcleo ventromedial do hipotálamo. Escala de barras: 100 μ m (A, B, C e D) e 10 μ m (E e F).

FONTE: Malta (2012).

Figura 13 - Distribuição de RNAm do CRF₂ no encéfalo de ratos.

Fotomicrografias em campo escuro no LSis, nível 0,20 mm com referência ao Bregma evidenciando o RNAm do CRF₂. A: Controle; B: C + Met; C: C + AF; D: EI; E: EI + Met.; F: EI + AF; G: EA. Abreviações: LSis, núcleo septal lateral parte intermédia; VL, ventrículo lateral; LSD, núcleo septal dorsal; cc, corpo caloso. Escala de barra: 100 µm. H: Gráfico da média da intensidade óptica integrada (IOD) ± e.p.m em unidade arbitrária (u.a.) para o RNAm do CRF₂. *p<0,05 comparado ao controle e #p<0,05 comparado ao EI. Teste de Kruskal Wallis seguido pelo teste de Mann Whitney (detalhes vide Conover, 1980), n=6.

FONTE: Malta (2012).

Figura 14 - Distribuição de RNAm do CRF₂ no encéfalo de ratos.

Fotomicrografias em campo escuro no VmH, nível -3,14 mm com referência ao Bregma evidenciando o RNAm do CRF₂. A: Controle; B: C + Met; C: C + AF; D: EI; E: EI + Met; F: EI + AF; G: EA. Abreviações: VmH, núcleo ventromedial do hipotálamo; 3V, terceiro ventrículo. Escala de barra: 100 µm. H: Gráfico da média da intensidade óptica integrada (IOD) ± e.p.m em unidade arbitrária (u.a.) para o RNAm do CRF₂. *p<0,05 comparado ao controle e #p<0,05 comparado ao EI. Teste de Kruskal Wallis seguido pelo teste de Mann Whitney (detalhes vide Conover, 1980), n=6.

FONTE: Malta (2012).

4.1.3.2 Imunorreatividade ao receptor de glicocorticóide (GR)

4.1.3.2.1 Especificidade do anticorpo

A especificidade do anticorpo foi determinada na diluição de 1:3000 (definida para o ensaio através da titulação do mesmo), realizando teste de adsorção utilizando como princípio a competição do GR presente no encéfalo de ratos (controle) e o peptídeo GR (M-20)P (Santa Cruz Biotechnology), específico para o anticorpo anti-GR em diferentes quantidades (0, 0,5; 5; 50 µg). Na quantidade mais baixa (0,5 µg), não observamos marcação tecidual (Tabela 2), o que confirma que esse anticorpo é específico para o GR no encéfalo de ratos Wistar machos.

Tabela 2 - Estudo de competição para caracterização do anticorpo anti-GR em encéfalo de ratos Wistar machos.

peptídeo GR (GR (M-20)P)	Quantidade (µg)			
	0	0,5	5	50
ratos <i>Wistar</i> machos	+++++	-	-	-

Intensidade da marcação usando escala de cinco pontos (+++++), considerando a maior marcação observada nos experimentos (+++++) e (-) indicando a ausência de marcação no encéfalo de ratos Wistar machos. Peptídeo sintético GR comercial (GR (M-20)P, Santa Cruz Biotechnology).

Fonte: Malta (2012).

4.1.3.2.2 Análise da marcação de imunorreatividade ao GR

Foram analisadas as alterações nos níveis de GR em núcleos envolvidos na circuitaria do estresse e/ou integrante do sistema límbico como o núcleo septal lateral parte intermédia (LSi, Figura 15); o núcleo central da amígdala (CeA, Figura 16); o núcleo intersticial da estria terminal (BST, Figura 17) o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVH, Figura 18); e os valores estão apresentados na Tabela 3.

A exposição ao EI induziu aumento do número de células imunorreativas ao GR, ou seja, a expressão desse receptor, nos núcleos LSi, PVH, CeA e BST quando comparados ao grupo controle ($p < 0,05$).

Os tratamentos farmacológicos apresentaram efeitos núcleo dependentes, uma vez que suas ações foram distintas nos núcleos avaliados. Para o LSi e CeA, tanto o tratamento com Met. quanto com AF foram capazes de inibir o aumento dos níveis de GR induzido por EI ($p < 0,05$), enquanto que para o BST esse efeito foi apenas observado nos animais EI tratados

com AF ($p < 0,05$). Todavia para o PVH não foi observada alteração quando comparados ao EI ($p > 0,05$), ou seja, os tratamentos não inibiram o efeito induzido por EI.

O tratamento crônico com AF não alterou os níveis de GR em nenhum dos núcleos avaliados, entretanto o tratamento com Met. foi capaz de induzir o aumento dos níveis de GR no BST e PVH quando comparado ao controle ($p < 0,05$).

Pode-se dizer também que, para os núcleos LSi e CeA, a resposta ao estresse está associada ao tempo (14 dias) e a exposição a diferentes estímulos estressores (EI), uma vez que nos animais submetidos ao estresse agudo (EA) não observamos aumento nos níveis de GR quando comparado ao controle ($p > 0,05$). Embora, no BST os animais submetidos ao EA apresentem aumento dos níveis de GR quando comparado ao controle ($p < 0,05$), também podemos dizer que a resposta está associada à cronicidade, uma vez que esse aumento é menor do que o observado em EI ($p < 0,05$).

Tabela 3 - Valores da média de células marcadas/mm² para GR nos núcleo septal lateral parte intermédia (LSi), central da amígdala (CeA), núcleo intersticial da estria terminal (BST) e paraventricular do hipotálamo (PVH).

Imunorreatividade para o receptor de glicocorticóide (GR)							
	Controle	C + Met	C + AF	EI	EI + Met	EI + AF	EA
LSi	162 ± 9	235 ± 26	270 ± 30	433 ± 40*	259 ± 25#	262 ± 25#	258 ± 46#
CeA	260 ± 27	371 ± 43	331 ± 48	566 ± 55*	346 ± 24#	309 ± 11#	380 ± 41#
BST	529 ± 82	1008 ± 53*	822 ± 147	1280 ± 29*	903 ± 72#	882 ± 130	960 ± 77#*
PVH	814 ± 96	1617 ± 190*	1164 ± 259	1850 ± 144*	1615 ± 235*	1881 ± 48*	1591 ± 114

Valores apresentados como média da de células marcadas/mm² ± e.p.m em unidades arbitrárias (u.a.).

Teste de Kruskal Wallis seguido pelo teste de Mann Whitney (detalhes vide Conover, 1980), n=6.

* $p < 0,05$ comparados ao controle; # $p < 0,05$ comparados ao EI.

Fonte: Malta (2012).

Figura 15 - Presença de GR no núcleo septal lateral parte intermédia (LSi) de ratos.

Fotomicrografias de campo claro mostrando células imunorreativas a GR no LSi. A: Controle; B: C + Met; C: C + AF; D: EI; E: EI + Met.; F: EI + AF; G: EA. Abreviações: LSi, núcleo septal lateral parte intermédia; VL, ventrículo lateral, LSD, núcleo septal dorsal, cc, corpo caloso. Escala de barra: 100 μ m. H: Gráfico da média de células marcadas/mm² $\pm$ e.p.m para GR no LSi. * $p < 0,05$ comparado ao controle e # $p < 0,05$ comparado ao EI. Teste de Kruskal Wallis seguido pelo teste de Mann Whitney (detalhes vide Conover, 1980), $n = 6$.

FONTE: Malta (2012)

Figura 16 - Presença de GR no núcleo central da amígdala (CeA) de ratos.

Fotomicrografias de campo claro mostrando células imunorreativas ao GR no CeA. A: Controle; B: C + Met; C: C+ AF; D: EI; E: EI + Met.; F: EI + AF; G: EA. Abreviações: CeA, núcleo central da amígdala, opt, trato óptico. Escala de barra: 100 μ m. H: Gráfico da média de células marcadas/mm² $\pm$ e.p.m para GR no CeA. * $p < 0,05$ comparado ao controle e # $p < 0,05$ comparado ao EI. Teste de Kruskal Wallis seguido pelo teste de Mann Whitney (detalhes vide Conover, 1980), $n=6$.

FONTE: Malta (2012)

Figura 17 - Presença de GR no núcleo intersticial da estria terminal (BST) de ratos.

Fotomicrografias de campo claro mostrando células imunorreativas a GR no BST. A: Controle; B: C + Met; C: C + AF; D: EI; E: EI + Met.; F: EI + AF; G: EA. Abreviações: BST, núcleo intersticial da estria terminal; VL, ventrículo lateral; ca, comissura anterior. Escala de barra: 100 μ m. H: Gráfico da média de células marcadas/mm² $\pm$ e.p.m para GR no BST. * $p < 0,05$ comparado ao controle e # $p < 0,05$ comparado ao EI. Teste de Kruskal Wallis seguido pelo teste de Mann Whitney (detalhes vide Conover, 1980), $n=6$.

FONTE: Malta (2012)

Figura 18 - Presença de GR no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVH) de ratos.

Fotomicrografias de campo claro mostrando células imunorreativas ao GR no PVH. A: Controle; B: C + Met; C: C + AF; D: EI; E: EI + Met.; F: EI + AF; G: EA. Abreviações: PVH, núcleo paraventricular do hipotálamo; 3V, terceiro ventrículo. Escala de barra: 100 μ m. H: Gráfico da média de células marcadas/mm² $\pm$ e.p.m para GR no PVH. *p<0,05 comparado ao controle e #p<0,05 comparado ao EI. Teste de Kruskal Wallis seguido pelo teste de Mann Whitney (detalhes vide Conover, 1980), n=6. FONTE: Malta (2012).

4.1.3.3 Dupla marcação: imunorreatividade para GR e hibridização in situ para CRF₂

Para verificar se a sinalização via GR e CRF₂ estavam na mesma célula, foi realizado o ensaio de dupla marcação. Os resultados mostraram que houve a colocalização de GR e RNAm do CRF₂ em células do LSi e do VmH, uma vez que as células imunorreativas para GR também apresentaram a deposição de grãos de pratas, após a hibridização para o CRF₂ como indicado pelas setas na Figura 19.

Figura 19 - Colocalização de GR e CRF₂ no encéfalo de ratos.

Fotomicrografias de campo claro mostrando células duplamente marcadas (setas) imunorreativas a GR (DAB, coloração castanha) e marcadas com ribossonda para o RNAm do CRF₂ (grãos de prata). A e B: núcleo septal lateral parte intermédia (LSi). C e D: núcleo ventromedial do hipotálamo (VmH). Abreviações: cc, corpo caloso; LSi, núcleo septal lateral parte intermédia; LSD, núcleo septal dorsal; VL, ventrículo lateral; VmH, núcleo ventromedial do hipotálamo; 3V, terceiro ventrículo. Escala de barras: 100 µm para A e C e 10 µm para B e D.

FONTE: Malta (2012).

4.2 Estudo comportamental

4.2.1 Preferência por Sacarose

Para avaliar se o estresse crônico imprevisível seria capaz de causar anedonia nos animais, os mesmos foram avaliados quanto à preferência pela ingestão de solução de sacarose. Valores basais de consumo foram obtidos 24 h antes do início do protocolo de EI, e mostraram a homogeneidade dos animais quanto à preferência por sacarose, não havendo diferença entre os animais divididos aleatoriamente nos grupos controle ($71 \pm 3,4 \%$) e EI ($69 \pm 2,9 \%$).

Após 24 h do último estímulo estressor, os animais foram novamente avaliados quanto à preferência pelo consumo de sacarose. Não foram observadas diferenças entre o consumo dos animais controle ($71 \pm 2,5 \%$) e EI ($72 \pm 2,2\%$), ou quando comparados com os valores basais ($p > 0,05$). Sendo assim, podemos dizer que o modelo de estresse crônico imprevisível (14 dias) não causou anedonia nos animais (Figura 20).

4.2.2 Labirinto em cruz elevado

Possíveis alterações no comportamento ansioso causado pela exposição ao estresse crônico imprevisível foram avaliadas utilizando o labirinto em cruz elevado, avaliando o tempo de permanência dos animais em duas regiões do aparato: braço aberto e fechado. Segundo esse modelo, o maior tempo de permanência no braço fechado caracteriza um comportamento ansioso.

Os testes foram realizados uma única vez em tempos diferentes, após 24 e 48 h do último estímulo estressor (sem prévia exposição ao aparato). Em nenhuma das condições, os animais submetidos ao EI apresentaram diferença na permanência nos braços aberto e fechado quando comparado ao grupo controle ($p > 0,05$). O tempo de permanência nos braços fechados, para os grupos observados 24 h após o último estímulo estressor foi de $62 \pm 7\%$ e $68 \pm 7 \%$ nos grupos controle e EI, respectivamente e no intervalo de 48 h, $52 \pm 5 \%$ e $49 \pm 5 \%$. Já para o braço aberto, os valores obtidos no intervalo de 24 h para os grupos controle e EI foram de $21 \pm 7 \%$ e $16 \pm 6 \%$ no intervalo de 24 h e de $28 \pm 5 \%$ e $30 \pm 5 \%$ após 48 h do último estímulo estressor (Figura 21).

Figura 20 - Preferência pelo consumo de solução de sacarose (SP) de ratos submetidos ou não ao EI.

Preferência por sacarose média $\pm$ e. p. m. em porcentagem (%) basal e no dia teste (24 h após o último estímulo estressor do protocolo de EI). Animais controle representados pela barra branca e submetidos ao EI pela barra preta. Não há diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) tanto em relação aos dias quanto ao tratamento. Teste T para análise da diferença entre os dias (basal e teste) e Two way ANOVA para todos os grupos ($n=23$).

Fonte: Malta (2012).

Figura 21 - Permanência nos braços aberto e fechado do labirinto em cruz elevado em 5 min. de observação.

Tempo de permanência média $\pm$ e.p.m em porcentagem (%) nos braços aberto e fechado do labirinto em cruz elevado em 5 min. de observação. A: animais expostos ao aparato 48 h após o último estímulo estressor e também submetidos ao teste de preferência por sacarose $n=23$. Teste T ($p > 0,05$; $p = 0,7265$ para o braço aberto e $p = 0,7358$ para o braço fechado quando comparado ao controle) B: animais expostos ao aparato 24 h após o último estímulo estressor ($n=7$). Teste T para a análise dos grupos em cada um dos braços ($p > 0,05$; $p = 0,6208$ para o braço aberto e $p = 0,5664$ para o braço fechado quando comparado ao controle).

Fonte: Malta (2012).

4.3 Síntese dos resultados obtidos

No Quadro 3 apresentamos um resumo dos dados obtidos no presente trabalho.

Quadro 3 - Principais resultados referentes ao estudo das alterações induzidas pelo estresse crônico imprevisível (EI) em ratos machos Wistar.

Análise morfofisiológica				
		EI (comparado ao controle)	Tratamentos farmacológicos (comparado ao EI)	
		intervalo de 24 h	Metirapona (Met.)	Atenolol e fentolamina (AF)
Corticosterona plasmática		↑	↓	↓
RNA _m do CRF ₂	LSi	↑	↓	↓
	VmH	↑	↓	↓
Níveis de GR	LSi	↑	↓	↓
	CeA	↑	↓	↓
	BST	↑	-	-
	PVH	↑	-	-
Análise comportamental				
Preferência por sacarose			-	
Labirinto em cruz elevado	intervalo de 24 h		intervalo de 48 h	
	-		-	

Légendas: (↑) aumento, (↓) diminuição e (-) ausência de alteração.

Fonte: Malta (2012).

5 DISCUSSÃO

O recrutamento de diferentes circuitos neuronais, neuro-endócrinos e fisiológicos pelo estresse, seja este processivo e/ou sistêmico, resulta em respostas coordenadas e complexas compostas por alterações comportamentais, ativação do sistema nervoso autônomo e hormonal (Ulrich-Lai e Herman, 2009). Essas respostas têm como objetivo assegurar a sobrevivência do indivíduo (Goldestein e McEwen, 2002), porém quando as mesmas não são finalizadas de maneira adequada, podem se tornar uma ameaça, seja pelo estabelecimento da carga alostática ou de efeitos deletérios sobre as funções fisiológicas e comportamentais (Charney, 2004). Dessa maneira, a severidade e/ou a persistência dos efeitos induzidos pelo estresse no indivíduo pode ser importante para prever a gravidade dessa carga na presença ou não de eventos adversos (Le Moal, 2007; McEwen e Wingfield, 2003).

O eixo HPA é o integrador central da resposta ao estresse. A ativação do eixo e a síntese e liberação de GCs, juntamente com a ativação do sistema nervoso simpático e de vários neuropeptídeos, dentre eles o CRF hipotalâmico e a vasopressina, coordenam a resposta inicial ao estresse e gerenciam as adaptações por ele induzidas. Da mesma maneira que esses hormônios promovem a resposta inicial ao estresse, alterações fisiológicas e comportamentais, e facilitam a recuperação do sistema, também agem para conter as reações iniciais do estresse (Herman et al., 2003; de Kloet 2008).

Quando os mecanismos de resposta ao estresse não são devidamente finalizados, ou se o mesmo persiste ao longo do tempo, pode-se observar hiperatividade do eixo HPA, um dos fatores de risco para o desenvolvimento de doenças neuropsiquiátricas, dentre elas a depressão (Jeannetau et al., 2012). Devido à estimulação contínua das glândulas adrenais, decorrente da hiperatividade do eixo, as mesmas podem apresentar hipertrofia e, como consequência, maior síntese e secreção de GCs que, uma vez liberados na circulação sanguínea, causam o hipercortisolismo (níveis elevados de GCs plasmáticos). Esse é o caso dos animais submetidos ao modelo de EI e avaliados 24 h após o último estímulo estressor, no presente trabalho, uma vez que os mesmos apresentaram hipertrofia das glândulas adrenais, acompanhada pelo aumento dos níveis de corticosterona plasmático. Entretanto, esse quadro não é persistente, sendo reestabelecidos parâmetros iguais ao controle, 72 h após a última sessão de EI.

Diferentes teorias tentam elucidar os mecanismos envolvidos na hiperatividade do eixo HPA. As alterações que levam a esta situação podem ser tanto hipotalâmicas (envolvendo os níveis de CRF) quanto hipofisárias (envolvendo os níveis de ACTH), porém, independente do

local onde ocorrem, sempre culminam na perda do controle do eixo (*feedback* negativo) por parte dos GCs circulantes.

O pesquisador Robert Sapolsky (Scientific American, 2003) sugere o estabelecimento de um círculo vicioso que mantém a circuitaria do estresse ativada pela ação do GC em outros núcleos, devido em parte, à perda do *feedback* negativo dos GCs sobre o próprio eixo HPA, mantendo, assim, a síntese e secreção desses hormônios elevadas. Kling et al. (2009) considera ainda, que em uma situação de estresse crônico, outros núcleos passariam a participar da ativação do eixo e levanta três hipóteses para a hiperatividade do mesmo: 1) alteração do eixo HPA; 2) hiperatividade da amígdala e 3) hipoatividade do córtex pré frontal. Segundo este autor, essas hipóteses não seriam mutuamente excludentes e o controle da síntese e liberação desses hormônios poderia ser vista como um sistema multifatorial, não mais dependente apenas da ativação e inibição do eixo HPA.

No presente estudo, mostramos que o EI é capaz de modular a expressão do RNAm de CRF₂ e os níveis proteicos de GR em estruturas encefálicas relacionadas com a regulação do eixo HPA e do sistema límbico 24 h após a última sessão de EI, e por não termos avaliado essas alterações em momentos diferentes, não podemos estabelecer uma relação causal entre essas alterações ou como elas poderiam influenciar o quadro de hiperatividade do eixo, com níveis elevados de corticosterona e hipertrofia da glândula adrenal.

A imprevisibilidade da exposição aos estímulos estressores permite que a cada evento seja liberado níveis elevados de GCs. Isso se contrapõe com o observado em modelos de estresse crônico previsível onde os animais são expostos a apenas um tipo de estímulo. Nesses modelos, normalmente há a adaptação desses animais ao estímulo estressor e ao longo do processo não se observa mais o aumento de GCs (Girotti et al., 2006). Dessa maneira, identificamos que a elevação da concentração de GC no momento do estímulo estressor seria de fundamental importância para a hiperatividade do eixo HPA observada nos animais submetidos ao EI, como evidenciado pelo tratamento com metirapona administrada cronicamente apenas antes do estímulo estressor, visando não influenciar no ritmo circadiano da síntese desses hormônios.

Além da comunicação entre diferentes estruturas encefálicas no controle da síntese e secreção de GCs, a via de sinalização desses hormônios pode ser crucial para predizer seus efeitos finais, uma vez que atuam regulando o próprio eixo HPA pelo mecanismo de *feedback* negativo sobre o hipotálamo (PVH) e hipófise (síntese de ACTH). No PVH, os GR podem exercer sua ação ligando-se a elementos responsivos inibitórios (nGRE) e suprimindo a transcrição gênica na presença de GCs (de Kloet et al., 1998; Przybycien-Szymanska et al., 2011), uma forma de manter o *feedback* negativo sobre o eixo no hipotálamo. Entretanto, sabendo-se que a ação desses

receptores nucleares é bastante complexa e pode ser modulada pelo recrutamento de cofatores, que direcionam o complexo GC-GR ao sítio de ligação ao DNA no qual o complexo se ligará e, considerando que em nosso estudo não analisamos a funcionalidade do GR, não é possível avaliar se nas condições observadas, nos animais submetidos ao EI, a ação, via nGRE, está de fato ocorrendo.

Por outro lado, nossos resultados mostraram que a modulação da expressão do GR observada no PVH dos animais submetidos ao EI não foi modulada diretamente pelo aumento de GC nem pela NE, uma vez que animais submetidos ao EI e tratados com metirapona (Met.) ou atenolol e fentolamina (AF) não apresentaram diferenças quando comparado ao grupo EI. Esses resultados sugerem que a expressão do GR no PVH possa ser modulada por estruturas superiores, como por exemplo, o hipocampo que apresenta uma ação inibitória sobre o PVH via BST. Neste sentido, não podemos negligenciar a presença de MR no hipocampo. Esta é uma região com alta densidade destes receptores, que como já mencionado, podem exercer uma ação importante se contrapondo às ações do GR nesta estrutura (de Kloet et al., 1998). Em situações controladas de estresse, o CRF agindo no hipocampo, está associado ao aumento da expressão de MR, que ao se ligar aos GCs exercem ação inibitória sobre o eixo; porém no estresse crônico, esse aumento de MR é inibido e com isso, o eixo permanece ativado (de Kloet et al., 1998; Reul e Holsboer, 2002). Desta maneira, a ausência de modulação direta pelos GCs e NE na expressão de GR no PVH que observamos nos animais submetidos ao EI, pode indicar uma tentativa do sistema em controlar a hiperatividade do eixo e restaurar os níveis de GCs mesmo quando o estresse é duradouro ou persistente.

A participação de outras estruturas no controle da síntese e liberação de GCs pode ocorrer através da participação de outros fatores, como, por exemplo, a NE. Neste contexto, a amígdala é uma estrutura muito importante no controle do eixo HPA, exercendo efeito positivo sobre a modulação do mesmo (revisado em Myers et al., 2012). Segundo Koob (1999), tanto a amígdala quanto o BST, através de projeções noradrenérgicas, estimulam o LC que, pela sua ação direta sobre o PVH, ativa o eixo HPA, uma vez que estimula a secreção de CRF. De fato, nossos dados mostram aumento da expressão de GR tanto no CeA quanto no BST, sugerindo a participação dos GCs na sinalização dessas estruturas sobre eixo HPA, o que resultaria no aumento de corticosterona observado 24 h após o último EI. Ainda, sustentando essa hipótese, os tratamentos prévios com Met. ou AF dos animais submetidos ao EI inibiram o aumento de GCs plasmático 24 h após a última sessão, fortalecendo a participação da amígdala e BST, via NE, na hiperatividade do eixo, como sugerida pela literatura (Figura 22). Além disso, devido à expressão de GR no BST dos grupos EI tratados com AF ou Met., inferimos que o aumento na

expressão deste receptor pode atuar garantindo a funcionalidade do eixo quando uma das vias de sinalização estiver comprometida, seja pela inibição da síntese de GCs no momento do EI ou pela inibição da ação noradrenérgica.

Figura 22 - Possíveis estruturas e alterações envolvidas nos animais submetidos ao EI 24 h após o último estímulo estressor.

Em azul se refere aos dados obtidos nos animais submetidos ao EI, 24 h após o último estímulo estressor. Em verde, represento a ação de ativação proveniente da relação entre os núcleos. Esquema baseado nos trabalhos de Koob (1999), Korosi e Baram (2008), Gallagher et al. (2008), Ulrich-Lai e Herman (2009), Reul e Holsboer (2002) e Herman et al. (2003).

Fonte: Malta (2012).

Em nosso estudo, a participação da NE foi analisada pelo tratamento concomitante de antagonistas α e β -adrenérgicos e os resultados obtidos se somam aos dados obtidos por García-Bueno et al. (2008), que utilizaram as mesmas doses de fentolamina porém utilizaram propranolol, um antagonista β -adrenérgico não seletivo, ao invés de atenolol, um antagonista β_1 -seletivo, como utilizado neste trabalho. No trabalho de García-Bueno (2008) os tratamentos farmacológicos foram isolados e em ratos submetidos ao estresse crônico previsível por imobilização (6 h por dia), enquanto que em nosso estudo utilizamos um modelo de estresse crônico imprevisível e a associação de AF. Esses autores mostraram que apenas o tratamento com antagonista β -adrenérgico diminuiu os níveis plasmáticos de corticosterona. Embora exista uma discussão a respeito da permeabilidade do atenolol à barreira hemato-encefálica por se tratar de um fármaco mais polar, vários trabalhos mostram que o atenolol atravessa a barreira, porém em menor concentração que fármacos mais apolares (Agon et al., 1991) e essa concentração aumenta consideravelmente quando a permeabilidade da barreira está comprometida, o que ocorre no estresse (Madrigal et al., 2002). Apesar de não termos feito os tratamentos separados, nossos dados obtidos com a associação de atenolol e fentolamina podem indicar diferenças na participação do sistema noradrenérgico nos modelos de estresse crônico previsível e imprevisível e a importância da sinalização via projeção do LC sobre o PVH no caso do EI, uma vez que nesta região, os receptores α -adrenérgicos são predominantes (Dunn et al., 2004; Koob 1999). Vale lembrar que as doses dos antagonistas utilizadas no nosso trabalho não acarretam alteração na pressão arterial dos animais, mesmo após o tratamento crônico (Garcia-Bueno et al., 2008; Goddard et al., 2010).

Assim como os GCs e a NE, o CRF e a Ucn também regulam o eixo HPA através da ação sobre os receptores CRF_1 e CRF_2 e, conseqüentemente, controlam a resposta do estresse. Desta maneira, a sinalização via CRF_1 estaria associada à fase aguda da resposta ao estresse enquanto a sinalização via CRF_2 , à fase de recuperação (Reul e Holsboer, 2002), provavelmente por modular endogenamente a resposta ao estresse associada à ativação do CRF_1 . De fato, alguns trabalhos mostraram que camundongos alterados geneticamente, com deleção do CRF_1 foram incapazes de responder a estímulos estressores com a ativação do eixo e na ausência de CRF_2 mantiveram níveis elevados de GCs, possivelmente devido à queda precoce de ACTH, à hipersensibilidade das células hipotalâmicas e do córtex adrenal, e ainda, pela ação dos MRs no hipocampo (Bale e Vale, 2004; Reul e Holsboer, 2002). Porém, esses autores mostraram que no caso de estresse crônico, o efeito regulador da resposta aos estímulos estressores via CRF_1 e CRF_2 não está presente e com isso, pode ocorrer uma possível perda na capacidade do CRF ou

das urocortinas em elevar os níveis de MR no hipocampo, resultando na manutenção da ativação do eixo.

Embora o tratamento crônico com metirapona (50 mg/kg, i.p., por 14 dias) nos animais controles não tenha alterado os níveis de corticosterona plasmática basais, foram observadas alterações tanto na expressão de RNAm do CRF₂ quanto nos níveis proteicos de GR em alguns núcleos encefálicos desses animais, possivelmente associadas a um efeito central da metirapona. Dados da literatura mostram a influência de tratamentos crônicos com metirapona no aumento de RNAm de BDNF (Rogóz e Legutko, 2005), na expressão de RNAm de CRF e GR (Rotllant e Armario, 2005), nos níveis de c-Fos (Rotllant et al., 2002) e ainda na resposta comportamental como natação forçada (Rogóz et al., 2008) em ratos não submetidos a estímulos estressores, evidenciando um efeito do fármaco mesmo na ausência de alterações nos níveis circulantes de GCs. A ausência de efeito do tratamento crônico com metirapona nos níveis plasmáticos de corticosterona também foi observada por Rogóz e Legutko (2005) e esse dado nos permite dizer que no caso dos animais EI + Met., a síntese de GCs foi inibida apenas durante as sessões de EI, evidenciando assim um efeito diferencial deste tratamento na ausência e presença de estímulos estressores.

A literatura sugere que nos modelos de estresse crônico imprevisível (ou crônico moderado) ocorre a adaptação do sistema simpato adrenal, mas não do eixo HPA (Hill et al., 2012). Entretanto, em nosso modelo de EI evidenciamos, a participação da NE na modulação do eixo HPA, sendo este neurotransmissor um dos responsáveis pela persistência do aumento de corticosterona após os estímulos estressores. Como os níveis de NE nos animais submetidos ao EI não foram avaliados, não podemos afirmar sobre a adaptação do sistema simpato-adrenal, todavia considerando que nessa situação, o GC liberado estaria atuando no LC, pelo aumento nos níveis desses hormônios a cada sessão de EI, poderíamos supor que esse GC atuaria no LC aumentando os níveis de NE no cérebro, que então agiriam em núcleos como amígdala, BST e PVH, mantendo a estimulação do eixo HPA. Dessa maneira, o tratamento com atenolol e fentolamina nos animais submetidos ao EI no momento do estresse impediria a ação nessas estruturas, que conseqüentemente não ativariam o eixo.

Uma vez que o próprio GC atua sobre a circuitaria do estresse, garantindo sua ativação, ou até mesmo, provavelmente, sua manutenção, não há como estabelecer uma relação causal, porém podemos sugerir que um círculo vicioso se estabelece (Figura 23), e apenas o restabelecimento do eixo permitiria o retorno às condições adequadas. Este restabelecimento do eixo HPA é extremamente importante, principalmente no controle dos quadros patológicos físicos e psiquiátricos envolvendo estresse ou níveis elevados de corticosterona tais como

ansiedade e depressão, que fármacos que atuam sobre o eixo ou sobre a síntese de GCs estão sendo utilizados conjuntamente aos fármacos específicos no tratamento desses transtornos (Gallagher et al., 2008), como, por exemplo, o uso de metirapona ou mifepristona nos casos de depressão.

Figura 23 - Circuitaria do estresse simplificada com dados dos níveis de RNAm de CRF₂ e expressão de GR nas estruturas do SNC de ratos submetidos ao EI.

Em azul os resultados observados em nosso estudo quanto a expressão de RNAm de CRF₂, níveis de GR e de corticosterona plasmática.

----- inibição; —> ativação

Fonte: Malta (2012)

É bem estabelecido que a hiperatividade do eixo HPA é uma característica de pacientes deprimidos e ansiosos. Além disso, pacientes com síndrome de Cushing, causada por níveis elevados de GCs, além de serem normalmente deprimidos, também, não raramente, apresentam déficits cognitivos e de memória. Em animais de laboratório, foi demonstrado que tanto níveis elevados de corticosterona ou estresse são capazes de alterar a morfologia neuronal, causando perda de dendritos em neurônios hipocampais (Margariños et al., 1995; Sapolsky et al., 1985; Teicher et al., 2012), uma característica também de pacientes deprimidos, é o aumento dos processos em neurônios da amígdala, um achado em animais ansiosos (Mitra et al., 2008). Ainda, alterações no sistema CRF também têm sido observadas em animais expostos a modelos de depressão e ansiedade. Embora o papel do CRF₂ não seja totalmente elucidado, dados da literatura evidenciam que na presença de estresse crônico, este pode participar nas alterações do humor e ansiedade, devido sua ação na amígdala e suas projeções para o núcleo *Accumbens* e córtex pré frontal ou ainda aumentando a atividade noradrenérgica (Bale e Vale, 2004; Reul e Holsboer, 2002). No caso do comportamento ansioso a ação do CRF₂ é dependente da estrutura e do momento no qual é analisado (Reul e Holsboer, 2002), e ainda do nível de estresse ao qual o animal está submetido como observado por Henry et al. (2006).

Neste sentido, os animais submetidos ao EI apresentam aumento dos níveis de RNAm do CRF₂ no LSi e VmH, regiões relacionadas com o sistema límbico. A formação septo hipocampal se projeta para regiões como amígdala e para o próprio VmH, que age no comportamento motivado e alimentar (Reul Holsboer, 2002), o qual não foi alterado visto que os animais não apresentaram perda de peso corpóreo após EI, apenas menor ganho quando comparado aos animais controle (dados não apresentados). A modulação desse efeito parece ser devido à plasticidade do sistema induzida pelo EI, uma vez que essas alterações são observadas após o EI e mediadas pelos níveis elevados de GCs e pela sinalização direta noradrenérgica em estruturas que se projetam para o LS ou VmH, ou ainda indireta pela participação da NE na manutenção dos níveis elevados de GCs.

Embora trabalhos na literatura mostrem a relação do CRF₂ no LS ao comportamento ansioso (Bakshi et al., 2007; Henry et al., 2006; Radulovic et al., 1999), nossos resultados mostram que animais submetidos ao EI, apesar de apresentarem aumento da expressão de RNAm do CRF₂ no LSi, não apresentaram tal comportamento, quando expostos ao EPM (24 e 48 h após a última sessão de EI), possivelmente devido ao momento em que foram avaliados. Como observados por Henry et al. (2006) apenas animais administrados com Ucn 2 no LS e submetidos a estresse apresentaram comportamento ansioso imediatamente após o estímulo, assim como nos dados apresentados por Radulovic et al. (1999) quando analisados após 30 e 60 min. Dessa

maneira, a participação do CRF₂ no comportamento ansioso está condicionado à severidade do estímulo estressor e momento da resposta ao estresse no qual é avaliado, e em parte modulada pelas projeções do LS para a amígdala.

Diante disso, fica claro que para a ação do sistema CRF nos transtornos de humor associados ao estresse, a intensidade do estímulo estressor torna-se fator determinante para o desenvolvimento do comportamento ansioso, ou seja, dependendo do nível de estresse, por exemplo, em caso de estresse severo ou leve, o aumento de CRF₂ no LS pode acarretar ou não em ansiedade, bem como a participação dos diferentes ligantes dos CRF₂ e a influência do CRF₁ (Bale e Vale, 2004).

Além da ansiedade, alterações nos níveis de CRF₂ e GC podem estar relacionadas ao aparecimento de comportamentos de depressão (Bale e Vale, 2004; Kling et al., 2009; Reul e Holsboer, 2002). Desta maneira, também avaliamos o consumo de solução de sacarose como parâmetro para anedonia nesse estudo. Entretanto, da mesma forma que para o comportamento ansioso, os animais submetidos ao EI não apresentaram anedonia. Nossos dados, novamente, se contrapõem a aqueles da literatura que utilizam protocolos de estresse crônico moderado (CMS) ou imprevisível bastante semelhante ao utilizado neste trabalho, inclusive como modelo de depressão (Willner, 2005). Embora algumas diferenças, principalmente em relação à severidade e tempo de exposição, entre os protocolos utilizados pudessem explicar essa discrepância, acreditamos que a principal delas esteja na maneira de alojar os animais já que a grande maioria dos procedimentos mantém os animais isolados durante todo o protocolo de estresse e utilizam mais de um estímulo estressor por dia. Neste sentido, o isolamento social é um fator bastante estressante para os ratos, podendo ser considerado per se um estímulo estressor como demonstrado por Wu e Wang (2010) que compararam várias linhagens de ratos, dentre elas a Sprague Dawley com características semelhantes à Wistar (utilizado no presente trabalho). Quando comparados a animais alojados agrupados, os animais Sprague Dawley alocados individualmente apresentaram aumento nos níveis de corticosterona e na imobilidade no teste de natação forçada, diminuição da distância total percorrida no campo aberto, entretanto não foi observada alteração quanto ao consumo de solução de sacarose. Contrapondo-se a esse efeito, a manutenção de ratos agrupados pode ser considerada como um suporte social, uma vez que esse contato ativa diferentes circuitos neuronais com a liberação de diversos mediadores, dentre eles a ocitocina que apresenta efeitos ansiolíticos e atenua os efeitos comportamentais e fisiológicos induzidos pelo estresse (Heinrichs et al., 2003; Sowthwick et al., 2005).

Podemos, também, considerar que na vigência de dois estímulos estressores, os níveis de mediadores da resposta do estresse se mantêm elevados por mais tempo e o custo energético

para a manutenção do estado alostático é maior, o que acarretaria numa sobrecarga e com isso o estabelecimento da patologia. No protocolo de EI utilizado no presente trabalho, os animais, após o estímulo estressor, passavam por um período em condições “normais”, o que permitia um restabelecimento, mesmo que parcial, para posterior estímulo estressor e um novo pico de GCs devido à imprevisibilidade dos estímulos.

Outro ponto que pode ser levantado para justificar a ausência de anedonia nesses animais é o delineamento experimental utilizado para o teste de preferência pelo consumo de sacarose. Em nosso modelo, os animais foram expostos às diferentes bebidas previamente, ao início do protocolo de EI, e o ensaio foi realizado apenas 15 dias após a medição basal (24 h antes da primeira sessão de EI). Desta maneira, não podemos avaliar o quanto as sessões de estresse interferiram na consolidação da memória adquirida no treino, uma vez que dados da literatura já mostraram que a memória aversiva pode se sobrepor à prazerosa (Livneh e Paz, 2012; Maren e Quirk, 2004), e com isso, os animais submetidos ao EI não se lembrariam da habituação e da sensação prazerosa associada ao consumo da solução de sacarose. Optamos por esse delineamento, pois para que fosse realizado este teste, os animais permaneceram um período privados de alimento e água e este é um dos estímulos estressores já presentes no protocolo adotado. A inserção do teste no decorrer do protocolo poderia significar um estímulo estressor a mais, invalidando a comparação com os dados obtidos para o estudo da expressão de RNAm de CRF₂ e níveis de GR.

Outra possível explicação para a ausência de efeito do estresse no comportamento ansioso e depressivo nesses animais pode ser devido à falta de um estímulo subsequente de intensidade igual ou superior, considerada uma situação desafio, capaz de desafiar o sistema e revelar tais alterações. De fato, Le Moal (2007) sugere que para o desenvolvimento de patologias associadas ao estresse, além de fatores relacionados ao desenvolvimento, características genótípicas e exposição prévia, que levariam ao fenótipo vulnerável no estado alostático, é necessária uma situação desafio para que se quebre a alostasia, possivelmente pelo estabelecimento da sobrecarga alostática (McEwen e Wingfield, 2003). No presente trabalho, não utilizamos nenhum estímulo desafio, pois queríamos avaliar se as alterações plásticas induzidas pelo EI seriam responsáveis por alterações comportamentais como anedonia ou ansiedade. Entretanto nossos dados mostraram que o EI altera parâmetros morfofisiológicos, estabelecendo um estado alostático, mas que per se não foram capazes de deslocar este para o desenvolvimento de alterações comportamentais. Em contra partida, utilizando esse mesmo modelo de EI, na presença de estímulo inflamatório, observamos a exacerbação da resposta inflamatória mediada pelos níveis elevados de corticosterona em estruturas encefálicas (Munhoz et al., 2006).

Diante disso, poderíamos sugerir que o aumento do CRF₂ nesse modelo poderia atuar como parte da resposta de recuperação após o EI, como sugerido por Reul e Holsboer (2002), pelo menos para o restabelecimento do eixo HPA, uma vez que a hipertrofia e os níveis de corticosterona plasmático após 72 h já retornaram aos níveis iguais ao do controle. Uma vez que não foi feito um decurso temporal para as alterações na expressão de RNAm do CRF₂ nem dos níveis proteicos de GR, não podemos dizer, embora os níveis plasmáticos de corticosterona após 72 h do último EI estivessem normais, que as condições fisiológicas tenham sido restabelecidas, ou se essas alterações tenham promovido o deslocamento para o estado resiliente.

A resposta do estresse é multifatorial e como as alterações induzem as patologias, ainda está longe de ser totalmente esclarecida, isso porque a maneira como lidamos com o estresse pode modular algumas respostas levando o indivíduo a uma situação de resiliência (Charney, 2004; de Kloet, 2008; Southwick et al., 2005). Em casos de pacientes com depressão e ansiedade, o conhecimento da neurobiologia do estresse e as intervenções farmacológicas, juntamente com terapia comportamental, podem auxiliar no tratamento. Dessa maneira, os dados mostrados nesse trabalho ajudam a elucidar parte dessa resposta, e ainda nos permite dizer que embora haja alterações morfofisiológicas, estas per se não são determinantes para as alterações comportamentais, nas condições avaliadas, possivelmente devido ao suporte social ou ainda ao tempo de recuperação entre os estímulos.

6 CONCLUSÕES

Considerando os dados apresentados e a discussão, podemos concluir que:

- animais submetidos ao EI apresentam níveis elevados de corticosterona plasmático 24 h após o último estímulo estressor, acompanhado de hipertrofia da glândula adrenal, que não se mantém após 72 h;
- os níveis elevados de corticosterona plasmático e a hipertrofia da glândula adrenal sugerem a hiperatividade transitória do eixo HPA nos animais submetidos ao EI;
- animais submetidos ao EI apresentam aumento da expressão de RNAm de CRF₂ nos núcleos septal lateral parte intermédia (LSi) e ventromedial do hipotálamo (VmH) bem como nos níveis de GR nos núcleos septal lateral (LSi), central da amígdala (CeA), intersticial da estria terminal (BST) e paraventricular do hipotálamo (PVH);
- o aumento da expressão de RNAm de CRF₂ e dos níveis de GR em determinadas regiões encefálicas de animais submetidos ao EI são, em parte, mediadas pela sinalização dos glicocorticóides e noradrenalina liberados em resposta aos estímulos estressores;
- a influência dos glicocorticóides e noradrenalina é região específica para as alterações nos níveis de GR uma vez que os tratamentos farmacológicos não impediram o aumento dos níveis desse receptor em todos os núcleos estudados nos animais submetidos ao EI;
- provavelmente a manutenção dos níveis elevados de corticosterona nos animais EI é dada pela ação do próprio hormônio relacionada à ação em núcleos noradrenérgicos como *Locus coeruleus* que, pela sinalização com PVH, estimula a secreção de CRF e consequente manutenção da ativação do eixo HPA, resultando na síntese de corticosterona;
- embora os animais EI apresentem alterações como hiperatividade do eixo HPA e alteração de GR em núcleos do sistema límbico, por vezes relacionadas a alterações comportamentais, em nosso estudo as alterações morfofisiológicas induzidas pelo EI per se não resultaram em alterações comportamentais como anedonia e ansiedade.

REFERÊNCIAS*

- Agon P, Goethals P, Van Haver D, Kaufman JM. Permeability of the blood-brain barrier for atenolol studied by positron emission tomography. *J Pharm Pharmacol*. 1991 Aug;43(8):597-600.
- Akil HA, Morano MI. Stress. In: Bloom FE, Kupper DJ. *Psychopharmacology: the fourth generation of progress*. New York: Raven Press; 1995. p. 773-85.
- Andrade LH, Wang YP, Andreoni S, Silveira CM, Alexandrino-Silva C, Siu ER, Nishimura R, Anthony JC, Gattaz WF, Kessler RC, Viana MC. Mental disorders in megacities: findings from the são Paulo magacity mental health survey, Brazil. *PLoS One*. 2012;7(2):e31879.
- Bakshi VP, Newman SM, Smith-Roe S, Joechman KA, Kalin NH. Stimulation of lateral septum CRF2 receptors promotes anorexia and stress-like behaviors: functional homology to CRF1 receptors in basolateral amygdala. *J Neurosci*. 2007 Sep 26;27(39):10568-77.
- Bale TL, Contarino A, Smith GW, Chan R, Gold LH, Sawchenko PE, Koob GF, Vale WW, Lee KF. Mice deficient for corticotropin-releasing hormone receptor-2 display anxiety-like behaviour and are hypersensitive to stress. *Nat Genet*. 2000;24(4):410-14.
- Bale TL, Vale WW. CRF and CRF receptors: role in stress responsiveness and other behaviors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2004;44:525-57.
- Béjean S, Sultan-Taïeb H. Modeling the economic burden of diseases imputable to stress at work. *Eur J Health Econ*. 2005;6(1):16-23.
- Berridge CW, Dunn AJ. CRF and restraint-stress decrease exploratory behavior in hypophysectomized mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 1989;34(3):517-9.
- Bittencourt JC, Vaughan J, Arias C, Rissman RA, Vale WW, Sawchenko PE. Urocortin expression in rat brain: evidence against a pervasive relationship of urocortin-containing projections with targets bearing type 2 CRF receptors. *J Comp Neurol*. 1999;415(3):285-312.
- Bloss EB, Janssen WG, McEwen BS, Morrison JH. Interactive effects of stress and aging on structural plasticity in the prefrontal cortex. *J Neurosci*. 2010;30(19):6726-31.
- Bremner JD, Krystal JH, Southwick SM, Charney DS. Functional neuroanatomical correlates of the effects of stress on memory. *J Trauma Stress*. 1995 Oct;8(4):527-53.
- Bremner JD, Scott TM, Delaney RC, Southwick SM, Mason JW, Johnson DR, Innis RB, McCarthy G, Charney DS. Deficits in short-term memory in posttraumatic stress disorder. *Am J Psychiatry*. 1993;150(7):1015-9.
- Britton DR, Varela M, Garcia A, Rosenthal M. Dexamethasone suppresses pituitary-adrenal but not behavioral effects of centrally administered CRF. *Life Sci*. 1986a;38(3):211-6.

* De 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.icmje.org>.

- Britton KT, Lee G, Vale W, Rivier J, Koob GF. Corticotropin releasing factor (CRF) receptor antagonist blocks activating and 'anxiogenic' actions of CRF in the rat. *Brain Res.* 1986b;369:303-6.
- Buckingham JC. Glucocorticoids: exemplars of multi-tasking. *Br k Pharmacol.* 2006;147 Suppl 1: S258-268.
- Carrasco GA, Van de Kar LD. Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur J Pharmacol.* 2003;463(1-3):235-72.
- Charney DS. Psychobiological mechanisms of resilience and vulnerability: implications for successful adaptation to extreme stress. *Am J Psychiatry.* 2004;161:195-216.
- Cintra A, Zoli M, Rosen L, Agnati LF, Okret S, Wikstrom AC, Gustaffson JA, Fuxe, K. Mapping and computer assisted morphometry and microdensitometry of glucocorticoid receptor immunoreactive neurons and glial cells in the rat central nervous system. *Neuroscience.* 1994;62:843-97.
- Conover WJ. *Practical nonparametric statistics.* 2nd ed. New York: Wiley; 1980.
- Coste SC, Kesterson RA, Heldwein KA, Stevens SL, Heard AD, Hollis JH, Murray SE, Hill JK, Pantely GA, Hohimer AR, Hatton DC, Phillips TJ, Finn DA, Low MJ, Rittenberg MB, Stenzel P, Stenzel-Korosi MP. Abnormal adaptations to stress and impaired cardiovascular function in mice lacking corticotrophin-releasing hormone receptor-2. *Nat Genet.* 2000;24(4):403-9.
- de Kloet ER, Derijk R. Signaling pathways in brain involved in predisposition and pathogenesis of stress-related disease: genetic and kinetic factor affecting the MR/GR balance. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1032:14-34
- de Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joels M. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocrine Reviews.* 1998;19:269–301.
- de Kloet ER. About stress hormones and resilience to psychopathology. *J Neuroendocrinol.* 2008 Jun;20(6):885-92.
- De Nicola AF, Ferrini M, Gonzalez SL, Gonzalez Denisielle MC, Grillo CA, Piroli G, Saraiva F, de Kloet ER. Regulation of gene expression by corticoid hormones in the brain and spinal Cord. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1998;65(1-6):253-72.
- Dunn AJ, Swiergiel AH, Palamarchouk V. Brain circuits involved in corticotropin-releasing factor-norepinephrine interactions during stress. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1018:25-34.
- Engelmann M, Landgraf R, Wotjak CT. The hypothalamic-neurohypophyseal system regulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis under stress: an old concept revisited. *Front Neuroendocrinol.* 2004 Sep-Dec;25(3-4):132-49.
- Feder A, Nestler EJ, Charney DS. Psychobiology and molecular genetics of resilience. *Nat Rev Neurosci.* 2009 Jun;10(6):446-57.
- Gallagher JP, Orozco-Cabal LF, Liu J, Shinnick-Gallagher P. Synaptic physiology of central CRF system. *Eur J Pharmacol.* 2008;583(2-3):215-25.

García-Bueno B, Caso JR, Leza JC. Stress as a neuroinflammatory condition in brain: damaging and protective mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev*. 2008 Aug;32(6):1136-51.

García-Bueno B, Madrigal JLM, Pérez-Nievas BG, Leza JC . Stress mediators regulate brain prostaglandin synthesis and peroxisome proliferator-activated receptor-activation after stress in rats. *Endocrinology*.2008;149(4):1969–78.

Girotti M, Pace TW, Gaylord RI, Rubin BA, Herman JP, Spencer RL. Habituation to repeated restraint stress is associated with lack of stress-induced c-fos expression in primary sensory processing areas of the rat brain. *Neuroscience*. 2006;138(4):1067-81.

Glaser R, Kiecolt-Glaser J. How stress damages immune system and health. *Discov Med*. 2005; 5(26):165-9.

Glaser R, Kiecolt-Glaser JK. Stress-induced immune dysfunction: implications for health. *Nat Rev Immunol*. 2005;5:243–51.

Goddard AW, Ball SG, Martinez J, Robinson MJ, Yang CR, Russell JM, Shekhar A. Current perspectives of the roles of the central norepinephrine system in anxiety and depression. *Depress Anxiety*. 2010 Apr;27(4):339-50.

Goel N, Bale TL. Identifying early behavioral and molecular markers of future stress sensitivity. *Endocrinology*. 2007;148(10):4585-91.

Goldstein DS, McEwen B. Allostasis, homeostats, and the nature of stress. *Stress*. 2002;5(1):55-8.

Grammatopoulos DK, Chrousos GP. Functional characteristics of CRH receptors and potential clinical applications of CRH-receptor antagonists. *Trends Endocrinol Metabol*. 2002;13(10):436-44.

Grammatopoulos DK, Randevo HS, Levine MA, Kanellopoulou KA, Hillhouse EW. Rat cerebral cortex corticotrophin-releasing hormone receptors: evidence for receptor coupling to multiple G-proteins. *J Neurochem*. 2001;76(2):509-19.

Groeneweg FL, Karst H, de Kloet ER, Joëls M. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at the neuronal membrane, regulators of nongenomic corticosteroid signalling. *Mol Cell Endocrinol*. 2012 Mar 24;350(2):299-309.

Haller J, Mikics E, Makara GB. The effects of non-genomic glucocorticoid mechanisms on bodily functions and the central neural system. A critical evaluation of findings. *Front Neuroendocrinol*. 2008;29(2):273-91.

Hauger RL, Grigoriadis DE, Dallman MF, Plotsky PM, Vale WW, Dautzenberg FM. International Union of Pharmacology. XXXVI. Current status of the nomenclature for receptors for corticotrophin-releasing factor and their ligands. *Pharmacol Rev*. 2003;55(1):21-6.

Heinrichs M, Baumgartner T, Kirschbaum C, Ehlert U. Social support and oxytocin interact to suppress cortisol and subjective responses to psychosocial stress. *Biol Psychiatry*. 2003 Dec 15;54(12):1389-98.

Henry B, Vale W, Markou A. The effect of lateral septum corticotropin-releasing factor receptor 2 activation on anxiety is modulated by stress. *J Neurosci*. 2006 Sep 6;26(36):9142-52.

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

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.

Hill MN, Helleman KG, Verma P, Gorzalka BB, Weinberg J. Neurobiology of chronic mild stress: Parallels to major depression. *Neurosci Biobehav Rev*. 2012 Jul 7. [Epub ahead print].

Hillhouse EW, Grammatopoulos DK. The molecular mechanisms underlying the regulation of the biological activity of corticotrophin-releasing hormone receptors: implications for physiology and pathophysiology. *Endocr Rev*. 2006;27(3):260-86.

Hsu SY, Hsueh AJW. Human stresscopin and stresscopin-related peptide are selective ligands for the type 2 corticotropin-releasing hormone receptor. *Nat Med*. 2001;7:605–11

Jeanneteau FD, Lambert WM, Ismaili N, Bath KG, Lee FS, Garabedian Mj, Chao MV. BDNF and glucocorticoids regulate corticotrophin-releasing hormone (CRH) homeostasis in the hypothalamus. *PNAS*. 2012 Jan;24(4):1305-10.

Joels M, de Kloet ER. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the brain. Implications for ion permeability and transmitter system. *Prog. Neurobiol*. 1994;43(1):1-36.

Kageyama K, Bradbury MJ, Zhao L, Blount AL, Vale WW. Urocortin messenger ribonucleic acid: tissue distribution in the rat and regulation in thymus by lipopolysaccharide and glucocorticoids. *Endocrinology*. 1999;140:5651–8.

Kling MA, Coleman VH, Schulkin J. Glucocorticoid inhibition in the treatment of depression: can we think outside the endocrine hypothalamus? *Depress Anxiety*. 2009;26(7):641-9.

Kolber BJ, Wiczorek L, Muglia LJ. HPA axis dysregulation and behavioral analysis of mouse mutants with altered GR or MR function. *Stress*. 2008;11(5):321-38.

Kompagne H, Bárdos G, Szénási G, Gacsályi, Hársing KG, Lévy G. Chronic mild stress generates clear depressive but ambiguous anxiety behavior in rats. *Behav Brain Res*. 2008; 193(2):311-4

Koob GF. Corticotropin-Releasing Factor, Norepinephrine and Stress. *Biol Psychiatry*. 1999; 46(9):1167-80

Korosi A, Baram TZ. The central corticotrophin releasing factor system during development and adulthood. *Eur J Pharmacol*. 2008;583(2-3):204-14.

Korosi A, Schotanus S, Olivier B, Roubos EW, Kozicz T. Chronic ether stress-induced response of urocortin 1 neurons in the Edinger-Westphal nucleus in the mouse. *Brain Res*. 2005;1046:172-9.

Korte SM, Koolhaas JM, Wingfield JC, McEwen BS. The Darwinian concept of stress: benefits of allostasis and costs of allostatic load and the trade-offs in health and disease. *Neurosci Biobehav Rev.* 2005;29(1):3-38.

Kostich WA, Chen A, Sperle K, Largent BL. Molecular identification and analysis of a novel human corticotropin-releasing factor (CRF) receptor: the CRF2gamma receptor. *Mol Endocrinol.* 1998 Aug;12(8):1077-85.

Kozicz T, Korosi A, Korsman C, Tilburg-Ouwens D, Groenink L, Veening J, van Der Gugten J, Roubos E, Olivier B. Urocortin expression in the Edinger-Westphal nucleus is down-regulated in transgenic mice over-expressing neuronal corticotropin-releasing factor. *Neuroscience.* 2004;123:589-94.

Kuperman Y, Chen A. Urocortins: emerging metabolic and energy homeostasis perspectives. *Trends Endocrinol Metabol.* 2008; 19(4):122-9.

Le Moal M. Historical approach and evolution of the stress concept: A personal account. *Psychoendocrinology.* 2007;32:S3-S9.

Lederis K, Letter A, McMaster D, Moore G. Complete amino acid sequence of urotensin-I, a hypotensive and corticotropin-releasing neuropeptide from *Ca-tostomus*. *Science.* 1982;218:162-4

Lewis K, Li C, Perrin MH, Bount A, Kunitake K, Donaldson C, Vaughan J, Reyes TM, Gulyas J, Fischer W, Bilezikjian L, Rivier J, Sawchenko PE, Vale WW. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:7570-5

Liaw CW, Lovenberg TW, Barry G, Oltersdorf T, Grigoriadis DE, de Souza EB. Cloning and characterization of the human corticotropin-releasing factor-2 receptor complementary deoxyribonucleic acid. *Endocrinology.* 1996;137(1):72-7.

Lightman SL. The neuroendocrinology of stress: a never ending story. *J Neuroendocrinol.* 2008; 20(6):880-4.

Liu J, Yu B, Neugebauer V, Grigoriadis DE, Rivier J, Vale WW, Shinnick-Gallagher P, Gallagher JP. Corticotropin-releasing factor and Urocortin I modulate excitatory glutamatergic synaptic transmission. *J Neurosci.* 2004 Apr 21;24(16):4020-9.

Livneh U, Paz R. Amygdala-prefrontal synchronization underlies resistance to extinction of aversive memories. *Neuron.* 2012 Jul 12;75(1):133-42.

Lovenberg TW, Liaw CW, Grigoriadis DE, Clewenger W, Chalmers DT, De Souza EB, Oltersdorf T. Cloning and characterization of a functionally distinct corticotropin-releasing factor receptor subtype from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(3):836-40.

Lu NZ, Cidlowski JA. Glucocorticoid receptor isoforms generate transcription specificity. *Trends Cell Biol.* 2006;16(6):301-7.

Madrigal JL, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Leza JC. Stress-induced increase in extracellular sucrose space in rats is mediated by nitric oxide. *Brain Res.* 2002 May 31;938(1-2):87-91.

- Magarinos AM, Deslandes A, McEwen BS. Effects of antidepressants and benzodiazepine treatments on the dendritic structure of CA3 pyramidal neurons after chronic stress. *Eur J Pharmacol.* 1999;371(2-3):113-22.
- Magariños AM, McEwen BS. Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: comparison of stressors. *Neuroscience.* 1995 Nov;69(1):83-8.
- Maren S, Quirk GJ. Neuronal signalling of fear memory. *Nat Rev Neurosci.* 2004 Nov;5(11):844-52.
- McEwen BS, Sapolsky RM. Stress and cognitive function. *Curr Opin Neurobiol.* 1995;5(2):205-16.
- McEwen BS, Wingfield JC. The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Horm Behav.* 2003;43(1):2-15.
- McEwen BS. Protective and damaging effects of stress mediators. *N Engl J Med.* 1998;338(3):171-9.
- Meaney MJ, Aitken DH. [3H]Dexamethasone binding in rat frontal cortex. *Brain Res.* 1985;328:176-80.
- Mitra R, Sapolsky RM. Acute corticosterone treatment is sufficient to induce anxiety and amygdaloid dendritic hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Apr 8;105(14):5573-8.
- 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.
- Munhoz CD, Lepsch LB, Kawamoto EM, Malta MB, Lima LS, Avellar MCW, Sapolsky RM, Scavone C. Chronic unpredictable stress exacerbates LPS-induced activation of NF- κ B in the frontal cortex and hippocampus via glucocorticoid secretion. *J Neurosci.* 2006;26(14):3813-20.
- Myers B, McKlveen JM, Herman JP. Neural Regulation of the Stress Response: The Many Faces of Feedback. *Cell Mol Neurobiol.* 2012 Feb 1. [Epub ahead of print]
- Oakley RH, Jewell CM, Yudit MR, Bofetiado DM, Cidlowski JA. The dominant negative activity of the human glucocorticoid receptor beta isoform. Specificity and mechanisms of action. *J Biol Chem.* 1999;274(39):27857-66.
- Orozco-Cabal L, Liu J, Pollandt S, Schmidt K, Shinnick-Gallagher P, Gallagher JP. Dopamine and corticotrophin-releasing factor synergistically alter basolateral amygdala to medial prefrontal cortex synaptic transmission: functional switch after chronic cocaine administration. *J Neurosci.* 2008 Jan 9;28(2):529-42.
- Ozawa H. Steroid hormones, their receptors and neuroendocrine system. *J Nippon Med Sch.* 2005; 729(6):316-25.
- Patel PD, Lopez JF, Lyons DM, Burke S, Wallace M, Schatzberg AF. Glucocorticoid and mineralocorticoid receptor mRNA expression in squirrel monkey brain. *J Psychiatry Res.* 2000;34:383-92.

Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 5th ed. New York: Academic Press; 2004.

Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*. 1985 Aug;14(3):149-67.

Perrin MH, Vale WW. Corticotropin releasing factor receptors and their ligand family. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;885:312-28.

Przybycien-Szymanska MM, Mott NN, Pak TR. Alcohol dysregulates corticotropin-releasing-hormone (CRH) promoter activity by interfering with the negative glucocorticoid response element (nGRE). *PLoS One*. 2011;6(10):e26647.

Radley JJ, Sisti HM, Hao J, Rocher AB, McCall T, Hof PR, McEwen BS, Morrison JH. Chronic behavioral stress induces apical dendritic reorganization in pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex. *Neuroscience*. 2004;125(1):1-6.

Radulovic J, Rühmann A, Liepold T, Spiess J. Modulation of learning and anxiety by corticotropin-releasing factor (CRF) and stress: differential roles of CRF receptors 1 and 2. *J Neurosci*. 1999 Jun 15;19(12):5016-25

Reul JM, Holsboer F. Corticotropin-releasing factor receptors 1 and 2 in anxiety and depression. *Curr Opin Pharmacol*. 2002;2(1):23-33.

Revollo JR, Cidlowski JA. Mechanisms generating diversity in glucocorticoid receptor signaling. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1177:167-78.

Reyes TM, Lewis K, Perrin MH, Kunitake KS, Vaughan J, Arias CA, Hogenesch JS, Gulyas J, Rivier J, Vale WW, and Sawchenko PE. Urocortin II: A member of the corticotropin-releasing factor (CRF) neuropeptide family that is selectively bound by type 2 CRF receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:2843-8

Robinson-Rechavi M, Carpenter AS, Duffraisse m, Laudet V. How many nuclear hormone receptors are there in the human genome? *Trends Genet*. 2001;17:554-6.

Rogóż Z, Legutko B. Combined treatment with imipramine and metyrapone induces hippocampal and cortical brain-derived neurotrophic factor gene expression in rats. *Pharmacol Rep*. 2005 Nov-Dec;57(6):840-4.

Rogóż Z, Skuza G, Leskiewicz M, Budziszewska B. Effects of co-administration of fluoxetine or tianeptine with metyrapone on immobility time and plasma corticosterone concentration in rat subjected to the forced swim test. *Pharmacol Rep*. 2008 Nov-Dec;60(6):880-8.

Romier C, Bernassau JM, Cambillau C, Darbon H. Solution of structure of human corticotropin releasing factor by 1H NMR and distance geometry with restrained molecular dynamics. *Protein Eng*. 1993;6(2):149-56.

Rotlant D, Armario A. A single dose of metyrapone caused long-term dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. *Neuroscience*. 2005;130(2):427-34.

- Rotllant D, Ons S, Carrasco J, Armario A. Evidence that metyrapone can act as a stressor: effect on pituitary-adrenal-hormones, plasma glucose and brain c-fos induction. *Eur J Neurosci.* 2002 Aug;16(4):693-700.
- Sapolsky RM. Do glucocorticoid concentrations rise with age in the rat? *Neurobiol Aging.* 1992;13(1):171-4.
- Sapolsky RM. Glucocorticoid toxicity in the hippocampus: temporal aspects of neuronal vulnerability. *Brain Res.* 1985 Dec 16;359(1-2):300-5.
- Sauvage M, Steckler T. Detection of corticotropin-releasing hormone receptor 1 immunoreactivity in cholinergic, dopaminergic and noradrenergic neurons of the murine basal forebrain and brainstem nuclei-potential implication for arousal and attention. *Neuroscience.* 2001;104(3):643-52.
- Shekhar A, Truitt W, Rainnie D, Sajdyk T. Role of stress, corticotrophin releasing factor (CRF) and amygdale plasticity in chronic anxiety. *Stress.* 2005;8(4):209-19.
- Song IH, Buttgerit F. Non-genomic glucocorticoid effects to provide the basis for new drug developments. *Mol Cell Endocrinol.* 2006;246(1-2):142-6.
- Sorrells SF, Sapolsky RM. An inflammatory review of glucocorticoid actions in the CNS. *Brain Behav Immun.* 2007;21(3):259-72.
- Sousa RJ, Tannery NH, Lafer EM. In situ hybridization mapping of glucocorticoid receptor messenger ribonucleid acid in rat brain. *Mol. Endocrinol.* 1989;3:481-94.
- Southwick SM, Vythilingam M, Charney DS. The psychobiology of depression and resilience to stress: implications for prevention and treatment. *Annu Rev Clin Psychol.* 2005;1:255-91
- Southwick, S.M., Bremner, D., Krystal, J.H., Charney, D.S. Psychobiologic research in post-traumatic stress disorder. *Psychiatr. Clin. North Am.* 1994; 17(2):251-64
- Stenzel-Poore MP, Heinrichs SC, Rivest S, Koob GF, Vale WW. Overproduction of corticotropin-releasing factor in transgenic mice: a genetic model of anxiogenic behavior. *J Neurosci.* 1994;14:2579-84.
- Stephens RLJ, Yang H, Rivier J, Taché Y. Intracisternal injection of CRF antagonist blocks surgical stress-induced inhibition of gastric secretion in the rat. *Peptides.* 1988;9(5):1067-70.
- Szapary D, Song LN, He Y, Simons SS Jr. Differential modulation of glucocorticoid and progesterone receptors transactivation. *Mol Cell Endocrinol.* 2008;283(1-2):114-26.
- Tata DA, Yamamoto BK. Chronic stress enhances methamphetamine-induced extracellular glutamate and excitotoxicity in the rat striatum. *Synapse.* 2008; 62(5): 325-36.
- Teicher MH, Anderson CM, Polcari A. Childhood maltreatment is associated with reduced volume in the hippocampal subfields CA3, dentate gyrus, and subiculum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Feb 28;109(9):E563-72.

Todorovic C, Radulovic J, Jahn O, Radulovic M, Sherrin T, Hippel C, Spiess J. Differential activation of CRF receptor subtypes removes stress-induced memory deficit and anxiety. *Eur J Neurosci.* 2007; 25(11):3385-97.

Trainer PJ, Faria M, Newell-Price J, Browne P, Kopelman P, Coy DH, Besser GM, Grossman AB. A comparison of the effects of human and ovine corticotropin-releasing hormone on the pituitary-adrenal axis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995; 80:412-17.

Ulrich-Lai YM, Herman JP. Neural regulation of endocrine and autonomic stress response. *Nat Rev Neurosci.* 2009;10:397-409.

Vale W, Sipess J, Rivier J. Characterization of a 41 residue ovine hypothalamic peptide that stimulates the secretion of corticotrophin and beta-endorphin. *Science.* 1981;213:1394-7.

Van de Kar LD, Blair ML. Forebrain pathways mediating stress-induced hormone secretion. *Front Neuroendocrinol.* 1999;20(1):1-48.

Van Pett K, Viau V, Bittencourt JC, Chan RKW, Li Hui-Yun, Arias C, Prins GS, Perrin M, Vale W, Sawchenko PE. Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse. *J. Comp. Neurol.* 2000;428(2):191-212.

Vaughan J, Donaldson C, Bittencourt J, Perrin MH, Lewis K, Sutton S, Chan R, Turnbull AV, Lovejoy D, Rivier C. Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor. *Nature* 1995;378:287-92.

Watson S, Gallagher P, Porter RJ, Smith MS, Herron LJ, Bulmer S; North-East Mood Disorders Clinical Research Group, Young AH, Ferrier IN. A Randomized Trial to Examine the Effect of Mifepristone on Neuropsychological Performance and Mood in Patients with Bipolar Depression. *Biol Psychiatry.* 2012 Jul 7. [Epub ahead of print].

Willner P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology.* 2005;52(2):90-110

Wu HH, Wang S. Strain differences in the chronic mild stress animal model of depression. *Behav Brain Res.* 2010 Nov 12;213(1):94-102.