LEONARDO SANTANA NOVAES

EFEITO PROTETOR DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL NA MANIFESTAÇÃO TARDIA DA ANSIEDADE E DO DÉFICIT DE EXTINÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO INDUZIDOS POR ESTRESSE AGUDO EM RATOS: O PAPEL DA SINALIZAÇÃO DE GLICOCORTICOIDE NO COMPLEXO BASOLATERAL DA AMÍGDALA

> 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 2018

LEONARDO SANTANA NOVAES

EFEITO PROTETOR DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL NA MANIFESTAÇÃO TARDIA DA ANSIEDADE E DO DÉFICIT DE EXTINÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO INDUZIDOS POR ESTRESSE AGUDO EM RATOS: O PAPEL DA SINALIZAÇÃO DE GLICOCORTICOIDE NO COMPLEXO BASOLATERAL DA AMÍGDALA

> 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: Prof^a. Dr^a. Carolina Demarchi Munhoz

Versão original

São Paulo 2018

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Novaes, Leonardo Santana EFEITO PROTETOR DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL NA MANIFESTAÇÃO TARDIA DA ANSIEDADE E DO DÉFICIT DE EXTINÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO INDUZIDOS POR ESTRESSE AGUDO EM RATOS: O PAPEL DA SINALIZAÇÃO DE GLICOCORTICOIDE NO COMPLEXO BASOLATERAL DA AMÍGDALA / Leonardo Santana Novaes; orientadora Carolina Demarchi Munhoz. -- São Paulo, 2018. 128 p. Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas. 1. estresse. 2. enriquecimento ambiental. 3. ansiedade. 4. Extinção da memória de medo. 5. Amígdala. I. Munhoz, Carolina Demarchi, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Leonardo Santana Novaes

Título da Tese: EFEITO PROTETOR DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL NA MANIFESTAÇÃO TARDIA DA ANSIEDADE E DO DÉFICIT DE EXTINÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO INDUZIDOS POR ESTRESSE AGUDO EM RATOS: O PAPEL DA SINALIZAÇÃO DE GLICOCORTICOIDE NO COMPLEXO BASOLATERAL DA AMÍGDALA

Orientador: Profa. Dra. Carolina Demarchi Munhoz

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a ______/ ____, considerou o(a) candidato(a):

	() Aprovado(a) () Reprovado(a)
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Presidente:	Assinatura: Nome: Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 028 nas fls. 04 do livro 03 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) Carolina Demarchi Munhoz Coordenador (a) da Linha de pesquisa "Efeitos do enriquecimento ambiental na manifestação tardia da ansiedade induzida por estresse agudo: implicações na aquisição de memória emocional" do qual participam o(s) aluno(s) Leonardo Santana Novaes, Nilton Barreto dos Santos, Dielly Catrina Favacho Lopes, Erica de Almeida Duque, 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 04.07.2013, com validade de 4 anos.

São Paulo, 05 de julho de 2013.

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

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE Secretária- CEUA - 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 86 nas fls. 08 do livro 03 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Carolina Demarchi Munhoz Coordenador (a) da Linha de pesquisa "Efeitos dos glicocorticoides nas interações celulares entre astrócitos, microglia e neurônios durante inflamção induzida por LPS em modelo in vitro" do qual participam o(s) aluno(s) Erica de Almeida Duque, Dielly Catrina Favacho Lopes, Leonardo Novaes Santana, Nilton Barreto dos Santos, 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 01.07.2013, com validade de 4 anos.

São Paulo, 03 de julho de 2013.

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

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



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000 CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "A relação entre a ativação dos receptores de glicocorticoides e a hiperexcitabilidade dos neurônios do complexo basolateral da amígdala na ansiedade tardia induzida por estresse agudo em ratos e sua implicação no déficit de extinção da memória de medo", registrado sob o protocolo nº **85/2016**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **11/08/2016** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: Dr.(a.) Carolina Demarchi Munhoz

- Departamento: Farmacologia

- Membros da Equipe: Erica de Almeida Duque (Pós-graduando), Nilton Barreto dos Santos (Pós-graduando), Leonardo Santana Novaes (Pós-graduando), Marília Brinati Malta (Pós-doutorando), Letícia Moraes Bueno de Camargo (Iniciação científica)

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico *www.icb.usp.br/ceua*. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "The relationship between glucocorticoid receptor activation and the neuronal hyperexcitability in the basolateral amygdala in the restraint stress-induced longlasting anxiety and their implications in the impaired contextual fear extinction", protocol nº 85/2016, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on 8/11/2016 by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for 4 year(s) from the date of approval.

- Principal Investigator: Dr.(a.) Carolina Demarchi Munhoz

- Team members: Erica de Almeida Duque (Graduate Student), Nilton Barreto dos Santos (Graduate Student), Leonardo Santana Novaes (Graduate Student), Marília Brinati Malta (Postdoctoral Researcher), Letícia Moraes Bueno de Camargo (Undergraduate Student)

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
Rattus norvegicus	Wistar	Macho/Male	60 dias/days	560
	Wistar	Macho/Male	Neonatos	480

São Paulo, 19 de agosto de 2016.

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes Coordenador CEUA-ICB/USP

Eliane Aparecida Gomes de M. Nascimento Secretária CEUA-ICB/USP

À minha companheira, Marina

AGRADECIMENTOS

Gostaria de oferecer meus sinceros agradecimentos:

À Professora Carolina Demarchi Munhoz pela confiança depositada, pela orientação atenta, pela generosidade com que oferece seus conhecimentos científicos (e de toda ordem), pela dedicação incansável e por ainda acreditar na ciência.

À Professora Ki Ann Goosens, pela orientação durante o período de pesquisa no MIT, com quem aprendi um pouco mais sobre como fazer ciência.

Às Professoras Raquel Fornari, Simone Motta e Rosana Camarini pelas observações atentas, sugestões e discussões esclarecedoras durante o exame de qualificação.

Aos Professores Cristoforo Scavone e Rosana Camarini, e aos colegas dos respectivos laboratórios, pela colaboração científica e apoio técnico.

À Professora Sara Joyce, cientista admirável, pelo tempo dedicado à minha formação científica e pela amizade.

Ao Professor Newton Canteras, pelas discussões científicas inspiradoras.

À Professora Maria Tereza pela tutoria durante minha formação acadêmica e pelo trabalho dedicado ao curso de graduação Ciências Fundamentais para a Saúde. Aproveito para agradecer, também, aos demais membros integrantes da comissão do curso.

À Guiomar, pelo suporte técnico oferecido e pela amizade.

Aos amigos Nilton, Erica, Leandro, Juliano, Marília e Dielly, pelas discussões científicas e técnicas, pela disposição em ajudar e por tornar a vida cotidiana mais harmônica. Weslão, pela pessoa que é, sempre disposto a compartilhar o que sabe. Renan, rapaz que saiu, mas não saiu.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Neuroendocrinofarmacologia e Imunomodulação, Guilherme (Paique), Fernando, Sabrina, Kairo, Regiane, Amanda e Arthur.

À Letícia, pela dedicação e por querer continuar.

À Aninha, pessoa incrível, de generosidade rara, sempre disposta a aprender e a ensinar. Obrigado pelo apoio e amizade.

À Simone (Simon), Antônio, Maria Aparecida (Cida), Larissa, Diana, Manoel e Adilson, pelo suporte técnico. Às secretárias Mônica e Camila.

Aos demais amigos cientistas fundamentais Aline, Clarissa, Magna e Bentinho, pela contribuição, emotiva e intelectual, durante toda minha formação.

À FAPESP, pelas bolsas concedidas e apoio financeiro (processos 2012/24002-0 e 2015/15169-6). E tabém pelo apoio financeiro, ao CNPq e CAPES.

A minhas amigas Bianca, Roberta e Paulo, pessoas admiráveis, pelas discussões inspiradoras, pela presença e segurança afetiva.

Aos amigos Nicolau, Douglas, Diego, Marcio, Patrícia, Vítor e Legume, pela amizade sincera.

Aos meus queridos Seu Cláudio e Dona Fátima, pessoas incríveis, pela generosidade com que fui recebido na família, pelo afeto e por serem os responsáveis pelo que há de melhor.

À minha família de Arujá, com quem compartilho ótimos momentos.

A meus pais, Maria Gesilda e Leordino, e às minhas irmãs Fernanda, Juliana e Ana Caroline, por quem tenho muita admiração e a quem devo o indescritível. Obrigado pelo apoio incondicional, pelo afeto e pelas sobrinhas e sobrinhos.

À pessoa que mais admiro, que torna o mundo mais leve e compreensível. A quem devo mais do que esse trabalho, a quem dá sentido ao que faço. Obrigado, Má!

RESUMO

Novaes LS. Efeito protetor do enriquecimento ambiental na manifestação tardia da ansiedade e do déficit de extinção da memória de medo induzidos pelo estresse agudo em ratos: o papela da sinalização de glicocorticoide no complexo basolateral da amígdala. [Tese (Doutorado em farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2017.

As consequências de eventos estressantes sobre a saúde humana, principalmente relacionada à condição psiguiátrica, tem ganhado notoriedade nos últimos anos em decorrência do crescente número de comorbidades associadas ao estresse registradas nas grandes cidades. Transtornos emocionais relacionados a sintomas de ansiedade são comuns dentre os relatados na clínica psiguiátrica e ganham importância em trabalhos científicos devotados ao estresse, que lançam mão de abordagens diversas para compreender os mecanismos neurobiológicos subjacentes à a persistência de sintomas ansiosos decorrentes de um evento estressante. Trabalhos prévios mostraram que tanto o estresse agudo de contenção quanto a administração sistêmica de corticosterona (CORT, hormônio glicocorticoide murino) promovem, 10 dias depois, comportamento do tipo ansioso e remodelamento dendrítico no complexo basolateral da amígdala (BLA) em ratos. Além disso, alguns trabalhos recentes mostraram que a exposição ao enriquecimento ambiental (EA) reverteu o efeito ansiogênico e sobre a modulação dendrítica do BLA induzidos por estresse repetido. Em trabalho recente, nós verificamos que o EA preveniu o efeito ansiogênico imediato do estresse agudo de contenção. Esse efeito protetor do EA pareceu estar relacionado a seu efeito preventivo no aumento da atividade neuronal e do receptor de glicocorticoide (GR) no BLA. No presente trabalho, nós verificamos que o EA preveniu tanto o surgimento do comportamento do tipo ansioso guanto o déficit de extinção da memória de medo induzidos por estresse agudo de contenção verificados 10 dias depois. Porém, não está claro se esses efeitos estão relacionados com alterações na árvore dendrítica do BLA e/ou com a atividade de GR no mesmo núcleo. Dessa forma, um dos objetivos centrais do trabalho foi determinar se o efeito preventivo do EA na persistência das alterações comportamentais, e nas alterações morfológicos no BLA, induzidas por estresse agudo, são atribuidas às ações de CORT. Nós observamos que o efeito preventivo do EA na ansiedade e no déficit de extinção, verificados 10 dias após o estresse, não estão relacionados à prevenção no aumento da densidade de espinhos dendríticos do BLA. Além disso, ainibição da síntese de CORT por metirapona preveniu a emergência do comportamento do tipo ansioso 10 dias após o estresse, indicando que a sinalização desse hormônio é crucial para os efeitos comportamentais tardios relacionados ao estresse agudo. Finalmente, lançando mão do uso da tecnologia do DNA recombinante, nós verificamos que a inibição da atividade genômicoa de GR no BLA preveniu o comportamento do tipo ansioso manifestado 10 dias após o estresse

Palavras-chave: Estresse. Enriquecimento ambiental. Ansiedade. Extinção da memória de medo. Amígdala.

ABSTRACT

Novaes LS. Environmental enrichment protection on acute stress-induced late anxiety-like behavior and fear extinction impairment in rats: role of glucocorticoid receptor signaling in the basolateral nucleus of amygdala. [PhD Thesis (Pharmacology)], São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

The consequences of stressful events on human health, especially related to psychiatric disorders, have gained attention in recent years due the increasing number of comorbidities associated to stress in large cities. Anxiety-related disorders are common among the psychiatric patients and are widely present in studies devoted to stress, which use different approaches to investigate the neurobiological mechanisms underlying the persistence of anxiety symptoms caused by a stressful event. Either acute restraint stress or systemic injection of corticosterone (CORT, a rodent glucocorticoid) in rats leads to enhanced anxiety-like behavior and dendritic branch remodeling in the basolateral amygdala complex (BLA) 10 days later. Also, some studies showed that exposure to environmental enrichment (EE) reverted the longlasting anxiety-like behavior and the repeated stress-induced BLA dendritic hypertrophy in rats. In a recent study, we found that EE prevented anxiety-related behavior in adult rats observed immediately after acute restraint stress. This protective role of EE appears to be due to the prevention of the stress-induced increase in neuronal activity and in glucocorticoid receptor (GR) nuclear activity in the BLA. In this study, we showed that EE prevented the restraint stress-induced long-lasting anxiety and contextual fear extinction impairment in adult rats. However, it is not yet clear if this protective role of EE is related to changes in the dendritic branch and/or in the GR signaling in the BLA. The present study sought to determine whether the preventive effect of EE on persistent stress-related changes in behavior as well as in the BLA morphology and activity are attributed to CORT signaling. We found that the EEinduced protection on anxiety-like behavior and fear extinction impairment 10 days after acute restraint stress was not related to prevention of the increase in spine density in BLA. Moreover, systemic injection of GC synthesis inhibitor (metyrapone) prevented the anxiety-like behavior 10 days after stress, showing that GC signaling during stress is crucial to late stress-related behavior. Finally, by antagonizing the genomic signaling of the endogenous GR in the BLA, through the use of recombinant DNA technology. we prevented the emergence of anxiety-related behavior 10 days after acute stress.

Keywords: Stress. Environmental enrichment. Anxiety. Fear extinction. Amygdala.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µ - micrograma

- ACTH Hormônio adrenocorticotrófico
- AMPA Ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropinoico
- ANOVA Análise de Variância
- ATP Trifosfato de Adenosina
- BLA Complexo basolateral da amígdala
- CA Campo aberto
- Ca++ Íon cálcio
- CBP Proteína ligante de CREB (CREB binding protein)
- CeA Núcleo central da amígdala
- CeC Núcleo central da amígdala, subdivisão capsular
- CeM Núcleo central da amígdala, subdivisão medial
- c-Fos Proto-oncogene c-Fos
- Cm Centímetro
- CORT Corticosterona
- Cpm Contagem por milhão
- DAB 3,3'-Diaminobenzidina
- DNA Ácido desoxirribonucleico
- DTT Ditiotreito
- EA Enriquecimento ambiental
- EC Estímulo condicionado
- EDTA Ácido etilenodiamino tetra-acético

Egr-1 – Proteína de resposta ao crescimento imediato -1 (*Early growth response protein 1*)

EI - Estímulo incondicionado

EMN - Extinção da memória de medo

ERGR - Quimera do receptor de estrógeno com o receptor de glicocorticoide

ER - Receptor de estrógeno

EtOH - Etanol

Fkbp5 - Proteína ligante de FK506 (FK506 binding protein 5)

FosB - Vírus do osteosarcoma murino homologo B (*murine osteosarcoma viral* oncogene homolog B)

- g Constante gravitacional universal
- GABA Ácido gama-aminobutírico
- GABAA Subunidade A do receptor de GABA
- GC Hormônios glicocorticoides
- GFP Green fluorescent protein
- GR Receptor de glicocorticoide
- h Hora
- HEPES 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid
- HPA Eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal
- hsp90 Proteína de choque térmico (heat shock protein 90)
- INSS Instituto Nacional do Seguro Social
- i.p. intraperitoneal
- K⁺ Íon potássio
- KCI Cloreto de potássio
- KH₂PO₄ Fosfato de potássio monobásico
- L litro
- LaNEFI Laboratório de neuroendocrinofarmacologia e imunomodulação
- LCE Labirinto em cruz elevado
- LTP Potenciação de longo prazo (Long-term potentiation)
- m Metro
- M Molar
- mm milímetro
- MAPK Proteína quinase ativada por mitógenos (Mitogen-activated protein kinases)
- MgCl₂ Cloreto de Magnésio
- MilliQ Água deionizada
- MIT Massachusetts Institute of Technology
- ml mililitro
- mm milímetro
- MR Receptor de mineralocorticoides
- mRNA Ácido ribonucleico mensageiro
- Na₂HPO₄ Fosfato de Sódio bibásico
- NAc Núcleo accumbens
- NaCI Cloreto de Sódio
- NaHCO3 Bicarbonato de Sódio

- NGF Fator de crescimento neuronal (nerve growth factor)
- NMDA N-metil-D-aspartato
- NP Não pareado
- NP-40 Tergitol nonil-fenoxipolietoxiletanol
- PBS Solução salina-fosfato
- PCR Reação em cadeia da polimerase
- PMSF Fluoreto de fenilmetilsulfonil
- Poly-dldC Poly(deoxyinosinic-deoxycytidylic) acid sodium salt
- rpm Rotações por minuto
- s segundos
- SFB Soro Fetal Bovino
- SDS Dodecil sulfato sódico
- TBE Tampão Tris/Borato/EDTA
- TBS Solução salina-tris
- tdGR Dominante negativo de GR
- TEPT Transtorno do estresse pós-traumático
- Tris-HCI (hidroximetil) aminometano-cloridrato (TRIS hydrochloride ou Tris
- (hidroxymethyl) aminomethane hydrochloride)
- U Unidade de massa atômica
- USP Universidade de São Paulo
- UV Ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática dos diferentes delineamentos experimentais adotados. 33

Figura 2. EA protegeu contra a persistência do comportamento do tipo ansioso induzido por 2h de estresse de contenção. 52

Figura 3 - EA não preveniu o aumento da densidade de espinhos dendríticos no BLA induzido por estresse agudo. 55

Figura 4 - EA e estresse de contenção de 2h não alteram, 10 dias depois de cada estímulo, as concentrações séricas de CORT e a translocação nuclear de GR no BLA. 57

Figura 5 - EA não modula o aumento nas concentrações séricas de CORT induzido por estresse. 58

Figura 6 - Inibição da síntese de CORT durante o estresse preveniu, 10 diasapós, o desencadeamento do comportamento do tipo ansioso.60

Figura 7 - Fotomicrografia ilustrando aumento de translocação nuclear de GR no BLA imediatamente após estresse. 62

Figura 8 - Fotomicrografia ilustrando a distribuição de GR após infecção de vírus HSV-tdGR em cultura primária de neurônio. 64

Figura 9 - Superexpressão de tdGR em neurônios reduz a atividade genômica de GR. 65

Figure 10 - Expressão de tdGR no BLA preveniu o desenvolvimento do comportamento do tipo ansioso nos animais 10 dias após estresse. 67

Figure 11 - Estresse de contenção de 2h não altera, 10 dias depois, a aquisição de memória de medo condicionada ao contexto. 69

Figure 12 - EA protege contra prejuízo no processo de extinção de memória de medo em animais estressados 10 dias antes do treino de aquisição. 71

Figure 13 - Efeito do estresse e do EA na atividade de neurônios do BLA em animais submetidos à extinção do medo condicionado. 74

Figure 14 - Efeito do estresse e do EA na atividade de neurônios do CPFmIL em animais submetidos à extinção do medo condicionado. 75

Figure 15 - Efeito do estresse e do EA na atividade de neurônios do CPFmPL em animais submetidos à extinção do medo condicionado. 76

1 INTRODUÇÃO	20
2 OBJETIVO	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 Animais	
3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	
3.3 PROCEDIMENTOS COMPORTAMENTAIS E APARELHOS UTILIZADOS	
3.3.1 Enriquecimento ambiental	34
3.3.2 Estresse Agudo por Contenção	34
3.3.3 Teste de ansiedade	34
3.3.3.1 LCE	34
3.3.3.2 CA	36
3.3.4 Extinção da memória de medo ao contexto (EMM)	36
3.4 INIBIÇÃO DA SÍNTESE DE CORT POR METIRAPONA	
3.5 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS E INFUSÃO DAS PARTÍCULAS VIRAIS NO BLA	
3.6 CONFECÇÃO DOS VETORES VIRAIS	
3.7 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DO MATERIAL A SER ANALISADO	
3.7.1 Decapitação por guilhotina, dissecção do BLA e coleta do sangue	
3.7.2 Perfusão transcardíaca	40
3.8 PROCESSAMENTO DO MATERIAL BIOLÓGICO	40
3.8.1 Análise da concentração de corticosterona no sangue	40
3.8.2 Extração de proteínas citosólicas e nucleares	41
3.8.2.1 Determinação da concentração de proteínas	41
3.8.3 Ensaio de Western Blot para expressão de GR	42
3.8.3.1 Visualização e análise das imagens	

SUMÁRIO

3.8.4 Processamento do material histológico	43
3.8.4.1 Imunoistoquímica e imunofluorescência	43
3.8.4.2 Coloração de Golgi	44
3.8.5 Análise do material histológico	45
3.9 CULTURA PRIMÁRIA DE TECIDO CORTICAL	46
3.9.1 Infecção das células pelas partículas virais e análise da sub-	
localização e atividade genômica de GR	47
3.10 ENSAIO DE PCR	48
3.10.1 Extração de RNA	48
3.10.2 Transcrição reversa	48
3.10.3 Reação de amplificação e corrida em gel de agarose	49
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS	49
4 RESULTADOS	50
4.1 EA protege contra ansiedade manifestada 10 dias após estresse	
4.1 EA PROTEGE CONTRA ANSIEDADE MANIFESTADA 10 DIAS APÓS ESTRESSE AGUDO DE CONTENÇÃO	50
 4.1 EA PROTEGE CONTRA ANSIEDADE MANIFESTADA 10 DIAS APÓS ESTRESSE AGUDO DE CONTENÇÃO 4.2 EA PREVINE O AUMENTO DA DENSIDADE DE ESPINHOS DENDRÍTICOS DO 	50
 4.1 EA PROTEGE CONTRA ANSIEDADE MANIFESTADA 10 DIAS APÓS ESTRESSE AGUDO DE CONTENÇÃO 4.2 EA PREVINE O AUMENTO DA DENSIDADE DE ESPINHOS DENDRÍTICOS DO BLA INDUZIDO POR ESTRESSE AGUDO DE CONTENÇÃO 	50
 4.1 EA PROTEGE CONTRA ANSIEDADE MANIFESTADA 10 DIAS APÓS ESTRESSE AGUDO DE CONTENÇÃO 4.2 EA PREVINE O AUMENTO DA DENSIDADE DE ESPINHOS DENDRÍTICOS DO BLA INDUZIDO POR ESTRESSE AGUDO DE CONTENÇÃO 4.3 COMPORTAMENTO DO TIPO ANSIOSO MANIFESTADO 10 DIAS APÓS O 	50
 4.1 EA PROTEGE CONTRA ANSIEDADE MANIFESTADA 10 DIAS APÓS ESTRESSE AGUDO DE CONTENÇÃO	50
 4.1 EA PROTEGE CONTRA ANSIEDADE MANIFESTADA 10 DIAS APÓS ESTRESSE AGUDO DE CONTENÇÃO 4.2 EA PREVINE O AUMENTO DA DENSIDADE DE ESPINHOS DENDRÍTICOS DO BLA INDUZIDO POR ESTRESSE AGUDO DE CONTENÇÃO 4.3 COMPORTAMENTO DO TIPO ANSIOSO MANIFESTADO 10 DIAS APÓS O ESTRESSE NÃO ESTÁ ATRELADO A ALTERAÇÕES NOS NÍVEIS SÉRICOS DE CORTICOSTERONA E À ATIVIDADE DE GR NO BLA 	50
 4.1 EA PROTEGE CONTRA ANSIEDADE MANIFESTADA 10 DIAS APÓS ESTRESSE AGUDO DE CONTENÇÃO	50
 4.1 EA PROTEGE CONTRA ANSIEDADE MANIFESTADA 10 DIAS APÓS ESTRESSE AGUDO DE CONTENÇÃO	50 53 56 57
 4.1 EA PROTEGE CONTRA ANSIEDADE MANIFESTADA 10 DIAS APÓS ESTRESSE AGUDO DE CONTENÇÃO	50 53 56 57
 4.1 EA PROTEGE CONTRA ANSIEDADE MANIFESTADA 10 DIAS APÓS ESTRESSE AGUDO DE CONTENÇÃO	50 53 56 57

4.6 EFEITO ANSIOGÊNICO TARDIO DO ESTRESSE ESTÁ ASSOCIADO AO
AUMENTO IMEDIATO DA SINALIZAÇÃO DE GR NO BLA61
4.7 EFEITO TARDIO DO ESTRESSE AGUDO DE CONTENÇÃO NOS PROCESSOS DE
AQUISIÇÃO E EXTINÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO AO CONTEXTO: PAPEL
MODULATÓRIO DO EA
4.8 Efeitos do EA e do estresse agudo na atividade neuronal no BLA
E CPFM DOS ANIMAIS SUBMETIDOS AOS TESTES DE EXTINÇÃO DA MEMÓRIA DE
MEDO AO CONTEXTO
5 DISCUSSÃO
6 CONCLUSÃO

1 INTRODUÇÃO

As respostas fisiológica e comportamental do organismo a estímulos estressores possuem um importante valor adaptativo, na medida em que o preparam para lidar com uma situação de risco. Porém, a recorrente submissão a estímulos dessa ordem implica em alterações adaptativas em sistemas endócrinos e de mediadores neurais, como os hormônios glicocorticoides (GCs) e as catecolaminas (McIntyre et al., 2012). Esses mediadores estão diretamente implicados no desenvolvimento de transtornos psiguiátricos de humor e ansiedade, como depressão, síndrome do pânico, transtorno obsessivo compulsivo e transtorno do estresse pós-traumático (TEPT; Abelson et al., 2007; Kluge et al., 2007; Ressler e Nemeroff, 1999). Dados divulgados pela Secretaria de Previdência do Ministério da Fazenda em parceria com o Instituto Nacional do Seguro Social (INSS)¹ mostram que, entre os anos de 2014 e 2016, foram concedidos no Brasil 538.493 auxílios acidentários na categoria transtornos mentais e comportamentais (90% referiam-se a problemas como estresse, episódios depressivos, alteração de humor e ansiedade), equivalendo a cerca de 9,3% do total de auxílios concedidos, sendo a terceira causa mais recorrente de afastamento no período. Levantamento realizado por Andrade et al. (2012) apontou que cerca de 30% da população residente na região metropolitana de São Paulo apresenta algum tipo de transtorno mental, sendo os mais comuns aqueles agrupados nas categorias de ansiedade (19%) e distúrbios de humor (11%).

A recordação de um evento ameaçador, tanto quanto a resposta fisiológica e comportamental imediata a um dado estímulo estressor, também possui um valor biológico adaptativo importante, na medida em que prepara o organismo para gerar uma resposta mais eficaz a uma eventual situação de risco futura. Porém, a recordação persistente de um evento estressante agudo pode desencadear uma condição patológica associada à ansiedade, onde a memória recordada assume uma característica traumática recorrentemente evocada, condição característica de pacientes com TEPT (American Psychiatric Association: Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-V, 2013).

¹ Anuário Estatístico da Previdência Social/Ministério da Fazenda, Secretaria da Previdência, Empresa de Tecnologia e Informações da Previdência – Ano 9 (2014-2016); v.23, p. 1-934.

A esse respeito, muitos pesquisadores estão investigando quais condições levam alguns indivíduos a desenvolverem TEPT, lançando mão de abordagens que variam desde a caracterização genética idiossincrática do indivíduo até a influência de fatores de riscos ambientais e, mais recentemente, a combinação de ambos os fatores através da investigação de mecanismos epigenéticos da modulação genômica (ver McEwen et al., 2012). Nesse contexto, diversos trabalhos relatam a influência modulatória que o estado de excitação emocional (do termo inglês *arousal*), durante a exposição a um evento, exerce sobre a memória, atribuindo uma valência emocional ao fato a ser recordado e, assim, modificando sua persistência em comparação a fatos extraídos de contextos emocionalmente neutros (para um a ampla revisão, ver de Quervainet al., 2017; McEwen et al., 2012; McGaugh, 2004).

O condicionamento clássico de medo é um dos paradigmas mais usados em animais de experimentação para o estudo da memória emocional e é extensamente utilizado como modelo de estudos de desordens associadas ao estresse e ansiedade (Fendt e Fanselow, 1999; LeDoux, 2000). Nesse paradigma, durante o período de treino, o rato ou camundongo é exposto a um estímulo condicionado neutro (EC; por exemplo, um sinal luminoso, sonoro ou olfativo) pareado a um estímulo incondicionado (EI) aversivo, por exemplo, um choque nas patas ou um ruído estridente. No dia do teste, quando se verifica a memória adquirida no treino, a apresentação apenas do EC desperta uma resposta emocional de medo, mesmo na ausência do El, tal como congelamento (freezing), aumento do reflexo de sobressalto e supressão de comportamento exploratório. Além disso, há manifestações autonômicas e neuroendócrinas como o aumento da liberação de hormônios do eixo hipotálâmico-hipofisário-adrenal (HPA), entre eles o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e a corticosterona (CORT, principal GC murino, análoga ao cortisol humano; Fendt e Fanselow, 1999). Essas respostas condicionadas podem ser observadas quando o animal é submetido à arena de testes onde recebeu o estímulo aversivo (EI), mesmo na ausência do EC. Nesse caso, o condicionamento está associado ao contexto.

A amígdala figura como estrutura chave no condicionamento aversivo clássico (ver LeDoux, 2000). Estudos anatômicos, eletrofisiológicos e comportamentais sugerem que a convergência dos estímulos condicionado e incondicionado (de ordem sensorial) ocorre no complexo basolateral da amígdala (BLA - que inclui os núcleos lateral, basolateral e basomedial), cujas projeções determinam direta, ou indiretamente, a resposta comportamental do animal (Amaral et al., 1992; Fendt and Fanselow, 1999; Gallagher and Holland, 1994; Janak and Tye, 2015; McDonald, 1998; Sah et al., 2003; Salzman and Fusi, 2010; Sarter and Markowitsch, 1985). Lesões ou inibição dos neurônios da região prejudica o condicionamento de medo (Amano et al.,2011; Anglada-Figueroa e Quirk, 2005; Hatfield et al., 1996; Maren et al., 2001), ao passo que a estimulação de populações neuronais do BLA favorece o pareamento com um estímulo neutro para, posteriormente, desencadear uma resposta de medo (Johansen et al., 2010; Yiu et al., 2014). A apresentação apenas do EC, em animais que tiveram o estímulo pareado com o EI, evoca respostas eletrofisiológicas mais acentuadas nos neurônios do núcleo lateral da amígdala quando comparados a animais que não tiveram o dado estímulo pareado com o EI (Collins e Paré, 2000; Quirk et al., 1995). Em trabalho recente, Gore e colegas (2015) mostraram que os neurônios do BLA ativados durante a apresentação do EI, quando estimulados fora do contexto em que este foi apresentado, gera a mesma resposta comportamental desencadeada pelo El. Além disso, os mesmos neurônios ativados durante a apresentação do El são necessários para a expressão do condicionamento quando da apresentação do EC, se este foi pareado com o EI.

Nas últimas décadas, diversos achados trouxeram avanços importantes sobre o substrato neural subjacente ao processo mnemônico associado a experiências estressantes, visando compreender como o estado de excitação emocional, além do componente potencialmente aversivo intrínseco ao próprio evento, modula o processamento da memória (de Quervain et al., 2017; Joëls et al., 2006; de Kloet et al., 1999; McEwen e Sapolsky, 1995; McEwenn et al., 2015; Zoladz et al., 2011). Dentro dessa perspectiva, muitas abordagens investigam a influência dos mediadores neuroendócrinos do estresse nas diferentes fases da formação ou expressão da memória. GCs, liberados pela glândula suprarrenal em decorrência de eventos estressantes, ganham destaque nesses trabalhos, fundamentalmente por estarem implicados em diversas patologias associadas ao estresse (de Kloet et al., 2005; McEwenn et al., 2015; de Quervain et al., 2017). De forma geral, sabe-se que a elevação sistêmica de CORT em roedores resulta em aumento na capacidade de consolidação da memória de informações novas, porém prejudica o processo de recordação de memórias anteriormente armazenadas (de Quervain et al., 1998; Roozendaal et al., 1999). Por outro lado, a elevação crônica dos níveis do mesmo hormônio está associada a prejuízos no desempenho em testes de cognição

(McEwen, 2001, Sapolsky , 2000). Estudos utilizando modelos de condicionamento clássico mostraram que a administração sistêmica de CORT resulta em aumento de consolidação de memória quando efetuada antes, ou imediatamente após, o treino de aquisição da memória (Buchanan e Lovallo, 2001; Cordero et al., 2002; Roozendaal et al., 1999). Um aspecto muito importante a ser destacado a respeito do papel dos GCs sobre a memória é sua atuação potencializadora apenas quando há um componente aversivo, ou de alta excitação emocional, intrínsecos ao teste. Nesse sentido, em modelos experimentais nos quais não há associação da aversividade com o fato ou evento a ser recordado, o aumento sistêmico de CORT não exerce qualquer influência no processo de aquisição de memória (Buchanan e Lovallo, 2001; Kuhlmann e Wolf, 2006; Okuda et al., 2004).

A influência de estímulos estressores exógenos ao contexto do paradigma de aprendizado sobre a memória emocional também depende do processamento das informações pela amígdala (Davis, 1992; Liu et al., 1999; Pelletier et al., 2005). A execução de atividades estressantes, ou de alta excitação emocional, que elevam, portanto, a liberação de hormônios glicocorticoides pela glândula adrenal, também ativam a amígdala (Pelletier et al., 2005). Além de serem hormônios lipofílicos e, assim, atingirem rapidamente uma extensa área do organismo, incluindo o encéfalo, a amígdala contém consideráveis concentrações de receptores de mineralocorticoides (MR) e de glicocorticoides (GR) (Patel et al., 2000; Pryce, 2008). Kvushansky e Richter-Levin (2006) mostraram uma relação diretamente proporcional entre o aumento da concentração sérica de CORT e a atividade dos neurônios da amígdala. Dados obtidos em humanos e em animais apontam o papel central da amígdala em uma variedade de processos que envolvem informações emocionalmente excitáveis, incluindo influências sobre a atenção, percepção, aprendizado e memória (LeDoux, 2003; Phelps e LeDoux, 2005). O BLA, nesse contexto, ocupa um papel chave. Lesões nessa estrutura, por exemplo, bloqueiam os efeitos sobre a modulação da memória induzida por administração sistêmica pós-treino de CORT (McGaugh, 2004; Roozendaal e McGaugh, 1996), efeito que independe do núcleo central da amígdala (CeA). Além disso, infusões pós-treino de CORT no BLA, mas não no CeA, promovem aumento de consolidação de memória (Roozendaal e McGaugh, 1997). Já a infusão de antagonista de GR (RU-486) nessa estrutura prejudica, ou até bloqueia, o efeito potencializador decorrente da exposição ao estresse no processo de consolidação da memória (Conrad e MacMillan, 2004; Perusini et al., 2016).

Trabalhos desenvolvidos com humanos complementam achados obtidos com o uso de animais, mostrando grandes avanços na compreensão do papel da amígdala na atribuição de valência emocional ao estímulo apreendido. Em testes de condicionamento clássico, pacientes com transtornos de ansiedade apresentam maior aquisição e retenção de um estímulo novo associado a uma situação de medo do que indivíduos controles. Nesses trabalhos, a atividade da amígdala novamente se destaca. No condicionamento de medo, por exemplo, trabalhos com ressonância magnética funcional mostraram um aumento significativo da atividade da amígdala durante a fase de aquisição em pacientes ansiosos (Büchel et al., 1998; LaBar et al., 1998). Outros estudos mostraram que pacientes ansiosos tendem a apresentar atenção seletiva a eventos de cunho emocional negativo (ou aversivo) ou, até, a interpretar estímulos de caráter dúbio (sem clara distinção entre aversão e neutralidade) como sendo de ordem aversiva, efeitos acompanhados pelo aumento de atividade da amígdala (Bishop et al., 2004; Pessoa et al., 2002; Vuilleumier et al., 2001). Em conjunto, esses dados apontam que a ansiedade, ou o estado de excitação emocional elevada, promove aumento da aquisição de memória associada a componentes aversivos, quadro que pode ser dependente de um processo de atenção seletiva a estímulos supostamente ameaçadores, além de predispor o sujeito a interpretar estímulos, aparentemente neutros, como aversivos (Bishop, 2007).

A extinção da memória de medo, um paradígma experimental que consiste na redução da resposta apreensiva mediante apresentações sucessivas do EC, possui um correlato importante com a terapia cognitivo-comportamental (Milad e Quirk, 2012; Pitman et al, 2012; Singewald et al, 2015; Yehuda e LeDoux, 2007). Trata-se de um fenômeno baseado na ausência de reforço da resposta apreendida mediante a apresentação do EC. Nesse sentido, a extinção da memória apreendida é um processo ativo de aprendizado, distinto do processo de aprendizado que levou à resposta de medo (Berman e Dudai, 2001; Myers e Davis, 2002).

A dependência de informações contextuais para que a extinção ocorra de forma eficiente traz implicações de relevância clínica importantes, visto ser um dos maiores desafios da psicoterapia chegar a uma redução da resposta apreensiva ou de medo que transcenda o ambiente terapêutico (ver Maren et al., 2013). O BLA, além de um papel crucial na aquisição e expressão do medo apreendido (LeDoux, 2000), também possui um papel central no processo de extinção da memória em modelos animais (Maren e Quirk, 2004). A inibição de síntese proteica ou a infusão de antagonista do

receptor subtipo NMDA para o glutamato diretamente no BLA prejudica a consolidação da extinção do medo condicionado (Falls et al., 1992; Lee e Kim, 1998), enquanto que a infusão de agonista do receptor NMDA no mesmo núcleo facilita a extinção (Ledgerwood et al., 2003; Walker et al., 2002). Do ponto de vista celular, uma questão intrigante é compreender como o processamento do estímulo condicionado recruta neurônios do BLA para manifestar a resposta de medo e, a depender de um processo de plasticidade (Herry et al., 2010; Quirk e Muller, 2008) decorrente da reexposição ao mesmo estímulo condicionado, porém na ausência do estímulo incondicionado, a resposta é suprimida. Sabe-se que em roedores, populações neuronais específicas do BLA apresentam aumento dos disparos após o condicionamento de medo e essas mesmas populações reduzem a magnitude desses disparos após o processo de extinção (Repa et al., 2001). Paralelamente, algumas populações codificam o processo de extinção, aumentando a atividade de seus neurônios em decorrência da exposição ao treino de extinção (Hobin et al., 2003).

Além das implicações do estresse e da sinalização mediada por CORT na aquisição e consolidação da memória de medo (de Quervain et al., 2017; McGaugh e Roozendall, 2002), recentes evidências vêm mostrando seus efeitos sobre a aquisição e consolidação da extinção da memória. A exposição ao estresse de plataforma suspensa 30 minutos antes do treino de extinção prejudicou a extinção da memória de medo ao contexto (Xu et al., 1997; Xu et al., 1998), ao passo que estresse único prolongado (2h de estresse de contenção, 20 min de nado forçado e perda de consciência por inalação de éter) prejudicou a extinção de medo ao contexto dos animais quando foram testados 7 dias após o estresse (Knox et al., 2012a; Knox et al., 2012b; Yamamoto et al., 2008). Por outro lado, e de forma contra intuitiva, a inibição da liberação sistêmica de CORT antes do treino de extinção no paradigma pavloviano clássico prejudicou a retenção da extinção da memória (Barrett e Gonzalez-Lima, 2004). No teste de sobressalto potencializado pelo medo, as sucessivas sessões de extinção aumentaram as concentrações séricas do hormônio, ao passo que a administração do glicocorticoide sintético dexametasona facilitou a extinção quando infundida antes, ou imediatamente após, as sessões de extinção (Yang et al., 2006). A infusão intra BLA de antagonista de GR (RU-486) preveniu o efeito facilitatório da administração periférica de Dexametasona (glicocorticoide sintético) na extinção da memória, enquanto que a infusão de agonista de GR (RU-28362) intra BLA promoveu aumento de extinção (Yang et al., 2006), sugerindo que o

BLA é uma região crítica na modulação da memória exercida pelas alterações nas concentrações de CORT. É interessante destacar que pacientes com TEPT, além de apresentarem déficit de extinção de memória traumática (Rothbaun e Davis, 2003), também apresentam alterações nas concentrações de glicocorticoides no plasma e urina, e *feedback* negativo aumentado do eixo HPA (Yehuda, 2001). Outros trabalhos mostraram, ainda, que a administração diária de baixas doses de hidrocortisona (um outro glicocorticoide sintético) reduz os sintomas clínicos em pacientes com TEPT (Aerni et al., 2004; Soravia et al., 2006).

Além de possuir um papel chave nos efeitos do estresse sobre os diferentes processos de memória emocional, diversos trabalhos vêm mostrando que o BLA também protagoniza o efeito ansiogênico do estresse não relacionado à memória (Davis, 1992; Gross and Hen, 2004; LeDoux, 2000; Rosen and Schulkin, 1998; Rodrigues et al., 2009). Alguns trabalhos mostraram que o estresse crônico de contenção em ratos (2h por 10 dias consecutivos) promove alterações na morfologia da árvore dendrítica do BLA, como o aumento do comprimento de cada segmento e do número de bifurcações (Mitra et al., 2005; Vyas et al., 2002), sugerindo um aumento da hiperatividade dos neurônios dessa região. Outros trabalhos mostraram que o estresse agudo de contenção (2h), assim como a administração sistêmica de uma única dose de CORT, geraram o mesmo efeito comportamental que o estresse crônico (Kim et al., 2014; Mitra et al., 2005; Mitra e Sapolsky, 2008; Rao et al., 2012). Interessantemente, nesses trabalhos, o comportamento ansioso dos animais foi verificado 10-12 dias após a infusão de CORT ou o estímulo estressor e coincidiu com o período em que também foram verificadas alterações na árvore dendrítica do BLA (nesse caso, aumento da densidade dos espinhos dendríticos), sugerindo a necessidade de um período de latência para que sejam verificados os efeitos morfológicos do estresse no BLA. Em conjunto, esses trabalhos sugerem que há uma correlação entre os efeitos do estresse sobre a manifestação do comportamento ansioso e seu efeito sobre a árvore dendrítica do BLA, além de indicarem que os efeitos do estresse sejam mediados pela CORT.

Abordagens distintas vêm sendo utilizadas para verificar fatores predisponentes ou protetores do organismo à submissão a estímulos estressores, dentre elas as condições ambientais às quais os mesmos são submetidos. O enriquecimento ambiental (EA) é um modelo experimental amplamente utilizado para esse fim, com conhecidas propriedades ansiolíticas (Benaroya-Milshtein et al., 2004;

Friske e Gammie, 2005; Huzard et al., 2015; Koe et al., 2016; Pietropaolo et al., 2014; Revenelle et al., 2014; Roy et al., 2001) e tem sido amplamente utilizado como modelo de indução de proteção ao organismo frente a estímulos estressores em diferentes modelos animais (ver Fox et al., 2006). Trata-se de um modelo experimental no qual os animais são acondicionados em caixas moradia que propiciam o aumento de estímulos sensórios, motores e sociais em relação às condições padrões oferecidas a animais de experimentação. De modo geral, o EA consiste no acondicionamento de grupos de animais em caixas relativamente grandes nas quais são introduzidos periodicamente objetos e brinquedos, de tal forma a criar um ambiente que potencialize as interações sociais e estimule o comportamento exploratório e motor (Mohammed et al., 2002; van Praag et al., 2000).

Embora muitos trabalhos tenham mostrado o efeito protetor do EA em diferentes transtornos induzidos por estresse, ainda não está claro como esse tipo de moradia exerce seus efeitos biológicos. Em trabalho recente (Novaes et al., 2017), obtivemos alguns resultados que nos ajudam a esclarecer os mecanismos neurobiológicos subjacentes aos efeitos protetores do EA sobre o comportamento do tipo ansioso induzido pelo estresse agudo. De forma geral, verificamos que animais acomodados em gaiolas enriguecidas são resilientes ao desencadeamento de comportamento do tipo ansioso induzido por estresse agudo de contenção e apresentaram menor expressão de EGR-1 no BLA, um marcador indireto de atividade neuronal. Contra intuitivamente, o EA não preveniu o aumento das concentrações séricas de CORT induzido pelo estresse, entretanto, nós observamos aumento da atividade nuclear de GR apenas nos animais não enriquecidos. Esses dados são interessantes na media em que muitos dos trabalhos relacionam os efeitos protetores do EA a seu efeito modulatório sobre o eixo HPA (Belz et al., 2003; Francis et al., 2002; Morley-Fletcher et al., 2003; Moncek et al., 2004; Roy et al., 2001; Welberg et al., 2006).

Pertencente à família dos receptores nucleares, o GR encontra-se no citoplasma da célula acoplado a algumas proteínas acessórias (chaperonas, como a Hsp90; co-chaperonas, como a Fkbp5; co-reguladores, como a CBP) e, quando ligado ao hormônio glicocorticoide, dissocia-se dessas proteínas e migra, em dímeros ou não, para o núcleo celular (ver Duque e Mnhoz, 2016). No núcleo celular, o complexo

GR-ligante atua como fator de transcrição através da transativação ou transrepressão de genes, ligando-se com alta afinidade aos elementos responsivos a glicocorticoides (GRE), localizados na região promotora ou no zona intra-gênica dos genes alvos (Kadmiel e Cidlowisk, 2014; Ratman et al., 2013). Dados da literatura mostram que o aumento da atividade nuclear de GR, desencadeado por estresse, é um fenômeno diretamente relacionado ao aumento da resposta eletrofisiológica dos neurônios do BLA (Duvarci e Paré, 2007), fenômeno atrelado à gênese da resposta do tipo ansiosa (Drevets et al., 1992). Ademais, evidências apontam que esse efeito modulatório de GR sobre a excitabilidade dos neurônios do BLA se deve à ação genômica do receptor (Duvarci e Paré, 2007).

2 OBJETIVO

Tendo em vista a pertinência do exposto, a presente tese teve como objetivo verificar os efeitos dos sintomas de ansiedade, decorrente de um evento estressante agudo, sobre os mecanismos de aquisição e extinção de memória aversiva. Fazendo referência aos trabalhos supracitados acerca do quadro de ansiedade sobre a percepção de estímulos aversivos, propusemos verificar, em ratos *Wistar*, os efeitos que a ansiedade manifestada tardiamente após um estímulo estressor agudo exerce sobre os diferentes processos de memória no condicionamento de medo ao contexto. Além disso, tendo em vista os dados obtidos previamente pelo grupo (Novaes et al., 2017), objetivamos verificar os efeitos que o EA prévio ao estresse exerce no decurso da resposta comportamental ao estresse, com destaque às alterações morfológicas e à sinalização de glicocorticoide via GR no BLA

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Todos os experimentos foram realizados de acordo com o estabelecido pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), sob a lei federal de número 11794 de 10/08/2008. Todos os procedimentos experimentais utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP – protocolo 028, fls. 04 do livro 03; protocolo 086, fls. 08 do livro 03; protocolo 085/2016) e foram conduzidos de forma a reduzir ao máximo o sofrimento e o número de animais utilizados.

Foram utilizados como sujeitos experimentais 344 ratos machos da linhagem *Wistar* provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, obtidos com 2 meses de idade. Os animais foram acondicionados, em grupos de 2, em gaiolas padrão de polipropileno (com medidas de 30 X 40 X 18 cm) por um período de 7 a 10 dias, seguidos de transferência para gaiolas especiais desenvolvidas para EA (ver descrição no próximo item), ou permanência na gaiola padrão conforme o grupo experimental. Os animais ficaram alojados com livre acesso à água e ração, em biotério mantido sob ciclo de luminosidade claro-escuro de 12 horas (luz acessa às 6h00) e sob controle de temperatura (23 ± 2 °C). Para a realização da cultura primária de células do córtex, foram utilizados 5 ratos neonatos da linhagem *wistar*, entre 1 e 4 dias de idade.

3.2 Delineamento experimental

Os ensaios comportamentais foram divididos em 4 frentes de trabalho independentes e conduzidas de forma paralela: No *experimento 1*, o objetivo do ensaio foi verificar o efeito da prévia exposição dos animais ao EA na manifestação tardia do comportamento do tipo ansioso desencadeado por estresse agudo (Fig. 1, A). Para tanto, passados 7-10 dias de aclimatação após o recebimento dos animais do Biotério Central, estes foram acondicionados em suas moradias conforme os grupos definidos, a saber: animais criados em gaiolas padrão e animais criados em ambiente enriquecido, onde viveram por 14 dias. No décimo quinto dia de estadia, entre 8h00 e 12h00, metade dos animais foi exposta ao estresse agudo por contenção

por duas horas, seguido de imediata transferência às gaiolas de acomodação padrão, inclusive o grupo de animais enriquecidos. Os animais não estressados permaneceram em suas caixas moradia e, passado o período de estresse dos demais, os animais enriquecidos (e não estressados) foram realocados em caixas moradia padrão. Desta forma, ao final do ensaio, obtivemos 4 grupos experimentais: animais criados em gaiolas padrão não estressados; animais criados em gaiolas padrão e que sofreram estresse agudo; animais criados em ambiente enriquecido não estressados; animais criados em ambiente enriquecido e que sofreram estresse agudo. Dez dias após o estresse agudo, os animais foram submetidos aos testes de ansiedade no labirinto em cruz elevado (LCE) ou no campo aberto (CA; nesse caso, apenas um grupo adicional de animais estressados – enriquecidos ou não), após o qual foram submetidos imediatamente à eutanásia. A eutanásia em parte dos animais foi por decapitação por guilhotina e parte através do procedimento de perfusão transcardíaca, ambos os processos descritos em detalhes adiante.

O objetivo do *experimento 2* foi verificar o efeito da inibição da síntese de corticosterona durante o estresse no comportamento ansioso tardio (10 dias após; Fig. 1, B). Todos os animais foram acondicionados em gaiolas padrão do início ao fim do experimento e o delineamento experimental seguiu conforme *experimento 1*, com as seguintes modificações. Após o período de aclimatação (7-10 dias em moradia padrão), os animais foram divididos em 4 grupos experimentais: animais que receberam salina e não foram estressados; animais que foram estressados e que receberam salina antes do estresse; animais que receberam inibidor de síntese de glicocorticoide (Metirapona) e não foram estressados; animais que foram estressados e que receberam Metirapona antes do estresse. Dez dias após a sessão de estresse (os animais que não foram estressados seguiram em suas caixas moradia), os animais foram submetidos ao teste no LCE e, imediatamente após, submetidos à eutanásia por decapitação.

O experimento 3 teve como objetivo verificar o efeito da inibição da sinalização de GR no BLA (através da expressão de tdGR, detalhes adiante) durante o estresse no comportamento do tipo ansioso tardio (10 dias após; Fig. 1, C). Após o período de aclimatação, os animais passaram por cirurgia estereotáxica para injeção das partículas virais no BLA (detalhes adiante) e, passado e período de recuperação (4 a 6 dias), os animais foram estressados (os animais não estressados permaneceram em suas respectivas caixas moradia). Dez dias depois do estresse, os animais foram

testados no LCE e, imediatamente após, submetidos à eutanásia por perfusão transcardíaca. Ao final do experimento, formaram-se os seguintes grupos experimentais: animais infectados com o vírus controle (GFP, detalhes adiante) não estressados; animais infectados com GFP e estressados; animais infectados com tdGR não estressados; animais infectados com tdGR não estressados.

O experimento 4 teve como objetivo verificar se 10 dias após o estresse agudo, os animais apresentam diferenças no processo de aquisição e extinção da memória de condicionamento de medo ao contexto (Fig. 1, D). O delineamento experimental seguiu-se da mesma forma que no *experimento 1* até o fim do intervalo pós-estresse, quando os animais foram encaminhados ao condicionamento de medo ao contexto. No dia do treino de aquisição da memória, os animais foram introduzidos na caixa de condicionamento, retornados às suas respectivas gaiolas de acomodação e, 24h após, iniciou-se a bateria de 6 testes de extinção da memória, intervalados de 24h. Após o último teste, os animais foram imediatamente submetidos à eutanásia conforme *experimento 1*.

Com vistas a obter amostras biológicas imediatamente após o fim do estímulo estressor, um grupo de 40 animais foi submetido ao mesmo delineamento experimental do *experimento 1* até o fim do período de EA, quando foram expostos ao estresse agudo de contenção. Cinco minutos após o estresse, os animais foram submetidos à eutanásia conforme os experimentos anteriores.





Desenho experimental adotado no *experimento 1* (A), no *experimento 2* (B), no *experimento 3* (C) e no *experimento 4* (D). CA, teste em campo aberto; EA, enriquecimento ambiental; EMM, teste de extinção da memória de medo; LCE, teste em labirinto em cruz elevado; MP, moradia padrão

3.3 Procedimentos comportamentais e aparelhos utilizados

3.3.1 Enriquecimento ambiental

O ambiente enriquecido consiste em uma caixa moradia confeccionada em polipropileno com dimensões de 30 X 45 X 25 cm, dentro da qual foram inseridos diversos objetos remanejados, trocados e limpos regularmente (a cada 2 dias), dentre eles, bolas e brinquedos de plástico, objetos de madeira, escadas metálicas e plásticas, cordas penduradas, nós de cordas soltos, caixas de madeira, túneis de PVC e plataformas suspensas de madeira, plástico e metal, de diferentes tamanhos. O assoalho da caixa foi coberto com maravalha seca, regularmente trocada. Os animais foram acondicionados em grupos de 2, tal como os animais que viveram em caixas padrão, de forma a evitar que a atividade de interação social entre os animais de cada grupo variasse em decorrência do tamanho populacional.

3.3.2 Estresse Agudo por Contenção

O aparato utilizado para a contenção dos animais consiste em um cilindro de PVC opaco (marrom) de 20 cm de comprimento e 6 cm de diâmetro, com uma das extremidades fechadas e furos que permitem a circulação de ar. Quando contido, atentamos para que o animal não tivesse a suas fezes em contato com o corpo nem que a cauda permanecesse levantada, pois estes fatores poderiam causar um estímulo estressor mais intenso do que o desejado. Os animais ficaram contidos no aparato por um período de 1h ou 2h sob constante observação do experimentador.

3.3.3 Teste de ansiedade

Para verificarmos o comportamento do tipo ansioso nos animais, utilizamos o LCE e o CA.

3.3.3.1 LCE

O labirinto consiste de dois braços abertos (50 X 10 cm, sem paredes) disposto em posições opostas e dois braços fechados (50 X 10 cm, circundados por parede de 40 cm de altura), também em posições opostas, de tal forma que os braços abertos fiquem em posição perpendicular aos braços fechados, com um espaço central (10 x 10 cm) que conecte os quatro braços. O aparelho é constituído de material acrílico preto e permanece suspenso a 50 cm do assoalho através de suporte posicionado na base de cada braço (Insight Equipamentos, Pesquisa e Ensino, Ribeirão Preto, SP). Os testes foram realizados em sala com isolamento acústico e baixa luminosidade (8-10 lux). Todos os testes foram filmados por uma câmera de vídeo suspensa sobre o aparelho para posterior análise. Parte dos aniamais do *experimento 3* foi testada em uma aparato (com as mesmas dimensões) de detecção de movimento automatizada (Kinder Scientific, CA, EUA), conforme mencionado adiante.

Os animais de todos os grupos experimentais foram introduzidos individualmente no centro do labirinto, com o focinho voltado para o braço aberto, alternadamente entre o braço esquerdo e o braço direito, com total liberdade para poder percorrê-lo ao longo de 5 minutos. Os parâmetros analisados foram a frequência de entradas em braços abertos (razão entre o número de entradas nos braços abertos pelo número total de entradas nos braços, representada em porcentagem), a permanência nos braços abertos (razão entre o tempo despendido nos braços abertos pelo tempo total despendido nos braços, representada em porcentagem) e a distância total percorrida (M) pelos animais em todo o labirinto. Para a análise deste último parâmetro, foi utilizado o software EthoVision® (Noldus, Holanda). Baseados em Cohen et al. (2007), utilizamos uma análise adicional na qual faz-se uso dos parâmetros de frequência de entradas e taxa de permanência nos braços abertos descritos sob a forma de um índice, que varia entre os valores de 0 e 1, onde o aumento do índice indica um aumento do comportamento do tipo ansioso. O índice de ansiedade é descrito pela seguinte fórmula: 1 – [(tempo despendido nos braços abertos / tempo despendido nos braços abertos + tempo despendido nos braços fechados) + (número de entradas nos braços abertos / número de entradas nos braços abertos + número de entradas nos braços fechados) / 2]. A colocação das quatro patas foi o critério para definir a entrada do animal nos braços e/ou no quadrado central do labirinto. Os animais foram testados entre 8h00 e 12h00 e ao término de cada teste, o labirinto foi limpo com uma solução de álcool a 5% para minimizar a influência de eventuais odores deixados pelos animais. Os animais que caíram do labirinto foram excluídos do teste.

3.3.3.2 CA

O campo aberto consiste em uma área circular (60 cm de diâmetro) circundada por parede (50 cm de altura) por toda sua extensão. No centro da arena foi desenhado um circulo menor (30 cm de diâmetro), subdividindo a arena entre o compartimento central (com as margens afastadas 15cm da parede) e o compartimento periférico, margeando a parede da arena. Cada arena foi, ainda, subdividida em quadrantes com iguais dimensões (4 quadrantes no compartimento central e 8 quadrantes no compartimento periférico). Os animais dos grupos experimentais de interesse foram introduzidos no compartimento periférico da arena e permaneceram no aparato durante 5 minutos, com total liberdade para explorá-lo. Os parâmetros analisados foram o tempo total que o animal permaneceu no compartimento central (s), razão do número de quadrantes cruzados na arena central pelo número de quadrantes na arena periférica (representada em porcentagem) e o número total de quadrantes cruzados em toda a arena, independente do compartimento. Todo procedimento foi filmado por uma câmera de vídeo suspensa sobre o aparato para posterior análise. A colocação das quatro patas foi o critério adotado para definir a entrada em cada um dos quadrantes e/ou compartimentos. Assim como no LCE, os animais foram testados entre 8h00 e 12h00 e, ao término de cada teste, o aparato foi limpo com uma solução de álcool a 5%.

3.3.4 Extinção da memória de medo ao contexto (EMM)

Para a realização do ensaio destinado à avaliação do medo condicionado ao contexto foram utilizadas duas arenas distintas: uma caixa de condicionamento e uma arena neutra (arena não pareada, NP), no caso, uma caixa plástica com paredes em preto e tampa transparente (21 x 26 x 27,5 cm), ambas localizadas em sala de experimentação mantida em condições de temperatura e luminosidade iguais ao do biotério de acomodação. A caixa de condicionamento (28 x 26 x 23 cm) é composta por três paredes brancas, uma tampa e uma parede de acrílico transparentes, e uma base formada por barras metálicas condutoras de corrente elétrica disposta de forma linear (diâmetro de 0,4 cm e espaçamento entre elas de 1,05 cm) e conectadas a um gerador de choque elétrico (Insight Equipamentos, Pesquisa e Ensino, Ribeirão Preto, SP). No dia do treino (10 dias após o estresse agudo de contenção, conforme
delineamento experimental), cada animal foi introduzido, individualmente, na caixa de condicionamento pelo período de 2 minutos, seguido do estímulo incondicionado (EI), no caso choque nas patas. O EI foi composto por 1 sessão de choque (0,5mA) com duração de 1 segundo. Quinzes segundos após o fim do EI, os animais foram reconduzidos à suas respectivas gaiolas de acomodação. Vinte e quatro horas após o treino, os animais foram conduzidos ao primeiro teste de extinção da memória. Os animais foram introduzidos, individualmente, na arena de condicionamento, onde permaneceram por de 10 minutos, sem a presença do EI. Esse procedimento foi repetido por mais 5 vezes totalizando, portanto, 6 sessões de testes, com o mesmo intervalo de 24h entre eles. A medida de análise de comportamento de medo foi o tempo de congelamento (*freezing*), definido como uma completa imobilidade do animal, com ausência de movimento de vibrissas e de farejamentos (Fanselow e Bolles, 1979).

O grupo dos animais que foi direcionado à arena NP seguiu o mesmo procedimento, sendo acondicionado na arena NP com o mesmo intervalo de 24h após o condicionamento na arena pareada, seguida por mais 4 reexposições intervaladas de 24h. No último teste, porém, os animais foram introduzidos na arena de condicionamento (pareada). Esse controle foi realizado para verificarmos se as eventuais alterações na porcentagem de *freezing* dos animais são decorrentes da passagem do tempo ou fruto da exposição à arena condicionada sem a presença do EI. Espera-se que os animais NP, no teste 6 (último dia de teste), apresentem a mesma porcentagem de *freezing* que os animais pareados no teste 1 (primeiro dia de teste pós condicionamento). Todo o procedimento de treino e testes foi registrado por uma câmera de vídeo e a análise do comportamento foi realizada durante o treino (2 minutos antes do EI – pré-EI) e durante os primeiros 5 minutos de cada teste. Após a realização de cada ensaio, as caixas foram limpas com álcool 5% para evitar pistas olfatórias.

Um grupo adicional de animais foi submetido a diferentes intensidades de choque durante o treino de condicionamento para verificarmos um eventual efeito do estresse prévio na aquisição da memória de medo. Para tanto, os animais seguiram o mesmo delineamento do teste de EMM, porém foi realizado apenas um teste 24h após o treino de condicionamento (teste de aquisição). Diferentes grupos de animais (estressados ou não) foram submetidos a sessões de treino com choques de 1mA,

0,5mA, 0,25mA e 0,15mA. Os animais foram eutanasiados imediatamente após o teste de aquisição.

3.4 Inibição da síntese de CORT por Metirapona

Para a inibição da síntese de CORT, utilizamos Metirapona (2-Metil-1,2-di-3piridil-1-propanona; Sigma-Aldrich), conhecido inibidor da enzima 11β-hidroxilase, que converte a 11-deoxicorticosterona em corticosterona. A dose utilizada foi de 150 mg/kg de peso corporal, administrada via introperitoneal (i.p.), 1h antes da sessão de estresse de contenção. A dose foi baseada em referência a trabalho prévio (Perusine et al., 2016) e preparada em solução salina 0,9%/etanol 10%. Os animais controles receberam apenas a solução veículo (salina 0,9%/etanol 10%).

3.5 Procedimentos cirúrgicos e infusão das partículas virais no BLA

As partículas virais foram infundidas no BLA através de cirurgia estereotáxica. Os animais foram anestesiados com Isoflurano (4% de saturação em oxigênio para indução e 2-3% para manutenção) e acomodados no equipamento estereotáxico (Neurostar Neurosolutions, Kahnerweg, Alemanha). Após assepsia e exposição do crânio, pequenos orifícios foram feitos na superfície da caixa craniana com o auxílio de broca odontológica para a passagem da agulha injetora. As partículas virais foram injetadas através de agulhas de aço inoxidável acopladas a uma seringa Hamilton (10 μl, Hamilton Co., NV, EUA) fixada à torre do estereotáxico por meio de suporte apropriado. As injeções foram feitas bilateralmente no BLA, seguindo as coordenadas: A/P -2.5, M/L +/-5.0, D/V -7.1, mm relativos ao bregma e à superfície do encéfalo. Os vírus foram infundidos a uma taxa de 0.1µl/min durante 20 min (total de 2µl por sítio de injeção, totalizando 2000000 partículas virais). As agulhas permaneceram no local por 10 minutos antes de serem removidas. As injeções foram realizadas 4-6 dias antes do estresse, intervalo necessário para que ocorra a expressão máxima do gene de interesse (Russo et al., 2009). Apenas os animais com infecção viral bilateral no BLA foram considerados na análise comportamental. O método de confecção das partículas virais será descrito adiante.

3.6 Confecção dos vetores virais

Os vetores virais contendo o dominante negativo para GR (tdGR) e o gene repórter GFP (green fluorescent protein) foram confeccionados conforme previamente descrito (Kaufer et al., 2004; Kirby et al., 2012; Meyer et al., 2014). Trata-se de um híbrido composto pela subunidade alfa (α , proveniente do GR de rato; Genbank M14053), que se liga à CORT, fundida à subunidade beta (β , proveniente do GR humano; Genbank X03348), que se liga ao DNA. Embora roedores possuam a subunidade β , esta é um produto de *splicing* e não homologa à humana. Sendo assim, a subunidade β humana não é funcional no rato, por não se ligar ao elemento responsivo presente no genoma do rato (Otto et al., 1997). Assim, a CORT se liga à subunidade α, mas a subunidade β não é capaz de se ligar ao DNA, não havendo a transcrição gênica; dessa forma, o HSV-tdGR funciona como um "antagonista" genômico de GR (Kaufer et al., 2004). Herpes Simplex Virus (HSV) foi usado como base para os vetores. Resumidamente, células aderentes 2.2 foram transfectadas com o plasmídeo de interesse (contendo tdGR) ou apenas com o vetor associado à GFP como controle. A transfecção foi feita usando o reagente Lipofectamina LTX (Invitrogen). Vinte e quatro horas após a transfecção, as células foram superinfectadas com o Helper Virus 5dl1.2, com multiplicidade de infecção = 0.03. As células foram coletadas 48 horas depois, quando o efeito citopático do vírus alcança 100%. Os vírus foram então extraídos, concentrados e purificados. A titulação dos vetores foi quantificada em células Vero pela contagem das células que expressam a proteína GFP. Foi antingida uma titulação média de aproximadamente 1 x 10⁶ partículas virais por µl. O desenvolvimento do constructo, bem como os primeiros testes comportamentais com o seu uso, foram realizados no Massachusetts Institute of Technology (MIT) na modalidade de Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE, processo FAPESP 2015/15169-6, sob supervisão da Dra Ki Ann Goosens).

3.7 Eutanásia dos animais e obtenção do material a ser analisado

3.7.1 Decapitação por guilhotina, dissecção do BLA e coleta do sangue

Os animais foram profundamente anestesiados com Isoflurano (exposição máxima de 30s) e decapitados com o auxilio de guilhotina para roedores (Insight

Equipamentos, Pesquisa e Ensino, Ribeirão Preto, SP). O cérebro foi rapidamente retirado em solução fria de tampão salina-fosfato (NaCl 137 mM, KCl 2,68 mM, KH₂PO₄ 1,27 mM, Na₂HPO₄ 8,06mM). O BLA foi dissecado bilateralmente sobre uma placa de vidro gelada e congelado em tubo cônico (1,5 ml) em gelo seco. As estruturas encefálicas foram estocadas a –80 °C para uso posterior. Para auxiliar a dissecção do BLA, os encéfalos foram acondicionados em uma matriz encefálica acrílica de corte coronal de espessura de 1 mm (Zivic Laboratories Inc., PA, EUA), própria para dissecção de estruturas pequenas em tecido fresco, e a dissecção foi feita sob um estereomicroscópio (Tecnival – Prolab, São Paulo, SP). O sangue dos animais foi obtido a partir da coleta do tronco do animal no momento da decapitação, com o auxilio de um funil de vidro, em tubo *falcon* (15 ml).

3.7.2 Perfusão transcardíaca

Os animais foram profundamente anestesiados com uma solução de cloridrato de cetamina (Syntec, São Paulo, Brasil; 9 mg/100 g, i.p.) e xilazina (Syntec, São Paulo, Brasil; 1 mg/100g, i.p.) e perfundidos transcardiacamente, utilizando-se uma bomba peristáltica (Cole Parmer, Vernon Hills, IL, EUA), com 200ml de solução salina a 0,9 % seguida por cerca de 500 ml de solução de formaldeído a 4% em tampão fosfato de sódio (pH 7,4) a 4 °C, durante 20 minutos. Após 3 horas, os encéfalos foram removidos da caixa craniana e mantidos em solução de sacarose a 30% em tampão fosfato de potássio (0,02M) a 4°C por 48h. Após esse período de crioproteção, os encéfalos foram removidos da solução de sacarose e congelados a -80 °C até o processamento histológico.

3.8 Processamento do material biológico

3.8.1 Análise da concentração de corticosterona no sangue

Para a análise dos níveis sanguíneos de CORT, utilizamos o kit *Corticosterone EIA kit* (Enzo Life Sciences, Inc, Reino Unido), de acordo com a orientação do fabricante. O soro dos animais foi obtido a partir da coleta de sangue do tronco do animal no momento da decapitação, com o auxilio de um funil de vidro, em um tubo *Falcon*, após centrifugação a 4.000 g por um período de 10 minutos. De parte dos animais foi obtido o plasma sanguíneo com o intuito de se realizar análises futuras de outros mediadores endócrinos. Para tanto, o mesmo procedimento foi utilizado, adicionando-se EDTA (4.5 mM) ao sangue coletado antes de centrifugação. As amostras de soro foram diluídas 30 vezes em tampão de ensaio fornecido pelo kit para que se ajustassem à faixa ótima da curva padrão.

3.8.2 Extração de proteínas citosólicas e nucleares

Os tecidos de BLA armazenados a -80 °C foram descongeladas e homogeneizadas por atrito com pilão plástico cônico (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) dentro de microtubo de 1,5 ml, em tampão de lise (10 mM HEPES; 1,5 mM MgCl₂; 10 mM KCl; 0,1 mM Ditiotreitol e água bidestilada), suplementado com inibidores de protease e fosfatase (Halt Protease Inhibitor Cocktail, ThermoFisher Scientific, MA, EUA), seguida de centrifugação a 11.000 g por 30s a 4 °C. O sobrenadante, contendo proteínas citoplasmáticas, foi coletado em tubo e armazenado a -80 °C. O pellet foi, então, ressuspendido em tampão de extração nuclear (20 mM HEPES; 1,5 mM MgCl₂; 300 mM NaCl; 0,25 mM EDTA; 25% glicerol e água bidestilada), suplementado com inibidores de protease e fosfatase (Halt Protease Inhibitor Cocktail, ThermoFisher Scientific, EUA), e incubado por 30 minutos em gelo. Após o período e incubação, o extrato foi centrifugado a 20.000 g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante, contendo as proteínas nucleares, foi recolhido em tubo e estocado a -80 °C. As amostras citoplasmáticas e nucleares permaneceram congeladas até o período em que foi realizada a quantificação da concentração de proteínas.

3.8.2.1 Determinação da concentração de proteínas

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

3.8.3 Ensaio de Western Blot para expressão de GR

O ensaio de Western blot utilizado foi baseado no descrito por Laemmli (1970). As proteínas foram ajustadas na quantidade de 5 ou 10 µg com o tampão de amostra (0,125 M tris-HCl; 4 % de SDS; 20 % v/v glicerol; 0,2 M de DTT; 0,02 % de bromophenol blue; pH 6,8) e fervidas por 5 minutos a 95 °C. O conteúdo total do meio de reação foi aplicado no gel de SDS-poliacrilamida 10% (acrilamida/bisacrilamida (37,5:1), 10 % SDS) para que ocorresse a separação das proteínas contidas na amostra. No mesmo gel foi adicionado um padrão de peso molecular. Para a eletroforese, foi utilizado um tampão de corrida consistindo em 25 mM de tris-base, 0,192 M de glicina e 0,1 % de SDS. O gel foi corrido por volta de 2 horas a 90 V. Ao final da corrida, as proteínas separadas e contidas no gel foram transferidas eletroforeticamente para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad Laboratories, Inc, CA, EUA), ou PVDF (Millipore corporation, MA, EUA) por aproximadamente 2h a 400mA. Para a transferência foi utilizado um tampão contendo 25 mM de tris-base, 192 mM de glicina, 20 % de metanol e água bidestilada. Após a transferência, as membranas foram coradas com solução de vermelho de Ponceau (0,5% Ponceau-S; 5% ácido tricloro acético e água bidestilada), lavadas com água até tirar todo o excesso da solução corante e deixadas por 2h à temperatura ambiente em uma solução contendo TBS (100 mM tris-base; 0,9 % NaCl e água bidestilada), 5 % de leite desnatado e 0,1 % de tween 20 para bloquear ligações inespecíficas com o anticorpo. Após essa etapa, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário (anti-GR, feito em coelho, 0,2 µg/ml; Santa Cruz Biotechnology Inc., EUA) diluído em TBS-T (TBS; 0,1 % Tween 20) "overnight" a 4 °C. As membranas foram, então, lavadas 5 vezes com TBS-T e incubadas com o anticorpo secundário (anti-coelho, feito em cabra, o,o5 µg/ml; KPL Inc., EUA) por 2 horas. Para a normalização da expressão de GR, foi utilizada como controle constitutivo a expressão de α -tubulina (anti α -tubulina, feito em camundongo, 0,04 µg/ml; Santa Cruz Biotechnology Inc., EUA – anticorpo secundário anti-camundongo, feito em cabra, 0,05 µg/ml; KPL Inc., EUA).

3.8.3.1 Visualização e análise das imagens

Após 5 lavagens com TBS-T, a visualização das bandas foi obtida após reação com o kit de quimioluminescência ECL-Amersham (General Eletric Company, MA, EUA) e a revelação em fotodocumentador ChemiDoc Imager (Bio-Rad Laboratories, Inc, CA, EUA). A análise da densidade óptica das bandas (quantidade de pixels cinzas por área, expressa em unidades arbitrárias) foi realizada com o auxílio do programa Image Lab 5.2 (Bio-Rad Laboratories, Inc, CA, EUA). A expressão relativa de GR, tanto no compartimento citoplasmático quanto no compartimento nuclear, foi determinada pela razão da densidade óptica das bandas indicativas da expressão de GR pela densidade óptica das bandas indicativas de expressão de α -tubulina. A translocação nuclear de GR foi medida pela razão da expressão do receptor no compartimento nuclear (já normalizada pela expressão da α -tubulina) pela expressão do receptor no compartimento citoplasmático (já normalizada pela expressão da α tubulina).

3.8.4 Processamento do material histológico

3.8.4.1 Imunoistoquímica e imunofluorescência

Os encéfalos foram seccionados em criostato (Leica CM3050-S, Leica Biosystems, Alemanha) em plano coronal, a -22 °C, a uma espessura de 40 µm e armazenados em quatro compartimentos em solução anticongelante (constituída de tampão fosfato de sódio 0,05 M, 150 g de sacarose e 300 ml de etilenoglicol) a -20 °C. Para a visualização da expressão de FosB no BLA e no córtex pré-frontal medial (CPFm), foi realizado o seguinte procedimento de imunoistoquímica: as fatias dos encéfalos foram incubados em solução de bloqueio (solução de fosfato de potássio 0,02 M contendo triton X-100 a 0,3% e albumina bovina a 1%) seguido de incubação em solução de bloqueio contendo o anticorpo primário anti-FosB obtido em coelho (diluição 1:1000; Santa Cruz, EUA) por 65h. Os cortes foram, então, incubados em uma solução de fosfato de potássio 0,02 M contendo um anticorpo biotinilado anticoelho feito em burro (dilução 1:200; Vector, EUA) e triton X-100 a 0,3% por 2h. O complexo antígeno-anticorpo foi visualizado com a técnica da biotina avidina (kit Elite; Vector, NY, EUA) e 3,3'-diaminobenzidina (DAB) como cromógeno, através de reação de peroxidase composta por solução de 2,5% de sulfato de níquel e 0.003% de peróxido de hidrogênio em tampão fosfato de potássio 0,02M. Os cortes foram

montados em lâminas gelatinizadas, secos à temperatura ambiente, desidratados com álcool, diafanizados com Xilol (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP) e recobertos com lamínula usando-se DPX (Sigma-Aldrich, MO, EUA) como meio de montagem.

Embora os vetores virais utilizados já carreiem o gene que codifica a expressão de GFP, foi realizado um procedimento de imunofluorescência para intensificar o sinal e permitir uma melhor visualização da expressão das partículas no BLA. Os procedimentos de bloqueio, incubação no anticorpo primário e secundário seguiram conforme realizado no procedimento de imunoistoquímica, com algumas alterações. Os cortes foram incubados em solução com o anticorpo primário (anti-GFP feito em coelho, diluição 1:5000; Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) "overnight" e foi utilizado um anticorpo secundário conjugado a um fluorocromo (AlexaFluor 488 anti-coelho feito em burro, diluição 1:500, Thermo Fisher Scientific, MA, EUA). Após incubação na solução com o anticorpo secundário, os cortes foram montados em lâminas positivamente carregadas (Fisherbrand Superfroast Plus, Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) e recobertos com lamínula utilizando-se Fluoromount-G (SouthernBiotech, PA, EUA) como meio de montagem. Para a visualização da sublocalização de GR nas células do BLA, os mesmos procedimentos foram adotados. Para tanto, foram utilizados os anticorpos primários anti-GR (feito em coelho, diluição 1:1000; Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA) e anti-MAP2 (feito em camundongo, diluição 1:1000; Sigma-Aldrich, MO, EUA). Os anticorpos secundários utilizados foram AlexaFluor 488 anti-coelho (diluição 1:500) e e AlexaFluor 594 anti-camundongo (diluição 1:500).

3.8.4.2 Coloração de Golgi

A coloração de Golgi foi feita utilizando-se o Kit FD Rapid GolgiStain (FD Neurotechnologies, MD, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Após a decapitação por guilhotina, os encéfalos foram removidos da caixa craniana e, com o auxílio de uma matriz encefálica (Zivic Laboratories Inc., Portesville, P.A., EUA), foi feita uma fatia de 5 mm de espessura no encéfalo no plano coronal, a partira do fim do quiasma óptico (na dimensão antero-posterior). As fatias, contendo o BLA, ficaram imergidas em solução de impregnação (solução A e B) por 14 dias, período após o qual foram transferidas para a solução de crioproteção (solução C). Após 48h, os tecidos foram congelados a – 80 °C até uso posterior. Secções coronais (120 µm de

espessura) foram realizadas em criostato a – 22 °C (Leica CM3050-S, Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha) e montadas em lâminas previamente revestidas com gelatina (0,5%). Após secarem, os cortes foram reidratados em água destilada, imersos em solução de coloração (D e E), desidratados com álcool, diafanizados com Xilol e recobertos com lamínula usando-se DPX como meio de montagem.

3.8.5 Análise do material histológico

As imagens de campo claro e fluorescência foram obtidas em microscópio Nikon Eclipse 80i (Nikon Instruments Inc., Japão). As imagens de confocal foram obtidas em microscópio Nikon A1R+ (Nikon Instruments Inc., Japão), com fracionamento de 0,5 µm. A contagem de células positivas para FosB no BLA e CPFm foi feita a partir de imagem capturada em campo claro com magnificação de 10x (BLA) e 20x (CPFm), salvas em TIF. Com o auxílio do software ImageJ (Image Processing and Analysis in Java, National Institutes of Health, MD, EUA), as estruturas foram delimitadas (mesma dimensão para todos os casos) e as células com marcação positiva foram contadas manualmente. Foram contados 4 cortes, bilaterais, para cada estrutura analisada por animal (8 replicatas). A média das replicatas foi utilizada como valor de comparação entre os animais.

Para a análise do material histológico corado com a técnica de Golgi, imagens compreendendo todo o BLA foram obtidas em campo claro com o microscópio *Slides Scanner Zeiss Axio Scan.Z1* (Carl Zeiss CA, Oberkochen, Alemanha), usando uma objetiva de 40x. Para obter diferentes pontos focais, foi realizado um fracionamento de 0,41 µm no plano z. As imagens foram analisadas no *software* ZEN 2 (Carl Zeiss CA, Oberkochen, Alemanha) com magnificação digital de 600x. Foram utilizados para análise 80 neurônios (5 por cada animal, 4 animais por grupo experimental) completamente corados, estrelados ou em formato piramidal (McDonald, 1982, apud Klenowski et al., 2015), com o soma localizado no BLA, e cujos dendritos não encontravam-se sobrepostos. Após a identificação do soma celular, foram identificados como dendritos primários, aqueles que emergem de dendritos primários foram classificados como secundários, os terciários emergem do segmento secundário e os quaternários emergem do segmento terciário. Cada dendrito teve seu comprimento mensurado através do software ZEN 2 (Carl Zeiss CA, Oberkochen,

Alemanha). Qualquer protrusão oriunda dos dendritos, independentemente de suas características morfológicas, foi contada como espinho. A densidade de espinhos dendríticos dos neurônios do BLA foi calculada através da razão entre o número de espinhos dendríticos contados em determinado segmento pelo comprimento desse segmento. A densidade de espinho de cada neurônio foi determinada pela média da densidade de cada dendrito, organizados por segmento. A densidade de espinho dendrítico do BLA de cada animal foi determinada pela média da densidade do total de neurônios analisados. O mesmo aplicou-se para o comprimento total dos dendritos e para o número total de bifurcações.

3.9 Cultura primária de tecido cortical

Ratos neonatos, entre 1 e 4 dias de idade, foram sacrificados por decapitação e em seguida foi realizada a dissecção do córtex frontal em meio estéril (tampão Hanks: 160 mM de NaCL, 5,3 mM de KCl, 0,44 de Kh₂PO₄, 0,33 mM de Na₂HPO₄, 5,5 mM de glicose, 4,0 mM de NaHCO3; Labsynth, Diadema, SP) acrescido de antibióticos (penicilina / estreptomicina, Invitrogen, Grand Island, NY, EUA), em pH 7,4. O córtex frontal isolado foi mantido em solução de tripsina a 0,05% (Vitrocell, Campinas, SP) e DNAse a 0,001% (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) a 37 °C por 10 minutos em tampão Hanks, para digestão enzimática e depois transferido para o meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEN; Vitrocel, Campinas, SP) acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB, Vitrocel, Campinas, SP) e 2 mM de glutamina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA), onde foi gentilmente triturado mecanicamente com o auxílio de pipeta Pasteur. As células contidas nessa solução foram filtradas em membrana de 70 μM (Becton-Dickinson, NJ, EUA), plaqueadas em placa de 24 poços e mantidas a 37 °C com 5% de CO2 em atmosfera umidificada (umidade relativa do ar de 80%) em incubadora. Para realizar o ensaio de imunofluorescência, as células foram plaqueadas em lamínulas de boro-silicato recobertas com poli-L-lisina (0,01%, Sigma-Aldrich, MO, EUA) em placa de 24 poços. Para permitir o cálculo da quantidade de partículas virais necessárias para uma infecção eficiente, foi realizada contagem do número de células antes do plaqueamento, utilizando-se o método de exclusão por Azul de Tripan (Sigma-Aldrich, MO, EUA). As células foram mantidas em DMEN suplementado com antibióticos e 10% de SFB. O meio foi trocado no segundo e quinto dias após o plaqueamento e as células foram mantidas até o décimo dia.

3.9.1 Infecção das células pelas partículas virais e análise da sub-localização e atividade genômica de GR

Para verificar o tráfego do receptor modificado tdGR nos compartimentos celulares, em resposta à CORT, no oitavo dia de cultura as células foram infectadas com as partículas virais (HSV-tdGR e HSV-GFP, relação de 1 partícula viral por célula presente na cultura) diluídas em meio de cultura (DMEN + 2% de SFB). Quarenta e oito horas depois (décimo dia de cultura), as células foram tratados com CORT a 10 µM em meio de cultura (DMEN + 2% de SFB) por 1h. Em seguida, o meio foi removido e as lamínulas foram lavadas com PBS e, então, fixadas com formaldeído a 4% (Amresco, Fountain Parkway Solon, OH, EUA) por 20 minutos à temperatura ambiente. Após 5 lavagens com PBS, as células aderidas às lamínulas foram incubadas em solução de bloqueio (5% de soro de jumento, 0,05% de Triton X-100 em PBS) por 2h em temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram incubadas em solução de bloqueio contendo o anticorpo primário anti-GR (1:1000, Santa Cruz, CA, EUA) por 24h e, em seguida, após lavagens com PBS, incubadas em PBS contendo o anticorpo secundário (AlexaFluor 594, 1:2000) e Triton X-100 a 0,05% por 2h. Finalmente, as lamínulas foram incubadas em solução com DAPI (1:100000, Sigma-Aldrich; PBS com 0,05% de Triton X-100) por 20 minutos, lavadas com PBS e montadas em lâminas em meio de montagem Fluoromount-G (SouthernBiotech, EUA). As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência, conforme descrito anteriormente.

Para a análise da atividade genômica de GR nas células infectadas por tdGR, foi realizado o ensaio de reação em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação dos genes *gilz* e *fkbp5*, descrito adiante. As células foram obtidas utilizando-se o mesmo protocolo para a análise de imagem, porém as células não foram plaqueadas em lamínulas. Ao final do tratamento com CORT, as células foram lavadas 5 vezes com PBS e coletadas em TRIzol® (0,75 µl por amostra; Thermo Fisher Scientific, MA, EUA). A extração do RNA seguiu conforme orientação do fabricante.

3.10 Ensaio de PCR

3.10.1 Extração de RNA

Após solubilização das células em TRIzol®, foram adicionados 175 μ I de clorofórmio em cada amostra, seguindo-se para incubação à temperatura ambiente por 3 minutos. As amostras, então, foram centrifugadas a 12000 g por 15 minutos à 4 °C, formando-se 3 fases. A primeira fase, que contém o *RNA* total, foi transferida para outro tubo, onde foi adicionado 5 μ g de glicogênio *RNase-free* e, posteriormente, 0,5 ml de álcool isopropanol para a precipitação do *RNA*. As amostras ficaram incubadas à temperatura ambiente por 10 minutos e, posteriormente, foram centrifugadas a 12000 g por 10 minutos a 4 °C. Após descartar o sobrenadante, ao *pellet* resultante foi adicionado 1 ml de etanol a 75%, seguido de agitação vigorasa em vortex e de centrifugação a 7500 g por 5 minutos a 4 °C. Após descartar o sobrenadante, o *pellet* foi seco à temperatura ambiente e, em seguida, diluído em àgua DEPC (20 μ I) e estocado a -80 °C. Uma pequena alíquota 2 μ I do *RNA* foi separada para quantificação por espectrofotometria no aparelho Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader (BioTek instruments, Inc, EUA), nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm.

3.10.2 Transcrição reversa

Para o procedimento de transcrição reversa e obtenção do *cDNA*, foi utilizado o Kit SuperScript III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) e seguido os passos conforme orientação do fabricante. Para a reação, foram utilizados 12 µl de solução final, contendo 5 µg de *RNA*, 1 µl de dNTPs (0,5nM cada), 1 µl de Random Primer, 5 µg de *RNA* total e o restante de água estéril. As amostras foram incubadas por 5 minutos a 70 °C e, em seguida, foi adicionado à solução 8 µl de da solução Mix, resultando em um volume final de 20 µl. Após incubação de 10 miutos a 25 °C, as amostras foram incubadas a 42 °C por 70 minutos, seguido de aquecimento a 70 °C por 15 minutos para a denaturação da enzima.

3.10.3 Reação de amplificação e corrida em gel de agarose

Para a reação de PCR, foram adicionados em um microtubo 2 µl do cDNA (20 ng/µl), 5 µl de Amp Buffer, 0,75 ul MgCl₂, 0,5 µl de dNTPs, 1,5 µl do *primer foward* e 1,5 µl do *primer reverse*, 0,5 µl de de Taq Polimerasa (Promega Co., WI, EUA) e agua milliQ (Merck Millipore, MA, EUA) suficiente para 25 µl. As condições de reação no termociclador (LifeECO, Bulldog Bio, Inc; NH, EUA) foram: 95 °C por 2 minutos iniciais, seguido por 30 ciclos a 95 °C por 1 minuto, 55 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto. Após o último ciclo, as amostras permaneceram por 5 minutos a 72 °C. O produto foi analisado por meio de eletroforese em gel de agarose (2%), corado com BlueGreen (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) visualizado com transiluminador UV (ChemiDoc Imager; Bio-Rad Laboratories, Inc, CA, EUA). As sequência dos primers utilizados seguem abaixo:

gapdh: *foward*, 5'-GGTGTGAACGGATTTGGC-3'; *reverse*, 5'-CTGG-AAGATGGTGATGGGTT-3';

gilz: foward, 5'-TGGGGCCTAGTAACACCAAG-3'; reverse, 5'-GAGCACACTGGCATCACATC-3'

fkbp5: *foward*, 5'-GAACCCAATGCTGAGCTTATG-3'; *reverse*, 5'-ATGTACTTGCCTCCCTTGAAG-3'.

3.11 Análise estatística dos resultados

As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram detectadas por análise de variância (ANOVA) de dois critérios seguida pelo pós-teste de comparações múltiplas de Tukey. Comparações entre dois grupos experimentais foram feitas por teste *t* ou Mann-Whitney. Foram adotados valores para p < 0.05 como estatisticamente significantes. Ainda, utilizamos a estatística descritiva para obtenção de médias e erro padrão da média. Para a análise da distribuição amostral, foi feito o teste de normalidade de D'Agostino & Pearson. Para Todas as análises foram realizadas no programa GraphPad Prism para Windows versão 7 (GraphPad Software, CA, EUA www.graphpad.com).

4 RESULTADOS

4.1 EA protege contra ansiedade manifestada 10 dias após estresse agudo de Contenção

Ao analisarmos os resultados obtidos, de acordo com o delineamento proposto no experimento 1, concluímos que 1h de estresse de contenção não promoveu comportamento do tipo ansioso mensurado 10 dias após. Conforme apresentado na figura 2, os animais acomodados em moradia padrão (MP) não estressados e estressados exploraram os braços abertos em igual magnitude, tanto para os parâmetros de frequência de entradas nos braços abertos quanto para o tempo de permanência nos mesmos (Fig. 2, A; teste t bicaudal, p = 0,6221 e p = 0,7153, respectivamente). Já os animais MP que foram submetidos a 2h de estresse de contenção, por sua vez, apresentaram significativa redução na porcentagem de entradas (Fig. 2, B) e tempo de permanência (Fig. 2, C) nos braços abertos em relação ao grupo não estressado. Por outro lado, os animais que sofreram o mesmo estresse, porém que foram previamente acondicionados em ambiente enriquecido (EA), apresentaram maior frequência de entradas e tempo de permanência nos braços abertos quando comparados aos animais MP estressados, sem apresentarem diferenças na exploração dos braços abertos quando comparados aos animais MP não estressados (Fig. 2 B; C), sugerindo que o enriquecimento ambiental, aplicado previamente ao estímulo estressor, protegeu os animais em relação ao comportamento do tipo ansioso manifestado 10 dias aós o estresse agudo de contenção de 2h. Ademais, os animais EA não estressados não apresentaram diferença estatisticamente significante na exploração dos braços abertos comparados aos animais MP não estressados e EA estressados, porém esta exploração foi maior quando comparados aos animais MP estressados (Fig. 2, B; C), indicando que o EA, por si, não provocou aumento da taxa de exploração dos braços abertos, mas sim modifica o curso da resposta do animal frente ao estresse agudo no que diz respeito a seu efeito ansiogênico, verificado após 10 dias. O índice de ansiedade apresentado por cada um dos grupos experimentais corroborou os dados acima, sendo maior nos animais MP estressados em comparação aos demais grupos (Fig. 2, D). A análise do deslocamento total dos animais no labirinto mostrou que não houve diferença na média de deslocamento total entre os quatro grupos experimentais (Fig. 2, E),

confirmando que o estresse agudo por contenção e o EA não provocaram alterações na atividade locomotora dos animais.

Para a variável porcentagem de entradas nos braços abertos, a ANOVA de dois critérios apontou efeito significante para os fatores estresse [F(1, 45) = 15,50, p = 0,0003], moradia [F(1, 45) = 22,15, p < 0,0001] e interação de ambos [F(1, 45) = 6,747, p = 0,0126)]. Para a variável permanência nos braços abertos, a ANOVA de dois critérios indicou efeito significante para os fatores estresse [F(1, 45) = 10,00, p = 0,0028] e moradia [F(1, 45) = 7,091, p = 0,0107], sem interação de ambos [F(1, 45) = 2,289, p = 0,1373]. Em relação à variável índice de ansiedade, a ANOVA de dois critérios revelou um efeito significante para os fatores estresse [F(1,46) = 13,00, p = 0,0008], tipo de moradia [F(1,46) = 13,71, p = 0,0006] e interação de ambos [F(1,46) = 4,080 p = 0,0492].

Adicionalmente, o teste de campo aberto confirmou o efeito protetor do EA na ansiedade tardia induzida por estresse. O teste Mann-Whitney bicaudal mostrou que animais previamente enriquecidos e que foram estressados permaneceram, 10 dias depois do estresse, maior tempo (p = 0,0070; Fig. 2, F) e deslocaram-se mais (p = 0,0372; Fig. 2, G) no centro da arena quando comparados a animais estressados, porém não enriquecidos. Conforme verificado previamente no LCE, tanto o estresse quanto o EA não influenciam na atividade motora dos animais, uma vez que não houve diferenças no total de quadrantes cruzados na arena entre os diferentes grupos de animais (p = 0,7657; Fig. 2, H).

Figura 2 - EA protegeu contra a persistência do comportamento do tipo ansioso induzido por 2h de estresse de contenção.



Uma hora de estresse de contenção não alterou, 10 dias depois, a exploração dos braços abertos no LCE (A). Duas horas de estresse de contenção promoveu, em animais acomodados em moradia padrão (MP), 10 dias depois, redução na frequência de estradas (B) e tempo de permanência (C) nos braços abertos em comparação aos animais MP não estressados. Animais enriquecidos (EA), tanto estressados quanto não estressados, apresentaram exploração dos braços abertos similar a dos animais MP não estressados, porém maior do que a dos animais MP estressados (B, C). Índice de ansiedade mostrou, no LCE, comportamento do tipo ansioso maior nos animais MP estressados guando comparados a animais MP não estressados e animais EA, estressados ou não (D). EA, estresse ou ambos não alteraram, 10 dias após, a atividade locomotora dos animais no LCE (E). O teste de campo aberto também mostrou que exposição prévia ao EA preveniu o desencadeamento do comportamento do tipo ansioso 10 dias após o estresse. Animais MP estressados ficaram menos tempo (F) e deslocaram-se menos (G) na região central do campo aberto quando comparados aos animais EA estressados. Não foi observada diferença no deslocamento total entre os animais MP e EA no campo aberto (H). ANOVA de dois critérios seguido pelo pósteste de comparações múltiplas de Tukey (B-E) e teste t bicaudal não pareado (A, F-H). Diferenças estatisticamente significantes entre grupos são indicadas por * (p<0,05), ** (p<0,01), *** (p<0,001) e **** (p<0,0001). n= 9 por grupo (A), 10-14 por grupo (B-E) e 12 por grupo (F-H).

4.2 EA previne o aumento da densidade de espinhos dendríticos do BLA induzido por estresse agudo de contenção

Com o intuito de verificar se o efeito protetor comportamental exercido pelo EA tem alguma relação com as alterações morfológicas induzidas pelo estresse agudo nos neurônios do BLA, nós verificamos alguns parâmetros morfológicos da árvore dendrítica dessa estrutura. Conforme ilustrado na Figura 3 (A), a exposição ao estresse agudo de contenção aumentou, 10 dias após, a densidade dos espinhos em todos os segmentos dendríticos analisados, tanto nos animais MP quanto nos animais EA. Já em ralação aos demais parâmetros analisados, nós não verificamos diferenças no comprimento total dos dendritos (Fig. 3, B) e no número de bifurcações (Fig. 3, C), tanto nos animais MP quanto EA, estressados ou não. Em relação à densidade de espinhos dendríticos, a ANOVA de dois critérios revelou um efeito significante do estresse para cada segmento dendrítico [F(1, 12) = 16,89, p = 0,0014 para segmentoprimário; F(1, 12) = 64,25, p < 0,0001 para segmento secundário; F(1, 12) = 80,62, p < 0,0001 para segmento terciário; F(1, 12) = 90,76, p < 0,0001 para segmento quaternário; F(1, 12) = 132,9, p < 0,0001 para todos os segmentos], enquanto não houve efeito significante para o tipo de moradia [F(1, 12) = 0.3362, p = 0.5727 para o segmento primário; F(1, 12) = 0,1044, p = 0,7521 para o segmento secundário; F(1, 12) = 0,1474, p = 0,7077 para o segmento terciário; F(1, 12) = 0,1621, p = 0,6943 para o segmento quaternário; F(1, 12) = 0,1273, p = 0,7275 para todos os segmentos] ou

para a interação de ambos [F(1, 12) = 1,170, p = 0,3007 para o segmento primário; F(1, 12) = 2,161, p = 0,1672 para o segmento secundário; F(1, 12) = 4,185, p < 0,0633 para o segmento terciário; F(1, 12) = 0,02568, p = 0,8753 para o segmento quaternário; F(1, 12) = 2,654, p = 0,1292 para todos os segmentos].

Figura 3 - EA não preveniu o aumento da densidade de espinhos dendríticos no BLA induzido por estresse agudo.



Animais estressados, independente se acomodados em moradia padrão (MP) ou enriquecimento ambiental (EA), apresentaram maior densidade de espinhos em todos os segmentos dendríticos dos neurônios do BLA quando comparados a animais não estressados (A). Tanto o estresse quanto o tipo de moradia não alteraram o comprimento total dos dendritos (B) nem o total de bifurcações dendríticas (C) dos neurônios do BLA. Imagens representativas do segmento secundário de neurônios do BLA dos diferentes grupos experimentais (barra de escala: 10 μ m; D). ANOVA de dois critérios seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas de Tukey. n=4 por grupo. Diferenças estatisticamente significantes entre os grupos são indicadas por * (p<0,05), *** (p<0,001) e **** (p<0,0001) em comparação ao grupo MP; # (p<0,05), ## (p<0,01), #### (p<0,001) e ##### (p<0,0001) em comparação ao grupo EA. EA, enriquecimento ambiental sem estresse; EA-Est, enriquecimento ambiental com estresse.

4.3 Comportamento do tipo ansioso manifestado 10 dias após o estresse não está atrelado a alterações nos níveis séricos de corticosterona e à atividade de GR no BLA

Tendo isso em vista, e conforme delineamento proposto no experimento 1 (Fig. 1, A) decidimos verificar se 10 dias após o estímulo estressor, após a submissão dos animais ao teste no LCE, há diferenças nas concentrações séricas do hormônio entre os diferentes grupos experimentais, com vistas a observar não só se o estresse agudo promove uma alteração de longo prazo no eixo HPA, mas também se o efeito protetor do EA está relacionado, de alguma forma, à modulação do mesmo eixo ou da atividade nuclear de GR no BLA. Nossos achados mostraram que não houve diferença nas concentrações séricas de CORT entre os 4 grupos experimentais, sugerindo que nem o estresse agudo, tampouco a exposição ao EA, modificam a cinética de liberação do hormônio frente ao estresse de exposição à novidade, no caso, o LCE (Fig. 4, A). Da mesma forma, verificamos que não houve alterações na translocação nuclear de GR no BLA dos animais dos 4 grupos experimentais analisados (Fig. 4, B). A ANOVA de dois critérios não apontou efeito significante sobre as concentrações séricas de CORT e sobre a translocação nuclear de GR do estresse [F(1, 34) = 2,523,p = 0,1215 e F(1, 8) = 0,1384, p = 0,7195, respectivamente], do tipo de moradia [F(1, 34) = 0,1678, p = 0,6846 e F(1, 8) = 0,1614, p = 0,6984, respectivamente] e da interação de ambos [F(1, 34) = 0,1634, p = 0,6885 e F(1, 8) = 0,02421, p = 0,9902, respectivamente].

Figura 4 - EA e estresse de contenção de 2h não alteram, 10 dias depois de cada estímulo, as concentrações séricas de CORT e a translocação nuclear de GR no BLA.



Concentrações séricas de CORT (A) e translocação nuclear de GR (B) não estão alterados nos animais MP estressados e EA (estressados e não estressados) em relação aos animais MP não estressados. ANOVA de dois critérios; n=8-12 por grupo em B e n=3 por grupo em C. EA, enriquecimento ambiental sem estresse; EA-Est, enriquecimento ambiental com estresse; MP, moradia padrão sem estresse; MP-Est, moradia padrão com estresse.

4.4 As concentrações séricas de CORT não estão modulados pelo EA imediatamente após o estresse de contenção.

As concentrações séricas de CORT analisadas 10 dias após o estresse indicaram que o histórico de estresse agudo de contenção ou de EA não modulam a liberação do hormônio na situação de novidade, no caso, o LCE. Imediatamente após o estímulo estressor, conforme proposto no delineamento experimental e ilustrado na Figura 5 (A), animais estressados, independentemente do tipo de moradia, apresentaram elevados níveis séricos de CORT (Fig. 5, B), indicando que o EA prévio não altera a liberação do hormônio pelo estresse agudo de contenção de 2h. Esse dado confirma achado prévio do grupo. A ANOVA de dois critérios revelou efeito significante do estresse [F(1, 34) = 35,51, p < 0,0001], porém não do tipo de moradia [F(1, 34) = 0,09052, p = 0,7654] e da interação estresse-tipo de moradia [F(1, 34) = 0,3852, p = 0,5390].





Representação esquemática do delineamento experimental adotado em B (A). Animais estressados (tanto MP quanto EA) apresentaram, imediatamente após o estresse, concentrações séricas de CORT maiores do que dos animais não estressados. ANOVA de dois critérios seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas de Tukey. n=9-10 por grupo. Diferenças estatisticamente significantes entre grupos são indicadas por ** (p<0,01) e *** (p<0,001).

4.5 Inibição da síntese de CORT durante o estresse previne o desenvolvimento do comportamento do tipo ansioso avaliado 10 dias após

Muito embora não tenhamos visto, 10 dias após o estresse, diferenças tanto na liberação de CORT nos animais enriquecidos quanto na sinalização de CORT via GR no BLA desses animais, considerando trabalho do grupo que mostrou que o efeito protetor do EA imediatamente após o estresse deve-se à alteração da sinalização desse hormônio no BLA via GR (Novaes et al., 2017), decidimos verificar se o efeito tardio (10 dias após o estresse) no comportamento ansioso desencadeado por estresse agudo é dependente da sinalização de CORT no momento em que ocorre o estresse. Além disso, é sabido que não só o estresse agudo, mas também a elevação

aguda das concentrações séricas de CORT promove tardiamente (10-12 dias após) comportamento do tipo ansioso e o aumento na densidade dos espinhos dendríticos do BLA. Conforme proposto no experimento 2 (Fig. 1, B), na seção "material e métodos", e ilustrado na Figura 6, verificamos que a administração de Metirapona (inibidor de síntese de CORT, I.P.) 1,5h antes do estresse preveniu a elevação dos níveis plasmáticos de CORT nos animais estressados (Fig. 6, A). Interessantemente, a não elevação dos níveis plasmáticos de CORT durante o estresse preveniu o surgimento do comportamento do tipo ansioso 10 dias após. Os animais que receberam salina (Sal) e que foram estressados, além de terem suas concentrações plasmáticas de CORT aumentadas em relação aos animais não estressados (Fig. 6, A), mostraram menor porcentagem de entradas nos braços abertos no LCE 10 dias após o estresse (Fig. 6, B). Já os animais estressados e que receberam metirapona (Met), além de não terem as concentrações plasmáticas de CORT alteradas pelo estresse (Fig. 6, A), exploraram mais os braços abertos em comparação aos animais Sal estressados e em igual magnitude aos animais Sal não estressados (Fig. 6, B). Embora haja uma visível tendência, o pós-teste de Tukey não indicou diferenças significativas dos animais Sal estressados com os animais Sal não estressados ou Met estressados para o tempo de permanência nos braços abertos (Fig. 6, C). O índice de ansiedade confirma os dados acima, sendo maior nos animais estressados que receberam salina em comparação as demais grupos (Fig. 6, D). Finalmente, o tratamento com metirapona ou o estresse não alteraram o comportamento motor dos animais, indicado pelo deslocamento total no labirinto (Fig. 6, E). Em relação à porcentagem de entradas nos braços abertos, a ANOVA de dois critérios mostrou efeito significante para os fatores estresse [F(1, 16) = 4,638, p = 0,0469], tipo de moradia [F(1, 16) = 8,207, p < 0,0112] e interação de ambos [F(1, 16) = 5,718, p =0,0294)]. Para a variável permanência nos braços abertos, a ANOVA de dois critérios indicou feito significante do estresse [F(1, 16) = 6,247, p = 0,0237], porém não do tipo de moradia [F(1, 16) = 3,745, p = 0,0708] e interação de ambos [F(1, 16) = 1,257, p = 0,2787]. Já em relação ao índice de ansiedade, a ANOVA de dois critérios revelou um efeito significante para os fatores estresse [F(1,16) = 6,448, p = 0,0219] e tipo de moradia [F(1, 16) = 6,644, p = 0,0228], sem interação de ambos [F(1, 16) = 3,229 p = 0,0912].

Figura 6 - Inibição da síntese de CORT durante o estresse preveniu, 10 dias após, o desencadeamento do comportamento do tipo ansioso.



Administração prévia de metirapona preveniu o aumento dos níveis plasmáticos de CORT induzido por estresse de contenção de 2 horas (A). Animais estressados e previamente tratados com salina (Sal) apresentaram menor exploração dos braços abertos no LCE (indicada pela maior porcentagem de entradas) quando comparados aos animais não estressados e que receberam o mesmo tratamento (B). Animais administrados com metirapona (Met), estressados ou não, apresentaram maior porcentagem de entradas dos bracos abertos que os animais estressados administrados com salina (Sal) e a mesma porcentagem de entradas que os animais não estressados administrados com salina (Sal, B). Pós-teste utilizado não apontou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em relação ao tempo de permanência nos braços abertos, porém ANOVA indicou um efeito exercido pelo estresse (C). Índice de ansiedade indicou, no LCE, comportamento do tipo ansioso maior nos animais Sal estressados quando comparados a animais Sal não estressados e animais Met, estressados ou não (D). Tratamento com metirapona e/ou estresse não alteraram a atividade motora dos animais no labirinto, indicada pelo deslocamento total no labirinto (E). ANOVA de dois critérios seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas de Tukey. n=4-6 por grupo. Diferenças estatisticamente significantes entre grupos são indicadas por * (p<0,05), ** (p<0,01) e **** (p<0,0001).

4.6 Efeito ansiogênico tardio do estresse está associado ao aumento imediato da sinalização de GR no BLA

Baseados no resultado anterior, decidimos verificar se o efeito ansiogênico tardio do estresse (manifestado 10 dias após) deve-se não só ao aumento da liberação de CORT, mas ao aumento da sinalização desse hormônio no BLA, via GR. Como pode ser observado na Figura 7, imediatamente após o estresse de contenção de 2h, há uma maior concentração de GR no compartimento nuclear dos neurônios do BLA (Fig. 7, D, E, F) em comparação a um animal não estressado (Fig. 7, A, B, C), ocorrendo, inclusive, a formação de aglomerados (Fig. 7, F).

Figura 7 - Fotomicrografia ilustrando aumento de translocação nuclear de GR no BLA imediatamente após estresse.



Imunofluorescência do BLA mostrando aumentado acúmulo de GR (vermelho) no núcleo de neurônios (verde, MAP-2) de animais estressados (D, E, F) comparados a animais não estressados (A, B, C). DAPI (azul) foi utilizado como marcador nuclear. Pontas de seta indicam região nuclear de neurônios. Barra de escala em F corresponde a 8µm. Imagens foram adquiridas em microscópio confocal seccionadas no plano Z a 0,6 µm.

Para inibirmos a sinalização de GR no BLA dos animais, durante a sessão de estresse, fizemos uso do constructo viral HSV-tdGR. A Figura 8 ilustra a sublocalização celular de GR após infecção de neurônios com o vírus HSV-tdGR. Neurônios infectados com o construto controle (HSV-GFP, que carrea apenas a sequência codificadora da proteína GFP) contêm GR difuso entre o citoplasma e o núcleo celular (Fig. 8, painel A), ao passo que neurônios infectados com esse mesmo construto, quando tratados com CORT, apresentaram menor difusão de GR no citoplasma e maior concentração do receptor no núcleo (Fig. 8, painel B). Os neurônios infectados com HSV-tdGR, quando tratados com CORT, também apresentaram uma menor difusão de GR pelo citoplasma e maior concentração no núcleo (Fig. 8, painel C), sugerindo que o tráfego no receptor entre os diferentes compartimentos celulares não foi alterado. Para confirmar o efeito que o construto

HSV-tdGR exerce sobre a atividade genômica de GR, utilizamos o mesmo delineamento utilizado na Figura 8 para verificar, via PCR, a expressão de dois genes sabidamente transcritos por GR, *gilz* e *fkbp-5*. Como pode ser observado na Figura 9, tratamento com CORT eleva a expressão de ambos *gilz* e *fkbp-5* nas células infectadas com o constructo controle (GFP), porém não nas células infectadas com o constructo KSV-tdGR (tdGR). A superexpressão de tdGR não alterou a atividade transcricional geral das células, indicado pelos níveis de expressão de *gapdh* por células infectadas por ambos os constructos.



Figura 8 - Fotomicrografia ilustrando a distribuição de GR após infecção de vírus HSV-tdGR em cultura primária de neurônio.

Imunofluorescência de cultura primária de córtex de rato mostrando distribuição de GR (vermelho) nos compartimentos citoplasmático e nuclear de neurônios. Os neurônios foram infectados com HSV-GFP (A, B) ou HSV-tdGR (C), e estimulados (B, C) ou não (A) com CORT (10 μ M, 1h). DAPI foi utilizado como marcador nuclear (Azul) e GFP está representado em verde. Barra de escala em C^{'''} corresponde a 10 μ m.

Figura 9 - Superexpressão de tdGR em neurônios reduz a atividade genômica de GR.



Fotorepresentação de análise eletroforética em gel de agarose dos produtos amplificados pela RT-PCR das sequências codificantes para os genes gilz, fkbp5 e gapdh.

Parte dos resultados apresentados a seguir foi obtida no laboratório da Dra. Ki Ann Gosens (Fig. 10, B-D) e parte no Laboratório de Neuroendocrinofarmacologia e Iunomodulação (LaNEFI), coordenado pela Professora Carolina Demarchi Munhoz. Embora tenhamos adotado as mesmas condições experimentais (como luminosidade, temperatura, horário do ciclo claro-escuro, linhagem do animal, dimensões do labirinto) em ambos os laboratórios, o sistema de análise dos parâmetros comportamentais são diferentes, sendo utilizado no laboratório da Dra. Goosens um sistema automatizado de detecção de movimento baseado em infravermelho (mais informações na sessão "Material e métodos").

Quatro a seis dias após infecção bilateral da amígdala por HSV-tdGR ou HSV-GFP (Fig. 1, C; período em que ocorre a expressão máxima do construto, ver sessão "Material e métodos"), os animais passaram por sessão de estresse agudo de contenção e, após 10 dias, foram submetidos ao teste no LCE. Animais infectados com HSV-tdGR exploraram mais os braços abertos em comparação aos animais infectados por HSV-GFP (Fig. 10, B, C; não significante estatisticamente em B), sugerindo estarem menos ansiosos (teste Mann-Whitney bicaudal, p = 0,1605 e p = 0,0401, respectivamente). Não houve diferença na locomoção dos animais no LCE entre os grupos (Fig. 10, E; teste Mann-Whitney bicaudal, p = 0,4234). Apesar de o teste ter sido realizado apenas com dois grupos experimentais (ambos os grupos passaram por sessão de estresse), não permitindo verificar se os construtos em si promovem alguma diferença no comportamento basal dos animais, o conjunto desses

dados sugerem que animais com reduzida atividade nuclear de GR no BLA (expressão de tdGR) durante a sessão de estresse são resilientes ao efeito ansiolítico tardio do estresse agudo. Para confirmar esse fenômeno, conduzimos outro ensaio incluindo mais dois grupos experimentais: animais infectados com HSV-GFP ou HSV-tdGR, não estressados. Ainda que com uma amostragem reduzida, a ANOVA de dois critérios mostrou um efeito significante na porcentagem de entradas nos braços abertos para o fator estresse [F(1, 29) = 4,736, p = 0,0378] e para a interação entre os fatores estresse e superexpressão de tdGR [F(1, 29) = 4,562, p = 0,0413], não havendo efeito significante para o fator superexpressão do vírus isoladamente [F(1, 29) = 0,2914, p = 0,5934; Fig. 10, E]. O mesmo teste apontou um efeito significante para a interação do estresse e superexpressão de tdGR para o parâmetro de tempo de permanência nos braços abertos [F(1, 28) = 6,074, p = 0,0201], porém não para os fatores estresse [F(1, 28) = 0,0201]2) = 2,316, p = 0,1392] e superexpressão isoladamente [F(1, 28) = 0,8279, p = 0,3706]; Fig. 10, F]. Índice de ansiedade confirmou o efeito protetor da superexpressão de tdGR no BLA, uma vez que a ANOVA de dois critérios indicou um efeito significante para o fator estresse [F(1, 29) = 4,704, p = 0,0384] e para a interação dos fatores estresse e superexpressão do vírus [F(1, 29) = 5,689, p = 0,0239], não havendo efeito da superexpressão isoladamente [F(1, 29) = 0,5805, p = 0,4523; Fig. 10, G]. O teste t não pareado bicaudal entre os animais infectados com HSV-GFP e HSV-tdGR evidencia a diferença entre ambos à resposta ao estresse, conforme ilustra a Figura 10 (H, p = 0.0030; l, p = 0.0110).

O efeito da superexpressão de tdGR no BLA sobre o comportamento do tipo ansioso verificado acima não pode ser atribuído à modulação das concentrações plasmáticas de CORT alteradas pelo estresse, uma vez que ambos animais estressados (GFP e tdGR) apresentaram concentrações plasmáticas elevadas do hormônio após o estresse em comparação aos animais não estressados e apresentaram níveis do hormônio semelhantes quando comparados entre si (Fig. 10, J). A ANOVA de dois critérios mostrou um efeito estatisticamente significante do estresse sobre a concentração dos níveis plasmáticos de CORT [F(1, 25 = 36,25, p < 0,0001], porém não da superexpressão de tdGR no BLA [F(1, 25 = 0,007222, p < 0,9330] e da interação de ambos os fatores [F(1, 25 = 0,07808, p < 0,7823]..

Figura 10 - Expressão de tdGR no BLA preveniu o desenvolvimento do comportamento do tipo ansioso nos animais 10 dias após estresse.



Fotomicrografia representando local de depósito de vírus (expressão de GFP, em verde) no BLA (A). Animais infectados com HSV-GFP e estressados (GFP) mostraram menor exploração dos braços abertos no LCE em termos de tempo de permanência (C) e porcentagem de entradas (B, não significante estatisticamente) em comparação aos animais estressados infectados com HSV-tdGR (tdGR). Infecção do BLA por ambos os vírus não alterou o comportamento motor dos animais no LCE, indicado pelo deslocamento total no labirinto (D). ANOVA, comparando os 4 grupos experimentais, indicou efeito exercido pelo estresse sobre a porcentagem de entradas nos braços abertos (E), o tempo de permanência nos braços abertos (F) e o índice de ansiedade (G); não apontou efeito da infecção viral isoladamente sobre os mesmo parâmetros citados (E-G) e indicou interação entres os fatores estresse e moradia para os parâmetros de porcentagem de entradas nos braços abertos (E) e índice de ansiedade (G). Teste t evidencia a diferença em relação à exploração dos braços abertos no LCE entre os animais estressados infectados com HSV-GFP ou HSV-tdGR (H, I). Animais estressados (tanto GFP quanto tdGR) apresentaram, imediatamente após o estresse, níveis plasmáticos de CORT maiores do que dos animais não estressados (J). Teste t bicaudal não pareado em B, C e D (n= 7-8 por grupo) e em H, I (n= 6-9 por grupo). ANOVA de dois critérios seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas de Tukey em E-G (n=7-9 por grupo) e J (n=6-9 por grupo). Diferenças estatisticamente significantes entre grupos são indicadas por * (p<0,05), ** (p<0,01) e *** (p<0,001), em relação ao grupo GFP não estressado, quando não indicado na figura). Barra de escala em A corresponde a 100µm. BLA, complexo basolateral da amígdala; CeA, núcleo central da amígdala

4.7 Efeito tardio do estresse agudo de contenção nos processos de aquisição e extinção da memória de medo ao contexto: papel modulatório do EA..

Com vistas a verificar se o quadro de ansiedade desencadeada pelo estresse e manifestado 10 dias após o mesmo influencia o processo de aquisição de memória emocional, seguimos com a análise comportamental conforme *experimento 4,* indicado no delineamento experimental e ilustrado na Fig. 1 (D).

Ao analisarmos os resultados obtidos, observamos que não houve diferença na porcentagem de *freezing* entre os animais controles e os animais estressados em cujo treino foi aplicado 1mA de choque nas patas (Fig. 11). O nível de *freezing* aumentado verificado nos animais durante o teste pareado comparado à sessão de treino indica que os animais, tanto estressados quanto não estressados, formaram memória de longo prazo. Admitindo a possibilidade do estímulo incondicionado (1mA de choque nas patas) ser muito aversivo e ter gerado um efeito teto na resposta de *freezing* nos animais, o que teria impossibilitado verificar eventuais diferenças entre os animais controles e estressados, fizemos mais três baterias de testes utilizando, no treino, níveis gradativamente menores de choque. Conforme ilustra a Figura 11, observamos que os animais treinados com intensidades mais baixas de choque nas patas (0,5mA, 0,25mA e 0,15mA) ainda são capazes de formar memória de longo prazo, indicado pelo aumento significativo de *freezing* durante a sessão de teste comparado à sessão

de treino, porém, não houve diferença no nível de *freezing* entre os animais controles e estressados para cada bateria de teste (Fig. 11). Esses dados nos levaram a concluir que o estado de ansiedade manifestado 10 dias após o estresse agudo de contenção não influenciou a aquisição de memória de longa duração. ANOVA de dois critérios indicou efeito estatisticamente significante para o fator teste [F(1, 30) = 886, p < 0,0001, para 1mA; F(1, 34) = 153.54, p < 0,0001, para 0,5mA; F(1, 20) = 37,08, p < 0,0001; F(1, 30) = 36,97, p < 0,0001, para 0,15mA], porém não para o fator estresse (com exceção dos animais treinados com 1mA, mas que não foi confirmado pelo pósteste) [F(1, 30) = 4,25, p < 0,0480, para 1mA; F(1, 34) = 0,2623, p < 0,6118, para 0,5mA; F(1, 20) = 0,2983, p < 0,5910; F(1, 30) = 1,767, p < 0,1937, para 0,15mA].





Sessões de treinos com 1mA, 0,5mA, 0,3mA e 0.15mA promoveram, na sessão de teste pareado (Pós-EI), aumento de freezing em relação à sessão de treino (Pré-EI). Animais treinados 10 dias depois de estresse agudo de contenção não apresentaram aumento de freezing em relação aos animais não estressados, independente da intensidade do estímulo incondicionado (EI). ANOVA de dois critérios seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas de Tukey. n=5-8 por grupo. Diferenças estatisticamente significantes entre os grupos são indicadas por * (p<0,05), ** (p<0,01), *** (p<0,001) e **** (p<0,0001). n.s., não significante.

Com o intuito de investigar se o efeito ansiogênico persistente do estresse agudo influencia o processo de extinção de memória emocional, seguimos com a análise comportamental descrita no *experimento 4*, indicado no delineamento experimental. Conforme mostrado na Figura 12, e confirmando os dados obtidos previamente, o estresse agudo de contenção não influencia no processo de aquisição de memória de medo ao contexto, uma vez que, 24h após o treino de aquisição (teste 1), a porcentagem de *freezing* dos animais MP estressados (MP-Est) foi semelhante à dos animais MP não estressados (MP; Fig. 12, A). O mesmo pode ser concluído a respeito do EA, uma vez que esses animais, estressados (EA-Est) ou não (EA) também apresentaram porcentagem de *freezing* semelhante ao dos animais MP (Fig. 12, A).

Já em relação ao processo de extinção da memória, notamos que os animais MP-Est apresentaram um prejuízo, uma vez que a porcentagem de freezing nesses animais no teste 1 não foi diferente da dos demais testes, ao passo que os animais MP, EA e EA-Est apresentaram redução de freezing após sucessivas reexposições na arena condicionada (Fig. 12, A). O efeito do estresse sobre o processo de extinção nos animais MP fica mais evidente ao analisamos a porcentagem de freezing no teste 6, significantemente maior que a dos MP (portanto não estressados; Fig. 12, A; B). O EA, assim como em relação à ansiedade, mostrou ter um papel protetor, uma vez que os animais EA-Est não apresentaram diferenças na porcentagem de freezing em relação aos animais MP em todos os testes, porém significativamente menor em relação aos animais MP-Est no teste 6 (Fig. 12, A; B). Os animais EA apresentaram comportamento semelhante ao dos animais MP e significativamente diferente dos animais MP-Est no teste 6 (Fig. 12, A; B), indicando que o enriquecimento ambiental não promove um aumento no processo de extinção, mas sim previne o prejuízo promovido pelo estresse. É importante destacar que os animais submetidos à arena não pareada (NP) no teste 1 demonstraram aumento de freezing em relação ao período de treino (pré-EI), porém quando submetidos à arena de condicionamento, no teste 6, mostraram aumento estatisticamente significante (Fig. 12, C). Esses dados nos indicam que a redução na resposta de freezing apresentada pelos animais devese às sucessivas sessões de extinção realizadas nesta arena, não à passagem do tempo entre o teste 1 e o teste 6. A ANOVA de dois critérios revelou efeito estatisticamente significante na porcentagem de freezing para os diferentes dias de teste [F(6, 279) = 32,73, p < 0,0001], confirmado pelo pós-teste de Tukey apenas para os grupos MP, EA e EA-Est. Em relação à porcentagem de freezing apresentada no teste 6, ANOVA de dois critérios mostrou um efeito significante do estresse [F(1, 49)

- = 12,23, p = 0,001] e da interação estresse-tipo de moradia [F(1, 49) = 7,866, p = 0,0072], sem efeito do tipo de moradia isoladamente [F(1, 49) = 1,468, p = 0,2315].
- Figura 12 EA protege contra prejuízo no processo de extinção de memória de medo em animais estressados 10 dias antes do treino de aquisição.



Animais MP estressados (MP-Est) apresentam maior porcentagem de freezing em relação aos animais MP não estressados (MP) e EA estressados (EA-Est) nos testes 4, 5 e 6, e maior do que os animais enriquecidos não estressados (EA) no teste 6 (A). Gráfico em colunas ilustrando maior porcentagem de freezing dos animais MP estressados em relação aos animais dos demais grupos experimentais no teste 6 (B). Animais acondicionados em arena não pareada (NP) no teste 1 apresentam aumento de freezing quando acondicionados na arena de condicionamento no teste 6 (C). ANOVA de dois critérios seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas deTukey (A - C). n=8-14 por grupo; *, ** e *** em relação a CO (A, p<0,05, p<0,01 e p<0,001, respectivamente), ## em relação a ES (A, p<0,01) e & em relação a E0 (A, p<0,05); n=14 por grupo; *, ** e *** (B, p<0,05, p<0,01 e p<0,001, respectivamente).n=8 por grupo, * e ** (C, p<0,05 e p<0,01, respectivamente).

4.8 Efeitos do EA e do estresse agudo na atividade neuronal no BLA e CPFm dos animais submetidos aos testes de extinção da memória de medo ao contexto.

A extinção da memória de medo é um processo dependente da atividade de estruturas como o BLA e CPFm, notadamente os núcleos infra-límbico (CPFmIL) e pré-límbico (CPFmPL) e, tendo em vista o efeito protetor do EA sobre o efeito deletério tardio do estresse agudo sobre o processo de extinção da memória de medo, decidimos analisar nesses animais o acúmulo de atividade neuronal nessas estruturas, através da expressão da proteína FosB. Conforme ilustra a Figura 13, a ANOVA de dois critérios não indicou alterações na expressão de FosB no BLA para os fatores moradia [F(1, 12) = 0,01188, p = 0,9150], estresse [F(1, 12) = 0,2706, p = (1, 12) = 0,270,6124] ou para a interação de ambos [F(1, 412) = 0,1642, p = 0,6924; Fig. 13, A-E], porém, a razão das porções mais rostrais do BLA pelas porções mais caudais mostrou um cenário diferente. O mesmo teste apontou para um efeito estatisticamente significante na interação do estresse e tipo de moradia [F(1, 12) = 5,518, p = 0,0368], sem efeitos sobre cada estimulo isoladamente [F(1, 12) = 0.08568, p = 0.7747 e F(1, 12)]12) = 0,03124, p = 0,8626, respectivamente; Fig. 13, F], sugerindo que o estresse exerce efeitos diferentes em animais acomodados em moradia padrão ou enriquecida no que diz respeito à extensão rostro-caudal dos neurônios ativados pelo estímulo. Em relação à expressão de FosB no CPFmIL, a ANOVA de dois critérios revelou um efeito do estatisticamente significante do estresse [F(1, 12) = 5,779, p = 0,0330], porém não para os parâmetros tipo de moradia [F(1, 12) = 0.02994, p = 0.8655] e para a interação de ambos [F(1, 12) = 1,919, p = 0,1912; Fig. 14]. Em relação à expressão de FosB no CPFmPL, a ANOVA não revelou efeito para os parâmetros tipo de moradia
[F(1, 12) = 0,4022, p = 0,5379], estresse [F(1, 12) = 3,547, p = 0,0841], ou interação de ambos [F(1, 12) = 1,368, p = 0,2649; Fig. 15]. É importante destacar que para todos os efeitos revelados pela ANOVA, não houve confirmação pelo pós-teste de Tukey, eventualmente devido ao reduzido número amostral.



Figura 13 - Efeito do estresse e do EA na atividade de neurônios do BLA em animais submetidos à extinção do medo condicionado.

Fotomicrografia ilustrando a marcação de células positivas para FosB no BLA de animais MP não estressados (A), animais MP estressados (B), animais EA não estressados (C) e animais EA estressados (D). Gráfico em colunas ilustrando quantidade média de células positivas para FosB no BLA dos animais dos diferentes grupos experimentais (E) e a razão da contagem de células positivas para FosB nas porções mais rostrais pela contagem nas porções mais caudais do BLA (F). ANOVA apontou efeito estatisticamente significativo para a interação entre os fatores tipo de moradia e estresse em F, porém não confirmado pelo pós-teste. ANOVA de dois critérios seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas de Tukey em E e F (n=4 por grupo). Barra de escala em D corresponde a 500µm. BLA, complexo basolateral da amígdala; CeA, núcleo central da amígdala.



Figura 14 - Efeito do estresse e do EA na atividade de neurônios do CPFmIL em animais submetidos à extinção do medo condicionado.

Fotomicrografia ilustrando a marcação de células positivas para FosB no CPFmIL de animais MP não estressados (A), animais MP estressados (B), animais EA não estressados (C) e animais EA estressados (D). Gráfico em colunas ilustrando quantidade média de células positivas para FosB no PFCmIL dos animais dos diferentes grupos experimentais (E). ANOVA apontou efeito estatisticamente significativo para o fator tipo estresse, porém não confirmado pelo pós-teste. ANOVA de dois critérios seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas de Tukey (n=4 por grupo). Barra de escala em D corresponde a 100µm. BLA, complexo basolateral da amígdala; CeA, núcleo central da amígdala.

Figura 15 - Efeito do estresse e do EA na atividade de neurônios do CPFmPL em animais submetidos à extinção do medo condicionado.





Fotomicrografia ilustrando a marcação de células positivas para FosB no CPFmPL de animais MP não estressados (A), animais MP estressados (B), animais EA não estressados (C) e animais EA estressados (D). Gráfico em colunas mostra que não há diferença na quantidade média de células positivas para FosB no PFCmPL dos animais dos diferentes grupos experimentais (E). ANOVA de dois critérios seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas de Tukey (n=4 por grupo). Barra de escala em D corresponde a 100µm. BLA, complexo basolateral da amígdala; CeA, núcleo central da amígdala.

5 DISCUSSÃO

Os resultados apresentados nesta tese permitiram conclusões a respeito de alguns dos objetivos iniciais propostos e trazem questões pertinentes a serem respondidas em eventuais pesquisas futuras. Com relação aos resultados comportamentais, concluímos acerca do efeito protetor exercido pelo EA sobre o comportamento do tipo ansioso desencadeado 10 dias após o estresse de contenção de 2h. Além disso, confirmamos não haver influência tanto do estado ansioso quanto do EA sobre o processo de aquisição de memória no paradigma de medo condicionado ao contexto. Entretanto, verificamos um prejuízo no processo de extinção da memória nos animais previamente estressados, efeito que foi prevenido pela exposição ao EA. A despeito do papel protetor do EA sobre os efeitos comportamentais desencadeados tardiamente após o estresse agudo, não observamos nenhum efeito modulatório do EA sobre a árvore dendrítica dos neurônios do BLA. Concluímos, também, que o EA não exerce seu efeito protetor através da modulação das concentrações séricas de CORT, pelo menos quando verificados imediatamente ou 10 dias após o estresse. No BLA, a atividade de GR não se mostrou alterada 10 dias após a exposição ao estresse ou ao EA, porém não descartamos a influência que as alterações na atividade deste receptor, na vigência do estímulo estressor, exercem sobre o comportamento dos animais tardiamente. Nesse sentido, verificamos que tanto a inibição da síntese de CORT quanto a da sinalização nuclear de GR no BLA, no momento do estresse, preveniram o desencadeamento do comportamento do tipo ansioso 10 dias após. Finalmente, resultados ainda preliminares indicaram que o estresse agudo prévio aos testes de extinção da memória de medo exerce efeitos em diferentes subpopulações neuronais nos animais enriquecidos e não enriquecidos no que diz respeito à atividade do BLA. Já em relação ao CPFm, nossos resultados sugerem que o estresse diminui a atividade dos neurônios do CPFmIL nos animais não enriquecidos, e não exerce efeito (tanto quanto o EA) sobre os neurônios do CPFmPL.

A relação entre um estímulo estressor agudo e a persistência de sintomas de ansiedade tem sido amplamente estudada, principalmente por ter validade translacional com transtornos recorrentes na clínica psiquiátrica, dentre eles, o TEPT. Um número crescente de trabalhos vem mostrando que uma única sessão de estresse de contenção de 2h é suficiente para gerar um comportamento do tipo ansioso que persiste por, pelo menos, 10 dias (Belda et al., 2008; Kin et al., 2014; Mitra et al., 2005; Mitra e Sapolsky, 2008; Rao et al., 2012). Além disso, alguns trabalhos relataram que animais previamente estressados apresentam uma resposta exacerbada a um segundo estímulo estressor, mesmo guando o intervalo entre os dois estímulos supera 10 dias (Belda et al., 2008; Belda et al., 2004; Dal-Zotto et al., 2003; Vallès et al., 2003;). Belda e colaboradores (2008), por exemplo, verificaram que 1h de estresse de contenção, embora não promova um comportamento do tipo ansioso 10 dias depois, como verificado após 2h de estresse, potencializa o efeito ansiogênico do choque nas patas. Os autores viram que apenas o estresse de contenção não promove alteração nas concentrações séricas de CORT, quando estes foram mensurados 10 dias depois, e também não observaram aumento da liberação do hormônio após o estresse de choque nas patas, em comparação aos animais que não foram previamente estressados. Ganon - Elazar e Akirav (2012), por sua vez, viram que uma semana após exposição ao estresse único prolongado (estresse de contenção, nado forçado e perda de consciência por inalação de éter), os ratos não apresentaram alterações nas concentrações basais de CORT, porém mostraram um aumento do feedback negativo no eixo HPA em resposta ao desafio com dexametasona, indicando uma maior responsividade do eixo. Esse dado apresenta um importante correlato com a clínica psiquiátrica, pois pacientes com TEPT mostram um acentuado feedback negativo do eixo HPA em resposta ao desafio com a hidrocortisona, um glicocorticoide sintético, além de apresentarem concentrações mais elevadas de cortisol frente a um estímulo estressor (Yehuda, 2006; ver Armario et al., 2008). Ademais, nesses pacientes, uma única dose de hidrocortisona afeta o desempenho em testes de memória, sugerindo um papel importante das alterações na responsividade do eixo HPA na patofisiologia do TEPT (Yehuda et al., 2007).

Os nossos resultados corroboram alguns achados da literatura. Tal como mencionado acima, verificamos que 1h de estresse de contenção não é suficiente para gerar um quadro do tipo ansioso em ratos 10 dias após, ao passo que 2h do mesmo tipo de estresse, sim. De forma inédita, verificamos que a prévia exposição dos animais ao EA exerce um efeito protetor no que diz respeito à persistência da ansiedade induzida pelo estresse agudo. É importante notar que não foi verificado qualquer efeito do EA, ou do estresse, sobre as concentrações séricas de CORT analisadas 10 dias após o estresse de contenção e imediatamente após o teste de ansiedade, este considerado um estresse leve de submissão à novidade. Esses dados

reforçam a hipótese de que não há correlação do comportamento do tipo ansioso com os níveis basais deste hormônio durante o teste. Todavia, não deve ser descartada a importância que a elevação dos níveis séricos de GCs, que ocorre imediatamente após o estresse, exerce no aparecimento tardio do comportamento do tipo ansioso. A esse respeito, alguns trabalhos mostraram que, tanto o estresse agudo de contenção de 2h quanto a infusão sistêmica de CORT promoveram, 10 a 12 dias depois, um comportamento do tipo ansioso em ratos, sugerindo um papel chave desse hormônio na persistência do quadro de ansiedade (Kim et al., 2014; Mitra et al., 2005; Mitra e Sapolsky, 2008; Rao et al., 2012). Da mesma forma, nós verificamos aqui que a inibição da síntese de CORT (através da administração sistêmica de Metirapona) durante o estresse de contenção preveniu o surgimento do comportamento do tipo ansioso 10 dias após. No entanto, não parece ser através do controle da liberação de CORT que o EA exerce seu efeito protetor, pois o aumento nas concentrações séricas deste hormônio, verificado imediatamente após o estresse de contenção de 2h, não sofreu alteração guando os animais foram submetidos previamente ao EA, e, mesmo assim, os animais mostraram-se protegidos em relação à ansiedade induzida pelo estresse.

Além do efeito ansiogênico tardio associado à elevação aguda dos níveis séricos de CORT, o remodelamento dendrítico no BLA tem sido apontado como a gênese das manifestações comportamentais associadas ao estresse. A esse respeito, nossos resultados contribuem para melhor entender essas correlações. Confirmando trabalhos anteriores (Mitra et al., 2005; Rao et al., 2012), nossos resultados mostraram que 2h de estresse agudo de contenção promoveu, 10 dias depois, tanto o comportamento do tipo ansioso quanto o aumento da densidade de espinhos dendríticos no BLA. Além disso, e de acordo com relato prévio (Mitra et al., 2005), esse mesmo estresse agudo não promoveu alterações no comprimento e número de bifurcações dos dendritos, efeitos que são atribuídos às exposições repetidas de estresse de contenção ou administrações exógenas de CORT (Mitra et al., 2005; Mitra and Sapolsky, 2008; Vyas et al., 2002). Interessantemente, nós verificamos que a exposição prévia ao EA preveniu o efeito ansiogênico induzido por estresse agudo, porém não seu efeito sobre o aumento da densidade de espinhos dendríticos no BLA.

Trabalhos recentes mostraram um efeito protetor do EA na persistência do comportamento do tipo ansioso em ratos induzido por dois tipos de estresses diferentes: separação materna e estresse de contenção repetido (Ashokan et al., 2016; Koe et al., 2016). Porém, diferente de nossos achados, esses trabalhos mostraram que a exposição ao EA reverteu tanto o comportamento do tipo ansioso quanto ao remodelamento dendrítico induzidos pelo estresse. Além disso, Ashokan e colegas (2016) mostraram que a exposição ao EA suprimiu o efeito agudo da exposição repetida ao estresse na elevação das concentrações séricas de CORT. É importante destacar que em ambos os trabalhos os animais foram expostos ao EA concomitantemente (Ashokan et al., 2016) ou após (Koe et al., 2016) o fim do estímulo estressor. Como mencionado anteriormente, nossos achados também revelaram um papel protetor do EA frente ao efeito comportamental do estresse agudo, porém não um efeito preventivo quanto à ação do estresse sobre o aumento da densidade dos espinhos dendríticos no BLA, tampouco na elevação aguda de CORT sérica. De acordo com os presentes achados, Novaes e colegas (2017) mostraram um efeito protetor do EA contra o efeito imediato do estresse agudo de contenção de 1h no comportamento do tipo ansioso, sem qualquer efeito sobre as concentrações séricas de CORT.

De forma geral, nossos resultados sugerem que o estresse, o remodelamento dendrítico no BLA e o surgimento do comportamento do tipo ansioso são, de certa maneira, fenômenos associados, porém não interdependentes. Enquanto o aumento transiente nas concentrações séricas de CORT é suficiente para induzir alterações dendríticas no BLA (Kim et al., 2014; Mitra and Sapolsky, 2008; Rao et al., 2012), os mecanismos através dos quais os glicocorticoides alteram a densidade dos espinhos dendríticos ainda não estão claros. Por outro lado, nos parece que o aumento transiente de CORT e o surgimento tardio do comportamento do tipo ansioso não são fenômenos necessariamente correlacionados, assim como o remodelamento dendrítico no BLA e o comportamento do tipo ansioso. Digno de nota, Mitra e colegas (2009) mostraram que a inibição dos neurônios do BLA, e a consequente elevação das concentrações séricas de CORT induzida por estresse agudo de contenção, preveniu o remodelamento dendrítico no BLA associado ao estresse, porém não o comportamento do tipo ansioso manifestado 10 dias após.

Embora o EA não module a liberação de CORT sistêmica frente a um estímulo estressor, pelo menos quando verificado imediatamente ou 10 dias após o estresse de contenção, em trabalho prévio (Novaes et al., 2017), nós mostramos que animais não enriquecidos e estressados apresentaram aumento da atividade nuclear de GR (medida por translocação nuclear) no BLA, ao passo que animais previamente

enriquecidos, mesmo que estressados e com altas concentrações circulantes de CORT, não apresentaram tal aumento. Esse dado sugere um potencial mecanismo de controle da sinalização de CORT no BLA exercido pelo EA, que pode estar relacionado com seu efeito protetor. Baseados nesse achado, decidimos investigar se o comportamento do tipo ansioso visto 10 dias após estresse de contenção de 2h está relacionado com o aumento de translocação nuclear de GR no BLA no momento do teste de ansiedade e se o efeito protetor do EA está relacionado com o controle dessa translocação. Nossos resultados indicaram que não houve aumento de atividade nuclear de GR no BLA durante o teste de ansiedade nos animais previamente estressados, nem redução por conta do EA, porém, não podemos afirmar que a translocação desse receptor, que ocorre imediatamente após o estresse de contenção, não seja importante para levar a alterações funcionais que culminem na persistência da ansiedade, e que a proteção exercida pelo EA não se deva ao controle dessa translocação.

Visando explorar essa questão, decidimos verificar qual o efeito da redução da sinalização nuclear de GR no BLA durante o estresse (através da superexpressão da forma dominante negativa do receptor – tdGR) no comportamento do tipo ansioso visto 10 dias após. A despeito da reduzida amostragem experimental (tratando-se de um ensaio comportamental e cujos indivíduos passaram por um procedimento invasivo), os resultados indicaram que a sinalização nuclear de GR no BLA exerce um papel importante para o efeito ansiogênico tardio do estresse agudo, na medida em que os animais com reduzida atividade nuclear do receptor no BLA (superexpressam a forma tdGR) mostraram-se menos ansiosos do que os animais controles, mesmo apresentando concentrações sistêmicas de CORT elevadas comparados aos animais não estressados.

A hiperatividade da amígdala é um fenômeno característico em pacientes com transtornos de ansiedade (Hull, 2002; Rauch et al., 2006; Shin et al., 2006; Simmons et al., 2011). Experimentalmente, a estimulação elétrica do BLA em ratos induz um comportamento do tipo ansioso (Kellet et al., 2001; Nieminen et al., 1992), ao passo que ratos de linhagens consideradas mais ansiosas apresentam aumento da atividade do BLA, verificada tanto por aumento da expressão de genes de expressão imediata (Hale et al., 2006; Silveira et al., 1993) quanto por registros eletrofisiológicos (Wang et al., 2011). Além disso, sabe-se que o estresse agudo ou infusão sistêmica de CORT aumenta a excitabilidade dos neurônios do BLA em ratos (Kavushansky and Richter-

Levin, 2006; Rodriguez Manzanares et al., 2005) enquanto o bloqueio de sinapses excitatórias no mesmo núcleo previne o desencadeamento do comportamento do tipo ansioso pelo estresse (Adamec et al., 1999; Bignante et al., 2010). Evidências crescentes vêm sugerindo que os efeitos do estresse sobre a funcionalidade do BLA podem ser decorrentes da sinalização de CORT nesse núcleo. Registros eletrofisiológicos ex vivo em fatias de encéfalos de ratos mostraram que a ativação de GR por CORT promove aumento da excitabilidade dos neurônios piramidais do BLA (Duvarci e Pare, 2007). Adicionalmente, Mitra e Sapolsky (2010) concluíram, a partir de uma inferência indireta, que o efeito protetor do receptor esteroide quimérico ERGR (que converte a sinalização mediada por GR em sinalização mediada pelo receptor de estrógeno - ER) no efeito ansiogênico do estresse agudo ou da infusão sistêmica de CORT, bem como sobre os efeitos no remodelamento dendrítico do BLA, foi decorrente do bloqueio da atividade de GR e não do aumento da sinalização de ER neste núcleo. Em trabalho prévio (Novaes et al., 2017), mostramos que ratos enriquecidos são resilientes ao efeito ansiogênico do estresse agudo de contenção e apresentam menor expressão de EGR-1, um marcador indireto de atividade neuronal, no BLA. Além disso, como já mencionado, o estresse promoveu aumento de translocação nuclear de GR apenas nos animais não enriquecidos. O conjunto desses dados sugere que o aumento da sinalização de GR no BLA promovido pelo estresse está associado com o pronunciamento do comportamento do tipo ansioso verificado tardiamente, muito embora ainda não esteja clara sua relação com o aumento da densidade de espinhos dendríticos na região.

A exposição de pacientes ansiosos a um estímulo estressor agudo em situações experimentais induz a formação de uma memória associativa de medo resistente ao processo de extinção, além de potencializar respostas típicas de ansiedade não associativas (Charney et al., 1993; Foa et al., 1992; McFarlane, 2010; Orr et al., 2002; Yehuda, 2002). Além disso, alterações funcionais da amígdala, hipocampo e de estruturas do córtex frontal medial, todas parte de um conhecido circuito implicado no processo de extinção de memória, são amplamente relatadas em pacientes com TEPT (ver Bryant et al., 2005; Shin et al., 2005). Evidências experimentais obtidas com modelos animais apontam uma correlação positiva entre o comportamento do tipo ansioso, ou a exposição prévia a um evento estressante, e o prejuízo no processo de extinção da memória de medo condicionado ao som ou ao contexto (Akirav and Maroun, 2007; Izquierdo et al., 2006; Maren e Chang, 2006;

Shumake et al., 2005), bem como na extinção da resposta de esquiva inibitória (Ganon-Elazar e Akirav, 2009). Muigg et al. (2008) mostraram que populações de ratos Wistar naturalmente mais ansiosas apresentam uma menor atenuação da resposta de freezing nos seguidos testes de extinção da memória de medo condicionada ao som em relação aos animais menos ansiosos da mesma linhagem. Outros estudos mostraram um efeito persistente do estresse agudo sobre o prejuízo da extinção da memória de medo. A exposição ao estresse único prolongado, por exemplo, prejudicou a extinção da memória de medo condicionado ao som e ao contexto de ratos treinados uma semana após o estresse (Knox et al., 2012a; Knox et al., 2012b; Yamamoto et al., 2008), sem que tenha exercido efeito sobre a aquisição da memória (Knox et al., 2012a; Yamamoto et al., 2008). Já o protocolo de estresse agudo de choque nas patas (sessão de 15 choques consecutivos durante o período de 90 minutos), por sua vez, resultou em aumento de medo condicionado e prejuízo na capacidade de extinção da memória condicionada ao som e ao contexto (diferente do contexto do estresse), também em animais treinados 1 semana após o estresse (Long e Fanselow, 2012). Nossos resultados mostraram que o estresse agudo de contenção, além de levar a um comportamento do tipo ansioso manifestado 10 dias após, também causou um prejuízo na extinção da memória de medo ao contexto, sem exercer influência sobre o processo de aquisição da memória. O EA, por sua vez, não só preveniu o surgimento tardio do quadro de ansiedade, mas também o efeito deletério do estresse sobre o processo de extinção da memória.

O BLA possue um papel crucial na extinção do medo condicionado (ver Baldi e Bucherelli, 2015). A inativação do BLA por muscimol (agonista seletivo do receptor GABA_A), imediatamente antes do treino de extinção, causa prejuízo na extinção da memória de medo em diferentes paradigmas (Herry et al., 2008; Holmes et al., 2013; Laurent et al., 2008; Laurent e Westbrook, 2008, 2010; Sierra-Mercado et al., 2011), indicando um papel crucial da atividade dos neurônios do BLA na fase de aquisição da extinção da memória de medo. Da mesma forma, a inativação do BLA por muscimol ou tetrodotoxina, após o teste de extinção da memória de medo condicionado ao contexto, prejudicou a retenção da extinção dessa memória (Baldi e Bucherelli, 2010; Laurent e Westbrook, 2008), ao passo que a administração de biculina (antagonista de receptor GABA) potencializou a extinção da memória (Berlau e McGaugh, 2006), sugerindo um papel central desse núcleo também da consolidação da extinção da memória de medo. Alguns trabalhos, no entanto, mostraram que animais estressados, e que, portanto, manifestaram prejuízo da extinção da memória de medo, apresentaram maior número de células positivas para cFos no BLA, sugerindo que o aumento da atividade dos neurônios da região estaria relacionado à alteração comportamental observada (Hoffman et al., 2014; Toledo-Rodriguez et al., 2012).

Não está claro, porém, se as alterações plásticas desencadeadas pelo estresse agudo ou crônico sobre a árvore dendrítica do BLA (Mitra et al., 2005, Padival et al., 2013, Vyas et al., 2006, 2002), o que implicaria em maior atividade dos neurônios da região, estão associadas com o prejuízo na extinção da memória de medo. Camp e colegas (2012) mostraram que animais com prejuízo natural na extinção da memória de medo. Camp e colegas (2012) mostraram que animais com prejuízo natural na extinção da memória de medo também apresentam hipertrofia dendrítica no BLA, porém, outros trabalhos mostraram que animais com prejuízo na extinção da memória de medo induzida por estresse de submissão à plataforma suspensa apresentaram retração dendrítica, não hipertrofia, no mesmo núcleo (Grillo et al., 2015; Maroun et al., 2013). No mesmo sentido, nossos resultados mostraram que não há associação entre o efeito protetor do EA sobre o efeito ansiogênico e o déficit de extinção induzidos por estresse com uma eventual prevenção do aumento na densidade dos espinhos dendríticos do BLA. Além disso, nossos resultados mostraram, através da análise da expressão de FosB, que tanto o estresse quando o EA não alteram a atividade dos neurônios do BLA após os sucessivos testes de extinção.

É interessante notar que muitos trabalhos vêm mostrando que subpopulações distintas de neurônios do BLA respondem a estímulos incondicionados com diferentes valências, variando de estímulos apetitivos a estímulos aversivos (Belova et al., 2007; Bermudez and Schultz, 2010; Knapska et al., 2007; Livneh and Paz, 2012; Muramoto et al., 1993; Paton et al., 2006; Romanski et al., 1993; Wolff et al., 2014). O resultado comportamental distinto decorrente da ativação dessas diferentes subpopulações neuronais reside nas projeções que esses neurônios apresentam. Neurônios localizados no BLA e que se projetam para o núcleo acumbens (NAc), por exemplo, são cruciais para o comportamento associado à recompensa (Ambroggi et al., 2008; Cardinal et al., 2002; Stuber et al., 2011), enquanto que neurônios também localizados no BLA, mas que se projetam para o núcleo central da amígdala, subdivisão medial (CeM), são recrutados durante o condicionamento de medo (Jimenez e Maren, 2009; Haubensak et al., 2010). Utilizando ferramentas como traçadores retrógrados, optogenética e eletrofisiologia, Namburi e colegas (2015) identificaram, no mesmo animal, populações de neurônios topograficamente sobrepostas que se projetam para

o NAc e para o CeM. Nesse trabalho, os pesquisadores mostraram que o condicionamento de medo promoveu redução da razão de ativação dos receptores do tipo AMPA e receptores do tipo NMDA para glutamato no terminal sináptico dos neurônios que se projetam para o NAc, porém promoveu aumento da razão AMPA/NMDA nos terminais dos neurônios que se projetam para o CeM. O condicionamento para o consumo de sacarose exerceu o efeito oposto em cada subpopulação. Além disso, a fotoestimulação dos neurônios BLA-NAc aumentou o comportamento de reforço positivo, enquanto que a fotoestimulação dos neurônios BLA-CeM promoveu comportamento de esquiva inibitória.

Em trabalho mais recente, Kim e colegas (2017) identificaram marcadores genéticos para duas subpopulações distintas localizadas no BLA que, embora apresentem certa sobreposição topográfica, estão claramente distribuídas na dimensão rostro-caudal do núcleo. As células Rspo2 positivas, por exemplo, localizam-se majoritariamente nas porções rostrais do BLA e são ativadas por estímulos de valência negativa, como choque nas patas, consumo de alimentos não palatáveis ou exposição a odor desagradável para o animal. Já as células Ppplrl positivas estão localizadas majoritariamente nas porções mais caudais do BLA e são ativadas por estímulos com valência positiva, como o contato do macho com uma fêmea, o consumo de alimento palatável e a exposição a odor agradável ao animal. As projeções desses tipos neuronais também são distintas entre sim, embora não haja uma clara segmentação como visto na sublocalização dos neurônios dentro do BLA. Os neurônios Rspo2 positivos projetam-se para o núcleo central da amígdala, subdivisão capsular (CeC) e para o CPFmPL, o que, segundo os autores, ajuda a explicar o comportamento de esquiva ou medo apresentado pelos animais quando da estimulação desses neurônios. Por outro lado, os neurônios Ppplrl positivos projetamse para o CeM, NAc e CPFmIL, o que explicaria o comportamento de reforço positivo quando da ativação da via, muito embora, como mostrado acima, as projeções do BLA para o CeM estejam associadas ao comportamento de esquiva inibitória (Namburi et al., 2015).

Uma análise da atividade da população neuronal do BLA como um todo, ou de suas alterações morfológicas, pode mascarar fenômenos que ocorrem em menor escala, sublocalizado no conjunto. O fato de não termos visto alterações na atividade neuronal (expressão de FosB) do BLA por conta do estresse, ou do EA, mas termos observado uma alteração na distribuição rostro-caudal da população de neurônios

ativados que acontece de forma distinta entre animais que foram enriquecidos ou não, nos sugere que pode haver um fenômeno sublocalizado no BLA não detectado pelo método de análise escolhido. Dessa forma, nos parece que o efeito do estresse sobre o prejuízo na extinção da memória, bem como o do EA prevenindo esse efeito, embora seja bastante robusto no âmbito comportamental, não tem uma correlação muito clara com os parâmetros biológicos utilizados para fazer essa correlação.

Além do BLA, o CPFm, particularmente o CPFmIL, tem um papel amplamente relatado no processo de extinção da memória de medo. Da mesma forma que o BLA, a inibição do CPFmIL por muscimol antes dos treinos de extinção prejudica a extinção da memória de medo condicionada ao som e ao contexto (Akirav et al., 2006; Laurent e Westbrook, 2009; Sierra-Mercado et al., 2011). Por outro lado, a administração do antagonista GABAérgico (picrotoxina) facilitou a extinção da memória de medo condicionada ao som e ao contexto (Thompson et al., 2010). A inibição ou lesão do CPFmIL após o treino de extinção também prejudica a consolidação da extinção da memória de medo a contexto (Laurent e Westbrook, 2009; Morgan and LeDoux, 1995; Quirk et al., 2000). Nota-se que esses efeitos não foram verificados quando da inibição do CPFmPL. Adicionalmente, utilizando-se fatias ex vivo de encéfalos de animais que passaram pelo processo de extinção da memória de medo, Santini e colegas (2008) mostraram haver uma associação entre o treino de extinção da memória e o aumento da excitabilidade do CPFmIL, ao passo que registros in vivo revelaram redução de disparos neuronais na mesma região em animais cronicamente estressados e que apresentaram déficit de extinção da memória de medo (Wilber et al., 2011).

Nossos resultados com expressão de FosB sugerem que os animais previamente estressados, e que não foram acondicionados no EA, apresentam reduzida atividade neuronal no CPFmIL, mas não no CPFmPL. Interessantemente, esses animais apresentaram déficit na extinção do medo condicionado ao contexto. Ao contrário do que ocorre no BLA, diferentes tipos de estresse estão associados com retração da árvore dendrítica no CPFm (Brown et al., 2005; Izquerdo et al., 2006; Radley et al., 2018) e o efeito prejudicial do estresse sobre a extinção teria correlação com a reduzida atividade do CPFmIL. De fato, alguns trabalhos mostraram que estresse agudo de nado forçado é capaz de causar retração dendrítica nos neurônios principais do CPFmIL e déficit de extinção (Holmes e Wellman, 2009; Izquerdo et al., 2006), contudo, tal como acontece com o BLA, a correlação direta entre as alterações morfológicas que acometem o CPFm e as alterações comportamentais induzidas por

estresse não está completamente esclarecida. Farrell e colegas (2010), por exemplo, viram que lesão do CPFmIL impediu os efeitos deletérios do estresse sobre a extinção da memória. Além disso, trabalhos que utilizaram estresse agudo (ou administração única de CORT) mostraram que as alterações promovidas pelo estresse sobre a morfologia do CPFm não perduram até o décimo dia após o estresse (Kim et al., 2014), e nossos dados sobre o prejuízo na extinção da memória foram observados a partir do décimo dia após o estresse. Esses animais, portanto, não teriam mais presentes as alterações morfológicas no CPFm induzidas pelo estresse.

6 CONCLUSÃO

De forma geral, nossos resultados mostram que existe um claro papel protetor do EA contra os efeitos comportamentais que o estresse agudo promove tardiamente nos ratos, porém muitos marcadores biológicos aos quais são atribuidos esses efeitos comportamentais do estresse não necessariamente correspondem aos os mecanismos através dos quais o EA exerce seu efeito protetor. Tratando-se de um protocolo experimental no qual os animais são submetidos a uma ampla variedade de estímulos, por um período relativamente longo (mais longo que o período de latência entre o estresse e a verificação de seus efeitos), o EA provavelmente promove uma plasticidade no sistema nervoso central (e talvez periférico) compensatória aos efeitos do estresse, não necessariamente na direção contrária a esses efeitos. Um exemplo de ação compensatória do EA poderia ser, por exemplo, a modulação sobre a atividade genômica de GR no BLA que, de alguma forma, compensaria os efeitos periféricos da ação do estresse sobre o eixo HPA. Uma evidencia prévia de que o EA poderia exercer seu efeito protetor frente ao estresse mediante o controle da atividade genômica de GR nos levou a investigar, e concluir, que, de fato, a ação desse receptor no BLA está diretamente relacionada aos efeitos ansiogênicos do estresse, a despeito de um eventual efeito sobre o exio HPA e a morfologia dendrítica do BLA. Embora não possamos concluir a respeito do papel da ação de GR no BLA sobre os efeitos do estresse na memória (mas também não podemos excluir essa possibilidade), esse achado nos aponta para um efeito mais localizado (intracelular) do estresse sobre uma determinada estrutura encefálica, o que poderia, inclusive, nos ajudar enteder como alterações em subpopulações específicas de neurônios no sistema nervoso central influenciam o comportamento do animal.

REFERÊNCIAS²

Abelson JL, Khan S, Liberzon I, Young EA. HPA axis activity in patients with panic disorder: review and synthesis of four studies. Depress Anxiety. 2007; 24(1):66-76.

Adamec RE, Burton P, Shallow T, Budgell J. Unilateral block of NMDA receptors in the amygdala prevents predator stress-induced lasting increases in anxiety-like behavior and unconditioned startle--effective hemisphere depends on the behavior. Physiology & behavior. 1999; 65:739-751.

Aerni A, Traber R, Hock C, Roozendaal B, Schelling G, Papassotiropoulos A, Nitsch RM, Schnyder U, de Quervain DJ. Low-dose cortisol for symptoms of posttraumatic stress disorder. Am J Psychiatry. 2004; 161(8):1488-90.

Akirav I, Maroun M. The role of the medial prefrontal cortexamygdala circuit in stress effects on the extinction of fear. Neural Plast. 2007.

Akirav I, Raizel H, Maroun M. Enhancement of conditioned fear extinction by infusion of the GABA(A) agonist muscimol into the rat prefrontal cortex and amygdala. Eur J Neurosci. 2006; 23(3):758-64.

Amano T, Duvarci S, Popa D, Paré D. The fear circuit revisited: contributions of the basal amygdala nuclei to conditioned fear. J Neurosci. 2011; 31(43):15481-9.

Amaral D, Price J, Pitkanen A, Carmichael S. The Amygdala: Neurobiological Aspects of emotion, Memory, and Mental Dysfunction. J. Agleton, ed. 1992; New York, pp 1-16.

Ambroggi F, Ishikawa A, Fields HL, Nicola SM. Basolateral amygdala neurons facilitate reward-seeking behavior by exciting nucleus accumbens neurons. Neuron. 2008; 59(4):648-61.

American Psychiatric Association: Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-IV-TR. 5ed. Arlington, VA: American Psychiatric Publishing. 2013.

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

² De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniforms requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: http://www.icmje.org

megacities: findings from the São Paulo megacity mental health survey, Brazil. PLoS One. 2012; 7(2):e31879.

Anglada-Figueroa D, Quirk GJ. Lesions of the basal amygdala block expression of conditioned fear but not extinction. J Neurosci. 2005; 25(42):9680-5.

Armario A, Escorihuela RM, Nadal R. Long-term neuroendocrine and behavioural effects of a single exposure to stress in adult animals. Neurosci Biobehav Rev. 2008; 32(6):1121-35.

Ashokan A, Hegde A, Mitra R. Short-term environmental enrichment is sufficient to counter stress-induced anxiety and associated structural and molecular plasticity in basolateral amygdala. Psychoneuroendocrinology. 2016; 69, 189-196.

Baldi E, Bucherelli C. Brain sites involved in fear memory reconsolidation and extinction of rodents. Neurosci Biobehav Rev. 2015; 53:160-90.

Barrett D, Gonzalez-Lima F. Behavioral effects of metyrapone on Pavlovian extinction. Neurosci Lett. 2004; 371(2-3):91-6.

Belda X, Fuentes S, Nadal R, Armario A. A single exposure to immobilization causes long-lasting pituitary-adrenal and behavioral sensitization to mild stressors. Horm Behav. 2008; 54(5):654-61.

Belda X, Márquez C, Armario A. Long-term effects of a single exposure to stress in adult rats on behavior and hypothalamic-pituitary-adrenal responsiveness: comparison of two outbred rat strains. Behav Brain Res. 2004;154(2):399-408.

Belova MA, Paton JJ, Morrison SE, and Salzman CD. Expectation modulates neural responses to pleasant and aversive stimuli in primateamygdala. Neuron. 2007; 55, 970–984.

Belz EE, Kennell JS, Czambel RK, Rubin RT, Rhodes ME. Environmental enrichment lowers stress-responsive hormones in singly housed male and female rats. Pharmacol Biochem Behav. 2003; 76(3-4):481-6.

Benaroya-Milshtein N, Hollander N, Apter A, Kululansky T, Raz N. et al. Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. European Journal of Neuroscience. 2004; 20:1341-1347.

Berlau DJ, McGaugh JL.. Enhancement of extinction memory consolidation: the role of the noradrenergic and GABAergic systems within the basolateral amygdala. Neurobiol. Learn. Mem. 2006; 86:123–132.

Berman DE, Dudai Y. Memory extinction, learning anew, and learning the new: dissociations in the molecular machinery of learning in cortex. Science. 2001; 291(5512):2417-9.

Bermudez MA, Schultz W. Reward magnitude coding in primate amygdala neurons. J. Neurophysiol. 2010; 104, 3424–3432.

Bignante EA, Paglini G, Molina VA. Previous stress exposure enhances both anxietylike behaviour and p35 levels in the basolateral amygdala complex: modulation by midazolam. European neuropsychopharmacology: the journal of the European College of Neuropsychopharmacology. 2010; 20:388-397.

Bishop SJ, Duncan J, Lawrence AD. State anxiety modulation of the amygdala response to unattended threat-related stimuli. J Neurosci. 2004; 24(6):10364-8.

Bishop SJ. Neurocognitive mechanisms of anxiety: an integrative account. Trends Cogn Sci. 2007; 11(7):307-16.

Bosscher KD. How glucocorticoid receptors modulate the activity of other transcription factors: A scope beyond tethering. Mol Cell Endocrinol. 2013; 5;380(1-2):41-54.

Brown SM, Henning S, Wellman CL. Mild, short-term stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. Cereb Cortex. 2005; 15(11):1714-22.

Bryant, RA, Felmingham, K., Kemp, AH, Barton, M, Peduto, AS, Rennie, C, Gordon, E, Williams, LM, 2005. Neural networks of information processing in posttraumatic stress disorder: a functional magnetic resonance imaging study. Biol. Psychiatry. 2005; 58, 111-118.

Buchanan TW, Lovallo WR. Enhanced memory for emotional material following stresslevel cortisol treatment in humans. Psychoneuroendocrinology. 2001; 26(3):307-17.

Büchel C, Morris J, Dolan RJ, Friston KJ. Brain systems mediating aversive conditioning: an event-related fMRI study. Neuron. 1998; 20(5):947-57.

Camp MC, Macpherson KP, Lederle L, Graybeal C, Gaburro S, Debrouse LM et al. Genetic strain differences in learned fear inhibition associated with variation in neuroendocrine, autonomic, and amygdala dendritic phenotypes. Neuropsychopharmacology. 2012; 37: 1534–1547.

Cardinal RN, Parkinson JA, Hall J, Everitt BJ. Emotion and motivation: the role of the amygdala, ventral striatum, and prefrontal cortex. Neurosci Biobehav Rev. 2002; 26(3):321-52.

Charney DS, Deutch AY, Krystal JH, Southwick SM, Davis M. Psychobiologic mechanisms of posttraumatic stress disorder. Arch Gen Psychiatry. 1993; 50:294–305.

Collins DR, Paré D. Differential fear conditioning induces reciprocal changes in the sensory responses of lateral amygdala neurons to the CS(+) and CS(-). Learn Mem. 2000; 7:97-103.

Conrad CD, MacMillan DD 2nd, Tsekhanov S, Wright RL, Baran SE, Fuchs RA. Influence of chronic corticosterone and glucocorticoid receptor antagonism in the amygdala on fear conditioning. Neurobiol Learn Mem. 2004; 81(3):185-99.

Cordero MI, Kruyt ND, Merino JJ, Sandi C. Glucocorticoid involvement in memory formation in a rat model for traumatic memory. Stress. 2002; 5(1):73-9.

Dal-Zotto S, Martí O, Armario A. Glucocorticoids are involved in the long-term effects of a single immobilization stress on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. Psychoneuroendocrinology. 2003; 28(8):992-1009.

Davis M. The role of the amygdala in fear and anxiety. Annu Rev Neurosci. 1992;15:353-75.

Davis M. The role of the amygdala in fear and anxiety. Annu Rev Neurosci. 1992; 15:353-75.

de Kloet ER, Joëls M, Holsboer F. Stress and the brain: from adaptation to disease. Nat Rev Neurosci. 2005; 6(6):463-75.

de Kloet ER, Oitzl MS, Joëls M. Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys? Trends Neurosci. 1999; 22(10):422-6.

de Quervain D, Schwabe L, Roozendaal B. Stress, glucocorticoids and memory: implications for treating fear-related disorders. Nat Rev Neurosci. 2017; 18(1):7-19.

de Quervain DJ, Roozendaal B, McGaugh JL. Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory. Nature. 1998; 394(6695):787-90.

Drevets WC, Videen TO, Price JL, Preskorn SH, Carmichael ST, Raichle ME. A functional anatomical study of unipolar depression. J Neurosci. 1992; 12(9): 3628-41.

Duque EA, Munhoz CD. The Pro-inflammatory Effects of Glucocorticoids in the Brain. Front Endocrinol. 2016; 7: 78.

Duvarci S, Pare D. Glucocorticoids enhance the excitability of principal basolateral amygdala neurons. J Neurosc.i. 2007; 27:4482-4491.

Falls WA, Miserendino MJ, Davis M. Extinction of fear-potentiated startle: blockade by infusion of an NMDA antagonist into the amygdala. J Neurosci. 1992; 12(3):854-63.

Fanselow MS, Bolles RC. Naloxone and shock-elicited freezing in the rat. J Comp Physiol Psychol. 1979; 93(4):736-44.

Farrell MR, Sayed JA, Underwood AR, Wellman CL. Lesion of infralimbic cortex occludes stress effects on retrieval of extinction but not fear conditioning. Neurobiol Learn Mem. 2010; 94: 240–246.

Fendt M, Fanselow MS. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. Neurosci Biobehav Rev. 1999; 23(5):743-60.

Foa EB, Zinbarg R, Rothbaum BO. Uncontrollability and unpredictability in posttraumatic stress disorder: an animal model. Psychol Bull. 1992; 112:218–38.

Fox C, Merali Z, Harrison C. Therapeutic and protective effect of environmental enrichment against psychogenic and neurogenic stress. Behav Brain Res. 2006; 75:1-8.

Francis DD, Diorio J, Plotsky PM, Meaney MJ. Environmental enrichment reverses the effects of maternal separation on stress reactivity. J Neurosci. 2002; 22:7840-7843.

Friske JE, Gammie SC. Environmental enrichment alters plus maze, but not maternal defense performance in mice. Physiol Behav. 2005; 85(2):187-94.

Gallagher M, Holland PC. The amygdala complex: multiple roles in associative learning and attention. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994; 91(25):11771-6.

Ganon-Elazar E, Akirav I. Cannabinoid receptor activation in the basolateral amygdala blocks the effects of stress on the conditioning and extinction of inhibitory avoidance. J Neurosci. 2009; 29: 11078–11088.

Ganon-Elazar E, Akirav I. Cannabinoid receptor activation in the basolateral amygdala blocks the effects of stress on the conditioning and extinction of inhibitory avoidance. J Neurosci. 2009; 29: 11078–11088.

Gore F, Schwartz EC, Brangers BC, Aladi S, Stujenske JM, Likhtik E, Russo MJ, Gordon JA, Salzman CD, Axel R. Neural Representations of Unconditioned Stimuli in Basolateral Amygdala Mediate Innate and Learned Responses. Cell. 2015; 162(1):134-45.

Grillo CA, Risher M, Macht VA, Bumgardner AL, Hang A, Gabriel C et al. Repeated restraint stress-induced atrophy of glutamatergic pyramidal neurons and decreases in glutamatergic efflux in the rat amygdala are prevented by the antidepressant agomelatine. Neuroscience. 2015; 284: 430–443.

Gross C, Hen R. The developmental origins of anxiety. Nat Rev Neurosci. 2004; 5:545-552.

Hale MW, Bouwknecht JA, Spiga F, Shekhar A, Lowry CA. Exposure to high- and lowlight conditions in an open-field test of anxiety increases c-Fos expression in specific subdivisions of the rat basolateral amygdaloid complex. Brain Res Bull. 2006; 71: 174– 182.

Hatfield T1, Han JS, Conley M, Gallagher M, Holland P. Neurotoxic lesions of basolateral, but not central, amygdala interfere with Pavlovian second-order conditioning and reinforcer devaluation effects. J Neurosci. 1996; 16(16):5256-65.

Haubensak W, Kunwar PS, Cai H, Ciocchi S, Wall NR, Ponnusamy R, Biag J, Dong HW, Deisseroth K, Callaway EM, Fanselow MS, Lüthi A, Anderson DJ. Genetic dissection of an amygdala microcircuit that gates conditioned fear. Nature. 2010; 468(7321):270-6.

Herry C, Ciocchi S, Senn V, Demmou L, Müller C, Lüthi A. Switching on and off fear by distinct neuronal circuits. Nature. 2008; 454(7204):600-6.

Herry C, Ferraguti F, Singewald N, Letzkus JJ, Ehrlich I, Lüthi A. Neuronal circuits of fear extinction. Eur J Neurosci. 2010; 31(4):599-612.

Hobin JA, Goosens KA, Maren S. Context-dependent neuronal activity in the lateral amygdala represents fear memories after extinction. J Neurosci. 2003; 23(23):8410-6.

Hoffman AN, Lorson NG, Sanabria F, Foster Olive M, Conrad CD. Chronicstress disrupts fear extinction and enhances amygdala and hippocampal Fos expression in an animal model of post-traumatic stress disorder. Neurobiol Learn Mem. 2014; 112: 139–147.

Holmes A, Wellman CL. Stress-induced prefrontal reorganization and executive dysfunction in rodents. Neurosci Biobehav Rev. 2009; 33: 773–783.

Holmes NM, Parkes SL, Killcross AS, Westbrook RF. The basolateral amygdala is critical for learning about neutral stimuli in the presence of danger, and the perirhinal cortex is critical in the absence of danger. J Neurosci. 2013; 33(32):13112-25.

Hull AM. Neuroimaging findings in post-traumatic stress disorder. Systematic review. Br J Psychiatry. 2002; 181:102–110.

Huzard D, Mumby DG, Sandi C, Poirier GL, van der Kooij MA. The effects of extrinsic stress on somatic markers and behavior are dependent on animal housing conditions. Physiol Behav. 2015; 151:238-45.

Izquierdo A, Wellman CL, Holmes A. Brief uncontrollable stress causes dendritic retraction in infralimbic cortex and resistance to fear extinction in mice. J Neurosci. 2006; 6: 5733–5738.

Janak PH, Tye KM. From circuits to behaviour in the amygdala. Nature. 2015; 517(7534):284-92.

Jimenez SA, Maren S. Nuclear disconnection within the amygdala reveals a direct pathway to fear. Learn Mem. 2009; 16(12):766-8.

Joëls M, Pu Z, Wiegert O, Oitzl MS, Krugers HJ. Learning under stress: how does it work? Trends Cogn Sci. 2006; 10(4):152-8.

Johansen JP, Hamanaka H, Monfils MH, Behnia R, Deisseroth K, Blair HT, LeDoux JE. Optical activation of lateral amygdala pyramidal cells instructs associative fear learning. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010; 107(28):12692-7.

KadmielM, Cidlowski A. Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. Trends Pharmacol Sci. 2013; 34(9): 518–530. Kaufer D, Ogle WO, Pincus ZS, Clark KL, Nicholas AC, Dinkel KM, et al. Restructuring the neuronal stress response with anti-glucocorticoid gene delivery. Nat Neurosci. 2004; 7(9):947-53.

Kavushansky A, Richter-Levin G. Effects of stress and corticosterone on activity and plasticity in the amygdala. J Neurosci Res. 2006; 84:1580-1587.

Kellett J, Kokkinidis L. Extinction deficit and fear reinstatement after electrical stimulation of the amygdala: implications for kindling-associated fear and anxiety. Neuroscience. 2001; 127(2):277-87.

Kim H, Yi JH, Choi K, Hong S, Shin KS, Kang SJ. Regional differences in acute corticosterone-induced dendritic remodeling in the rat brain and their behavioral consequences. BMC Neuroscience. 2014; 15:65.

Kim J, Pignatelli M, Xu S, Itohara S, Tonegawa S. Antagonistic negative and positive neurons of the basolateral amygdala. Nat Neurosci. 2016; 19(12):1636-1646.

Kirby ED, Friedman AR, Covarrubias D, Ying C, Sun WG, Goosens KA, Sapolsky RM, Kaufer D. Basolateral amygdala regulation of adult hippocampal neurogenesis and fear-related activation of newborn neurons. Mol Psychiatry. 2012; 17(5):527-36.

Kluge M, Schüssler P, Künzel HE, Dresler M, Yassouridis A, Steiger A. Increased nocturnal secretion of ACTH and cortisol in obsessive compulsive disorder. J Psychiatr Res. 2007; 41(11):928-33.

Knapska E, Radwanska K, Werka T, Kaczmarek L. Functional internal complexity of amygdala: focus on gene activity mapping after behavioral training and drugs of abuse. Physiol. Rev. 2007; 87, 1113–1173.

Knox D, George SA, Fitzpatrick CJ, Rabinak CA, Maren S, Liberzon I. Single prolonged stress disrupts retention of extinguished fear in rats. Learn Mem. 2012a; 19:43–9.

Knox D, Nault T, Henderson C, Liberzon I. Glucocorticoid receptors and extinc-tion retention deficits in the single prolonged stress model. Neuroscience. 2012b; 223:163–73.

Koe AS, Ashokan A, Mitra, R. Short environmental enrichment in adulthood reverses anxiety and basolateral amygdala hypertrophy induced by maternal separation. Transl. Psychiatry. 2016; 6, 1-7. Kuhlmann S, Wolf OT. Arousal and cortisol interact in modulating memory consolidation in healthy young men. Behav Neurosci. 2006; 120(1):217-23.

LaBar KS, Gatenby JC, Gore JC, LeDoux JE, Phelps EA. Human amygdala activation during conditioned fear acquisition and extinction: a mixed-trial fMRI study. Neuron. 1998; 20(5):937-45.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970; 15;227(5259):680-5.

Laurent V, Marchand AR, Westbrook RF. The basolateral amygdala is necessary for learning but not relearning extinction of context conditioned fear. Learn Mem. 2008; 15(5):304-14.

Laurent V, Westbrook RF. Distinct contributions of the basolateral amygdala and the medial prefrontal cortex to learning and relearning extinction of context conditioned fear. Learn Mem. 2008; 15(9):657-66.

Laurent V, Westbrook RF. Inactivation of the infralimbic but not the prelimbic cortex impairs consolidation and retrieval of fear extinction. Learn Mem. 2009; 25;16(9):520-9.

Laurent V, Westbrook RF. Role of the basolateral amygdala in the reinstatement and extinction of fear responses to a previously extinguished conditioned stimulus. Learn Mem. 2010; 17(2):86-96.

Ledgerwood L, Richardson R, Cranney J. Effects of D-cycloserine on extinction of conditioned freezing. Behav Neurosci. 2003; 117(2):341-9.

LeDoux JE. Emotion circuits in the brain. Annu Rev Neurosci. 2000; 23:155-84.

LeDoux JE. The emotional brain, fear, and the amygdala. Cell Mol Neurobiol. 2003; 23(4-5):727-38.

Lee H1, Kim JJ. Amygdalar NMDA receptors are critical for new fear learning in previously fear-conditioned rats. J Neurosci. 1998; 18(20):8444-54.

Livneh U, Paz R. Aversive-bias and stage-selectivity in neurons of the primate amygdala during acquisition, extinction, and overnight retention. J. Neurosci. 2012; 32, 8598–8610.

Long VA, Fanselow MS. Stress-enhanced fear learning in rats is resistant to the effects of immediate massed extinction. Stress. 2012; 15: 627–636.

Maren S, Chang CH. Recent fear is resistant to extinction. Proc Natl Acad Sci. 2006; 21: 18020–18025.

Maren S, Phan KL, Liberzon I. The contextual brain: implications for fear conditioning, extinction and psychopathology. Nat Rev Neurosci. 2013; 14(6):417-28.

Maren S, Quirk GJ. Neuronal signalling of fear memory. Nat Rev Neurosci. 2004; 5:844-52.

Maren S, Yap SA, Goosens KA. The amygdala is essential for the development of neuronal plasticity in the medial geniculate nucleus during auditory fear conditioning in rats. J Neurosci. 2001; 21(6):RC135.

Maroun M, Ioannides PJ, Bergman KL, Kavushansky A, Holmes A, Wellman CL. Fear extinction deficits following acute stress associate with increased spine density and dendritic retraction in basolateral amygdala neurons. Eur J Neurosci. 2013; 38: 2611–2620.

McDonald AJ. Cortical pathways to the mammalian amygdala. Prog Neurobiol. 1998; 55(3):257-332.

McEwen BS, Eiland L, Hunter RG, Miller MM. Stress and anxiety: structural plasticity and epigenetic regulation as a consequence of stress. Neuropharmacology. 2012; 62(1):3-12.

McEwen BS, Gray JD, Nasca C. 60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: Redefining neuroendocrinology: stress, sex and cognitive and emotional regulation. J Endocrinol. 2015; 226(2):T67-83.

McEwen BS, Sapolsky RM. Stress and cognitive function. Curr Opin Neurobiol. 1995; 5(2):205-16.

McEwen BS. Plasticity of the hippocampus: adaptation to chronic stress and allostatic load. Ann N Y Acad Sci. 2001; 933:265-77.

McFarlane AC. The long-term costs of traumatic stress: intertwined physical and psychological consequences. World Psychiatry. 2010; 9:3–10.

McGaugh JL, Roozendaal B. Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain. Curr Opin Neurobiol. 2002; 12(2):205-10.

McGaugh JL. The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. Annu Rev Neurosci. 2004; 27:1-28.

McIntyre CK, McGaugh JL, Williams CL. Interacting brain systems modulate memory consolidation. Neurosci Biobehav Rev. 2012; 36(7):1750-62.

Meyer RM, Burgos-Robles A, Liu E, Correia SS, Goosens KA. A ghrelin-growth hormone axis drives stress-induced vulnerability to enhanced fear. Mol Psychiatry. 2014; 19(12): 1284–1294.

Milad MR, Quirk GJ. Fear extinction as a model for translational neuroscience: ten years of progress. Annu Rev Psychol. 2012; 63:129-51.

Mitra R, Ferguson D, Sapolsky RM. SK2 potassium channel over-expression in basolateral amygdala reduces anxiety, stress-induced corticosterone and dendritic arborization. Mol. Psychiatry. 2009; 14 (9): 847-827.

Mitra R, Jadhav S, McEwen BS, Vyas A, Chattarji S. Stress duration modulates the spatiotemporal patterns of spine formation in the basolateral amygdala. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2005; 102:9371–9376.

Mitra R, Sapolsky RM. Expression of chimeric estrogen-glucocorticoid-receptor in the amygdala reduces anxiety. Brain Research. 2010; 1342:33-38.

Mitra R, Sapolsky RM. Acute corticosterone treatment is sufficient to induce anxiety and amygdaloid dendritic hypertrophy. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008; 105:5573-5578.

Mohammed AH, Zhu SW, Darmopil S, Hjerling-Leffler J, Ernfors P, Winblad B, Diamond MC, Eriksson PS, Bogdanovic N. Environmental enrichment and the brain. Progress in brain research. 2002; 138:109-133.

Moncek F, Duncko R, Johansson BB, Jezova D. Effect of environmental enrichment on stress related systems in rats. J Neuroendocrinol. 2004; 16(5):423-31.

Morgan M, LeDoux J. Differential contribution of dorsal and ventral medial prefrontal cortex to the acquisition and extinction of conditioned fear in rats. Behav Neurosci. 1995; 109: 681–688.

Morley-Fletcher S, Rea M, Maccari S, Laviola G. Environmental enrichment during adolescence reverses the effects of prenatal stress on play behaviour and HPA axis reactivity in rats. Eur J Neurosci. 2003; 18(12):3367-74.

Muigg, P, Hetzenauer, A, Hauer, G, Huschild, M, Gaburro, S, & Frank, E. Impaired extinction of learned fear in rats selectively bred for high anxiety- Evidence of altered neuronal processing in prefrontal-amygdala pathways. Eur J Neurosci. 2008; 28, 2299–2309.

Muramoto K, Ono T, Nishijo H, Fukuda M. Rat amygdaloid neuron responses during auditory discrimination. Neuroscience. 1993; 52, 621–636.

Myers KM, Davis M. Behavioral and neural analysis of extinction. Neuron. 2002; 36(4):567-84.

Namburi P, Beyeler A, Yorozu S, Calhoon GG, Halbert SA, Wichmann R, Holden SS, Mertens KL, Anahtar M, Felix-Ortiz AC, Wickersham IR, Gray JM, Tye KM. A circuit mechanism for differentiating positive and negative associations. Nature. 2015; 520(7549):675-8.

Nieminen SA, Sirvio J, Teittinen K, Pitkanen A, Airaksinen MM, Riekkinen P. Amygdala kindling increased fear-response, but did not impair spatial memory in rats. Physiology & behavior. 1992; 51:845-849.

Novaes LS, Dos Santos NB, Batalhote RF, Malta MB, Camarini R, Scavone C, Munhoz CD. Environmental enrichment protects against stress-induced anxiety: Role of glucocorticoid receptor, ERK, and CREB signaling in the basolateral amygdala. Neuropharmacology. 2017; 113:457-466.

Okuda S, Roozendaal B, McGaugh JL. Glucocorticoid effects on object recognition memory require training-associated emotional arousal. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004; 101(3):853-8.

Orr SP, Metzger LI, Pitman RK. Psychophysiology of post-traumatic stress disorder Psychiatr Clin North Am 2002; 25:279-935(2):271–93.

Otto C1, Reichardt HM, Schütz G. Absence of glucocorticoid receptor-beta in mice. J Biol Chem. 1997; 272(42):26665-8.

Padival MA, Blume SR, Rosenkranz JA. Repeated restraint stress exerts different impact on structure of neurons in the lateral and basal nuclei of the amygdala. Neuroscience. 2013; 246: 230–242.

Patel PD, Lopez JF, Lyons DM, Burke S, Wallace M, Schatzberg AF. Glucocorticoid and mineralocorticoid receptor mRNA expression in squirrel monkey brain. Journal of Psychiatric Research. 2000; 34:383–392.

Paton JJ, Belova MA, Morrison SE, Salzman CD. The primate amygdala represents the positive and negative value of visual stimuli during learning. Nature. 2006; 439, 865–870.

Pelletier JG, Likhtik E, Filali M, Paré D. Lasting increases in basolateral amygdala activity after emotional arousal: implications for facilitated consolidation of emotional memories. 2005; 12(2):96-102.

Perusini JN, Meyer EM, Long VA, Rau V, Nocera N, Avershal J, Maksymetz J, Spigelman I, Fanselow MS. Induction and Expression of Fear Sensitization Caused by Acute Traumatic Stress. Neuropsychopharmacology. 2016; 41(1):45-57.

Pessoa L, McKenna M, Gutierrez E, Ungerleider LG. Neural processing of emotional faces requires attention. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002; 99(17):11458-63.

Phelps EA, LeDoux JE. Contributions of the amygdala to emotion processing: from animal models to human behavior. Neuron. 2005; 48(2):175-87.

Pietropaolo S, Feldon J, Yee, BK. Environmental enrichment eliminates the anxiety phenotypes in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. Cogn Affect Behav Neurosci. 2014; 14:996-1008.

Pitman RK, Rasmusson AM, Koenen KC, Shin LM, Orr SP, Gilbertson MW, Milad MR, Liberzon I. Biological studies of post-traumatic stress disorder. Nat Rev Neurosci. 2012; 13(11):769-87.

Pryce, CR. Postnatal ontogeny of expression of the corticosteroid receptor genes in mammalian brains: Inter-species and intra-species differences. Brain Research Reviews. 2008; 57:596–605.

Quirk GJ, Mueller D. Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. Neuropsychopharmacology. 2008; 33(1):56-72.

Quirk GJ, Repa C, LeDoux JE. Fear conditioning enhances short-latency auditory responses of lateral amygdala neurons: parallel recordings in the freely behaving rat. Neuron. 1995; 15:1029-39.

Quirk GJ, Russo GK, Barron JL, Lebron K (2000). The role of ventromedial prefrontal cortex in the recovery of extinguished fear. J Neurosci. 2000; 20: 6225–6231.

Radley JJ, Rocher AB, Rodriguez A, Ehlenberger DB, Dammann M, McEwen BS, Morrison JH, Wearne SL, Hof PR. Repeated stress alters dendritic spine morphology in the rat medial prefrontal cortex. J Comp Neurol. 2008; 507(1):1141-50.

Rao RP, Anilkumar S, McEwen B, Chattarji S. Glucocorticoids protect against the delayed behavior and cellular effects of acute stress on the amygdala. Biol. Psychiatry. 2012; 72 (6), 466-475.

Ratman R, Berghe WV, Dejager L, Libert C, Tavernier J, Beck IM, de Bosscher K. How glucocorticoid receptors modulate the activity of other transcription factors: a scope beyond tethering. Mol Cell Endocrinol. 2013; 380(1-2):41-54.

Rauch SL, Shin LM, Phelps EA. Neurocircuitry models of posttraumatic stress disorder and extinction: Human neuroimaging research:past, present, and future. Biol. Psychiatry. 2006; 60:376-382.

Ravenelle R, Santolucito HB, Byrnes EM, Byrnes JJ, Donaldson ST. Housing environment modulates physiological and behavioral responses toanxiogenic stimuli in trait anxiety male rats. Neuroscience. 2014; 270, 76–87.

Repa JC, Muller J, Apergis J, Desrochers TM, Zhou Y, LeDoux JE. Two different lateral amygdala cell populations contribute to the initiation and storage of memory. Nat Neurosci. 2001; 4(7):724-31.

Ressler KJ, Nemeroff CB. Role of norepinephrine in the pathophysiology and treatment of mood disorders. Biol Psychiatry. 1999; 46(9):1219-33.

Rodrigues SM, LeDoux JE, Sapolsky RM.The influence of stress hormones on fear circuitry. Annual review of neuroscience. 2009; 32:289-313.

Rodriguez Manzanares PA, Isoardi NA, Carrer HF, Molina VA. Previous stress facilitates fear memory, attenuates GABAergic inhibition, and increases synaptic plasticity in the rat basolateral amygdala. J Neurosci. 2005; 25:8725-8734.

Romanski LM, Clugnet MC, Bordi F, LeDoux JE. Somatosensory and auditory convergence in the lateral nucleus of the amygdala. Behav. Neurosci. 1993; 107, 444–450.

Roozendaal B, McGaugh JL. Amygdaloid nuclei lesions differentially affect glucocorticoid-induced memory enhancement in an inhibitory avoidance task. Neurobiol Learn Mem. 1996; 65(1):1-8.

Roozendaal B, Williams CL, McGaugh JL. Glucocorticoid receptor activation in the rat nucleus of the solitary tract facilitates memory consolidation: involvement of the basolateral amygdala. Eur J Neurosci. 1999; 11(4):1317-23.

Roozendaal B, Williams CL, McGaugh JL. Glucocorticoid receptor activation in the rat nucleus of the solitary tract facilitates memory consolidation: involvement of the basolateral amygdala. Eur J Neurosci. 1999;11(4):1317-23.

Rosen JB, Schulkin J. From normal fear to pathological anxiety. Psychological review. 1998; 105:325-350.

Rothbaum BO, Davis M. Applying learning principles to the treatment of post-trauma reactions. Ann N Y Acad Sci. 2003; 1008:112-21.

Roy V, Belzung C, Delarue C, Chapillon P. Environmental enrichment inBALB/c mice: effects in classical tests of anxiety and exposure to a predatoryodor. Physiol. Behav. 2001; 74, 313–320.

Russo SJ, Wilkinson MB, Mazei-Robison MS, Dietz DM, Maze I, Krishnan V, Renthal W, Graham A, Birnbaum SG, Green TA, Robison B, Lesselyong A, Perrotti LI, Bolaños CA, Kumar A, Clark MS, Neumaier JF, Neve RL, Bhakar AL, Barker PA, Nestler EJ. Nuclear factor kappa B signaling regulates neuronal morphology and cocaine reward. J Neurosci. 2009;18;29(11):3529-37.

Sah P, Faber ES, Lopez De Armentia M, Power J. The amygdaloid complex: anatomy and physiology. Physiol Rev. 2003; 83(3):803-34.

Salzman CD, Fusi S. Emotion, cognition, and mental state representation in amygdala and prefrontal cortex. Annu Rev Neurosci. 2010; 33:173-202.

Santini E, Quirk GJ, Porter JT. Fear conditioning and extinction differentially modify the intrinsic excitability of infralimbic neurons. J Neurosci. 2008; 28(15):4028-36.

Sapolsky RM. Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. Arch Gen Psychiatry. 2000; 57(10):925-35.

Sarter M, Markowitsch HJ. Involvement of the amygdala in learning and memory: a critical review, with emphasis on anatomical relations. Behav Neurosci. 1985; 99(2):342-80.

Shin, LM, Wright, CI, Cannistraro, PA, Wedig, MM, McMullin, K, Martis, B, Macklin, ML, Lasko, NB, Cavanagh, SR, Krangel, TS, Orr, SP, Pitman, R, Whalen, k, Rauch, PJSL. A functional magnetic resonance imaging study of amygdala and medial prefrontal cortex responses to overtly presented fearful faces in posttraumatic stress disorder. Arch. Gen. Psychiatry. 2005; 62, 273-281.

Shumake J, Barrett D, Gonzalez-Lima F. Behavioral characteristics of rats predisposed to learned helplessness: Reduced reward sensitivity, increased novelty seeking, and persistent fear memories. Behav Brain Res. 2005; 164: 222–230.

Sierra-Mercado D, Padilla-Coreano N, Quirk GJ. Dissociable roles of prelimbic and infralimbic cortices, ventral hippocampus, and basolateral amygdala in the expression and extinction of conditioned fear. Neuropsychopharmacology. 2011;36(2):529-38.

Silveira MC, Sandner G, Graeff FG. Induction of Fos immunoreactivity in the brain by exposure to the elevated plus-maze. Behav Brain Res. 1993; 56: 115–118.

Simmons AN, Matthews SC, Strigo IA, Baker DG, Donovan HK, Motezadi A, Stein MB, Paulus MP. Altered amygdala activation during face processing in Iraqi and Afghanistani war veterans. Biol Mood Anxiety Disord. 2011; 12;1(1):6.

Singewald N, Schmuckermair C, Whittle N, Holmes A, Ressler KJ. Pharmacology of cognitive enhancers for exposure-based therapy of fear, anxiety and trauma-related disorders. Pharmacol Ther. 2015; 149:150-90.

Soravia LM, Heinrichs M, Aerni A, Maroni C, Schelling G, Ehlert U, Roozendaal B, de Quervain DJ. Glucocorticoids reduce phobic fear in humans. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006; 103(14):5585-90.

Stuber GD, Sparta DR, Stamatakis AM, van Leeuwen WA, Hardjoprajitno JE, Cho S, Tye KM, Kempadoo KA, Zhang F, Deisseroth K, Bonci A. Excitatory transmission from the amygdala to nucleus accumbens facilitates reward seeking. Nature. 2011; 475(7356):377-80.

Thompson BM, Baratta MV, Biedenkapp JC, Rudy JW, Watkins LR, Maier SF. Activation of the infralimbic cortex in a fear context enhances extinction learning. Learn Mem. 2010; 17(11):591-9.

Toledo-Rodriguez M, Pitiot A, Paus T, Sandi C. Stress during puberty boosts metabolic activation associated with fear-extinction learning in hippocampus, basal amygdala and cingulate cortex. Neurobiol Learn Mem. 2012; 98: 93–101.

Vallès A, Martí O, Armario A. Long-term effects of a single exposure to immobilization stress on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: transcriptional evidence for a progressive desensitization process. Eur J Neurosci. 2003; 18(6):1353-61.

van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Neural consequences of environmental enrichment. Nat Rev Neurosci 2000;1:191-198.

Vuilleumier P, Armony JL, Driver J, Dolan RJ. Effects of attention and emotion on face processing in the human brain: an event-related fMRI study. Neuron. 2001; 30(3):829-41.

Vyas A, Jadhav S, Chattarji S. Prolonged behavioral stress enhances synaptic connectivity in the basolateral amygdala. Neuroscience. 2006; 143: 387–393.

Vyas A, Mitra R, Shankaranarayana RBS, Chattarji S. Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. J Neurosci. 2002; 22:6810-6818.

Walker DL, Ressler KJ, Lu KT, Davis M. Facilitation of conditioned fear extinction by systemic administration or intra-amygdala infusions of D-cycloserine as assessed with fear-potentiated startle in rats. J Neurosci. 2002; 22(6):2343-51.

Wang DV, Wang F, Liu J, Zhang L, Wang Z, Lin L. Neurons in the amygdala with response-selectivity for anxiety in two ethologically based tests. PLoS One. 2011; 6(4):e18739.

Welberg L, Thrivikraman KV, Plotsky PM. Combined pre- and postnatal environmental enrichment programs the HPA axis differentially in male and female rats. Psychoneuroendocrinology. 2006; 31(5):553-64.

Wilber AA, Walker AG, Southwood CJ, Farrell MR, Lin GL, Rebec GV et al. Chronic stress alters neural activity in medial prefrontal cortex during retrieval of extinction. Neuroscience. 2011; 174: 115–131.

Wolff SB, Grundemann J, Tovote P, Krabbe S, Jacobson GA, Muller C, Herry C, Ehrlich I, Friedrich RW, Letzkus JJ, Luthi A. Amygdala interneuron subtypes control fear learning through disinhibition. Nature. 2014; 509, 453–458.

Xu L, Anwyl R, Rowan MJ. Behavioural stress facilitates the induction of long-term depression in the hippocampus. Nature. 1997; 387(6632):497-500.

Xu L, Anwyl R, Rowan MJ. Spatial exploration induces a persistent reversal of longterm potentiation in rat hippocampus. Nature. 1998; 394(6696):891-4.

Yamamoto S, Morinobu S, Fuchikami M, Kurata A, Kozuru T, Yamawaki S. Effects of single prolonged stress and D-cycloserine on contextual fear extinction and hippocampal NMDA receptor expression in a rat model of PTSD. Neuropsychopharmacology. 2008; 33: 2108–2116.

Yamamoto S, Morinobu S, Fuchikami M, Kurata A, Kozuru T, Yamawaki S. Effects of single prolonged stress and D-cycloserine on contextual fear extinction and hippocampal NMDA receptor expression in a rat model of PTSD. Neuropsychopharmacology. 2008; 33: 2108–2116.

Yang YL, Chao PK, Lu KT. Systemic and intra-amygdala administration of glucocorticoid agonist and antagonist modulate extinction of conditioned fear. Neuropsychopharmacology. 2006; 31(5):912-24.

Yehuda R, LeDoux J. Response variation following trauma: a translational neuroscience approach to understanding PTSD. Neuron. 2007; 56(1):19-32.

Yehuda R. Advances in understanding neuroendocrine alterations in PTSD and their therapeutic implications. Ann N Y Acad Sci. 2006; 1071:137-66.

Yehuda R. Biology of posttraumatic stress disorder. J Clin Psychiatry. 2001; 62(17):41-6.

Yehuda R. Post-traumatic stress disorder. N Engl J Med. 2002; 346:108–14.

Yiu AP, Mercaldo V, Yan C, Richards B, Rashid AJ, Hsiang HL, Pressey J, Mahadevan V, Tran MM, Kushner SA, Woodin MA, Frankland PW, Josselyn SA. Neurons are recruited to a memory trace based on relative neuronal excitability immediately before training. Neuron. 2014; 83(3):722-35.

Zoladz PR, Clark B, Warnecke A, Smith L, Tabar J, Talbot JN. Pre-learning stress differentially affects long-term memory for emotional words, depending on temporal proximity to the learning experience. Physiol Behav. 2011; 103(5):467-76.

ANEXO I – Manuscrito submetido para publicação

Manuscript Details

Manuscript number PNEC_2018_122

Title Environmental enrichment prevents acute restraint stress-induced anxiety- related behavior but not changes in basolateral amygdala spine density

Article type Short Communication

Abstract

Previous studies have shown that acute restraint stress or transient elevation of glucocorticoid (GC) stress hormones produces emergent changes in both anxiety behavior and dendritic branches in the basolateral amygdala complex (BLA) of rats. In this work, we demonstrate that exposure to environmental enrichment (EE) prevented stress-induced increases in anxiety (emerging 10 days post-stress) in adult rats but did not prevent either stress-induced dendritic branch remodeling in the BLA nor stress-induced enhancement of GC serum levels.

Keywords stress; anxiety; environmental enrichment; basolateral amygdala; spine remodeling

	Manuscript category	Preclinical studies
	Corresponding Author	Carolina Demarchi Munhoz
ding	Correspon Author's	University of Sao Paulo - Institute of Biomedical Sciences

Institution

Order of Authors Leonardo Santana Novaes, Nilton Barreto dos Santos, Juliano Genaro Perfetto, Ki Ann Goosens, Carolina Demarchi Munhoz

Suggested reviewers Israel Liberzon, Michael Fanselow, Rupshi Mitra, Marian Joels

Submission Files Included in this PDF

File Name [File Type]

Novaes et al - Psychoneuroendocrinol - cover letter.pdf [Cover Letter] Novaes et al - Highlights.pdf [Highlights]

Novaes_et_al_Psychoneuroendocrinology_Short-communication.docx [Manuscript File] Novaes et al-Figure 1.tif [Figure]
Novaes et al-Figure 2.tif [Figure]

Novaes et al - Conflict of Interests.pdf [Conflict of Interest]

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE Homepage, then click 'Download zip file'.

Research Data Related to this Submission

There are no linked research data sets for this submission. The following reason is given: Data will be made available on request

February 19, 2018

Dr. Robert Dantzer Editor-in-chief Symptom Research,

MD Anderson Cancer Center 1400 Pressler Street Houston, Texas, TX 77030

Dear Dr. Dantzer,

Attached, please find a manuscript entitled, "Environmental enrichment prevents acute restraint stress-induced anxiety-related behavior but not changes in basolateral amygdala spine density" that we are submitting for consideration as a Short Communication in *Psychoneuroendocrinology*.

There is an enormous literature linking stress and glucocorticoids, one of the mediators of stress effects, to subsequent depressive and anxiety like-behaviors. Some studies have linked glucocorticoids to emergent changes in both anxiety behavior and dendritic branches in the basolateral amygdaloid complex (BLA) of rats. The present paper increases this knowledge in a substantial way. Specifically, we report here that environmental enrichment can protect rats from the acute restraint stress-induced late anxiety- related behavior (emerging 10 days post-stress) without preventing either stress-induced dendritic branch remodeling in the BLA or stress-induced enhancement of GC serum levels. This is the first report showing this disconnection between stress and subsequent BLA dendritic branch remodeling and anxiety- related behavior.

Because the paper concerns a subject that is fascinating from a mechanistic standpoint and of considerable clinical relevance, we think it will be of interest to the readership of this prestigious journal.

We also report no biomedical, financial or other potential conflicts of interest. These results are original research, have not been published previously, and are not under consideration for publication elsewhere.

Thank you for your consideration of this paper. Sincerely,

Carolina D. Munhoz, Ph.D. Department of Pharmacology Institute of Biomedical Sciences University of Sao Paulo

Av. Professor Lineu Prestes, 1524, sala 323 Phone: +55 11 30917990 Email: cdmunhoz@usp.br

<u>Highlights</u>

EE prevents the emergent anxiety-like behavior induced by acute restraint stress

EE does not prevent stress-induced increase spine density in the BLA

EE does not prevent stress-induced increases in serum CORT levels

Title: Environmental enrichment prevents acute restraint stress-induced anxietyrelated behavior but not changes in basolateral amygdala spine density

Authors: Leonardo S. Novaesª, Nilton B. dos Santosª, Juliano Genaro Perfettoª, Ki Ann Goosens^b, Carolina Demarchi Munhoz^{a*}

Affiliation: ^aDepartment of Pharmacology, Institute of Biomedical Science, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, 05508-000. ^b Department of Neurology, Massachusetts General Hospital, Chaelestown, MA 02129, USA.

[•]Corresponding author: Carolina Demarchi Munhoz at Department of Pharmacology, Av. Professor Lineu Prestes, 1524, room 323. Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo - SP, 05508- 000, Brazil. Phone Number: + 55 11 3091 7990. Email: cdmunhoz@usp.br

Abstract

Previous studies have shown that acute restraint stress or transient elevation of glucocorticoid (GC) stress hormones produces emergent changes in both anxiety behavior and dendritic branches in the basolateral amygdala complex (BLA) of rats. In this work, we demonstrate that exposure to environmental enrichment (EE) prevented stress-induced increases in anxiety (emerging 10 days post-stress) in adult rats but did not prevent either stress-induced dendritic branch remodeling in the BLA nor stress-induced enhancement of GC serum levels.

Key words: stress; anxiety; environmental enrichment; basolateral amygdala; spine remodeling.

Introduction

Either acute restraint stress (2h) or systemic injection of corticosterone (CORT, a rodent GC) in rats leads to anxiety-like behavior and dendritic branches remodeling in the BLA 10- 12 days later (Mitra et al., 2005; Mitra and Sapolsky, 2008). In a previous study, we found that exposure to EE prevented anxiety-related behavior in adult rats observed immediately after acute restraint stress, but it is not yet known whether EE affects the persistent effects of acute stress (Novaes et al., 2017). Recent studies showed that EE reverses the effects of early life or repeated stress on anxiety-like behavior, BLA hypertrophy, and increases in CORT serum levels (Koe et al., 2016; Ashokan et al., 2016). Hence, this study sought to determine whether EE can prevent acute restraint stress from enhancing anxiety-related behavior and whether this protection is attributed to its influence over the BLA spine remodeling and CORT releasing.

Methods

Experiments were carried out in accordance with the guidelines of the Brazilian National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA), under the Brazilian National Law number 11794 from 10/08/2008. All experimental procedures were approved by the Ethical Committee for Animal Use of the Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Brazil (protocol number 028/2013). All efforts were taken to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used to the minimum required for detection of significant statistical effects. A total of 114 adult male *Wistar* rats (60 days of age upon arrival) were used for this study. All animals were randomly pair-housed in standard polypropylene cages throughout the first ten days (habituation period), after which half of the pairs were transferred to EE (where they remained for 14 consecutive days, pair-housed). The other half remained pair-housed in standard housing conditions, see Novaes et al. (2017). Animals were kept in a controlled temperature room (21 ± 2 °C) on a 12-hour light/dark cycle (lights on at 07:00 h) with free access to food and water.

Acute restraint stress

On the last EE day, half of the EE animals and half of the non-EE animals were stressed (within paired), while the others remained in their cages, undisturbed. The rats were transferred at 09:00 a.m. to the experimental room and restrained in ventilated PVC tubes for 2h. Immediately after the stress session, animals were placed, with the same cage mate, in standard cages, including animals from EE group. EE, non-stressed, animals were also transferred to standard cages.

Behavioral tests

Ten days after the acute restraint stress, animals were subjected to elevated plus maze (EPM) or open field (OF) tests to measure anxiety-like behavior. All trials were videotaped and the apparatuses were cleaned with 5% (vol/vol) ethanol after each trial. All behavioral tests were performed between 08:00 a.m. and 12:00 p.m.

Elevated plus maze

The EPM apparatus consisted of two open arms (50 x 10 cm) and two enclosed arms (50 x 10 cm, surrounded by a 40-cm-high wall), forming a plus-shape. The arms were connected by a central area (10 x 10 cm), and the maze was elevated 50 cm from the floor. Animal were placed in the center of the maze, facing one of the open arms, and were permitted to explore the maze for 5 minutes. Anxiety-like behavior was assessed as a function of decreased open arms exploration, measured by the total percentage of entries into the open arms and the total percentage of time spent on the open arms. An anxiety index was calculated as follows: anxiety index = 1 - [(time spent in open arms/total time on the maze) + (number of entries to the open arms/Total exploration on the maze) / 2]. Anxiety index values range from 0 to 1 where an increase in the index expresses increased anxiety-like behavior (Cohen et al., 2008). General locomotor activity was assessed by measuring the total distance traveled in the maze, using EthoVision software (Noldus, Netherlands).

Open field

The open field apparatus consisted of a circular arena (60 cm diameter) surrounded by a wall (50 cm-high). The arena was divided into four quadrants. A smaller circle (30 cm diameter) was drawn in the center of the arena, which further subdivided the arena into central (15 cm far from the wall, with 4 sections) and peripheral (with 8 sections) compartments. At the beginning of each trial, animals were placed in the peripheral compartment. Each trial lasted 5 min and the amount of time spent in the central compartment and the total percentage of squares crossed in the central compartment (in relation to the total squares crossed in the arena) were used as parameters to assess anxiety-related behavior. General locomotor activity was assessed by measuring the total squares crossed in the arena.

Euthanasia and CORT analysis

Immediately after stress or after behavior tests, rats were decapitated under deep isoflurane anesthesia. Blood was collected from the body trunk in non-heparinized 2 ml tubes, allowed to clot at room temperature for 30 min and then centrifuged at 4,000 rpm for 10 min. Serum was collected and stored at -80 °C. Concentrations of CORT serum were quantified using the Corticosterone EIA Kit® (Enzo Life Sciences). Serum samples were diluted 1:30 and processed following manufacturer's instructions.

Dendritic arborization

Following decapitation, the brain was removed and prepared using the Rapid Golgi Kit (FD NeuroTechnologies, Inc.) according to the manufacturer's instructions. Brains were incubated in impregnation solution for 14 days followed by incubation in cryoprotectant solution for 48h, coronally sliced (120 µm) using a Leica CM3050-S cryostat (Leica Biosystems), and mounted on gelatin coated slides. Brain sections were dehydrated in ethanol, diaphonized in xylene, and coverslipped. Images of the whole BLA were captured in bright field with Zeiss Axio Scan.Z1 (Zeiss), using a 40X objective and saved as TIFF files. The images were analyzed in ZEN 2 (Zeiss) software with magnification of 600X. A total of 80 neurons (5 neurons per animal, 4 animals per group) whit the soma completely localized in the BLA, heavily impregnated, without truncated dendrites, were analyzed. After neuronal soma identification, we classified each dendritic segment as primary (originating from the soma), secondary (originating from the primary branch), tertiary (originating from the secondary branch), and quaternary (originating from the tertiary branch). All protrusions originating from a dendrite, regardless of its morphologic classification, were considered spines. The dendritic branch length was calculated by the ZEN 2 software.

Statistical analysis

For results with more than 2 experimental groups, the statistical analyses were performed using two-way ANOVA, in which housing conditions (standard or EE) and stress (unexposed or exposed) were factors. *Post hoc* Tukey's multiple comparison test examined differences between individual groups. The OF test was analyzed with an unpaired two-tailed Mann-Whitney test. GraphPad Prism software 7.0 was used for

the statistical analyses and the level of statistical significance was p < 0.05. Data are presented as mean \pm SEM.

Results

EE protects against the late anxiety-like behavior triggered by 2h of acute restraint stress, as shown in Figure 1. Acute restraint stress reduced open arms entries (Fig. 1A) and time spent in the open arms (Fig. 1B) in standard-housed but not in enriched-housed animals. The anxiety index corroborates these results, insofar as we observed a higher anxiety index in non-EE, stressed animals compared to each of the other groups (Fig. 1C). Finally, there were no differences in the distance travelled in the EPM across the experimental groups, ensuring that neither housing conditions nor stress influenced locomotor activity (Fig. 1D). Similar results were observed in the OF test. The time spent (Fig. 1E) and the displacement (Fig. 1F) in the central compartment was higher in EE, stressed animals compared to non-EE, stressed animals, with no differences in the animals' motor activity between the groups (Fig. 1G).

Next, we evaluated dendritic morphology in the BLA. As depicted in Figure 2A, acute restraint stress increased, 10 days later, the spine density in all dendritic segments of both non-EE and EE animals compared to unstressed animals. We also investigated differences in two other dendritic arborization parameters, with no differences in both total dendritic length (Fig. 2B) and number of branch points (Fig. 2C) among all experimental groups. Multiple studies have linked stress-induced changes in CORT to subsequent hypertrophy of BLA neurons (Kim et al., 2014; Mitra and Sapolsky, 2008; Rao et al., 2012). Thus, we examined CORT serum levels in both EE and non-EE animals immediately after the restraint stress and 10 days later. We found significantly higher levels of CORT in both the stressed SC and EE groups immediately following stress (Fig. 2D), with no differences in CORT concentration 10 days later (Fig. 2E).

Discussion

Confirming previous findings (Mitra et al., 2005; Rao et al., 2012), our results showed that 2h of restraint stress promotes, 10 days later, anxiety-related behavior and increases the spine density in the BLA of the rats. Furthermore, in agreement with a previous report (Mitra et al., 2005), this acute restraint stress did not lead to changes in dendritic length or in the number of branch points, effects that are attributed to repeated restraint stress or exogenous administration of CORT (Mitra et al., 2005; Mitra and Sapolsky, 2008; Vyas et al., 2002). Moreover, we verified that prior EE exposure prevented the acute restraint stress-induced late anxiety-related behavior but not the stress-induced increase in spine density in the BLA.

Recent papers have shown the protective role of EE on sustained anxiety-related behavior promoted by 2 different types of repeated stress: maternal separation and repeated restraint-stress (Koe et al., 2016; Ashokan et al., 2016). In these studies, rats were exposed to EE concomitantly or after the stress stimulus. In contrast to our results, these papers showed that the EE exposure reverted both the stress-induced anxiety- related behavior and the dendritic remodeling in the BLA. In addition, Ashokan et al., (2016) found that EE housing blunted the acute effect of repeated stress exposition in the rising of CORT serum levels. As mentioned above, we also verified the protective role of EE on stress-induced increase in spine density in the BLA nor in the increasing levels of CORT. Accordingly, Novaes et al. (2017) showed a protective role of EE against the immediately effect of 1h of restraint stress on anxiety-like behavior, without any effect on CORT levels.

Altogether, our results contribute to relationship growing literature that suggests that stress, BLA dendritic branch remodeling, and the emergent anxiety-related behavior are somewhat dissociable phenomena. While a transient increase in CORT serum levels is sufficient to trigger BLA dendritic branch remodeling (Mitra and Sapolsky, 2008; Rao et al., 2012; Kim et al., 2014), the mechanism through which GCs alter spine density is not clear. On the other hand, it seems that transient increases in CORT serum levels and emergent of anxiety may be explicitly uncoupled as can dendritic remodeling in the BLA and emergent anxiety- related behavior. In accordance, Mitra et al., (2009) found that the hindrance in the rising of CORT serum

levels by acute restraint stress prevented the dendritic remodeling but not the emergence of anxiety-like behavior 10 days after, pointing out a disconnection between the BLA dendritic branch remodeling and anxiety-related behavior.

Figure legends

Figure 1. EE prevents the late anxiety-related behavior induced by 2h of acute restraint stress. Stressed animals housed in standard cages exhibited in EPM test reduced open arms entries (A) and time spent (B) compared to non-stressed animals housed in the same type of cage and to both stressed and non-stressed EE-animals. Stress increased the anxiety index in standard-housed but not in EE-housed rats (C). Neither stress nor housing conditions influenced the animal's locomotor activity in the EPM (D). Stressed animals showed less time spent (E) and displacement (F) in the center of OF if housed in standard cage. There were no differences in EE and non-EE, stressed animals in terms of displacement in the OF (G). Results are represented as mean \pm SEM (n = 10-14 animals for each group in A-D; n = 12 for each group in E-G). Two- way ANOVA (Tukey's multiple comparison test, A-D) and Mann-Whitney two-tailed test (E-F). Significance differences between groups are indicated as * (P < 0.05), ** (P < 0.01), *** (p < 0.001), and

**** (P < 0.0001). EE, environmental enrichment; SC, standard cage.

Figure 2. EE did not prevent the acute restraint stress-induced increase in spine density in the rat BLA. Stressed animals housed in both standard and enriched cages showed increase in spine density in all dendrite segments compared to non-stressed animals (A). Neither stress nor housing conditions changed the total dendritic length (B) or the total branch points (C) of the BLA neurons. Stressed animals (standard-housed and EE-housed) showed, immediately after stress, serum CORT levels significantly higher than the non- stressed animals (standard-housed and EE-housed, D). There were no main effects of stress or housing conditions in CORT serum levels 10 days after acute restraint stress (E). Representative images of secondary dendrites of BLA neurons (scale bar: 10 μ m; F). Results are represented as mean \pm SEM (n = 4

animals per group in A-C; n = 9-10 for each group in D; n = 8-12 for each group in E). Two-way ANOVA (Tukey's multiple comparison test). Significance differences between groups are indicated as * (P < 0.05),

** (P < 0.01), *** (p < 0.001), and **** (P < 0.0001) comparing to standard-housed, non-stressed animals;

*(P < 0.05), **(P < 0.01), ***(P < 0.001), and ****(P < 0.0001) comparing to EEhoused, non-stressed animals. EE, environmental enrichment; EE-Str, environmental enrichment, stressed; Pri, primary dendritic segment; Qua, quaternary dendritic segment; SC, standard cage; SC-Str, standard cage, stressed; Sec, secondary dendritic segment; Ter, tertiary dendritic segment.

Acknowledgments

We gratefully thank Guiomar Wiesel for technical assistance. This work was supported by research grants to C.D.M. from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP: 2008/55178-0, 2012/24727-4, and 2016/03572-3) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq: 479153/2009-4 and 422523/2016-0). L.S.N. was supported by FAPESP (2012/24002-0). N.B.S.

was supported by CNPq (160570/2012-3); C.D.M. is research fellow from CNPq.

References

Ashokan, A., Hegde, A., Mitra, R., 2016. Short-term environmental enrichment is sufficient to counter stress-induced anxiety and associated structural and molecular plasticity in basolateral amygdala. Psychoneuroendocrinology 69, 189-196.

Cohen, H., Matar, M.A., Buskila, D., Kaplan, Z., Zohar, J., 2008. Early poststressor intervention with high- dose corticosterone attenuates posttraumatic stress response in an animal model of posttraumatic stress disorder. Biol. Psychiatry 64 (8), 708-717 Kim, H., Yi, J.H., Choi, K., Hong, S., Shin, K.S., Kang, S.J., 2014. Regional differences in acute corticosterone-induced dendritic remodeling in the rat brain and their behavioral consequences. BMC Neuroscience 15:65.

Koe, A.S., Ashokan, A., Mitra, R., 2016. Short environmental enrichment in adulthood reverses anxiety and basolateral amygdala hypertrophy induced by maternal separation. Transl. Psychiatry 6, 1-7

Mitra, R., Sapolsky, R.M., 2008. Acute corticosterone treatment is sufficient to induce anxiety and amygdaloid dendritic hypertrophy. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105, 5573-5578.

Mitra, R., Jadhav, S., McEwen, B.S., Vyas, A., Chattarji, S., 2005. Stress duration modulates the spatiotemporal patterns of spine formation in the basolateral amygdala. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102, 9371-9376.

Mitra, R., Ferguson, D., Sapolsky, R.M., 2009. SK2 potassium channel overexpression in basolateral amygdala reduces anxiety, stress-induced corticosterone and dendritic arborization. Mol. Psychiatry 14 (9): 847-827.

Novaes, L.S., dos Santos, N.B., Batalhote, R.F.P., Malta, M.B., Camarini, R., Scavone, C., Munhoz, C.D., 2017. Environmental enrichment protects against stressinduced anxiety: Role of glucocorticoid receptor, ERK, and CREB signaling in the basolateral amygdala. Neuropharmacology 113, 457-466.

Rao, R.P., Anilkumar, S., McEwen, B., Chattarji, S., 2012. Glucocorticoids protect against the delayed behavior and cellular effects of acute stress on the amygdala. Biol. Psychiatry 72 (6), 466-475.

Vyas, A., Mitra, R., Rao, B.S.S., Chattarji, S., 2002. Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. J. Neurosci. 22 (15), 6810-6818.





D SC EE E SC EE

Conflict of Interests:

The authors report no biomedical, financial or other potential conflicts of interest. These results are original research, have not been published previously, and are not under consideration for publication elsewhere. All authors have contributed significantly and agreed with the entire content of this manuscript.

Técnica Responsável pelo Treinamento Treinamento em Biossegurança realizado no Departamento de Certificamos que Leonardo Santana Novaes participou do Microbiologia/ICB-USP, no dia 29 de agosto de 2013, com carga Tatiana Alves dos Reis Satiante Alux dos teis Certificado Responsável pelo Treinamento Prof. Dr. Gabriel Padilla horária total de 8 horas. Kudilla.

ANEXO II - Certificado de Biosegurança

EXPERIMENTAÇÃO" (duração: 3 horas), realizado neste Instituto pela Comissão de Biotérios do ICB e pela Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal São Paulo, 3 de maio de 2007. Prof. Dr./Ubiratan Fabres Machado por sua participação no "CURSO DE TREINAMENTO NO USO DE ANIMAIS DE Gualaie Comissão de Ética em Experimentação Animal, em abril de 2007. Outorgamos o presente certificado a , INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO Leonardo Santana Novaes CERTIFICAD Prof^a . Dr^a.Zuleica Bruno Fortes Presidente da Comissão de Biotérios

ANEXO III - Certificado de treinamento no uso de animais de experimentação