LEONARDO SANTANA NOVAES

PROTEÇÃO CONFERIDA PELO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL NA ANSIEDADE INDUZIDA POR ESTRESSE: A IMPORTÂNCIA DA SINALIZAÇÃO VIA GR, ERK E CREB NO COMPLEXO AMIGDALÓIDE BASOLATERAL DE RATOS

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

São Paulo
2013

LEONARDO SANTANA NOVAES

PROTEÇÃO CONFERIDA PELO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL NA ANSIEDADE INDUZIDA POR ESTRESSE: A IMPORTÂNCIA DA SINALIZAÇÃO VIA GR, ERK E CREB NO COMPLEXO AMIGDALÓIDE BASOLATERAL DE RATOS

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

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profª. Drª. Carolina Demarchi Munhoz

Versão original

São Paulo
2013

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

© reprodução total

Novaes, Leonardo Santana.
Proteção conferida pelo enriquecimento ambiental na ansiedade induzida por estresse: a importância da sinalização via GR, ERK e CREB no complexo amigdaloide basolateral de ratos / Leonardo Santana Novaes. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Carolina Demarchi Munhoz.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Neuroendocrinofarmacologia e Imunomodulação.

Versão do título para o inglês: Protection conferred by environmental enrichment on stress-induced anxiety: the importance of GR, ERK, and CREB pathways in the rat basolateral amygdala.

1. Enriquecimento ambiental 2. Estresse psicológico 3. Hormônio glicocorticoides 4. Ansiedade 5. Amigdala 6. CREB I. Munhoz, Profa. Dra. Carolina Demarchi II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB031/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Leonardo Santana Novaes.

Título da Dissertação: Proteção conferida pelo enriquecimento ambiental na ansiedade induzida por estresse: a importância da sinalização via GR, ERK e CREB no complexo amigdaloide basolateral de ratos.

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

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

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **006** nas fls. **98** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Carolina Demarchi Munhoz de Souza**, Coordenador(a) da Linha de pesquisa *"Fator protetor do enriquecimento ambiental na ansiedade induzida por estresse: Possível participação das vias do NF-KB, CREB,BDNF e AKT"* do qual participam o(s) alunos **Leonardo Santana Novaes, Erica de Almeida Duque, Dielly Catrina Favacho Lopes, Rafaela Pestana Batalhote, Camila Sayuri Matsubara, Lais Ferreira Rodrigues,** 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 **15.02.2011, com validade de 3 anos**.

São Paulo, 17 de fevereiro de 2011.

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

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

À minha companheira,

Marina

AGRADECIMENTOS

Gostaria de oferecer meus sinceros agradecimentos:

À Professora Carolina Demarchi Munhoz por ter me recebido em seu laboratório, pela dedicada orientação, pelos ensinamentos científicos e técnicos, por ainda acreditar na ciência e pela confiança depositada.

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

À Professora Rosana Camarini pelo suporte técnico e pelas observações construtivas durante o exame de qualificação.

Aos Professores Jackson Bittencourt e Tatiana Ferreira pelas observações atentas e sugestões durante o exame de qualificação

À Professora Sara Joyce pelo tempo dedicado à minha formação científica, pelas contribuições nesse trabalho e pela amizade.

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

À Guiomar, Larissa e Diana pelo suporte técnico oferecido.

Aos amigos Diella (Dielly) Lopes, Érica Duque, Nilton Barreto e Leandro Rodrigues pelas discussões científicas e técnicas, pela disposição em ajudar e por tornar a vida cotidiana mais harmônica.

Às colegas do Laboratório de Neuroendocrinofarmacologia e Imunomodulação Natália e Jennifer.

À Aninha, uma pessoa de generosidade rara e conhecimento técnico distinto, pelo apoio e amizade.

Aos amigos cientistas fundamentais Aline, Bruna, Clarissa, Magna, Bentinho, Marcelo, Renan, Weslão e Ricardo pela contribuição, emotiva e intelectual, durante toda minha formação.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

A minhas amigas Comadre Bianca, Comadre Kelaine e Roberta pela constante presença, inspiração e segurança afetiva.

Aos amigos Nicolau, Igor e Leandro pela amizade sincera.

Aos meus queridos Seu Cláudio e Dona Fátima, pessoas incríveis, pela generosidade com que fui acolhido na família.

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 e pelo afeto.

A quem eu devo mais do que esse trabalho, a quem dá sentido ao que faço. Obrigado, Má!

RESUMO

Novaes LS. Proteção conferida pelo enriquecimento ambiental na ansiedade induzida por estresse: a importância da sinalização via GR, ERK e CREB no complexo amigdalóide basolateral de ratos. [dissertação (Mestrado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

O enriquecimento ambiental (EA) é um modelo experimental capaz de aumentar os estímulos sensórios, motores e sociais de animais expostos a esse ambiente em relação aos animais criados em condições padrão. Dentre os benefícios conferidos pelo EA estão a melhora no aprendizado e na formação de memórias hipocampo-dependentes, bem como a redução de manifestações comportamentais relacionadas ao estresse, incluindo a ansiedade. Em geral, os achados mais proeminentes na área trouxeram importantes contribuições no sentido de esclarecer a relação causal entre o processo plástico adaptativo ocorrido no hipocampo e na amígdala em decorrência a um estímulo estressor e a manifestação comportamental tardia de sintomas de ansiedade. Dentro desse contexto, o EA tem ganhado destaque por promover ou restaurar o processo de neurogênese normal no hipocampo adulto, além de modular a liberação sistêmica de hormônios glicocorticoides. Contudo, a relação entre o estresse, a ansiedade e os mecanismos através dos quais o EA exerce seu papel protetor mostra-se pouco conclusiva, principalmente considerando os efeitos imediatos exercidos pelo estresse agudo sobre o comportamento animal. Com o objetivo de verificar se o EA influencia o processamento do estímulo estressor agudo, de forma a modificar o curso da resposta comportamental em ratos, e quais alterações biomoleculares estariam relacionadas a esse processo, no presente trabalho nós submetemos os animais ao EA (14 dias) previamente ao estresse por imobilização (1h) e, imediatamente após o estimulo estressor, verificamos o comportamento do tipo ansioso e as possíveis alterações de vias intracelulares nesses animais. Sumariamente, nós verificamos que o EA é capaz de prevenir, em ratos, o surgimento de sintomas do tipo ansioso desencadeados imediatamente após o estresse e que tal efeito pode estar relacionado à modulação, no complexo amigdalóide basolateral, da sinalização nuclear do receptor de glicocorticoide (GR), da atividade de ERK (pertencente à família das MAPK) e de CREB, bem como a alterações na expressão do receptor de BDNF, o TrKB.

Palavras-chave: Enriquecimento ambiental. Estresse psicológico. Hormônios glicocorticoides. Ansiedade. Amígdala. CREB.

ABSTRACT

Novaes LS. Protection conferred by environmental enrichment on stress-induced anxiety: the importance of GR, ERK, and CREB pathways in the rat basolateral amygdala. [Masters thesis (Pharmacology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

Environmental enrichment (EE) is an experimental model that enhances the opportunity of animals to interact with sensory, motor, and social stimuli compared to the standard conditions. Among the benefits of EE are the improvements in learning and memory, as well as reduction in stress-induced behaviors, including anxiety. Overall, the most conclusive findings on the latter issue show a casual relationship between stress-induced changes in the hippocampus and amygdala and a long-lasting anxiety symptoms emergence. In this regard, EE has gained attention for promoting or restoring the normal adult hippocampal neurogenesis process, as well as by modulating the systemic release of glucocorticoid hormones. However, the relationship among stress, anxiety and the mechanisms through EE exerts its protective role remains inconclusive, especially considering the immediate effects exerted by acute stress on animal behavior. The present study aimed to check whether EE influences the processing of the stressor stimulus in order to modify the course of behavioral response in rats, and which biomolecular changes would be related to this process. For this purpose, we kept the animals in EE (14 days) prior to restraint stress (1h) and, just after the stressor stimulus, we measured the anxiety-like behavior and possible changes in intracellular pathways in these animals. Briefly, we found that EE was able to prevent the emergence of anxiety-like symptoms triggered immediately after stress and that this effect may be related to the modulation, in the basolateral amygdala, nuclear glucocorticoid receptor (GR) signaling, ERK (a MAPK protein) and CREB activity, as well as to changes in the expression of BDNF receptor.

Keywords: Environmental enrichment. Psychological stress. Glucocorticoids hormones. Anxiety. Amygdala. CREB.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

ANOVA - Análise de variância

ATP - Trifosfato de adenosina

BDNF - Fator neurotrófico derivado do cérebro (*Brain-derived neurotrophic factor)*

BLA - Complexo amigdalóide basolateral

Ca^{++} - Íon cálcio

C0 - Animal controle não estressado

CORT - Corticosterona

cpm - Contagem por milhão

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

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

CREM – Modulador do elemento responsivo ao cAMP *(response element modulator)*

CS - Animal controle estressado

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DTT - Ditiotreitol

E0 - Animal enriquecido não estressado

EA – Enriquecimento ambiental

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

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

EMSA - Ensaio do Retardamento da Mobilidade Eletroforética em Gel

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

ES - Animal enriquecido estressado

GC - Hormônios glicocorticoides

GR - Receptor de glicocorticoide

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

HEK-293 – Linhagem de células renais embrionárias humanas 293 (Human Embryonic Kidney 293 cells)

HPA – Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

K^+ - Íon potássio

KCl - Cloreto de potássio

KH_2PO_4 - Fosfato de potássio monobásico

LA – Núcleo lateral da amígdala

LTP – Potenciação de longo prazo (*Long-term potentiation)*

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

MEK - Quinase de MAPK (*Mitogen-activated protein kinases kinase)*

$MgCl_2$ - Cloreto de magnésio

MR - Receptor de mineralocorticoides

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

Na^+ - Íon sódio

Na_2HPO_4 - Fosfato de sódio bibásico

NaCl - Cloreto de sódio

$NaHCO_3$ - Bicarbonato de sódio

NGF – Fator de crescimento neuronal (*nerve growth factor)*

NMDA - N-metil-D-aspartato

NP-40 – Tergitol nonil-fenoxipolietoxiletanol

PBS - Tampão salina-fosfato

PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfonil

Poly-dIdC – Ácido polideoxiinosínico e deoxicitidílico (*Poly(deoxyinosinic-deoxycytidylic) acid sodium salt)*

q.s.p – Quantidade suficiente para

RAF – Proteina quinase serina/treonina proto-oncogene (*Proto-oncogene serine/threonine-protein kinase)*

RAS – Sarcoma de ratos (*Rat sarcoma)*

rpm - Rotações por minuto

SDS – Dodecil sulfato sódico

TBE - Tampão Tris/Borato/EDTA

TBS – Tampão tris-salina

TFIID – Fator de transcrição II D (*Transcription factor II D*)

TrKB – Quinase relacionada à tirosina B (*tyrosine-related kinase B)*

Tris-HCl – (hidroximetil) aminometano-cloridrato (*TRIS hydrochloride ou Tris(hidroxymethyl)aminomethane hydrochloride)*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fotorepresentação de ambiente enriquecido. 24

Figura 2 - Expressão da proteína nuclear Lamina-B1 é exclusiva para extrato nuclear. 27

Figura 3 - EA inibe o efeito do estresse na indução do comportamento do tipo ansioso medido em labirinto em cruz elevado.....32

Figura 4 - EA não afeta os níveis séricos de corticosterona induzidos pelo estresse agudo. 33

Figura 5 - Estresse agudo eleva a translocação nuclear de GR no BLA de animais controle, porém não no de animais enriquecidos. 35

Figura 6 - EA e estresse agudo reduzem a ativação de CREB no BLA. 37

Figura 7 - EA e estresse agudo reduzem a fosforilação de ERK-1/2 no BLA de ratos. 39

Figura 8 - Estresse agudo promove aumento de Egr-1 em animais controles, porém não em animais enriquecidos.....40

Figura 9 - EA altera a expressão do receptor TrKB no BLA dos animais. 41

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 15
2 MATERIAIS E MÉTODOS 22
2.1 Animais 22
2.2 Delineamento experimental 22
2.3 Procedimentos comportamentais e aparelhos utilizados 23
2.3.1 Enriquecimento ambiental 23
2.3.2 Estresse agudo por contenção 24
2.3.3 Teste de ansiedade 24
2.4 Eutanásia dos animais e obtenção do material a ser analisado 25
2.5 Processamento e análise do material biológico 25
2.5.1 Análise da concentração de corticosterona sérica 26
2.5.2 Extração de proteínas citosólicas e nucleares 26
2.5.2.1 Determinação da concentração de proteínas 27
2.5.3 Ensaio de Retardo da Mobilidade Eletroforética em gel de poliacrilamida (EMSA) 27
2.5.3.1 Marcação da Sonda 27
2.5.3.2 Reação de ligação e Corrida do gel 28
2.5.4 Ensaio de Western blot 28
2.5.5 Revelação e análise dos filmes 29
2.6 Análise estatística dos resultados 30
3 RESULTADOS 31
3.1 EA protege contra ansiedade induzida por estresse agudo 31
3.2 EA não inibe a liberação de corticosterona em animais agudamente estressados 32
3.3 EA inibe translocação nuclear de GR no BLA de animais promovida por estresse agudo 33
3.4 EA reduz cronicamente a atividade basal do fator de transcrição CREB no BLA ao mesmo nível que o estresse agudo o faz. 35
3.5 EA, bem como o estresse agudo, reduzem a fosforilação de ERK-1/2 no BLA 38
3.6 Expressão de Egr-1 após estresse é maior em animais controles quando comparados a animais enriquecidos 39

3.7 EA altera a expressão basal do receptor de BDNF (Trkb) no BLA, notadamente em animais estressados......40
4 DISCUSSÃO.....42
5 CONCLUSÕES.....53
REFERÊNCIAS 54

1 INTRODUÇÃO

O enriquecimento ambiental (EA) é 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 como túneis, plataformas, escadas, rodas de atividade para exercício físico voluntário e brinquedos em geral, de tal forma a criar um ambiente que potencialize as interações sociais e estimule o comportamento exploratório e motor (Mohammed et al., 2002; Rosenzweig, Bennett, 1996; Rosenzweig et al., 1978; van Praag et al., 2000; para resumo, ver Mora et al.2007).

Diversas alterações de ordem biológica têm sido descritas em decorrência da exposição de animais a ambientes enriquecidos, como o aumento da espessura e do peso cortical (Bennett et al., 1969; Diamond et al., 1966; Diamond et al., 1972), mudanças na árvore dendrítica de populações neuronais específicas e reconfigurações sinápticas (Connor et al., 1982; Faherty et al., 2003; Greenough et al., 1973; Greenough et al., 1985 Greenough, Volkmar, 1973; Leggio et al., 2005), além de proliferação celular no encéfalo adulto (Altman, Das, 1964; Diamond et al., 1966; Kempermann et al., 1998), inclusive de populações neuronais no hipocampo e incorporação dessas células recém-formadas em circuitos funcionais (Bruel-Jungerman et al., 2005; Kempermann et al., 1997; Kempermann et al., 1998; Kempermann et al., 2002; Kirby et al., 2011; van Praag et al., 2000). De forma geral, essas alterações estruturais, que possuem implicações na sinalização e plasticidade neural, estão de acordo com achados que apontam que o EA promove modificações na expressão de genes diversos envolvidos em processos de formação de novas sinapses e reorganização de sinapses pré-existentes, no crescimento e amadurecimento neuronal, bem como em mecanismos envolvidos com a excitabilidade celular (Rampon et al., 2000). Muitos desses são genes codificadores de proteínas intermediárias da sinalização glutamatérgica em neurônios, corroborando dados prévios acerca dos efeitos do EA sobre alterações na LTP (*long-term potentiation*) de neurônios hipocampais e corticais (Artola et al., 2006; Duffy et al., 2001; Foster, Dumas, 2001; Green, Greenough, 1986). Somam-se a esses dados trabalhos que apontam modificações na expressão e atividade das

neurotrofinas BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) e NGF (*nerve growth factor*) (Ickes et al., 2000; Pham et al., 1999); das proteínas estruturais presentes no terminal sináptico, as sinaptofisinas e PSD-95 (*postsynaptic density-95 protein*) (Frick, Fernandez, 2003; Nithianantharajah et al., 2004); e em subunidades dos receptores glutamatérgicos AMPA (α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropinoic acid) e NMDA (*N-methyl-D-aspartate*) (Lee et al., 2003; Naka et al., 2005; Tang et al., 2001).

Esses fenômenos neurobiológicos fundamentam os efeitos comportamentais decorrentes da submissão de animais ao EA, como a melhora no aprendizado e na formação de memória em uma variedade de tarefas hipocampo-dependentes, incluindo memória espacial, reconhecimento de objetos e condicionamento do medo ao contexto (Kempermann et al., 1997; Lee et al., 2003; Nilsson et al., 1999; Rampon et al., 2000; Tang et al., 2001), bem como a redução de manifestações comportamentais relacionadas a transtornos afetivos de forma geral (Benaroya, et al. 2004; Chamove, 1989; Fernandez-Teruel et al., 1997; Rosenzweig, Bennet, 1996). Mais especificamente, dentro da ordem dos transtornos de caráter afetivo, em especial a depressão e a ansiedade, o enriquecimento ambiental tem sido apontado como fator protetor contra distúrbios emocionais induzidos por estresse psicológico (Francis et al., 2002; Klein et al., 1994; Larsson et al., 2002; Roy et al., 2001). Diversos trabalhos utilizando-se de modelos de estresse por submissão à novidade, contenção e exposição ao predador, ou às suas pistas deixadas no ambiente, mostraram que o EA foi capaz de inibir, ou até reverter, a resposta do tipo ansiosa em roedores gerada pelo estímulo estressor (resumido por Fox et al., 2006). A esse respeito, evidências suportam que variações no estado de humor em desordens afetivas desencadeadas pelo estresse tenham como base a deficiência no processo de neurogênese normal no hipocampo (Gould et al., 1997; Koo et al., 2010; Kozorovitskiy, Gould, 2004; Schloesser et al. 2010). Ademais, estudos suportam a hipótese de uma relação de dependência entre os efeitos terapêuticos (verificados em modelos de depressão e ansiedade) decorrentes da administração crônica de antidepressivos e o consequente aumento, ou manutenção em níveis normais, da neurogênese hipocampal em roedores (Dranovsky, Hen, 2006; Malberg et al., 2000; Santarelli et al., 2003; Surget et al., 2008; Warner-schmidt, Duman, 2006). Além de prejuízo no processo de neurogênese, a redução do tamanho e da ramificação dos

dendritos dos neurônios do hipocampo também estão em relação direta com os efeitos do estresse sobre o comportamento animal (Conrad et al., 1996; Kim, Diamond, 2002; Luine et al., 1994; Sousa et al., 2000).

Na amígdala, ao contrário do que ocorre no hipocampo, o estresse por imobilização aumenta o tamanho e o número de dendritos dos neurônios do complexo amigdalóide basolateral (BLA), além de aumentar a quantidade de espinhos dendríticos nessas células, efeitos que vêm acompanhados pelo aumento da ansiedade (Mitra et al., 2005; Rao et al., 2012; Vyas, Chattarji, 2004; Vyas et al., 2002). De fato, muitos trabalhos interessados na relação entre ansiedade e estresse vêm reportando a amígdala como estrutura chave para o entendimento desse processo, tendo em vista seu papel crucial na geração e desenvolvimento do medo e da ansiedade, duas respostas comportamentais intrinsecamente relacionadas no âmbito dos fenômenos neurológicos (Davis, 1992; Gross, Hen, 2004; LeDoux, 2000; Rodrigues et al. 2009; Rosen, Schulkin, 1998; Shin, Liberzon, 2010). O BLA, em especial, é considerado chave para a percepção e resposta do organismo a potenciais ameaças, consideradas aqui como estímulos estressores, na medida em que recebe informações polimodais talâmicas e corticais e projeta-se para outras regiões, incluindo núcleos da própria amígdala, de tal forma a modular a atividade de estruturas encefálicas que controlam tanto o aspecto comportamental quanto fisiológico da resposta ao estresse (para revisão, ver Rodrigues et al., 2009). Além da expressão do comportamento defensivo, como a resposta de congelamento (Blanchard, Blanchard, 1969; Fendt, Fanselow, 1999), o BLA influencia na promoção do aumento da resposta atencional, resultando em maior acurácia no processamento de pistas externas (Aston-Jones, Cohen, 2005; LeDoux, 2007; ver Rodrigues et al., 2009).

Dentro da concepção neuroendocrinológica da resposta a estímulos estressantes, como a alteração do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e o consequente aumento na liberação de hormônios glicocorticoides (GC) no organismo (Herman et al., 2003, Smith, Vale, 2006), a amígdala ganha destaque por possuir concentrações consideráveis dos receptores mineralocorticoide e glicocorticoide (MR e GR, respectivamente) (Patel et al., 2000; Pryce, 2008), o que poderia explicar a relação diretamente proporcional entre o aumento da disponibilidade do hormônio esteroide e a atividade de seus neurônios (Kvushansky,

Richter-Levin, 2006). Ressalta-se que a atividade dos neurônios do BLA influencia o processo de liberação de GC, devido suas densas projeções para regiões do prosencéfalo basal, hipotálamo e estruturas do tronco encefálico, que estão em estrita comunicação com o núcleo paraventricular do hipotálamo (Feldman et al., 1994; Herman et al., 2003; Mitra et al., 2009), principal regulador do eixo HPA. A ativação excessiva ou prolongada desse sistema tem sido associada à patogênese dos transtornos de humor e ansiedade (Holsboer, 2000; Pariante, Miller, 2001), em geral atribuída ao prejuízo no processo de retroalimentação negativa na liberação do hormônio esteroide (ver Binder et al., 2008).

Outros trabalhos mostram, ainda, que o estresse, ou o aumento das concentrações séricas de GC, aumenta a ansiedade e provoca alterações na estrutura e função do BLA em ratos (Mitra et al., 2005; Mitra, Sapolsky, 2008). Mitra e Sapolsky (2008) mostraram que o tratamento agudo com corticosterona (CORT, tipo de GC em roedores) é suficiente para induzir ansiedade em ratos, processo acompanhado por hipertrofia dendrítica dos neurônios do BLA, enquanto que a redução da sinalização por GR no BLA diminui a ansiedade e bloqueia a hipertrofia dendrítica de seus neurônios decorrente de administração aguda de CORT (Mitra, Sapolsky, 2010). Além disso, a administração estereotáxica do hormônio no BLA de ratos é capaz de desencadear uma resposta do tipo ansiosa, bem como provocar aumento da excitabilidade dos neurônios dessa região (Myers, Meerveld, 2007; Shepard et al., 2003). Complementarmente, o bloqueio de sinapses excitatórias no BLA previne o desencadeamento da ansiedade induzida por estresse (Adamec et al. 1999), ao passo que a ativação de seus neurônios provoca um quadro típico de ansiedade e o concomitante aumento da liberação de CORT (Herman et al., 1996; Mitra et al., 2005). Nesse contexto, alguns trabalhos em humanos sugerem que a gênese dos sintomas de ansiedade severa apresentados por pacientes diagnosticados com o transtorno do estresse pós-traumático decorre de uma hiperatividade dos neurônios da amígdala (Protopopescu, et al., 2005; Rauch et al., 2000). É digno de nota que muitos trabalhos suportam o papel crucial da atividade dos neurônios do BLA no processo de consolidação de memórias aversivas de longa duração (Ferry, McGaugh, 1999; Hatfield, McGaugh, 1999), processo diretamente influenciado pela sinalização de GR e atividade dos neurônios na região (Akirav et al., 2005; Rodríguez-Manzanares et al., 2005; Roozendal, McGaugh, 1997; ver

Duvarci, Paré, 2007). A esse respeito, um número considerável de trabalhos mostrou que o BLA exerce um efeito modulatório intenso sobre os neurônios hipocampais (Richardson et al., 2004; Roozendaal et al., 2009; Tsoory et al., 2008), inclusive influenciando de forma determinante o processo de LTP (Frey et al., 2001; Ikegaya et al., 1996).

De fato, muitas abordagens interessadas em entender os efeitos do estresse no desencadeamento de transtornos de humor recaem sobre a influência que a sinalização mediada por GC exercem no funcionamento do sistema nervoso central via GR (Binder, 2009; Binder et al., 2008; Galigniana et al., 2012; Korte, 2001; Millan, 2003; Spijker, van Rossum, 2012). Localizado no citoplasma da célula, esse receptor transloca-se para o núcleo celular quando ligado ao hormônio (complexo GR-GC), onde exerce, com o auxílio de proteínas acessórias, sua ação modulatória sobre diversos genes (Tronche et al., 1998). Um trabalho recente mostrou que o aumento da excitabilidade dos neurônios do BLA de ratos na vigência de altos níveis de CORT decorre do concomitante aumento da atividade nuclear de GR (Duvarci, Paré, 2007). Por outro lado, outro trabalho sugere que o efeito eletrofisiológico de GR pode dever-se a ações rápidas não genômicas do receptor (Hua, Chen, 1989 apud Chen, Qiu, 2001), eventualmente modulando a atividade de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), como as proteínas ERK-1/2 (*extracellular-signal-regulated kinase) (*Chen, Qiu, 2001). Um importante efetor final da via das MAPK é o fator de transcrição CREB (*cAMP response element-binding protein)*, extensamente apontado como modulador da excitabilidade de neurônios de diversas regiões encefálicas (Han et al., 2006; Jancic et al., 2009; Lopez de Armentia et al., 2007; Viosca et al. 2009; Zhou et al., 2009), cujo papel foi sugerido como crítico no pronunciamento do comportamento ansioso (Pandey et al. 2003; Pandey et al., 2005; Valverde et al., 2004; Wallace et al., 2004).

Outro aspecto importante da sinalização de GCs na fenomenologia do comportamento ansioso é a interação entre GR e o receptor de BDNF, o TrKB (*tyrosine-related kinase B*). Além do papel crítico de GR nos efeitos sobre as alterações plásticas estruturais decorrentes do estresse na amígdala (Mitra, Sapolsky, 2010), sabe-se que tal fenômeno também depende da sinalização de neurotrofinas como o BDNF, de tal forma que o aumento da sinalização desse mediador especificamente no BLA promove aumento da densidade de espinhos

dendríticos na região, com consequente indução de um comportamento do tipo ansioso em camundongos (Govindarajan et al., 2006). Jeanneteau et al. (2008) mostraram, *in vivo* e *in vitro*, que administração aguda de GC promove a fosforilação, e consequente ativação, de TrKB. Esse efeito mostrou-se dependente da ação nuclear de GR, porém independente da produção de neurotrofinas.

Embora uma série de trabalhos reportem a importância dos efeitos decorrentes do estresse na gênese dos transtornos afetivos, além do importante papel do enriquecimento ambiental como fator protetor ao desencadeamento desses transtornos (Fox et al., 2006; Nithianantharajah, Hannan, 2006; Shin, Liberzon, 2010), estudos da relação entre o estresse, a ansiedade e os mecanismos através dos quais o EA exerce seu papel protetor mostram-se pouco conclusivos, pautando-se principalmente pelos efeitos tardios que o estresse, mesmo que agudo, exerce sobre o comportamento afetivo. Notadamente, os principais achados nesse sentido apontam para um papel modulatório sobre o eixo HPA exercido pelo EA, seja por mecanismos relacionados à neurogênese hipocampal (Schloesser et al., 2010; Snyder et al., 2011), inclusive podendo ser dependente da atividade dos neurônios do BLA (Kirby et al., 2012), seja por modulação na expressão e atividade de GR no hipocampo (Herman et al., 1989; Sapolsky et al., 1984; Sapolsky et al., 1990; Kabbaj et al., 2000). No entanto, considerando o efeito agudo que a sinalização de GC exerce sobre a atividade dos neurônios do BLA (Duvarci, Paré, 2007; Kvushansky, Richter-Levin, 2006), somado ao importante papel modulatório exercido pelos neurônios dessa região sobre estruturas envolvidas no desencadeamento de resposta apreensiva (nesse caso entendido como medo e/ou ansiedade), é provável que alterações no padrão de disparos de seus neurônios ocorridas poucos minutos após um estímulo estressor agudo seja responsável pela manifestação de um comportamento do tipo ansioso, independente de qualquer movimento adaptativo que esse processo possa resultar tardiamente, como alterações na árvore dendrítica de populações neuronais do BLA e do Hipocampo.

Diante desse quadro, no presente trabalho propusemos estudar os efeitos que o estresse agudo exerce imediatamente sobre o comportamento ansioso de ratos e qual a implicação da exposição prévia dos animais ao EA no curso da resposta ao estímulo estressor. Interessou-nos, especificamente, verificar eventuais mecanismos plásticos promovidos pelo EA sobre o BLA que possam estar em acordo com os

efeitos verificados no âmbito comportamental. Sumariamente, nós verificamos que o estresse agudo por imobilização foi capaz de induzir imediatamente um comportamento do tipo ansioso em ratos, efeito não verificado em animais criados em ambiente enriquecido. Esse efeito protetor exercido pelo EA não parece decorrer de uma eventual regulação do eixo HPA, porém mostra-se relacionado à modulação da atividade do receptor GR no BLA e de alguns membros de vias de sinalização intracelular a ele correlacionados, como as proteínas quinases ERK-1/2 e o fator de transcrição CREB, bem como a alterações no padrão de expressão do receptor TrkB.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizados como sujeitos experimentais ratos machos da linhagem *Wistar* provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, obtidos com 2 meses de idade. Os animais foram acondicionados, em grupos de 2, em gaiolas padrão de polipropileno (com medidas de 30 x 37 x 18 cm) por um período de 10 dias, seguidos de transferência para gaiolas especiais desenvolvidas para enriquecimento ambiental, ou permanência na gaiola padrão conforme o grupo experimental (ver descrição no próximo item). 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 ºC). Os procedimentos experimentais utilizados seguiram as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP) e foram conduzidos de forma a reduzir ao máximo o sofrimento e o número de animais utilizados.

2.2 Delineamento experimental

Sessenta animais recebidos do Biotério Central foram divididos aleatoriamente em 2 grupos experimentais compostos por 30 indivíduos cada, acomodados em grupos de 2 por gaiola, a saber: animais criados em gaiolas padrão e animais criados em ambiente enriquecido. Dez dias após o recebimento dos animais no biotério de experimentação, estes foram acondicionados em suas moradias conforme os grupos definidos (dia 0), onde viveram por 14 dias. No décimo quinto dia de estadia (dia 15), entre 8h00 e 12h00, metade dos animais (1 de cada gaiola) foi submetida ao procedimento de estresse agudo por contenção, seguido de imediata transferência ao teste de labirinto em cruz elevado. Paralelamente, a outra metade dos animais foi submetida ao teste no labirinto sem que sofresse o estímulo estressor. Após o teste, todos os animais foram imediatamente eutanasiados (decapitação por guilhotina), tiveram seus encéfalos retirados da caixa craniana e as estruturas encefálicas de interesse dissecadas e criopreservadas (imersão direta em nitrogênio líquido) para posterior processamento. Os animais foram submetidos ao

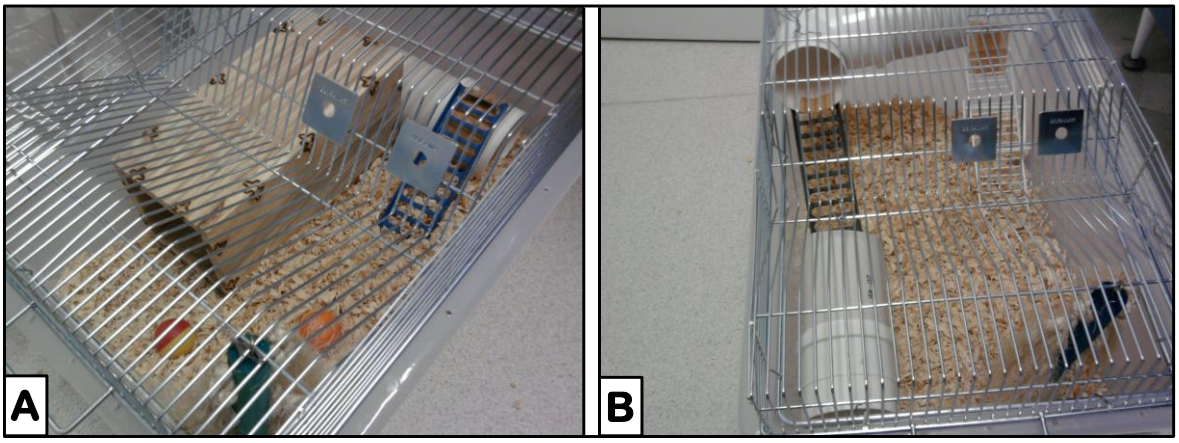
estresse por contenção, um por vez, com intervalo de 30 minutos entre eles, de tal forma que após 1 hora de submissão ao estímulo, cada animal pudesse ser direcionado ao teste no labirinto em cruz elevado (5 min) e eutanasiado (15 min), sem que o seguinte ultrapassasse 1 hora de estresse. Para evitar o efeito estressante do isolamento, os 2 animais residentes na mesma caixa foram retirados simultaneamente para a bateria de ensaios, sendo um direcionado ao estresse, e posteriormente ao teste no labirinto, e o outro diretamente ao teste, sem passar pelo estresse. Ao final do experimento obtivemos 4 grupos experimentais: animais criados em gaiolas padrão (C0); animais criados em gaiolas padrão e que sofreram estresse agudo (CS); animais criados em ambiente enriquecido (E0); animais criados em ambiente enriquecido e que sofreram estresse agudo (ES). Um experimentador adicional auxiliou nos procedimentos de eutanásia dos animais e na dissecção e criopreservação das estruturas encefálicas. Para viabilizar o ensaio, os experimentos foram realizados seriadamente em 6 blocos experimentais.

2.3 Procedimentos comportamentais e aparelhos utilizados

2.3.1 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. A Figura 1 ilustra alguns exemplos de ambiente enriquecido utilizados.

Figura 1 - Fotorepresentação de ambiente enriquecido.



A e B exemplificam três formas distintas de disposição dos objetos na gaiola.

2.3.2 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 severo do que o desejado. Os animais ficaram contidos no aparato por um período de 1 h sob constante observação do experimentador.

2.3.3 Teste de ansiedade

Para verificarmos o comportamento do tipo ansioso nos animais, utilizamos o labirinto em cruz elevado. 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 madeira tratada com tinta fosca, permanece suspenso a 50 cm do assoalho por um suporte central e, durante os testes, foi alocado em sala com condições de luminosidade e temperatura iguais as do biotério. Todo procedimento foi filmado por uma câmera de vídeo suspensa sobre o aparelho para posterior análise.

Os animais de todos os grupos experimentais foram introduzidos individualmente no centro do labirinto, com total liberdade para poder percorrê-lo ao longo de 5 minutos. Os parâmetros analisados foram a frequência de entradas em braços abertos (razão entre o número de entradas em braços abertos pelo número total de entradas nos braços), a tacha de permanência nos braços abertos (razão entre o tempo despendido nos braços abertos pelo tempo total despendido nos braços) e o total de distância (cm) percorrida pelos animais em todo o labirinto. Para a análise deste último parâmetro, foi utilizado o *software* EthoVision® (Noldus, The Netherlands). 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.

Os testes foram conduzidos em colaboração com o Laboratório de Neuroquímica e Farmacologia Comportamental do Departamento de Farmacologia (ICB/USP), coordenado pela Professora Dra. Rosana Camarini.

2.4 Eutanásia dos animais e obtenção do material a ser analisado

Os animais foram eutanasiados por decapitação e o cérebro rapidamente retirado em solução fria de tampão salina-fosfato (NaCl 137 mM, KCl 2,68 mM, KH_2PO_4 1,27 mM, Na_2HPO_4 8,06mM). O complexo amigdalóide basolateral foi dissecado bilateralmente sobre uma placa gelada e imerso em nitrogênio líquido. As estruturas encefálicas foram estocadas a – 80 ^oC para uso posterior. Para auxiliar a dissecção da amígdala, os encéfalos foram acondicionados em uma matriz encefálica acrílica de corte coronal de espessura de 1 mm (Zivic Laboratories Inc., Portesville, P.A., USA), própria para dissecção de estruturas pequenas em tecido fresco. 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 à 4.000 *g* por um período de 10 minutos.

2.5 Processamento e análise do material biológico

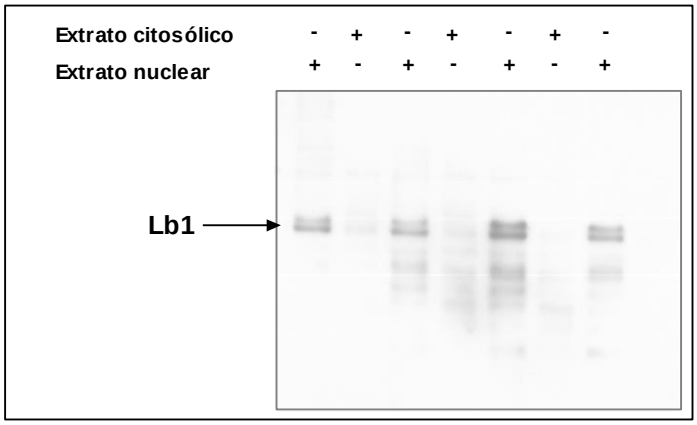
2.5.1 Análise da concentração de corticosterona sérica

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

2.5.2 Extração de proteínas citosólicas e nucleares

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

Figura 2 - Expressão da proteína nuclear Lamina-B1 é exclusiva para extrato nuclear.



Análise por *Western blot* revela a expressão de lamina B1 (ponta de seta) em extratos nucleares, porém não em extratos citosólicos. Anticorpo anti-lamin B1 (ab 16048, Abcan Biochemicals, Inc; 0,5 µg/ml).

2.5.2.1 Determinação da concentração de proteínas

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

2.5.3 Ensaio de Retardo da Mobilidade Eletroforética em gel de poliacrilamida (EMSA)

2.5.3.1 Marcação da Sonda

O oligonucleotídeo de DNA contendo a seqüência de ligação para o fator de transcrição do CREB (Promega corporation, Madison, WI, USA; E328b) foi marcado com a adição de γ-^{32}P ATP em uma solução contendo tampão T_4 quinase, enzima T_4 quinase e água; nas concentrações de: 3,5 pmol de oligonucletídeo, 1 U/µL de T_4 quinase, 1 µl de γ-^{32}P ATP (111 GBq/mmol) (1 Ci=3,7 GBq), 1 µL de tampão T_4 quinase (10 X) em 10 µL de volume de reação. Após incubação à 37 ^{o}C por 10 minutos, o excesso de γ-^{32}P ATP foi retirado com resina sephadex® G-25 (Microspin G-25; Millipore corporation, Billerica, MA, USA): as colunas foram colocadas em um

tubo de microcentrifuga e submetidas à centrifugação por 1 minuto a 3.000 rpm. Em seguida, as colunas foram transferidas para um novo tubo e o volume total da sonda marcada foi aplicado no centro da resina. Após centrifugação, o eluato contendo a sonda foi recolhido e, no dia do ensaio, a atividade da sonda foi determinada. Para o ensaio foi utilizado aproximadamente 22.000 cpm/µL.

2.5.3.2 Reação de ligação e Corrida do gel

Foram adicionados a um tubo de microcentrífuga: 4 µL de tampão de ligação 5X ($MgCl_2$ 5 mM; EDTA 2,5 mM; DTT 2,5 mM; NaCl 300 mM; Tris-HCl 50 mM pH 7,5; Poly dIdc 0,25 µg/µL; glicerol 20%); extrato nuclear (3 µg de proteína); oligonucleotídeo frio em excesso (10X concentrado em relação à sonda marcada), ou anticorpo específico para as subunidades anti-pCREB (0,02 µg/ul; Santa Cruz Biotechnology, Inc), anti-CREM (0,02 µg/ul; Santa Cruz Biotechnology, Inc), anti-CREB-1 (0,02 µg/ul; Santa Cruz Biotechnology, Inc), ou o oligonucleotídeo inespecífico TFIID 10X concentrado em relação à sonda marcada (Promega corporation, Madison, WI, USA; E322B) e água bidestilada q.s.p. para 20 µL de volume final (contando com a adição da sonda marcada).

O tubo foi incubado por 20 minutos à temperatura ambiente, adicionando-se em seguida a sonda marcada (1 µL), e novamente o tubo foi incubado por 30 minutos à temperatura ambiente. A corrida foi visualizada com a adição de 1 µL de azul de bromofenol ao controle negativo. O conteúdo total do meio de reação foi aplicado no gel de poliacrilamida 5,5% [acrilamida/bisacrilamida (37,5:1)]. Para a eletroforese foi utilizado um tampão de corrida consistindo em 0,5X TBE (1X TBE = Tris 90 mM, Ácido Bórico 90mM, EDTA 1 mM). O gel foi corrido por volta de 2 horas a 150-160 V. Ao final da corrida, o gel foi secado procedendo-se em seguida a exposição do filme ao gel em cassete a – 80 ^{o}C, pelo período de 2 dias, seguida da revelação do filme.

2.5.4 Ensaio de Western blot

O ensaio de *Western blot* utilizado foi baseado no descrito por Laemmli (1970). As proteínas foram ajustadas na quantidade de 5 ou 10 ug com o tampão de amostra (0,125 M tris-HCl; 4% de SDS; 20% v/v glicerol; 0,2 M de DTT; 0,02% de azul de bromofenol; pH 6,8) e fervidas por 5 minutos a 95 ^{o}C. O conteúdo total do

meio de reação foi aplicado no gel de SDS-poliacrilamida 10% (acrilamida/bisacrilamida (37,5:1), 10% SDS) para que ocorresse a separação das proteínas contidas na amostra. No mesmo gel foi adicionado um padrão de peso molecular. Para a eletroforese, foi utilizado um tampão de corrida consistindo em 25 mM de tris-base, 0,192 M de glicina, 0,1% de SDS e água bidestilada. O gel foi corrido por volta de 2 h a 90 V. Ao final da corrida, as proteínas separadas e contidas no gel foram transferidas eletroforeticamente para uma membrana de PVDF (Millipore corporation, Billerica, MA, USA) por aproximadamente 2 h a 400 mA. Para a transferência foi utilizado um tampão contendo 25 mM de tris-base, 192 mM de glicina, 20% de metanol e água bidestilada. Após a transferência, as membranas foram coradas com solução de vermelho de Ponceau (0,5% Ponceau-S; 5% ácido tricloro acético e água bidestilada), lavadas com água até tirar todo o excesso da solução corante e deixadas por 2 h à temperatura ambiente em uma solução contendo TBS (100 mM tris-base; 0,9% NaCl e água bidestilada), 0,5% de leite desnatado e 0,1% de Tween 20 para bloquear ligações inespecíficas com o anticorpo. Após essa etapa, as membranas foram lavadas 5 vezes em solução de TBS-T (TBS; 0,1 % Tween 20) e incubadas com o anticorpo primário diluído em TBS-T "*overnight"* a 4 °C: anti-GR (coelho, 0,2 µg/ml; Santa Cruz Biotechnology Inc, USA), anti-TrKB (coelho, 0,2 µg/ml; Santa Cruz Biotechnology Inc, USA), anti-Egr-1 (coelho, 0,2 µg/ml; Santa Cruz Biotechnology Inc, USA), anti-p-ERK1/2 (coelho, 0,1 µg/ml; Santa Cruz Biotechnology Inc, USA), anti-ERK1 (coelho, 0,1 µg/ml; Santa Cruz Biotechnology Inc, USA), anti-ERK2 (coelho, 0,1 µg/ml; Santa Cruz Biotechnology Inc, USA) e anti-alfa-tubulina (camundongo, 0,04 µg/ml; Santa Cruz Biotechnology Inc, USA). As membranas foram, então, novamente lavadas 5 vezes com TBS-T e incubadas com os anticorpos secundários anti-coelho (cabra, 0,05 µg/ml; KPL, Kirkegaard & Perry Laboratoies Inc, USA) ou anti camundongo (cabra, o,o5µg/ml; KPL, Kirkegaard & Perry Laboratoies Inc, USA) por 2 horas. A revelação foi feita através do kit de quimioluminescência ECL-Amersham® (General Eletric Company, USA).

2.5.5 Revelação e análise dos filmes

Os filmes foram revelados em sala escura em máquina de revelação automática Hyper Processor (Amersham Biosciences Piscataway, NJ, EUA). As

imagens foram fotocopiadas digitalmente em resolução 600 dpi e a densidade óptica das bandas analisadas com auxílio do programa *ImageJ*® (Image Processing and Analysis in Java, NIH, MD, USA).

2.6 Análise estatística dos resultados

As diferenças entre os grupos experimentais foram detectadas por análise de variância (ANOVA) de um critério seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls. Em todos os casos, foram adotados valores para $p < 0.05$ como estatisticamente significativos. Todas as análises foram realizadas no programa GraphPad Prism® para Windows versão 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA www.graphpad.com).

3 RESULTADOS

Conforme descrito anteriormente, ao final do ensaio experimental os 60 animais utilizados formaram 4 grupos experimentais, doravante denominados animais controle não estressados (C0), animais controle estressados (CS), animais enriquecidos não estressados (E0) e animais enriquecidos estressados (ES).

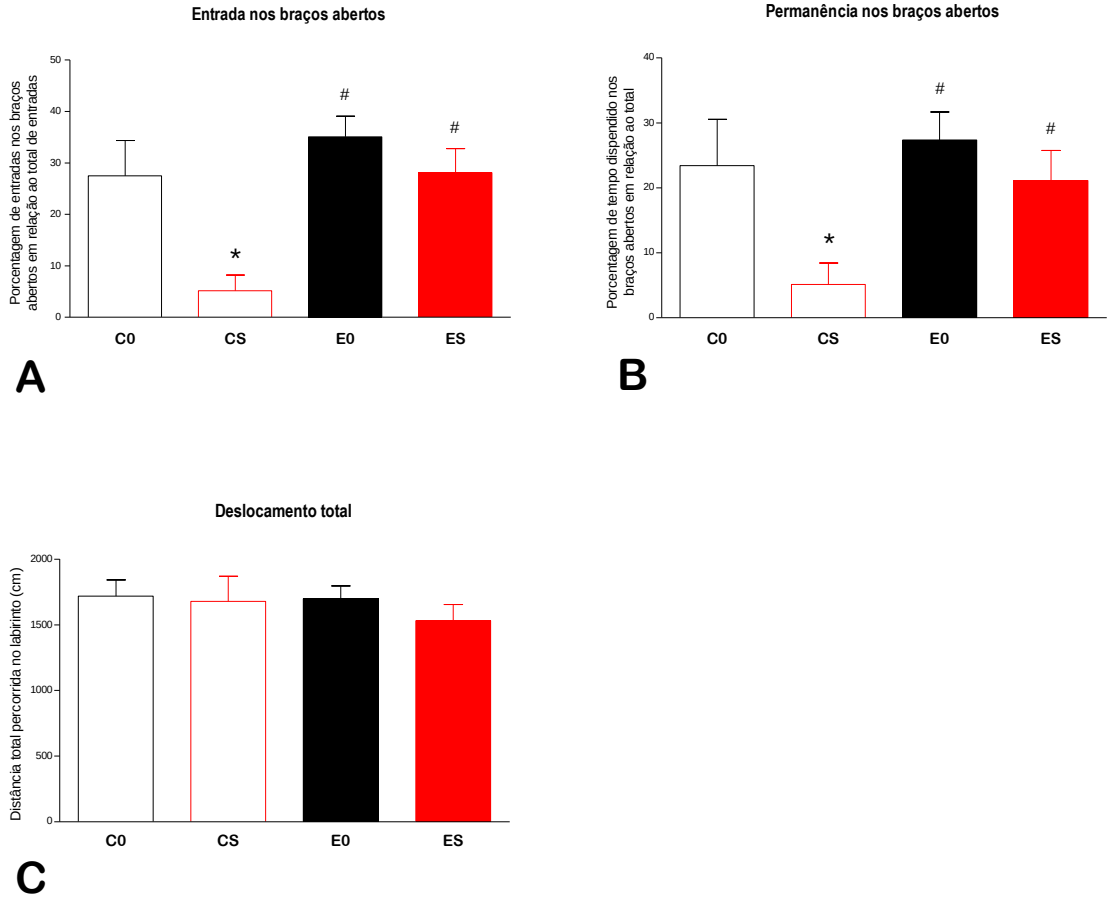
3.1 EA protege contra ansiedade induzida por estresse agudo

Ao analisarmos os resultados obtidos, ilustrados na figura 3, podemos observar que os animais CS apresentaram redução na frequência de entradas e no tempo de permanência nos braços abertos em comparação aos animais C0 (Figura 3A; B), indicando que o estresse agudo por contenção de 1h foi suficiente para induzir um comportamento do tipo ansioso nos animais. Por outro lado, os animais que sofreram o mesmo estresse, mas que foram previamente acondicionados em ambiente enriquecido (ES), apresentaram maior exploração dos braços abertos quando comparados aos animais CS, porém não quando comparados aos animais C0 (Figura 3A; B), sugerindo que o enriquecimento ambiental, nos moldes em que foi aplicado, protegeu os animais em relação à indução do comportamento do tipo ansioso pelo estresse agudo por contenção. Ademais, os animais do grupo E0 não apresentaram diferença significativa na exploração dos braços abertos comparados aos animais C0 e ES (Figura 3A; B), indicando que o enriquecimento ambiental, por si, não provoca aumento da taxa de exploração do labirinto, mas sim modifica o curso da resposta do animal ao estresse no que diz respeito ao seu efeito ansiogênico.

Complementarmente, realizamos uma análise da distância total que cada animal percorreu durante o teste no labirinto para verificar eventuais diferenças na atividade locomotora dos animais dos diferentes grupos experimentais. Como ilustrado na Figura 3C, não houve diferença na média de deslocamento total entre os quatro grupos experimentais, indicando que o estresse agudo por contenção e o enriquecimento ambiental não provocam alterações na atividade locomotora dos animais, recrudescendo a hipótese de que o efeito do enriquecimento ambiental e do estresse que observamos sobre os animais se dá no âmbito das escolhas e

preferências (manifestadas através da exploração dos braços abertos) e não da condição física dos mesmos, embora a expressão do efeito seja de ordem motora.

Figura 3 - EA inibe o efeito do estresse na indução do comportamento do tipo ansioso medido em labirinto em cruz elevado.



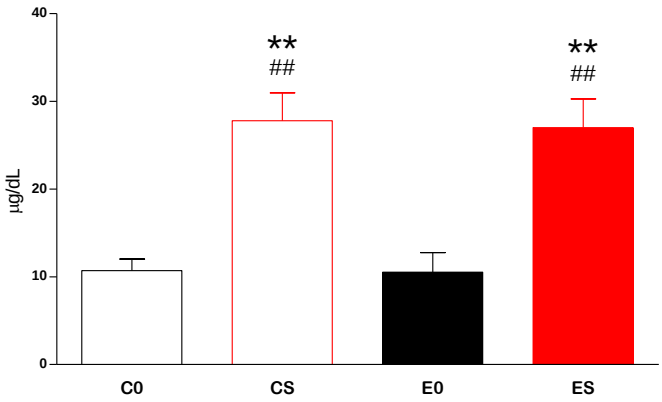
Animais CS apresentaram exploração reduzida dos braços abertos em termos de frequência de entradas (A) e tempo de permanência (B) comparados aos animais C0. Animais enriquecidos, tanto estressados (ES) quanto não estressados (E0), apresentaram exploração dos braços abertos similar ao de animais C0 e mostraram aumento de exploração dos mesmos comparados aos animais CS. n=14-15 por grupo, * (em relação à C0) e $^{\#}$ (em relação à CS), $p < 0,05$ (pós-teste de Newman-Keuls). Tanto o estresse quanto o enriquecimento ambiental não afetaram a atividade locomotora dos animais (C).

3.2 EA não inibe a liberação de corticosterona em animais agudamente estressados

Para responder a primeira hipótese levantada quanto à diferença no padrão de resposta comportamental mostrada entre animais enriquecidos e animais controles diante um estimulo estressor, mensuramos os níveis séricos de corticosterona dos animais imediatamente após o teste, nos permitindo verificar sob quais níveis desse

hormônio os animais realizaram a tarefa. Desta maneira, poderíamos inferir se o EA exerceria seu efeito protetor contra a ansiedade induzida por estresse mediante controle da liberação do hormônio. Como podemos verificar na Figura 4, os grupos de animais estressados, independente do tipo de moradia que habitaram (CS e ES), apresentaram níveis séricos de CORT semelhantes e significativamente maiores do que os níveis apresentados pelos animais não estressados (C0 e E0). Estes, por sua vez, não apresentaram diferenças entre si. A esse respeito, podemos interpretar que os animais que sofreram estresse agudo por contenção manifestaram, durante o teste, efeito fisiológico de estresse (altos níveis de CORT plasmática), e que o efeito do EA, no comportamento desses animais, não se deve à modulação da liberação do hormônio.

Figura 4 - EA não afeta os níveis séricos de corticosterona induzidos pelo estresse agudo.



Animais estressados (CS e ES) apresentaram níveis séricos de corticosterona significativamente maiores do que animais não estressados (C0 e E0). n=14-15 por grupo, ** (em relação à C0) e $^{\#\#}$ (em relação à E0), $p < 0{,}001$ (pós-teste de Newman-Keuls)

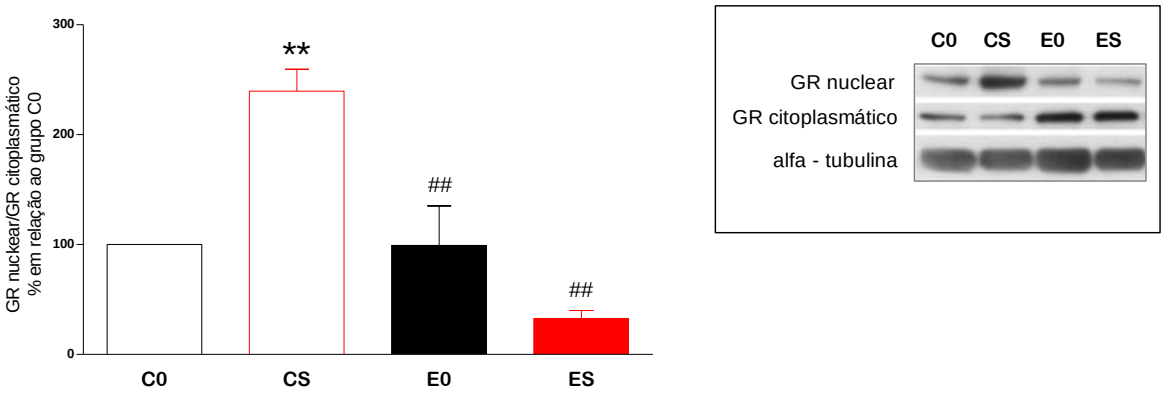
3.3 EA inibe translocação nuclear de GR no BLA de animais promovida por estresse agudo

Dado não haver modulação na liberação de CORT nos animais enriquecidos frente ao estímulo estressor agudo, decidimos analisar eventuais diferenças na sinalização do hormônio entre os diferentes grupos experimentais mensurando a atividade do receptor GR no BLA dos animais. Para tanto, medimos, por meio do ensaio de *western blot*, a expressão do receptor GR na fração nuclear do extrato de proteínas relativa à sua expressão na fração citoplasmática, de tal forma a inferir a

proporção de receptores que migraram do citoplasma para o núcleo das células, processo que ocorre mediante ligação do hormônio ao receptor (Tronche et al., 1998). Experimentalmente, a translocação nuclear é considerada um indício de ativação do fator de transcrição GR-GC.

Ao analisarmos a Figura 5, observamos um aumento substancial na translocação nuclear de GR nos animais CS comparados aos animais C0, apontando um aumento da sinalização do hormônio CORT, via GR, no BLA, de tal forma a acompanhar a elevação dos níveis séricos do hormônio verificado nesses animais estressados (Figura 4). Por outro lado, os animais enriquecidos, mesmo que estressados, não apresentaram diferenças na translocação de GR no BLA quando comparados aos animais C0, muito embora os animais ES apresentem níveis séricos de CORT elevados ao mesmo nível dos CS (Figura 4). O conjunto desses resultados sugere que o EA protege os animais do efeito ansiogênico do estresse independente do controle da liberação plasmática do hormônio CORT (controle do eixo HPA) e que tal proteção pode ser devido ao controle da sinalização do hormônio via GR nas células do BLA. É importante notar que não se trata simplesmente de um rebaixamento da sinalização nuclear de GR por parte do enriquecimento ambiental, visto não haver diferença na translocação nuclear do receptor entre os animais E0 e C0, mas sim de um controle exercido sobre a sinalização de GR quando na vigência de um estímulo estressor.

Figura 5 - Estresse agudo eleva a translocação nuclear de GR no BLA de animais controle, porém não no de animais enriquecidos.



Animais CS apresentaram níveis aumentados de GR na fração nuclear em relação à fração citoplasmática quando comparados aos animais C0. Animais enriquecidos (E0 e ES) apresentaram níveis semelhantes aos animais C0 e níveis reduzidos quando comparados aos animais CS. n=4-5 por grupo, ** (em relação à C0) e $^{\#\#}$ (em relação à CS), $p < 0{,}001$ (pós-teste de Newman-Keuls).

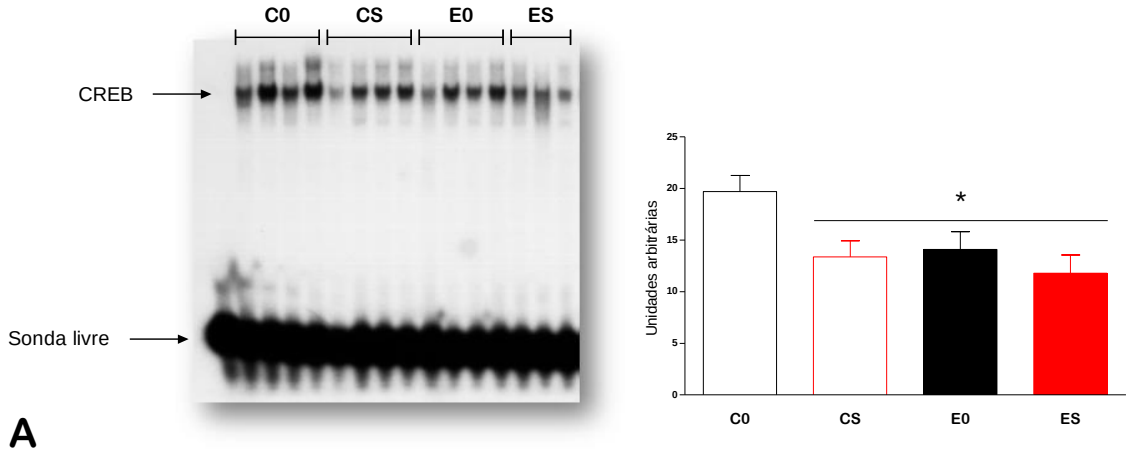
3.4 EA reduz cronicamente a atividade basal do fator de transcrição CREB no BLA ao mesmo nível que o estresse agudo o faz.

Para inferir diferenças na atividade do fator de transcrição CREB nos neurônios do BLA, realizamos o EMSA, através do qual podemos verificar a possibilidade de aumento ou diminuição da ligação do fator de transcrição presente em uma dada amostra a uma sequência de DNA contendo seu respectivo sítio de ligação. Embora de forma indireta, o ensaio permite-nos avaliar a modulação da atividade de determinados fatores de transcrição entre os diferentes grupos experimentais.

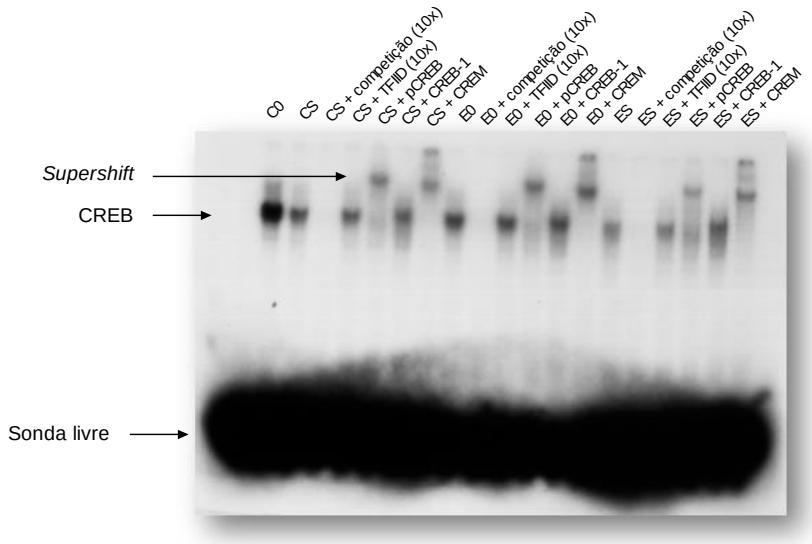
Os resultados obtidos nos mostram que animais criados em ambiente enriquecido (E0 e ES) apresentaram redução da ligação de CREB na sonda de DNA em comparação aos animais C0. É importante notar que não houve diferença na ligação de CREB entre os animais criados em ambiente enriquecido, diferentemente do que ocorreu entre os animais criados em ambiente padrão, onde o estresse agudo exerceu um efeito de redução da ligação do CREB, levando os animais CS a apresentarem o mesmo nível de ligação dos animais enriquecidos (Figura 6A). Sumariamente, podemos interpretar que o EA reduz a atividade basal de CREB nas células do BLA, independente da vigência ou não de um estímulo estressor agudo. Já nos animais controle, o estresse agudo reduziu a atividade do CREB ao mesmo nível estabelecido pelo efeito crônico do enriquecimento ambiental.

Complementarmente, realizamos o ensaio de competição e de *supershift*, através dos quais pudemos verificar a especificidade da ligação de CREB à sequência de DNA e, além disso, quais as isoformas de CREB estavam envolvidas nesse processo. Ao analisarmos os grupos experimentais cujos ensaios contaram com a adição em excesso de oligonucleotídeo contendo o sítio de ligação de CREB (CRE), porém não marcado com o radioativo P^{32}, notamos que houve a exclusão completa das bandas relativas à ligação de CREB anteriormente verificadas (Figura 6B), denotando um deslocamento da ligação de CREB à sonda radioativa pela sonda não radioativa, um importante indicativo de que a banda formada anteriormente devia-se à especificidade da ligação de CREB ao respectivo sítio de ligação presente na sonda radiomarcada. Reforça esse dado o fato do excesso de oligonucleotídeo não contendo CRE (TFIID) não ter deslocado a banda relativa à ligação de CREB observada nas amostras sem competição. Além disso, os ensaios de *supershift* apontaram a presença de p-CREB e CREM no complexo proteico ligado à sonda de DNA radiomarcada contendo CRE, como pode ser verificado pela presença de uma banda acima do peso molecular indicado para ligação de CREB à sonda, e a concomitante exclusão da banda nesta altura (Figura 6B). Em outro ensaio de competição e *supershift*, além da presença das isoformas p-CREB e CREM no extrato de proteína, verificamos também a presença de CREB-1 (dados não ilustrados), diferença atribuída ao lote de anticorpo utilizado nos diferentes ensaios.

Figura 6 - EA e estresse agudo reduzem a ativação de CREB no BLA.



A



B

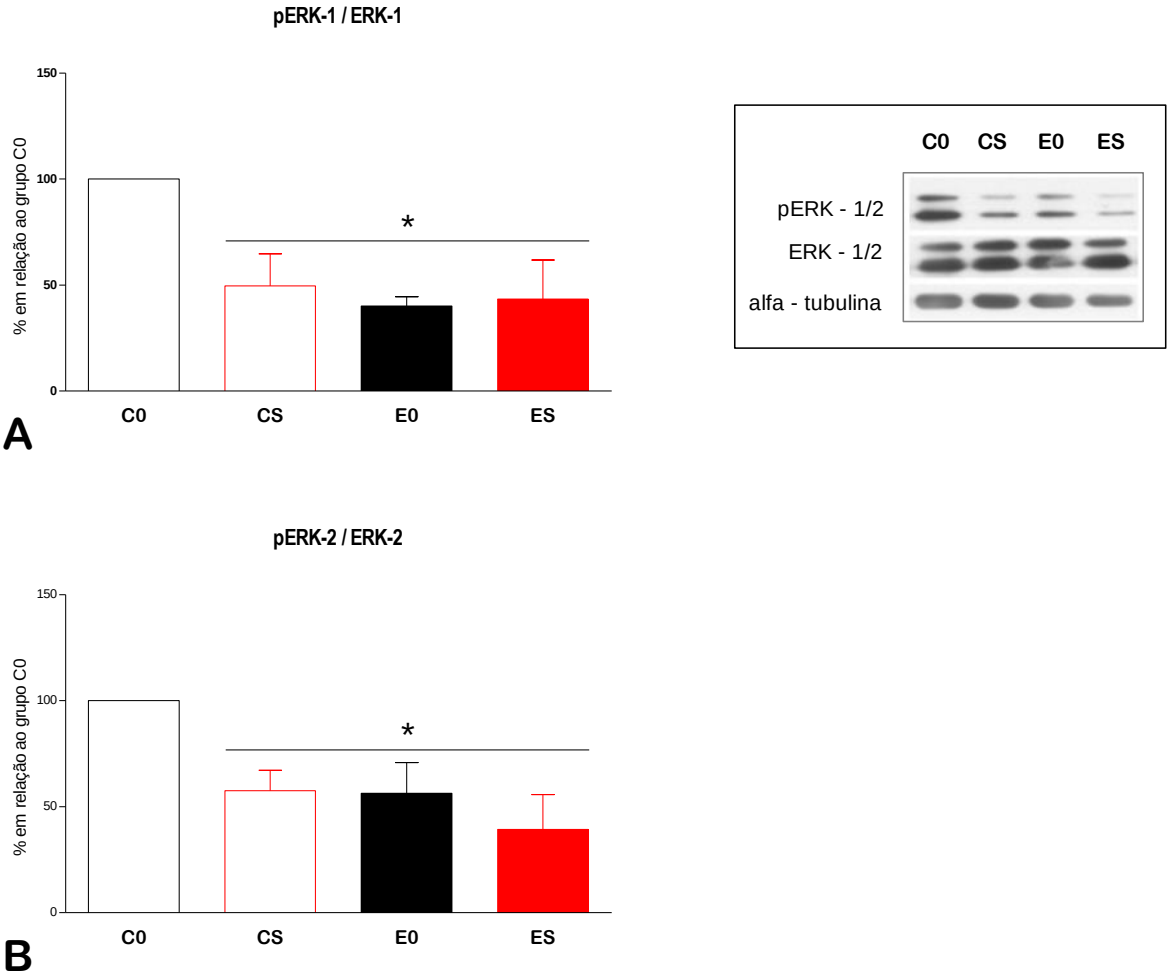
Animais CS, E0 e ES apresentaram redução da ligação de CREB ao DNA em comparação aos animais C0. À esquerda, setas indicam bandas específicas para ligação de CREB à sonda radiomarcada (topo) e a presença da sonda livre (base). À direita, gráfico representativo da análise densitométrica da figura (A). (B) Ensaio de competição e *supershift* realizados em amostras dos grupos experimentais CS, E0 e ES na presença ou ausência de sonda de DNA não marcada radioativamente (sequência consenso contendo CRE, molaridade 10 vezes em excesso), ou na presença de oligonúcleotídeo não específico (sequência consenso de TFIID, molaridade 10 vezes em excesso). Ensaio de *supershift* foi realizado nas mesmas amostras com a presença de anticorpos contra as subunidades p-CREB, CREB-1 e CREM (0.2 µg/µl). n=3-5 por grupo, * (em relação à C0), $p < 0,05$ (pós-teste de Newman-Keuls).

3.5 EA, bem como o estresse agudo, reduzem a fosforilação de ERK-1/2 no BLA

Considerando os efeitos que o EA e o estresse agudo exercem sobre a atividade do fator de transcrição CREB no BLA dos animais, e tendo em vista o papel modulatório que as proteínas quinases ERK-1/2 exercem sobre esse mesmo fator de transcrição, decidimos mensurar a atividade dessas proteínas quinases por meio de quantificação, por *western blot*, dos níveis de fosforilação das mesmas. Para tanto, realizamos a quantificação das formas fosforiladas de cada isoforma relativas às respectivas formas totais. Os resultados, ilustrados na Figura 7, nos mostram que os animais enriquecidos (E0 e ES), bem como os animais controle estressados (CS), apresentaram níveis reduzidos de fosforilação de ERK-1 (Figura 7A) e ERK-2 (Figura 7B) quando comparados aos animais C0, compondo um quadro muito semelhante ao ilustrado pela Figura 6A, referente aos resultados de atividade de CREB.

Tratando-se de uma das principais quinases que fosforilam diretamente e que, portanto, ativam CREB, podemos pensar o conjunto desses resultados como um processo interdependente, onde a atividade reduzida de CREB no BLA verificada pode ser devido a uma também atividade reduzida da ERK, muito embora não podemos deixar de notar que CREB responde a outros ativadores.

Figura 7 - EA e estresse agudo reduzem a fosforilação de ERK-1/2 no BLA de ratos.



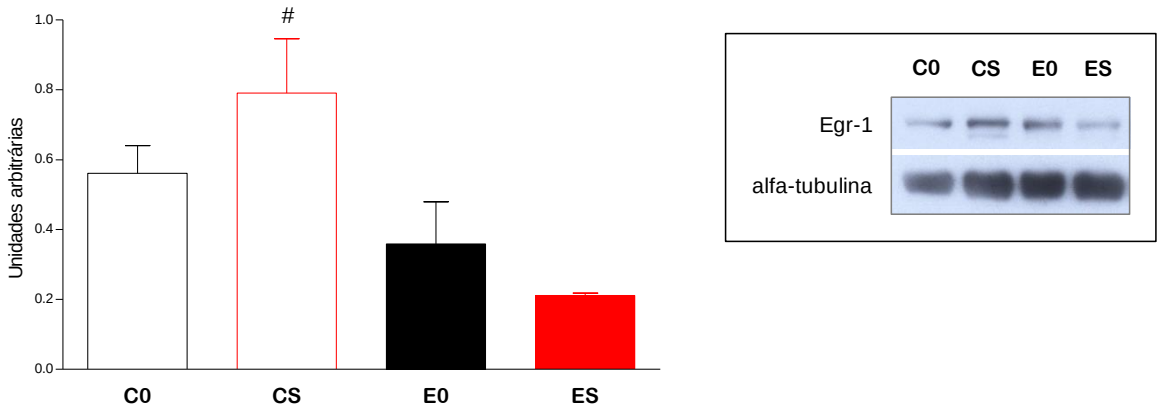
Animais CS, E0 e ES apresentaram redução da razão entre pERK-1/2 e ERK-1/2 no BLA em comparação aos animais controle. n=5-6 por grupo, * (em relação à C0), $p < 0,01$ (pós-teste de Newman-Keuls).

3.6 Expressão de Egr-1 após estresse é maior em animais controles quando comparados a animais enriquecidos

A fim de verificar a influência das diferentes condições ambientais na atividade dos neurônios do BLA após estímulo estressor, realizamos, por *western blot*, a quantificação da proteína Egr-1 no BLA dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais. Embora preliminares, os resultados indicam que os animais CS apresentam aumento da expressão de Egr-1 no BLA quando comparados aos animais ES, mostrando um papel modulador sobre essa proteína exercido pelo enriquecimento ambiental na vigência do estímulo estressor (Figura 8). Além disso, embora os animais CS apresentam níveis elevados de Egr-1 quando comparados

aos grupos C0 e E0, como pode ser observado em filme radiográfico, a análise desnitométrica da banda específica não se mostrou significativa estatisticamente. Esses resultados, embora preliminares, nos permitem elocubrar que o estresse exerce, em animais submetidos a condições padrões, um efeito de hiperexpressão de Egr-1 e que o enriquecimento ambiental não afeta a expressão basal da proteína, apenas modula sua expressão na vigência do estímulo estressor. O fato de não haver nível de significância estatística para essa última análise foi atribuído ao n experimental diminuto (n=2 por grupo experimental).

Figura 8 - Estresse agudo promove aumento de Egr-1 em animais controles, porém não em animais enriquecidos.



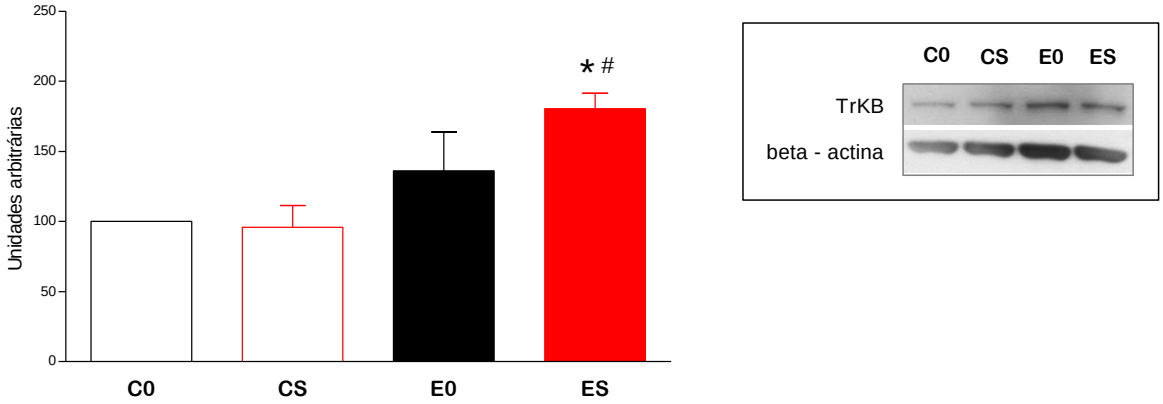
Animais CS apresentaram aumento da expressão de Egr-1 no BLA em comparação aos animais ES ($^{\#}$). Animais C0, E0 e ES não são diferentes estatisticamente. n=2 por grupo, $^{\#}$, $p < 0,05$ (pós-teste de Newman-Keuls).

3.7 EA altera a expressão basal do receptor de BDNF (TrKB) no BLA, notadamente em animais estressados

Considerando seu importante papel no processo plástico/adaptativo de células nervosas, decidimos analisar eventuais alterações na sinalização de BDNF entre animais controles e enriquecidos e os diferentes efeitos exercidos pelo estresse nessa sinalização. Para tanto, realizamos a análise da expressão do receptor TrKB nesses animais através do ensaio de *western blot*. Como resultado, ilustrado na Figura 9, não verificamos alterações da expressão do receptor em decorrência do estresse, pelo menos na análise imediata após o estímulo agudo, como podemos verificar comparando os animais C0 e CS. Porém, ao analisarmos os animais enriquecidos, notamos aumento da expressão de TrKB nos animais ES em

comparação aos animais C0 e, embora não seja estatisticamente significante, notamos uma tendência de aumento da expressão do receptor também nos animais E0 em relação aos animais C0, uma vez que não existe diferença significativa entre os animais ES e E0, tampouco entre estes e os animais C0.

Figura 9 - EA altera a expressão do receptor TrKB no BLA dos animais.



Animais ES apresentaram aumento da expressão de TrKB no BLA em comparação aos animais C0 (*) e CS ($^{\#}$), porém não em comparação aos animais E0. n=4-6 por grupo, * e $^{\#}$, $p < 0,005$ (pós-teste de Newman-Keuls).

4 DISCUSSÃO

O conjunto dos dados aqui apresentados contribui para a compreensão dos mecanismos neurobiológicos subjacentes aos efeitos exercidos pelo EA sobre o curso da resposta ao estresse no que diz respeito ao seu potencial ansiogênico. Após verificarmos um efeito protetor exercido pelo EA sobre o comportamento do tipo ansioso induzido pelo estresse agudo por contenção, seguimos nossa análise no sentido de melhor entender como tal fenômeno opera em âmbito molecular (na modulação de expressão e atividade de diferentes proteínas) em uma estrutura encefálica chave para a orquestração da resposta emocional ao estresse, o BLA.

Não é novidade que eventos estressantes são capazes de levar ao desenvolvimento de transtornos de humor (Caspi et al., 2003; McEwen, 2008; McWwen et al., 2012; Risch et al., 2009), dentre eles a ansiedade, e que o EA promove efeitos benéficos fisiológicos e comportamentais em modelos animais de transtornos psíquicos (Nithianantharajah, Hannan, 2006) e pode melhorar distúrbios emocionais induzidos por estresse psicológico (Fox et al., 2006). Além disso, evidências suportam o papel da neurogênese hipocampal adulta na regulação de desordens afetivas relacionadas ao estresse (Gould et al., 1997; Koo et al., 2010; Kozorovitskiy et al., 2004; Malberg et al., 2000), mecanismo através do qual o EA poderia exercer seu efeito protetor. Dentro dessa perspectiva, Schloesser et al. (2010) mostram uma correlação direta entre a redução da neurogênese hipocampal adulta induzida por estresse social crônico e a expressão de comportamentos que conotam alterações afetivas (incluindo ansiedade), processo revertido pelo EA através da manutenção, em níveis normais, da neurogênese hipocampal, mesmo na vigência do estimulo estressor. Baseados em dados prévios que mostraram que a supressão de neurogênese hipocampal adulta promove, em camundongos, um quadro ansiogênico típico (Revest et al., 2009) e leva à desregulação do eixo HPA durante o estresse moderado (Schloesser et al., 2009), os autores propõem que os efeitos exercidos pelo EA perante o estresse seriam mediados pela regulação do eixo HPA via neurogênese hipocampal, ou seja, os neurônios recém-formados no hipocampo exerceriam um papel fundamental na modulação do eixo, e as consequências comportamentais verificadas nos animais em decorrência do estímulo estressor crônico adviria da sinalização de CORT em excesso no encéfalo.

É importante ressaltar que o hipocampo exerce um papel modulatório sobre a liberação de CORT, principalmente através das projeções dos neurônios do giro denteado para o núcleo paraventricular do hipotálamo (Brady et al., 1992). A sinalização mediada por CORT no hipocampo, notadamente via GR, está implicada na retroalimentação negativa da resposta ao estresse, de tal forma que a redução da atividade dos neurônios dessa região resulta em um quadro de hipersecreção do hormônio (Sapolsky et al., 1984; Sapolsky et al., 1990; Kabbaj et al., 2000). Em acordo com esses dados, a modulação da neurogênese no hipocampo adulto, via sinalização de CORT, tem amplo suporte na literatura (Dranovsky, Hen, 2006). A exposição de animais a diferentes tipos de estímulos estressores crônicos ou aumento dos níveis séricos de CORT implica em supressão do processo normal de neurogênese no hipocampo adulto (Cameron et al., 1994; Czéh et al., 2002; Dranovsky, Hen, 2006; Murray et al., 2008). Adicionalmente, Snyder et al. (2011) mostraram que a neurogênese hipocampal tem um papel fundamental no processo adaptativo do organismo a um estímulo estressor, na medida em que camundongos geneticamente manipulados a não fazerem neurogênese apresentaram diferenças na cinética de recomposição dos níveis basais de CORT após o estresse agudo por contenção quando comparados a animais controle. Em conjunto, esses dados apontam que o prejuízo no processo de neurogênese hipocampal decorrente de estímulos estressores configura um processo adaptativo, de tal forma que os efeitos emocionais tardios consequentes do estresse fundamentam-se em alterações na modulação do eixo HPA exercida por neurônios recém-formados no hipocampo. Nesse sentido, os avanços científicos a respeito do papel do EA na proteção ao estresse no que diz respeito a seus efeitos psicogênicos dão conta de compreender mecanismos de adaptação do organismo ao estresse, notadamente revertendo, ou impedindo, o processo inibitório sobre a neurogênese hipocampal exercida pelo estímulo estressor.

Mesmo considerando que a modulação do eixo HPA seja um aspecto importante para a adaptação da resposta do animal a estímulos estressores, muito provavelmente através da alteração da sinalização do hormônio em estruturas límbicas envolvidas com resposta emocional (Brinder et al., 2008; ver Spijker, van Rossum, 2011), a análise de nossos resultados sugere existir outro mecanismo através do qual o EA exerce seu efeito protetor frente ao efeito ansiogênico do

estresse agudo que, nesse caso, independe de eventuais alterações na neurogênese hipocampal. Em nosso modelo experimental, os animais que foram testados no labirinto imediatamente após o estresse realizaram o teste de ansiedade sob a influência de altos níveis séricos de CORT, tanto os animais do grupo controle (CS) quanto os animais enriquecidos (ES), fato verificado após a realização de nossas análises dos níveis séricos de CORT imediatamente após o teste de 5 minutos, que não apontaram diferenças entre os animais de ambos os grupos. No entanto, os animais ES, mesmo apresentando níveis séricos de CORT iguais ao dos animais CS, não manifestaram comportamento típico de ansiedade. Diante do exposto, podemos interpretar que o estresse agudo por contenção exerce um efeito ansiogênico imediato na resposta emocional do animal e que o EA é capaz de modular a resposta ao estresse independente de sua ação modulatória sobre eixo HPA.

O fato de não haver diferenças nos níveis plasmáticos de CORT entre os animais CS e ES, o que minimiza o papel modulatório sobre o eixo HPA exercido pelo EA como fonte de explicação para seu efeito protetor, não nos permite deixar de considerar a sinalização desse mediador endocrinológico em seu sítio final de ação. Kavushansky e Richter-Levin (2006), através de registros eletrofisiológicos *in vivo*, mostraram que o estresse agudo de 30 minutos por submissão em plataforma suspensa gera um aumento imediato da responsividade dos neurônios do BLA em consequência a um dado estímulo elétrico no córtex entorrinal. Para verificar se o efeito do estresse na modulação da atividade dos neurônios da região se deveu ao aumento concomitante de CORT plasmática visto nesses animais, os autores administraram sistemicamente, em animais não estressados, níveis gradativos do hormônio e observaram, 30 minutos após a infusão, aumento correspondente da excitabilidade dos neurônios do BLA, mostrando, assim, que esse efeito verificado nos animais estressados agudamente foi devido ao consequente aumento da sinalização de CORT.

É importante destacar que dados apontam que o aumento da excitabilidade dos neurônios da amígdala de roedores está diretamente relacionado ao pronunciamento de um comportamento do tipo ansioso. A ativação do BLA através de estimulação elétrica, por exemplo, promove um quadro do tipo ansioso em ratos (Nieminen et al., 1992; Kellett et al., 2001). Além disso, o comportamento do tipo ansioso

desencadeado por estresse agudo por contenção está associado ao aumento da excitabilidade dos neurônios do BLA (Guo et al., 2012), ao passo que o bloqueio da sinalização estimulatória glutamatérgica no mesmo núcleo, via receptores NMDA, previne o desencadeamento do quadro de ansiedade tardio induzido por estresse de exposição ao predador (Adamec et al., 1999). A esses achados, somam-se registros clínicos de pacientes ansiosos que mostram um perfil hiper-responsivo da amígdala diante estímulos visuais com conotações aversivas (Bishop et al., 2004; Pessoa et al., 2002; Vuilleumier et al., 2001).

Muitos trabalhos buscam compreender os mecanismos através dos quais o estresse exerce suas alterações biológicas e comportamentais mediante análise dos níveis de atividade dos receptores de CORT, além dos já citados mecanismos que levam em conta alterações na concentração do hormônio circulante no organismo. A esse respeito, nossos resultados mostram que os animais CS apresentaram aumento de translocação nuclear de GR no BLA comparados aos animais C0, de tal forma a acompanhar a elevação dos seus níveis séricos de CORT; e que os animais enriquecidos, mesmo estressados, e que tiveram elevação de CORT plasmática ao mesmo nível dos animais CS, não apresentaram tal aumento de translocação de GR.

Ao retomarmos o trabalho de Kavushansky e Richter-Levin (2006), que mostrou os efeitos eletrofisiológicos no BLA de ratos em decorrência do aumento agudo nas concentrações séricas de CORT, podemos fazer uma correlação com nossos resultados, os quais apontaram que o comportamento ansioso visto nos animais controle já é verificado imediatamente após o estresse, e que esse fenômeno é acompanhado por aumento de sinalização nuclear (visto através do aumento de translocação nuclear do receptor) de GR no BLA. Por outro lado, os animais enriquecidos que, embora respondam ao estresse com o mesmo aumento dos níveis séricos do hormônio visto nos animais controles, não apresentam aumento de sinalização nuclear de GR. Assim, o aumento da translocação nuclear de GR no BLA indica um eventual mecanismo através do qual o estresse, via sinalização de CORT, exerce seu efeito ansiogênico nos animais CS, e o mecanismo molecular subjacente ao efeito protetor exercido pelo EA residiria no controle da translocação nuclear, e portanto ativação, desse receptor nos animais estressados.

Em suporte a essa hipótese, registros eletrofisiológicos realizados em *slice* de BLA de ratos mostraram que o aumento da sinalização de CORT via atividade nuclear de GR gera um aumento da excitabilidade dos neurônios de projeção do BLA (Durvaci, Paré, 2007). Esse efeito mostrou-se decorrente do aumento da excitabilidade intrínseca dos neurônios do núcleo e da concomitante redução do impacto da inibição exercida através de receptores do tipo $GABA_A$ no microcircuito da região. Além disso, os potenciais de repouso desses neurônios de projeção do BLA estavam significativamente menos polarizados, o que poderia explicar seu perfil hiper-responsivo. Algumas hipóteses aventadas para explicar esse efeito exercido pela CORT nos neurônios do BLA são a possibilidade de modulação da atividade da bomba de Na^+, K^+ – ATPase e alterações na condutância de repouso e nas correntes de K^+, inclusive podendo envolver canais dependentes de influxo de Ca^{++}, como os do tipo L, amplamente expressos no sistema nervoso central, inclusive nos neurônios da amígdala. (ver Faber, Sah, 2002; Faber, Sah, 2005; Guo et al., 2012; Karst et al., 2002). Reforçando as evidências de que a gênese do comportamento ansioso decorrente do estresse agudo se deve a uma hiperexcitabilidade dos neurônios do BLA, Rodríguez Manzanares et al. (2005) mostraram que esse processo está relacionado à atenuação do controle inibitório exercido por neurônios GABAérgicos naquela região, fenômeno que pode depender especificamente da modulação da atividade dos receptores do tipo $GABA_A$. Complementarmente, Rosenkranz et al. (2010) mostraram que o efeito da hiperexcitabilidade do núcleo lateral da amigdala (LA) decorrente do estresse crônico por contenção depende da atividade de canais de potássio dependentes de cálcio. Ainda, em trabalho mais recente, Guo et al. (2012) mostraram que o efeito do estresse agudo na indução do comportamento ansioso é acompanhado pela hiperexcitabilidade dos neurônios do LA concomitantemente à redução da expressão de canais de K^+ dependentes de cálcio do tipo L no núcleo.

Outro importante fato verificado em nossos resultados é que o EA gerou um efeito crônico de redução de ligação de CREB ao DNA no BLA dos ratos, indicando uma redução da atividade desse fator de transcrição nesse núcleo. A esse respeito, dados na literatura já haviam mostrado que o aumento crônico da sinalização de CREB no BLA, via transfecção viral, gera um quadro do tipo ansioso nos animais (Wallace et al., 2004). Somados a esse fato, e considerando os efeitos do perfil

hiporresponsivo dos neurônios do BLA na gênese do quadro ansioso (Adamec et al., 1999; Guo et al., 2012; Kellett et al., 2001; Nieminen et al., 1992), diversos trabalhos mostraram que a hiperexpressão basal crônica de CREB em *slice* de diversas estruturas encefálicas, incluindo a amígdala, promove um aumento sustentado da excitabilidade intrínseca de neurônios (Han et al., 2006; Lopez de Armentia et al., 2007; Viosca et al. 2009; Zhou et al., 2009). Da mesma forma, a redução crônica de CREB em populações neuronais promove uma redução da excitabilidade neuronal (Jancic et al., 2009; ver Gruart et al., 2012). Esses dados reverberam nossos achados na medida em que a redução da sinalização de CREB foi verificada em animais que não manifestaram ansiedade mediante estresse (ES). Muito embora não tenhamos visto aumento da ligação de CREB nos animais CS como fator indicador de ansiedade, e sim redução, não podemos deixar de levar em conta o fato de que o efeito do aumento da ativação de CREB verificado pelos autores do trabalho supracitado (Wallace et al., 2004) foi crônico, tal como nos animais enriquecidos, ao passo que a redução da ativação desse fator verificada nos animais CS foi aguda. Ademais, trabalho realizado por Pandey et al. (2003) reforça a hipótese de que a redução aguda de CREB no BLA não exerceria efeito sobre o comportamento do tipo ansioso em animais, uma vez que a inibição aguda de sua ativação via PKA não gerou alteração nesse sentido. Isso sugere que enquanto a modulação aguda da atividade de CREB no BLA (por pelo menos 1h) não exerce efeito sobre a ansiedade, minimizando o papel da redução da sinalização de CREB vista nos animais CS, as alterações crônicas desse fator de transcrição parecem exercer um efeito modulatório sobre tal fenômeno.

Complementarmente a esses dados, outro ponto a ser considerado e que pode ajudar a entender esse quadro é o fato de termos verificado, tal como na sinalização de CREB, uma redução crônica exercida pelo EA na fosforilação de ERK, indicando redução de sua atividade, da mesma forma que o estímulo estressor agudo também o faz. Esses dados são complementares na medida em que sabemos que a ERK (membro da família das MAPK) é um dos principais ativadores de CREB, agindo por intermédio de uma cascata proteica envolvendo a ativação de GTPases RAS, que ativam isoformas da família das RAF. Estas, por sua vez, fosforilam e ativam a enzima MEK, culminando na fosforilação de ERK que, assim, modulam a atividade de CREB (Davis, 1995; ver Bell-Horner et al., 2006). Uma importante isoforma da

família das RAF é a B-RAF, a mais recorrente ativadora de MEK/ERK expressa no tecido nervoso (Storm et al., 1990). Recentemente, em trabalho utilizando animais transgênicos deficientes de B-RAF no prosencéfalo, Wefers et al. (2012) mostraram que a consequente redução crônica dos níveis de fosforilação de ERK e da atividade de CREB resultou em um comportamento menos ansioso por parte desses animais, dado muito semelhante aos nossos, onde os animais enriquecidos, que apresentam níveis crônicos de CREB reduzidos, também estão menos ansiosos após estímulo estressor. Além de agir modulando a atividade de CREB, evidências sugerem um possível papel da proteína quinase ERK como moduladora direta da excitabilidade celular (Bell-Horner et al., 2006). Trabalhando com deleção pontual do sítio de fosforilação de ERK na subunidade alfa do receptor $GABA_A$ em cultura celular (HEK293), os autores mostraram que essa quinase é capaz de modular negativamente a atividade do receptor, de tal forma que a redução da atividade de ERK resultaria em aumento da probabilidade de abertura do canal inibitório, gerando um perfil celular hiporresponsivo.

Por ser considerado um efetivo marcador de ativação neuronal, o gene de expressão imediata *egr-1* (também conhecido como zif/268) é muito utilizado em abordagens científicas interessadas em mapear a atividade funcional de estruturas encefálicas dentro de um dado circuito (Chaudhuri et al., 2000). Além de apresentar uma expressão bastante rápida após a despolarização da membrana neuronal, apresentando pico de expressão de mRNA em torno de 20 minutos pós estímulo, o transcrito final, no caso o fator de transcrição Egr-1, pode exercer um efeito modulatório sobre a expressão de outros genes. Por isso, além de um marcador de atividade neuronal, esse fator de transcrição é considerado crítico no processo de conversão de estímulos extracelulares em ações modulatórias sobre processos neuronais adaptativos (ver Chaudhuri et al., 2000). A esse respeito, a atividade de Egr-1 tem sido muito recorrente em estudos sobre a participação da amígdala no processo de aprendizagem e memória aversiva, devido sua ação modulatória sobre a expressão de genes requeridos para o processo de plasticidade neuronal (Baumgärtel et al., 2009; Jones et al., 2001; Malkani, Rosen, 2000).

Nossos resultados, embora preliminares, indicam um tendência de aumento da expressão de Egr-1 nos animais CS em relação aos animais C0, o que pode indicar um aumento de atividade neuronal do BLA dos animais em decorrência do estresse

agudo. Por outro lado, os animais enriquecidos, mesmo que estressados (ES), não apresentam tal aumento, ao contrário, apontam para uma redução da expressão da proteína em relação aos animais C0, embora sutil e não significativa estatisticamente. A comparação entre os animais CS e ES evidencia uma maior diferença na expressão da proteína entre os dois grupos. Nesse sentido, considerando Egr-1 como um marcador de atividade neuronal recente, podemos sugerir que o estresse agudo promove um aumento da responsividade dos neurônios do BLA em animais controle, porém não nos animais enriquecidos, mesmo que estressados. Como já mencionado, além de um importante indicador de atividade neuronal, o fator de transcrição Egr-1 possui um papel modulatório sobre mecanismos adaptativos neuronais. Dentre esses mecanismos, destaca-se a ação sobre genes importantes para alterações funcionais e morfológicas relativas ao processo sináptico, promovendo a modulação da expressão de diversos genes implicados na modelagem da arborização dendrítica (ver Baumgärtel et al., 2009; James et al., 2006). Tendo isso em vista, o aumento da expressão desse fator de transcrição nos animais CS pode ajudar a explicar as consequências adaptativas tardias do estresse, além de prenunciar o efeito agudo de aumento de atividade neuronal. Considerando dados da literatura que mostram que o estresse ou tratamento agudo com CORT em ratos induz aumento do número e do tamanho dos espinhos dendríticos dos neurônios do BLA tardiamente (10 dias após o estímulo ou a infusão), efeito diretamente relacionado ao aumento de ansiedade em ratos (Mitra, Sapolsky, 2008; Rao et al., 2012), e que a redução da sinalização de GR no BLA previne essas alterações plásticas decorrentes do estresse, com consequente redução do comportamento ansioso (Mitra, Sapolsky, 2010), além do papel modulatório exercido pelo Egr-1 sobre a expressão de genes relativos à remodelagem dendrítica (Baumgärtel et al., 2009; James et al., 2006), podemos pensar que os efeitos imediatos observados neste trabalho nos animais pós-estresse agudo podem estar implicados no mecanismo de adaptação tardia do organismo a esse mesmo estresse.

Além de responder à despolarização da membrana celular, eventualmente via influxo de Ca^{++}, é importante destacar que Egr-1 responde a outros mediadores intracelulares, como ERK e CREB, muito provavelmente devido à presença da sequência de ligação CRE em sua região promotora. Considerando esse fato e

retomando nossos resultados, notamos que os animais CS apresentam redução da sinalização de CREB e ERK no BLA, tal como os animais enriquecidos e, mesmo assim, apresentam um indicativo de aumento de expressão de Egr-1. No entanto, um aspecto central e que pode explicar as diferenças comportamentais e na expressão de Egr-1 em relação aos animais enriquecidos é o aumento da sinalização nuclear de GR apresentado apenas no BLA de animais CS. Em trabalho bastante elegante, Revest et al. (2005) mostraram uma intricada relação entre a sinalização de GR e a via da MAPK (especificamente atividade de ERK), culminando na expressão de Egr-1. Os autores mostraram que o tratamento agudo de linhagens celulares derivadas de hipófise (AtT20) com CORT gera um aumento da expressão de Egr-1 concomitante ao aumento de translocação nuclear de GR (processo ocorrido dentro de 1 h), efeito não dependente de atividade de ERK, pois a inibição da atividade dessa proteína quinase não afetou a transcrição de EGR-1. Ademais, a despeito do GR poder agir rapidamente (dentro de 1 h) no sentido de aumentar a expressão de RAS e RAF, intermediários à jusante de ERK na via da MAPK, já que esses possuem na região promotora de seus genes o elemento responsivo ao GR (GREs), esse processo final de aumento de atividade de ERK ocorre apenas 3 h após o estímulo com CORT e não interfere no aumento de expressão de Egr-1 provocado pelo aumento da sinalização de GR.

Esses dados estão em acordo com os achados de Durvaci e Pare (2007), pois apontam para um provável aumento de atividade celular, medido através da expressão de Egr-1, em decorrência da sinalização de CORT via translocação nuclear de GR. Além disso, mostram que esse processo independe da atividade de ERK. Em conjunto, esses dados sugerem que as alterações na atividade de ERK e CREB verificadas nos animais CS podem ser um efeito secundário e não influente sobre o comportamento do tipo ansioso, uma vez que agudamente (dentro de um período de 1 h), GR pode gerar aumento do transcrito Egr-1, independentemente da atividade de ERK. Por outro lado, uma redução crônica de atividade de CREB, via ERK, tal como apresentam os animais enriquecidos, poderia resultar em redução da excitabilidade dos neurônios do BLA (Jancic et al., 2009; ver Gruart et al., 2012), verificada, em nosso caso, através de redução da expressão de Egr-1. Não obstante, a redução da atividade de ERK concomitante ao aumento de sinalização de GR, vista nos animais CS, tem suporte factual na medida em que Wu et al. (2005)

mostraram, em trabalho realizado com cultura de células mamárias, que o aumento da sinalização de GR promove a rápida indução (em 30 minutos) do mRNA de MAPK fosfatase-1 (*mkp-1*), cujo produto proteico (MKP-1) é capaz de promover a desfosforilação, e portanto desativação, de diversas vias da MAPK, notadamente ERK. Complementarmente, Munhoz et al. (2010) verificaram que o aumento prolongado dos níveis séricos CORT em ratos promove aumento da expressão de mRNA de *mkp-1* no hipocampo e no cortex frontal.

Diante desse cenário, compreender de que forma o EA interfere na sinalização de GR nas células do BLA pode configurar uma estratégia interessante para o entendimento de como ocorre o desdobramento em uma resposta apreensiva diante um estímulo estressor. Voltando-nos para nossos resultados, um importante passo nesse sentido seria desvendar como o EA influencia na dinâmica de atividade do GR a ponto de torná-lo menos responsivo à CORT, pelo menos no que diz respeito à sua translocação nuclear, tal como vemos comparando os animais CS e ES. Pontualmente, ao analisarmos nossos resultados acerca da expressão do receptor de BDNF (TrKB) no BLA, notamos a possibilidade de uma interessante correlação destes com o aumento da translocação nuclear de GR ocorrida apenas nos animais CS, porém não nos animais ES, e com a redução crônica de sinalização de ERK/CREB ocorrida nos animais enriquecidos. De acordo com nossos resultados, o EA gerou um aumento da expressão de TrKB, notadamente nos animais ES, porém não nos animais controle, independente de terem sido estressados ou não. Com relação a esse fato, trabalhos anteriores desenvolvidos em cultura primária de neurônios corticais de ratos mostraram a existência de uma inter-relação entre a sinalização de GR e a sinalização de TrKB, inclusive mediante interação direta entre as duas proteínas, de tal forma que o aumento de expressão de um dos receptores, no caso GR, gera aumento de interação com o segundo (Numakaua et al., 2008). Adicionalmente, Kumamaru et al. (2011) mostraram, no mesmo modelo experimental, que o aumento de sinalização de GR via ligação a um agonista seletivo gera uma redução da interação de TrKB com uma proteína acessória chave para o processo de ativação de ERK, a saber, Shp2. O conjunto dessas informações nos sugere que, embora não tenha sido mostrado na literatura, o aumento da expressão de TrKB pode ser um importante mecanismo de controle da sinalização de GR, devido à interação entre ambos, de tal forma a permitir explicar o fato dos

animais ES não apresentarem aumento de translocação nuclear de GR no BLA, mesmo apresentando altos níveis séricos de CORT. Da mesma forma, a redução crônica da sinalização de ERK/CREB verificada nesses animais enriquecidos poderia ser devido ao aumento da interação entre TrKB e GR, não só devido ao aumento da expressão de TrKB e consequente recrutamento de GR, mas também por conta de evidências que apontam que o EA promove, cronicamente, moderado aumento basal de sinalização de GR (de Jong et al., 2000; Moncek et al., 2004), o que poderia influenciar na interação entre TrKB e Shp2, como visto acima, promovendo uma redução na fosforilação de ERK e consequente redução da atividade de CREB.

5 CONCLUSÕES

No presente trabalho, nós verificamos que o estresse agudo por contenção de 1 h foi capaz de induzir imediatamente um comportamento do tipo ansioso em ratos criados em condições padrão, porém não nos que viveram em ambiente enriquecido. O EA, portanto, mostrou influenciar o curso da resposta do tipo ansiosa desencadeada imediatamente após o estresse agudo. Nosso corpo de resultados indica que esse efeito protetor exercido pelo EA não se deve a uma eventual modulação sobre o eixo HPA, na media em que os animais estressados, independente se enriquecidos ou não, apresentaram níveis séricos de CORT semelhantes após o estresse e durante o teste de ansiedade. Por outro lado, verificamos que o estresse agudo promove aumento da atividade nuclear de GR no BLA dos animais, efeito não verificado quando estes foram submetidos ao ambiente enriquecido, sugerindo que o EA promove a modulação da atividade desse receptor na vigência de estímulo estressor. Além disso, verificamos, na mesma estrutura encefálica, que o EA promove redução crônica da atividade das proteínas ERK-1/2 e do fator de transcrição CREB, efeito que também é verificado agudamente após o estímulo estressor. As diferenças entre alterações de curta e longa duração na expressão dessas proteínas, além da modulação sobre a atividade de GR, sugerem que o EA exerce um efeito final alterando a responsividade dos neurônios do BLA a um dado estímulo estressor, eventualmente culminando em seu papel protetor na ansiedade. Preliminarmente, e em acordo com essa hipótese, verificamos maior expressão da proteína Egr-1 no BLA de animais controles estressados quando comparados aos animais enriquecidos estressados, indicando não só aumento da atividade neuronal na região em decorrência do estresse, como também o início de um processo plástico adaptativo promovido pelo estresse e que pode estar relacionado ao comportamento ansioso manifestado tardiamente. Finalmente, notamos que o EA promove, notadamente nos animais estressados, aumento da expressão do receptor TrKB, sugerindo um processo plástico que pode estar implicado na cinética de atividade nuclear do receptor GR.

REFERÊNCIAS*

Adamec R, Burton P, Shallow T, Budgell J. Unilateral block of NMDA receptors in the amygdala prevents predator stress-induced lasting increases in anxiety-like behavior and unconditioned startle-effective hemisphere depends on the behavior. Physiol Behav. 1999;65:739–51.

Altman J, Das GD. Autoradiographic examination of the effects of enriched environment on the rate of glial multiplication in the adult rat brain. Nature. 1964;204:1161-3.

Aston-Jones G, Cohen JD. Adaptive gain and the role of the locus coeruleus-norepinephrine system in optimal performance. J Comp Neurol. 2005;493(1):99-110.

Akirav I, Kozenicky M, Tal D, Sandi C, Venero C, Richter-Levin G. A facilitative role for corticosterone in the acquisition of a spatial task under moderate stress. Learn Mem. 2004;11(2):188-95.

Artola A, von Frijtag JC, Fermont PC, Gispen WH, Schrama LH, et al. Long-lasting modulation of the induction of LTD and LTP in rat hippocampal CA1 by behavioural stress and environmental enrichment. Eur J Neurosci. 2006;23(1):261-72.

Baumgärtel K, Tweedie-Cullen RY, Grossmann J, Gehrig P, Livingstone-Zatchej M, et al. Changes in the proteome after neuronal zif268 overexpression. J Proteome Res. 2009;8(7):3298-316.

Bell-Horner CL, Dohi A, Nguyen Q, Dillon GH, Singh M. ERK/MAPK pathway regulates GABAA receptors. J Neurobiol. 2006;66(13):1467-74.

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. Eur J Neurosci. 2004;20:1341-7.

Bennett EL, Rosenzweig MR, Diamond MC. Rat brain: effects of environmental enrichment on wet and dry weights. Science. 1969;163(3869):825-6.

Binder EB. The role of FKBP5, a co-chaperone of the glucocorticoid receptor in the pathogenesis and therapy of affective and anxiety disorders. Psychoneuroendocrinology. 2009;34 1:S186-95.

Binder EB, Bradley RG, Liu W, Epstein MP, Deveau TC, et al. Association of FKBP5 polymorphisms and childhood abuse with risk of posttraumatic stress disorder symptoms in adults. JAMA. 2008;299(11):1291-305.

*De acordo com:
International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 jul 15]. Available from: http://www.icmje.org

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

Blanchard RJ, Blanchard DC. Crouching as an index of fear. J Comp Physiol Psychol. 1969;67(3):370-5.

Brady LS, Lynn AB, Whitfield HJ Jr, Kim H, Herkenham M. Intrahippocampal colchicine alters hypothalamic corticotropin-releasing hormone and hippocampal steroid receptor mRNA in rat brain. Neuroendocrinology. 1992;55(2):121-33.

Bruel-Jungerman E, Laroche S, Rampon C. New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. Eur J Neurosci. 2005;21(2):513-21.

Caspi A, Sugden K, Moffitt TE, Taylor A, Craig IW, et al. Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. Science. 2003;301(5631):386-9.

Cameron HA, Gould E. Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus. Neuroscience. 1994;61(2):203-9.

Chamove AS. Cage design reduces emotionality in mice. Lab Anim. 1989;23(3):215-9.

Chaudhuri A, Zangenehpour S, Rahbar-Dehgan F, Ye F. Molecular maps of neural activity and quiescence. Acta Neurobiol Exp (Wars). 2000;60(3):403-10.

Chen YZ, Qiu J. Possible genomic consequence of nongenomic action of glucocorticoids in neural cells. News Physiol Sci. 2001;16:292-6.

Connor JR, Wang EC, Diamond MC. Increased length of terminal dendritic segments in old adult rats' somatosensory cortex: an environmentally induced response. Exp Neurol. 1982;78(2):466-70.

Conrad CD, Galea L.A, Kuroda Y, McEwen BS. Chronic stress impairs rat spatial memory on the Y maze, and this effect is blocked by tianeptine pretreatment. Behav Neurosci. 1996;110:1321–34.

Czéh B, Welt T, Fischer AK, Erhardt A, Schmitt W, et al. Chronic psychosocial stress and concomitant repetitive transcranial magnetic stimulation: effects on stress hormone levels and adult hippocampal neurogenesis. Biol Psychiatry. 2002;52(11):1057-65.

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

Davis RJ. Transcriptional regulation by MAP kinases. Mol Reprod Dev. 1995;42(4):459-67.

Diamond MC, Law F, Rhodes H, Lindner B, Rosenzweig MR, et al. Increases in cortical depth and glia numbers in rats subjected to enriched environment. J Comp Neurol. 1966;128(1):117-26.

Diamond MC, Rosenzweig MR, Bennett EL, Lindner B, Lyon L. Effects of environmental enrichment and impoverishment on rat cerebral cortex. J Neurobiol. 1972;3(1):47-64.

de Jong IC, Prelle IT, van de Burgwal JA, Lambooij E, Korte SM, et al. Effects of environmental enrichment on behavioral responses to novelty, learning, and memory, and the circadian rhythm in cortisol in growing pigs. Physiol Behav. 2000;68(4):571-8.

Dranovsky A, Hen R. Hippocampal neurogenesis: regulation by stress and antidepressants. Biol Psychiatry. 2006;15;59(12):1136-43.

Duffy SN, Craddock KJ, Abel T, Nguyen PV. Environmental enrichment modifies the PKA-dependence of hippocampal LTP and improves hippocampus-dependent memory. Learn Mem. 2001;8(1):26-34.

Duvarci S, Paré D. Glucocorticoids enhance the excitability of principal basolateral amygdala neurons. J Neurosci. 2007; 27(16):4482-91.

Faber ES, Sah P. Independent roles of calcium and voltage-dependent potassium currents in controlling spike frequency adaptation in lateral amygdala pyramidal neurons. Eur J Neurosci. 2005;22(7):1627-35.

Faber ES, Sah P. Physiological role of calcium-activated potassium currents in the rat lateral amygdala. J Neurosci. 2002;1618-28.

Faherty CJ, Kerley D, Smeyne RJ. A Golgi-Cox morphological analysis of neuronal changes induced by environmental enrichment. Brain Res Dev Brain Res. 2003;141(1-2):55-61.

Feldman S, Conforti N, Itzik A, Weidenfeld J. Differential effect of amygdaloid lesions on CRF-41, ACTH and corticosterone responses following neural stimuli. Brain Res. 1994;658:21–6

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

Fernández-Teruel A, Escorihuela RM, Castellano B, González B, Tobeña A. Neonatal handling and environmental enrichment effects on emotionality, novelty/reward seeking, and age-related cognitive and hippocampal impairments: focus on the Roman rat lines. Behav Genet. 1997;27(6):513-26.

Ferry B, McGaugh JL. Clenbuterol administration into the basolateral amygdala post-training enhances retention in an inhibitory avoidance task. Neurobiol Learn Mem. 1999;72(1):8-12.

Foster TC, Dumas TC. Mechanism for increased hippocampal synaptic strength following differential experience. J Neurophysiol. 2001;85(4):1377-83.

Fox C, Merali Z, Harriso C. Therapeutic and protective effect of environmental enrichment against psychogenic and neurogenic stress. Behav Brain Res. 2006;175:1-8.

Francis DD, Diorio J, Plotsky PM, Meaney MJ. Environmental enrichment reverses the effects of maternal separation on stress reactivity. J Neurosci. 2002;22(18):7840-3.

Frey S, Bergado-Rosado J, Seidenbecher T, Pape HC, Frey JU. Reinforcement of early long-term potentiation (early-LTP) in dentate gyrus by stimulation of the basolateral amygdala: heterosynaptic induction mechanisms of late-LTP. J Neurosci. 2001;21(10):3697-703.

Frick KM, Fernandez SM. Enrichment enhances spatial memory and increases synaptophysin levels in aged female mice. Neurobiol Aging. 2003;24(4):615-26.

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

Galigniana NM, Ballmer LT, Toneatto J, Erlejman AG, Lagadari M, et al. Regulation of the glucocorticoid response to stress-related disorders by the Hsp90-binding immunophilin FKBP51. J Neurochem. 2012;122(1):4-18.

Govindarajan A, Rao BS, Nair D, Trinh M, Mawjee N, et al. Transgenic brain-derived neurotrophic factor expression causes both anxiogenic and antidepressant effects. Proc Natl Acad Sci USA. 2006;103(35):13208-13.

Gould E, McEwen BS, Tanapat P, Galea LA, Fuchs E. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. J Neurosci. 1997;17:2492–8.

Green EJ, Greenough WT. Altered synaptic transmission in dentate gyrus of rats reared in complex environments: evidence from hippocampal slices maintained in vitro. J Neurophysiol. 1986;55(4):739-50.

Greenough WT, Hwang HM, Gorman C. Evidence for active synapse formation or altered postsynaptic metabolism in visual cortex of rats reared in complex environments. Proc Natl Acad Sci USA. 1985;82(13):4549-52.

Greenough WT, Volkmar FR. Pattern of dendritic branching in occipital cortex of rats reared in complex environments. Exp Neurol. 1973;40(2):491-504.

Greenough WT, Volkmar FR, Juraska JM. Effects of rearing complexity on dendritic branching in frontolateral and temporal cortex of the rat. Exp Neurol. 1973;41(2):371-8.

Gross C, Hen R. The developmental origins of anxiety. Nat Rev Neurosci. 2004;5(7): 545-52.

Gruart A, Benito E, Delgado-García JM, Barco A. Enhanced cAMP response element-binding protein activity increases neuronal excitability, hippocampal long-term potentiation, and classical eyeblink conditioning in alert behaving mice. J Neurosci. 2012;32(48):17431-41.

Guo YY, Liu SB, Cui GB, Ma L, Feng B, et al. Acute stress induces down-regulation of large-conductance Ca2+-activated potassium channels in the lateral amygdala. J Physiol. 2012;590(Pt 4):875-86.

Han MH, Bolaños CA, Green TA, Olson VG, Neve RL, et al. Role of cAMP response element-binding protein in the rat locus ceruleus: regulation of neuronal activity and opiate withdrawal behaviors. J Neurosci. 2006;26(17):4624-9.

Hatfield T, McGaugh JL. Norepinephrine infused into the basolateral amygdala posttraining enhances retention in a spatial water maze task. Neurobiol Learn Mem. 1999;71(2):232-9.

Herman JP, Prewitt CMF, Cullinan WE. Neuronal circuit regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical stress axis. Crit Rev Neurobiol. 1996;10:371-94.

Herman JP, Schäfer MK, Young EA, Thompson R, Douglass J, et al. Evidence for hippocampal regulation of neuroendocrine neurons of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. J Neurosci. 1989;9(9):3072-82.

Herman JP, Figueiredo H, Mueller NK, Ulrich-Lai Y, Ostrander M.M. et al. Central mechanisms of stress integration: Hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. Front Neuroendocrinol. 2003;24:151–80.

Holsboer F. The corticosteroid receptor hypothesis of depression. Neuropsychopharmacology. 2000;23(5):477-501.

Hua SY, Chen YZ. Membrane receptor-mediated electrophysiological effects of glucocorticoid on mammalian neurons. Endocrinology. 1989;124(2):687-91.

Ickes BR, Pham TM, Sanders LA, Albeck DS, Mohammed AH, et al. Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain. Exp Neurol. 2000;164(1):45-52.

Ikegaya Y, Saito H, Abe K. The basomedial and basolateral amygdaloid nuclei contribute to the induction of long-term potentiation in the dentate gyrus in vivo. Eur J Neurosci. 1996;8(9):1833-9.

James AB, Conway AM, Morris BJ. Regulation of the neuronal proteasome by Zif268 (Egr1). J Neurosci. 2006;26(5):1624-34.

Jancic D, Lopez de Armentia M, Valor LM, Olivares R, Barco A. Inhibition of cAMP response element-binding protein reduces neuronal excitability and plasticity, and triggers neurodegeneration. Cereb Cortex. 2009;19(11):2535-47.

Jeanneteau F, Garabedian MJ, Chao MV. Activation of Trk neurotrophin receptors by glucocorticoids provides a neuroprotective effect. Proc Natl Acad Sci USA. 2008;105(12):4862-7.

Jones MW, Errington ML, French PJ, Fine A, Bliss TV, et al. A requirement for the immediate early gene Zif268 in the expression of late LTP and long-term memories. Nat Neurosci. 2001;4(3):289-96.

Kabbaj M, Devine DP, Savage VR, Akil H. Neurobiological correlates of individual differences in novelty-seeking behavior in the rat: differential expression of stress-related molecules. J Neurosci. 2000;20(18):6983-8.

Karst H, Nair S, Velzing E, Rumpff-van Essen L, Slagter E, et al. Glucocorticoids alter calcium conductances and calcium channel subunit expression in basolateral amygdala neurons. Eur J Neurosci. 2002;16(6):1083-9.

Kavushansky A, Richter-Levin G. Effects of stress and corticosterone on activity and plasticity in the amygdala. J Neurosci Res. 2006;84(7):1580-7.

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

Kempermann G, Brandon EP, Gage FH. Environmental stimulation of 129/SvJ mice causes increased cell proliferation and neurogenesis in the adult dentate gyrus. Curr Biol. 1998;8(16):939-42.

Kempermann G, Gast D, Gage FH. Neuroplasticity in old age: sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment. Ann Neurol. 2002;52(2):135-43.

Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. Nature. 1997;386(6624):493-5.

Kim JJ, Diamond DM. The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. Nat Rev Neurosci. 2002;3:453–62.

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

Klein SL, Lambert KG, Durr D, Schaefer T, Waring RE. Influence of environmental enrichment and sex on predator stress response in rats. Physiol Behav. 1994;56(2):291-7.

Ko SW, Ao HS, Mendel AG, Qiu CS, Wei F, et al. Transcription factor Egr-1 is required for long-term fear memory and anxiety. Acta Physiologica Sinica. 2005;57(4):421-32.

Koo JW, Russo SJ, Ferguson D, Nestler EJ, Duman RS. Nuclear factor-kappaB is a critical mediator of stress-impaired neurogenesis and depressive behavior. Proc Nat Acad Sci. 2010;107:2969-74.

Korte SM. Corticosteroids in relation to fear, anxiety and psychopathology. Neurosci Biobehav Rev. 2001;25(2):117-42.

kozorovitskiy Y, Gould E. Dominance hierarchy influences adult neurogenesis in the dentate gyrus. J Neurosci. 2004;24:6755–9.

Kumamaru E, Numakawa T, Adachi N, Kunugi H. Glucocorticoid suppresses BDNF-stimulated MAPK/ERK pathway via inhibiting interaction of Shp2 with TrkB. FEBS Lett. 2011;585(20):3224-8.

Larsson F, Winblad B, Mohammed AH. Psychological stress and environmental adaptation in enriched vs. impoverished housed rats. Pharmacol Biochem Behav. 2002;73(1):193-207.

Leammli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970;227:680-5.

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

LeDoux J. The amygdala. Curr Biol. 2007;23;17(20):R868-74.

Lee EH, Hsu WL, Ma YL, Lee PJ, Chao CC. Enrichment enhances the expression of sgk, a glucocorticoid-induced gene, and facilitates spatial learning through glutamate AMPA receptor mediation. Eur J Neurosci. 2003;18(10):2842-52.

Leggio MG, Mandolesi L, Federico F, Spirito F, Ricci B, et al. Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat. Behav Brain Res. 2005;30;163(1):78-90.

Lopez de Armentia M, Jancic D, Olivares R, Alarcon JM, Kandel ER, et al.. cAMP response element-binding protein-mediated gene expression increases the intrinsic excitability of CA1 pyramidal neurons. J Neurosci. 2007;27(50):13909-18.

Luine V, Villegas M, Martinez C, McEwen BS. Repeated stress causes reversible impairments of spatial memory performance. Brain Res. 1994;639:167–70.

Malber JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. J Neurosci. 2000; 20:9104–10.

Malkani S, Rosen JB. Differential expression of EGR-1 mRNA in the amygdala following diazepam in contextual fear conditioning. Brain Res. 2000;860(1-2):53-63.

McEwen BS. Central effects of stress hormones in health and disease: Understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. Eur J Pharmacol. 2008;583(2-3):174-85.

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.

Millan MJ. The neurobiology and control of anxious states. Prog Neurobiol. 2003;70:83-244.

Mitra R, Ferguson D, Sapolsky RM. Mineralocorticoid Receptor Overexpression in Basolateral Amygdala Reduces Corticosterone Secretion and Anxiety. Biol Psychiatry. 2009;66:686-90.

Mitra R, Jadhav S, McEwen BS, Vyas A. Chattarji S. Stress duration modulates the spatiotemporal patterns of spine formation in the basolateral amygdala. Proc Nat Acad Sci USA. 2005;102:9371–6.

Mitra R, Sapolsky RM. Acute corticosterone treatment is sufficient to induce anxiety and amygdaloid dendritic hypertrophy. Proc Nat Acad Sci USA. 2008;105:5573–8.

Mitra R, Sapolsky RM. Expression of chimeric estrogen-glucocorticoid-receptor in the amygdala reduces anxiety. Brain Res. 2010;1342:33-8.

Mohammed AH, Zhu SW, Darmopil S, Hjerling-Leffler J, Ernfors P, et al. Environmental enrichment and the brain. Prog in Brain Res. 2002;138:109-33.

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.

Mora F, Segovia G, del Arco A. Aging, plasticity and environmental enrichment: Structural changes and neurotransmitter dynamics in several areas of the brain. Brain Res Rev. 2007;55:78-88.

Munhoz CD, Sorrells SF, Caso JR, Scavone C, Sapolsky RM. Glucocorticoids exacerbate lipopolysaccharide-induced signaling in the frontal cortex and hippocampus in a dose-dependent manner. J Neurosci. 2010;30(41):13690-8.

Murray F, Smith DW, Hutson PH. Chronic low dose corticosterone exposure decreased hippocampal cell proliferation, volume and induced anxiety and depression like behaviours in mice. Eur J Pharmacol. 2008;583(1):115-27.

Myers B, Meerveld BG. Corticosteroid receptor-mediated mechanisms in the amygdala regulate anxiety and colonic sensitivity. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2007;292:9

Naka F, Narita N, Okado N, Narita M. Modification of AMPA receptor properties following environmental enrichment. Brain Dev. 2005;27(4):275-8.

Nieminen SA, Sirviö J, Teittinen K, Pitkänen A, Airaksinen MM, Riekkinen P. Amygdala kindling increased fear-response, but did not impair spatial memory in rats. Physiol Behav. 1992;51(4):845-9

Nilsson M, Perfilieva E, Johansson U, Orwar O, Eriksson PS. Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. J Neurobiol. 1999;39(4):569-78.

Nithianantharajah J, Hannan A. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. Nat Rev Neurosci. 2006;7:697-709.

Nithianantharajah J, Levis H, Murphy M. Environmental enrichment results in cortical and subcortical changes in levels of synaptophysin and PSD-95 proteins. Neurobiol Learn Mem. 2004;81(3):200-10.

Numakawa T, Kumamaru E, Adachi N, Yagasaki Y, Izumi A, et al. Glucocorticoid receptor interaction with TrkB promotes BDNF-triggered PLC-gamma signaling for glutamate release via a glutamate transporter. Proc Natl Acad Sci USA. 2009;106(2):647-52.

Pandey SC, Roy A, Zhang H. The decreased phosphorylation of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) response element binding (CREB) protein in the central amygdala acts as a molecular substrate for anxiety related to ethanol withdrawal in rats. Alcohol Clin Exp Res. 2003;27(3):396-409.

Pandey SC, Zhang H, Roy A, Xu T. Deficits in amygdaloid cAMP-responsive element-binding protein signaling play a role in genetic predisposition to anxiety and alcoholism. J Clin Invest. 2005;115(10):2762-73.

Pariante CM, Miller AH. Glucocorticoid receptors in major depression: relevance to pathophysiology and treatment. Biol Psychiatry. 2001;49(5):391-404.

Patel PD, Lopez JF, Lyons DM, Burke S. Wallace, M, Schatzberg, A.F. Glucocorticoid and mineralocorticoid receptor mRNA expression in squirrel monkey brain. J Psychiatr Res. 2000;34:383–92.

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

Pham TM, Ickes B, Albeck D, Söderström S, Granholm AC, et al. Mohammed AH. Changes in brain nerve growth factor levels and nerve growth factor receptors in rats exposed to environmental enrichment for one year. Neuroscience. 1999;94(1):279-86.

Protopopescu X, Pan H, Tuescher O, Cloitre M, Goldstein M, et al. Differential time courses and specificity of amygdala activity in posttraumatic stress disorder subjects and normal control subjects. Biol Psychiatry. 2005;57(5):464-73.

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

Rampon C, Jiang CH, Dong H, Tang YP, Lockhart DJ, et al. Effects of environmental enrichment on gene expression in the brain. Proc Natl Acad Sci USA. 2000;97(23):12880-4.

Rampon C, Tang YP, Goodhouse J, Shimizu E, Kyin M, et al. Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. Nat Neurosci. 2000;3(3):238-44.

Rao RP, Anilkumar S, McEwen BS, Chattarji S. Glucocorticoids protect against the delayed behavioral and cellular effects of acute stress on the amygdala. Biol Psychiatry. 2012;72(6):466-75.

Rauch SL, Whalen PJ, Shin LM, McInerney SC, Macklin ML, et al. Exaggerated amygdala response to masked facial stimuli in posttraumatic stress disorder: a functional MRI study. Biol Psychiatry. 2000;47(9):769-76.

Revest JM, Dupret D, Koehl M, Funk-Reiter C, Grosjean N, et al. Adult hippocampal neurogenesis is involved in anxiety-related behaviors. Mol Psychiatry. 2009;14(10):959-67.

Revest JM, Di Blasi F, Kitchener P, Rougé-Pont F, Desmedt A. The MAPK pathway and Egr-1 mediate stress-related behavioral effects of glucocorticoids. Nat Neurosci. 2005;8(5):664-72.

Richardson MP, Strange BA, Dolan RJ. Encoding of emotional memories depends on amygdala and hippocampus and their interactions. Nat Neurosci. 2004;7(3):278-85.

Risch N, Herrell R, Lehner T, Liang KY, Eaves L, et al. Interaction between the serotonin transporter gene (5-HTTLPR), stressful life events, and risk of depression: a meta-analysis. JAMA. 2009;301(23):2462-71.

Rodrigues SM, LeDoux JE, Sapolsky RM. The influence of stress hormones on fear circuitry. Annu Rev Neurosci. 2009;32:289-313

Rodríguez-Manzanares PA, Isoardi NA, Carrer HF, Molina VA. Previous stress facilitates fear memory, attenuates GABAergic inhibition, and increases synaptic plasticity in the rat basolateral amygdala. J Neurosci. 2005;25(38):8725-34.

Roozendaal B, McGaugh JL. Glucocorticoid receptor agonist and antagonist administration into the basolateral but not central amygdala modulates memory storage. Neurobiol Learn Mem. 1997;67(2):176-9.

Roozendaal B, McEwen BS, Chattarji S. Stress, memory and the amygdala. Nat Rev Neurosci. 2009;10(6):423-33.

Rosen JB, Schulkin J. From normal fear to pathological anxiety. Psychological Review. 1998;205:325-50.

Rosenkranz JA, Venheim ER, Padival M. Chronic stress causes amygdala hyperexcitability in rodents. Biol Psychiatry. 2010;67(12):1128-36.

Rosenzweig MR, Bennett EL. Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. Behav Brain Res. 1996;78:57-65.

Rosenzweig MR, Bennett EL, Hebert M, Morimoto H. Social grouping cannot account for cerebral effects of enriched environments. Brain Res. 1978;153:563-76.

Roy V, Belzung C, Delarue C, Chapillon P. Environmental enrichment in BALB/c mice: effects in classical tests of anxiety and exposure to a predatory odor. Physiol Behav. 2001;74(3):313-20.

Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, et al. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. Science. 2003;301:805–9.

Sapolsky RM, Armanini MP, Packan DR, Sutton SW, Plotsky PM. Glucocorticoid feedback inhibition of adrenocorticotropic hormone secretagogue release. Relationship to corticosteroid receptor occupancy in various limbic sites. Neuroendocrinology. 1990;51(3):328-36.

Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS. Glucocorticoid-sensitive hippocampal neurons are involved in terminating the adrenocortical stress response. Proc Natl Acad Sci USA. 1984;81(19):6174-7.

Schloesser RJ, Lehmann M, Martinowich K, Manji HK, Herkenham M. Environmental enrichment requires adult neurogenesis to facilitate the recovery from psychosocial stress. Mol Psychiatry. 2010;15(12):1152-63.

Schloesser RJ, Manji HK, Martinowich K. Suppression of adult neurogenesis leads to an increased hypothalamo-pituitary-adrenal axis response. Neuroreport. 2009;20(6):553-7.

Shepard J, Barron K, Myers D. Stereotaxic localization of corticosterone to the amygdala enhances hypothalamo-pituitary-adrenal responses to behavioral stress. Brain Res. 2003;963:203–13.

Shin LM, Liberzon I. The Neurocircuitry of Fear, stress, and anxiety disorders. Neuropsychopharmacology. 2010;35:169-91.

Smith SM, Vale WW. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. Dialogues Clin Neurosci. 2006;8:383–95.

Snyder JS, Soumier A, Brewer M, Pickel J, Cameron HA. Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour. Nature. 2011;476(7361):458-61.

Sousa N, Lukoyanov NV, Madeira MD, Almeida OF. Paula-Barbosa, M.M. Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. Neuroscience. 2000;97:253–66.

Spijker AT, van Rossum EF. Glucocorticoid sensitivity in mood disorders. Neuroendocrinology. 2012;95(3):179-85.

Storm SM, Cleveland JL, Rapp UR. Expression of raf family proto-oncogenes in normal mouse tissues. Oncogene. 1990;5(3):345-51.

Surget A, Saxe M, Leman S, Ibarguen-Vargas Y, Chalon S et al. Griebel, G. et al. Drug-dependent requirement of hippocampal neurogenesis in a model of depression and of antidepressant reversal. Biol Psychiatry. 2008;64:293–301.

Tang YP, Wang H, Feng R, Kyin M, Tsien JZ. Differential effects of enrichment on learning and memory function in NR2B transgenic mice. Neuropharmacology. 2001;41(6):779-90.

Tronche F, Kellendonk C, Reichardt HM, Schütz G. Genetic dissection of glucocorticoid receptor function in mice. Curr Opin Genet Dev. 1998;8(5):532-8.

Tsoory MM, Vouimba RM, Akirav I, Kavushansky A, Avital A, et al. Amygdala modulation of memory-related processes in the hippocampus: potential relevance to PTSD. Prog Brain Res. 2008;167:35-51.

Valverde O, Mantamadiotis T, Torrecilla M, Ugedo L, Pineda J, et al. Modulation of anxiety-like behavior and morphine dependence in CREB-deficient mice. Neuropsychopharmacology. 2004;29(6):1122-33.

van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Neural consequences of environmental enrichment. Nat Rev Neurosci. 2000;1:191-8.

Viosca J, Lopez de Armentia M, Jancic D, Barco A. Enhanced CREB-dependent gene expression increases the excitability of neurons in the basal amygdala and primes the consolidation of contextual and cued fear memory. Learn Mem. 2009;16(3):193-7.

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, Chattarji S. Modulation of different states of anxiety-like behavior by chronic stress. Behav Neurosci. 2004;118:1450–4.

Vyas A, Mitra R, Shankaranarayana, Rao BS, Chattarji S. Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. J Neuroscience. 2002;22:6810–8

Wallace TL, Stellitano KE, Neve RL, Duman RS. Effects of cyclic adenosine monophosphate response element binding protein overexpression in the basolateral amygdala on behavioral models of depression and anxiety. Biol Psychiatry. 2004;56(3):151-60.

Warner-Schmidt JL, Duman RS. Hippocampal neurogenesis: opposing effects of stress and antidepressant treatment. Hippocampus. 2006;16(3):239-49.

Wefers B, Hitz C, Hölter SM, Trümbach D, Hansen J, et al. MAPK signaling determines anxiety in the juvenile mouse brain but depression-like behavior in adults. PLoS One. 2012;7(4):e35035.

Wu W, Pew T, Zou M, Pang D, Conzen SD. Glucocorticoid receptor-induced MAPK phosphatase-1 (MPK-1) expression inhibits paclitaxel-associated MAPK activation and contributes to breast cancer cell survival. J Biol Chem. 2005;280(6):4117-24.

Zhou Y, Won J, Karlsson MG, Zhou M, Rogerson T, et al. CREB regulates excitability and the allocation of memory to subsets of neurons in the amygdala. Nat Neurosci. 2009;12(11):1438-43.