Richard Leandro Spinieli

“Avaliação do envolvimento de receptores específicos para o fator liberador de corticotropina CRF₁ e CRF₂ dos núcleos basolateral e central da amígdala no comportamento de imobilidade tônica em cobaias (*Cavia porcellus*)”

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área de concentração: Psicobiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Christie Ramos Andrade Leite-Panissi

Ribeirão Preto-SP

2014

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL E PARCIAL DESTES
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO,
PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central do Campus USP – Ribeirão Preto

Spinieli, Richard Leandro

Avaliação do envolvimento de receptores específicos para o fator liberador de corticotropina CRF₁ e CRF₂ dos núcleos basolateral e central da amígdala no comportamento de imobilidade tônica em cobaias (*Cavia porcellus*). Ribeirão Preto, 2014.

82.: il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Psicobiologia.

Orientador: Leite-Panissi, Christie Ramos Andrade

1. Comportamento Defensivo 2. Medo Inato. 3. Núcleo Basolateral da Amígdala. 4. Núcleo Central da Amígdala. 5. Fator Liberador de Corticotropina. 6. CRF. 7. CRF₁. 8. CRF₂.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Richard Leandro Spinieli

“Avaliação do envolvimento de receptores específicos para o fator liberador de corticotropina CRF₁ e CRF₂ dos núcleos basolateral e central da amígdala no comportamento de imobilidade tônica em cobaias (*Cavia porcellus*)”

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Psicobiologia

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora:

1)Prof.(a). Dr. (a).:_____

Instituição:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

2)Prof.(a). Dr. (a).:_____

Instituição:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

3)Prof.(a). Dr. (a).:_____

Instituição:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

DEDICATÓRIA

Dedico, inicialmente, aos meus amados pais, que com esmero me conduziram até aqui.
Com grande paciência, crença e devoção foram capazes de proporcionar a existência
deste trabalho.

Também, agradeço aos meus irmãos por todo apoio.

Em verdade confesso que sem vocês esse sonho não haveria se realizado.

Meu eterno agradecimento a cada um de vocês.

AGRADECIMENTOS

Confesso ser complicado retribuir o devido agradecimento neste breve espaço a todos que contribuíram com o trabalho.

Mas, dentre a imensidão de pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste, nada aconteceria sem a Profa. Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi. Sem ela, não haveria realização pessoal e profissional, não haveria a caminhada, não haveria todo aprendizado e não haveria a realização deste grande sonho almejado.

Ainda, como parte da finalização do trabalho, agradeço aos membros desta banca avaliadora pela paciência na leitura e maestria no julgamento.

À Profa. Dra. Maria José Alves Rocha e Profa. Dra. Mamie Misusaki Iyomasa por cederem seus equipamentos de seus laboratórios.

Em toda essa jornada, é impossível deixar de agradecer imensamente aos amigos de laboratório. Sendo eles: Alberto, Eveline, Bruna, Vinícius, Glauce, Priscila, Amanda Desiderá, Amanda, João, Daniela, Jeanne, Carolina e João.

À técnica do laboratório Patrícia Adriana Basile, pelo auxílio técnico durante a experimentação deste estudo.

À Renata B. Vicentini Del Moro, secretária do programa de Pós-Graduação em Psicobiologia da FFCLRP-USP, pela colaboração.

Ao Prof. Dr. Wagner Ferreira dos Santos, pela colaboração como assessor, por analisar e direcionar com clareza o trabalho.

Aos funcionários do Biotério I da FORP, Sra. Aline Aparecida Ferrarese, Sr. Antônio Sérgio Ap. Mesca e Sr. Antônio Massaro, por toda competência.

À Maria e Cláudia que trabalharam na manutenção da limpeza do laboratório durante todo o período do trabalho.

Aos amigos que divido o mesmo teto, Luan, Franco e Rogério e Vitor.

À Amanda Castro pela preocupação e apoio.

Ao meu querido amigo Ms. Everton Horiquni Barbosa, que acompanhou toda minha trajetória na pós-graduação.

À CAPES, PROEX e FAPESP pelo apoio financeiro.

“Podem ter a certeza de que não foi quando descobriu a América, mas
sim quando estava a descobri-la, que Colombo se sentiu feliz.”

Fiodor Dostoiévski

RESUMO

Spinieli, R.L. Avaliação do envolvimento de receptores específicos para o fator liberador de corticotropina CRF₁ e CRF₂ dos núcleos basolateral e central da amígdala no comportamento de imobilidade tônica em cobaias (*Cavia porcellus*). 2014. 82p. Dissertação (Mestrado em Ciências, Psicobiologia) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

A resposta comportamental de Imobilidade Tônica (IT) ocorre em situações de perigo intenso, e em situações inescapáveis, como por exemplo, o ataque de um predador. Esta resposta caracteriza-se por perda do reflexo de endireitamento e relativa falta de responsividade aos estímulos ambientais. Estudos consistentes tem demonstrado o envolvimento de distintas áreas encefálicas na modulação desta resposta, entre elas a substância cinzenta periaquedutal, o hipotálamo e a amígdala. Considerando a amígdala em particular, estudos mostraram o envolvimento dos receptores para o fator liberador de corticotropina (CRF) dos núcleos basolateral (BLA) e central (CeA) na modulação da resposta de IT em cobaias. De fato, nas últimas décadas, várias evidências sugerem que o CRF está intimamente correlacionado com comportamento emocional associado ao medo e à ansiedade. Embora seja claro o envolvimento de receptores CRF na modulação do medo, e especificamente na modulação da IT em cobaias, ainda não está esclarecido o envolvimento dos diferentes subtipos de receptores para CRF na modulação emocional. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi investigar o envolvimento dos receptores específicos para o fator liberador de corticotropina, CRF₁ e CRF₂ dos núcleos basolateral (BLA) e central da amígdala (CeA) na modulação da resposta de IT em cobaias. Para atingir estes objetivos, grupos independentes de cobaias, com implante de cânulas-guias dirigidas para o BLA ou para o CeA foram avaliadas no teste de imobilidade tônica, antes e depois da administração dos antagonistas específicos para receptores CRF₁ (CP-376395) ou para receptores CRF₂ (Astressin 2B), ou depois da administração de CRF precedido ou não dos antagonistas CRF₁ ou CRF₂. Em adição, para avaliar se as drogas utilizadas alteraram a atividade locomotora, foi realizado o teste do campo aberto, por 5 minutos, após a administração dos antagonistas para receptores CRF₁ (CP-376395) e CRF₂ (Astressin 2B), em doses capazes de alterar a resposta de IT em cobaias, e de CRF precedido por antagonista CRF₁ ou CRF₂. Os resultados deste trabalho mostram que o bloqueio dos receptores CRF₁ e CRF₂ no BLA e no CeA reduziram a duração da resposta defensiva de imobilidade tônica (IT) em cobaias. Inversamente, a ativação destes receptores no BLA e no CeA aumentou o

tempo de IT, demonstrado pela administração de CRF nestas regiões amigdalóides. Ainda, os antagonistas específicos para receptores CRF₁ e CRF₂ foram capazes de bloquear o aumento da duração da IT induzida pelo CRF administrado no mesmo sítio. Estes resultados sugerem que o efeito promovido pelo CRF no BLA e no CeA ocorre por atuação conjunta em receptores CRF₁ e CRF₂. Em adição, é importante ressaltar que as drogas, nas doses utilizadas neste estudo, não promoveram alteração da resposta motora, desde que não alteraram a atividade no teste do campo aberto, o que por si só, poderia alterar a resposta de IT. Assim, é possível que sugerir que o bloqueio específico de receptores CRF₁ e CRF₂ do BLA e do CeA promovem redução do medo e/ou da ansiedade, resultando em redução da resposta de IT em cobaias.

Palavras-chave: Comportamento Defensivo, Medo Inato, Imobilidade Tônica, Núcleo Basolateral da Amígdala, Núcleo Central da Amígdala, CRF, CRF₁, CRF₂.

ABSTRACT

Spinieli, R.L. Evaluation of the role of specific receptors for corticotropin-releasing factor CRF₁ and CRF₂ from the basolateral and central nucleus of amygdala in tonic immobility behavior in guinea pigs (*Cavia porcellus*). 2014. 82p. Dissertation (Master degree in Sciences, Psychobiology) – Faculdade de Philosophy, Sciences and Literature, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

The tonic immobility response (TI) occurs in inescapable situations of intense danger, such as the predator attack. This response is characterized by loss of righting reflex and the relative lack of responsiveness to environmental stimuli. Consistent studies have demonstrated the involvement of different brain areas to modulate this defensive behavior, including the periaqueductal gray matter, hypothalamus and amygdala. Whereas the amygdala in particular, studies have shown the involvement of receptors for corticotropin-releasing factor (CRF) of the central (CeA) and basolateral (BLA) nuclei of amygdala in TI modulating in guinea pigs. Indeed, in recent decades, several evidences suggest that CRF is closely correlated with emotional behavior associated with fear and anxiety. While it is clear the involvement of CRF receptors in the modulation of fear, and specifically in the modulation of TI, it is still unclear the involvement of different subtypes of CRF receptors in the emotional modulation. Thus, the aim of this study was to investigate the involvement of specific receptors for corticotropin-releasing factor, CRF₁ and CRF₂ of BLA and of CeA in modulating the TI response in guinea pigs. To achieve these objectives, independent groups of guinea pigs were implanted with guide cannulae aimed for BLA or CeA were evaluated in the test of tonic immobility before and after the administration of specific antagonists of CRF₁ receptors (CP- 376395) or CRF₂ receptors (Astressin 2B), or after the administration of CRF preceded by CRF₁ or CRF₂ antagonists, or CRF per se. In addition, to assess whether the drugs used altered locomotor activity, the open field test, for 5 minutes was performed after administration of antagonists for CRF₁ receptors (CP- 376395) and CRF₂ (Astressin 2B), at doses that alter the TI response in guinea pigs, and the CRF agonist preceded by CRF₁ or CRF₂. These results show that blockade of CRF₁ and CRF₂ receptors in the BLA and CeA reduced the duration of the defensive response of tonic immobility (TI) in guinea pigs. In contrast, activation of these receptors in the BLA and CeA increased the TI duration, demonstrated by administration of CRF in these amygdaloid regions. Also, specific antagonists for CRF₁ and CRF₂ receptors were able to block the increase in the TI response induced by CRF administered in the same structure. These results suggest that the effect promoted by CRF in the BLA and CeA is

by joint performance of CRF₁ and CRF₂ receptors. Additionally, it is important to note that the drugs, in the doses used in this study, did not promote change in the motor response, since it did not alter the activity in the open field test, which by itself could alter the TI response. Thus, it is possible to suggest that the specific blockade of CRF₁ and CRF₂ receptors in the BLA and CeA promote reduction of fear and/or anxiety, resulting in reduced TI response in guinea pigs.

Keywords: Defensive behavior, Innate fear: Tonic Immobility, Basolateral nucleus of amygdala, Central nucleus of amygdala, CRF, CRF₁, CRF₂.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Fotografia de uma cobaia (*Cavia porcellus*) durante um episódio de imobilidade tônica, induzido manualmente, em laboratório. 32

FIGURA 2: Fotografia de aparato em polietileno opaco (60 X 60 X 60 cm) utilizado para teste do campo aberto, medindo 15 cm de cada lado. 33

FIGURA 3: Duração média dos cinco episódios de imobilidade tônica (IT) antes (Controle), após a cirurgia (Sham) e após a administração do antagonista para receptores CRF₁, CP-376395, (CP 37) nas doses de 0,4 µg/0,2 µl (A) e 0,8 µg/0,2 µl (B) no núcleo basolateral da amígdala (BLA). 40

FIGURA 4: Duração média dos cinco episódios de imobilidade tônica (IT) antes (Controle) e após a cirurgia (Sham), após a administração do CRF (0,2 µg/0,2 µl) e após o pré-tratamento com CP-376395 (CP-37, 0,2 µg/0,2 µl), antagonista de receptores CRF₁, seguido pela microinjeção de CRF no BLA. 40

FIGURA 5: Duração média dos cinco episódios de imobilidade tônica (IT) antes (Controle), após a cirurgia (Sham) e após a administração do antagonista para receptores CRF₁, CP-376395, (CP 37) nas doses de 0,4 µg/0,2 µl (A) e 0,8 µg/0,2 µl (B) no núcleo central da amígdala (CeA). 41

FIGURA 6: Duração média dos cinco episódios de imobilidade tônica (IT) antes (Controle) e após a cirurgia (Sham), após a administração do CRF (0,2 µg/0,2 µl) e após o pré-tratamento com CP-376395 (CP-37, 0,2 µg/0,2 µl), antagonista de receptores CRF₁, seguido pela microinjeção de CRF no CeA. 41

FIGURA 7: Duração média dos cinco episódios de imobilidade tônica (IT) antes (Controle), após a cirurgia (Sham) e após a administração do antagonista para receptores CRF₂, Astressin 2B, (ASTR 2B) nas doses de 0,4 µg/0,2 µl (A) e 0,8 µg/0,2 µl (B) no BLA. 44

FIGURA 8: Duração média dos cinco episódios de imobilidade tônica (IT) antes (Controle) e após a cirurgia (Sham), após a administração do CRF (0,2 µg/0,2 µl) e após o pré-tratamento com Astressin 2B (ASTR 2B, 0,2 µg/0,2 µl), antagonista de receptores CRF₂ seguido pela microinjeção de CRF no BLA. 44

FIGURA 9: Duração média dos cinco episódios de imobilidade tônica (IT) antes (Controle), após a cirurgia (Sham) e após a administração do antagonista para receptores CRF₂, Astressin 2B, (ASTR 2B) nas doses de 0,4 µg/0,2 µl (A) e 0,8 µg/0,2 µl (B) no CeA. 45

FIGURA 10: Duração média dos cinco episódios de imobilidade tônica (IT) antes (Controle) e após a cirurgia (Sham), após a administração do CRF (0,2 µg/0,2 µl) e após o pré-tratamento com Astressin 2B (ASTR 2B, dose de 0,2 µg/0,2 µl), antagonista de receptores CRF₂ seguido pela microinjeção de CRF no CeA. 45

FIGURA 11: Representação esquemática de secções frontais obtidas em planos representativos da amígdala de cobaias para o teste de imobilidade tônica. 47

FIGURA 12: Efeito das microinjeções nos núcleos basolateral e central da amígdala em cobaias na atividade locomotora avaliada no Teste de Campo Aberto. 49

FIGURA 13: Representação esquemática de secções frontais obtidas em planos representativos da amígdala de cobaias no Protocolo experimental no teste de campo aberto. 50

FIGURA 14: Fotomicrografias de cortes transversais do encéfalo de cobaia. Representativo dos grupos experimentais apresentados neste trabalho com cânula-guia, dirigida para o núcleo basolateral(BLA) e central da amígdala (CeA), após coloração por técnica de Nissl. 51

LISTA DE ABREVIATURAS

AB	Núcleo Acessório Basal da Amígdala
ACTH	Adrenocorticotrofina
AMPc	AMP cíclico
B	Núcleo Basal
BLA	Núcleo Basolateral da Amígdala
CeA	Núcleo Basolateral da Amígdala
CeA _l	Subdivisão lateral do Núcleo Central da Amígdala
CeA _m	Subdivisão medial do Núcleo Central da Amígdala
CRF	Fator Liberador de Corticotropina
CRF-BP	Proteína associada ao Fator Liberador de Corticotropina
CRF ₁	Receptor para Fator Liberador de Corticotropina
CRF ₂	Receptor para Fator Liberador de Corticotropina
GABA _a	Receptor específico para GABA
HPA	Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
IT	Imobilidade Tônica
LA	Núcleo Lateral da Amígdala
MeA	Núcleo Medial da Amígdala
PKA	Proteína Cinase A
RNA _m	RNA mensageiro
SCP	Substância Cinzenta Periaquedutal
UCN	Urocortina
5-HT _{1a}	Subtipo de receptor serotoninérgico
5-HT _{2a}	Subtipo de receptor serotoninérgico

SUMÁRIO

<i>Introdução</i>	15
1.1) Comportamento Defensivo	17
1.2) Imobilidade Tônica	19
1.3) Complexo Amigdalóide	21
1.4) Sistema CRF.....	24
<i>Objetivos</i>	28
<i>Materiais e métodos</i>	30
3.1) Animais	31
3.2) Procedimento cirúrgico	31
3.3) Cânula guia e microinjeção	32
3.4) Drogas	32
3.5) Registro da Imobilidade Tônica	33
3.6) Campo Aberto	33
3.7) Eutanásia e Histologia.....	34
3.8) Grupos Experimentais	35
3.9) Análise Estatística	36
<i>Resultados</i>	38
<i>Discussão</i>	51
<i>Conclusões</i>	59
<i>Referências Bibliográficas</i>	61

Descrever o conceito da palavra “emoção” é uma difícil tarefa, pois se trata de um somatório de experiências subjetivas, descritas como, por exemplo, medo, ansiedade, sofrimento, dor, desejo, alegria, esperança. Ainda, a emoção representa aspectos particulares do comportamento (público ou privado) do indivíduo (Sah *et al.*, 2003). No passado, a emoção era relacionada como característica exclusivamente do ser humano, e distinta dos demais aspectos do funcionamento encefálico, tal como cognição e percepção sensorial. Esta separação entre emoção e cognição persistiu por muito tempo, embora seja clara a influência da emoção sobre vários aspectos das funções encefálicas (Sah *et al.*, 2003). A correlação entre a emoção e o desencadeamento de comportamentos foi descrita inicialmente por Charles Darwin em 1872 em sua obra “*The expression of the emotions in man and animals*” (Darwin, 1998). Este foi um dos primeiros relatos sobre a similaridade da expressão de respostas emocionais entre os seres humanos e os animais, indicando a possibilidade de se estudar a emoção por meio de modelos animais. Dentro da mesma perspectiva, Willian James (James, 1884) e Carl Lange (Lange, 1887), propuseram, independentemente, que as emoções seriam respostas cognitivas que acompanhariam as modificações fisiológicas frente a estímulos externos. Este princípio teoria foi denominado de *Teoria da Emoção de James-Lange*. Juntos, os estudos de Charles Darwin, Willian James e Carl Lange fundamentam o uso das análises das respostas fisiológicas emitidas frente a estímulos externos para o estudo da emoção (Sah *et al.*, 2003).

A respeito dos circuitos neurais envolvidos na emissão e modulação dos comportamentos emocionais, no início do século XX, Walter Cannon e Philip Bard descreveram a primeira teoria neurofisiológica da emoção, discordando parcialmente da proposta de James e Lange. Nestes estudos, o hipotálamo e suas projeções para o córtex encefálico e para o diencefalo eram os elementos centrais que avaliavam e iniciavam respostas emocionais (Cannon, 1927). Subsequentemente, James Papez (1937), após avaliar informações clínicas e anatômicas, adicionou estruturas mediano-temporais na circuitaria envolvida na expressão das respostas emocionais. Em 1949, McLean (1949) denominou estas estruturas diencefálicas de “cérebro visceral”, e introduziu o conceito de sistema límbico, incluindo a amígdala no processamento emocional. Ainda, estudos de Klüver e Bucy (1937; 1939) mostraram que ocorrem mudanças distintas no comportamento emocional (redução do medo) de macacos após lesões extensas da parte medial do lobo temporal, incluindo a amígdala, o hipocampo e áreas do córtex encefálico. Em particular, estes estudos evidenciaram redução da agressividade e

aumento do comportamento sexual. Adicionalmente, Weiskrantz (1956) mostrou que lesões restritas da amígdala fizeram com que os animais se tornassem menos agressivos e não expressasse medo frente a estímulos que tinham características aversivas antes da lesão. Assim, foram replicados os resultados de Klüver e Bucy (1939), corroborando o envolvimento desta estrutura no processamento de respostas comportamentais emocionais.

Nas últimas décadas é crescente a investigação sobre os mecanismos neurais envolvidos na modulação emocional, o que em parte é devido ao estudo das respostas comportamentais frente a estímulos aversivos condicionados, o medo condicionado, descrito a partir do modelo de condicionamento pavloviano clássico. Proposto inicialmente por Ivan Pavlov na década de 1920, este modelo fundamenta-se na aplicação de um estímulo físico com característica aversiva (por exemplo, um choque nas patas) emparelhado a um estímulo neutro (som ou luz), ou a um contexto específico (por exemplo, o local onde o animal recebeu o estímulo aversivo). O estímulo neutro ou contextual é emparelhado diversas vezes a um estímulo aversivo, até que o estímulo neutro adquira características aversivas e passe a eliciar o mesmo comportamento desencadeado pelo estímulo aversivo, como por exemplo, congelamento motor combinado com alterações fisiológicas (micção, piloereção, defecação, alterações da frequência cardíaca e respiratória). Estas respostas foram consideradas como respostas comportamentais de medo condicionado. Adicionalmente, outros paradigmas são utilizados para o estudo do substrato neural envolvido na modulação do medo, tais como a exposição a um predador, confronto co-específico, o que representariam respostas de medo incondicionado ou medo inato (Canteras, 2003).

1.1) Comportamento Defensivo

As respostas comportamentais defensivas podem ser divididas em dois grupos: respostas inatas ou incondicionadas e respostas condicionadas ou aprendidas. Com relação às respostas defensivas inatas, estas são reações típicas da espécie frente às ameaças atuais ou potenciais e não necessitam de qualquer tipo de aprendizagem prévia. Por outro lado, respostas aprendidas ou condicionadas relacionam-se a comportamentos desencadeados por estímulos ameaçadores que previamente tenham promovido respostas defensivas ou ativado os circuitos encefálicos de defesa (Canteras, 2003).

A função primária dos comportamentos defensivos é reduzir a magnitude da ameaça ou a vulnerabilidade do animal, aumentando as suas chances de sobrevivência,

ou seja, tem função primordial na preservação da espécie. Estes comportamentos são de grande importância, pois a emissão de uma reação defensiva inadequada pode levar à injúria ou dano físico (Yang *et al.*, 2004). Edmunds (Edmunds, 1974) em seus estudos, classificou o sistema de defesa em primário e secundário. No sistema primário, a função das reações de defesa seriam reduzir a probabilidade de encontro com o predador, e entre as estratégias utilizadas, a camuflagem em animais que possuem tal fenótipo se configura como exemplo para este contexto. Já no sistema defensivo secundário, as respostas defensivas possuem como objetivo aumentar as chances de sobrevivência, incluindo a emissão de comportamentos defensivos, tais como o congelamento, a fuga e a luta (ou também denominado de ataque defensivo). Para a análise das respostas comportamentais defensivas, estudos etológicos das reações defensivas de ratos em ambientes naturais ou em laboratório, frente ao confronto com co-específicos e predadores mostraram ser uma alternativa para o estudo da agressividade, do medo e da ansiedade. Portanto, isto pode descrever a organização comportamental destas respostas, bem como o substrato neural envolvido na sua modulação (Blanchard e Blanchard, 1989).

Considerando a emissão das respostas defensivas pelos animais na natureza, é possível que sejam considerados distintos aspectos, dentre eles a distância existente entre o animal e o estímulo ameaçador (Ratner, 1967), bem como o grau de ameaça existente em cada situação (Blanchard e Blanchard, 1988). Assim, a escolha das respostas defensivas pode ser resumida da seguinte forma: quando o perigo ainda não foi identificado, o animal explora o ambiente cautelosamente com abaixamento do tronco, olhos abertos e orelhas arqueadas. Em roedores, este comportamento foi denominado como exploração cautelosa ou avaliação de risco. É importante citar também que quando o perigo não pode ser confirmado e localizado, a exploração cautelosa se mantém por maior tempo (Blanchard e Blanchard, 1989). Em um segundo momento, quando o perigo já foi detectado, mas se encontra distante, o animal pode fugir ou emitir o comportamento de congelamento. Durante o congelamento há imobilidade física, com raros movimentos leves das vibrissas associados à respiração. O objetivo deste comportamento é passar despercebido pelo predador, bem como avaliar a situação mais detalhadamente (Fanselow, 1980). Respostas autonômicas como piloereção, micção, defecação e tremores mandibulares também podem ser observados durante o congelamento. Com a redução da distância presa-predador (ou do estímulo ameaçador) e consequentemente, com possível contato físico, as respostas

comportamentais exibidas são luta (ataque defensivo) ou fuga. Entretanto, quando o contato físico é prolongado e não há mais alternativas para o animal, o último recurso utilizado pela presa é a resposta de imobilidade tônica ou “fingir de morto” (Klemm, 1971).

1.2) Imobilidade Tônica

A Imobilidade Tônica (IT) é uma resposta defensiva inata e reversível, caracterizada por profunda inatividade física e relativa falta na responsividade aos estímulos externos (Ratner, 1967; Klemm, 1971). Este comportamento é emitido em situações de medo extremo ((Klemm, 1971; Gallup, 1977), provavelmente quando não há alternativa de fuga do predador e contribui sobremaneira para a sobrevivência do animal, revelando claro caráter evolutivo e adaptativo (Marx *et al.* 2008). O comportamento de IT, também denominado de hipnose animal ou “fingir-se de morto” (Klemm, 1976), pode ser observado em ampla variedade de vertebrados e invertebrados (Ratner, 1967; Thompson *et al.*, 1981).

Durante a resposta de IT podem ocorrer alterações neurovegetativas, e comportamentais tais como: vocalização, fechamento intermitente dos olhos, rigidez muscular, tremores de extremidades semelhantes ao parkinsonismo (Jones, 1986), alteração nos padrões eletroencefalográficos (Rusinova e Davydov, 2010), mudanças na taxa de batimentos cardíacos e na respiração (Nash, Gallup Jr e Czech, 1976; Giannico *et al.*, 2014), aumento da pressão sanguínea (Carli, 1974) e alterações da temperatura corporal (Nash, Gallup Jr e Czech, 1976; Eddy e Gallup Jr, 1990; Rovee-Collier *et al.*, 1991). Os fenômenos psicofisiológicos que ocorrem durante a IT (alteração da frequência cardíaca e respiratória e também modificações da temperatura corporal) foram observados no estado emocional aversivo, que se assemelham ao medo inato (Nash, Gallup Jr e Czech, 1976). Esta resposta inata pode ser induzida em laboratório, por inversão postural com restrição manual dos movimentos, sendo que as sensações táteis e proprioceptivas são essenciais para o desencadeamento deste comportamento (Klemm, 1971; Gallup, 1977). Por estar inserida no conceito de resposta defensiva, é necessário que sistemas neurais sensoriais e motores sejam ativados para a expressão deste comportamento emocional (Bandler e Carrive, 1988).

Para investigar os mecanismos neuroquímicos envolvidos na resposta de IT, (Carlton, 1963; 1969) por meio de diversos experimentos, demonstrou que durante a emissão desta resposta defensiva ocorre intensa descarga adrenérgica, com subsequente

mobilização do sistema colinérgico, tornando-se este, o principal candidato na modulação dessa resposta. Além das evidências do envolvimento do circuito colinérgico na modulação da resposta de IT, os sistemas de neurotransmissão serotoninérgica (Hicks *et al.*, 1975; Harston *et al.*, 1976; Hatton *et al.*, 1978; Hennig *et al.*, 1980), adrenérgica (Hennig *et al.*, 1980), dopaminérgica (Ettinger e Thompson, 1978) e encefalinérgica (Farabollini *et al.*, 1990) estão intrinsicamente correlacionados com este comportamento emocional.

Klemm (Klemm, 1971) foi pioneiro na identificação das estruturas cerebrais envolvidas na modulação da IT. Utilizando técnicas de transecção encefálica, em coelhos e sapos, foram definidos os níveis do sistema nervoso central envolvidos neste comportamento. Em particular, a resposta de IT está relacionada com a ativação de uma variedade de interneurônios na formação reticular do tronco encefálico, que estimulariam neurônios com projeções descendentes, os quais por sua vez, inibiriam os motoneurônios da medula espinhal (Klemm, 1971). Outros experimentos demonstram que a integridade das estruturas mesencefálicas é essencial para a expressão deste comportamento, embora outras estruturas encefálicas possam modular o comportamento de IT (Carli, 1971). Segundo (Carli, 1968), tanto os reflexos mono ou polissinápticos de músculos flexores ou extensores encontram-se inibidos durante a IT. Em harmonia com os estudos citados anteriormente, (Ratner, 1967) aponta o envolvimento do neocórtex no controle inibitório sobre as estruturas do tronco encefálico, e que este também estaria modulando a resposta defensiva de IT.

Considerando o substrato neural envolvido na modulação da IT, experimentos em cobaias (*Cavia porcellus*) apontaram a amígdala (Ramos *et al.*, 1999; Leite-Panissi e Menescal-De-Oliveira, 2002; Leite-Panissi, Coimbra e Menescal-De-Oliveira, 2003; Leite-Panissi *et al.*, 2006; Donatti e Leite-Panissi, 2011), a SCP (Monassi, Hoffmann e Menescal-De-Oliveira, 1994; 1997; Monassi, Leite-Panissi e Menescal-De-Oliveira, 1999; Monassi e Menescal-De-Oliveira, 2004; Vieira, Menescal-De-Oliveira e Leite-Panissi, 2011), a região parabraquial (Menescal-De-Oliveira e Hoffmann, 1993) e o hipotálamo (De Oliveira, Hoffmann e Menescal-De-Oliveira, 1997a; De Oliveira, Hoffmann e Menescal-De-Oliveira, 1997b) como estruturas importantes na modulação deste comportamento.

Considerando a amígdala, o trabalho de Leite-Panissi *et al.* (1999) demonstrou que a estimulação colinérgica dos núcleos central, basolateral e lateral posterior da amígdala, reduziu o tempo do comportamento de IT em cobaias. Estudos subsequentes

(Leite-Panissi *et al.*, 2006) mostraram que a microinjeção de agonistas para receptores serotoninérgicos, 5-HT₁ e 5-HT_{2A}, no núcleo basolateral da amígdala diminuiu significativamente a duração da IT em cobaias. Posteriormente, (Donatti e Leite-Panissi, 2009) evidenciaram a interação entre o sistema serotoninérgico e gabaérgico do núcleo basolateral da amígdala na modulação da IT em cobaias. Neste estudo, o pré-tratamento com bicuculina (antagonista GABA_A) bloqueou a redução da resposta de IT promovida pela microinjeção de agonista de receptores 5-HT_{2A} no mesmo núcleo. Dentro desta linha de investigação, o estudo de Donatti e Leite-Panissi (2011) mostrou o envolvimento dos receptores para o fator liberador de corticotropina (CRF) do núcleo basolateral e central da amígdala na modulação da IT. Estes autores demonstraram que a ativação de receptores CRF do núcleo basolateral e do núcleo central da amígdala aumentou a duração da resposta de IT, enquanto que o bloqueio destes receptores reduziu a duração deste comportamento de medo inato em cobaias.

São crescentes as publicações científicas sugerindo correlação entre a resposta de IT em animais com posturas de imobilidade em seres humanos após eventos de grande impacto emocional (Bovin *et al.*, 2008; Abrams *et al.*, 2009; Humphreys *et al.*, 2010; Volchan *et al.*, 2011; Portugal *et al.*, 2012). Dentro deste contexto, foram descritos casos de imobilidade, semelhantes à IT em animais, em vítimas de abuso sexual (Abrams *et al.*, 2009; Bovin *et al.*, 2008; Humphreys *et al.*, 2010), e em pacientes acometidos por sintomas de estresse pós-traumático (Portugal *et al.*, 2012; Volchan *et al.*, 2011). Estes achados estão em concordância com a proposta de (Graeff, 1990), de que é de grande relevância investigar as bases neurais das respostas defensivas em modelos animais, para contribuir com maior entendimento do substrato neuroanatômico das reações de medo, sendo este campo de atuação de grande importância para a neurobiologia das doenças psiquiátricas.

1.3) Complexo Amigdalóide

O complexo amigdalóide, também denominado como amígdala, foi inicialmente descrito por Burdach no início do século XIX (Sah *et al.*, 2003). Anatomicamente, é composto por um conjunto de núcleos profundos telencefálicos localizados no lobo temporal, com maior precisão, entre a cápsula externa e o hipotálamo, estendendo-se rostralmente para o nível dos núcleos supraquiasmáticos e caudalmente para os corpos mamilares (Kapp *et al.*, 1981; Ursin *et al.*, 1981). Esta estrutura é parte do sistema límbico, e têm sido amplamente estudada a participação desta no controle e integração

dos comportamentos emocionais e reações autonômicas (Kapp *et al.*, 1981; Ursin *et al.*, 1981). Atualmente, o complexo amigdalóide é visto como uma estrutura diversificada e composta por aproximadamente 13 núcleos podendo ser agrupados em três grandes grupos, e são eles: 1) o grupo basolateral que inclui o núcleo lateral, o núcleo basal e núcleo basal acessório; 2) o núcleo denominado como cortical, que compreende o núcleo cortical e o núcleo do trato olfatório lateral; e 3) o grupo centro-medial que é composto pelos núcleos central e medial (Sah *et al.*, 2003). O primeiro grupo, o basolateral, inclui o núcleo lateral (LA), localizado dorsalmente, e limitando o núcleo basal ventralmente, sendo margeado lateralmente pela cápsula externa e medialmente pelo núcleo central. O núcleo basal (B), que algumas vezes é denominado de núcleo basolateral (BLA), e o núcleo acessório basal (AB), é denominado também de núcleo basomedial, localizam-se ventralmente ao LA (Sah *et al.*, 2003). Em particular, o núcleo basal (B) ou basolateral da amígdala (BLA) possui três divisões, e são elas: a magnocelular, intermediária e parvocelular. A parte magnocelular é localizada rostralmente ao núcleo lateral, medial à cápsula externa e lateral ao núcleo central. Mais caudalmente, o núcleo basal se encontra ventralmente ao núcleo lateral, e dorsal ao núcleo basal acessório. E caudalmente, é lateral ao ventrículo lateral. Resumidamente, quanto às suas conexões, a maioria de seus impulsos são oriundos das áreas corticais sensoriais laterais, porções mediais e laterais do córtex pré-frontal e formação hipocampal. Esta área envia projeções para o córtex pré-frontal medial, formação hipocampal, núcleo intersticial da estria terminal, *substantia innominata*, núcleo accumbens e caudado-putâmen (Pitkänen, 2000).

O segundo grupo de núcleos amigdaloides, denominado cortical, inclui o núcleo cortical e os núcleos do trato olfatório lateral. Estes núcleos são constituídos de núcleos superficiais, ao contrário dos núcleos do primeiro grupo que são profundos, pois se localizam na superfície do encéfalo e são organizados em camadas (Price *et al.*, 1987). O terceiro e último grupo de núcleos amigdaloides, o centromedial, encontra-se na porção dorsomedial do complexo amigdalóide, é composto pelo núcleo medial (ME) que está localizado próximo à superfície medial do trato óptico e pelo núcleo central (CeA), e o qual encontra-se dorsomedialmente na parte rostral da amígdala, margeado lateralmente pelo complexo basolateral, dorsalmente pelo globo pálido e medialmente pela estria terminal (Sah *et al.*, 2003). Anatomicamente, o núcleo central da amígdala (CeA) possui quatro divisões: capsular, lateral, intermediária e medial. Localiza-se dorsomedialmente ao aspecto rostral da metade da amígdala. É medial aos núcleos

lateral e basal e lateral à *stria terminallis*. Caudalmente, o CeA limita-se com o ventrículo lateral. Esta região recebe impulsos das áreas corticais sensoriais laterais, formação hipocampal, porções mediais e laterais do córtex pré-frontal, núcleo intersticial da *stria terminallis*, *substantia innominata*, alguns núcleos talâmicos, hipotálamo e núcleos pontinos. E finalmente, envia impulsos ao núcleo intersticial da *stria terminallis*, alguns núcleos hipotalâmicos, vários núcleos mesencefálicos, pontinos e da medula espinal (Pitkänen, 2000).

Amplas funções têm sido atribuídas ao complexo amigdalóide, entre elas: memória, atenção e interpretação das emoções (Davis, 1997). Em adição, a inativação desta estrutura interfere na expressão adequada das emoções (Davidson *et al.*, 2002). Assim, lesões restritas à amígdala podem desencadear bloqueio da aquisição ou da expressão de vários aspectos das respostas comportamentais associadas ao medo condicionado e incondicionado (Davis, Rainnie e Cassell, 1994). Em seres humanos, os mecanismos neuronais amigdalóides são essenciais no processamento e na modulação do comportamento social e emocional. De fato, relatos de indivíduos que sofreram lesão desta estrutura, descrevem aumento da agressividade e redução do medo (Tranel e Hyman, 1990). Ledoux (Ledoux, 2007) sugeriu que a amígdala proporciona alto refinamento no controle da intensidade das reações e da escolha do momento para emissão da resposta de defesa. Contudo, este processo envolve estruturas diencefálicas e mesencefálicas, bem como regiões periventriculares. Desta forma, a amígdala seria responsável pela detecção e organização de respostas comportamentais frente a perigos naturais (por exemplo, um ataque predatório), perigos aprendidos, ou novas ameaças e estímulos, prevendo sua ocorrência (Ledoux, 2007).

Considerando as relações intrínsecas intra-amigdalóides e as particularidades de cada núcleo, o complexo basolateral da amígdala (BLA) é considerado uma via de entrada sensorial, e este enviaria projeções para o núcleo central da amígdala (CeA) (LeDoux, 2007). Este, por sua vez emitiria eferências para várias estruturas envolvidas na geração da resposta de medo (LeDoux, 2007), inserindo o CeA em um contexto de interface com o sistema motor e autonômico envolvido no controle das respostas condicionadas (Davis, 1994) por meio de suas projeções eferentes para o hipotálamo e para o tronco encefálico (Pitkänen, 2000). Dentro deste contexto, a lesão de estruturas que enviam projeções para o CeA reduziram respostas neurovegetativas e comportamentais decorrentes do medo condicionado (Ledoux *et al.*, 1988).

Evidências apontam que é possível que o núcleo BLA, LA, CeA e ME estejam particularmente associados com o comportamento defensivo em associação ao estado emocional de medo e ansiedade (Stutzmann e Ledoux, 1999; Shekhar *et al.*, 2003), e alguns destes núcleos podem também estar envolvidos na modulação da nocicepção simultaneamente (Bernard, Peschanski e Besson, 1989; Leite-Panissi, Coimbra e Menescal-De-Oliveira, 2003). Estudos de Donatti e Leite-Panissi (Donatti e Leite-Panissi, 2011; Donatti e Leite-Panissi, 2013) demonstraram que além do aumento da duração da resposta de ITa microinjeção do fator liberador de corticotropina(CRF) no BLA ou no CeA aumentou o índice de analgesia do teste de placa quente, sugerindo que a ativação de receptores para CRF destes núcleos, além de potencializar respostas de medo inato, produz, conjuntamente, efeito antinociceptivo.

1.4) Sistema CRF (Fator Liberador de Corticotropina)

Em 1981, Vale *et al.* isolaram e caracterizaram quimicamente o fator liberador de corticotropina (CRF) a partir do hipotálamo de ovelhas. Estes autores caracterizaram o CRF como um polipeptídeo de 41 resíduos de aminoácidos gerado por clivagem do terminal carboxila a partir de um precursor pré-pró-CRF de 196 resíduos de aminoácidos, sendo este o principal regulador fisiológico do eixo HPA (hipotálamo – pituitária – glândula adrenal) (Vale *et al.*, 1981). Adicionalmente, este polipeptídeo pode ser encontrado na periferia (vasos sanguíneos, pele, pulmões, testículos, ovários e placenta), bem como no SNC com grande expressão no hipotálamo, na amígdala, em áreas corticais e septais do encéfalo (Potter *et al.*, 1994; Boorse e Denver, 2006)

O CRF tem sido identificado como responsável por muitas respostas endócrinas, autonômicas e comportamentais associadas ao estresse; o qual, em forma crônica, pode levar a respostas mal-adaptativas, resultando em síndromes psiquiátricas, como ansiedade generalizada e depressão (Shekhar *et al.*, 2005). Confirmando estes achados, evidências demonstraram que o CRF e seus receptores medeiam respostas comportamentais, endócrinas e autonômicas no estresse (Dunn e Berridge, 1990). Ainda, o aumento na produção e liberação de CRF pode estar presente em alterações gastrointestinais, cardiovasculares, metabólicas e reprodutivas em decorrência ao estresse (Habib, Gold e Chrousos, 2001), podendo também atuar em receptores periféricos que regulam processos inflamatórios (Dautzenberg e Hauger, 2002).

Outros peptídeos participantes do sistema CRF foram descobertos por (Vaughan *et al.*, 1995). Em seus estudos, os autores descreveram a urocortina (UCN), a

qual tem similaridade com a urotensina, presente em peixes, e com ação via receptores para CRF. Atualmente, são descritas as UCN 1, 2 e 3, que se distribuem pelo SNC e pela periferia (Bale e Vale, 2004). Com destaque, a UCN1 é predominantemente encontrada nos corpos celulares do núcleo Edinger-Westphal (Vaughan *et al.*, 1995), e na periferia no trato gastrointestinal, testículos, miócitos do músculo cardíaco, pele, timo e esplênio (Bale e Vale, 2004). Por outro lado, a UCN2 é encontrada no hipotálamo, em núcleos do tronco encefálico e na medula espinhal; na periferia foi encontrada no coração, em células sanguíneas e na glândula adrenal (Hsu e Hsueh, 2001; Reyes *et al.*, 2001). Finalmente, a UCN3 foi identificada no hipotálamo e na amígdala, e na periferia, no trato gastrointestinal e no pâncreas (Hsu e Hsueh, 2001; Lewis *et al.*, 2001).

Em adição, estudos têm demonstrado que a atividade do CRF pode ser modulada por mecanismos intrínsecos. Foi identificado como importante componente regulador da atividade biológica do CRF um peptídeo ligante ao CRF (CRF-BP) amplamente expresso em mamíferos e não mamíferos (Behan *et al.*, 1995; Seasholtz, Valverde e Denver, 2002). Está presente na circulação e nos espaços intersticiais como uma glicoproteína 37 kDa que se liga ao CRF e as UCNs com alta afinidade, reduzindo sua biodisponibilidade e impedindo sua ligação aos receptores de CRF (Behan *et al.*, 1995). O CRF-BP é encontrado em tecidos, incluindo: encéfalo, coração, intestinos, pulmões e placenta (Potter *et al.*, 1992; Boorse e Denver, 2006; Vitoratos *et al.*, 2006).

Evidências sugerem que os neuropeptídios citados atuem em dois receptores específicos, CRF₁ e CRF₂ (Hauger *et al.*, 2003). O CRF e a UCN 1 possuem alta afinidade para o CRF₁, enquanto as UCNs 1, 2 e 3, ligam-se com alta afinidade ao receptor CRF₂. Ainda a UCN2 pode ativar o CRF₁ em altas concentrações (Perrin *et al.*, 1995). Ambos receptores, CRF₁ e CRF₂, pertencem à classe B das superfamílias dos receptores com sete alças transmembrana que sinalizam pelo acoplamento da proteína G. Desta forma, estabeleceu-se que a ligação de agonistas dos receptores CRF no domínio extracelular dos receptores CRF₁ e CRF₂ promovem alteração na forma da membrana, levando-os a um estado ativo, e consequentemente, aumentando sua afinidade a proteínas G (estimuladora) estimulando a enzima adenilato-ciclase e a proteína cinase-A (PKA), bem como outras vias do AMPc, conduzindo a fosforilação de proteínas e transcrição de genes (Dautzenberg, Higelin e Teichert, 2000; Hauger e Dautzenberg, 2000). Os receptores CRF₁ são expressos em grande escala no encéfalo de mamíferos e na hipófise. Especificamente, alta densidade de RNAm (RNA mensageiro)

para o receptor CRF₁ tem sido encontrada na hipófise anterior, córtex cerebral, cerebelo, amígdala, hipocampo e bulbo olfatório (Kageyama *et al.*, 1999; Sanchez *et al.*, 1999). Em primatas, o RNAm para o receptor CRF₁ é encontrado no hipotálamo, no lócus coeruleus e na periferia; e há baixo nível da expressão deste receptor nos testículos, ovários e glândulas adrenais (Kageyama *et al.*, 1999). Os receptores CRF₁ são cruciais na regulação das funções encefálicas e hipofisárias (Lovenberg *et al.*, 1995; Nozu *et al.*, 1999; Palchadhuri *et al.*, 1999). O CRF₂ também é expresso no SNC, mas apresenta ampla distribuição somente às áreas subcorticais, incluindo o hipotálamo, amígdala, núcleo intersticial da *stria terminallis* e núcleo da rafe; e nos tecidos periféricos é expresso na pituitária, coração, pulmões, ovários, testículos e glândula adrenal (Potter *et al.*, 1994; Chalmers, Lovenberg e De Souza, 1995; Lovenberg *et al.*, 1995; Hiroi *et al.*, 2001). O CRF₂ possui duas isoformas, CRFR2 α e CRFR2 β , encontrados em roedores e humanos, e uma terceira que se encontra somente em seres humanos, denominada CRFR2 γ (Lovenberg *et al.*, 1995; Kostich *et al.*, 1998).

No estresse, o CRF atua de maneira distinta na mediação de respostas fisiológicas por meio dos receptores CRF₁ e CRF₂. Em regiões límbicas, o CRF pode estar envolvido em estados de ansiedade e depressão (Nemeroff, 1996), e possivelmente o CRF₁ é o principal mediador nos processos destas doenças (Heinrichs *et al.*, 1997; Arborelius *et al.*, 1999; Reul e Holsboer, 2002). Particularmente na depressão, os antagonistas de CRF₁ atuam revertendo a depressão em doses que não afetam ou estimulam a ativação do eixo HPA (Zobel *et al.*, 2000; Kunzel *et al.*, 2003). A função do CRF₂ permanece indefinida (Binder e Nemeroff, 2010), embora camundongos *knockout* para o receptor CRF₂ não apresentarem comportamentos compatíveis com ansiedade (Bale *et al.*, 2000). Em particular, a inibição conjunta dos receptores CRF₁ e CRF₂ resultou em redução de respostas de estresse desencadeadas por estímulos estressores (estresse por restrição); entretanto, quando foi avaliada a inibição isolada de um dos receptores CRFs, as respostas perante o estresse foram menores, sugerindo necessidade da ação compartilhada destes receptores (Takahashi, 2001). Em suma, é possível que o CRF₁ seja o principal receptor das respostas de estresse, enquanto o CRF₂ poderia modular os efeitos da transdução de sinal do CRF₁ (Reul e Holsboer, 2002; Nemeroff e Vale, 2005; Hauger *et al.*, 2006).

A ação mais descrita do polipeptídeo CRF é estimular a síntese e secreção de ACTH (hormônio adrenocorticotrofina), e o controle da atividade do eixo HPA (Vale *et al.*, 1981). Considerando a resposta defensiva de IT, estudos demonstraram que a

duração da IT está positivamente relacionada ao nível plasmático de corticosterona (Carli, 1975). De fato, estudos prévios mostraram que a ativação de receptores CRF do complexo amigdalóide resulta em aumento da resposta de IT em cobaias, enquanto que o bloqueio destes receptores reduz este comportamento de defesa inato. Ainda, os níveis plasmáticos de ACTH e corticosterona aumentaram após uma série de quatro episódios de indução de imobilidade (Farabollini *et al.*, 1990), em contraste, pequena alteração é observada após uma simples tentativa de inversão postural e imobilização em peixes *Carassius auratus* (Lefebvre e Sabourin, 1977).

Considerando a literatura apresentada, o objetivo deste trabalho foi avaliar o envolvimento dos receptores específicos para o fator liberador de corticotropina, CRF₁ e CRF₂ dos núcleos basolateral e central da amígdala na modulação da resposta de IT em cobaias.

Para isso, foram descritos os seguintes objetivos específicos:

1. Verificar o efeito da administração de hidrocloreto de CP-376395, antagonista para receptores CRF₁, nos núcleos basolateral e central da amígdala sobre a duração do comportamento de imobilidade tônica em cobaias induzidos manualmente pela inversão e contenção postural;
2. Verificar o efeito da administração de Astressin 2B, antagonista para receptores CRF₂, nos núcleos basolateral e central da amígdala sobre a duração do comportamento de imobilidade tônica em cobaias induzidos manualmente pela inversão e contenção postural;
3. Verificar se a administração prévia de antagonistas específicos para receptores CRF₁ ou CRF₂ nos núcleos basolateral e central da amígdala alteram o aumento da duração da resposta de IT em cobaias induzida pela microinjeção de CRF nestes mesmos núcleos amigdaloides.
4. Verificar o efeito da administração de hidrocloreto de CP-376395 e Astressin 2B, nos núcleos basolateral e central da amígdala sobre a atividade locomotora de cobaias avaliadas no teste de campo aberto. Este protocolo experimental teve como objetivo verificar se os antagonistas específicos para receptores CRFs, nas doses utilizadas, promoveriam alterações motoras, as quais podem alterar a emissão do reflexo de endireitamento interferindo na duração da IT *per se*.

3.1) Animais

Neste trabalho foram utilizados cobaias machos adultos (*Cavia porcellus*, 400-500g, n = 105), fornecidos pelo Biotério Central do *Campus* Administrativo da USP de Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos (no Biotério I da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo) em caixas acrílicas (56 x 17 x 39cm) sendo 4 animais por caixa, forradas com maravalha (trocas feitas 3 vezes por semana), em sala climatizada a 24 ± 1 °C, com ciclo de claro escuro de 12 hs (início às 7:00h), tendo livre acesso à água filtrada e comida durante todo experimento. A manutenção dos animais e todos os procedimentos experimentais obedeceram às guias internacionais que regulamentam o uso de animais, à legislação Brasileira e foram aprovados pela Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Prefeitura do *Campus* Administrativo da USP-RP (Processo CEUA 12.1.1393.53.0).

3.2) Procedimento cirúrgico

Inicialmente, foi administrado como medicação pré-anestésica com 0,05 mg/Kg de atropina via subcutânea, 15 minutos antes da administração da associação anestésica aplicada via intramuscular de cetamina a 10% (25 mg/Kg) e xilasina a 2% (5 mg/Kg). Os animais foram colocados em um aparelho esterotáxico (David Kopf, instrumentos, EUA) tendo a cabeça fixada por meio de duas barras auriculares e de um suporte bucal. A peça bucal do esterotáxico se localizava abaixo do plano horizontal por 21,4 mm em relação ao ducto auricular, sendo considerada de 14,4 mm a distância do ducto ao bregma. Foi injetado, subcutaneamente, 0,2 mL de xilocaína a 2% associado à felinefrina a 0,04% (0,2 mL), na região do escalpo aberta, para reduzir a sensibilidade dolorosa e o sangramento no local. Foi também realizada assepsia da pele após tricotomia, com álcool iodado e após esses procedimentos se fez uma incisão longitudinal na pele da cabeça e no tecido subcutâneo. A calota craniana então foi exposta e efetuada nova assepsia da região com uma solução de água oxigenada 10 vol. e merthiolate. Após a exposição da calota craniana foi realizado dois orifícios com auxílio de um motor elétrico de baixa rotação e de uma fresa odontológica esférica de aço inoxidável número 4 (carbide). Em um orifício foi rosqueado um pequeno parafuso com a finalidade de servir de apoio para o capacete de acrílico, confeccionado com resina autopolimerizável (Simplex, Dental Fillings). No outro orifício foi introduzida a cânula guia nas regiões pré-estabelecidas (BLA ou CeA) por meio do uso da coordenadas estereotáxicas do Atlas de Rössner (1965) para cobaias.

Após a completa polimerização do acrílico, o suporte de apoio da cânula guia acoplado a torre do estereotáxico foi removida, e colocada a mesma, já fixada, um mandril oclisor de aço inoxidável com 0,2mm de diâmetro e do mesmo comprimento da cânula guia, para evitar uma possível obstrução.

Trinta minutos antes do início da cirurgia, os animais receberam, via subcutânea, 2,5 mg/kg de Banamine a1% (flunixinameglumina, Schering-Plough SA, RJ, BR) um antiinflamatório, antipirético e analgésico de longa duração, para contribuir com a recuperação pós-cirúrgica. Após a cirurgia os animais permaneceram no Biotério I da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo Peri, por um período de recuperação de 6 dias com livre acesso à água e comida.

3.3) Cânula guia e microinjeção

As cânulas foram confeccionadas a partir de segmentos de agulhas hipodérmicas de aço inoxidável com 0,6 mm de diâmetro externo e 14 mm de comprimento. O implante foi realizado no hemisfério esquerdo unilateral, e as coordenadas utilizadas estão descritas na Tabela I.

Estrutura	Antero Posterior	Meso Lateral	Dorso Ventral
<i>Núcleo basolateral da amígdala</i>	-3,4mm em relação ao bregma	+6,2mm em relação à linha média	-9,0mm em relação à calota craniana
<i>Núcleo central da amígdala</i>	-3,4mm em relação ao bregma	+6,1mm em relação à linha média	-7,5mm em relação à calota craniana

Tabela I: Parâmetro anatômico para o núcleo basolateral e núcleo central da amígdala de acordo com o Atlas de Rössner (1965).

A microinjeção foi realizada com uma seringa Hamilton 10,0 µl (EUA), conectada a uma agulha dental, de 0,3mm de diâmetro externo e 15mm de comprimento, por um segmento de polietileno PE-10 de aproximadamente 45cm. Dessa forma, a agulha alcançou o tecido cerebral, ultrapassando em 1mm a extremidade inferior da cânula guia. Parte do polietileno foi preenchido com o fármaco utilizado e a outra parte, com água destilada, com uma bolha de ar separando os dois líquidos. A microinjeção foi realizada sempre no volume de 0,2µl, durante 60 segundos.

3.4) Drogas

Foram utilizadas neste estudo as seguintes drogas: hidroclorito de CP-376395 (antagonista de receptores CRF₁, Tocris), Astressin 2B (antagonista de receptores CRF₂,

Sigma-Aldrich), e o fator liberador de corticotropina (CRF, Sigma) diluídos em solução salina estéril. As doses utilizadas para os antagonistas específicos para CRF₁ e CRF₂ foram de 0,8 µg/0,2 µl e 0,4µg/0,2 µl. Para o CRF foi utilizada a dose de 0,2 µg/0,2 µl. Estas doses foram fundamentadas nos estudos prévios de Henry *et al.* (2006) e Donatti e Leite-Panissi (2011).

3.5) Registro da Imobilidade Tônica

Antes e após a realização da cirurgia, os animais foram submetidos, individualmente a uma sessão de imobilidade tônica, divididas em cinco episódios. A indução de IT foi realizada por meio da inversão postural e contenção do animal manualmente, até que ele não mais apresentasse resistência a este procedimento. As mãos do experimentador foram afastadas do animal, e registradas as durações dos episódios de IT até o momento em que o animal retornasse a sua postura habitual. As durações foram registradas em segundos com um auxílio de um cronômetro. Estas manobras foram realizadas em uma calha em forma de "V" acolchoada com espuma, medindo 25cm de comprimento, 15cm de altura e 20cm de largura (Figura 1).

Foram realizadas cinco manobras de indução de IT em cada sessão, sendo que somente foram considerados para o estudo, os animais que apresentassem a duração média no episódio controle de IT acima de 45 segundos.

Figura 1: Fotografia de uma cobaia (*Cavia porcellus*) durante um episódio de imobilidade tônica, induzido manualmente, em laboratório.

3.6) Teste do Campo Aberto

Para excluir a possibilidade de que as drogas utilizadas em nosso estudo promoveram alterações da resposta de IT de forma não específica, por meio da alteração da atividade motora espontânea, a locomoção foi monitorada após cada microinjeção,

em uma caixa de acrílico de 60 x 60 x 60cm com solo dividido em 16 quadrados iguais de 15cm de cada lado (Figura 2). Para este teste, o animal foi colocado no centro da caixa e a atividade locomotora foi avaliada pela observação direta do número de quadrados percorridos por minutos, durante 5 minutos, imediatamente após a microinjeção da droga em estudo. O teste foi realizado à temperatura ambiente, com luzes artificiais, semelhante às condições a qual os animais estavam habituados no biotério de manutenção.

Figura 2: Fotografia de aparato em polietileno opaco utilizado para teste do campo aberto.

3.7) Eutanásia e Histologia

Com o término dos experimentos, os animais foram anestesiados profundamente com hidrato de cloral (10%; 0,35 ml/100 mg de peso corporal, i.p) para realização da perfusão transcardíaca através do ventrículo esquerdo, com solução fisiológica (NaCl 0,9%), para a remoção do sangue do animal, seguida de perfusão com formaldeído (10%) para a fixação dos tecidos. A seguir os encéfalos foram retirados e armazenados por pelo menos 48 horas em formaldeído (10%). Após este período, o material foi colocado em solução de sacarose a 10% por, 24 horas depois em sacarose a 20% por 48 horas, ou até que o encéfalo migrasse para o fundo do frasco indicando saturação do tecido.

Após os períodos de fixação e crioproteção, os encéfalos foram congelados, cortados em secções transversais na espessura de 40µm, em criostato. Em seguida foi realizada a técnica de coloração com Nissl. Os cortes foram analisados sob microscopia de luz, para avaliar se ocorreu lesão na estrutura alvo esperado, segundo o Atlas de

Rössner (1965) para cobaias. Somente os animais que tiveram os sítios de microinjeção localizados na estrutura alvo (BLA ou CeA) foram considerados para análise dos resultados.

3.8) Grupos experimentais

Protocolo 1: Avaliação do envolvimento de receptores CRF₁ do núcleo basolateral e central da amígdala na resposta de IT em cobaias.

Após a realização da sessão controle de IT e de uma sessão de IT realizada para controle pós-cirúrgico (Sham) do implante da cânula-guia (núcleo basolateral ou central da amígdala) os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais:

Grupo 1 (n = 7 BLA; n = 7CeA): os animais receberam a microinjeção de hidroclorito de CP376395, antagonista de receptores CRF₁, nas concentrações 0,4 µg/0,2 µl e 0,8 µg/0,2 µl de forma aleatória, e foram submetidos a IT em dois dias consecutivos.

Grupo 2 (n = 7 BLA; n = 6CeA): os animais receberam a microinjeção de hidroclorito de CP376395 na concentração de 0,4 µg/0,2 µl seguido pela microinjeção de CRF na concentração de 0,2 µg/0,2 µl ou somente CRF na concentração de 0,2 µg/0,2 µl, e foram submetidos a IT em dois dias consecutivos.

Protocolo 2: Avaliação do envolvimento de receptores CRF₂ do núcleo basolateral e central da amígdala na resposta de IT em cobaias.

Após a realização da sessão controle de IT e de uma sessão de IT realizada para controle pós-cirúrgico (Sham) do implante da cânula-guia (núcleo basolateral e central) os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais:

Grupo 1 (n = 5 BLA; n = 5CeA): os animais receberam a microinjeção de Astressin 2B, antagonista de receptores CRF₂, nas concentrações de 0,4 µg/0,2 µl e 0,8 µg/0,2 µl de forma aleatória, e foram submetidos a IT em dois dias consecutivos.

Grupo 2 (n = 6 BLA; n = 7CeA): os animais receberam a microinjeção de Astressin 2B, na concentração de 0,4 µg/0,2 µl seguido pela microinjeção de CRF na concentração de 0,2 µg/0,2 µl ou somente CRF na concentração de 0,2 µg/0,2 µl, e foram submetidos a IT em dois dias consecutivos.

Protocolo 3: Avaliação do envolvimento de receptores CRF₁ ou CRF₂ do núcleo basolateral e central da amígdala na locomoção em cobaias

Após o período de recuperação da cirurgia para implante da cânula-guia no BLA ou no CeA, os animais foram submetidos à avaliação da locomoção, por meio do teste do campo aberto, após a administração da droga em estudo. Para isto, tivemos os seguintes grupos experimentais:

Grupo 1 (n = 5 BLA; n = 86 CeA): os animais receberam microinjeção de salina 0,9% no volume de 0,2 µl e foram submetidos ao teste de campo aberto.

Grupo 2 (n = 5 BLA; n = 6 CeA): os animais receberam a microinjeção de hidrocortisona de CP376395, antagonista de receptores CRF₁, na concentração de 0,8 µg/0,2 µl BLA e foram submetidos ao teste de campo aberto.

Grupo 3 (n = 5 BLA; n = 6 CeA): os animais receberam a microinjeção de Astressin 2B, antagonista de receptores CRF₂, na concentração de 0,8 µg/0,2 µl e foram submetidos ao teste de campo aberto.

Grupo 4 (n = 5 BLA; n = 6 CeA): os animais receberam a microinjeção de hidrocortisona de CP376395 na concentração de 0,4 µg/0,2 µl seguido pela microinjeção de CRF na concentração de 0,2 µg/0,2 µl e foram submetidos ao teste de campo aberto.

Grupo 5 (n = 5 BLA; n = 6 CeA): os animais receberam microinjeção de Astressin 2B, na concentração de 0,4 µg/0,2 µl seguido pela microinjeção de CRF na concentração de 0,2 µg/0,2 µl. e foram submetidos ao teste de campo aberto.

3.9) Análise Estatística

Os resultados de IT foram expressos em valores médios das durações de cinco episódios de IT de cada animal $\pm$ erro padrão da média (EPM). Para a realização da análise estatística os valores da duração da IT (em segundos) foram transformados no logaritmo natural (Ln) do número devido a variabilidade das respostas, sendo dessa forma, analisados por meio de uma análise de variância de uma via para medidas repetidas (MANOVA). As diferenças estatísticas entre os tratamentos foram determinadas pelo teste de Newman-Keuls. Os dados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

No teste de campo aberto, os dados foram expressos pelo valor médio de quadrados percorridos pelo animal no período de 5 minutos $\pm$ EPM para cada grupo experimental. Os resultados foram analisados por uma análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Newman-Keuls, considerando os dados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

Protocolo 1: Avaliação do envolvimento de receptores CRF₁ do núcleo basolateral e central da amígdala na resposta de IT em cobaias.

Os resultados do presente trabalho mostram que a microinjeção de CP-376395, antagonista específico para o receptor CRF₁, microinjetado no BLA ou no CeA na dose de 0,8 µg/0,2 µl reduziu a duração da IT em cobaias (Figuras 3 e 4). Em adição, o pré-tratamento com este antagonista para o receptor CRF₁, tanto no BLA como no CeA, bloqueou o aumento da duração da IT induzido pela ativação de receptores CRF por meio da administração no mesmo sítio de CRF (Figuras 3 e 5).

Considerando o BLA, a aplicação da ANOVA de uma via para medidas repetidas mostrou diferença entre os tratamentos ($F_{6,27} = 6,99$, $p = 0,003$). O pós-teste de Newman-Keuls evidenciou diferença ($P < 0,05$) entre o antagonista para o receptor CRF₁, CP-376395, na dose de 0,8 µg/0,2 µl em relação ao controle e ao Sham, porém não em relação a dose de 0,4 µg/0,2 µl. Contudo, a dose de 0,4 µg/0,2 µl não mostrou diferença em relação ao controle e ao Sham, e também não houve diferença entre o controle e o Sham (Figura 3). Neste grupo, a média obtida para o tempo de IT no controle foi de $124,0 \pm 20,2$ s, para o Sham $119,2 \pm 23,1$ s, para a dose de 0,4 µg/0,2 µl do CP-376395 $73,8 \pm 17,6$ s e para o CP-376395 na dose de 0,8 µg/0,2 µl foi de $40,7 \pm 9,8$ s. A análise estatística do grupo que recebeu CRF, e CP-376395 seguido por CRF microinjetado no BLA revelou diferença entre os tratamentos ($F_{6,27} = 6,03$, $p = 0,005$, ANOVA uma via para medidas repetidas). O pós teste de Newman-Keuls apontou que o tratamento com CRF foi diferente ($P < 0,05$) dos demais tratamentos (Figura X). Entretanto, não há diferença entre os episódios Controle, Sham e CP-37+CRF (Figura 4). Neste grupo as médias das sessões de IT foram no Controle $144,2 \pm 39,4$ s, no Sham $93,9 \pm 18$ s, após o CRF $345,0 \pm 118,0$ s e após CP-37+CRF foi de $143,0 \pm 45,8$ s.

Com relação ao CeA, a aplicação da ANOVA de uma via para medidas repetidas, no grupo que recebeu administração de doses distintas de CP-376395, antagonista de receptores CRF₁, mostrou diferença entre os tratamentos ($F_{6,27} = 8,629$, $p < 0,001$). O pós-teste de Newman-Keuls evidenciou diferença significativa entre a dose 0,8 µg/0,2 µl de CP-376395 quando comparado ($P < 0,05$) ao episódio Controle, Sham e a dose de 0,4 µg/0,2 µl de CP-376395. Contudo, não houve diferença entre o Controle, Sham e CP-376395 0,4 µg/0,2 µl (Figura 5). A média da duração da resposta de IT para o grupo CeA que recebeu CP-376395 em doses distintas foram de $177,1 \pm 71,6$ s para o episódio Controle, $112 \pm 28,9$ s para o Sham, $113,1 \pm 55,2$ s para CP-376395 0,4 µg/0,2

μl e $10,8 \pm 4,6$ s para o CP-376395 na dose de $0,8 \mu\text{g}/0,2 \mu\text{l}$. No grupo realizado para avaliar a ação do antagonista para receptores CRF_1 (CP-37) sobre o efeito do CRF no CeA, a aplicação da ANOVA de uma via para medidas repetidas mostrou diferença entre os tratamentos ($F_{5,23} = 8,482$, $p = 0,002$). O pós-teste de Newman-Keuls revelou diferença significativa entre o tratamento com CRF na dose de $0,2 \mu\text{g}/0,2 \mu\text{l}$ comparado com os episódios Controle, Sham e com a administração de CP-376395 seguido pelo CRF no mesmo sítio (Figura 6). Neste grupo, a duração da IT no Controle foi $99,7 \pm 14,5$ s, no Sham $138,2 \pm 22,9$ s, para o CRF $431,8 \pm 154,0$ s e para o CP-376395 seguido pelo CRF a média foi de $111,9 \pm 33,9$ s.

Figura 3: Duração média dos cinco episódios de imobilidade tônica (IT) antes (Controle), após a cirurgia (Sham) e após a administração do antagonista para receptores CRF_1 , CP-376395, (CP 37) nas doses de 0,4 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{l}$ (A) e 0,8 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{l}$ (B) no BLA (n=7). As barras verticais representam o EPM. * $P < 0,05$ teste de Newman-Keuls quando comparado com o Controle e com Sham.

Figura 4: Duração média dos cinco episódios de imobilidade tônica (IT) antes (Controle) e após a cirurgia (Sham), após a administração do CRF (0,2 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{l}$) e após o pré-tratamento com CP-376395 (CP-37, 0,2 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{l}$), antagonista de receptores CRF_1 , seguido pela microinjeção de CRF no BLA (n = 7). As barras verticais representam o EPM. * $P < 0,05$ teste de Newman-Keuls quando comparado com demais grupos.

Figura 5: Duração média dos cinco episódios de imobilidade tônica (IT) antes (Controle), após a cirurgia (Sham) e após a administração do antagonista para receptores CRF_1 , CP-376395, (CP 37) nas doses de 0,4 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{l}$ (A) e 0,8 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{l}$ (B) no CeA ($n = 7$). As barras verticais representam o EPM. * $P < 0,05$ teste de Newman-Keuls quando comparado com os demais grupos.

Figura 6: Duração média dos cinco episódios de imobilidade tônica (IT) antes (Controle) e após a cirurgia (Sham), após a administração do CRF (0,2 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{l}$) e após o pré-tratamento com CP-376395 (CP-37, 0,2 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{l}$), antagonista de receptores CRF_1 , seguido pela microinjeção de CRF no CeA ($n=6$). As barras verticais representam o EPM. * $P < 0,05$ teste de Newman-Keuls quando comparado com demais grupos.

Protocolo 2: Avaliação do envolvimento de receptores CRF₂ do núcleo basolateral e central da amígdala na resposta de IT em cobaias

Os resultados do presente trabalho mostram que a microinjeção de Astressin 2B (antagonista específico para receptores CRF₂), nos núcleos basolateral e central da amígdala promoveram redução da duração do comportamento de imobilidade tônica em cobaias (Figuras 7 e 9) na maior dose utilizada (0,8 µg/0,2 µl). Ainda, os resultados apontaram que a pré-administração de Astressin 2B bloqueou o aumento da resposta de IT induzida pela microinjeção de CRF no mesmo sítio (Figuras 8 e 10).

A aplicação da ANOVA de uma via no grupo que recebeu Astressin 2B (ASTR 2B), no BLA, em distintas doses evidenciou diferença entre os tratamentos ($F_{4,19}=10,800$, $p = 0,001$). O pós-teste de Newman-Keuls evidenciou diferença entre a dose de 0,8 µg/0,2 µl do ASTR 2B ($P < 0,05$) quando comparado com episódio Controle, o Sham e com a dose de 0,4 µg/0,2 µl de ASTR 2B (Figura 7). Entretanto, não houve diferença entre o Controle, Sham e ASTR 2B 0,4 µg/0,2 µl. Neste grupo experimental, as médias obtidas para o tempo de IT no Controle foi de $92,2 \pm 27,7$ s, para o Sham $72,4 \pm 21,6$ s, para ASTR 2B 0,4 µg/0,2 µl $62,8 \pm 40,7$ s e para ASTR 2B 0,8 µg/0,2 µl foi de $11,5 \pm 10$ s. Na análise estatística do grupo que recebeu administração de CRF e ASTR 2B+CRF no BLA revelou diferença entre os tratamentos ($F_{6,27}= 3,630$, $p = 0,033$, ANOVA uma via para medidas repetidas). O pós-teste de Newman-Keuls mostrou que o tratamento com CRF foi diferente ($P < 0,05$) quando comparado com os demais tratamentos. Entretanto, o Controle, Sham e ASTR 2B+CRF não diferiram entre si (Figura 8). Neste grupo, a média do Controle foi $147,45 \pm 33,3$ s, do Sham $130,0 \pm 28,0$ s, do CRF $430,8 \pm 121,5$ s e do tratamento ASTR 2B+CRF foi de $274,1 \pm 164,6$ s.

Considerando o grupo microinjetado com distintas doses de ASTR 2B no CeA, a análise estatística revelou diferença entre os tratamentos ($F_{4,19}= 4,575$, $p = 0,023$, ANOVA de uma via para medidas repetidas). O pós-teste de Newman-Keuls evidenciou diferença entre ASTR 2B 0,8 µg/0,2 µl quando comparado com o Sham ($P < 0,05$, Figura 9), porém, não houve diferença em relação ao Controle e a ASTR 2B 0,4 µg/0,2 µl do antagonista. Ainda, não houve diferença entre Controle, Sham e ASTR 2B 0,4 µg/0,2 µl (Figura 9). A média da duração da resposta de IT para este grupo no Controle foi de $148,5 \pm 41,0$ s, $197,1 \pm 47,1$ s para o Sham, $105,4 \pm 39,6$ s para ASTR2B 0,4 µg/0,2 µl e $60,9 \pm 16,7$ s para ASTR 2B 0,8 µg/0,2 µl. Por fim, no grupo que recebeu administração de CRF no CeA, a aplicação da ANOVA de uma via para medidas

repetidas revelou diferença entre os tratamentos ($F_{5,23} = 8,430$, $p = 0,02$), sendo que o tratamento com CRF foi diferente comparado ($P < 0,05$, Newman-Keuls) com Controle, Sham e ASTR 2B+CRF (Figura 10). Entretanto, Controle, Sham e ASTR+CRF não diferiram entre si (Figura 10). A duração média da IT neste grupo foi no Controle foi $123,5 \pm 20,6$ s, no Sham $123,2 \pm 12,4$ s, para o CRF $230,8 \pm 30,8$ s e para ASTR 2B+CRF a média foi de $122,7 \pm 13,8$ s.

Figura 7: Duração média dos cinco episódios de imobilidade tônica (IT) antes (Controle), após a cirurgia (Sham) e após a administração do antagonista para receptores CRF_2 , Astressin 2B, (ASTR 2B) nas doses de 0,4 µg/0,2 µl (A) e 0,8 µg/0,2 µl (B) no BLA (n = 5). As barras verticais representam o EPM. * $P < 0,05$ teste de Newman-Keuls quando comparado com os demais grupos.

Figura 8: Duração média dos cinco episódios de imobilidade tônica (IT) antes (Controle) e após a cirurgia (Sham), após a administração do CRF (0,2 µg/0,2 µl) e após o pré-tratamento com Astressin 2B (ASTR 2B, 0,2 µg/0,2 µl), antagonista de receptores CRF_2 seguido pela microinjeção de CRF no BLA (n = 7). As barras verticais representam o EPM. * $P < 0,05$ teste de Newman-Keuls quando comparado com demais grupos.

Figura 9: Duração média dos cinco episódios de imobilidade tônica (IT) antes (Controle), após a cirurgia (Sham) e após a administração do antagonista para receptores CRF_2 , Astressin 2B, (ASTR 2B) nas doses de 0,4 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{l}$ (A) e 0,8 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{l}$ (B) no CeA ($n = 5$). As barras verticais representam o EPM. * $P < 0,05$ teste de Newman-Keuls quando comparado com episódio Sham.

Figura 10: Duração média dos cinco episódios de imobilidade tônica (IT) antes (Controle) e após a cirurgia (Sham), após a administração do CRF (0,2 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{l}$) e após o pré-tratamento com Astressin 2B (ASTR 2B, dose de 0,2 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{l}$), antagonista de receptores CRF_2 seguido pela microinjeção de CRF no CeA ($n = 6$). As barras verticais representam o EPM. * $P < 0,05$ teste de Newman-Keuls quando comparado com demais grupos.

Figura 11: Representação esquemática de secções frontais obtidas em planos representativos da amígdala de cobaias: [■] CP 376395 nas concentrações de 0,4 µg/0,2 µl e 0,8 µg/0,2 µl; [Δ] CRF na dose de 0,2 µg/0,2 µl precedida por CP 376395 na concentração de 0,4 µg/0,2 µl; [□] Astressin 2B nas concentrações de 0,4 µg/0,2 µl e 0,8 µg/0,2 µl; [▲] CRF na dose de 0,2 µg/0,2 µl precedida por Astressin 2B na concentração de 0,4 µg/0,2 µl. Abreviações: BLA: núcleo basolateral da amígdala; CeA: núcleo central da amígdala; TO: trato óptico. Todas as microinjeções foram realizadas do lado esquerdo, a representação do lado direito é para melhor visualização. O número de pontos pode ser menor do que o número de cobaias em cada grupo devido a sobreposições de sítios de microinjeção.

Protocolo 3: Avaliação do envolvimento de receptores CRF_1 ou CRF_2 do núcleo basolateral e central da amígdala na locomoção em cobaias

Os resultados do presente trabalho mostram que o tratamento com antagonistas de receptores CRF_1 (CP-376395) ou CRF_2 (astressin 2B) no núcleo basolateral ou central da amígdala não promovem alteração da atividade locomotora em cobaias (Figura 12A e 12B).

A aplicação da ANOVA de uma via apontou que não há diferença entre os tratamentos administrados intra-BLA ($F_{4,24} = 0,148$, $p = 0,962$), ou intra-CeA ($p = 0,962$). A média de quadrados percorridos após os distintos tratamentos realizados no BLA foi de $2,56 \pm 1,02$, para o grupo Salina, $3,04 \pm 1,16$ para o CP-376395 ($0,8 \mu\text{g}/0,2 \mu\text{l}$), $2,64 \pm 1,21$ para o Astressin 2B ($0,8 \mu\text{g}/0,2 \mu\text{l}$), $2,52 \pm 0,73$ para CP-37+CRF e $3,52 \pm 1,30$ para ASTR 2B+CRF (Figura 12A). Nos grupos que receberam os tratamentos intra-CeA as médias obtidas no grupo Salina foi $4,07 \pm 1,33$, para o CP-376395 ($0,8 \mu\text{g}/0,2 \mu\text{l}$) $3,33 \pm 1,38$, para o Astressin 2B ($0,8 \mu\text{g}/0,2 \mu\text{l}$) $3,20 \pm 1,24$, para o CP-37+CRF $4,37 \pm 1,82$ e para ASTR 2B+ CRF $2,33 \pm 1,56$ (Figura 12B).

Figura 12: Efeito dos distintos tratamentos no núcleo basolateral da amígdala (BLA, A) e no núcleo central da amígdala (CeA, B) na atividade locomotora por 5 minutos no campo aberto em cobaias. A atividade locomotora foi registrada imediatamente após microinjeção de Salina 0,9% (0,2 µl), CP 376395 (CP-37, 0,8 µg/0,2 µl), Astressin 2B (ASTR 2B, 0,8 µg/0,2 µl), e do CP 37 e ASTR 2B na dose de 0,4 µg/0,2 µl seguidos por CRF (0,2 µg/0,2 µl) no mesmo sítio. As barras verticais representam o EPM. Os números acima das barras representam o número de animais em cada grupo.

Figura 13: Representação esquemática de secções frontais obtidas em planos representativos da amígdala de cobaias: [●] Salina 0,9% 0,2 µl; [■] CP 376395 nas concentrações de 0,4 µg/0,2 µl e 0,8 µg/0,2 µl; [Δ] CRF na dose de 0,2 µg/0,2 µl precedida por CP 376395 na concentração de 0,4 µg/0,2 µl; [□] Astressin 2B nas concentrações de 0,4 µg/0,2 µl e 0,8 µg/0,2 µl; [▲] CRF na dose de 0,2 µg/0,2 µl precedida por Astressin 2B na concentração de 0,4 µg/0,2 µl. Abreviações: BLA: núcleo basolateral da amígdala; CeA: núcleo central da amígdala; TO: trato óptico. Todas as microinjeções foram realizadas do lado esquerdo, a representação do lado direito é para melhor visualização. O número de pontos pode ser menor do que o número de cobaias em cada grupo devido a sobreposições de sítios de microinjeção.

Figura 14: Fotomicrografias de cortes transversais do encéfalo de cobaia. Representativo dos grupos experimentais apresentados neste trabalho com cânula-guia, dirigida para o núcleo basolateral(BLA) e central da amígdala (CeA), após coloração por técnica de Nissl. Aumento de 2,5X. Legendas: TO: trato óptico; BLA: núcleo basolateral da amígdala; CeA: núcleo central da amígdala.

Os resultados deste trabalho mostram que o bloqueio dos receptores CRF₁ e CRF₂ no BLA e no CeA reduziram a duração da resposta defensiva de imobilidade tônica (IT) em cobaias. Inversamente, a ativação destes receptores no BLA e no CeA aumentou o tempo de IT, demonstrado pela administração de CRF nestas regiões amigdaloides. Ainda, os antagonistas específicos para receptores CRF₁ e CRF₂ foram capazes de bloquear o aumento da duração da IT induzida pelo CRF administrado no mesmo sítio. Estes resultados sugerem que o efeito promovido pelo CRF no BLA e no CeA ocorre por atuação conjunta em receptores CRF₁ e CRF₂. Em adição, é importante ressaltar que as drogas, nas doses utilizadas neste estudo não promoveram alteração da resposta motora, desde que não alteraram a atividade no teste do campo aberto, o que por si só, poderia alterar a resposta de IT. Assim, é possível que sugerir que o bloqueio específico de receptores CRF₁ e CRF₂ do BLA e do CeA promovem redução do medo e/ou da ansiedade, resultando em redução da resposta de IT em cobaias.

O comportamento de IT é uma reação inata e o medo intenso é fator principal para desencadeamento desta resposta, portanto, o medo influencia na duração da IT (Ratner, 1967; Klemm 2001). Dentro desta perspectiva, estudos tem mostrado que a ativação de receptores CRF no BLA levam ao aumento de respostas relacionadas ao medo e a ansiedade (Sajdyk *et al.*, 1999), e o mesmo ocorre no CeA (Kalin *et al.*, 1994; Skorzewska *et al.*, 2009). Em conjunto, estes resultados sugerem que o aumento da liberação de CRF na amígdala e a ativação de receptores CRF são um substrato neural para reações de medo (Koob, 1999; Shekar *et al.*, 2005; Kalin *et al.*, 1994; Skorzewska *et al.*, 2009; Sajdyk *et al.*, 1999).

Segundo Graeff (1990), o medo inato é organizado por um circuito neural denominado de “Sistema Cerebral Aversivo”, o qual é composto pela amígdala, hipotálamo medial e substância cinzenta periaquedutal. Em particular, o BLA é uma estrutura criticamente envolvida na resposta emocional do medo, do estresse e da ansiedade (Sajdyk e Shekar, 1997a,b; Sanders *et al.*, 1995; Sanders e Shekar, 1991, 1995a,b), possivelmente sendo responsável pela percepção de estímulos aversivos. Por sua vez, o CeA é relacionado com o envio de eferências para os componentes do sistema nervoso central responsáveis pelos componentes autonômicos e somáticos que ocorrem nas reações de medo (Davis, 1998). Em geral, o complexo amigdalóide, contribui para respostas de medo e ansiedade atribuindo significado emocional e motivacional ao estímulo sensorial (Jones e Mishkin, 1972; Gaffan *et al.*, 1988; Ledoux, 2000).

O fator liberador de corticotropina (CRF) está envolvido na coordenação de respostas autonômicas, endócrinas e nas respostas comportamentais ao estresse (Carrasco e Van de Kar, 2003; Vale *et al.*, 1981 e 1982; Landgraf, 2001). De fato, a liberação de CRF, e a subsequente secreção de glicocorticóides exercem papel fundamental na preparação do organismo a lidar com insultos iminentes, particularmente perante pistas ambíguas, tais como aqueles eliciados por ambiente aversivo (Merali *et al.*, 2004). Também é importante citar que o CRF tem papel primordial nas respostas de luta e fuga, aumentando o débito cardíaco e o nível de glicocorticóides, inibindo a função digestiva (Dunn e Berridge, 1990), além de levar ao aumento da ansiedade (Takahashi *et al.*, 1989b). Os efeitos do CRF se dão por seu acoplamento aos receptores CRF₁ e CRF₂ (Eckart *et al.*, 2002; Hauger *et al.*, 2003; Hillhouse e Grammatopoulos, 2006). Estes receptores são ligados a proteína G e expressos em regiões discretas do encéfalo. Com destaque, receptores para CRF₁ encontram-se em diversas áreas encefálicas de roedores, enquanto o CRF₂ tem distribuição mais restrita, com maior expressão no hipotálamo ventromedial, núcleo dorsal da rafe e septo lateral (Van Pett *et al.*, 2000). Neste sistema de neurotransmissão, é possível que o CRF₁ controle a ativação do eixo HPA (Bale *et al.*, 2000), sendo responsável pela mediação de diversos efeitos comportamentais do CRF (Bale e Vale, 2004). É importante ressaltar que os efeitos do CRF₁ e CRF₂ no estresse e na ansiedade ainda são motivo de intensa discussão. Assim, enquanto a ativação dos receptores CRF₁ tem sido associada com aumento das reações ao estresse e ansiedade, não há consenso sobre a participação dos receptores CRF₂ (Fèkete e Zorrilla, 2007; Zorrilla *et al.*, 2013).

Os resultados do presente trabalho mostram que o bloqueio dos receptores CRF₁ no BLA e no CeA reduziram a duração do tempo IT, indicando efeito ansiolítico. Inversamente, a administração de CRF aumentou o tempo IT quando administrado nestes mesmos núcleos, corroborando resultados anteriores (Donati e Leite-Panissi, 2011). De fato, trabalho de Sajdyk *et al.* (1999) e de Spiga *et al.*, (2006) descreveram que a administração de CRF ou urocortina 1 (agonista para receptores CRF₁ e CRF₂, com maior afinidade para o receptor CRF₁) no BLA provocou efeito ansiogênico avaliado pelo teste de interação social em ratos, sendo este efeito revertido pelo antagonismo de receptores CRF₁. Ainda, enquanto que injeções sistêmicas e intracerebroventriculares de antagonistas não-peptídicos para CRF₁ (CP-145,526, antalarmin ou DMP696) reduziram comportamentos defensivos no labirinto em cruz elevado e no teste claro/escuro (para revisão Bale e Vale, 2004; Carrasco e Van de Kar,

2003). Injeções sistêmicas, intracerebroventriculares e microinjeções intra-septais de agonistas para CRF₁ atenuaram comportamentos defensivos (Radulovic *et al.*, 1999). É possível que essas diferenças nos efeitos comportamentais envolvam circuitos neurais independentes mediando diferentes modelos etológicos correlacionados com as respostas defensivas (Lowry e Moore, 2006), e indicam a necessidade de manipulações sítio-específicas do sistema CRF (Todorovic *et al.*, 2005).

Com relação ao sistema de receptores para CRF do CeA, estudos prévios mostram que animais introduzidos a ambiente não-familiar (estímulo estressor) é acompanhado por robusta liberação de CRF no CeA, (Richter *et al.*, 1995; Merali *et al.*, 1998; Cook, 2001). Ainda, a administração de CRF no CeA (Wiersma *et al.*, 1997), ou no leito do núcleo da estria terminal, estrutura considerada como parte da extensão da amígdala (Lee *et al.*, 2008) promoveu efeito ansiogênico em distintos testes comportamentais. Por outro lado, a administração de um antagonista para CRF₁ ou de nucleotídeos *antisense* do receptor CRF₁ no CeA reduziu comportamentos de isolamento social e de congelamento em teste de condicionamento aversivo (Heinrichs *et al.*, 1992; Liebsch *et al.*, 1995). Vicentini *et al.* (2014) mostraram que o antagonismo do receptor para CRF₁ reduziu a latência das respostas de esquiva avaliadas no teste do labirinto em “T”, indicando efeito ansiolítico deste antagonista. Ainda no estudo de Vicentini *et al.* (2014), o antagonismo foi capaz de reverter os efeitos ansiogênicos promovidos pelo CRF (facilitação de esquiva no labirinto em “T”). Desta forma, os resultados obtidos neste estudo, corroboram os dados obtidos na literatura, desde que a administração de antagonista para receptores CRF₁ no CeA reduziu a duração da resposta de IT em cobaias.

Considerando o mecanismo de ação do CRF, estudos têm demonstrado que baixas doses de CRF podem ativar preferencialmente receptores CRF₁ em neurônios de projeção glutamatérgicos, em neurônios serotoninérgicos ou colaterais glutamatérgicos dentro do córtex pré-frontal medial (Vertes, 2004; Zhou *et al.* 2010). De fato, a inativação global do CRF₁ no prosencéfalo (onde se encontram predominantemente neurônios glutamatérgicos) reduziu a emissão de comportamentos defensivos (Refojo *et al.*, 2011). Diante do contexto, considerando o envolvimento dos receptores CRF₁ na modulação do medo e da ansiedade, é possível que outros mecanismos e sistemas de neurotransmissores atuem sinergicamente. Dentro deste contexto, achados revelaram que aplicações *in-vitro* de CRF em fatias do córtex pré-frontal medial potencializou a inibição pré-sináptica desta região, via inibição dos neurônios serotoninérgicos, os quais

são estão sob controlada atividade gabaérgica (Tan *et al.*, 2004). Essa potencialização da atividade neuronal gabaérgica do córtex pré-frontal medial pode reduzir a ativação da amígdala, levando a redução dos comportamentos defensivos via projeções diretas do córtex infralímbico para os núcleos medial, central, basomedial ou cortical da amígdala, ou projeções diretas do córtex pré-límbico para a parte capsular do núcleo central da amígdala (Pentkowski *et al.*, 2013). Alternativamente, projeções do córtex pré-frontal medial para neurônios intercalados no BLA inibe a via de saída do CeA (Likhtik *et al.*, 2005).

No presente estudo, o bloqueio dos receptores CRF₂ no BLA e CeA também promoveu efeito ansiolítico ou de redução do medo, evidenciado pela redução da resposta de IT em cobaias. Estes resultados corroboram trabalho de Henry *et al.* (2006) onde a administração de Astressin 2B no septo lateral de ratos bloqueou o efeito ansiogênico promovido pela urocortina 2 em animais submetidos ao estresse. Entretanto, é importante ressaltar que a ativação dos receptores CRF₂ parece exercer efeitos distintos de acordo com o modelo animal e a situação emocional. Nesta perspectiva, Liu *et al.* (2005) reportaram que a urocortina 1 deprimiu a atividade de neurônios septais por ativação dos receptores CRF₂, mas resultou em efeito oposto depois de realizado o teste de retirada de cocaína, mostrando assim, facilitação do aumento de correntes excitatórias glutamatérgicas pós-sinápticas. Ainda, Pernar *et al.* (2004) demonstraram que baixas doses de urocortina 2 inibiu neurônios serotoninérgicos no núcleo dorsal da rafe de ratos, enquanto que altas doses promoveram ativação destes neurônios. Os autores sugeriram que estes efeitos contrários poderiam ser mediados pela ativação de receptores CRF₂ em interneurônios GABAérgicos. Ainda, Henry *et al.* (2006) sugerem que os receptores CRF₂ modulam o comportamento emocional por meio da inibição de vias colaterais GABAérgicas oriundas de neurônios localizados nos neurônios do septo lateral que se projetam para regiões encefálicas envolvidas na modulação comportamental.

Seguindo esta linha de investigação, o tratamento i.c.v com antisauvagine-30 (antagonista de receptor CRF₂) aumentou a resposta de medo condicionado de forma dose-dependente e elevou o nível de corticosterona no plasma sanguíneo em animais que foram expostos a condições aversivas (Skorzewska *et al.*, 2011). No trabalho de Elharrar *et al.* (2013) a administração de um lentiviral, o qual produz aumento da expressão do receptor CRF₂, na divisão medial pósterio-intermédia do leito do núcleo da estria terminal de ratos com alta susceptibilidade ao estresse, reduziu comportamentos

relacionados ao estresse. Ainda, no estudo de Pelleymounter *et al.* (2002) a administração i.c.v. do antisauvagine-30 mostrou efeito ansiolítico em camundongos avaliados no teste de exploração em campo, no *marble burying* e no labirinto em cruz elevado. Contudo, não alterou a atividade locomotora ou o nível de ACTH ao estresse após contenção física (Pelleymounter *et al.*, 2002). Em contrapartida, estudos mostraram que o antisauvagine-30 poderia promover efeito ansiogênico (Radulovic *et al.*, 1999; Kishimoto *et al.*, 2000). Em particular, a administração de antisauvagine-30 no septo lateral intermédio reforçou o condicionamento aversivo ao contexto (Radulovic *et al.*, 1999), bem como, uma única injeção de antisauvagine-30 (400ng, i.c.v.) em camundongos selvagens adultos aumentou a ansiedade avaliada no teste de labirinto em cruz elevado (Kishimoto *et al.*, 2000). Porém, outro achado (Hubbard *et al.*, 2007) mostrou que a administração de antagonista de receptores CRF₂ no BLA (antisauvagine-30) não foi efetivo em reduzir respostas de medo no teste de condicionamento aversivo. Juntos, estes resultados sugerem o envolvimento dos receptores CRF₂ na modulação dos comportamentos emocionais, entretanto, o mecanismo pelo qual ele modula estas respostas ainda necessita ser elucidado.

De maneira geral, o envolvimento dos receptores CRF₁ na mediação da ansiedade, depressão e respostas do eixo HPA ao estresse parece claro, enquanto o envolvimento do CRF₂ não está esclarecido. Os dados citados sugerem duas hipóteses: 1) a ativação do receptor CRF₁ inicia as respostas de medo e ansiedade, enquanto a ativação do receptor CRF₂ estabelece homeostase por contraposição aos efeitos adversos da sinalização do receptor CRF₁ (Reul e Holsboer, 2002); 2) os receptores CRF₁ e CRF₂ contribuem de maneira antagônica no comportamento defensivo, onde os receptores CRF₁ medeiam respostas defensivas ativas decorrentes de estressores escapáveis e o CRF₂ medeia respostas de ansiedade por estímulos incontroláveis e inescapáveis (para revisão, Hauger *et al.*, 2006).

Ainda, é possível que o estresse promova alteração da atividade de receptores CRF, em especial, dos receptores CRF₂ nos comportamentos relacionados à ansiedade. Valdez *et al.* (2002, 2003) reportaram que o tratamento i.c.v. com a urocortina 2 e 3 reduziu a ansiedade em ratos previamente manuseados por 1 semana e habituados ao ambiente do local de teste (teste de retirada defensiva) por 2 horas antes da administração da droga e do início do teste comportamental. Venihaki *et al.* (2004) relataram efeitos ansiolíticos da urocortina 3 administrada i.c.v. em camundongos C57BL/6 que foram previamente manuseados quando comparados com camundongos

controle. De interesse especial, estudo de Henry *et al.* (2006), mostrou que o Astressin 2B não teve efeito em situações de baixo estresse, mas reduziu comportamentos compatíveis com ansiedade quando os animais eram submetidos a estresse por imobilização. Assim, é pertinente sugerir que o antagonismo de receptores CRF₂ foi ansiolítico em situações de alto nível estresse.

Considerando o mecanismo dos receptores CRF no complexo amigdalóide, estudos têm sugerido a existência de uma microcircuitaria entre o BLA e o CeA envolvido na modulação comportamental. Em particular, estes estudos mostraram que o BLA pode modular a via de saída do CeA via projeções diretas para o subnúcleo medial do CeA, bem como por meio de uma via indireta que conduz retroalimentação negativa a subdivisão medial do CeA (CeA_m), via ativação de neurônios GABAérgicos da subdivisão lateral do CeA (CeA_l) (Ciocchi *et al.*, 2010; Haubensak *et al.*, 2010; Tye *et al.*, 2011). Embora mecanismo da microcircuitaria citada não esteja totalmente esclarecido, Silberman e Winder (2013) mostraram que o aumento de CRF no CeA_l pode aumentar a transmissão glutamatérgica. Desta forma, pode ocorrer modulação da transmissão excitatória oriunda das aferências do BLA sinergicamente ou por oclusão funcional, como a transmissão glutamatérgica do BLA pode ser menos saliente (Silberman e Winder, 2013). Por fim, a excitação do CeA_l mediada pelo CRF poderia aumentar a retroalimentação negativa do CeA_m e por sua vez reduzir os comportamentos de medo e ou estresse (Silberman e Winder, 2013).

O estudo de Ugolini e colaboradores (2008) mostrou que a potenciação de longo prazo induzida por CRF pode ser uma característica de diversas áreas límbicas e ser um importante regulador do aprendizado e da memória. A plasticidade no BLA é vista como importante fator para o desenvolvimento de distúrbios de ansiedade (Rainnie *et al.*, 2004; Shekar *et al.*, 2005). A administração repetida de urocortina no BLA sensibilizou os neurônios desta estrutura, levando ao desenvolvimento do estado crônico de ansiedade (Sajdyk e Gehlert, 2000), bem como facilitou a esquiva inibitória em ratos (Liang e Lee, 1988). Antagonistas para o receptor CRF₁ inibiram a consolidação da memória aversiva (Roosendal *et al.*, 2002), um processo que parece ser dependente da atividade do BLA (McGaugh, 2004; Paré, 2003). Ainda, Ugolini *et al.* (2008), sugerem que o aumento a longo prazo da responsividade de neurônios do BLA a estimulação aferente induzida por CRF é mediada por receptores CRF₁. Assim, a liberação aguda de CRF na amígdala pode contribuir não somente para a ansiedade em resposta a um

estímulo aversivo, mas também para consolidação da memória para estímulo aversivo e para o contexto (Ugolini *et al.*, 2008).

A exposição ao estresse de forma prolongada, excessiva e incontrolável representa um fator de risco comum a várias doenças psiquiátricas, incluindo depressão, esquizofrenia e ansiedade (Bale, 2005; Korte *et al.*, 2005, Nemeroff *et al.*, 1984). Os dados citados e compilados nesta discussão confirmam que a modulação do comportamento emocional pelos receptores CRF ainda são, por vezes, antagonistas, e necessitam de mais estudos que envolvam manipulações sítio-específicas de outras áreas encefálicas. Além disso, é possível que a contribuição do CRF₁ e CRF₂ para a depressão e ansiedade pode variar de acordo com o sexo, como ocorre em seres humanos em estados de depressão (Bale e Vale, 2003).

Em suma, os resultados do presente trabalho sugerem que o antagonismo dos receptores CRF₁ e CRF₂ dos núcleos basolateral e central da amígdala reduzem a duração do comportamento de IT, indicando redução do medo e/ou ansiedade, visto que para ocorrência do comportamento de IT é necessário o medo intenso (Klemm, 1971; Gallup, 1977). Em contraste, a ativação inespecífica destes receptores pelo CRF aumenta a resposta de IT, aumentando o medo e/ou ansiedade, sendo este efeito bloqueado por antagonistas de receptores CRF₁ e CRF₂, isoladamente. Ainda, as drogas utilizadas, em suas doses efetivas para alteração a resposta de IT, não promoveram alterações na locomoção das cobaias avaliadas no teste de campo aberto, evidenciando que os efeitos observados não são devidos a alteração motora.

- Os resultados do trabalho mostram que o antagonismo dos receptores CRF₁ nos núcleos basolateral e central da amígdala reduzem a duração do comportamento de imobilidade tônica em cobaias;
- O antagonismo dos receptores CRF₂ dos núcleos basolateral e central da amígdala reduzem o tempo de duração do tempo de IT, sugerindo participação do medo inato em cobaias;
- A administração prévia de antagonistas específicos para receptores CRF₁ ou CRF₂ nos núcleos basolateral e central da amígdala alteram o aumento da duração da resposta de IT em cobaias induzida pela microinjeção de CRF nestes mesmos núcleos amigdaloides.
- A alteração do tempo da resposta de IT por administração dos antagonistas (CRF₁ e CRF₂) e do agonista para CRF observada no estudo é possivelmente resultado da modulação do medo inato e não por influência da motricidade, visto que esses fármacos não causaram alterações na motricidade avaliada no teste de locomoção em campo aberto.

Referências Bibliográficas*

*De acordo com a ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ABRAMS, M. P. et al. Human tonic immobility: measurement and correlates. **Depress Anxiety**, v. 26, n. 6, p. 550-6, 2009. ISSN 1091-4269. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/da.20462> >.

ARBORELIUS, L. et al. The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. **J Endocrinol**, v. 160, n. 1, p. 1-12, Jan 1999. ISSN 0022-0795 (Print)0022-0795. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BALE, T. L. et al. Mice deficient for corticotropin-releasing hormone receptor-2 display anxiety-like behaviour and are hypersensitive to stress. **Nat Genet**, v. 24, n. 4, p. 410-4, Apr 2000. ISSN 1061-4036 (Print)1061-4036. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/74263> >.

BALE, T. L.; VALE, W. W. CRF and CRF receptors: role in stress responsivity and other behaviors. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 44, p. 525-57, 2004. ISSN 0362-1642 (Print)0362-1642. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121410> >.

BANDLER, R.; CARRIVE, P. Integrated defence reaction elicited by excitatory amino acid microinjection in the midbrain periaqueductal grey region of the unrestrained cat. **Brain research**, v. 439, n. 1, p. 95-106, 1988. ISSN 0006-8993.

BEHAN, D. P. et al. Corticotropin releasing factor (CRF) binding protein: a novel regulator of CRF and related peptides. **Front Neuroendocrinol**, v. 16, n. 4, p. 362-82, Oct 1995. ISSN 0091-3022 (Print)0091-3022. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1006/frne.1995.1013> >.

BERNARD, J. F.; PESCHANSKI, M.; BESSON, J. M. A possible spino (trigemino)-ponto-amygdaloid pathway for pain. **Neurosci Lett**, v. 100, n. 1-3, p. 83-8, May 22 1989. ISSN 0304-3940 (Print)0304-3940. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BINDER, E. B.; NEMEROFF, C. B. The CRF system, stress, depression and anxiety-insights from human genetic studies. **Mol Psychiatry**, v. 15, n. 6, p. 574-88, Jun 2010. ISSN 1359-4184. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/mp.2009.141> >.

BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. **Annual review of psychology**, v. 39, n. 1, p. 43-68, 1988. ISSN 0066-4308.

BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Attack and defense in rodents as ethoexperimental models for the study of emotion. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 13 Suppl, p. S3-14, 1989. ISSN 0278-5846 (Print)0278-5846. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BOORSE, G. C.; DENVER, R. J. Widespread tissue distribution and diverse functions of corticotropin-releasing factor and related peptides. **Gen Comp Endocrinol**, v. 146, n. 1, p. 9-18, Mar 2006. ISSN 0016-6480 (Print)0016-6480. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2005.11.014> >.

BOVIN, M. J. et al. Tonic immobility mediates the influence of peritraumatic fear and perceived inescapability on posttraumatic stress symptom severity among sexual assault survivors. **J Trauma Stress**, v. 21, n. 4, p. 402-9, Aug 2008. ISSN 0894-9867. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jts.20354> >.

CANNON, W. B. The James-Lange theory of emotion: a critical examination and an alternative theory. **Am J Psychol**. 39: 106-124, 1927.

CANTERAS, N. S. [Critical analysis of the neural systems organizing innate fear responses]. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 25 Suppl 2, p. 21-4, Dec 2003. ISSN 1516-4446. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

CARLI, G. Depression of somatic reflexes during rabbit hypnosis. **Brain research**, v. 11, n. 2, p. 453-456, 1968. ISSN 0006-8993.

_____. Sub-cortical mechanisms of rabbit hypnosis. **Archives italiennes de biologie**, v. 109, n. 1, p. 15-26, 1971. ISSN 0003-9829.

_____. Blood pressure and heart rate in the rabbit during animal hypnosis. **Electroencephalography and clinical Neurophysiology**, v. 37, n. 3, p. 231-237, 1974. ISSN 0013-4694.

_____. Some evidence of analgesia during animal hypnosis. **Experimental Brain Research**, 1975, SPRINGER VERLAG 175 FIFTH AVE, NEW YORK, NY 10010. p.35-35.

CARLTON, P. L. Cholinergic mechanisms in the control of behavior by the brain. **Psychological Review**, v. 70, n. 1, p. 19, 1963. ISSN 1939-1471.

_____. Brain-acetylcholine and inhibition. **Reinforcement and behavior**, p. 286-327, 1969.

CARRASCO, G. A.; VAN DE KAR, L. D. Neuroendocrine pharmacology of stress. **Eur J Pharmacol**, v. 463, n. 1-3, p. 235-72, Feb 28 2003. ISSN 0014-2999 (Print)0014-2999. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

CHALMERS, D. T.; LOVENBERG, T. W.; DE SOUZA, E. B. Localization of novel corticotropin-releasing factor receptor (CRF2) mRNA expression to specific subcortical nuclei in rat brain: comparison with CRF1 receptor mRNA expression. **J Neurosci**, v. 15, n. 10, p. 6340-50, Oct 1995. ISSN 0270-6474 (Print)0270-6474. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

CIOCCHI, S. et al. Encoding of conditioned fear in central amygdala inhibitory circuits. **Nature**, v. 468, n. 7321, p. 277-82, Nov 11 2010. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nature09559> >.

COOK, C. J. Measuring of extracellular cortisol and corticotropin-releasing hormone in the amygdala using immunosensor coupled microdialysis. **J Neurosci Methods**, v. 110, n. 1-2, p. 95-101, Sep 30 2001. ISSN 0165-0270 (Print)0165-0270. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

DARWIN, C. **The expression of the emotions in man and animals**. Oxford University Press, 1998. ISBN 0195158067.

DAUTZENBERG, F. M.; HAUGER, R. L. The CRF peptide family and their receptors: yet more partners discovered. **Trends Pharmacol Sci**, v. 23, n. 2, p. 71-7, Feb 2002. ISSN 0165-6147 (Print)0165-6147. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

DAUTZENBERG, F. M.; HIGELIN, J.; TEICHERT, U. Functional characterization of corticotropin-releasing factor type 1 receptor endogenously expressed in human embryonic kidney 293 cells. **European journal of pharmacology**, v. 390, n. 1, p. 51-59, 2000. ISSN 0014-2999.

DAVIDSON, R. J. et al. Depression: perspectives from affective neuroscience. **Annu Rev Psychol**, v. 53, p. 545-74, 2002. ISSN 0066-4308 (Print)0066-4308. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.psych.53.100901.135148> >.

DAVIS, M. Are different parts of the extended amygdala involved in fear versus anxiety? **Biol Psychiatry**, v. 44, n. 12, p. 1239-47, Dec 15 1998. ISSN 0006-3223 (Print)0006-3223. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

DAVIS, M. Neurobiology of fear responses: the role of the amygdala. **J Neuropsychiatry Clin Neurosci**, v. 9, n. 3, p. 382-402, Summer 1997. ISSN 0895-0172 (Print)0895-0172. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

DAVIS, M.; RAINNIE, D.; CASSELL, M. Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety. **Trends Neurosci**, v. 17, n. 5, p. 208-14, May 1994. ISSN 0166-2236 (Print)0166-2236. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

DE OLIVEIRA, L.; HOFFMANN, A.; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L. Participation of the medial and anterior hypothalamus in the modulation of tonic immobility in guinea pigs. **Physiol Behav**, v. 62, n. 5, p. 1171-8, Nov 1997a. ISSN 0031-9384 (Print)0031-9384. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

_____. The lateral hypothalamus in the modulation of tonic immobility in guinea pigs. **Neuroreport**, v. 8, n. 16, p. 3489-93, Nov 10 1997b. ISSN 0959-4965 (Print)0959-4965. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

DONATTI, A. F.; LEITE-PANISSI, C. R. GABAergic antagonist blocks the reduction of tonic immobility behavior induced by activation of 5-HT₂ receptors in the basolateral nucleus of the amygdala in guinea pigs. **Brain Res Bull**, v. 79, n. 6, p. 358-64, Aug 14 2009. ISSN 0361-9230. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2009.04.016> >.

_____. Activation of corticotropin-releasing factor receptors from the basolateral or central amygdala increases the tonic immobility response in guinea pigs: an innate fear behavior. **Behav Brain Res**, v. 225, n. 1, p. 23-30, Nov 20 2011. ISSN 0166-4328. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2011.06.027> >.

DONATTI, A. F.; LEITE-PANISSI, C. R. A. Activation of the corticotropin-releasing factor receptor from the basolateral or central amygdala modulates nociception in guinea pigs. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 4, p. 20, 2013.

DUNN, A. J.; BERRIDGE, C. W. Physiological and behavioral responses to corticotropin-releasing factor administration: is CRF a mediator of anxiety or stress responses? **Brain Res Brain Res Rev**, v. 15, n. 2, p. 71-100, May-Aug 1990. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

ECKART, K. et al. Pharmacology and biology of corticotropin-releasing factor (CRF) receptors. **Receptors Channels**, v. 8, n. 3-4, p. 163-77, 2002. ISSN 1060-6823 (Print)1060-6823. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

EDDY, T. J.; GALLUP JR, G. G. Thermal correlates of tonic immobility and social isolation in chickens. **Physiology & behavior**, v. 47, n. 4, p. 641-646, 1990. ISSN 0031-9384.

EDMUNDS, M. Longman Group Ltd; Harlow, Essex, UK: 1974. **Defence in animals: a survey of antipredator defences**,

ELHARRAR, E. et al. Overexpression of corticotropin-releasing factor receptor type 2 in the bed nucleus of stria terminalis improves posttraumatic stress disorder-like symptoms in a model of incubation of fear. **Biol Psychiatry**, v. 74, n. 11, p. 827-36, Dec 1 2013. ISSN 0006-3223. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2013.05.039> >.

ETTINGER, R. H.; THOMPSON, R. W. The role of dopaminergic systems in the mediation of tonic immobility (animal hypnosis) in chickens. **Bulletin of the Psychonomic Society**, v. 12, n. 4, p. 301-302, 1978. ISSN 0090-5054.

FANSELOW, M. S. Conditional and unconditional components of post-shock freezing. **The Pavlovian Journal of Biological Science: Official Journal of the Pavlovian**, v. 15, n. 4, p. 177-182, 1980. ISSN 1053-881X.

FARABOLLINI, F. et al. Time-course of opioid and pituitary-adrenal hormone modifications during the immobility reaction in rabbits. **Physiol Behav**, v. 47, n. 2, p. 337-41, Feb 1990. ISSN 0031-9384 (Print)0031-9384. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

FEKETE, E. M.; ZORRILLA, E. P. Physiology, pharmacology, and therapeutic relevance of urocortins in mammals: ancient CRF paralogs. **Front Neuroendocrinol**, v. 28, n. 1, p. 1-27, Apr 2007. ISSN 0091-3022 (Print)0091-3022. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.yfrne.2006.09.002> >.

GAFFAN, E. A.; GAFFAN, D.; HARRISON, S. Disconnection of the amygdala from visual association cortex impairs visual reward-association learning in monkeys. **J Neurosci**, v. 8, n. 9, p. 3144-50, Sep 1988. ISSN 0270-6474 (Print)0270-6474. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

GALLUP, G. G. Tonic immobility: The role of fear and predation. **The Psychological Record**, 1977. ISSN 0033-2933.

GIANNICO, A. T. et al. Proven cardiac changes during death-feigning (tonic immobility) in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). **Journal of Comparative Physiology A**, p. 1-6, 2014. ISSN 0340-7594.

GRAEFF, F. Brain defense systems and anxiety. **Handbook of anxiety**, v. 3, p. 307-354, 1990.

HABIB, K. E.; GOLD, P. W.; CHROUSOS, G. P. Neuroendocrinology of stress. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v. 30, n. 3, p. 695-728; vii-viii, Sep 2001. ISSN 0889-8529 (Print)0889-8529. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

HARSTON, C. T. et al. Effects of intraventricular injections of imipramine and 5-hydroxytryptamine on tonic immobility in chickens. **Bulletin of the Psychonomic Society**, v. 8, n. 5, p. 403-405, 1976. ISSN 0090-5054.

HATTON, D. C. et al. Serotonin and tonic immobility in the rabbit. **Behavioral biology**, v. 24, n. 1, p. 97-100, 1978. ISSN 0091-6773.

HAUBENSAK, W. et al. Genetic dissection of an amygdala microcircuit that gates conditioned fear. **Nature**, v. 468, n. 7321, p. 270-6, Nov 11 2010. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nature09553> >.

HAUGER, R. L.; DAUTZENBERG, F. M. Regulation of the stress response by corticotropin-releasing factor receptors. In: (Ed.). **Neuroendocrinology in physiology and medicine**: Springer, 2000. p.261-286. ISBN 161737153X.

HAUGER, R. L. et al. International Union of Pharmacology. XXXVI. Current status of the nomenclature for receptors for corticotropin-releasing factor and their ligands. **Pharmacol Rev**, v. 55, n. 1, p. 21-6, Mar 2003. ISSN 0031-6997 (Print)0031-6997. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1124/pr.55.1.3> >.

_____. Corticotropin releasing factor (CRF) receptor signaling in the central nervous system: new molecular targets. **CNS & neurological disorders drug targets**, v. 5, n. 4, p. 453, 2006.

HEINRICHS, S. C. et al. Anti-stress action of a corticotropin-releasing factor antagonist on behavioral reactivity to stressors of varying type and intensity. **Neuropsychopharmacology**, v. 11, n. 3, p. 179-86, Nov 1994. ISSN 0893-133X (Print)0006-3223. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/sj.npp.1380104> >.

HEINRICHS, S. C. et al. Corticotropin-releasing factor CRF1, but not CRF2, receptors mediate anxiogenic-like behavior. **Regul Pept**, v. 71, n. 1, p. 15-21, Jul 23 1997. ISSN 0167-0115 (Print)0167-0115. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

_____. Suppression of corticotropin-releasing factor in the amygdala attenuates aversive consequences of morphine withdrawal. **Behav Pharmacol**, v. 6, n. 1, p. 74-80, Jan 1995. ISSN 0955-8810. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

_____. Corticotropin-releasing factor antagonist reduces emotionality in socially defeated rats via direct neurotropic action. **Brain Res**, v. 581, n. 2, p. 190-7, May 29 1992. ISSN 0006-8993 (Print)0006-8993. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

HENNIG, C. W. et al. Tonic immobility and the alpha-adrenergic system in chickens. **Physiology & behavior**, v. 24, n. 1, p. 21-25, 1980. ISSN 0031-9384.

HENRY, B.; VALE, W.; MARKOU, A. The effect of lateral septum corticotropin-releasing factor receptor 2 activation on anxiety is modulated by stress. **J Neurosci**, v. 26, n. 36, p. 9142-52, Sep 6 2006. ISSN 0270-6474. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.1494-06.2006> >.

HICKS, L. E. et al. Possible serotonergic mediation of tonic immobility: Effects of morphine and serotonin blockade. **Psychopharmacologia**, v. 42, n. 1, p. 51-56, 1975. ISSN 0033-3158.

HILLHOUSE, E. W.; GRAMMATOPOULOS, D. K. The molecular mechanisms underlying the regulation of the biological activity of corticotropin-releasing hormone receptors: implications for physiology and pathophysiology. **Endocr Rev**, v. 27, n. 3, p. 260-86, May 2006. ISSN 0163-769X (Print)0163-769x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1210/er.2005-0034> >.

HIROI, N. et al. Expression of corticotropin releasing hormone receptors type I and type II mRNA in suicide victims and controls. **Mol Psychiatry**, v. 6, n. 5, p. 540-6, Sep 2001. ISSN 1359-4184 (Print)1359-4184. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/sj.mp.4000908> >.

HSU, S. Y.; HSUEH, A. J. Human stresscopin and stresscopin-related peptide are selective ligands for the type 2 corticotropin-releasing hormone receptor. **Nat Med**, v. 7, n. 5, p. 605-11, May 2001. ISSN 1078-8956 (Print)1078-8956. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/87936> >.

HUMPHREYS, K. L. et al. Tonic immobility in childhood sexual abuse survivors and its relationship to posttraumatic stress symptomatology. **J Interpers Violence**, v. 25, n. 2, p. 358-73, Feb 2010. ISSN 0886-2605. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1177/0886260509334412> >.

JAMES, W. What is an emotion? **Mind**.9: 188-205, 1884.

JONES, R. B. The tonic immobility reaction of the domestic fowl: a review. **World's poultry science journal**, v. 42, n. 01, p. 82-96, 1986. ISSN 1743-4777.

JONES, B.; MISHKIN, M. Limbic lesions and the problem of stimulus--reinforcement associations. **Exp Neurol**, v. 36, n. 2, p. 362-77, Aug 1972. ISSN 0014-4886 (Print)0014-4886. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

KAGEYAMA, K. et al. Urocortin messenger ribonucleic acid: tissue distribution in the rat and regulation in thymus by lipopolysaccharide and glucocorticoids. **Endocrinology**, v. 140, n. 12, p. 5651-8, Dec 1999. ISSN 0013-7227 (Print)0013-7227. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1210/endo.140.12.7223> >.

KALIN, N. H.; TAKAHASHI, L. K.; CHEN, F. L. Restraint stress increases corticotropin-releasing hormone mRNA content in the amygdala and paraventricular nucleus. **Brain Res**, v. 656, n. 1, p. 182-6, Sep 5 1994. ISSN 0006-8993 (Print)0006-8993. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

KAPP, E. S.; GALLAGHER, M. M.; FRYSSINGER, R. S.; APPELEGATE, C. D. The amygdala, emotion and cardiovascular conditioning. In: **The Amygdaloid Complex**, Ben-Ari (ed.). Amsterdam: Elsevier/North-Holland. 355-366, 1981.

KISHIMOTO, T. et al. Deletion of crhr2 reveals an anxiolytic role for corticotropin-releasing hormone receptor-2. **Nat Genet**, v. 24, n. 4, p. 415-9, Apr 2000. ISSN 1061-4036 (Print)1061-4036. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/74271> >.

KLEMM, W. Neurophysiologic studies of the immobility reflex ("animal hypnosis"). **Neurosciences research**, v. 4, p. 165, 1971. ISSN 0077-7846.

_____. Identity of sensory and motor systems that are critical to the immobility reflex ("animal hypnosis"). **Journal of neuroscience research**, v. 2, n. 1, p. 57-69, 1976. ISSN 1097-4547.

KLÜVER, H; BUCY, P.C. Preliminary analysis of the temporal lobes in monkeys. **Arch Neurol Psychiatry**.42: 979–100, 1939.

KLÜVER, H; BUCY, P.C. "Psychic blindness" and other symptoms following bilateral temporal lobectomy in rhesus monkeys. **Am J Physiol**. 119: 352–353, 1937.

KOOB, G. F.; HEINRICHS, S. C. A role for corticotropin releasing factor and urocortin in behavioral responses to stressors. **Brain Res**, v. 848, n. 1-2, p. 141-52, Nov 27 1999. ISSN 0006-8993 (Print)0006-8993. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

KORTE, S. M. et al. The Darwinian concept of stress: benefits of allostasis and costs of allostatic load and the trade-offs in health and disease. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 29, n. 1, p. 3-38, Feb 2005. ISSN 0149-7634 (Print)0149-7634. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.08.009> >.

KOSTICH, W. A. et al. Molecular identification and analysis of a novel human corticotropin-releasing factor (CRF) receptor: the CRF2gamma receptor. **Mol**

Endocrinol, v. 12, n. 8, p. 1077-85, Aug 1998. ISSN 0888-8809 (Print)0888-8809. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1210/mend.12.8.0145> >.

KÜNZEL, H. E. et al. Treatment of depression with the CRH-1-receptor antagonist R121919: endocrine changes and side effects. **Journal of psychiatric research**, v. 37, n. 6, p. 525-533, 2003. ISSN 0022-3956.

LANDGRAF, R. Neuropeptides and anxiety. **Stress**, v. 4, n. 4, p. 273-6, Dec 2001. ISSN 1025-3890 (Print)1025-3890. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

LANGE, C. G. The mechanisms of emotion. *In*: **Classic Psychol.** (ed: Boston, R. B) Houghton Mifflin, 672-684, 1887.

LEDOUX, J. E. Emotion circuits in the brain. **Annu Rev Neurosci**, v. 23, p. 155-84, 2000. ISSN 0147-006X (Print)0147-006x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.neuro.23.1.155> >.

LEDOUX, J. The amygdala. **Curr Biol**, v. 17, n. 20, p. R868-74, Oct 23 2007. ISSN 0960-9822 (Print)0960-9822. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2007.08.005> >.

LEDOUX, J. E. et al. Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. **J Neurosci**, v. 8, n. 7, p. 2517-29, Jul 1988. ISSN 0270-6474 (Print)0270-6474. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

LEE, Y. et al. Repeated stimulation of CRF receptors in the BNST of rats selectively induces social but not panic-like anxiety. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 11, p. 2586-94, Oct 2008. ISSN 0006-3223. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/sj.npp.1301674> >.

LEFEBVRE, L.; SABOURIN, M. Effects of spaced and massed repeated elicitation on tonic immobility in the goldfish (*Carassius auratus*). **Behavioral Biology**, v. 21, n. 2, p. 300-305, 10// 1977. ISSN 0091-6773. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091677377903960> >.

LEITE-PANISSI, C. R.; COIMBRA, N. C.; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L. The cholinergic stimulation of the central amygdala modifying the tonic immobility response and antinociception in guinea pigs depends on the ventrolateral periaqueductal

gray. **Brain Res Bull**, v. 60, n. 1-2, p. 167-78, Apr 15 2003. ISSN 0361-9230 (Print)0361-9230. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

LEITE-PANISSI, C. R. et al. Serotonergic activation of the basolateral amygdala and modulation of tonic immobility in guinea pig. **Brain Res Bull**, v. 69, n. 4, p. 356-64, Apr 28 2006. ISSN 0361-9230 (Print)0361-9230. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2006.02.007> >.

LEITE-PANISSI, C. R.; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L. Central nucleus of the amygdala and the control of tonic immobility in guinea pigs. **Brain Res Bull**, v. 58, n. 1, p. 13-9, May 2002. ISSN 0361-9230 (Print)0361-9230. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

LEWIS, K. et al. Identification of urocortin III, an additional member of the corticotropin-releasing factor (CRF) family with high affinity for the CRF2 receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 13, p. 7570-5, Jun 19 2001. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.121165198> >.

LIANG, K. C.; LEE, E. H. Intra-amygdala injections of corticotropin releasing factor facilitate inhibitory avoidance learning and reduce exploratory behavior in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 96, n. 2, p. 232-6, 1988. ISSN 0033-3158 (Print)0033-3158. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

LIEBSCH, G. et al. Chronic infusion of a CRH1 receptor antisense oligodeoxynucleotide into the central nucleus of the amygdala reduced anxiety-related behavior in socially defeated rats. **Regul Pept**, v. 59, n. 2, p. 229-39, Oct 20 1995. ISSN 0167-0115 (Print)0167-0115. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

LIKHTIK, E. et al. Prefrontal control of the amygdala. **J Neurosci**, v. 25, n. 32, p. 7429-37, Aug 10 2005. ISSN 0270-6474. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.2314-05.2005> >.

LOVENBERG, T. W. et al. Cloning and characterization of a functionally distinct corticotropin-releasing factor receptor subtype from rat brain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 3, p. 836-40, Jan 31 1995. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

LOWRY, C. A.; MOORE, F. L. Regulation of behavioral responses by corticotropin-releasing factor. **Gen Comp Endocrinol**, v. 146, n. 1, p. 19-27, Mar 2006. ISSN 0016-6480 (Print)0016-6480. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2005.12.006> >.

MCLEAN, P. D. Psychosomatic disease and the “visceral brain”. **Psychosom Med**. 338-353, 1949.

MARX, B. P. et al. Tonic Immobility as an Evolved Predator Defense: Implications for Sexual Assault Survivors. **Clinical Psychology: Science and Practice**, v. 15, n. 1, p. 74-90, ISSN 1468-2850. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1468-2850.2008.00112.x/abstract> >.Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1468-2850.2008.00112.x/full> >.Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1468-2850.2008.00112.x/pdf> >.

MCGAUGH, J. L. The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. **Annu Rev Neurosci**, v. 27, p. 1-28, 2004. ISSN 0147-006X (Print)0147-006x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.neuro.27.070203.144157> >.

MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L.; HOFFMANN, A. The parabrachial region as a possible region modulating simultaneously pain and tonic immobility. **Behav Brain Res**, v. 56, n. 2, p. 127-32, Sep 30 1993. ISSN 0166-4328 (Print)0166-4328. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MERALI, Z. et al. Does amygdaloid corticotropin-releasing hormone (CRH) mediate anxiety-like behaviors? Dissociation of anxiogenic effects and CRH release. **Eur J Neurosci**, v. 20, n. 1, p. 229-39, Jul 2004. ISSN 0953-816X (Print)0953-816x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03468.x> >.

_____. Aversive and appetitive events evoke the release of corticotropin-releasing hormone and bombesin-like peptides at the central nucleus of the amygdala. **J Neurosci**, v. 18, n. 12, p. 4758-66, Jun 15 1998. ISSN 0270-6474 (Print)0270-6474. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MONASSI, C. R.; HOFFMANN, A.; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L. Participation of the periaqueductal gray matter in the modulation of tonic immobility in the guinea pig. **Braz J Med Biol Res**, v. 27, n. 5, p. 1243-8, May 1994. ISSN 0100-879X (Print)0100-879x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

_____. Involvement of the cholinergic system and periaqueductal gray matter in the modulation of tonic immobility in the guinea pig. **Physiol Behav**, v. 62, n. 1, p. 53-9, Jul 1997. ISSN 0031-9384 (Print)0031-9384. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MONASSI, C. R.; LEITE-PANISSI, C. R.; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L. Ventrolateral periaqueductal gray matter and the control of tonic immobility. **Brain Res Bull**, v. 50, n. 3, p. 201-8, Oct 1999. ISSN 0361-9230 (Print)0361-9230. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MONASSI, C. R.; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L. Serotonin 5-HT₂ and 5-HT_{1A} receptors in the periaqueductal gray matter differentially modulate tonic immobility in guinea pig. **Brain Res**, v. 1009, n. 1-2, p. 169-80, May 29 2004. ISSN 0006-8993 (Print)0006-8993. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2004.02.061> >.

NASH, R. F.; GALLUP JR, G. G.; CZECH, D. A. Psychophysiological correlates of tonic immobility in the domestic chicken (< i> Gallus gallus</i>). **Physiology & behavior**, v. 17, n. 3, p. 413-418, 1976. ISSN 0031-9384.

NEMEROFF, C. B. et al. Elevated concentrations of CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients. **Science**, v. 226, n. 4680, p. 1342-4, Dec 14 1984. ISSN 0036-8075 (Print)0036-8075. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

NEMEROFF, C. B. The corticotropin-releasing factor (CRF) hypothesis of depression: new findings and new directions. **Mol Psychiatry**, v. 1, n. 4, p. 336-42, Sep 1996. ISSN 1359-4184 (Print)1359-4184. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

NEMEROFF, C. B.; VALE, W. W. The neurobiology of depression: inroads to treatment and new drug discovery. **J Clin Psychiatry**, v. 66 Suppl 7, p. 5-13, 2005. ISSN 0160-6689 (Print)0160-6689. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

NOZU, T. et al. Peripheral urocortin delays gastric emptying: role of CRF receptor 2. **Am J Physiol**, v. 276, n. 4 Pt 1, p. G867-74, Apr 1999. ISSN 0002-9513 (Print)0002-9513. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

PALCHAUDHURI, M. R. et al. Isolation and pharmacological characterization of two functional splice variants of corticotropin-releasing factor type 2 receptor from *Tupaia belangeri*. **J Neuroendocrinol**, v. 11, n. 6, p. 419-28, Jun 1999. ISSN 0953-8194 (Print)0953-8194. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

PAPEZ, J. W. A proposed mechanism of emotion. **Arch Neurol Psych** 38: 725-743, 1937.

PARE, D. Role of the basolateral amygdala in memory consolidation. **Prog Neurobiol**, v. 70, n. 5, p. 409-20, Aug 2003. ISSN 0301-0082 (Print)0301-0082. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

PENTKOWSKI, N. S. et al. Cortagine infused into the medial prefrontal cortex attenuates predator-induced defensive behaviors and Fos protein production in selective nuclei of the amygdala in male CD1 mice. **Horm Behav**, v. 64, n. 3, p. 519-26, Aug 2013. ISSN 0018-506x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.yhbeh.2013.06.008> >.

PERNAR, L. et al. Selective activation of corticotropin-releasing factor-2 receptors on neurochemically identified neurons in the rat dorsal raphe nucleus reveals dual actions. **J Neurosci**, v. 24, n. 6, p. 1305-11, Feb 11 2004. ISSN 0270-6474. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.2885-03.2004> >.

PERRIN, M. et al. Identification of a second corticotropin-releasing factor receptor gene and characterization of a cDNA expressed in heart. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 7, p. 2969-73, Mar 28 1995. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

PORTUGAL, L. C. et al. Peritraumatic tonic immobility is associated with posttraumatic stress symptoms in undergraduate Brazilian students. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 34, n. 1, p. 60-5, Mar 2012. ISSN 1516-4446. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

POTTER, E. et al. The central distribution of a corticotropin-releasing factor (CRF)-binding protein predicts multiple sites and modes of interaction with CRF. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 9, p. 4192-6, May 1 1992. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

_____. Distribution of corticotropin-releasing factor receptor mRNA expression in the rat brain and pituitary. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 19, p. 8777-81, Sep 13 1994. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

RAINNIE, D. G. et al. Corticotrophin releasing factor-induced synaptic plasticity in the amygdala translates stress into emotional disorders. **J Neurosci**, v. 24, n. 14, p. 3471-9, Apr 7 2004. ISSN 0270-6474. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.5740-03.2004> >.

RAMOS, C. et al. Role of the amygdaloid nuclei in the modulation of tonic immobility in guinea pigs. **Physiol Behav**, v. 67, n. 5, p. 717-24, Nov 1999. ISSN 0031-9384 (Print)0031-9384. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

RADULOVIC, J. et al. Modulation of learning and anxiety by corticotropin-releasing factor (CRF) and stress: differential roles of CRF receptors 1 and 2. **J Neurosci**, v. 19, n. 12, p. 5016-25, Jun 15 1999. ISSN 0270-6474. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

RATNER, S. Comparative aspects of hypnosis. **Handbook of clinical and experimental hypnosis**. New York: Macmillan, p. 550-587, 1967.

REFOJO, D. et al. Glutamatergic and dopaminergic neurons mediate anxiogenic and anxiolytic effects of CRHR1. **Science**, v. 333, n. 6051, p. 1903-7, Sep 30 2011. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1126/science.1202107> >.

REUL, J. M.; HOLSBOER, F. Corticotropin-releasing factor receptors 1 and 2 in anxiety and depression. **Curr Opin Pharmacol**, v. 2, n. 1, p. 23-33, Feb 2002. ISSN 1471-4892 (Print)1471-4892. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

REYES, T. M. et al. Urocortin II: a member of the corticotropin-releasing factor (CRF) neuropeptide family that is selectively bound by type 2 CRF receptors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 5, p. 2843-8, Feb 27 2001. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.051626398> >.

RICHTER, R. M. et al. Sensitization of cocaine-stimulated increase in extracellular levels of corticotropin-releasing factor from the rat amygdala after repeated administration as determined by intracranial microdialysis. **Neurosci Lett**, v. 187, n. 3, p. 169-72, Mar 10 1995. ISSN 0304-3940 (Print)0304-3940. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

ROOZENDAAL, B. et al. Involvement of stress-released corticotropin-releasing hormone in the basolateral amygdala in regulating memory consolidation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 21, p. 13908-13, Oct 15 2002. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.212504599> >.

RÖSSNER, W. **Stereotaktischerhirn atlas vomMeerschweinchen**, 1 ed. Munich: Pallas Verlag; 1965.

ROVEE-COLLIER, C. et al. Behavioral thermoregulation and immobilization: Conflicting demands for survival. **Journal of Comparative Psychology**, v. 105, n. 3, p. 232, 1991. ISSN 1939-2087.

RUSINOVA, E.; DAVYDOV, V. Dynamics of changes in electrical activity in the rabbit cerebral cortex during sequential sessions of “animal hypnosis”. **Neuroscience and behavioral physiology**, v. 40, n. 5, p. 471-478, 2010. ISSN 0097-0549.

SAH, P. et al. The amygdaloid complex: anatomy and physiology. **Physiol Rev**, v. 83, n. 3, p. 803-34, Jul 2003. ISSN 0031-9333 (Print)0031-9333. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00002.2003> >.

SAJDYK, T. J.; GEHLERT, D. R. Astressin, a corticotropin releasing factor antagonist, reverses the anxiogenic effects of urocortin when administered into the basolateral amygdala. **Brain Res**, v. 877, n. 2, p. 226-34, Sep 22 2000. ISSN 0006-8993 (Print)0006-8993. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SAJDYK, T. J. et al. Role of corticotropin-releasing factor and urocortin within the basolateral amygdala of rats in anxiety and panic responses. **Behav Brain Res**, v. 100, n. 1-2, p. 207-15, Apr 1999. ISSN 0166-4328 (Print)0166-4328. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SAJDYK, T. J.; SHEKHAR, A. Excitatory amino acid receptor antagonists block the cardiovascular and anxiety responses elicited by gamma-aminobutyric acidA receptor blockade in the basolateral amygdala of rats. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 283, n. 2, p. 969-77, Nov 1997a. ISSN 0022-3565 (Print)0022-3565. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

_____. Excitatory amino acid receptors in the basolateral amygdala regulate anxiety responses in the social interaction test. **Brain Res**, v. 764, n. 1-2, p. 262-4, Aug 1 1997b. ISSN 0006-8993 (Print)0006-8993. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SANDERS, S. K.; MORZORATI, S. L.; SHEKHAR, A. Priming of experimental anxiety by repeated subthreshold GABA blockade in the rat amygdala. **Brain Res**, v. 699, n. 2, p. 250-9, Nov 20 1995. ISSN 0006-8993 (Print)0006-8993. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SANDERS, S. K.; SHEKHAR, A. Blockade of GABAA receptors in the region of the anterior basolateral amygdala of rats elicits increases in heart rate and blood pressure. **Brain Res**, v. 567, n. 1, p. 101-10, Dec 13 1991. ISSN 0006-8993 (Print)0006-8993. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SANCHEZ, M. M. et al. Autoradiographic and in situ hybridization localization of corticotropin-releasing factor 1 and 2 receptors in nonhuman primate brain. **J Comp Neurol**, v. 408, n. 3, p. 365-77, Jun 7 1999. ISSN 0021-9967 (Print)0021-9967. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SEASHOLTZ, A. F.; VALVERDE, R. A.; DENVER, R. J. Corticotropin-releasing hormone-binding protein: biochemistry and function from fishes to mammals. **J Endocrinol**, v. 175, n. 1, p. 89-97, Oct 2002. ISSN 0022-0795 (Print)0022-0795. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SHEKHAR, A. et al. The amygdala, panic disorder, and cardiovascular responses. **Ann N Y Acad Sci**, v. 985, p. 308-25, Apr 2003. ISSN 0077-8923 (Print)0077-8923. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

_____. Role of stress, corticotrophin releasing factor (CRF) and amygdala plasticity in chronic anxiety. **Stress**, v. 8, n. 4, p. 209-19, Dec 2005. ISSN 1025-3890 (Print)1025-3890. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1080/10253890500504557> >.

SILBERMAN, Y.; WINDER, D. G. Corticotropin releasing factor and catecholamines enhance glutamatergic neurotransmission in the lateral subdivision of the central amygdala. **Neuropharmacology**, v. 70, p. 316-23, Jul 2013. ISSN 0028-3908. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.02.014> >.

SKORZEWSKA, A. et al. The effect of CRF and alpha-helical CRF((9-41)) on rat fear responses and amino acids release in the central nucleus of the amygdala. **Neuropharmacology**, v. 57, n. 2, p. 148-56, Aug 2009. ISSN 0028-3908. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2009.04.016> >.

_____. The effect of CRF2 receptor antagonists on rat conditioned fear responses and c-Fos and CRF expression in the brain limbic structures. **Behav Brain Res**, v. 221, n. 1, p. 155-65, Aug 1 2011. ISSN 0166-4328. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2011.02.036> >.

SPIGA, F. et al. Injections of urocortin 1 into the basolateral amygdala induce anxiety-like behavior and c-Fos expression in brainstem serotonergic neurons. **Neuroscience**, v. 138, n. 4, p. 1265-76, 2006. ISSN 0306-4522 (Print)0306-4522. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.12.051> >.

STUTZMANN, G. E.; LEDOUX, J. E. GABAergic antagonists block the inhibitory effects of serotonin in the lateral amygdala: a mechanism for modulation of sensory inputs related to fear conditioning. **J Neurosci**, v. 19, n. 11, p. Rc8, Jun 1 1999. ISSN 0270-6474. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

TAKAHASHI, L. K. Role of CRF(1) and CRF(2) receptors in fear and anxiety. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 25, n. 7-8, p. 627-36, Dec 2001. ISSN 0149-7634 (Print)0149-7634. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

TAKAHASHI, L. K. et al. Antagonism of CRF(2) receptors produces anxiolytic behavior in animal models of anxiety. **Brain Res**, v. 902, n. 2, p. 135-42, Jun 1 2001. ISSN 0006-8993 (Print)0006-8993. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

_____. Corticotropin-releasing factor modulates defensive-withdrawal and exploratory behavior in rats. **Behav Neurosci**, v. 103, n. 3, p. 648-54, Jun 1989. ISSN 0735-7044 (Print)0735-7044. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

TAN, H.; ZHONG, P.; YAN, Z. Corticotropin-releasing factor and acute stress prolongs serotonergic regulation of GABA transmission in prefrontal cortical pyramidal neurons. **J Neurosci**, v. 24, n. 21, p. 5000-8, May 26 2004. ISSN 0270-6474. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.0143-04.2004> >.

THOMPSON, R. K. et al. Tonic immobility in Japanese quail can reduce the probability of sustained attack by cats. **Animal Learning & Behavior**, v. 9, n. 1, p. 145-149, 1981. ISSN 0090-4996.

TODOROVIC, C. et al. The role of CRF receptors in anxiety and depression: implications of the novel CRF1 agonist cortagine. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 29, n. 8, p. 1323-33, 2005. ISSN 0149-7634 (Print)0149-7634. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.04.014> >.

TRANSEL, D.; HYMAN, B. T. Neuropsychological correlates of bilateral amygdala damage. **Arch Neurol**, v. 47, n. 3, p. 349-55, Mar 1990. ISSN 0003-9942 (Print)0003-9942. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

TYE, K. M. et al. Amygdala circuitry mediating reversible and bidirectional control of anxiety. **Nature**, v. 471, n. 7338, p. 358-62, Mar 17 2011. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nature09820> >.

UGOLINI, A. et al. CRF1 receptor activation increases the response of neurons in the basolateral nucleus of the amygdala to afferent stimulation. **Front Behav Neurosci**, v. 2, p. 2, 2008. ISSN 1662-5153. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3389/neuro.08.002.2008> >.

URSIN, H.; JELLESTAD, F.; CABRERA, I. G. The amygdala exploration and fear. *In: The Amygdaloid Complex*. (Ed: Ben-Ari). Amsterdam: Elsevier/North-Holland. 317-330, 1981.

VALDEZ, G. R. et al. Human urocortin II: mild locomotor suppressive and delayed anxiolytic-like effects of a novel corticotropin-releasing factor related peptide. **Brain Res**, v. 943, n. 1, p. 142-50, Jul 5 2002. ISSN 0006-8993 (Print)0006-8993. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

_____. Locomotor suppressive and anxiolytic-like effects of urocortin 3, a highly selective type 2 corticotropin-releasing factor agonist. **Brain Res**, v. 980, n. 2, p. 206-12, Aug 8 2003. ISSN 0006-8993 (Print)0006-8993. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

VALE, W. et al. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. **Science**, v. 213, n. 4514, p.

1394-7, Sep 18 1981. ISSN 0036-8075 (Print)0036-8075. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

VAN PETT, K. et al. Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse. **J Comp Neurol**, v. 428, n. 2, p. 191-212, Dec 11 2000. ISSN 0021-9967 (Print)0021-9967. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

VAUGHAN, J. et al. Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor. **Nature**, v. 378, n. 6554, p. 287-92, Nov 16 1995. ISSN 0028-0836 (Print)0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/378287a0> >.

VENIHAKI, M. et al. Urocortin III, a brain neuropeptide of the corticotropin-releasing hormone family: modulation by stress and attenuation of some anxiety-like behaviours. **J Neuroendocrinol**, v. 16, n. 5, p. 411-22, May 2004. ISSN 0953-8194 (Print)0953-8194. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2826.2004.01170.x> >.

VERTES, R. P. Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. **Synapse**, v. 51, n. 1, p. 32-58, Jan 2004. ISSN 0887-4476 (Print)0887-4476. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/syn.10279> >.

VICENTINI, J. E. et al. CRF type 1 receptors of the medial amygdala modulate inhibitory avoidance responses in the elevated T-maze. **Horm Behav**, v. 65, n. 3, p. 195-202, Mar 2014. ISSN 0018-506x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.yhbeh.2014.01.004> >.

VIEIRA, E. B.; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L.; LEITE-PANISSI, C. R. Functional mapping of the periaqueductal gray matter involved in organizing tonic immobility behavior in guinea pigs. **Behav Brain Res**, v. 216, n. 1, p. 94-9, Jan 1 2011. ISSN 0166-4328. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2010.07.013> >.

VITORATOS, N. et al. "Reproductive" corticotropin-releasing hormone. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1092, p. 310-8, Dec 2006. ISSN 0077-8923 (Print)0077-8923. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1196/annals.1365.029> >.

VOLCHAN, E. et al. Is there tonic immobility in humans? Biological evidence from victims of traumatic stress. **Biol Psychol**, v. 88, n. 1, p. 13-9, Sep 2011. ISSN 0301-0511. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsycho.2011.06.002> >.

WEISKRANTZ, L. Behavioural changes associated with ablation of the amygdaloid complex in monkeys. **J Comp Physiol Pharmacol**49: 129–158, 1956.

WIERSMA, A. et al. Corticotropin-releasing hormone modulation of a conditioned stress response in the central amygdala of Roman high (RHA/Verh)-avoidance and low (RLA/Verh)-avoidance rats. **Behavior genetics**, v. 27, n. 6, p. 547-555, 1997. ISSN 0001-8244.

YANG, M. et al. The rat exposure test: a model of mouse defensive behaviors. **Physiol Behav**, v. 81, n. 3, p. 465-73, May 2004. ISSN 0031-9384 (Print)0031-9384. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.02.010> >.

ZOBEL, A. W. et al. Effects of the high-affinity corticotropin-releasing hormone receptor 1 antagonist R121919 in major depression: the first 20 patients treated. **Journal of psychiatric research**, v. 34, n. 3, p. 171-181, 2000. ISSN 0022-3956.

ZORRILLA, E. P. et al. Anxiolytic-like effects of antisauvagine-30 in mice are not mediated by CRF2 receptors. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e63942, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0063942> >.

ZHOU, Y. et al. Drug-induced and genetic alterations in stress-responsive systems: Implications for specific addictive diseases. **Brain Res**, v. 1314, p. 235-252, 2009. Disponível em: < [10.1016/j.brainres.2009.11.015](http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2009.11.015) >.