UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE PSICOLOGIA

Janaína Paola Schwerz

Mapeamento da atividade cerebral de ratos submetidos aos estresses físico, psicológico e misto empregando [^{14}C]-2-Deoxi-Glicose e expressão da proteína Fos

São Paulo
2021

Janaína Paola Schwerz

Mapeamento da atividade cerebral de ratos submetidos aos estresses físico, psicológico e misto empregando [^{14}C]-2-Deoxi-Glicose e expressão da proteína Fos

Versão Corrigida

Dissertação apresentada ao Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo para a obtenção do grau de **Mestre em Ciências**.

Área de concentração: Neurociências e Comportamento

Orientador: Dr. Lanfranco Ranieri Paolo Troncone

São Paulo
2021

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

Catalogação na publicação
Biblioteca Dante Moreira Leite
Instituto de Psicologia da Universidade de São
Paulo Dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Schwerz, Janaína Paola
Mapeamento da atividade cerebral de ratos submetidos aos estresses físico, psicológico e misto empregando [14C]-2-Deoxi-Glicose e expressão da proteína Fos / Janaína Paola Schwerz; orientador Lanfranco Ranieri Paolo Troncone . -- São Paulo, 2021.
61 f.
Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento) -- Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, 2020.

1. Estresse agudo. 2. Modelos animais. 3. Depressão. 4. Mapeamento cerebral. I. Troncone , Lanfranco Ranieri Paolo, orient. II. Título.

Nome: SCHWERZ, Janaína Paola

Título: Mapeamento da atividade cerebral de ratos submetidos aos estresses físico, psicológico e misto empregando [^{14}C]-2-Deoxi-Glicose e expressão da proteína Fos

Dissertação apresentada ao Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo para a obtenção do grau de **Mestre em Ciências**.

Área de concentração: Neurociências e Comportamento

Aprovado em: 07 de dezembro de 2020

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Julgamento _____

Aos meus pais, Rosane e Sergio, que sempre me apoiaram e não mediram esforços para que mais este sonho pudesse se tornar real.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as bênçãos e também por todas as provações, elas me tornaram uma pessoa mais forte.

A minha família, principalmente aos meus pais Rosane e Sergio, meu irmão Jardel e meus nonos Irineu (*in memoriam*) e Helena. Vocês são a base de tudo, e é por vocês que cheguei até aqui. Obrigada pelo amor incondicional, carinho e cuidados. Eu amo vocês!

Ao meu namorado Gabriel, pela paciência, pelo incentivo e pela contribuição na formatação desta dissertação. Te amo!

Ao Dr. Lanfranco Troncone, por ter me acolhido em seu laboratório. Obrigada pela orientação, ensinamentos, pela confiança depositada e pela amizade.

Ao Vitor Cabbia, minha dupla, pela enorme e fundamental ajuda nos experimentos. A "tia" tem uma enorme gratidão por você.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Farmacologia, que são tantos, mas em especial à Adriana de Toledo Ramos, que foi uma mãezona e também fundamental na realização dos protocolos cirúrgicos. Também à Patrícia, Marcelo, Eliza, Karen, Caroline, Alessandra e aos inúmeros alunos de estágio obrigatório que passaram pelo laboratório. Obrigada pela ajuda, companheirismo, conselhos, risadas sem fim e amizade.

À Profa. Dra. Simone Motta, por abrir as portas do seu laboratório para que as análises da imuno-histoquímica fossem novamente realizadas.

Ao Prof. Dr. Luiz Roberto Giorgetti de Britto e ao técnico Adilson, pelos ensinamentos, boas risadas e empréstimo de equipamentos e materiais.

Ao Prof. Dr. Antonio Herbert Lancha Junior, pela colaboração na interpretação dos dados.

Ao Luiz Silva dos Santos, funcionário do setor de métodos quantitativos do Instituto de Psicologia da USP, pelo auxílio com os dados estatísticos.

Aos amigos do "ex-lab" de Santa Maria, que mesmo na distância se fizeram presentes e dispostos a ajudar em todas as dúvidas que surgiram pelo caminho. Também à minha amiga Caroline, que está presente em todas as fases da minha vida. Saudade de todos.

À Fundação Butantan, CAPES, FAPESP e Instituto Butantan pelo apoio financeiro. E ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento pela oportunidade de fazer parte dessa história.

Por fim, agradeço a todas as demais pessoas aqui não citadas que cruzaram pelo meu caminho durante o mestrado. Cada uma deixou marcas e ensinamentos, os quais jamais esquecerei. Aos momentos ruins, aprendizado. Aos momentos bons, gratidão.

RESUMO

SCHWERZ, Janaína Paola. **Mapeamento da atividade cerebral de ratos submetidos aos estresses físico, psicológico e misto empregando [^{14}C]-2-Deoxi-Glicose e expressão da proteína Fos.** 2020. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Psicologia. Universidade de São Paulo, 2020.

Os transtornos psiquiátricos têm sido relacionados a experiências de estresse. Modelos de estresse podem contribuir para o entendimento das bases neurobiológicas da depressão mas apresentam várias limitações. Este trabalho teve como objetivo investigar as bases neurais envolvidas em diferentes categorias de estresse agudo: físico (inalação de vapor de éter), psicológico (contenção) e misto (nado). Para isso, empregamos o mapeamento da atividade cerebral pelo acúmulo do traçador [^{14}C]-2DG e pela transcrição da proteína Fos. Ratos Wistar machos adultos foram implantados permanentemente com cateteres intravenosos 7 dias antes dos protocolos experimentais para [^{14}C]-2DG. Imediatamente antes do estresse, os animais foram injetados por via intravenosa com 50 micro-Ci de [^{14}C]-2DG. Uma hora após a injeção, os animais foram decapitados e os cérebros processados para autorradiografia e densitometria óptica. As regiões de interesse foram identificadas com base no atlas de cérebro de Watson & Paxinos - 6ª Ed. A densitometria óptica empregou o sistema MCID Core 7. Além disso, avaliamos a expressão da proteína Fos a partir da técnica de imuno-histoquímica, com janela temporal de 2 horas após os estresses e também para o procedimento da canulação, em regiões selecionadas do paraventricular do hipotálamo e amígdala. Os resultados mostraram que as áreas envolvidas preferencialmente no controle emocional, como amígdala, áreas corticais límbicas e accumbens, mostraram aumento da captação de glicose no estresse psicológico. Por outro lado, o estresse físico afeta principalmente as áreas do hipocampo. As áreas hipotalâmicas foram estimuladas pelos dois estresses. Surpreendentemente, o estresse misto do nado induziu uma forte diminuição na captação de glicose em todas as áreas do cérebro investigadas. Quanto a análise da proteína Fos, houve um aumento da marcação nas regiões autonômicas PaDC e PaV após estresse físico. Na região PALM, houve um aumento da expressão da proteína Fos no estresse misto. Já na região PaMP, todos os estresses mostram aumento da atividade neural através da expressão da proteína Fos, ressaltando o envolvimento tanto do CRF quanto da AVP na estimulação do eixo HPA. Esses resultados apóiam resultados laboratoriais anteriores, mostrando que existem diferentes padrões de ativação cerebral com diferentes tipos de estresse. Para compreender os efeitos paradoxais do estresse do nado na distribuição cerebral de [^{14}C]-2DG, empreendemos uma investigação adicional sobre a distribuição do marcador no cérebro, fígado e músculo de animais controles e estressados pelo nado. Observamos uma redução na glicemia em decorrência do nado, assim como um acúmulo maior do marcador no fígado. A avaliação dos músculos não foi conclusiva. O maior acúmulo de [^{14}C]-2DG no fígado e a menor glicemia dos animais submetidos ao nado pode explicar a baixa captação do marcador pelo cérebro, devido a sua menor disponibilidade durante o nado, que representa uma atividade física intensa. Essa avaliação nunca foi considerada por outros autores. Os resultados de mapeamento correlacionam-se com estruturas envolvidas no transtorno da depressão maior e o estresse psicológicos podem ter efeito marcante no desenvolvimento desse transtorno.

Palavras-chave: Estresse agudo. Modelos animais. Depressão. Contenção. Nado. Éter.

ABSTRACT

SCHWERZ, Janaína Paola. **Mapping brain activity in rats subjected to physical, psychological and mixed stress using [^{14}C] -2-Deoxy-Glucose and Fos protein expression.** 2020. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Psicologia. Universidade de São Paulo, 2020.

Psychiatric disorders have been linked to stressful experiences. Stress models can contribute to the understanding of the neurobiological bases of depression, but they have several limitations. This work aimed to investigate the neural bases involved in different categories of acute stress: physical (ether inalation), psychological (restraint) and mixed (swimming). For this, we mapped the brain activity by using the [^{14}C]-2DG tracer and the expression of Fos protein. Adult male Wistar rats were permanently implanted with intravenous catheters 7 days before the experimental protocols for [^{14}C]-2DG experiments. Immediately before stress, animals were injected intravenously with 50 micro-Ci of [^{14}C]-2DG. One hour after injection, the animals were decapitated and brains were processed for autoradiography and optical densitometry. The regions of interest were identified based on the Watson & Paxinos - 6th Ed brain atlas. The optical densitometry was performed used MCID Core 7 system. Fos protein expression was mapped by immunohistochemistry, in a time window of 2 hours after stress. An additional control for the surgical procedure of cannulation was performed and selected regions of the paraventricular hypothalamus and amygdala were analised. Results showed that areas related to emotional control, such as amygdala, cortical and limbic areas and accumbens, increased glucose uptake in psychological stress more than in physical stress. On the other hand, physical stress mainly affects areas of the hippocampus. The hypothalamic areas were stimulated equally by both stresses. Surprisingly, swimming stress induced a sharp decrease in glucose uptake in all brain areas investigated. Fos protein expression was increased in the autonomic PVH areas PaDC and PaV after physical stress. Swimming stress caused an increase in Fos protein in PALM sub-region. All stresses stimulated Fos expression in PAMP pointing to the involvement of this structure in both CRF and AVP-mediated responses to stress and HPA axis response. These results support the concept that different stress modalities involve different neural controls and mediators. To understand the paradoxical effects of swimming stress in the regional uptake of [^{14}C]-2DG, we investigated blood glucose levels and the presence of [^{14}C]-2DG in brain, liver and muscles, in control unstressed animals and after swimming stress. We observed a reduction in blood glucose due to swimming, and an increase of the marker in the liver. The evaluation of muscles was not conclusive. Therefore, the lower availability of [^{14}C]-2DG may explain the lower brain uptake of the tracer after swimming which represents an intense physical activity, an issue never considered by other authors. Our results of brain activity mapping strongly correlates to brain areas affected by major depressive disorders and suggests that psychological stresses may have a distinguished effect on the development of depression.

Keywords: Acute stress. Animal model. Depression. Restraint. Ether. Swimming

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - A esquerda, rato implantado com cânula permanente na veia ilíaca e botão de acesso externo. Ao lado, processo de injeção da [^{14}C]-2DG. 24

Figura 2 - A esquerda da figura, cortes seriados corados em Nissl para referência neuroanatômica, e ao lado, foto dos filmes autorradiográficos. 24

Figura 3 - Fotos dos aparatos e realização dos estresses. A: nado; B: contenção; C: inalação de vapor de éter. 27

Figura 4 - Ilustração baseada na tabela 1. Os dados abaixo mostram a porcentagem de variação da captação de [^{14}C]-2DG nas diferentes áreas cerebrais depois dos estresses, em relação ao grupo controle. 31

Figura 5 - À esquerda, imagens em Nissl onde as regiões de interesse são identificadas e delimitadas. À direita, imagem de corte autorradiográfico com filtro de cor, mostrando o carimbo gerado sob essa imagem. Imagem ilustrativa de um animal controle (A e C), contenção (B) e éter (D). As regiões delimitadas são: Cg, PrL, IL, Pir, Cpu, STMA, STMV, STLV 32

Figura 6 - À esquerda, imagens em Nissl onde as regiões de interesse são identificadas e delimitadas. À direita, imagem de corte autorradiográfico com filtro de cor, mostrando o carimbo gerado sob essa imagem. Imagem ilustrativa de um animal controle (A), contenção (B) e éter (B). As regiões delimitadas são CA1, CA2, CA3, GrDG, MoDG, BLA e Ce..... 33

Figura 7 - Efeito do estresse do nado sobre a captação de [^{14}C]-2DG no fígado e cérebro (A) e músculo gastrocnêmio (B). 35

Figura 8 - Glicemia dos animais submetidos ao estresse do nado, n=7 (A) e contenção, n=4-6 (B). 36

Figura 9 – Fotomicrografias representativas das células Fos imunorreativas nos diferentes núcleos do complexo paraventricular do hipotálamo (coluna A), no complexo central da amígdala (coluna B) e no complexo da amígdala basolateral (coluna C). Grupos: controle (linha 1), controle canulado (linha 2), contenção (linha 3), éter (linha 4) e nado (linha 5). Escala: 50µM. 38

Figura 10 - Densidade de células Fos positivas nas diferentes regiões do núcleo paraventricular do hipotálamo (A) e nas regiões da amígdala (B). 39

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AcbC	Núcleo accumbens
ACC	Córtex cingulado anterior
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ATP	Adenosina trifosfato
AVP	Arginina-Vasopressina
BLA	Complexo basolateral da amígdala
[^{14}C]-2DG	[^{14}C]-2-Deoxi-Glicose
CA1	Camada piramidal do hipocampo 1
CA2	Camada piramidal do hipocampo 2
CA3	Camada piramidal do hipocampo 3
Ce	Complexo central da amígdala
Cg	Córtex cingulado áreas 1 e 2
Cpu	Caudato putamen - estriado
CRF	Hormônio Liberador de Corticotrofina
CRF1	Receptor 1 do hormônio liberador de corticotrofina
DMPAG	Substância cinzenta periaquedutal, dorsomedial
DPM	Desintegrações por minuto
FrA	Córtex frontal associativo
FSC	Fluxo sanguíneo cerebral
GLUT	Transportador de glicose
GrDG	Camada granular do giro denteado
HPA	Hipotálamo-hipófise-adrenal
LPAG	Substância cinzenta periaquedutal, lateral
IHQ	Imuno-histoquímica
IL	Córtex infralímbico
IMAO	Inibidor da monoamina oxidase
ISRN	Inibidor seletivo da recaptação de noradrenalina
ISRS	Inibidor seletivo de recaptação de serotonina
ISRSN	Inibibor seletivo de receptação de serotonina e noradrenalina
M1	Córtex motor primário
M2	Córtex motor secundário

MeA	Núcleo medial da amígdala
MoDG	Camada molecular do giro denteado
MPA	Área pré-óptica medial
MRI	Ressonância magnética
OMS	Organização Mundial da Saúde
PaAP	Núcleo paraventricular do hipotálamo, anterior parvocelular
PaDC	Núcleo hipotalâmico paraventricular dorsal
PaLM	Núcleo hipotalâmico magnocelular lateral
PaMP	Núcleo hipotalâmico paraventricular parvocelular medial
PaV	Núcleo paraventricular do hipotálamo, ventral
PET	Tomografia por emissão de pósitrons
Pir	Córtex piriforme
PrL	Córtex pré-limbico
PVC	Policloreto de polivinila
PVH	Núcleo paraventricular do hipotálamo
SGLT	Transportador de glicose dependente de sódio
SNCD	Substância negra compacta dorsal
SNR	Substância negra reticular
SO	Núcleo supra-óptico
STLV	Núcleo leito da estria terminal, lateral ventral
STMA	Núcleo leito da estria terminal, medial anterior
STMV	Núcleo leito da estria terminal, medial ventral
TDM	Transtorno da depressão maior
UCMS	Estresse crônico leve imprevisível
V1b	Receptor 1b de vasopressina
VTA	Área tegmental ventral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 13
1.1 Transtorno da Depressão Maior 13
1.2 Neuroanatomia da depressão 14
1.3 Neuroquímica e mediadores da depressão 15
1.4 Modelos animais de transtornos psiquiátricos 17
1.5 Estresse como modelo 17
2 OBJETIVOS 21
2.1 Objetivo geral 21
2.2 Objetivos específicos 21
3 MATERIAIS E MÉTODOS 22
3.1 Animais: 22
3.2 Divisão dos grupos experimentais: 22
3.3 Mapeamento cerebral do consumo de [^{14}C]-2DG 23
3.4 Expressão imuno-histoquímica da proteína Fos 25
3.5 Protocolos de estresse 26
3.5.1 Nado 26
3.5.2 Inalação de vapor de éter 26
3.5.3 Contenção 27
3.6 Análise da distribuição de [^{14}C]-2DG 27
3.7 Avaliação dos níveis glicêmicos 28
3.8 Análise estatística 28
4 RESULTADOS 29
4.1 Alterações na distribuição cerebral de [^{14}C]-2DG depois do estresse 29
4.1 Distribuição de [^{14}C]-2DG em outros órgãos 34
4.2 Avaliação dos níveis glicêmicos durante os estresses 34
4.3 Análise da expressão da proteína Fos 37
5 DISCUSSÃO 40
6 CONCLUSÕES 49
REFERÊNCIAS 50
ANEXOS 59

1 INTRODUÇÃO

1.1 Transtorno da Depressão Maior

O Transtorno da Depressão Maior (TDM) é um transtorno psiquiátrico de alta complexidade devido ao seu caráter heterogênio, multifacetado e na maioria das vezes crônico. É definido por humor deprimido por mais de duas semanas, acompanhado por sintomas adicionais como desesperança, culpabilização, alterações no sono e apetite e anedonia (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 1994). É uma das principais causas de morbidade em todo o mundo, com risco recorrente de perda de vida, devido a ideação suicida (NESTLER et al., 2002; HAENISCH; BÖNISCH, 2011). Em 2010, o TDM ficou em segundo lugar como a principal causa de incapacidade induzida por doença, sendo que o paciente passa 8,2% do total de anos vividos com esse transtorno. Recentemente a Organização Mundial da Saúde (OMS) previu que até 2030 o TDM será a principal causa de incapacidade do mundo (CZÉH et al., 2016).

O TDM acomete todos os gêneros, idades e origens; jovens, idosos e mulheres são mais suscetíveis (WILLIAMS et al., 2007; SEEDAT et al., 2009). Tornou-se uma preocupação de saúde pública devido ao grande gasto com o tratamento e utilização dos serviços públicos, bem como a significativa perda funcional de seus acometidos. Dados de outros países mostram que os custos econômicos causados pela doença, nos Estados Unidos da América, são de cerca de 83 bilhões de dólares, e na Europa esse valor chega a 118 bilhões de euros (SOBOCKI et al., 2006; DONOHUE; PINCUS, 2007).

A ideia de que o TDM seja o resultado de uma complexa interação entre fatores genéticos, epigenéticos, sociais e comportamentais é amplamente aceita, mas sua etiologia e fisiopatologia ainda são pouco conhecidas; estratégias eficazes de prevenção e tratamento da depressão se fazem urgentemente necessárias, uma vez que a farmacoterapia disponível para tratar esses transtornos é limitada e insuficiente em relação à eficácia, tolerância e taxa de remissão dos sintomas (LESCH, 2004; BAO; MEYNEN; SWAAB, 2008; HAENISCH; BÖNISCH, 2011).

1.2 Neuroanatomia da depressão

Estudos de imageamento cerebral através do uso da ressonância magnética (MRI) ou tomografia por emissão de pósitrons (PET), tem sido largamente empregados em pacientes com TDM, para tentar compreender esta patologia. Tais estudos podem ser morfométricos ou funcionais e são efetuados em condição de repouso ou sob desafio. Nos estudos funcionais são avaliados o fluxo sanguíneo regional e a captação de glicose marcada com radioisótopo, oferecendo um mapeamento de áreas cerebrais sob ativação ou inibição (QIU; LI, 2018).

No entanto, para o estudo desta patologia em modelos animais, o uso de PET e MRI são dificultados devido ao alto custo dos equipamentos e sua instalação. Alternativamente ao PET que utiliza a fluorodeoxiglicose para avaliar as regiões cerebrais mais ativas sob determinadas condições, emprega-se o método da [^{14}C]-2-Deoxi-Glicose ([^{14}C]-2DG). O uso de um análogo da glicose, marcado com isótopo radioativo que também permeia a barreira hematoencefálica, [^{14}C]-2DG, permite a identificação das áreas que mais consumiram glicose refletindo o grau de atividade dessas regiões (SOKOLOFF et al., 1977). Diferentemente da glicose, que no final se converte basicamente em dióxido de carbono e água, a [^{14}C]-2DG também sofre metabolização nos tecidos, sendo fosforilada pela hexoquinase a [^{14}C]-desoxiglicose-6-fosfato (SOLS; CRANE, 1954), que permanece ligada aos tecidos permitindo seu mapeamento (SOKOLOFF et al., 1977).

Os amplos sintomas clínicos do TDM implicam no envolvimento de diversos sistemas cerebrais, como os que regulam o humor, ansiedade, medo, recompensa, atenção, motivação, resposta ao estresse, interação social e funções neurovegetativas (PRICE; DREVETS, 2012), sugerindo a participação de diversas áreas cerebrais. Acredita-se que o circuito límbico-cortical-estriado-pálido-talâmico, que se conecta ao hipocampo, amígdala, núcleo caudado putâmen e córtex frontal seja o circuito chave na depressão (NESTLER et al., 2002; PRICE; DREVETS, 2012; JEON; KIM, 2016).

Estudos relatam anormalidades estruturais em várias regiões do cérebro de pacientes depressivos principalmente no hipocampo, giro cingulado, amígdala e córtex pré-frontal.

O hipocampo é uma das estruturas cerebrais que mais tem sido estudadas. Está associado à memória de curto prazo, declarativa e contextual, bem como ao aprendizado espacial, além de regular negativamente o eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HPA) (JACOBSON; SAPOLSKY, 1991). Nota-se atrofia e redução de seu volume depois de exposições ao estresse crônico e depressão (BREMNER et al., 2000; COLLA et al., 2007).

O córtex pré-frontal, outra região que tem se destacado nos estudos de imagem, faz conexões com inúmeras outras regiões, como o hipocampo, gânglios da base, tálamo, área tegmental ventral (VTA), dentre outras, que estão intimamente associadas a fisiopatologia da depressão (MURRAY; WISE; DREVETS, 2011).

O giro cingulado, outra região percentence ao córtex, está envolvido na modulação do aprendizado e dos processos emocionais. Lesões no giro cingulado podem afetar os processos cognitivos e a capacidade de processar emoções (CHEN et al., 2017). Um estudo anterior relatou que alterações estruturais nas regiões cerebrais associadas ao córtex cingulado anterior (ACC) estão relacionadas ao comportamento suicida em pacientes com depressão (HEERINGEN; BIJTTEBIER; GODFRIN, 2011).

A amígdala, região conhecida por ser responsável por atribuir importância emocional/afetiva a estímulos positivos ou negativos, está associada às ações farmacológicas dos tratamentos antidepressivos. O fluxo sanguíneo cerebral (FSC) em repouso e metabolismo de glicose têm se mostrado consistentemente elevados em pacientes com subtipos primários de distúrbios de humor, incluindo o transtorno depressivo familial puro e transtorno bipolar não-psicótico (ver CARLSON et al., 2006).

Outros sistemas também tem sido bastante relacionados a depressão, dentre eles o sistema dopaminérgico mesolímbico, que parece estar envolvido em mecanismos de motivação e recompensa, tudo isso relacionado à VTA e núcleo accumbens (AcbC) (NESTLER; CARLEZON, 2006). Também, acredita-se que o hipotálamo, parte do eixo HPA conhecido como “eixo do estresse”, esteja significativamente associado aos sintomas da depressão, incluindo insônia, perda de apetite e perda de desejos sexuais (JEON; KIM, 2016).

1.3 Neuroquímica e mediadores da depressão

Dentre os diversos mediadores, mecanismos e sistemas propostos como importantes no TDM podem ser citados o desequilíbrio da transmissão monoaminérgica (SIEVER; DAVIS, 1985), receptores beta-adrenérgicos (FRAZER et al., 1982; TRONCONE; TUFIK, 1991), receptores alfa-2 adrenérgicos (GARCÍA-SEVILLA et al., 1999; NEUMEISTER et al., 2006), receptores alfa-1 adrenérgicos (STONE et al., 2007; GOLD; MACHADO-VIEIRA; PAVLATOU, 2015) os sistemas dopaminérgicos (BROWN et al., 1993; CABIB; PUGLISI-ALLEGRA, 1996), eixo HPA e corticosteróides (ASNIS et al., 1985; THOERINGER et al., 2007), citocinas (HAYLEY et al., 2005), neurotrofinas (DUMAN; MONTEGGIA, 2006), atrofia neuronal (MCEWEN, 2005), neurogênese (SANTARELLI et al., 2003), mais

recentemente mudanças na microbiota intestinal (MAYER et al., 2014) e mecanismos inflamatórios (ROSENBLAT et al., 2014).

Ao longo das últimas cinco décadas, o estudo do sistema monoaminérgico no cérebro contribuiu significativamente para o conhecimento da fisiopatologia e tratamento da depressão (CHARNEY, 1998). De acordo com a teoria monoaminérgica, a depressão pode ser atribuída a um desbalanço ou deficiência de monoaminas e neurotransmissores como a serotonina, noradrenalina e dopamina (JEON; KIM, 2016). Essa hipótese contribuiu para o desenvolvimento de um grande número de diferentes classes de antidepressivos, incluindo os tricíclicos, os inibidores da enzima monoamina oxidase (IMAO), os inibidores seletivos de recaptação serotonina (ISRSs), os inibidores seletivos da recaptação de noradrenalina (ISRNs), e os combinados, como os inibidores seletivos da recaptação de noradrenalina e serotonina (ISRSNs) (HIRSCHFELD, 2000; GAO; BAO, 2011; HAENISCH; BÖNISCH, 2011). Entretanto, antidepressivos que têm como alvo o sistema monoaminérgico, fazem efeito apenas em alguns pacientes. Além disso, existe uma grande discrepância entre as ações farmacológicas e bioquímicas dos antidepressivos (poucos minutos) e a alteração clínica esperada que pode levar de 2 a 4 semanas (LEONARD, 2007). Essa diferença tem sido explicada pela existência de mecanismos neurais adaptativos. Devido a este tempo de latência, pacientes deprimidos correm grande risco de suicídio.

Além dos antidepressivos com alvo aminérgico, outros mecanismos e alvos foram explorados. A Agomelatina, um agonista dos receptores de melatonina tem sido utilizado como tratamento do TDM. Esse antidepressivo parece não apresentar tantos efeitos colaterais como por exemplo a síndrome serotoninérgica e síndrome de descontinuação (POMPILI et al., 2013). Mais recentemente, a Cetamina, um antagonista não competitivo dos receptores NMDA de glutamato, têm sido proposto como antidepressivo por apresentar vantagens nunca antes observadas, como a indução de uma resposta rápida e eficiente em uma única dose subanestésica (ZARATE et al., 2006).

Humor deprimido, um dos principais sintomas do TDM, pode ser induzido experimentalmente pela redução da disponibilidade de serotonina apenas em um subgrupo de humanos particularmente vulneráveis. Este resultado questiona a relação direta entre as mudanças no sistema monoaminérgico e a ocorrência de depressão (RUHÉ; MASON; SCHENE, 2007; COWEN, 2008), sugerindo que as monoaminas exerçam apenas uma influência modulatória na sintomatologia da depressão.

1.4 Modelos animais de transtornos psiquiátricos

As ferramentas diagnósticas para depressão e ansiedade são baseadas essencialmente na observação comportamental, nas relações interpessoais e na expressão verbal reportada pelo paciente. Nenhuma destas estratégias pode ser avaliadas em animais, tornando difícil a obtenção de modelos laboratoriais para doenças psiquiátricas. Assim, Haenisch e Bonisch em extensa revisão da literatura sobre depressão e antidepressivos, publicada em 2011, apontam que o principal sintoma da depressão, a ideação suicida, não pode ser monitorada em animais e, portanto, modelos animais para doenças psiquiátricas seguem critérios reducionistas (HAENISCH; BÖNISCH, 2011). Um bom modelo animal deve seguir três critérios: isomorfismo, reprodução de sintomas apresentados na doença humana; validade preditiva, as drogas ativas na doença humana também causam melhoras nos parâmetros comportamentais do modelo; e finalmente, o modelo animal deve envolver as mesmas estruturas neurais, à semelhança com as bases neurobiológicas da disfunção humana. Como apontam os autores, no entanto, o conhecimento das bases neurobiológicas da doença depressiva ou ansiedade ainda são muito limitadas, tornando difíceis as correlações entre modelos animais e o distúrbio humano.

Para o estudo do TDM, os modelos animais podem ser divididos em duas grandes categorias: a primeira em que uma linhagem ou uma manipulação (lesão) predispõe os animais a estados depressivos, e a segunda em que o animal é submetido a alguma forma de perturbação ou estresse levando-o a estados depressivos. Por esta segunda, considerada mais natural, listam-se os modelos de estresses como a contenção, desamparo aprendido, estresse crônico leve imprevisível (do inglês chronic unpredictable mild stress - UCMS), o modelo residente-intruso, separação maternal, isolamento, entre outras formas de estresse social. No caso de humanos, o estresse crônico parece desempenhar um papel central no desenvolvimento da doença, principalmente a perda ou medo da perda de *status* social, validando ainda mais os modelos animais de estresse social (DE KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005; BALE, 2006; HAENISCH; BÖNISCH, 2011).

1.5 Estresse como modelo

A experiência do estresse é de comum ocorrência a todos os seres vivos, sendo que nos mamíferos, a resposta ao estresse é fruto de uma reação integrada, fisiológica e psicológica, à adversidade real ou percebida. Uma das principais alterações fisiológicas em resposta ao estresse é a liberação de glicocorticoides (cortisol em humanos e corticosterona em outros mamíferos), pelas glândulas suprarrenais, que agem redistribuindo recursos de

energia para otimizar a sobrevivência e manutenção da homeostase do organismo frente ao agente estressor (HERMAN; CULLINAN, 1997; MYERS; MCKLVEEN; HERMAN, 2012).

O eixo HPA é o responsável pelo controle da secreção de glicocorticoides, e o seu controle central é regulado por uma população selecionada de neurossecretores no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVH). Ao serem estimulados pelo estresse, esses neurônios produzem e liberam tanto o hormônio liberador de corticotrofina (CRF) quanto arginina-vasopressina (AVP) na circulação portal hipofisária. Ambos peptídeos estimulam a síntese e secreção de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) do hipotálamo anterior para a circulação sistêmica. Isso faz com que ocorra a síntese e secreção de glicocorticoides pelo córtex da adrenal (PACAK et al., 1990; NESTLER et al., 2002).

As aferências neuronais aminérgicas no PVH originam-se principalmente de grupos de células do tronco cerebral inferior, na medula ventrolateral (grupos de células A1/C1), ao redor e dentro do núcleo do trato solitário (grupos de células A2/C2) e no *locus coeruleus* (grupo de células A6) (PALKOVITS et al., 1980; SWANSON et al., 1981; SAWCHENKO; SWANSON, 1982). Os eferentes neuronais do PVH se projetam diretamente para o tronco cerebral inferior, coluna celular intermediolateral da medula espinhal (que contém os neurônios simpáticos pré-ganglionares), eminência média eferentes da subdivisão parvocelular do PVH, e a neuro-hipófise vindo da subdivisão magnocelular do PVH (PACAK et al., 1992).

A porção parvocelular do PVH é inervada principalmente a partir de grupos de células A2/C2. A divisão parvocelular também contém terminais noradrenérgicos e adrenérgicos nas células reativas ao CRF, sugerindo um papel das catecolaminas na regulação das respostas hipófise-adrenocorticais (LIPOSITS; PHELIX; PAULL, 1986; PLOTSKY, 1987).

Existem mecanismos que limitam a magnitude e a duração da secreção de glicocorticoides, como o ciclo circadiano da secreção dos mesmos, controlado pelo núcleo supra-óptico (SO) e influenciado pela AVP, assim como o mecanismo de “feedback” negativo dos glicocorticoides, através do qual a liberação de ACTH é inibida. O “feedback” negativo pode ser dividido em: (a) rápido ou não-genômico – sensível a taxa de glicocorticoide secretado e (b) tardio – sensível aos níveis de glicocorticoides envolvendo ações genômicas. Este último processo pode ser subdividido em intermediário e tardio, uma vez que, com o aumento da duração do estresse, ocorre também um prolongamento das mudanças no conteúdo de pró-opiomelanocortina (peptídio precursor do ACTH) e ACTH. Assim, os glicocorticoides parecem modular o eixo HPA por múltiplos mecanismos de retroalimentação (KELLER-WOOD; DALLMAN, 1984).

É importante ressaltar que o eixo HPA é suscetível a regulações independentes de glicocorticoides. Por exemplo, o hipocampo, a amígdala e o córtex pré-frontal estão envolvidos na regulação do eixo HPA, onde hipocampo e córtex pré-frontal exercem papel inibitório e a amígdala excitatório (HERMAN; CULLINAN, 1997). O PVH é ricamente inervado por neurônios GABA-érgicos de múltiplas regiões do cérebro, incluindo o núcleo leito da estria terminal, área pré-óptica medial, hipotálamo dorsomedial, hipotálamo lateral e neurônios dispersos pelas imediações do PVH (CULLINAN; HERMAN; WATSON, 1993; ROLAND; SAWCHENKO, 1993).

Alguns autores sugerem que o estresse pode ser categorizado como físico/sistêmico, que afeta a homeostase do indivíduo (hemorragia ou infecção), ou psicológico/processivo, onde há envolvimento cortical e tomada de decisão, luta ou fuga (conflito social, estímulos aversivos...) (HAENISCH; BÖNISCH, 2011). A categorização tem sido baseada no padrão de ativação de áreas cerebrais a partir da transcrição do gene c-Fos em algumas áreas específicas do cérebro, como a amígdala e o PVH. De acordo com esses parâmetros, os autores classificam o nado forçado e a contenção na categoria de estresse psicológico, e a inalação de vapor de éter como estressor físico. Apontam-se controvérsias quanto a categorização do nado forçado, por isso, poderia ser acomodada em uma categoria intermediária, que em nosso laboratório foi denominada por estresse misto (PACAK et al., 1990; HERMAN; CULLINAN, 1997; SAWCHENKO; LI; ERICSSON, 2000; PACÁK; PALKOVITS, 2001; RAMOS; TRONCONE; TUFIK, 2007).

Tendo em mente que o estresse tem profundas inter-relações com a indução/desencadeamento de episódios de depressão devido a uma desregulação do eixo HPA, e que a resposta ao estresse compartilha muitos mediadores, circuitarias e fenomenologias com a depressão, nosso laboratório envolveu-se anteriormente a este trabalho, no estudo de três fármacos experimentais desenvolvidos como potenciais antidepressivos ou ansiolíticos, pela Pfizer e Sanofi-Aventis Pharma. São elas: a CP154,526 (Pfizer) antagonista do receptor 1 do hormônio liberador de corticotrofina (CRF1), o SSR125543 (Sanofi-Aventis), também antagonista desse receptor, e o SSR149415 (Sanofi-Aventis), antagonista do receptor V1b da vasopressina. Todos esses fármacos mostravam-se ativos em modelos animais de depressão empregados pelos fabricantes. Assim, os estudos deste laboratório avaliaram a capacidade destes em bloquear a resposta de secreção de ACTH em três modelos de estresse.

Esses trabalhos mostraram pela primeira vez que a supressão da secreção do ACTH por uma ou outra classe de antagonistas depende da natureza do estresse envolvido, de tal

forma que apenas o uso concomitante de ambos os antagonistas leva a uma supressão total da resposta hipotalâmica ao estresse (RAMOS; TRONCONE; TUFIK, 2007). Este procedimento foi, então, empregado para avaliar se a supressão total da resposta hipotalâmica poderia ter um efeito antidepressivo maior que o obtido com os fármacos individuais. Os resultados não mostraram um aumento da ação antidepressiva sugerindo que esta não tem relação direta com os circuitos controladores da secreção hipotalâmica/pituitária de ACTH em resposta a estresses, reforçando a hipótese de que estas drogas agem em substratos neurais extra-hipotalâmicos para exercer efeitos antidepressivos ou ainda, que circuitos neurais que empregam AVP ou CRF podem influenciar estados de humor controlados por outras estruturas cerebrais (RAMOS et al., 2014).

A fim de aprofundarmos o conhecimento sobre as bases neurais responsáveis por essa distinção na resposta a diferentes agentes estressores, neste trabalho, mapeamos a atividade cerebral em ratos submetidos a estressores de natureza física, psicológica e mista. O mapeamento da atividade cerebral por [^{14}C]-2DG reflete a atividade regional em uma janela temporal imediatamente seguinte a injeção do traçador. Já o mapeamento da proteína Fos mostra a ativação cerebral induzida por estímulo em uma janela de duas horas após o estímulo ou manipulação. Em outro estudo, nosso laboratório mapeou a atividade da enzima metabólica citocromo-oxidase, que reflete os efeitos de estresses prolongados, com duração de dias a semanas (HOMEM, 2017).

Segundo Czéh et al. (2016), o aumento contínuo da incidência da depressão que tem sido documentado todos os anos desde o início do século XX, pode não ser explicado pela disseminação de fatores genéticos e epigenéticos de suscetibilidade. Pelo contrário, sugere-se que este aumento seja causado pelas inúmeras mudanças drásticas de cunho socioeconômico nesse período, que são potentes estressores. Por esse motivo, os modelos animais baseados em estressores ambientais ou sociais permanecerão altamente relevantes na pesquisa. Assim, a partir da caracterização e da identificação das bases neurais dos diferentes tipos de estresses, será possível modelar subconjuntos diferentes de pacientes, e traçar correlações neurais entre o estresse e o TDM. Eventualmente será possível fornecer alvos potenciais para novos tratamentos da doença. Com o conhecimento dessas bases neurais será ainda possível desenvolver melhores modelos animais para o teste de novos antidepressivos, fornecendo importante subsídio ao desenvolvimento desses fármacos tão necessários.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo consistiu em investigar as bases neurais envolvidas em diferentes tipos de estresse: físico, psicológico e misto, através de diferentes janelas temporais, e relacioná-las com estruturas envolvidas no TDM, contribuindo para a compreensão dos papéis das estruturas cerebrais na gênese da doença.

2.2 Objetivos específicos

- Investigar as áreas cerebrais que apresentam alteração na taxa metabólica após exposição dos animais aos três estresses propostos, empregando autorradiografia do consumo de 2-deoxi-D-glicose marcada ([^{14}C]-2DG), que mapeia as áreas cerebrais dentro de uma janela temporal de até vinte minutos.

- Mapear a expressão da proteína Fos, que reflete a atividade neuronal regional em uma janela temporal de duas horas, como consequência da ativação da transcrição gênica/proteica.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais:

Ratos Wistar machos, pesando entre 250g a 300g (±2 meses de idade) foram fornecidos pelo biotério central do Instituto Butantan e mantidos no biotério do Laboratório de Farmacologia. Os animais receberam comida e água à vontade, em sala com temperatura e umidade controladas (22ºC±2ºC, 55%±10% UR) e ciclo claro/escuro de 12 horas, com luz das 7:00 às 19:00 horas. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (protocolo CEUAIB 13/1175 novo 6398181018).

3.2 Divisão dos grupos experimentais:

Foram feitos os seguintes grupos de animais com n de 4 a 6 ratos:

- Controle sem estresse para mapeamento de proteína Fos;
- Controle canulado e sem estresse para mapeamento de proteína Fos;
- Controle canulado e sem estresse para mapeamento por [^{14}C]-2DG;
- Experimental contenção para mapeamento de proteína Fos;
- Experimental éter para mapeamento de proteína Fos;
- Experimental nado forçado para mapeamento de proteína Fos;
- Experimental contenção canulado para mapeamento por [^{14}C]-2DG;
- Experimental nado forçado canulado para mapeamento por [^{14}C]-2DG;
- Experimental éter canulado para mapeamento por [^{14}C]-2DG;

Os animais que passaram por cirurgia de canulação da veia ilíaca (animais em que foi necessário um acesso venoso, utilizados no protocolo do mapeamento por [^{14}C]-2DG) foram mantidos em caixas de polipropileno individuais. Um grupo de animais foi implantado com cânulas da mesma forma, mantidos em caixas individuais, mas não foram injetados com traçador pois foram utilizados no estudo de expressão da proteína Fos, a título de controle canulado. Os animais que não passaram pelo procedimento cirúrgico (animais utilizados para mapeamento de proteína Fos) foram mantidos em caixas de 4 animais cada.

Durante todo este trabalho, foram utilizados aproximadamente 80 animais.

3.3 Mapeamento cerebral do consumo de [^{14}C]-2DG

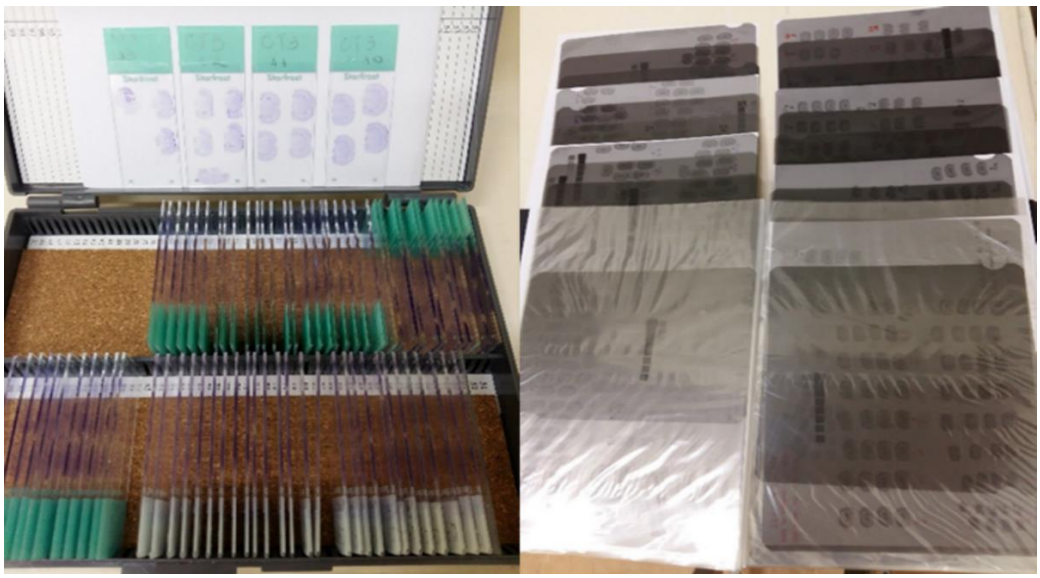
Para os estudos de mapeamento cerebral de consumo de [^{14}C]-2DG foram empregados protocolos qualitativos descritos por Sokoloff (SOKOLOFF, 1981, 2008; SOKOLOFF et al., 1977). Os ratos foram inicialmente submetidos a uma cirurgia de implantação permanente de catéteres da Instech (USA) na veia ilíaca. Para isso, os animais foram anestesiados com isoflurano (BioChimico®) e oxigênio medicinal até atingir um plano cirúrgico. Foi realizado um corte na região da virilha e outro inter-escapular. Isolou-se a veia ilíaca e introduziu-se a cânula na veia. A cânula foi fixada por sutura e conduzida pelo sub-cutâneo até a região cervical inter-escapular, onde foi conectada a um conector Instech com acesso venoso e fixada por sutura. A cânula foi lavada diariamente com heparina (1:100) em solução fisiológica 0,9% para manutenção da mesma. Durante os 3 primeiros dias pós cirúrgicos, foi administrado 1 gota de ibuprofeno (TEUTO 50 mg/mL) diluído na água de beber, para cada 250 mL de água. Os animais permaneceram 7 dias em recuperação antes de serem submetidos aos experimentos. Os animais submetidos aos protocolos de estresse, que serão descritos abaixo, foram injetados com uma alíquota de 50 micro-Ci de [^{14}C]-2DG (American Radiolabeled Chemicals Inc., St Louis-Mo) junto com solução fisiológica 0,9% pela cânula imediatamente antes do estresse, ou mantidos nas caixas de residência por 60 minutos (controles), em seguida, foram decapitados por guilhotina para remoção do cérebro. O cérebro foi lavado em salina gelada, congelado rapidamente em gelo seco e armazenado em freezer -80°C. Posteriormente, o cérebro inteiro foi cortado em criostato (Leica CM1850) (-18°C +/- 2°C) em cortes coronais de 20 micrômetros. Os cortes foram coletados a um intervalo de 6 cortes (120 micrômetros), coletando o 7º corte para uma lâmina que foi exposta ao filme autorradiográfico e o 8º corte em uma lâmina que foi corada com Nissl (cresil violeta) para identificação neuroanatômica. Os cortes montados em lâminas foram imediatamente secos em chapa aquecida a 60º C por 5 minutos, dispostos em cassetes radiográficos e expostos a filme radiográfico (Carestream, BIOMAX MR Filme, USA) por um período de 23 dias juntamente com os padrões de calibração (alcance: 0.0 – 35.0 µCi/g, Carbono-14, American Radiolabeled Chemicals Inc., St Louis-Mo). Após revelação dos filmes com revelador e fixador comercial Kodak®, as imagens das autorradiografias e Nissl foram capturadas utilizando-se o aparato Northern Lights contendo um transluminador + câmera. A densitometria óptica digital foi realizada empregando-se o sistema MCID 7.0 - Ontario-CA e computado seguindo procedimento similar ao descrito por Troncone et al. (2011), que mede a densidade óptica das regiões de interesse (ROI). O valor da densidade óptica da amostra é plotado contra a curva-padrão de cada filme, obtida a partir da densidade óptica produzida pelos padrões e o valor

equivalente em nCi é tomado como valor amostral. As regiões foram delimitadas baseando-se no atlas de cérebro de rato de Watson e Paxinos 6ª edição (ver figuras 5 e 6). As áreas foram escolhidas levando em consideração as áreas supostamente afetadas pelo estresse e depressão, já descritas na literatura.

Figura 1 - A esquerda, rato implantado com cânula permanente na veia ilíaca e botão de acesso externo. Ao lado, processo de injeção da [^{14}C]-2DG.

Fonte: Arquivo pessoal

Figura 2 - A esquerda da figura, cortes seriados corados em Nissl para referência neuroanatômica, e ao lado, foto dos filmes autorradiográficos.



Fonte: Arquivo pessoal

3.4 Expressão imuno-histoquímica da proteína Fos

A imuno-histoquímica (IHQ) foi realizada usando o protocolo convencional de imunoperoxidase free-floating. Duas horas após o término do estresse, os animais foram anestesiados com anestésico volátil isoflurano e oxigênio medicinal e perfundidos transcardialmente com solução salina tamponada 0,9%, por 10 minutos, seguida de formaldeído 4% em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4), a 4°C, a um fluxo de 18 ml/min por 20 minutos. Após a perfusão, o encéfalo foi removido e colocado na mesma solução fixadora anterior pelo período de 4 horas. Depois, o encéfalo foi trocado de solução, ficando em sacarose 30%, em geladeira, por no mínimo 48 horas para crioproteção. Posteriormente o cérebro foi cortado em micrótomo de congelamento (Leica SM2000R) a uma espessura de 30µM ao longo do plano coronal, a intervalo de 6 cortes (150 µM) e, então, armazenados a -20°C em tampão anti-freeze. Para realização da técnica de IHQ, os cortes foram lavados em tampão fosfato de potássio (KPBS) 0,02M e em seguida, incubados em anticorpo primário anti-Fos produzido em coelho (Calbiochem, 1:20.000) diluído em Triton X-100 0,3% contendo 2% de soro normal de cabra, pelo período aproximado de 72 horas, em geladeira (4°C) sob agitação. Depois de 6 lavagens de 5 minutos com KPBS 0,02M, os cortes foram incubados em anticorpo secundário biotinilado anti-coelho produzido em cabra (Vector 1:200), por 90 minutos em temperatura ambiente, sob agitação. Nova sequência de lavagens foi realizada com posterior incubação em complexo avidina-biotina-peroxidase (Kit ABC, Vectastein Elite – Vector 1:200) pelo período de 90 minutos em temperatura ambiente sob agitação. Uma nova sequência de lavagens antecedeu a exposição dos cortes ao cromógeno da reação. Os cortes foram incubados em uma solução contendo 50mg de 3,3'-Diaminobenzidina tetrahidrocloreto hidrato (Sigma), 2 mL de solução aquosa de sulfato de níquel a 10% (intensificador de cor) além 40 mg de cloreto de amônio, 0,6 mg de glicose oxidase (enzima da reação) em 100 mL de tampão fosfato de sódio 0,1M, por 5 minutos. Depois disso 2 mL de uma solução aquosa de β-D glicose (Sigma) 10% foi adicionada (substrato) para ocorrer a reação, que levou cerca de 40 minutos. Os cortes foram lavados em KPBS para interromper a reação, montados em lâminas gelatinizadas, secos, desidratados em sequência de álcoois seguida por xilol, e as lâminas foram cobertas com lamínula e Entellan. Cada seção de tecido contendo as áreas de interesse foi fotografada usando um microscópio (Nikon Eclipse E800), com objetiva de 10x de aumento, acoplado a uma câmera digital (Nikon D5-Fi1). As fotos foram capturadas contendo uma escala de 50 µm. A análise das imagens foi realizada por meio do software Image J (NIH, EUA). A região de interesse foi delimitada manualmente com base no atlas de cérebro de rato de Watson e Paxinos 6ª edição

e, atráves da calibração do software a partir da escala da foto, a área foi medida em µm² e depois convertida em mm^2. Os núcleos das células, na região delimitada, que puderam ser claramente distinguidos do fundo foram contados e foi feita a densidade dividindo-se o número de núcleos contados pela área da região delimitada. As regiões cerebrais analisadas foram: núcleo hipotalâmico paraventricular dorsal (PaDC), núcleo hipotalâmico magnocelular lateral (PaLM), núcleo hipotalâmico paraventricular parvocelular medial (PaMP), núcleo hipotalâmico paraventricular ventral (PaV) e duas regiões da amígdala: complexo central da amígdala (Ce) e complexo basolateral da amígdala (BLA) (figura 9).

3.5 Protocolos de estresse

Os protocolos de estresses do nado, inalação de vapor de éter e contenção foram idênticos aos empregados em estudos anteriores em nosso laboratório (RAMOS; TRONCONE; TUFIK, 2007; RAMOS et al., 2014).

Todos os protocolos de estresse foram realizados no mesmo turno, entre as 09:00–14:00 horas.

3.5.1 Nado

Para o estresse do nado foi empregado o aparato composto por 4 cilindros verticais de acrílico (60 cm de altura e 30 cm de diâmetro), contendo 40 cm de água à temperatura ambiente, em torno de 21ºC (figura 3A). Os ratos implantados com cânulas para mapeamento por [^{14}C]-2DG foram injetados com o marcador e imediatamente colocados nos cilindros e mantido por 5 minutos, retirados e enxugados em toalhas e colocados de volta nas caixas de manutenção. Animais para mapeamento da proteína Fos foram tratados da mesma maneira, mas sem implantação da cânula e administração de [^{14}C]-2DG. Após o período de uma hora do início do estresse, para protocolo de mapeamento por [^{14}C]-2DG, ou duas horas do fim do estresse para protocolo de IHQ para Fos, os animais foram eutanasiados conforme protocolos descritos acima.

3.5.2 Inalação de vapor de éter

O estresse de inalação de vapor de éter, que mencionaremos como “éter”, foi realizado colocando-se o rato em um dessecador, contendo um chumaço de algodão/gaze embebido em éter etílico P.A. (Anidrol®) isolado do animal por um anteparo cerâmico (figura 3C). A exposição durou até o animal apresentar sinais de sedação, que ocorreu de 1 a 3 minutos.

Depois disso, os animais voltaram para suas caixas de manutenção e lá foram mantidos pelo período de uma hora, para protocolo de mapeamento por [^{14}C]-2DG, ou 2 horas do fim do estresse para protocolo de IHQ para Fos. Os animais foram eutanasiados conforme descrito acima.

3.5.3 Contenção

O estresse de contenção consistiu em manter o rato em um tubo de PVC ventilado pelo período de uma hora (figura 3B). Assim, os ratos implantados com cânulas, como descrito acima, foram injetados com [^{14}C]-2DG e introduzidos nos tubos de contenção pelo período de uma hora, após, foram removidos e decapitados imediatamente e foi seguido protocolo descrito anteriormente para mapeamento cerebral pelo consumo de [^{14}C]-2DG. Já os animais que foram utilizados para IHQ para Fos, também ficaram dentro do tubo pelo período de uma hora, retirados e devolvidos à caixa de manutenção por mais 2 horas. Após esse período os animais foram eutanasiados e processados para mapeamento por IHQ contra proteína Fos, como descrito acima.

Figura 3 - Fotos dos aparatos e realização dos estresses. A: nado; B: contenção; C: inalação de vapor de éter.

Fonte: Arquivo pessoal

3.6 Análise da distribuição de [^{14}C]-2DG

Este protocolo, bem como o protocolo descrito posteriormente (3.7), foram realizados em apenas alguns grupos experimentais selecionados, com o intuito de tornar a discussão dos resultados obtidos possível. A fim de detectar a localização do marcador radioativo ^{14}C, o grupo experimental do estresse nado e o controle passaram pelo protocolo anteriormente descrito no mapeamento cerebral de consumo de [^{14}C]-2DG. Uma hora após a injeção de

[^{14}C]-2DG, os animais foram decapitados e o cérebro, fígado e músculo gastrocnêmio foram coletados. Esses tecidos foram pesados inteiros. Um hemisfério do cérebro (esquerdo), um fragmento do fígado e o gastrocnêmio (direito) foram utilizados na contagem de ^{14}C. Para isso, os tecidos foram homogeineizados com água destilada (10mL) em Ultra-turrax pelo tempo aproximado de 2 minutos. Desse homogenato, 1mL foi transferido para um frasco de cintilação contendo 10 mL de líquido de cintilação (EcoLume^{TM}). Esse material foi então colocado no contador de cintilações beta Beckman Coulter LS6500, e a quantidade de ^{14}C foi obtida em desintegrações por minuto (DPM). Os valores encontrados foram proporcionalizados para o valor total de ^{14}C contida nos cérebro e fígado, ou por grama de tecido, no caso do músculo.

3.7 Avaliação dos níveis glicêmicos

Para a avaliação da glicemia, os animais foram subdivididos em 4 grupos experimentais: nado, contenção e seus respectivos controles. Não houve restrição alimentar para evitar a adição de mais um componente estressor. A glicemia foi medida usando o aparelho One Touch Ultra®. O sangue, obtido através de uma pequena punção de agulha na ponta da cauda, foi coletado em 3 momentos: antes do estresse, imediatamente depois do estresse (5 minutos para os animais do grupo nado e 1 hora para os animais do grupo contenção) e 20 minutos após o fim do estresse. Os animais dos grupos controle permanceram em suas caixas de manutenção e o sangue foi coletado nos mesmos tempos do seu respectivo grupo estresse.

3.8 Análise estatística

Foram aplicados teste ‘t’ nas análises do mapeamento e distribuição de [^{14}C]-2DG. Para as análises da glicemia, foi utilizado teste ‘t’ múltiplo-bicaudal e teste de amostras pareadas. Para as análises da expressão da proteína Fos foi aplicado ANOVA de uma via seguia de Bonferroni. As análises foram feitas utilizando o programa estatístico SPSS e Graphpad Prism 6. O programa MCID para densitometria óptica já fornece os resultados com cálculo da média e desvio padrão da densidade óptica medida nos pixels da ROI em nCi. Os demais resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (S.E.M). Foram considerados significativos quando $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Alterações na distribuição cerebral de [^{14}C]-2DG depois do estresse

As regiões analisadas foram escolhidas com base em evidências de possíveis relações com estresse e depressão, já relatadas na literatura. Foram elas: córtex frontal associativo (FrA); córtex cingulado áreas 1 e 2 (Cg); córtex pré-limbico (PrL); córtex inflalímbico (IL); córtex piriforme (Pir); hipocampo (CA1, camada piramidal); hipocampo (CA2, camada piramidal); hipocampo (CA3, camada piramidal); camada molecular do giro denteado (MoDG); camada granular do giro denteado (GrDG); complexo basolateral da amígdala (BLA); complexo central da amígdala (Ce); caudato putamen - estriado (Cpu); núcleo accumbens (AcbC); núcleo leito da estria terminal medial anterior (STMA); núcleo leito da estria terminal medial ventral (STMV); núcleo leito da estria terminal lateral ventral (STLV); núcleo supra-óptico (SO); núcleo paraventricular do hipotálamo, anterior parvocelular (PaAP); núcleo paraventricular do hipotálamo, ventral (PaV); área pré-óptica medial (MPA); substância negra reticular (SNR); substância negra compacta dorsal (SNCD); substância cinzenta periaquedutal lateral (LPAG) e substância cinzenta periaquedutal dorsomedial (DMPAG). Duas áreas corticais motoras, primária e secundária (M1 e M2) foram adicionadas à análise no grupo controle e nado.

A Tabela 1 apresenta os valores médios de captação de [^{14}C]-2DG obtidos em nCi em cada uma das áreas investigadas. A figura 4 ilustra as mudanças na captação da [^{14}C]-2DG, em diferentes áreas cerebrais depois da exposição aos estresses. Nesse gráfico os valores das médias de nCi foram apresentados normalizados, tomando-se os controles como 0%. O estresse de contenção levou a um aumento no consumo de [^{14}C]-2DG em relação ao grupo controle em todas as áreas analisadas. No entanto, significância estatística foi alcançada apenas na região CA2. No estresse da inalação do vapor de éter, assim como no estresse da contenção, todas as áreas analisadas mostram um aumento no consumo de [^{14}C]-2DG quando comparadas ao grupo controle, mas alterações estatisticamente significativas foram encontradas apenas em Pir, MoDG; STMV e STLV. No estresse do nado, todas as áreas mostraram redução na captação de [^{14}C]-2DG em relação ao grupo controle. Diferenças estatisticamente significativas foram observadas nas regiões: FrA, Pir, CA1, CA3, MoDG; GrDG; Ce, AcbC; STMA, PaAP, PaV, SNR, DMPAG e M2.

Tabela 1 - Os números abaixo representam a quantidade de [^{14}C]-2DG acumulada nas diversas estruturas estudadas. Os valores estão expressos como médias em nCi ± desvio padrão. Teste 't'. *p≤0,05. N=5-6.

Áreas Cerebrais	Controle	Estresse psicológico	Estresse físico	Estresse misto
FrA	0,07386 ± 0,00962	0,10299 ± 0,4075	0,07475 ± 0,01483	0,04924 ±0,01493*
Cg	0,07708 ± 0,01222	0,10227 ± 0,05663	0,09216 ± 0,01886	0,05953 ± 0,02216
PrL	0,07222 ± 0,01338	0,11001 ± 0,05823	0,08822 ± 0,01865	0,0568 ± 0,023
IL	0,06377 ± 0,01173	0,09827 ± 0,05055	0,07153 ± 0,01768	0,04928 ± 0,02021
Pir	0,07037 ± 0,01681	0,10073 ± 0,05491	0,09223± 0,02253*	0,04823 ± 0,01906
CA1	0,04837 ± 0,01045	0,05525 ± 0,02035	0,06032 ± 0,01825	0,0312 ± 0,00973*
CA2	0,04894 ± 0,01002	0,05852 ± 0,02081*	0,06557 ± 0,01957	0,03362 ± 0,01105
CA3	0,04856 ± 0,01037	0,05427 ± 0,02124	0,05952 ± 0,01909	0,0322 ± 0,00984*
MoDG	0,05071 ± 0,01208	0,05511 ± 0,02112	0,0621 ± 0,02055*	0,03468 ±0,01146*
GrDG	0,04811 ± 0,0107	0,05482 ± 0,02093	0,05842 ± 0,0188	0,03433 ±0,01005*
BLA	0,05883 ± 0,00998	0,07808 ± 0,03706	0,07489 ± 0,02339	0,0417 ± 0,01331
Ce	0,03782 ± 0,00581	0,05688 ± 0,02158	0,05109 ± 0,01972	0,02839 ±0,01154*
Cpu	0,06814 ± 0,01319	0,09143 ± 0,04491	0,08548 ± 0,02121	0,05433 ± 0,02269
AcbC	0,06038 ± 0,01395	0,08293 ± 0,04141	0,07235 ± 0,01785	0,03929 ±0,01466*
STMA	0,04276 ± 0,00711	0,04676 ± 0,01706	0,05049 ± 0,01619	0,02923 ±0,01212*
STMV	0,03877 ± 0,007	0,05737 ± 0,02366	0,05221± 0,01427*	0,03839 ± 0,01634
STLV	0,03638 ± 0,00679	0,05356 ± 0,02292	0,05176± 0,0147*	0,03277 ± 0,01401
SON	0,03904 ± 0,01157	0,04524 ± 0,0259	0,04892 ± 0,02188	0,03072 ± 0,01488
PaAP	0,03649 ± 0,00708	0,04327 ± 0,01996	0,04485 ± 0,01609	0,02865 ±0,00664*
PaV	0,04293 ± 0,00571	0,05048 ± 0,02683	0,04805 ± 0,01088	0,02784 ±0,00968*
MPA	0,04289 ± 0,00937	0,05777 ± 0,02864	0,05485 ± 0,01834	0,03465 ± 0,014
SNR	0,04438 ± 0,00988	0,05085 ± 0,01914	0,05071 ± 0,01917	0,03062 ±0,01397*
SNCD	0,05112 ± 0,01048	0,05696 ± 0,018	0,06046 ± 0,02236	0,03785 ± 0,01623
LPAG	0,05027 ± 0,00733	0,05981 ± 0,01365	0,06267 ± 0,0165	0,03632 ± 0,01422
DMPAG	0,04334 ± 0,00798	0,05296 ± 0,01198	0,05374 ± 0,01362	0,03059 ±0,01048*
M1	0,07754 ± 0,0698			0,0582 ± 0,02024
M2	0,07741 ± 0,00568			0,05713 ±0,02075*

Figura 4 - Ilustração baseada na tabela 1. Os dados abaixo mostram a porcentagem de variação da captação de [^{14}C]-2DG nas diferentes áreas cerebrais depois dos estresses, em relação ao grupo controle. Teste 't'. *p≤0.05. N= 5-6.

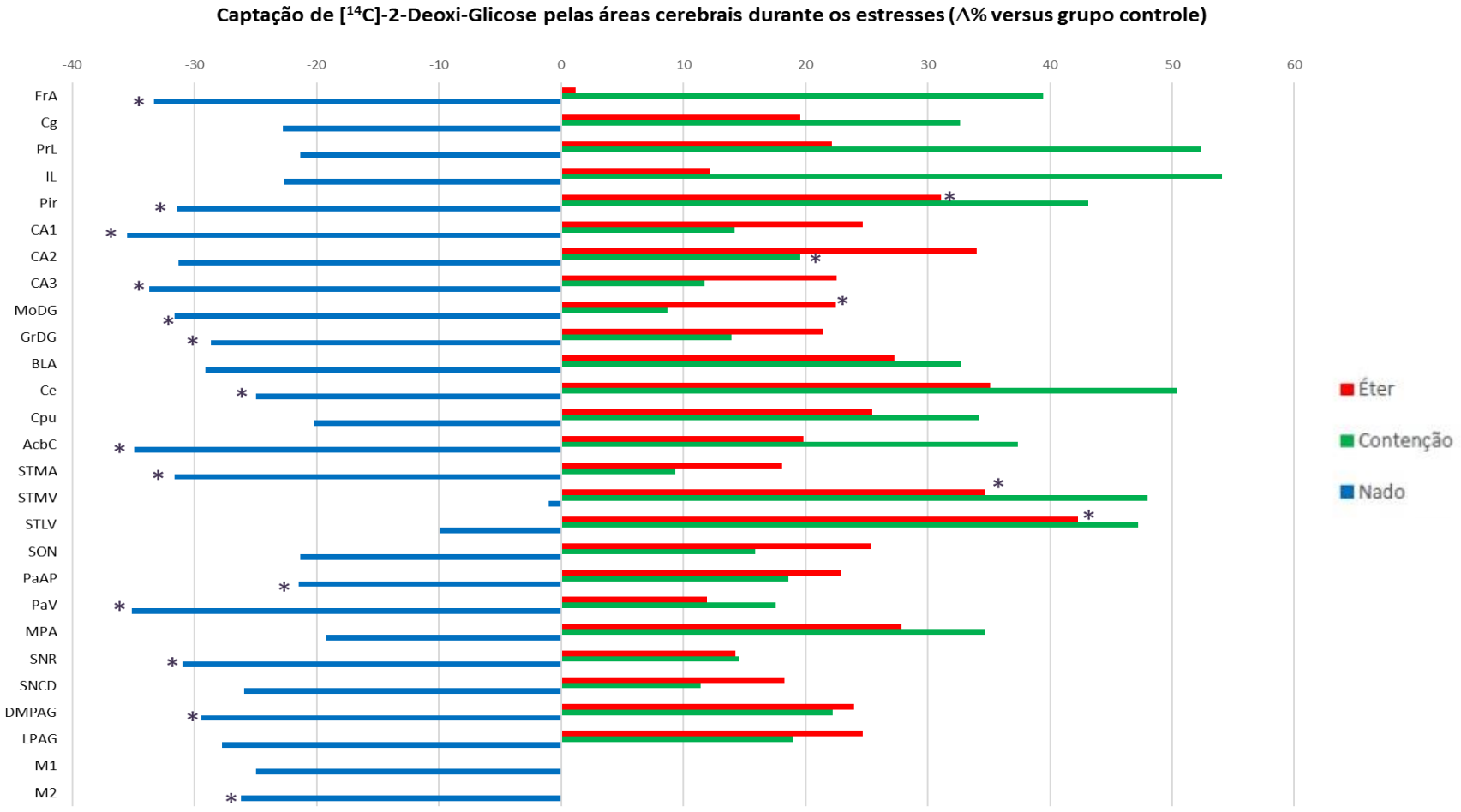


Figura 5 - À esquerda, imagens em Nissl onde as regiões de interesse são identificadas e delimitadas. À direita, imagem de corte autorradiográfico com filtro de cor, mostrando o carimbo gerado sob essa imagem. Imagem ilustrativa de um animal controle (A e C), contenção (B) e éter (D). As regiões delimitadas são: Cg, PrL, IL, Pir, Cpu, STMA, STMV, STLV

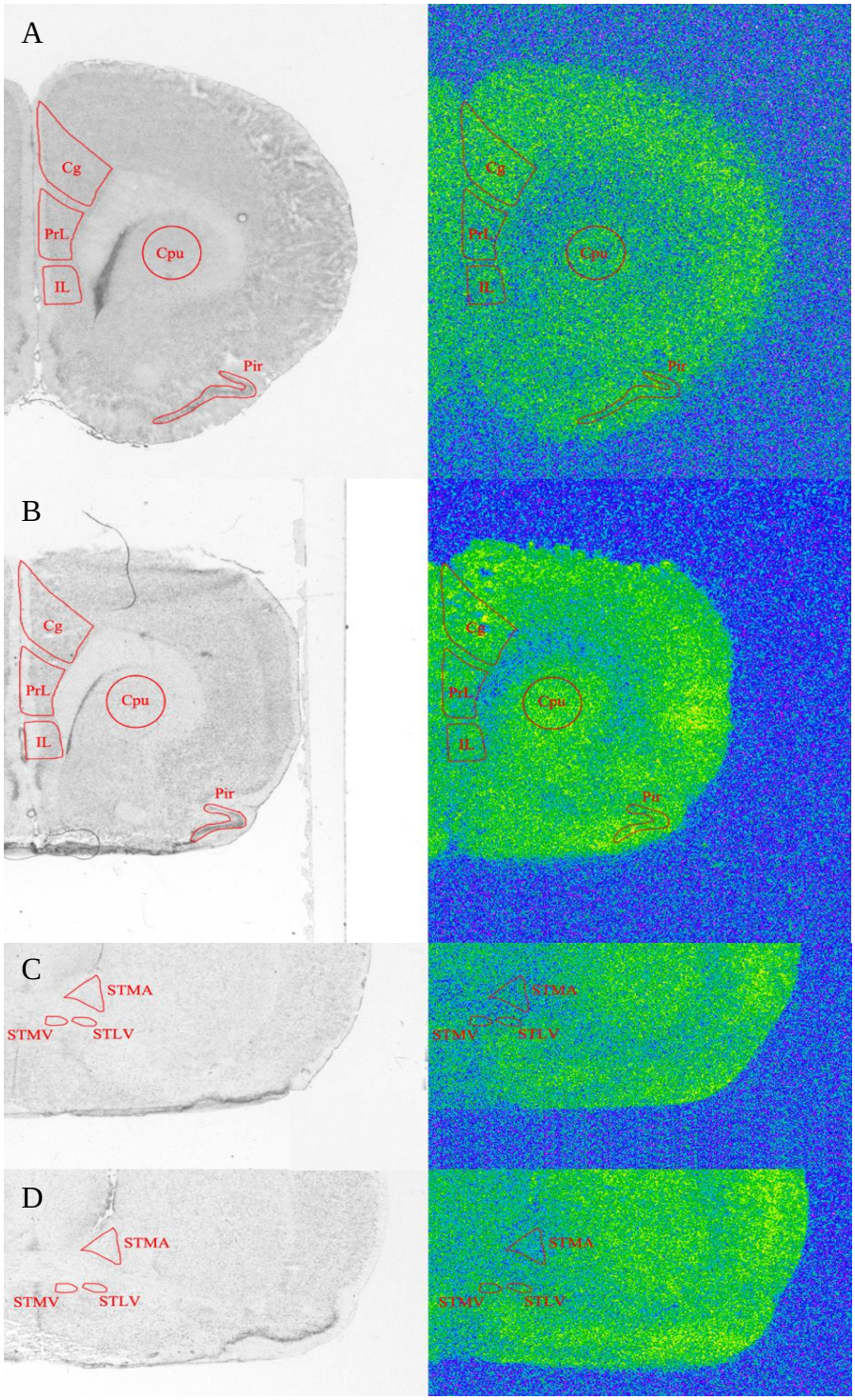
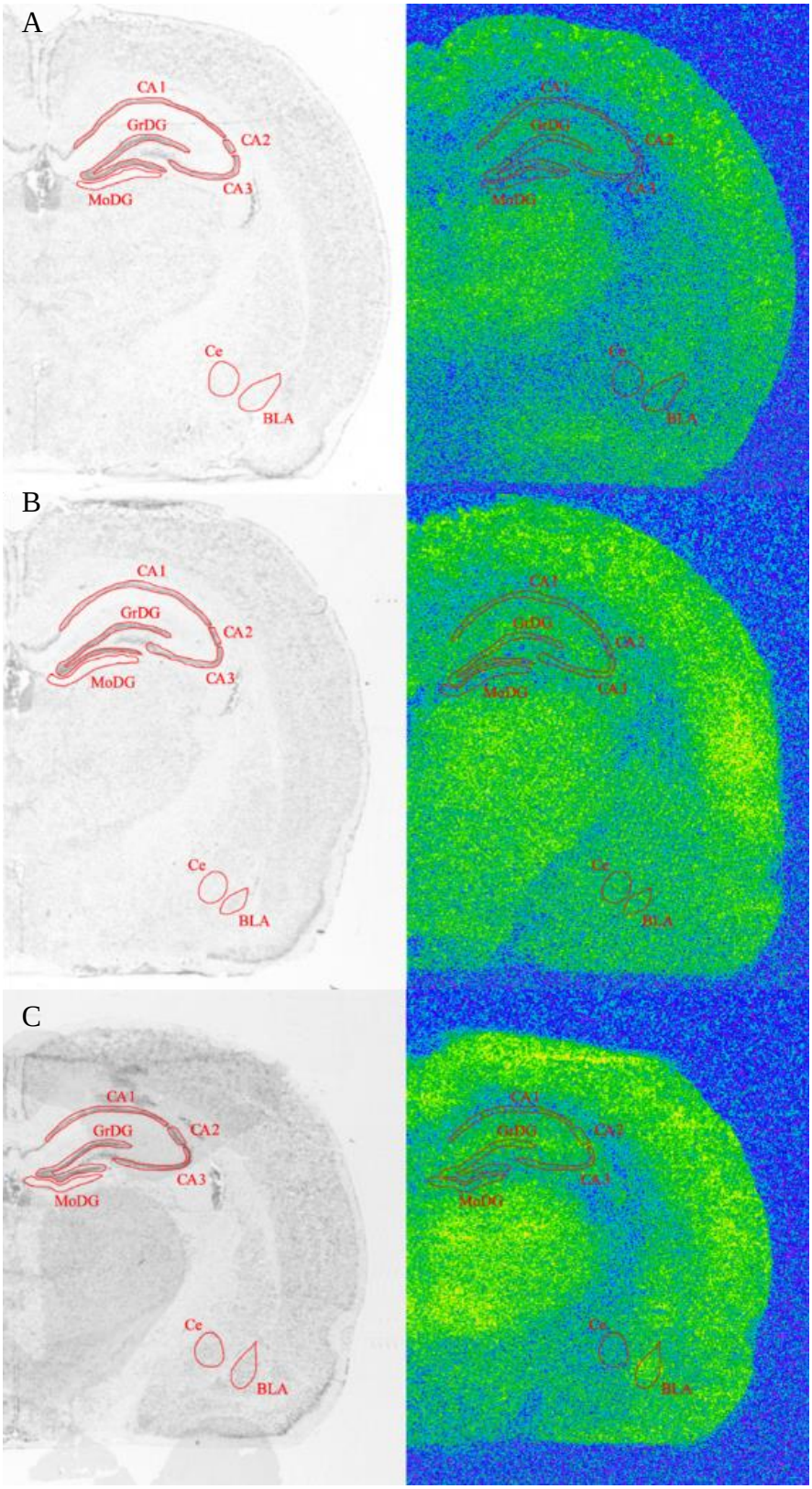


Figura 6 - À esquerda, imagens em Nissl onde as regiões de interesse são identificadas e delimitadas. À direita, imagem de corte autorradiográfico com filtro de cor, mostrando o carimbo gerado sob essa imagem. Imagem ilustrativa de um animal controle (A), contenção (B) e éter (B). As regiões delimitadas são CA1, CA2, CA3, GrDG, MoDG, BLA e Ce



4.1 Distribuição de [^{14}C]-2DG em outros órgãos

Em vista da inesperada redução de captação de [^{14}C]-2DG durante o nado avaliamos a distribuição do traçador em 3 tecidos com funções distintas: o cérebro responsável pelo processamento central, o fígado como um órgão metabolizador e o músculo, necessário para realização da atividade física. Como o fígado e o cérebro puderam ser isolados totalmente e seu peso total obtido, os dados desses órgãos estão apresentados separadamente do músculo, em que foi feita uma proporcinalização na forma de DPM/grama de tecido.

Houve um aumento significativo na captação de [^{14}C]-2DG pelo fígado dos animais estressados (135.745 DPM/fígado) quando comparado ao grupo controle (107.844 DPM/fígado). Diferenças não foram observadas para o cérebro desses animais (figura 7A).

Já em relação ao músculo gastrocnêmio, não houveram diferenças significativas na captação de [^{14}C]-2DG nos animais submetidos ao nado em comparação ao grupo não estressado (figura 7B).

4.2 Avaliação dos níveis glicêmicos durante os estresses

Observou-se uma redução significativa do nível glicêmico dos animais que passaram pelo estresse do nado quando medido imediatamente após a exposição ao estresse, se acentuando 20 minutos após a exposição, quando comparado ao grupo controle (figura 8A). Os animais submetidos ao estresse de contenção apresentaram aumento (não significativo) da glicemia na medida tomada imediatamente após a contenção quando comparado ao grupo controle. No entanto, há um aumento estatisticamente significativo quando comparadas a glicemia basal e a glicemia pós estresse do grupo contenção (figura 8B). Neste grupo, os níveis glicêmicos igualam-se ao controle após 20 minutos do término do estresse.

Figura 7 - Efeito do estresse do nado sobre a captação de [^{14}C]-2DG no fígado e cérebro (A) e músculo gastrocnêmio (B). Os resultados estão expressos em média ± S.E,M. Teste 't'- unicaudal. *p≤0,05 quando comparado ao grupo controle. N=7.

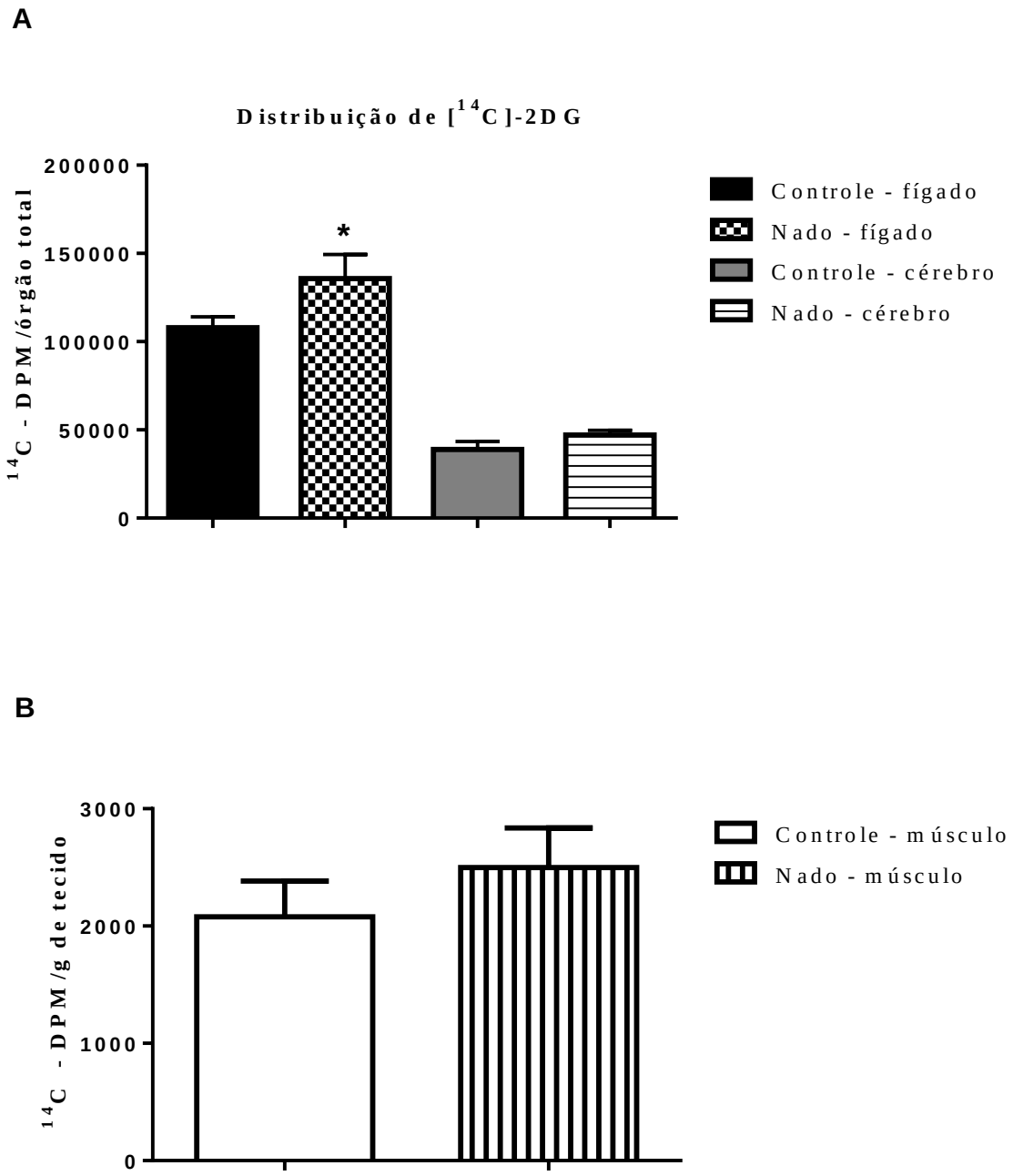
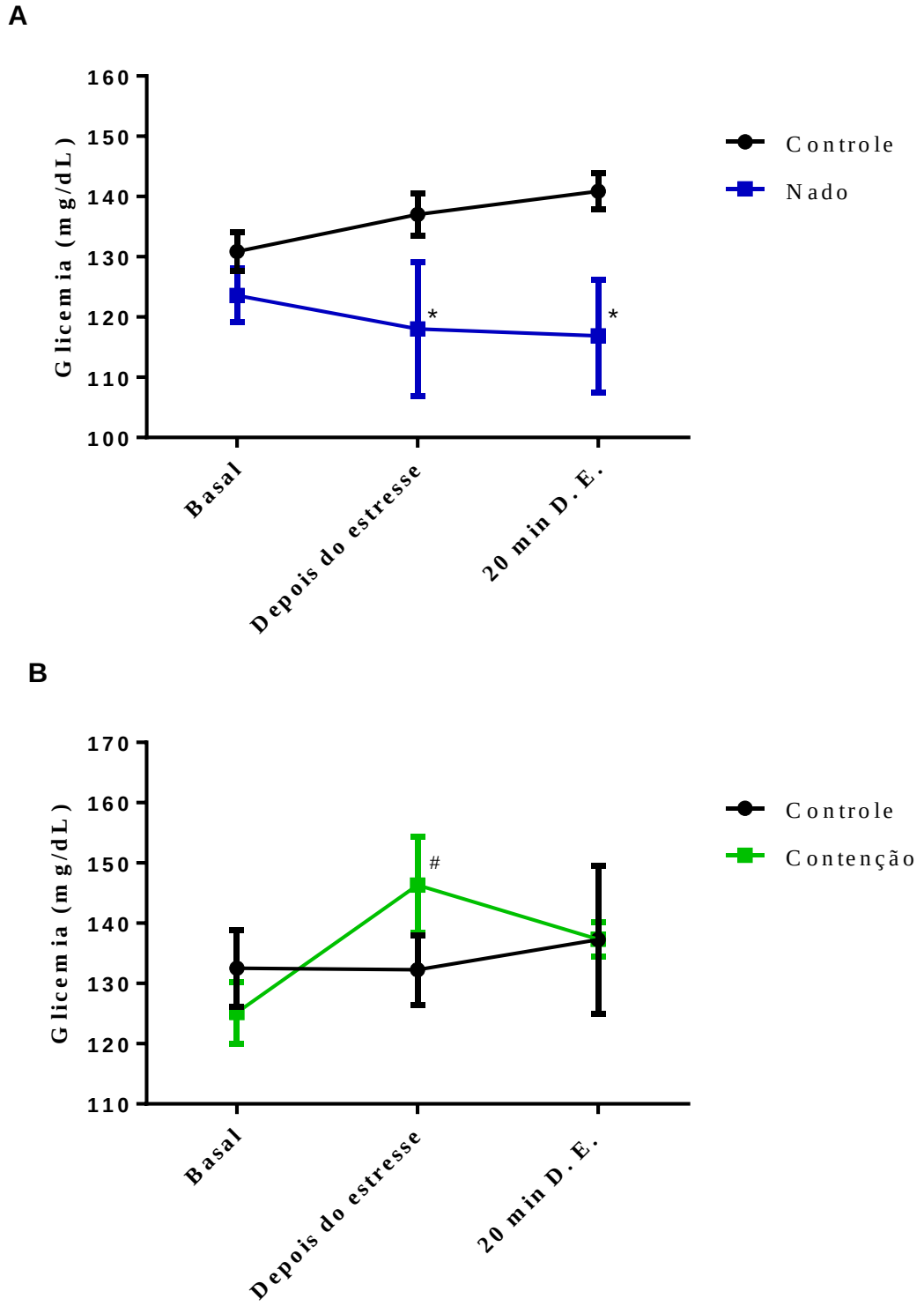


Figura 8 - Glicemia dos animais submetidos ao estresse do nado, n=7 (A) e contenção, n=4-6 (B). As medições glicêmicas foram realizadas nos tempos: basal, imediatamente depois do estresse e 20 minutos depois do fim do estresse. Os dados estão expressos em média ± S.E.M. Teste 't' múltiplo e teste de amostras pareadas. *p≤0,05 quando comparado ao grupo controle. #p≤0,05 quando comparado ao mesmo grupo, no tempo basal.



4.3 Análise da expressão da proteína Fos

Para avaliação da expessão da proteína Fos, foram avaliadas diferentes regiões do PVH: PaDC, PaLM, PaMP, PaV e duas regiões da amígdala: Ce e BLA.

A figura 10 mostra um aumento da expressão da proteína Fos nos animais submetidos ao estresse do éter nas chamadas regiões autonômicas PaDC e PaV quando comparados aos grupos controles. Na região PaLM, houve aumento significativo da expressão de Fos no estresse do nado. No PaMP e na região da amígdala BLA, todos os grupos estresse (contenção, éter e nado) apresentaram aumento estatisticamente significativo na expressão de Fos quando comparados ao grupo controle. Na região Ce, houve uma diminuição significativa da expressão da proteína Fos no grupo controle canulado quando comparado ao grupo controle.

Figura 9 – Fotomicrografias representativas das células Fos imunorreativas nos diferentes núcleos do complexo paraventricular do hipotálamo (coluna A), no complexo central da amígdala (coluna B) e no complexo da amígdala basolateral (coluna C). Grupos: controle (linha 1), controle canulado (linha 2), contenção (linha 3), éter (linha 4) e nado (linha 5). Escala: 50µM.

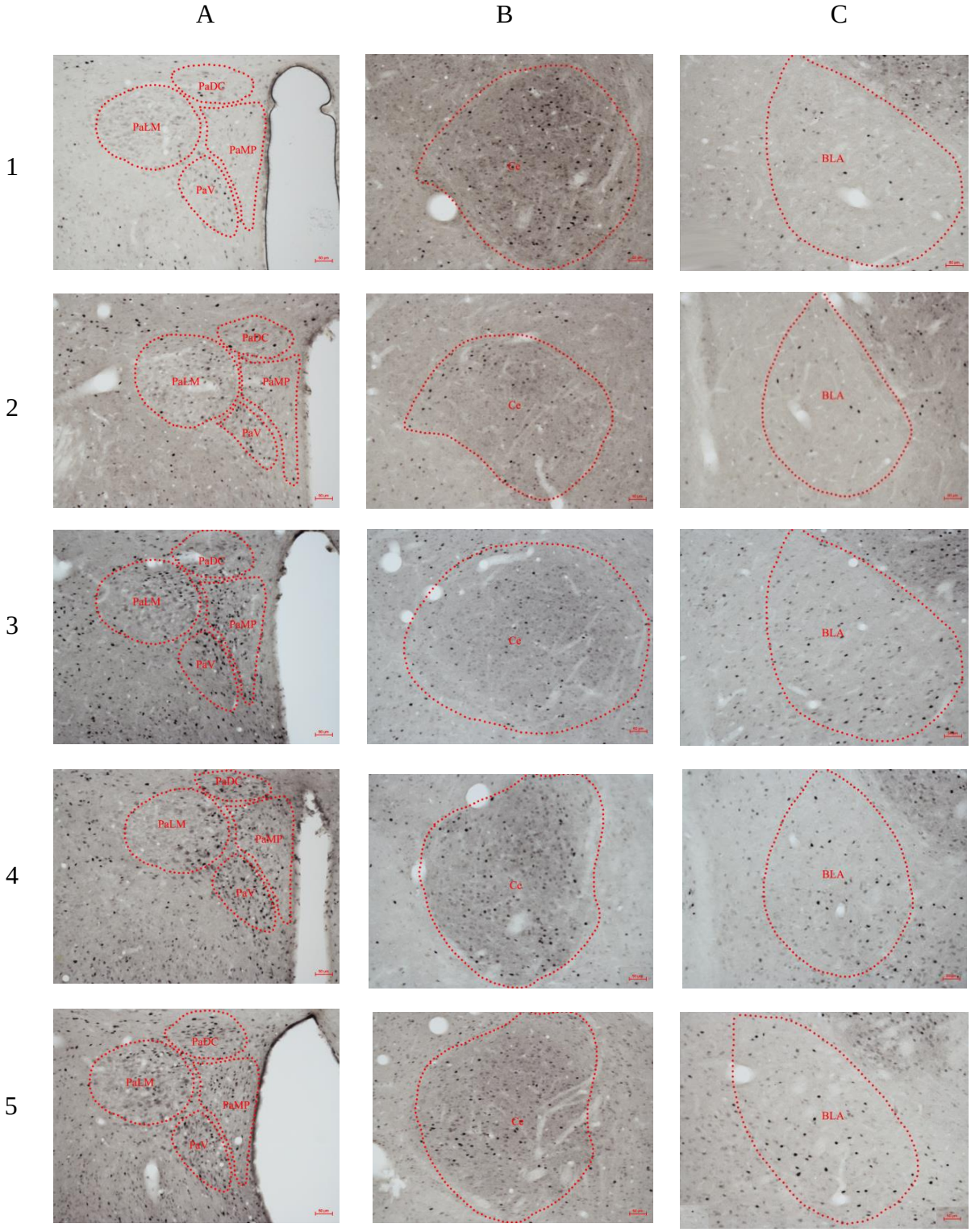
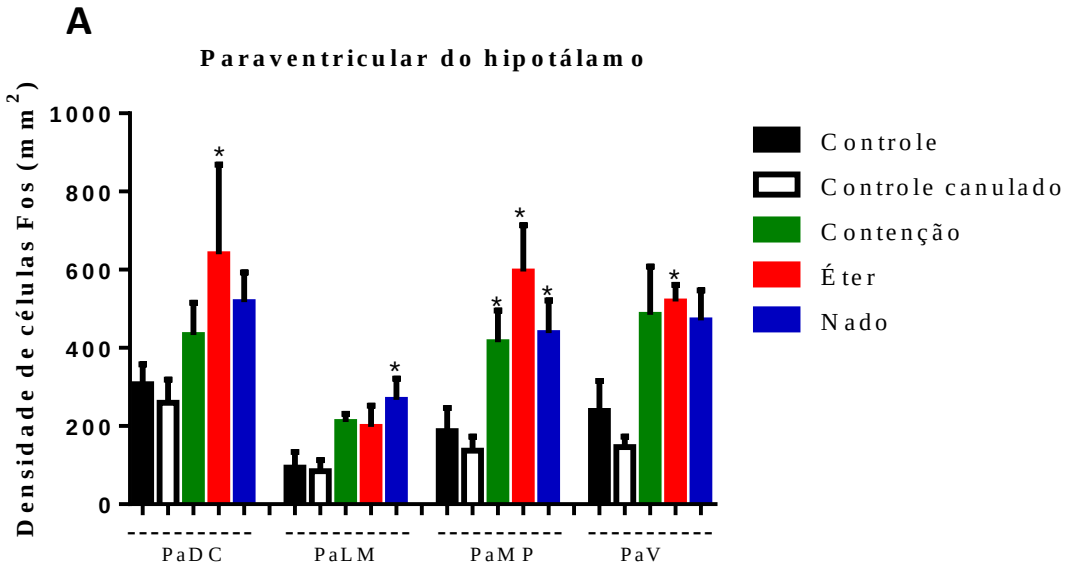
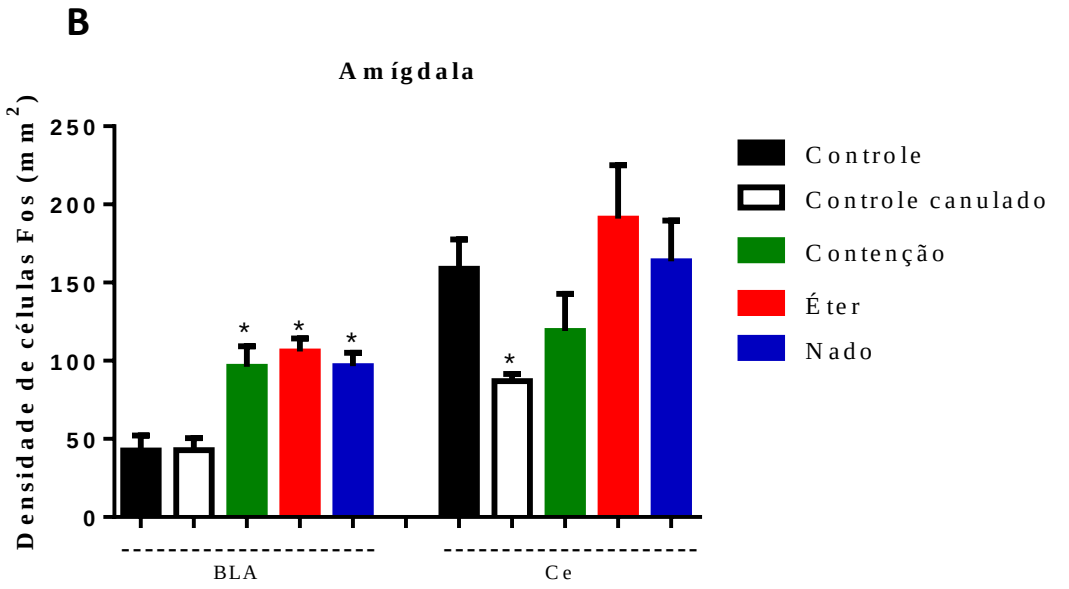


Figura 10 - Densidade de células Fos positivas nas diferentes regiões do núcleo paraventricular do hipotálamo (A) e nas regiões da amígdala (B). Os resultados estão expressos em média ± S.E.M. *p≤0,05 quando comparados ao grupo controle. ANOVA de uma via seguida de teste de Bonferroni. N=4-5





5 DISCUSSÃO

O estresse é definido como um estado de desarmonia e ameaça à homeostase (CHROUSOS; GOLD, 1992). Hipócrates afirmava que somos assediados por forças perturbadoras do equilíbrio, que hoje chamamos de estressores. Galeno dizia que haviam forças no trabalho que ajudavam a restaurar o equilíbrio, às quais chamava de "forças curativas da natureza", que poderiam ser identificadas com o que atualmente denominamos de respostas adaptativas, ou homeostase (CHROUSOS; GOLD, 1992; GOLD; MACHADO-VIEIRA; PAVLATOU, 2015).

Embora o estresse, no seu conceito geral tenha uma ampla definição, ele tem sido subdividido em diferentes categorias. O estresse físico, como já comentado acima, está mais relacionado a desafios sistêmicos, que induzem uma resposta metabólica a fim de manter a homeostase. Já o estresse psicológico está relacionado a um processamento cortical de alta complexidade (PACAK et al., 1990; SAWCHENKO; LI; ERICSSON, 2000; DAYAS et al., 2001; PACÁK; PALKOVITS, 2001). Essas classificações do estresse têm se mostrado coerentes e distintas tanto em relação às diferentes áreas cerebrais ativadas, quanto pelo hormônio mediador de cada um desses estresses, como a AVP ao estresse físico e o CRF ao estresse psicológico (RAMOS; TRONCONE; TUFIK, 2007).

A glicose é a principal fonte de energia para todos os tipos celulares encontrados em mamíferos. Ela é responsável pela produção de adenosina trifosfato (ATP) tanto em aerobiose como anaerobiose. A glicose não permeia livremente a membrana plasmática e a captação celular desse nutriente é realizada por proteínas transportadoras associadas à membrana. Esses transportadores de glicose são divididos em: transportadores de glicose (GLUTs) e transportadores de glicose dependentes de sódio (SGLTs) (MUECKLER et al., 1985; HEDIGER et al., 1987; PEREIRA; LANCHA, 2004).

São descritos na literatura 14 subtipos de GLUT distribuídos nos mais variados tecidos. O GLUT1 é encontrado predominantemente nos eritrócitos e cérebro; o GLUT2 é encontrado predominantemente no fígado e células β pancreáticas; o GLUT3 está no cérebro, placenta e rim e GLUT4 é predominante no músculo esquelético e tecido adiposo (SCHEEPERS; JOOST; SCHÜRMANN, 2004). O músculo esquelético contém vários transportadores de glicose. As evidências indicam que a translocação do GLUT4 para a superfície celular é o principal mecanismo responsável pela captação regulada de glicose neste tecido durante o exercício. A insulina e as contrações musculares são os estímulos mais importantes para que haja a mobilização do GLUT4 do seu compartimento de armazenamento

intracelular para a membrana plasmática (PEREIRA; LANCHA, 2004). Durante o exercício, a captação de glicose pelos músculos é aumentada em 10 a 20 vezes. Além disso, em humanos, exercícios que não são treinados levam a uma mobilização 60% maior de GLUT4 para a membrana do que exercícios treinados (WAHREN et al., 1971).

Em nossos experimentos com estresse do nado, observamos uma surpreendente redução da captação de [^{14}C]-2DG pelo cérebro, inclusive em áreas motoras M1 e M2 (figura 4). Por isso, algumas análises adicionais foram efetuadas em busca de uma explicação (figuras 7 e 8). Estudamos o acúmulo do marcador no tecido cerebral e hepático, como um todo, e também em um fragmento de músculo. Também avaliamos a glicemia dos animais em três momentos diferentes do protocolo: antes do estresse, imediatamente após o estresse e 20 minutos após o fim do estresse. Observamos que os animais submetidos ao nado apresentaram uma queda da glicemia logo após o estresse que se acentuou após 20 minutos. Por outro lado, animais submetidos a contenção apresentaram uma tendência a elevação da glicemia ao final do período de contenção e retorno aos níveis dos controles após 20 minutos. Embora os dados da captação de [^{14}C]-2DG pelo músculo não tenham apresentado diferenças significativas entre controles e animais submetidos ao nado (figura. 7B), é possível observar uma tendência a um aumento de captação. Tal aumento não foi maior devido ao curto período de atividade física, onde o uso do glicogênio muscular pode ter sido a primeira fonte de energia utilizada. Além disso, não foi possivel proporcionalizar a quantidade de [^{14}C]-2DG captada por todos os músculos envolvidos na tarefa do nado. Assim, a avaliação da mobilização de glicose para o sistema muscular ficou comprometida pois teria sido necessário coletar uma quantidade representativa da massa muscular dos ratos para se inferir tal mobilização.

No fígado, mais precisamente nos hepatócitos, é encontrado o transportador de glicose GLUT2. Esse transportador possui alta capacidade e confere função glico-sensora às células em que se expressa (BURCELIN; DOLCI; THORENS, 2000). Durante o nado, pode ter havido um pico glicêmico semelhante ao observado no estresse da contenção, fazendo com que o fígado aumentasse a captação de glicose pelo GLUT2, tentando manter a glicemia estável. Dessa forma haveria um acúmulo maior de [^{14}C]-2DG no fígado, o que foi observado em nossos resultados (figura. 7A). Então, o GLUT2 capta a glicose da circulação, levando a uma redução na glicemia, que foi observada em nossos dados (figura. 8A). Quando a glicemia é estável, a atividade do GLUT2 tende a se manter baixa. Diante desses fatos entende-se que não houve efetivamente uma redução da captação de glicose [^{14}C]-2DG pelo cérebro, e sim, que houve um sequestro maior de glicose pelo fígado e músculos, não deixando disponível o traçador em quantidades suficientes para os outros órgãos. Na prática, o resultado aparece

como se os animais tivessem sido injetados com uma quantidade significativamente menor do traçador [^{14}C]-2DG.

Alguns trabalhos utilizaram-se da metodologia da captação de [^{14}C]-2DG também no modelo de teste de antidepressivos do nado forçado de Porsolt a fim de observar alterações na ativação de determinadas áreas cerebrais. Nesses estudos é possível observar que poucas áreas apresentam aumento no consumo de [^{14}C]-2DG quando comparadas ao controle, e áreas como o PVH, muito relacionada ao estresse, aparecem menos ativadas ou com pouca ativação em relação ao controle (DUNCAN; JOHNSON; BREESE, 1993; DUNCAN et al., 1996). Esses autores não levaram em consideração a captação de [^{14}C]-2DG por outros órgãos e o fato desse modelo introduzir viés físico muito grande quando analisado através desta metodologia. Somando-se a isso, os protocolos de Porsolt são significativamente diferentes do que se praticou aqui, tornando difícil a comparação dos resultados. Essas diferenças consistiram em uma exposição prévia de 15 minutos ao aparato do nado, um dia antes do teste. O tempo do teste, 5 minutos, foi o mesmo tempo que utilizamos para o estresse do nado, no entanto, nesses estudos, os animais foram decapitados 5 minutos após a injeção do [^{14}C]-2DG, e no nosso caso a decapitação foi realizada 60 minutos após a injeção, não interrompendo o processo de captação deste traçador. Com isso propiciamos um tempo maior para a manifestação dos efeitos do nado. Consideramos que o nado é um modelo que sofre com a interferência da intensa atividade física, possivelmente alterando de modo inespecífico a captação do traçador pelo sistema nervoso central.

O cérebro é um órgão complexo e heterogêneo subdividido em muitos componentes anatômicos e funcionais com níveis marcadamente diferentes de atividade funcional que variam independentemente com o tempo e a função (SOKOLOFF, 2008). Os resultados obtidos no mapeamento cerebral da captação de [^{14}C]-2DG nos estresses do éter e contenção puderam ser interpretados. As áreas corticais, incluindo as regiões FrA, Cg, PrL, IL, são regiões relacionadas a percepção da dor, das emoções, e também estão relacionadas a respostas afetivas a estímulos nocivos e ao medo (NAKAMURA; KATAYAMA; KAWAKAMI, 2010; LU et al., 2016; MAREK et al., 2018). São áreas que processam e integram informações para produzir uma resposta ao estímulo recebido. O FrA parece também ligado a processos de aprendizem (NAKAYAMA et al., 2015). Embora o estresse físico tenha causado metabolismo aumentado nessas áreas em relação ao grupo controle, a demanda energética dessas regiões é marcadamente maior quando o estressor é psicológico (figura. 4). O Pir está relacionado principalmente ao sistema sensor olfatório (DE CURTIS et al., 2019). Em nossos dados, foi encontrada diferença estatística no metabolismo desta área

quando os animais foram expostos ao estresse físico (figura 4), indicando que a inalação do vapor de éter ativou de forma marcante esta região.

O hipocampo, um componente importante do sistema límbico, é separado em diferentes regiões de acordo com a morfologia de suas células e a formação das fibras nervosas. Esse sistema desempenha papéis importantes no aprendizado, na memória e cognição, especialmente na consolidação de informações da memória de curto prazo para a memória de longo prazo. Além disso está relacionado com a localização espacial (SOSA; GILLESPIE; FRANK, 2018; TZAKIS; HOLAHAN, 2019). Nossos dados do mapeamento com [^{14}C]-2DG mostram uma pequena ativação do hipocampo nos animais submetidos ao estresse psicológico, onde o CA2 chega a alcançar significação estatística. Uma tendência ainda maior foi observada durante o estresse físico, que alcançou significância estatística na região MoDG. Esse aumento na ativação hipocampal no estresse físico já foi observado em estudos do laboratório onde a atividade da enzima citocromo c oxidase foi medida depois de uma sequência de estresses fisicos, refletindo alterações de longa duração na atividade neuronal nessa estrutura (ANEXO C). É importante notar que naquele estudo se notou uma clara redução da atividade da citocromo oxidase após estresses psicológico. Em um estudo funcional realizado por Werner e colaboradores (2009), não houve diferenças significativas na ativação hipocampal dos indivíduos com TDM quando comparados ao grupo controle. No entanto, dados morfométricos de outros estudos mostram que há uma redução do volume hipocampal em pacientes deprimidos principalmente em episódios recorrentes (CAMPBELL et al., 2004; VIDEBECH; RAVNKILDE, 2004). Nesse sentido, embora os efeitos agudos do estresse físico sejam pequenos em nosso modelo, os efeitos desse tipo de estresse aplicado por maior tempo, conforme observado no mapeamento da atividade da citocromo oxidase, pode se correlacionar com o observado nos quadros depressivos. Mais importante ainda, a aplicação prolongada de estresse psicológico, com aumento da atividade hipocampal, pode levar a uma lesão hipocampal, que seria observada como redução da atividade da citocromo oxidase, como citado acima. Resta comprovar se a redução da atividade da citocromo c oxidase se deve a um processo de perda neuronal, como parece ser no quadro de depressão.

O AcbC está principalmente conectado ao sistema límbico. Desempenha papel modulador no fluxo de informações do complexo da amígdala para outras regiões como, por exemplo, os gânglios da base e regiões mesolímbicas. Sendo assim, é considerado uma interface entre a motivação e a ação, tendo papel no comportamento sexual, comportamento motivado por recompensa, comportamento relacionado ao estresse e a dependência química (STURM et al., 2003; WEST; CARELLI, 2016). O AcbC e a VTA compõem um circuito

crítico na via de sinalização de recompensa. Um desbalanço nesse circuito pode levar a anormalidades na motivação e hedonia que são características da depressão e mania (NESTLER et al., 2002). Nos transtornos de humor, há um aumento no metabolismo desta estrutura (CARLSON et al., 2006). Nossos resultados mostraram que essa região tende a estar mais ativada durante o estresse psicológico, porém sem alcance significativo (figura 4).

O Cpu é uma das principais partes dos gânglios da base, coordena sinais neuronais de várias regiões corticais e subcorticais e desempenha um papel crítico em movimentos voluntários, aprendizado motor, cognição e emoção (HWANG et al., 2016). Nossos resultados, embora não significativos mostram uma tendência a aumento da captação de [^{14}C]-2DG tanto no estresse físico quanto no psicológico (figura 4). Em pacientes com TDM, o caudato, uma das regiões do Cpu, apresenta redução da atividade funcional (FORBES et al., 2009; GUO et al., 2015). Como esta região está associada ao sistema de recompensa, sua alteração pode estar associada a anedonia, um dos principais sintomas da doença. É preciso notar que nossos animais não podem ser considerados deprimidos, mas sim estressados, o que compromete a comparação direta entre os resultados de atividade cerebral.

Como apresentado na figura 4, STMA, STMV, STLV, que fazem parte da chamada amígdala estendida, são regiões com tendência a aumento no consumo de [^{14}C]-2DG nos estresses psicológico e físico, mas de forma mais acentuada no estresse psicológico. As regiões STMV e STLV são ainda mais notáveis mesmo que não atinjam significação estatística. Diferença estatística nessas regiões foi vista no estresse físico. Estas regiões estão relacionadas a estímulos ansiogênicos, medo, aversão e recompensa (WALKER; DAVIS, 1997; ALVAREZ et al., 2011;). A captação da [^{14}C]-2DG obedece a uma curta janela temporal, cerca de 20 minutos (SOKOLOFF, 1981). Assim, é possível considerar que o início do estresse de contenção seja relacionado preponderantemente a um quadro de ansiedade, que é essencial para a sobrevivência, onde a atenção é focalizada predominantemente no estressor ameaçador (GOLD, 2015).

A MPA recebe aferências de regiões límbicas e envia projeções para o hipotálamo e tronco cerebral (WESTERHAUS; LOEWY, 1999; MYERS et al., 2014). Suas conexões com a porção parvocelular do PVH possivelmente regulam as saídas neuroendócrinas. Além disso, tem sido relatado que a exposição a breves sessões de estresse provoca acentuada ativação neuronal na MPA (CULLINAN et al., 1995). Tal ativação foi vista em nossos dados, com uma tendência a aumento de captação do traçador no estresse físico e mais evidentemente no estresse psicológico. As evidências acima sugerem a MPA como uma estrutura implicada na resposta do estresse (MYERS et al., 2014). Assim como a MPA, o SO também parece

implicado na resposta ao estresse bem como em inúmeras funções como controle do apetite, comportamento sexual, comportamentos sociais e ansiosos (LENG; RUSSELL, 2019). Seu metabolismo tendeu a aumentar no estresse psicológico, mas principalmente no físico (figura 4).

A substância negra, subdividida em porção compacta e reticular, é uma estrutura rica em neurônios dopaminérgicos e está implicada não só na regulação motora, mas também na regulação do sono e recompensa (LIMA; REKSIDLE; VITAL, 2009). A porção compacta tem como função principal o controle motor, através de suas projeções excitatórias ao estriado (HODGE; BUTCHER, 1980), além de regular a motivação (IKEMOTO; YANG; TAN, 2015). Como observado em nossos dados de mapeamento, há uma maior ativação dessa região no estresse físico (figura 4), que pode estar relacionada a tentativa do animal em manter seu tônus e postura quando passa a sentir os efeitos de sedação causados pela inalação do vapor do éter.

A PAG é uma estrutura cerebral mesencefálica localizada no caminho de diferentes circuitos neurais que regulam funções autonômicas (ZELENA et al., 2018). Mantém diversas aferências e eferências com várias regiões encefálicas, bem como é modulada por muitos neurotransmissores e neuropeptídeos (para revisão ver SILVA; MCNAUGHTON, 2019). Além disso, está relacionada a diferentes comportamentos: sociais, materno, agressivo, defensivo e sexuais. Também tem sido envolvida na regulação das emoções, medo, ansiedade, pânico e dor (MOTTA; CAROBREZ; CANTERAS, 2017). A PAG dorsal é um local importante para o processamento do medo e ansiedade (ZELENA et al., 2018). Observamos em nossos resultados do mapeamento por [^{14}C]-2DG uma tendência de ativação das áreas DMPAG e LPAG tanto no estresse psicológico quanto no físico (figura 4). Este aumento da atividade dessas regiões no estresse psicológico pode estar relacionado a um enfrentamento de conflito causado pela contenção. No estresse físico o aumento da atividade pode ser proposto como sendo em função de um maior recrutamento das áreas autonômicas a fim de manter a homeostase.

O PVH contém subpopulações de neurônios topograficamente organizados, que se relacionam diretamente com os mecanismos autonômicos e neuroendócrinos (SWANSON; SAWCHENKO, 1983). Os grupos de células noradrenérgicas A1 do tronco encefálico, projetam-se substancialmente para células neurosecretoras magnocelulares do PVH e SO, secretoras de AVP (SAWCHENKO; SWANSON, 1982). A AVP é um nonapeptídeo regulador-chave do eixo HPA. Em algumas condições, a AVP de origem magnocelular potencializa a ação do CRF e facilita a secreção de ACTH. Nossos dados mostrando um

aumento da expressão da proteína Fos na área PaLM no nado suportam esse mecanismo (figura 10A). Esse estressor, categorizado como misto, tem como mediadores tanto CRF quanto AVP, o que reforça a noção de potencialização entre esses mediadores na secreção de ACTH. Neurônios extrahipotalâmicos contendo AVP foram identificados no núcleo medial da amígdala (MeA) e no núcleo leito da estria terminal (CAFFÉ; VAN LEEUWEN; LUITEN, 1987).

Neurônios neurossecretores parvocelulares do PVH são responsáveis pelo fornecimento de CRF à eminência média para o controle estimulatório do ACTH. Além do PVH, o *locus coeruleus* e amígdala expressam neurônios contendo esse peptídeo, o que lhes sugere papel nos transtornos de humor e ansiedade (HOLMES et al., 2003). Nossos dados da expressão da proteína Fos no PaMP, parecem corroborar estudos anteriores do laboratório (RAMOS; TRONCONE; TUFIK, 2007), que relacionam o estresse psicológico ao CRF.

Em contrataste com a expressão da AVP nos neurônios magnocelulares, que são regulados principalmente por mudanças osmóticas, a AVP nos neurônios parvocelulares são responsivas ao estresse e a mudanças nos níveis plasmáticos de glicocorticoides (KOVÁCS; SAWCHENKO, 1996; AGUILERA; RABADAN-DIEHL, 2000). O estresse agudo estimula a liberação de CRF e AVP da eminência média para a circulação porta-hipofisária e aumenta a expressão dos dois peptídeos nos neurônios parvocelulares do PVH (AGUILERA; RABADAN-DIEHL, 2000). Encontramos um aumento da expressão da proteína Fos na região PaMP também após estresse físico (figura 10A). Tanto o estresse físico quanto o misto (nado) envolvem liberação de AVP para efetuar a resposta de ACTH. Uma observação interessante e indo de encontro aos nossos dados foi obtida por Dayas et al. (2001), que também observou um aumento significativo na expressão da proteína Fos na região parvocelular após estresses físicos (hemorragia e desafio imune com IL-1β), psicológicos (contenção e ruído) e misto (nado forçado).

As regiões PaV e PaDC estão relacionadas a funções autonômicas. Os neurônios do PVH que se projetam para o medula ventrolateral dorsal, estão localizados principalmente nessas regiões, além do núcleo hipotalâmico parvocelular posterior (PaPo). Nessas regiões, peptídeos incluindo ocitocina, CRF e AVP foram detectados (LEE; RYU; LEE, 2013). Nossos dados mostraram aumento da expressão da proteína Fos nas regiões PaV e PaDC após estresse do éter, indicando uma maior tendência do estresse físico em ativar vias autonômicas (figura 10A). Em nossos dados de mapeamento da captação de [^{14}C]-2DG devido a limitação da imagem, apenas as regiões PaV e PaAP foram analisadas. Embora não significativamente, ambas as regiões, apresentam aumento na captação de [^{14}C]-2DG tanto no estresse físico

quanto psicológico sendo majoritário o aumento de captação de [^{14}C]-2DG pela região PaAP no estresse físico e no estresse psicológico pela região PaV (figura 4).

O Ce é visto como o ponto central da disseminação de informações relacionadas à ansiedade e ao medo por meio de suas projeções eferentes em respostas autonômicas, endócrinas e comportamentais coordenadas (LEDOUX et al., 1988; DAVIS, 1992). Também é responsável por responder a corticoides endógenos. Um trabalho publicado por Dayas e colaboradores (2001) fornece fortes evidências de que estressores físicos (por exemplo, desafio imunológico e hemorragia) ativam preferencialmente células do Ce, enquanto estressores psicológicos (por exemplo, contenção e ruído) ativam preferencialmente células da MeA. Em nossos dados da expressão da proteína Fos, não encontramos diferenças significativas nos grupos estresse quando comparados ao controle. É preciso notar que nosso grupo controle apresentou uma alta densidade de células Fos positivas, o que não era esperado. Isso comprometeu a comparação estatística com os grupos estressados (figura 10B). Em nosso estudo, quando avaliado o metabolismo desta estrutura a partir da captação de [^{14}C]-2DG observa-se uma tendência acentuada de aumento da atividade dessa região causada pelo estresse psicológico, e um aumento um pouco menor da captação de [^{14}C]-2DG no estresse físico (figura 4).

O grupo controle canulado foi incluido no estudo para avaliar o impacto causado pela cirurgia de canulação da veia ilíaca, necessária para o protocolo do mapeamento da atividade da [^{14}C]-2DG. Com os nossos dados foi possível perceber que nas poucas regiões analisadas para expressão da proteía Fos, não há diferença significativa entre o grupo controle e controle canulado, exceto na Ce (figura 10B). Nesta região houve uma redução da expressão de Fos nos controles canulados, que pode ser atribuido a uma maior adaptação e resiliência dos animais canulados, visto que eram manipulados diariamente depois da cirurgia, para manutenção da cânula. O efeito dessa manipulação diária também deve ser considerado na interpretação final dos resultados de mapeamento de [^{14}C]-2DG.

O BLA está implicado em afetos negativos e positivos, bem como aprendizado espacial e motor (ROOZENDAAL; MCEWEN; CHATTARJI, 2009). Em nossos resultados observamos aumento na expressão da proteína Fos em todos os grupos submetidos aos estresses (figura 10B). No mapeamento por [^{14}C]-2DG também há uma tendência de aumento na captação nessa área em ambos estresses (físico e psicológico) (figura 4).

Alguns estudos comparando pacientes depressivos com o subtipo primário do TDM, não medicados, tem reportado elevado FSC e metabolismo no córtex pré-frontal lateral orbital/ventrolateral, ACC, córtex pregenual e insula anterior em condição basal (BRODY et

al., 2001; DREVETS, 2000). Essas áreas fazem conexões com a amígdala, que tem apresentado aumento anormal da atividade em pacientes com TDM (DREVETS, 1999; ONGUR, 2000; DREVETS; BOGERS; RAICHLE, 2002). Alta atividade fisiológica também foi reportada no córtex cingulado posterior, que abrange a área do accumbens. Além dessas áreas que mostraram aumento na atividade metabólica, áreas com redução do metabolismo foram encontradas no ACC ventral, córtex subgenual e cortex pré-frontal dorsomedial/dorsolateral em depressivos, quando comparados ao controle (DREVETS; BOGERS; RAICHLE, 2002).

Como bem lembrado por Qiu e Li (2018) em sua revisão sobre TDM e o uso da MRI, o TDM é uma condição heterogênea, que não envolve apenas áreas cerebrais e sim circuitarias complexas, tornando difícil uma comparação e estabelecimento de paralelos entre as ativações cerebrais. Resultados falsos positivos ou negativos podem ser obtidos em alguns estudos devido ao número limitado de animais ou pessoas disponíveis para a análise bem como métodos variados e inconsistentes de análise e processamento de dados.

Em linhas gerais, o estresse psicológico tende a causar um aumento na captação de [^{14}C]-2DG principalmente nas regiões corticais e límbicas (FrA, Cg, PrL, IL, Pir, BLA, Ce, Cpu, AcbC, STMV e STLV) com poucas excessões (STMA) e o estresse físico tende a causar uma maior ativação das áreas hipocampais (CA1, CA2, CA3, MoDG, GrDG). Nas áreas hipotalâmicas ambos os estresses parecem estimular, de formas variadas, essas regiões. Assim, os resultados apresentados na figura 4 suportam os resultados anteriores do laboratório, mostrando que há diferentes padrões de ativação cerebral com os diferentes tipos de estresses.

No estresse físico todas as áreas analisadas apresentaram aumento no consumo de [^{14}C]-2DG, indo ao encontro dos resultados do mapeamento da atividade da citocromo c oxidase (ANEXO C) (HOMEM, 2017). A citocromo c oxidase é uma enzima mitocondrial que está diretamente relacionada a produção de ATP (HARRO et al., 2011). Assim, essa categoria de estresse parece demandar maior energia das áreas cerebrais tanto em uma janela temporal curta, medida através do consumo de [^{14}C]-2DG (figura 4), em uma janela intermediária como observado na expressão da proteína Fos (figura 10), bem como em uma janela temporal maior, mostrando alterações mais duradouras de atividade cerebral, medidas através da atividade da enzima citocromo c oxidase (ANEXO C). Assim, esses resultados mostram que a exposição prolongada a estresses pode causar uma mudança na expressão das enzimas mitocondriais, servindo de indicação de que podem ocorrer alterações de longo prazo nas funções de circuitos cerebrais.

6 CONCLUSÕES

- Existem diferentes padrões de ativação cerebral nos diferentes tipos de estresse, o que já havíamos observado em alguns estudos anteriores do laboratório. Neste caso, o mapeamento da atividade cerebral metabólica refletida imediatamente após o estresse mostra o estresse psicológico relacionado a uma maior demanda energética pelas partes corticais e límbicas, responsáveis pelo processamento das emoções, enquanto o estresse físico tende a ativar principalmente as regiões hipocampais. Ambos os estresses ativaram as áreas hipotalâmicas.
- O mapeamento por [^{14}C]-2DG não é um bom modelo para avaliar a ativação de áreas cerebrais de animais submetidos ao nado. Estresses que envolvem atividade física intensa levam a uma estimação errônea de consumo de [^{14}C]-2DG pelo cérebro, pois o ato da atividade física provoca grande demanda glicêmica por outros órgãos.
- O estressor misto, que tem como mediadores tanto o CRF quanto a AVP, causou aumento na atividade neural pela expressão da proteína Fos tanto na região magnocelular PaLM quanto na região parvocelular PaMP do hipotálamo, o que reforça a noção de potencialização entre esses mediadores na secreção de ACTH.
- Aparentemente o estresse físico, por mais curto que seja seu tempo de exposição quando comparado aos estresses misto e psicológico, parece ativar mais fortemente as vias autonômicas, refletindo maior expressão da proteína Fos nas regiões PaDC e PaV.
- O uso de uma mesma metodologia, no mesmo laboratório permitiu a comparação da ação dos diferentes estresses sobre a ativação cerebral.
- Desejamos ampliar os dados do mapeamento da expressão da proteína Fos para outras áreas que foram mapeadas por [^{14}C]-2DG, para traçar um panorama mais completo.

REFERÊNCIAS

AGUILERA, G.; RABADAN-DIEHL, C. Vasopressinergic regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: Implications for stress adaptation. **Regulatory Peptides**, v. 96, n. 1–2, p. 23–29, 2000.

ALVAREZ, R. P. et al. Phasic and sustained fear in humans elicits distinct patterns of brain activity. **NeuroImage**, v. 55, n. 1, p. 389–400, 2011.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**. Fourth ed. Washington, DC: American Psychiatric Association, 1994.

ASNIS, G. M. et al. The cortisol response to desipramine in endogenous depressives and normal controls: Preliminary findings. **Psychiatry Research**, v. 14, n. 3, p. 225–233, 1985.

BALE, T. L. Stress sensitivity and the development of affective disorders. **Hormones and Behavior**, v. 50, n. 4, p. 529–533, 2006.

BAO, A. M.; MEYNEN, G.; SWAAB, D. F. The stress system in depression and neurodegeneration: Focus on the human hypothalamus. **Brain Research Reviews**, v. 57, n. 2, p. 531–553, 2008.

BREMNER, J. D. et al. Hippocampal volume reduction in major depression. **American Journal of Psychiatry**, v. 157, n. 1, p. 115–117, 2000.

BRODY, A. L. et al. Regional brain metabolic changes in patients with major depression treated with either paroxetine or interpersonal therapy: Preliminary findings. **Archives of General Psychiatry**, v. 58, n. 7, p. 631–640, 2001.

BROWN, A. S. et al. Dopamine and depression. **Journal of Neural Transmission - General Section**, v. 91, n. 2–3, p. 75–109, 1993.

BURCELIN, R.; DOLCI, W.; THORENS, B. Glucose sensing by the hepatoportal sensor is GLUT2-dependent: In vivo analysis in GLUT2-null mice. **Diabetes**, v. 49, n. 10, p. 1643–1648, 2000.

CABIB, S.; PUGLISI-ALLEGRA, S. Stress, depression and the mesolimbic dopamine system. **Stress: The International Journal on the Biology of Stress**, p. 331–342, 1996.

CAFFÉ, A. R.; VAN LEEUWEN, F. W.; LUITEN, P. G. M. Vasopressin cells in the medial amygdala of the rat project to the lateral septum and ventral hippocampus. **Journal of Comparative Neurology**, v. 261, n. 2, p. 237–252, 1987.

CAMPBELL, S. et al. Lower Hippocampal Volume in Patients Suffering from depression: A Meta-Analysis. **American Journal of Psychiatry**, v. 161, n. 4, p. 598–607, 2004.

CARLSON, P. J. et al. Neural circuitry and neuroplasticity in mood disorders: Insights for novel therapeutic targets. **NeuroRx**, v. 3, n. 1, p. 22–41, 2006.

CHARNEY, D. S. Monoamine dysfunction and the pathophysiology and treatment of depression. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 59, n. SUPPL. 14, p. 11–14, 1998.

CHEN, V. C. H. et al. Assessment of brain functional connectome alternations and correlation with depression and anxiety in major depressive disorders. **PeerJ**, v. 2017, n. 11, p. 1–16, 2017.

CHROUSOS, G. P.; GOLD, P. W. The concepts of stress and stress system disorders. **Jama**, v. 267, n. 9, p. 1244–1252, 1992.

COLLA, M. et al. Hippocampal volume reduction and HPA-system activity in major depression. **Journal of Psychiatric Research**, v. 41, n. 7, p. 553–560, 2007.

COWEN, P. J. Serotonin and depression: pathophysiological mechanism or marketing myth? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 29, n. 9, p. 433–436, 2008.

CULLINAN, W. E. et al. Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. **Neuroscience**, v. 64, n. 2, p. 477–505, 1995.

CULLINAN, W. E.; HERMAN, J. P.; WATSON, S. J. Ventral subicular interaction with the hypothalamic paraventricular nucleus: Evidence for a relay in the bed nucleus of the stria terminalis. **Journal of Comparative Neurology**, v. 332, n. 1, p. 1–20, 1993.

CZÉH, B. et al. Animal models of major depression and their clinical implications. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 64, p. 293–310, 2016.

DAVIS, M. The Role Of The Amygdala In Fear And Anxiety. **Annual Review of Neuroscience**, v. 15, n. 1, p. 353–375, 1992.

DAYAS, C. V. et al. Stressor categorization: Acute physical and psychological stressors elicit distinctive recruitment patterns in the amygdala and in medullary noradrenergic cell groups. **European Journal of Neuroscience**, v. 14, n. 7, p. 1143–1152, 2001.

DE CURTIS, M. et al. Piriform cortex ictogenicity in vitro. **Experimental Neurology**, v. 321, n. February, p. 113014, 2019.

DE KLOET, E. R.; JOËLS, M.; HOLSBOER, F. Stress and the brain: From adaptation to disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 6, n. 6, p. 463–475, 2005.

DONOHUE, J. M.; PINCUS, H. A. Reducing the societal burden of depression: a review of economic costs, quality of care and effects of treatment. **Pharmacoeconomics**, v. 25, n. 1, p. 7–24, 2007.

DREVETS, W. C. Prefrontal cortical-amygdalar metabolism in major depression. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 877, p. 614–637, 1999.

DREVETS, W. C. Neuroimaging studies of mood disorders. **Biological Psychiatry**, v. 48, n. 8, p. 813–829, 2000.

DREVETS, W. C.; BOGERS, W.; RAICHLE, M. E. Functional anatomical correlates of antidepressant drug treatment assessed using PET measures of regional glucose metabolism. **European Neuropsychopharmacology**, v. 12, n. 6, p. 527–544, 2002.

DUMAN, R. S.; MONTEGGIA, L. M. A Neurotrophic Model for Stress-Related Mood Disorders. **Biological Psychiatry**, v. 59, n. 12, p. 1116–1127, 2006.

DUNCAN, G. E. et al. Functional classification of antidepressants based on antagonism of swim stress-induced fos-like immunoreactivity. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 277, n. 2, p. 1076–1089, 1996.

DUNCAN, G. E.; JOHNSON, K. B.; BREESE, G. R. Topographic patterns of brain activity in response to swim stress: Assessment by 2-deoxyglucose uptake and expression of Fos-like immunoreactivity. **Journal of Neuroscience**, v. 13, n. 9, p. 3932–3943, 1993.

FORBES, E. E. et al. Altered striatal activation predicting real-world positive affect in adolescent major depressive disorder. **American Journal of Psychiatry**, v. 166, n. 1, p. 64–73, 2009.

FRAZER, A. et al. Alterations in monoamine-containing neuronal function due to administration of antidepressants repeatedly to rats. **Neuropsychopharmacology**, p. 21–34, 1982.

GAO, S. F.; BAO, A. M. Corticotropin-releasing hormone, glutamate, and γ-aminobutyric acid in depression. **Neuroscientist**, v. 17, n. 1, p. 124–144, 2011.

GARCÍA-SEVILLA, J. A. et al. Up-regulation of immunolabeled α(2A)-adrenoceptors, G(i) coupling proteins, and regulatory receptor kinases in the prefrontal cortex of depressed suicides. **Journal of Neurochemistry**, v. 72, n. 1, p. 282–291, 1999.

GOLD, P. W. The organization of the stress system and its dysregulation in depressive illness. **Molecular Psychiatry**, v. 20, n. 1, p. 32–47, 2015.

GOLD, P. W.; MACHADO-VIEIRA, R.; PAVLATOU, M. G. Clinical and biochemical manifestations of depression: Relation to the neurobiology of stress. **Neural Plasticity**, v. 2015, p. 7–9, 2015.

GUO, Q. et al. Whole-brain mapping of inputs to projection neurons and cholinergic interneurons in the dorsal striatum. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, p. 1–15, 2015.

HAENISCH, B.; BÖNISCH, H. Depression and antidepressants: Insights from knockout of dopamine, serotonin or noradrenaline re-uptake transporters. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 129, n. 3, p. 352–368, 2011.

HARRO, J. et al. Mapping patterns of depression-related brain regions with cytochrome oxidase histochemistry: Relevance of animal affective systems to human disorders, with a focus on resilience to adverse events. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 35, n. 9, p. 1876–1889, 2011.

HAYLEY, S. et al. The pathogenesis of clinical depression: Stressor- and cytokine-induced alterations of neuroplasticity. **Neuroscience**, v. 135, n. 3, p. 659–678, 2005.

HEDIGER, M. A. et al. Expression cloning and cDNA sequencing of the Na+/glucose co-transporter. **Nature**, v. 330, n. 6146, p. 379–381, 1987.

HEERINGEN, C. VAN; BIJTTEBIER, S.; GODFRIN, K. Neuroscience and Biobehavioral Reviews Suicidal brains : A review of functional and structural brain studies in association with suicidal behaviour. v. 35, p. 688–698, 2011.

HERMAN, J. P.; CULLINAN, W. E. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo–pituitary–adrenocortical axis. **Trends in Neurosciences**, v. 20, n. 2, p. 78–84, 1997.

HIRSCHFELD, R. M. A. History and evolution of the monoamine hypothesis of depression. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 61, n. SUPPL. 6, p. 4–6, 2000.

HODGE, G. K.; BUTCHER, L. L. Pars compacta of the substantia nigra modulates motor activity but is not involved importantly in regulating food and water intake. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 313, n. 1, p. 51–67, 1980.

HOLMES, A. et al. Neuropeptide systems as novel therapeutic targets for depression and anxiety disorders. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 24, n. 11, p. 580–588, 2003.

HOMEM, K. S. DE C. **Avaliação do modelo animal de anedonia/depressão induzida por Estresse Leve Crônico em ratos**. 2017. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

HWANG, J. W. et al. Enhanced default mode network connectivity with ventral striatum in subthreshold depression individuals. **Journal of Psychiatric Research**, v. 76, p. 111–120, 2016.

IKEMOTO, S.; YANG, C.; TAN, A. Basal ganglia circuit loops, dopamine and motivation: A review and enquiry. **Behavioural Brain Research**, v. 290, p. 17–31, 2015.

JACOBSON, L.; SAPOLSKY, R. The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. **Endocrine Reviews**, v. 12, n. 2, p. 118–134, 1991.

JEON, S. W.; KIM, Y. K. Molecular neurobiology and promising new treatment in depression. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 3, p. 381, 2016.

KELLER-WOOD, M. E.; DALLMAN, M. F. Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. **Endocrine Reviews**, v. 5, n. 1, p. 1–24, 1984.

KOVÁCS, K. J.; SAWCHENKO, P. E. Regulation of stress-induced transcriptional changes in the hypothalamic neurosecretory neurons. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 7, n. 2, p. 125–133, 1996.

LEDOUX, J. E. et al. Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. **Journal of Neuroscience**, v. 8, n. 7, p. 2517–2529, 1988.

LEE, S. K.; RYU, P. D.; LEE, S. Y. Differential distributions of neuropeptides in hypothalamic paraventricular nucleus neurons projecting to the rostral ventrolateral medulla in the rat. **Neuroscience Letters**, v. 556, p. 160–165, 2013.

LENG, G.; RUSSELL, J. A. The osmoresponsiveness of oxytocin and vasopressin neurones: Mechanisms, allostasis and evolution. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 31, n. 3, p. 0–2, 2019.

LEONARD, B. E. Psychopathology of depression. **Drugs of Today**, v. 43, n. 10, p. 705–716, 2007.

LESCH, K. P. Gene-environment interaction and the genetics of depression. **Journal of Psychiatry and Neuroscience**, v. 29, n. 3, p. 174–184, 2004.

LIMA, M. M. S.; REKSIDLE, A. B. B.; VITAL, M. A. B. F. Birth, life and death of dopaminergic neurons in the substantia nigra. **Journal of neural transmission. Supplementum**, v. 73, n. 73, 2009.

LIN, X. et al. c-Fos mapping of brain regions activated by multi-modal and electric foot shock stress. **Neurobiology of Stress**, v. 8, n. February, p. 92–102, 2018.

LIPOSITS, Z.; PHELIX, C.; PAULL, W. K. Electron microscopic analysis of tyrosine hydroxylase, dopamine-β-hydroxylase and phenylethanolamine-N-methyltransferase immunoreactive innervation of the hypothalamic paraventricular nucleus in the rat. **Histochemistry**, v. 84, n. 2, p. 105–120, 1986.

LU, J. S. et al. Characterization of the anterior cingulate cortex in adult tree shrew. **Molecular Pain**, v. 12, p. 1–11, 2016.

MAREK, R. et al. Excitatory connections between the prelimbic and infralimbic medial prefrontal cortex show a role for the prelimbic cortex in fear extinction. **Nature Neuroscience**, v. 21, n. 5, p. 654–658, 2018.

MAYER, E. A. et al. Gut Microbes and the Brain: Paradigm Shift in Neuroscience. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 46, p. 15490–15496, 2014.

MCEWEN, B. S. Glucocorticoids, depression, and mood disorders: Structural remodeling in the brain. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 54, n. 5 SUPPL., p. 20–23, 2005.

MOTTA, S. C.; CAROBREZ, A. P.; CANTERAS, N. S. The periaqueductal gray and primal emotional processing critical to influence complex defensive responses, fear learning and reward seeking. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 76, p. 39–47, 2017.

MUECKLER, M. et al. Sequence and structure of a human glucose transporter. **Science**, v. 229, n. 4717, p. 941–945, 1985.

MURRAY, E. A.; WISE, S. P.; DREVETS, W. C. Localization of dysfunction in major depressive disorder: Prefrontal cortex and amygdala. **Biological Psychiatry**, v. 69, n. 12, p. e43–e54, 2011.

MYERS, B. et al. Central stress-integrative circuits: Forebrain glutamatergic and GABAergic projections to the dorsomedial hypothalamus, medial preoptic area, and bed nucleus of the stria terminalis. **Brain Structure and Function**, v. 219, n. 4, p. 1287–1303, 2014.

MYERS, B.; MCKLVEEN, J. M.; HERMAN, J. P. Neural regulation of the stress response: The many faces of feedback. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 32, n. 5, p. 683–694, 2012.

NAKAMURA, H.; KATAYAMA, Y.; KAWAKAMI, Y. Hippocampal CA1/subiculum-prefrontal cortical pathways induce plastic changes of nociceptive responses in cingulate and prelimbic areas. **BMC Neuroscience**, v. 11, p. 1–9, 2010.

NAKAYAMA, D. et al. Frontal association cortex is engaged in stimulus integration during associative learning. **Current Biology**, v. 25, n. 1, p. 117–123, 2015.

NESTLER, E. J. et al. Neurobiology of depression. **Neuron**, v. 34, n. 1, p. 13–25, 2002.

NESTLER, E. J.; CARLEZON, W. A. The Mesolimbic Dopamine Reward Circuit in Depression. **Biological Psychiatry**, v. 59, n. 12, p. 1151–1159, 2006.

NEUMEISTER, A. et al. Effects of a α2C-adrenoreceptor gene polymorphism on neural responses to facial expressions in depression. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 8, p. 1750–1756, 2006.

ONGUR, D. The Organization of Networks within the Orbital and Medial Prefrontal Cortex of Rats, Monkeys and Humans. **Cerebral Cortex**, v. 10, n. 3, p. 206–219, 2000.

PACAK, K. et al. Heterogeneous neurochemical responses to different stressors: a test of Selye's doctrine of nonspecificit. **Progress in Neurobiology**, v. 35, n. 3, p. 195–215, 1990.

PACAK, K. et al. Noradrenergic activation in the paraventricular nucleus during acute and chronic immobilization stress in rats: an in vivo microdialysis study. **Brain Research**, v. 589, n. 1, p. 91–96, 1992.

PACÁK, K.; PALKOVITS, M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: Implications for stress-related disorders. **Endocrine Reviews**, v. 22, n. 4, p. 502–548, 2001.

PALKOVITS, M. et al. Noradrenergic innervation of the rat hypothalamus: Experimental biochemical and electron microscopic studies. **Brain Research**, v. 191, n. 1, p. 161–171, 1980.

PEREIRA, L. O.; LANCHA, A. H. Effect of insulin and contraction up on glucose transport in skeletal muscle. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 84, n. 1, p. 1–27, 2004.

PLOTSKY, P. M. Facilitation of immunoreactive corticotropin-releasing factor secretion into the hypophysial-portal circulation after activation of catecholaminergic pathways or central norepinephrine injection. **Endocrinology**, v. 121, n. 3, p. 924–930, 1987.

POMPILI, M. et al. Agomelatine, a novel intriguing antidepressant option enhancing neuroplasticity: A critical review. **World Journal of Biological Psychiatry**, v. 14, n. 6, p. 412–431, 2013.

PRICE, J. L.; DREVETS, W. C. Neural circuits underlying the pathophysiology of mood disorders. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 16, n. 1, p. 61–71, 2012.

QIU, H.; LI, J. Major Depressive Disorder and Magnetic Resonance Imaging: A Mini-Review of Recent Progress. **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, n. 22, p. 2524–2529, 2018.

RAMOS, A. DE T. et al. Drug-induced suppression of ACTH secretion does not promote anti-depressive or anxiolytic effects. **Behavioural Brain Research**, v. 265, p. 69–75, 2014.

RAMOS, A. T.; TRONCONE, L. R. P.; TUFIK, S. Suppression of adrenocorticotrophic hormone secretion by simultaneous antagonism of vasopressin 1b and CRH-1 receptors on three different stress models. **Neuroendocrinology**, v. 84, n. 5, p. 309–316, 2007.

ROLAND, B. L.; SAWCHENKO, P. E. Local origins of some GABAergic projections to the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 332, n. 1, p. 123–143, 1993.

ROOZENDAAL, B.; MCEWEN, B. S.; CHATTARJI, S. Stress, memory and the amygdala. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 6, p. 423–433, 2009.

ROSENBLAT, J. D. et al. Inflamed moods: A review of the interactions between inflammation and mood disorders. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 53, p. 23–34, 2014.

RUHÉ, H. G.; MASON, N. S.; SCHENE, A. H. Mood is indirectly related to serotonin, norepinephrine and dopamine levels in humans: A meta-analysis of monoamine depletion studies. **Molecular Psychiatry**, v. 12, n. 4, p. 331–359, 2007.

SANTARELLI, L. et al. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. **Science**, v. 301, n. 5634, p. 805–9, 2003.

SAWCHENKO, P. E.; LI, H. Y.; ERICSSON, A. Circuits and mechanisms governing hypothalamic responses to stress: A tale of two paradigms. **Progress in Brain Research**, v. 122, p. 61–78, 2000.

SAWCHENKO, P. E.; SWANSON, L. W. The organization of noradrenergic pathways from the brainstem to the paraventricular and supraoptic nuclei in the rat. **Brain Research Reviews**, v. 4, n. 3, p. 275–325, 1982.

SCHEEPERS, A.; JOOST, H. G.; SCHÜRMANN, A. The glucose transporter families SGLT and GLUT: Molecular basis of normal and aberrant function. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 28, n. 5, p. 364–371, 2004.

SEEDAT, S. et al. Cross-national associations between gender and mental disorders in the World Health Organization World Mental Health Surveys. **Arch Gen Psychiatry**, v. 66, n. 7, p. 785–795, 2009.

SIEVER, L. J.; DAVIS, K. L. Overview: Toward Hypothesis of Depression. **American Journal of Psychiatry**, v. 14, n. September, p. 1017–1031, 1985.

SILVA, C.; MCNAUGHTON, N. Are periaqueductal gray and dorsal raphe the foundation of appetitive and aversive control? A comprehensive review. **Progress in Neurobiology**, v. 177, n. October 2018, p. 33–72, 2019.

SOBOCKI, P. et al. Cost of depression in Europe. **Journal of Mental Health Policy and Economics**, v. 9, n. 2, p. 87–98, 2006.

SOKOLOFF, L. et al. The [14 C]Deoxyglucose Method for the Measurement of Local Cerebral Glucose Utilization: Theory, Procedure, and Normal Values in the Conscious and Anesthetized Albino Rat. **Journal of Neurochemistry**, v. 28, n. 5, p. 897–916, 1977.

SOKOLOFF, L. Localization of functional activity in the central nervous system by measurement of glucose utilization with radioactive deoxyglucose. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 1, n. 1, p. 7–36, 1981.

SOKOLOFF, L. The physiological and biochemical bases of functional brain imaging. **Cognitive Neurodynamics**, v. 2, n. 1, p. 1–5, 2008.

SOLS, A.; CRANE, R. K. Substrate specificity of brain hexokinase. **J.Biol.Chem**, v. 210, p. 581–595, 1954.

SOSA, M.; GILLESPIE, A. K.; FRANK, L. Neural Activity Patterns Underlying Spatial Coding in the Hippocampus. **Curr Top Behav Neurosci**, v. 37, p. 43–100, 2018.

STONE, E. A. et al. Central α1-adrenergic system in behavioral activity and depression. **Biochemical Pharmacology**, v. 73, n. 8, p. 1063–1075, 2007.

STURM, V. et al. The nucleus accumbens: A target for deep brain stimulation in obsessive-compulsive- and anxiety-disorders. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 26, n. 4, p. 293–299, 2003.

SWANSON, L. W. et al. An immunohistochemical study of the organization of catecholaminergic cells and terminal fields in the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus. **Journal of Comparative Neurology**, v. 196, n. 2, p. 271–285, 1981.

SWANSON, L. W.; SAWCHENKO, P. E. Hypothalamic Integration: Organization of the Paraventricular and Supraoptic Nuclei. **Annual Review of Neuroscience**, v. 6, n. 1, p. 269–324, 1983.

THOERINGER, C. K. et al. Association of a Met88Val diazepam binding inhibitor (DBI) gene polymorphism and anxiety disorders with panic attacks. **Journal of Psychiatric Research**, v. 41, n. 7, p. 579–584, 2007.

TRONCONE, L. R. P. et al. Regional brain c-fos activation associated with penile erection and other symptoms induced by the spider toxin Tx2-6. **Toxicon**, v. 58, n. 2, p. 202–208, 2011.

TRONCONE, L. R. P.; TUFIK, S. Effects of selective adrenoceptor agonists and antagonists on aggressive behavior elicited by apomorphine, DL-DOPA and fusaric acid in REM-sleep-deprived rats. **Physiology and Behavior**, v. 50, n. 1, p. 173–178, 1991.

TZAKIS, N.; HOLAHAN, M. R. Social Memory and the Role of the Hippocampal CA2 Region. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 13, n. October, p. 1–15, 2019.

VIDEBECH, P.; RAVNKILDE, B. Reviews and Overviews Hippocampal Volume and Depression : A Meta-Analysis of MRI Studies. **Am J Psychiatry**, v. 161, p. 1957–1966, 2004.

WAHREN, J. et al. Glucose metabolism during leg exercise in man. **The Journal of clinical investigation**, v. 50, n. 12, p. 2715–2725, 1971.

WALKER, D. L.; DAVIS, M. Double dissociation between the involvement of the bed nucleus of the stria terminalis and the central nucleus of the amygdala in startle increases produced by conditioned versus unconditioned fear. **The Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 23, p. 9375–9383, 1997.

WERNER, N. S. et al. Functional MRI study of memory-related brain regions in patients with depressive disorder. **Journal of Affective Disorders**, v. 119, n. 1–3, p. 124–131, 2009.

WEST, E. A.; CARELLI, R. M. Nucleus accumbens core and shell differentially encode Reward-Associated cues after reinforcer devaluation. **Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 4, p. 1128–1139, 2016.

WESTERHAUS, M. J.; LOEWY, A. D. Sympathetic-related neurons in the preoptic region of the rat identified by viral transneuronal labeling. **Journal of Comparative Neurology**, v. 414, n. 3, p. 361–378, 1999.

WILLIAMS, D. R. et al. Prevalence and Distribution of Major Depressive Disorder in African Americans, Caribbean Blacks, and Non-Hispanic Whites. **Archieves Gen Psychiatry**, v. 64, n. March, p. 305–315, 2007.

ZARATE, C. A. et al. A Randomized Trial of an N-methyl-D-aspartate Antagonist in Treatment-Resistant Major Depression. **Arch Gen Psychiatry**, v. 63, n. 8, p. 856–864, 2006.

ZELENA, D. et al. Periaqueductal gray and emotions: The complexity of the problem and the light at the end of the tunnel, the magnetic resonance imaging. **Endocrine Regulations**, v. 52, n. 4, p. 222–238, 2018.

ANEXOS

ANEXO A - Carta de aprovação do comitê de ética e pesquisa do Instituto Butantan

Av Vital Brasil 1500 - Casa 82
05503-900 São Paulo SP
T +55 11 3723-2132
ceuaib@butantan.gov.br
www.butantan.gov.br

butantan

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUAIB)
INSTITUTO BUTANTAN

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Investigação e aperfeiçoamento do modelo do Estresse leve crônico e imprevisível (UCMS) para teste de antidepressivos", **protocolo nº 1175/13**, sob a responsabilidade de Lanfranco Ranieri Paolo Troncone e Adriana de Toledo Ramos e Karen Silvia de Carvalho Homem – que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 20/6/2018.

This is to certify that the proposal "Investigation and improvements on the Unpredictable Chronic Mild Stress test for antidepressants", **protocol nº 1175/13**, under the responsibility of Lanfranco Ranieri Paolo Troncone and Adriana de Toledo Ramos e Karen Silvia de Carvalho Homem – which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings) – has been reviewed by the Institute Butantan Animal Care and Use Committee and approved in 6/20/2018. This proposal is in accordance with standards outlined by Brazilian laws for use of experimental animals, and with ethical principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation.

Vigência do Projeto: 05/2014 - 12/2018	**Nº de animais/espécie**	**Observação**
Laboratório de Farmacologia	Sem adição de animais	Prorrogação de vigência

São Paulo, 20 de junho de 2018

Maria Leonor Sarno de Oliveira

Dra. Maria Leonor Sarno de Oliveira
Coordenadora da CEUAIB

ANEXO B - Carta de aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantam, constando o novo número do protocolo.

butantan *Comissão de Ética no Uso de Animais*

São Paulo, 10 de dezembro de 2018
CEUA N 6398181018

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Lanfranco R. P. Troncone
Área: Farmacologia

Título da proposta: "Investigação e aperfeiçoamento do modelo do Estresse leve crônico e imprevisível (UCMS) para teste de antidepressivos (antigo 1175/13)".

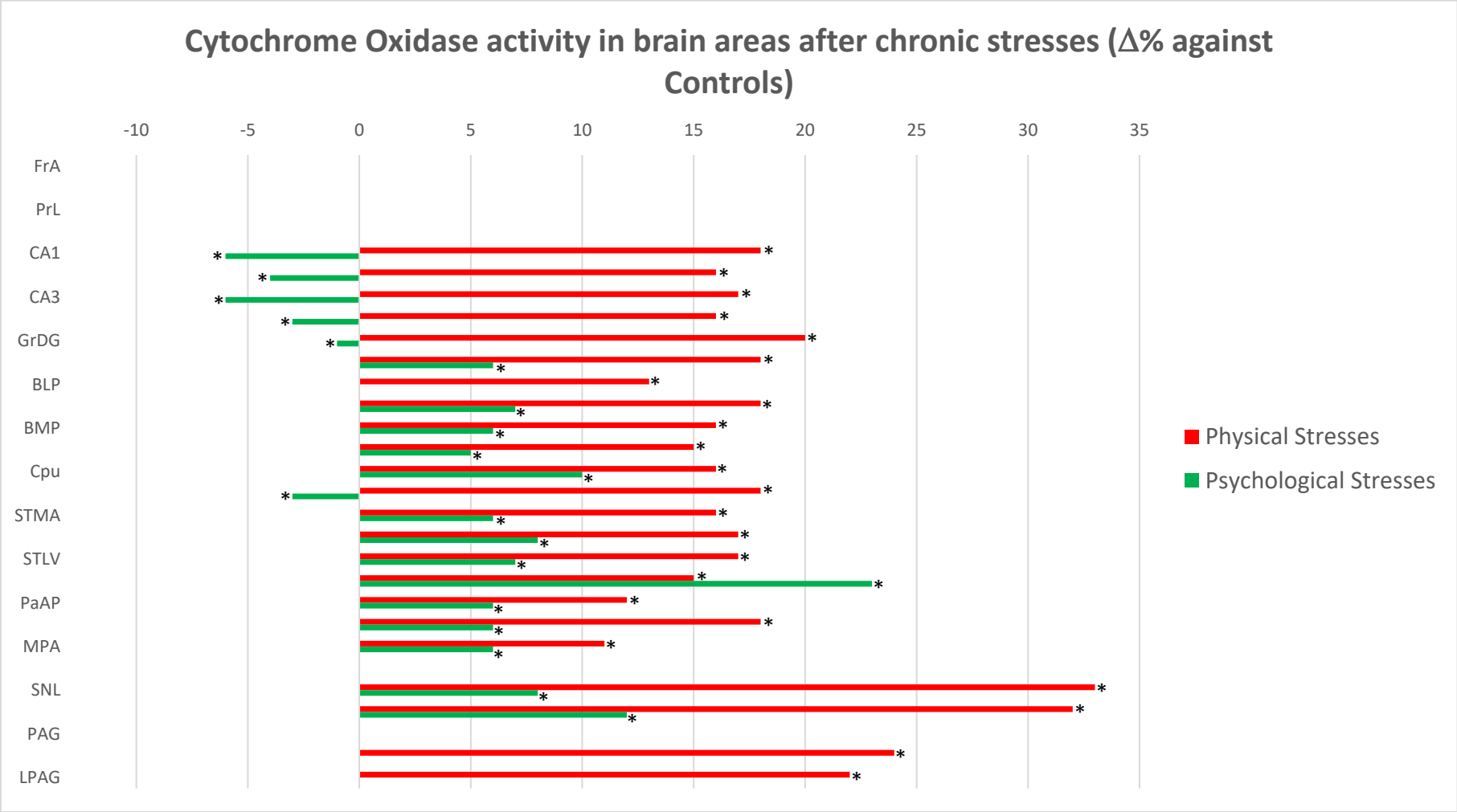
Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais IB (ID 001702)

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 04/dezembro/2018) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "O laboratório de Farmacologia está em processo de mudança para o prédio novo (107). E vista disso não pudemos iniciar os protocolos experimentais sob risco de sermos colhidos em meio a mudança. Nesse momento a data da mudança de prédio se definiu e terá lugar em Janeiro de 2019. Assim, o protocolo será retomado após amudança e será cumprido de forma segura. Solicitamos a prorrogação da vigência para dezembro de 2019.".

Comentário da CEUA: "".

Maria Leonor Sarno de Oliveira
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

Nancy Oguiura
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

ANEXO C - Figura ilustrativa dos dados ainda não publicados e pertencentes a Doutora Karen Silvia de Carvalho Homem, mostrando os resultados obtidos no mapeamento cerebral da atividade da citocromo c oxidase depois de estresses psicológicos e físicos aplicados em protocolo de UCMS. Os resultados mostram a porcentagem de variação da atividade da citocromo oxidase em relação ao grupo controle. Anova de uma via seguida de Bonferroni. *p≤0,05.