

GISELE PEREIRA DIAS

PROLIFERAÇÃO CELULAR E CARACTERIZAÇÃO
COMPORTAMENTAL E COGNITIVA NUM MODELO ANIMAL DE
TRANSTORNO DE ANSIEDADE GENERALIZADA

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO DE JANEIRO VISANDO À OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)



**Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Dias, Gisele Pereira.

PROLIFERAÇÃO CELULAR E CARACTERIZAÇÃO COMPORTAMENTAL E
COGNITIVA NUM MODELO ANIMAL DE TRANSTORNO DE ANSIEDADE
GENERALIZADA/ v1, 118/f

Dissertação: Mestrado em Ciências Biológicas (Biofísica)

Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF), 2009.

Orientação: Patrícia Franca Gardino.

1. Ansiedade 2. Medo Condicionado 3. Comportamento 4. Hipocampo
5. Neurogênese

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Neurobiologia da Retina do programa de Neurobiologia do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da UFRJ sob orientação da Professora Patrícia Franca Gardino na vigência de auxílios concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Conselho de Ensino para Graduados da UFRJ (CEPEG-UFRJ), PRONEX e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

LISTA DE ABREVIações

ACTH – hormônio adrenocorticotrófico

BrdU – bromo deoxiuridina

BSA - soro de albumina bovino

CAC – cariocas de alto congelamento (linhagem de rato para medo/ansiedade)

CA1 – corno de Amon 1

CA3 - corno de Amon 3

5-HT – 5-hidroxitriptamina (serotonina)

5-HT_{1A} – receptor serotoninérgico tipo 1A

CRH – hormônio liberador de corticotrofina

CTRL – grupo controle

DAPI – 4', 6-diamidino-2-fenilindol

DCX - doublecortina

dPAG – matéria cinzenta periaquedutal dorsal

DSM-IV – Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais

GABA - ácido gama-amino butírico

GABA_A – receptor GABAérgico tipo A

GABA_B – receptor GABAérgico tipo B

GABA_C – receptor GABAérgico tipo C

GD – giro denteado

HPA – eixo hipotálamo-pituitária-adrenal

LCE – labirinto em cruz elevado

8-OH-DPAT - 8-hidroxi-2-(di-n-propilamino)tetralino (agonista de receptor 5-HT_{1A})

PAG – matéria cinzenta periaquedutal

SERT – transportador de serotonina

SNC – sistema nervoso central

TAG – transtorno de ansiedade generalizada

TEPT – transtorno de estresse pós-traumático

TOC – transtorno obsessivo-compulsivo

vPAG – matéria cinzenta periaquedutal ventral

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me permitido nascer em uma família que valoriza o estudo e o conhecimento. Obrigada, Senhor, pela minha vida, pelo meu trabalho, por tudo.

Agradeço muito especialmente aos meus pais, Leda Regina e Nilton, que com muito amor e incessante orientação, guiaram minha vida para o melhor caminho, sempre. À minha irmã, Clarisse, devo praticamente tudo o que sou. Vocês sempre foram meu exemplo, meu modelo, meu tudo. Amo vocês mais que a mim mesma!

Agradeço à minha orientadora, Prof^a Patricia Gardino, por ter me desenvolvido como cientista, dando-me autonomia para pensar projetos e experimentos e fornecendo todo o suporte para que meus sonhos de pesquisadora se realizassem. Ainda, por ser uma presença agradável, amiga e conciliadora em todas as horas.

Ao Prof^o Landeira-Fernandez, por acreditar em uma psicologia que dialoga com as neurociências e permitir que esse diálogo ocorresse em minha vida.

Ao meu namorado Fabrício (meu ursinho!), que esteve comigo em grande parte desta jornada, apoiando-me em todos os aspectos e em todos os momentos. Obrigada, lindinho, por dar asas aos meus sonhos. Amo você!

À minha tia Maria, por abraçar a mim e à minha irmã como filhas e cuidarem da gente por todos esses anos. Obrigada, tia, por nos mostrar que é possível ser um anjo nesse mundo.

Ao Bruno, o irmão mais lindo que a vida poderia me dar! Mandou bem, Clazinha!

Aos meus amigos Ana Cristina e Fabio, por me mostrarem que a vida sem amizade não faz sentido. Obrigada por colorirem meus dias com alegria e carinho!

À minha amada Mynhoca, por ser muito mais do que amiga, uma irmã inseparável. Só tenho a agradecer por ter você no meu caminho, sempre me mostrando que é possível ser feliz em qualquer situação!

Ao Mário, meu velho e bom Chino, por ser o melhor amigo que qualquer pessoa pode ter! Obrigada por ter sido o maior companheiro dessa trajetória; que Deus te abençoe sempre!!

À Anna Claudia, que bem poderia ser minha co-orientadora. Sem você, nada teria sido possível. Você e seu legado científico no laboratório fazem parte de cada pedacinho desse trabalho. Só tenho a te admirar; muito obrigada!

Ao Bolinho, meu filhinho Cristiano. Obrigada pelos melhores momentos de risos nessa jornada! Adoro você!

Aos Professores Jan Nora Hokoç, Fernando Mello e Maria Christina, por fazerem do conhecimento um projeto de vida e por fazerem do desenvolvimento de jovens cientistas uma meta diária. É uma honra compartilhar o mesmo ambiente de trabalho que vocês.

À Profª Leny, pela rica contribuição ao ser a revisora deste trabalho.

Aos Professores Jean-Christophe, Vânia e Eliane Volchan, por abrilhantarem esse momento tão inesquecível da minha vida. É uma honra tê-los como a banca desta dissertação.

Aos amigos Nilson e Bel, Marcinha e Renata, por serem uma presença sempre doce no laboratório.

A todos que participaram e acreditaram nesse trabalho, muito obrigada!

RESUMO

DIAS, Gisele Pereira. Proliferação celular e caracterização comportamental e cognitiva num modelo animal de Transtorno de Ansiedade Generalizada. Rio de Janeiro, 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Biofísica) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

A seleção de ratos pelo paradigma do medo condicionado possibilita o estudo de aspectos comportamentais e neurofisiológicos característicos do traço de medo, sendo uma importante ferramenta para investigar o papel de variáveis genéticas e sua interação com o ambiente na etiologia e no desenvolvimento de transtornos de ansiedade. O presente trabalho buscou caracterizar aspectos comportamentais, cognitivos e histológicos, bem como a neurogênese hipocampal, de um modelo animal de Transtorno de Ansiedade Generalizada, obtido a partir da seleção de ratos Wistar por condicionamento do medo. Os animais do grupo experimental, chamado CAC (Cariocas de Alto Congelamento), foram obtidos segundo protocolo descrito em trabalho anterior. Para a caracterização do comportamento ansioso, os animais foram testados nos testes de labirinto em cruz elevado (LCE) e de interação social, mostrando-se significativamente mais ansiosos do que os ratos do grupo controle (número de entrada nos braços abertos do LCE: $6,83 \pm 1,40$ CTRL; $3,44 \pm 0,72$ CAC; porcentagem do tempo nos braços abertos: $35,81\% \pm 4,52$ CTRL; $23,82\% \pm 3,41$ CAC; tempo gasto em comportamentos de interação social: $212,00 \pm 27,19$ CTRL; $70,33 \pm 9,60$ CAC), sem alteração da atividade locomotora, medida pelo número de entradas nos braços fechados do LCE e pela ambulação no teste de interação social. Tampouco houve diferenças entre os grupos no teste de depressão do nado forçado, indicando que as diferenças se restringem ao quadro de

ansiedade. Avaliação da memória e aprendizagem, por meio dos testes do labirinto em T e do reconhecimento de objetos, revelou que os grupos não diferem quanto à memória não-emocional. A estrutura cerebral de interesse para análises histológicas foi o hipocampo dorsal. Não houve diferença entre os grupos quanto à quantidade de células totais nessa estrutura, marcadas com DAPI. Injeções de BrdU e imuno-histoquímica para essa molécula, bem como para doublecortina (DCX), revelaram diferenças entre os grupos no que diz respeito à proliferação celular (células BrdU⁺/mm³: 281,80±68,76 CTRL; 145,20±13,21 CAC; células DCX⁺/mm³: 550,00±47,97 CTRL; 206,30±40,96 CAC). A análise qualitativa de cortes marcados para vermelho neutro não revelou diferenças entre os grupos quanto à morte celular no giro denteado, confirmando que a menor expressão de BrdU e de DCX no grupo CAC é indicativo de menor neurogênese. Tomados juntos, os resultados aqui apresentados mostram que a linhagem CAC representa um modelo adequado para estudos de ansiedade, uma vez que as diferenças entre ela e o grupo controle se mantêm em testes de ansiedade; não se devem a diferenças locomotoras e não se estendem a sistemas emocionais diversos, como a depressão. Já as diferenças neurofisiológicas entre os grupos possivelmente se devem a aspectos mais específicos que o número de células no hipocampo. Nesse sentido, a menor taxa de neurogênese hipocampal entre os animais mais ansiosos pode ser proposta como um dos possíveis mecanismos envolvidos na origem e no desenvolvimento do fenótipo ansioso.

Palavras-chave: ansiedade, medo, comportamento, hipocampo, neurogênese.

ABSTRACT

DIAS, Gisele Pereira. Proliferação celular e caracterização comportamental e cognitiva num modelo animal de Transtorno de Ansiedade Generalizada. Rio de Janeiro, 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Biofísica) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

Contextual fear-conditioning selection makes it possible to study behavioral and neurophysiological aspects of fear, consisting of an important tool to investigate the role of genetic variables and their interaction with the surrounding environment in the aetiology and development of anxiety disorders. The present work aimed to characterize behavioral, cognitive, and histological aspects, as well as hippocampal neurogenesis, of an animal model of Generalized Anxiety Disorder, obtained from the selection of Wistar rats by fear conditioning. The experimental group (CHF – Cariocas High-Freezing) was built according to a previously described protocol. For the characterization of anxious behavior, animals were tested in the elevated plus-maze (EPM) and in the social interaction test. CHF animals were significantly more anxious than control rats (number of entries in EPM open arms: $6,83 \pm 1,40$ CTRL; $3,44 \pm 0,72$ CHF; percentage of time spent in open arms: $35,81\% \pm 4,52$ CTRL; $23,82\% \pm 3,41$ CHF; time spent in social interaction behavior: $212,00 \pm 27,19$ CTRL; $70,33 \pm 9,60$ CHF), and it was not observed alteration in locomotor activity, measured by both the number of entries in closed arms of the EPM and the number of crossings in the social interaction arena. Similarly, it was not found differences between groups in the depression forced swimming test, indicating that the behavioral differences previously noticed were restricted to anxiety. Cognitive memory and learning were evaluated in the T-maze and the object recognition test, and the groups did not differ for non-

emotional memory. Histological analysis of the dorsal hippocampus was performed, and total cell quantification, stained with DAPI, was similar in both groups. BrdU injections and immunohistochemistry for this molecule, as well as for doublecortin (DCX), revealed differences between groups as for cellular proliferation (BrdU⁺ cells/mm³: 281,80±68,76 CTRL; 145,20±13,21 CHF; DCX⁺ cells/mm³: 550,00±47,97 CTRL; 206,30±40,96 CHF). Qualitative analysis of brain slices stained for neutral red did not reveal any differences between groups for cell death in the dentate gyrus, confirming that the lower expression of BrdU and DCX in the CHF group is indicative of lower neurogenesis. Taken together, these data show that the CHF line represents a robust model for anxiety studying, as differences in the experimental group are observed in different anxiety tests; differences do not account for locomotor activity and do not extend to other emotional systems, like depression. Neurophysiological differences between groups are possibly more specific than total hippocampal cell number. This way, the lower level of hippocampal neurogenesis among anxious animals can be suggested as one of the possible mechanisms involved in the origin and development of anxious phenotype.

Keywords: anxiety, fear, behavior, hippocampus, neurogenesis.

SUMÁRIO

FICHA CATALOGRÁFICA.....	
LISTA DE ABREVIACÕES.....	
AGRADECIMENTOS.....	
RESUMO.....	
ABSTRACT.....	
SUMÁRIO.....	

INTRODUÇÃO _____ 13

1 - Medo e Ansiedade _____ 13

1.1 - Definições _____ 13

1.2 - Medo e Ansiedade: similaridades e diferenças conceituais _____ 15

1.3. - Medo condicionado x medo incondicionado _____ 16

1.4 - Testes comportamentais para o estudo do medo/ ansiedade _____ 18

1.4.1 Labirinto em cruz elevado _____ 20

1.4.2 Interação social _____ 21

1.4.3 Aversão contextual _____ 22

1.4.4 Campo aberto _____ 24

1.5 Medo e ansiedade: bases neurobiológicas _____ 25

1.5.1 Medo/ ansiedade e hipocampo _____ 25

1.5.2 Medo/ ansiedade e neurogênese hipocampal _____ 30

1.5.3 Neurotransmissores envolvidos nas respostas de medo/ ansiedade _____ 34

1.5.4 Medo/ ansiedade e corticosterona _____ 39

1.6 Transtornos de Ansiedade _____ 40

1.6.1 Transtorno de Ansiedade Generalizada _____ 41

1.7 Modelos animais para estudo de medo/ ansiedade _____ 44

1.8 Medo/ ansiedade e depressão _____ 47

1.9 Medo/ ansiedade e aprendizagem _____ 48

OBJETIVOS _____ 51

MATERIAIS E MÉTODOS _____ 52

3.1 Animais _____ 52

3.1.1 Obtenção de linhagens de ratos selecionados para o medo condicionado _____ 52

3.1.2 Sujeitos _____ 54

3.2 Testes Comportamentais _____ 55

3.2.1 Labirinto em cruz elevado _____ 55

3.2.2 Interação social _____ 56

3.2.3 Nado forçado _____ 56

3.2.4 Aprendizagem operante – Labirinto em T _____ 57

3.2.4 Reconhecimento de objetos _____ 59

3.3 Hipocampo - Histologia _____ 61

3.3.1 Perfusão dos animais _____ 61

3.3.2 – Obtenção do tecido _____ 62

3.4 – Quantificação de células hipocampais _____ 62

3.4.1 – Marcação celular com DAPI _____ 62

3.5 – Neurogênese hipocampal _____ 63

3.5.1 – Administração de BrdU _____ 63

3.5.2 – Processamento imunohistoquímico	64
3.5.3 Imuno-histoquímica para BrdU	64
3.5.4 – Processamento imunohistoquímico para doublecortina	66
3.5.5 – Coloração com vermelho neutro	67
3.7 – Análises Estatísticas	67
RESULTADOS	68
4.1 Testes Comportamentais	68
4.1.1 Labirinto em cruz elevado	68
4.1.2 Interação social	71
4.1.3 Nado Forçado	74
4.1.4 Aprendizagem operante: labirinto em T	75
4.1.5 Teste de reconhecimento de objetos	76
4.2 Avaliações histológicas	78
4.2.1 Análise qualitativa do tecido hipocampal	78
4.2.2 Quantificação de células hipocampais	79
4.3 Imuno-histoquímica para BrdU	81
4.4 Imuno-histoquímica para doublecortina	82
4.5 Coloração para vermelho neutro	86
DISCUSSÃO	87
PERSPECTIVAS	103
CONCLUSÕES	105
REFERÊNCIAS	107

1 - Medo e Ansiedade

1.1 - Definições

Embora o medo e a ansiedade sejam experiências recorrentes e evolutivamente antigas para seres humanos e outros animais, não há ainda um consenso na definição destes dois fenômenos. Muitos são os conceitos disponíveis na literatura que tentam resumir o que seriam estas experiências, ora enfatizando sua dimensão subjetiva, ora focalizando seus aspectos comportamentais e fisiológicos. Dessa forma, a ansiedade pode ser definida como um estado subjetivo de apreensão ou tensão, induzido por uma expectativa de perigo ou um esforço especial (Kelly, 1980) ou mesmo como um sentimento de apreensão, difuso, altamente desagradável, freqüentemente vago e acompanhado por uma ou mais sensações físicas, tais como vazio no estômago, opressão no peito, palpitação, transpiração, etc. (Kaplan e Sadock, 1990). Outros autores defendem que a ansiedade pode ser considerada um impulso motivacional fundamental em muitas formas de comportamento, com um importante significado adaptativo e evolutivo (Tallman *et al.*, 1980). É interessante notar que a questão evolutiva - isto é, o medo e a ansiedade como características selecionadas ao longo da história filogenética das espécies que as apresentam, por sua função adaptativa e protetora – encontra-se presente em muitas das definições e considerações científicas sobre o tema. De uma forma objetiva, a ansiedade pode ser definida como um conjunto característico de respostas comportamentais e fisiológicas como evitação, viglância/ alerta e

excitação, que evoluíram para proteger o indivíduo do perigo (Gross e Hen, 2004). Ela pode ser associada a um conjunto de sintomas somáticos, perceptuais, cognitivos e comportamentais, deflagrado não apenas por estímulos aversivos, mas também por antecipação (Landgraf e Wigger, 2002). A antecipação inclui respostas indicadoras de ansiedade, tais como um menor limiar para detecção sensorial e uma maior taxa de congelamento (*freezing*), o qual corresponde a um estado de imobilidade onde todos os movimentos cessam, com exceção daqueles necessários para a respiração (Godsil *et al.*, 2000). As taxas de congelamento corresponderiam, dessa forma, ao tempo durante o qual o animal permanece em alerta.

Alguns autores evolucionistas enumeram algumas das variadas modificações que ocorrem em um organismo quando este detecta um sinal de perigo ou alerta (Cosmides e Tooby, 2000): (1) há mudanças em percepção e atenção, como um aumento na capacidade de ouvir e distinguir sons; (2) objetivos e metas motivadas mudam – a segurança passa a ser uma prioridade absoluta; (3) processos de memória são direcionados a novas tarefas de evocação, isto é, o organismo – no caso, humano - passa a rememorar as informações sobre a situação atual e as estratégias utilizadas em experiências anteriores similares e bem-sucedidas; (4) os processos comunicativos se modificam e, dependendo das circunstâncias, o animal pode emitir um alarme ou ficar paralisado, sem emitir sons; (5) sistemas de aprendizagem especializados são ativados, conforme mostra a ampla literatura de medo condicionado, que será mais bem discutida posteriormente; (6) importantes mudanças fisiológicas ocorrem, decorrentes da ativação simpática e conseqüente descarga adrenérgica, como o

aumento da frequência cardíaca, o clareamento da mucosa gástrica (conseqüência da saída do sangue do trato digestivo para estruturas com função prioritária na situação de perigo, como os músculos), a liberação de hormônios do estresse, a hipoalgesia e a potenciação dos reflexos (LeDoux, 2000); (7) regras de decisão comportamental são ativadas, e diferentes cursos de ação podem ser potenciados, como esconder-se, fugir, lutar, fingir-se de morto ou tornar-se imóvel – este último correspondendo ao congelamento, resposta comportamental que será o critério de seleção da linhagem de ratos mais medrosos/ ansiosos utilizada neste trabalho.

1.2 - Medo e Ansiedade: similaridades e diferenças conceituais

O conceito de uma resposta induzida por estímulos ameaçadores e que representa um importante sistema adaptativo corresponde tanto à definição de medo (Shields e King, 2008) quanto à de ansiedade (Gross e Hen, 2004), o que traz como conseqüência uma dificuldade em distinguir estes dois fenômenos. Alguns autores alegam que o medo poderia estar relacionado a um perigo real e presente e a ansiedade a uma percepção de perigo potencial ou iminente, um “medo antecipatório” (Graeff, 1990). Evidências empíricas têm mostrado que animais de linhagens selecionadas para respostas de medo mais acentuadas após passarem por experiência de choque nas patas apresentam comportamento igualmente acentuado em alguns testes de ansiedade (Ponder *et al.*, 2007). Essa semelhança entre respostas para testes de medo condicionado e de ansiedade também pode ser verificada em trabalhos com alteração da neurotransmissão de serotonina e de ácido gama aminobutírico (GABA), dois dos conhecidos neurotransmissores

envolvidos no processamento das informações ambientais relacionadas ao perigo e na resposta comportamental do organismo diante de situações que representem perigo ou ameaça (Ansorge *et al.*, 2004; Ramboz *et al.*, 1998). Assim, tanto situações que evoquem medo ou ansiedade parecem deflagrar reações comportamentais e fisiológicas semelhantes e, embora uma distinção conceitual não encontre consenso, uma identidade psicobiológica entre ambos é proposta (Alves, 2001). Medo e ansiedade referir-se-iam a um mesmo conjunto de respostas, sendo a distinção entre os dois termos conceitual e variável entre os pesquisadores da área.

1.3. - Medo condicionado x medo incondicionado

Uma distinção interessante e mais clara pode ser feita com relação aos termos “medo condicionado” (aprendido) e “medo incondicionado” (inato), que são os dois mecanismos básicos do medo (Shields e King, 2008). O primeiro refere-se às respostas do organismo a um estímulo que outrora não os desencadeava, mas passa a fazê-lo, por ter ocorrido paralelamente ou imediatamente após um estímulo naturalmente provocador de medo. Trata-se, portanto, de um medo aprendido, baseado em experiências aversivas anteriores, cujos estímulos associados levam a respostas de medo. O conceito de condicionamento do medo foi primeiramente proposto pelo fisiologista russo Ivan Pavlov (1927), cujos experimentos clássicos com cachorros mostraram que se uma campainha (estímulo inicialmente neutro, que não evoca de resposta de salivação) é apresentada ao animal simultaneamente ou segundos após a apresentação de alimento (estímulo incondicionado, que evoca naturalmente a resposta de salivação), após poucas sessões de pareamento a

campainha passa a evocar a resposta de salivação no animal, mesmo na ausência do estímulo incondicionado (alimento). O som se torna, desta forma, um estímulo condicionado. Este modelo foi adaptado para os estudos de medo e tem sido amplamente utilizado para a investigação dos processos de aprendizado do medo, em que um estímulo neutro (uma campainha ou mesmo a caixa onde o animal é colocado) é emparelhado a um estímulo incondicionado aversivo (um choque de baixa intensidade nas patas, por exemplo). Uma vez que a relação entre o estímulo condicionado e o estímulo incondicionado é aprendida, as respostas fisiológicas e comportamentais inatas do organismo frente a situações de perigo passam a ser emitidas na apresentação do estímulo condicionado (LeDoux, 2000). Por esse motivo, o termo medo condicionado pode ser chamado de modelo associativo de ansiedade (Alves, 2001). A figura 1 ilustra o resultado deste processo:

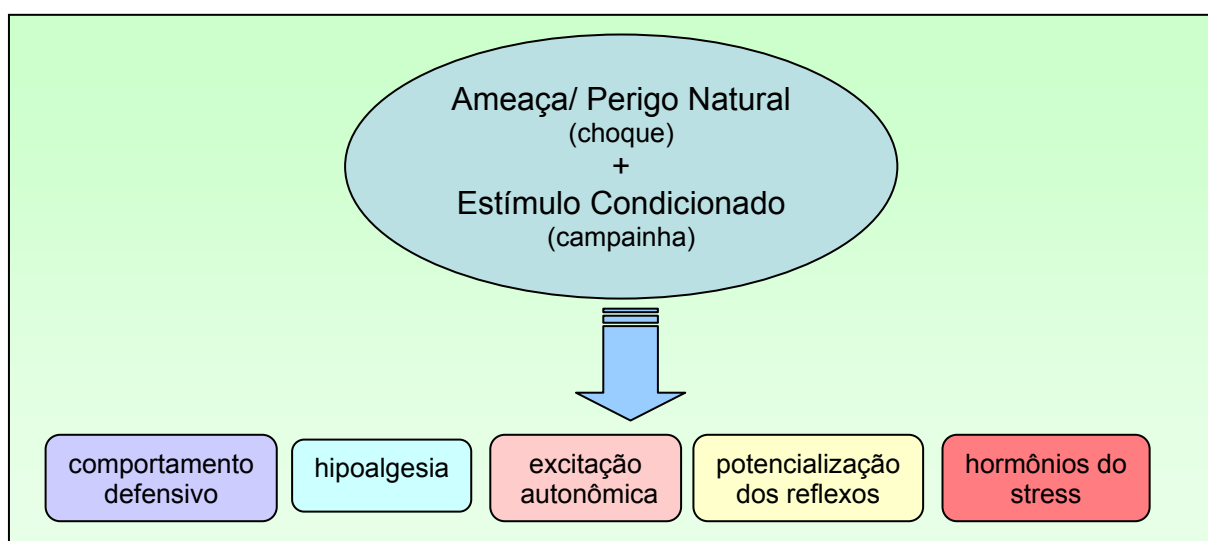


Figura 1: Condicionamento do medo. Após pareamento do estímulo neutro com estímulo incondicionado (ameaça/ perigo natural), o organismo passa a exibir respostas comportamentais típicas de medo/ ansiedade em seguida à apresentação do estímulo condicionado. Adaptado de LeDoux, J. (2000).

O termo “medo incondicionado”, por sua vez, se refere à evocação das respostas de medo/ ansiedade em situações naturalmente ameaçadoras para o

organismo. Trata-se, portanto, de um medo não relacionado à aprendizagem, mas de respostas automáticas filogeneticamente selecionadas ao longo da história evolutiva da espécie para protegê-lo de injúrias reais ou potenciais. O termo medo incondicionado é, muitas vezes, concebido como um sinônimo para a ansiedade propriamente dita. Interessantemente, as respostas de medo condicionado e incondicionado são as mesmas; a diferença está no contexto em que ocorre a experiência, isto é, se aprendida (medo condicionado) ou inata (medo incondicionado) (Davis, 1992). No presente trabalho, o modelo de estudo utilizado para a obtenção do grupo experimental é o de medo condicionado, consistindo em uma linhagem selecionada para respostas altas de congelamento quando exposta a um contexto onde anteriormente foi aplicada estimulação elétrica nas patas.

1.4 - Testes comportamentais para o estudo do medo/ ansiedade

Em animais, a experiência da ansiedade e do medo não pode ser acessada diretamente por relatos (Liebsch *et al.*, 1998), como ocorre em humanos. Dessa forma, os experimentos na área repousam sobre parâmetros comportamentais que se mostram associados a esses estados emocionais.

Tanto os modelos de estudo de medo condicionado como os de medo incondicionado têm se mostrado fontes úteis para o entendimento da neurobiologia do medo e da ansiedade, o que contribui para futuras propostas de intervenção terapêutica para os transtornos relacionados. É interessante notar a predominância de modelos de testes de ansiedade em relação a qualquer outra condição psiquiátrica (Cruz *et al.*, 1997).

A validação dos testes de ansiedade ocorre por meio do preenchimento dos critérios de previsibilidade, de semelhança e de homologia (Treit, 1985; Lister, 1990; Treit, 1991; McCreary *et al.*, 1996). O primeiro tem por objetivo estabelecer uma correlação entre os efeitos de uma determinada droga administrada tanto em pacientes quanto nos modelos animais. O critério de semelhança diz respeito à similaridade entre as características humanas da ansiedade e o comportamento operacionalmente definido como ansiedade no modelo animal. Por fim, o critério de homologia, também conhecido como validade teórica ou de construto (Alves, 2001; Cruz *et al.*, 1997), pressupõe que os mecanismos psicobiológicos responsáveis pela etiologia e pelas reações comportamentais características do quadro patológico estudado sejam os mesmos em humanos e nos modelos animais propostos.

Esses modelos comportamentais podem provocar diferentes estados de ansiedade por meio da exposição do animal a ambientes excessivamente iluminados, a arenas desconhecidas, a plataformas elevadas e a choques elétricos nas patas (Lister, 1991). Os diferentes modelos animais de medo/ ansiedade podem, portanto, basear-se em procedimentos de aprendizagem aversiva associativa (medo condicionado), bem como na manipulação de respostas de defesa filogeneticamente preparadas (medo incondicionado), sendo esses, portanto, conhecidos como modelos etológicos, os quais dispensam treinos de aprendizagem nos animais (Lorenz, 1995). A seguir, alguns modelos animais para o estudo da psicobiologia do medo/ ansiedade serão descritos.

1.4.1 Labirinto em cruz elevado

O labirinto em cruz elevado (LCE) é um teste de medo inato, isto é, de medo incondicionado (Anagnostaras *et al.*, 1999a), tendo sido desenvolvido por Handley e Mithani (1984) e validado como modelo de ansiedade por Pellow, Chopin, File e Briley (1985). O teste baseia-se no conflito enfrentado por roedores entre a aversão de estar exposto a uma plataforma aberta e elevada e a motivação para explorar um novo ambiente (Henniger *et al.*, 2000). É composto por dois braços abertos (circundados apenas por um anteparo de acrílico medindo cerca de 3cm, para evitar a queda do animal do labirinto) e por dois braços fechados, elevados em cerca de 50cm do solo, conforme mostra a figura 2:

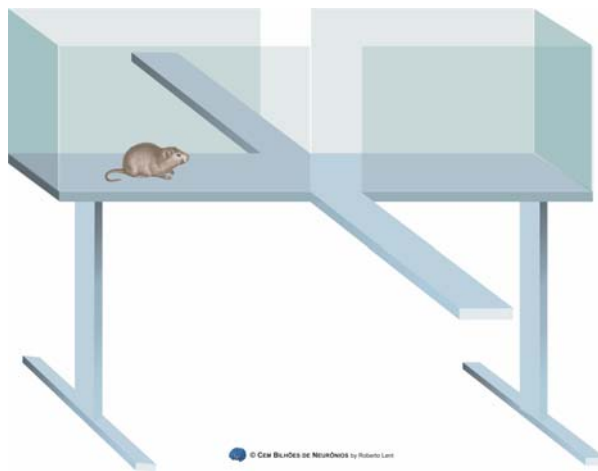


Figura 2: Labirinto em cruz elevado (LCE). Trata-se de um dos testes comportamentais mais utilizados para estudos de medo incondicionado (ansiedade). Retirado de Lent, 2002.

Dessa forma, os braços fechados representam um local seguro e próximo ao hábitat natural de roedores – ambientes escuros e fechados. Já os braços abertos representariam a possibilidade de explorar ambientes novos e desconhecidos.

Conseqüentemente, os indivíduos considerados menos ansiosos são os que apresentam maior porcentagem de entrada e de tempo gasto nos braços abertos. Este construto foi validado por meio da utilização de drogas ansiolíticas (benzodiazepínicos, barbitúricos e etanol), que diminuem a aversão natural em direção aos braços abertos, enquanto drogas ansiogênicas podem aumentá-la (Pellow *et al.*, 1985). Assim, no campo da pesquisa experimental acerca de medo e ansiedade, o labirinto em cruz elevado é um paradigma comportamental utilizado em larga escala (Rodgers e Cole, 1995), que mede o comportamento de evitação motivado pelo medo (Handley e McBlane, 1993; Pellow *et al.*, 1985). Interessantemente, o número de entradas nos braços abertos é considerado um índice relativamente puro de atividade locomotora, construto validado estatisticamente por meio de análise fatorial (Cruz, *et al.*, 1994; Rodgers e Johnson, 1995).

1.4.2 Interação social

O teste de interação social foi desenvolvido por File e Hyde (1978) e tem por objetivo avaliar o efeito de ambientes desconhecidos e intensamente iluminados na interação entre pares de ratos de mesmo grupo, mas desconhecidos entre si, colocados em uma caixa experimental. Os comportamentos de interação social podem ser definidos operacionalmente como aqueles relacionados ao contato físico entre os animais na arena, e medidos, portanto, por meio do tempo em que os ratos passam cheirando, seguindo ou limpando o parceiro. Em condições consideradas normais para o animal, ou seja, em ambientes familiares e pouco iluminados, há a redução de medidas de ansiedade, que são: maior imobilidade, maior defecação e menor interação social. O aumento nos níveis plasmáticos de corticotrofina,

hormônio secretado em condições de estresse, está associado à redução da frequência e do tempo gasto em interação social (Cruz *et al.*, 1997). Atendendo ao critério de previsibilidade, a administração de ansiolíticos, como o diazepam, o clordiazepóxido e o fenobarbital, assim como a do agonista GABAérgico muscimol, aumenta o tempo de interação social (File, 1985). Como o fundo da caixa experimental é dividido em quadrados, é possível a investigação da atividade locomotora dos animais, tomada como o número de vezes em que o animal cruza os quadrados marcados na caixa.

1.4.3 Aversão contextual

O teste de aversão contextual é baseado no modelo de condicionamento clássico, desenvolvido por Pavlov na virada para o século XX (LeDoux, 2001). É, portanto, um modelo de medo aprendido. No contexto experimental, o processo de aprendizagem se dá da seguinte forma: o roedor é colocado em uma caixa e ouve um som ou vê uma luz, que é emparelhada a um choque elétrico moderado nas patas. Após algumas dessas experiências, o animal responde automaticamente ao som ou à luz, mesmo na ausência do choque. As respostas, conforme já descrito, incluem o congelamento, o aumento da frequência cardíaca e da pressão sanguínea, características do medo e da ansiedade, como mostra a figura 3.

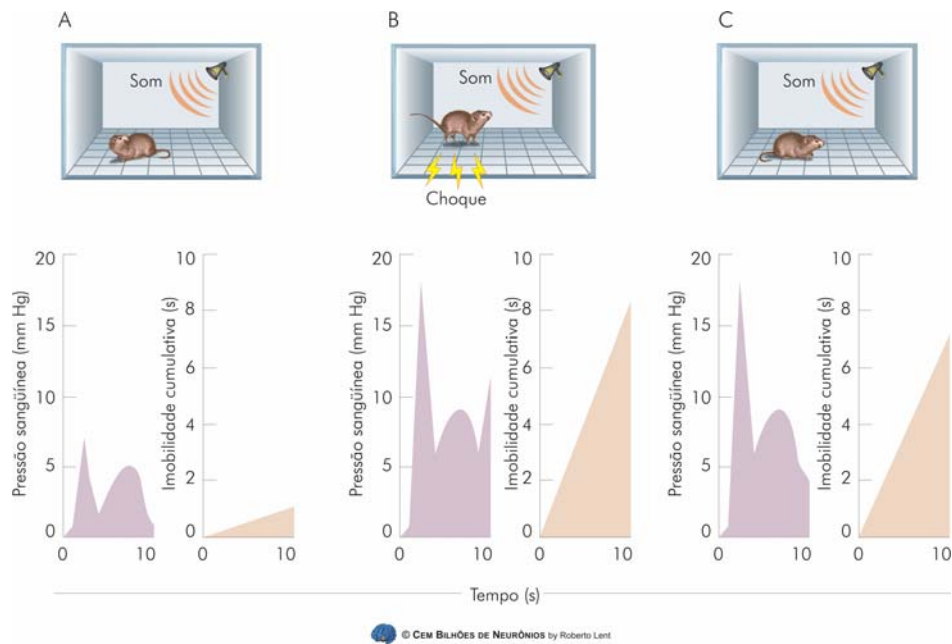


Figura 3: Condicionamento do medo. A pressão sanguínea e a imobilidade do animal estão em níveis basais quando apenas o estímulo condicionado é apresentado. Durante o emparelhamento com o estímulo incondicionado, as respostas de medo são expressas. Após alguns emparelhamentos, o animal começa a exibir as respostas de medo, mesmo sem a apresentação do estímulo aversivo, e passam a ser chamadas respostas condicionadas. Retirado de Lent, R. (2002).

Segundo LeDoux (1994), em termos neurobiológicos, o condicionamento do medo ocorre porque o choque modifica a forma como os neurônios em determinadas áreas cerebrais interpretam o som ou a luz. Os autores comportamentais dão a esses o nome de estímulo condicionado, e ao choque nas patas, estímulo incondicionado. Já as respostas aprendidas são denominadas respostas condicionadas. No condicionamento aversivo contextual, o mesmo processo ocorre, mas não há apresentação de luz ou som; o estímulo condicionado é o próprio contexto do experimento, isto é, a caixa onde o estímulo incondicionado é apresentado ao animal. A aversão contextual foi o modelo utilizado para a obtenção do grupo experimental do presente trabalho, sendo o tempo em congelamento o critério utilizado para a seleção dos animais (Gomes e Landeira-Fernandez, 2008). Sobre o congelamento, é

importante destacar que se refere à resposta comportamental de completa ausência de movimentos corporais, sendo uma resposta natural a estímulos inescapáveis, mediada por uma estrutura mesencefálica denominada substância cinzenta periaquedutal (PAG). De acordo com substratos neurais específicos, a resposta de congelamento pode ser classificada em, pelo menos, quatro tipos (Brandão *et al.*, 2008): 1) imobilidade induzida por estimulação da coluna ventral da PAG (vPAG), correspondendo ao componente de recuperação de processos de defesa-recuperação; 2) resposta de congelamento ao estímulo contextual pareado a choques elétricos, correspondendo a um modelo de transtorno de ansiedade generalizada (TAG); 3) congelamento evocado pela estimulação da porção dorsal da PAG (dPAG), obtido pela mais baixa intensidade de estimulação elétrica da dPAG capaz de produzir congelamento e proposto como modelo para ataques de pânico e 4) resposta de imobilidade pós-estimulação da dPAG, proposto como modelo de transtorno do pânico e correspondendo à duração da resposta de congelamento após a interrupção da estimulação elétrica da dPAG. Nesse contexto, destacam-se a resposta de congelamento descrita no item 2 como modelo utilizado neste trabalho e seu isomorfismo com o TAG.

1.4.4 Campo aberto

O teste do campo aberto (*open field*) foi originalmente descrito por Hall (1934) para o estudo de aspectos emocionais em ratos. É um teste amplamente utilizado na psicologia animal, em pesquisas que objetivem investigar a atividade locomotora dos animais e seu comportamento ansioso (Nazar *et al.*, 1997; Ho *et al.*,

2002). O teste consiste em uma arena medindo aproximadamente 1m x 1m, com o fundo da arena dividido em quadrados para avaliação da locomoção dos animais. Assim como o labirinto em cruz elevado, o campo aberto investiga o medo incondicionado, evocado pelo contato com um ambiente desconhecido. Dessa forma, o maior tempo em que o animal passa nos quadrados centrais da arena é considerado como um indicador de menor ansiedade, uma vez que se trata do local onde há menor proteção e maior luminosidade. Muitas são as variações desse teste (Prut e Belzung, 2002): ele pode variar em formato (circular, quadrangular ou retangular); quanto à iluminação, que pode vir de cima ou de baixo (no caso de arena com fundo transparente) e mesmo quanto à presença de objetos no centro da arena. Em geral, os animais são filmados por 4 dias (5 minutos de sessão/ dia) e, algumas vezes, comportamentos específicos são observados, como o comportamento de levantar (*rearing*), que é considerado uma manifestação de menor ansiedade (Cruz *et al.*, 1997).

1.5 Medo e ansiedade: bases neurobiológicas

1.5.1 Medo/ ansiedade e hipocampo

Quando um estímulo proveniente do ambiente é percebido como potencialmente perigoso para a integridade do organismo, este emite uma série de respostas neuroquímicas, neuroendócrinas e comportamentais que, juntas, potencializam a probabilidade de sobrevivência do indivíduo. Em termos neurobiológicos, estímulos ameaçadores ativam o chamado circuito mediador do medo. As respostas de medo são deflagradas a partir da ativação de uma estrutura subcortical chamada amígdala, que recebe aferências de uma série de estruturas

envolvidas no processamento cognitivo, como o córtex sensorial, o tálamo e o hipocampo (LeDoux, 2001), conforme mostra a figura 4.

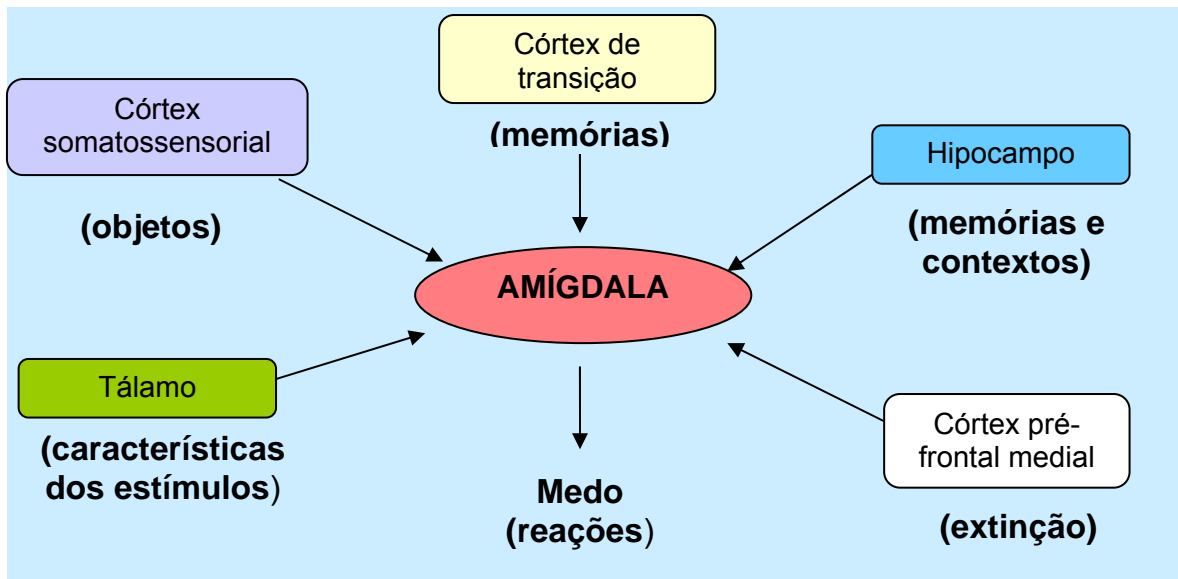


Figura 4: Estruturas corticais e subcorticiais envolvidas na resposta de medo/ ansiedade enviam informações sobre os estímulos à amígdala, que envia sinal a diversas regiões do organismo, para que as respostas de luta e fuga sejam deflagradas. No caso do medo contextual aprendido, destacam-se as informações provenientes do hipocampo. Adaptado de LeDoux, 2001.

O hipocampo é uma das principais estruturas cerebrais envolvidas na mediação das manifestações de medo/ ansiedade deflagradas pelo medo aprendido, provavelmente por meio das projeções hipocampais descendentes para a amígdala (Anagnostaras *et al.*, 1999a). Maren e Fanselow (1995) mostraram que lesões eletrolíticas em regiões da formação hipocampal que emitem projeções para a amígdala eliminam o condicionamento pavloviano do medo em situações de estímulo condicionado contextual. Phillips e LeDoux (1992) também demonstraram que lesões no hipocampo interferem no condicionamento do medo ao contexto, dando a essa estrutura um papel de transmissão sensorial na circuitaria mediadora do medo. Anagnostaras *et al.*, (1999b) mostraram ainda que a atuação do hipocampo no condicionamento contextual do medo é limitada ao tempo, uma vez que lesões nessa estrutura um dia após o condicionamento impedem o aprendizado

do medo, enquanto lesões hipocampais 28 dias após a sessão de condicionamento não produzem efeito sobre o armazenamento de memórias de medo contextual. Dessa forma, animais com lesões no hipocampo não apresentam respostas de medo contextual aprendido, uma vez que não são capazes de formar a representação contextual e enviá-la para a amígdala (LeDoux, 2001). A figura 5 ilustra, esquematicamente, as vias corticais para o hipocampo, e deste para a amígdala:

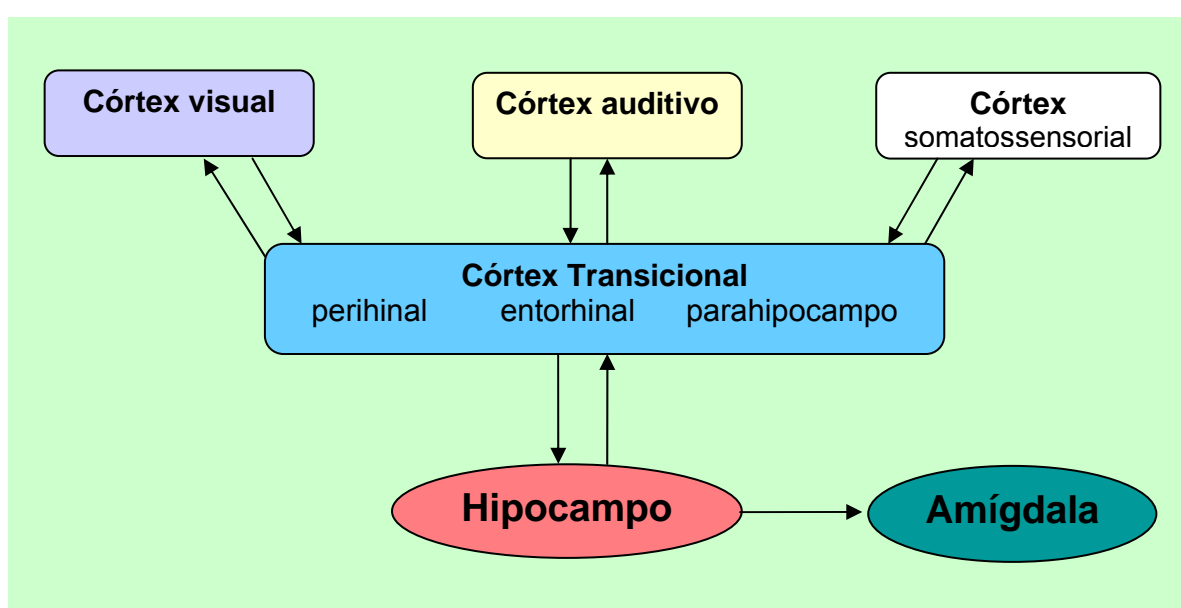


Figura 5: Informações corticais para o hipocampo e, deste, para a amígdala. Adaptado de LeDoux, 2001.

O hipocampo estende-se longitudinalmente ao longo do eixo dorso-ventral no cérebro e é formado basicamente por quatro regiões celulares que são: corno de Amon 1 e 3 e giro denteado (CA1, CA3 e GD). A secção transversal da estrutura revela as características do circuito tri-sináptico que está representado na figura 6. A via perfurante proveniente do córtex entorrinal faz contato com os dendritos das células granulares na camada molecular do giro denteado. Células granulares estendem seus axônios para a camada CA3 de neurônios piramidais constituindo as

fibras musgosas. As colaterais de Schaffer são projeções dos neurônios piramidais de CA3 que vão em direção aos neurônios piramidais de CA1, os quais são projetados para o subículo e de lá novamente para o córtex entorrinal (Doetsch e Hen, 2005).

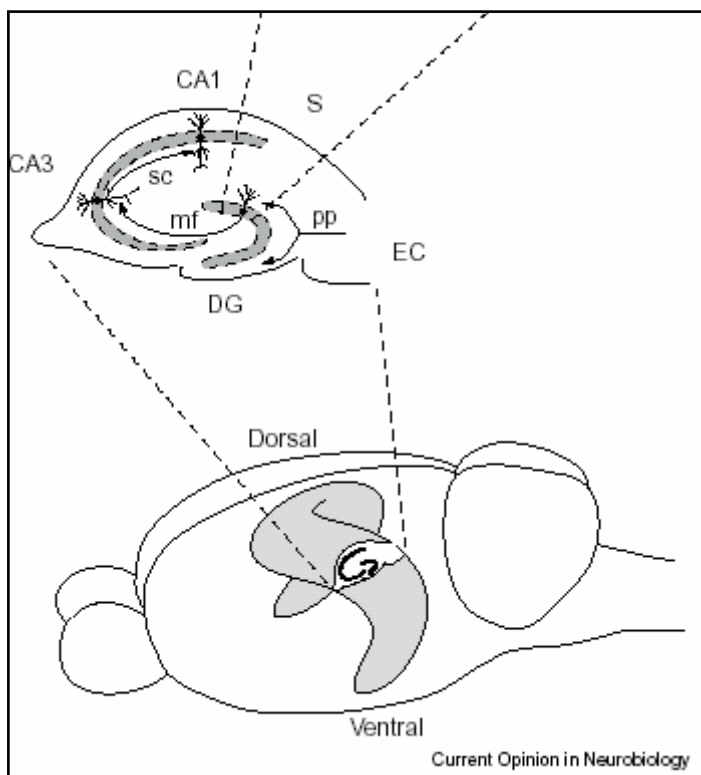


Figura 6: Circuito hipocampal. O circuito primário da formação hipocampal é baseado em uma série de seqüências de sinapses que transmitem a informação na seguinte direção: córtex entorrinal – células granulares do giro denteado - células piramidais de CA3 – células piramidais de CA1 que projetam para área entorrinal novamente. via perfurante (PP); córtex entorrinal (EC); giro denteado (DG); fibras musgosas (mf); colaterais de Schaffer (sc); subiculum (S). Modificado de Doetsch e Hen, 2005.

A formação hipocampal é, portanto, um componente essencial ao sistema emocional do cérebro, tendo um importante papel funcional na modulação do complexo processo comportamental, por meio de áreas corticais e subcorticais. Há diversas vantagens no uso do modelo do sistema hipocampal em estudos quando se utiliza estímulos ou insultos externos. É ideal para o estudo da organização neuronal, da função celular e da formação de circuitos por sua organização histológica ordenada e conhecida, sendo importante também no estudo da neuroplasticidade, por estar sempre sendo influenciado pela atividade na formação

de novas sinapses ou por ser sítio de neurogênese em adultos, isto é, sítio de formação de novos neurônios. Além disso, é uma estrutura cerebral importante na formação de aspectos comportamentais e funções como aprendizado, memória e ansiedade. Por isso, a formação hipocampal tem sido figurada proeminente em estudos de plasticidade sináptica, memória e, nos últimos anos, em estudos sobre neurogênese (Morgane *et al.*, 2002).

Duas formas bem estabelecidas de aprendizado aversivo dependente do hipocampo são o labirinto aquático de Morris e o condicionamento contextual do medo (Kim e Fanselow, 1992). Assim, o presente trabalho estudará, entre outros parâmetros, aspectos hipocâmpais como a neurogênese em ratos selecionados para o medo condicionado. A região do hipocampo escolhida para análise foi a porção dorsal do hipocampo, por seu envolvimento na modulação da ansiedade (Gonzalez *et al.*, 1998b; Nazar *et al.*, 1999; Rezayat *et al.*, 2005) e do medo condicionado (Kjelstrup *et al.*, 2002). O hipocampo dorsal, com suas principais regiões (giro denteado, área CA1 e CA3), está ilustrado na figura 7:

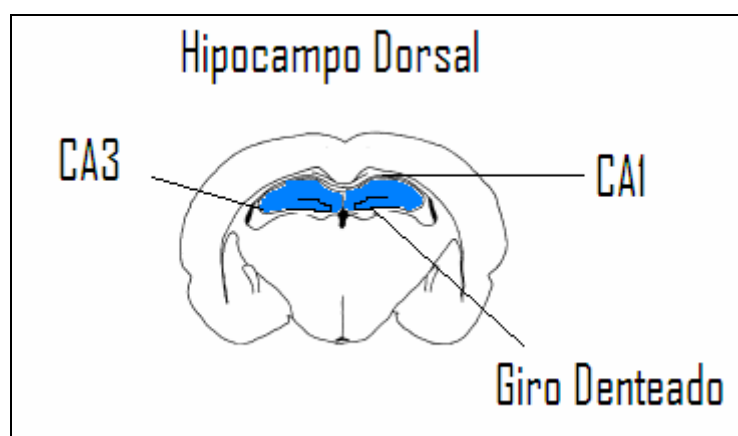


Figura 7: Hipocampo dorsal. Corte coronal (3.3mm posterior ao bregma) de cérebro de rato Lister. A área em azul corresponde à porção dorsal do hipocampo, com as áreas CA1, CA3 e giro denteado. Adaptado de Gonzalez, Ouagazzal e File, 1998b.

1.5.2 Medo/ ansiedade e neurogênese hipocampal

A descoberta de que o cérebro adulto de mamíferos é capaz de gerar novos neurônios foi um divisor de águas na história da neurociência (Abrous *et al.*, 2005), considerando-se que, por muito tempo, acreditou-se que novos neurônios não poderiam ser acrescentados ao cérebro de animais adultos. Entretanto, na década de 60, Joseph Altman, por meio da autorradiografia para [³H]-timidina, mostrou haver novos neurônios em estruturas cerebrais de ratos jovens e adultos. Esses estudos, no entanto, não foram suficientes para mudar a opinião dos pesquisadores da época e, somente 15 anos depois, Kaplan e colaboradores confirmaram a existência dessas células, mostrando que elas apresentavam características de neurônios, como dendritos e sinapses (Gross, 2000). Aproximadamente no mesmo período, resultados de estudos com pássaros mostraram haver neurogênese nesses animais e que esta se relacionava ao canto sazonal, uma descoberta que possibilitou o surgimento de novas formas de pensar a plasticidade cerebral (Nottebohm, 1989). Desde então, a literatura tem descrito sítios neurogênicos no cérebro de várias espécies de animais, em estruturas como o hipocampo. Assim, a idéia de que novos neurônios são produzidos ao longo da vida adulta na formação hipocampal de ratos e outros mamíferos, incluindo humanos (Altman e Das, 1965; Eriksson *et al.*, 1998) já é aceita e difundida entre neurocientistas. Uma vez estabelecido o fenômeno da neurogênese como construto científico, o próximo passo foi tentar desvendar os mecanismos regulatórios e entender quais estímulos podem desencadear ou inibir as taxas neurogênicas (Abrous *et al.*, 2005). A supressão da secreção de corticosterona, por exemplo, parece aumentar o nascimento de células da glia e neurônios no giro denteado (Gould *et al.*, 1992; Cameron e Gould, 1994). Com relação à geração de novos neurônios, esse efeito foi também observado em ratos

criados em ambiente enriquecido, isto é, em interação com brinquedos, plataformas e objetos de diferentes cores e formatos (Brown *et al.*, 2003; Silveira, 2008).

Assim, o hipocampo caracteriza-se por apresentar um grau notável de plasticidade estrutural e funcional no animal adulto, sendo a neurogênese uma das principais expressões dessa plasticidade estrutural (Mirescu *et al.*, 2004; Gould e Gross, 2002). Dessa forma, o hipocampo de ratos adultos produz vários milhares de células granulares por dia (Cameron e McKay, 2001), sugerindo que esses novos neurônios devem desempenhar papéis importantes na função hipocampal. Tendo em vista a plasticidade do hipocampo, isto é, a capacidade desta estrutura sofrer alterações conforme o organismo interage com o ambiente, estímulos ou insultos que se estabeleçam na vida pré-natal até a fase adulta poderão prejudicar a formação de novas células e o estabelecimento de sinapses, podendo ter efeito também sobre o comportamento relacionado à memória e à ansiedade, que são dependentes da função hipocampal (Dranovsky e Hen, 2006; Earnheart *et al.*, 2007).

Duas regiões são atualmente bem descritas como sendo sítios neurogênicos no cérebro de mamíferos adultos: a camada subgranular (SGZ - do inglês subgranular zone), no giro denteado do hipocampo, e a zona subventricular (SVZ - do inglês subventricular zone), adjacente aos ventrículos laterais (Petreanu, 2002; Alvarez-Buylla e Lim, 2004). No primeiro caso, as células proliferam na camada subgranular, localizada entre o hilo e a camada granular do giro denteado, onde migram e se diferenciam em neurônios maduros (Abrous *et al.*, 2005). Esses mesmos passos, incluindo o crescimento de axônios e dendritos, a formação de sinapses com outros neurônios no circuito e, por último, maturação até o neurônio totalmente funcional (Alvarez-Buylla *et al.*, 2002), são equivalentes ao processo pelo

qual passam os neurônios gerados durante o desenvolvimento; a fundamental diferença entre a neurogênese do desenvolvimento inicial e a do adulto é que, nesta última, os processos envolvidos na maturação se integram a circuitos pré-existentes (Lie *et al.*, 2004). A neurogênese no sistema hipocampal está ilustrada na figura 8:

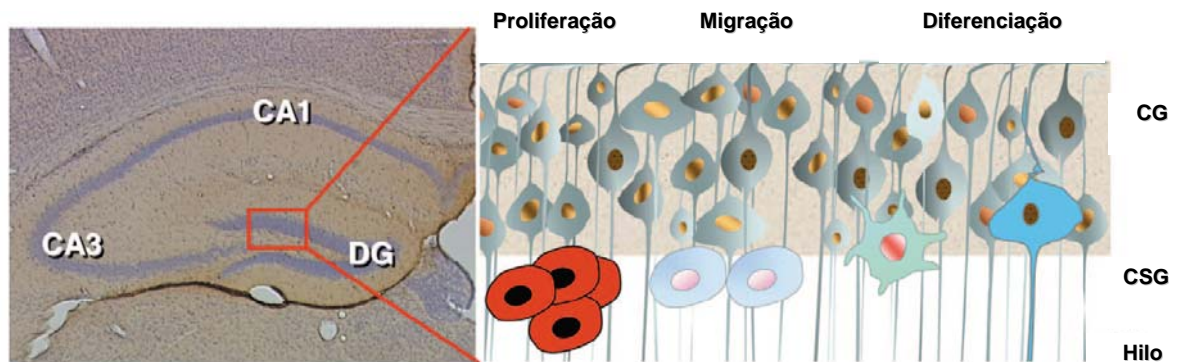


Figura 8: Neurogênese hipocampal. Células proliferam na camada subgranular (CSG), localizada entre o hilo e a camada granular (CG) do giro denteado, onde migram e se diferenciam em neurônios maduros. Adaptado de Abrous *et al.*, 2005.

A introdução do BrdU (5-bromo-3-deoxiuridina), análogo da timidina, ao estudo da neurogênese merece novamente ser destacada. Assim como a timidina sintética, o BrdU é incorporado pelas células progenitoras e por sua progênie. Essa marcação pode ser visualizada com técnicas imuno-histoquímicas e não requer autorradiografia, permitindo uma estimativa do número total de células e a co-localização com marcadores celulares específicos possibilitando a identificação de novas células geradas (Nowakowski *et al.*, 1989). Tendo em vista a importância do hipocampo na mediação do aprendizado do medo contextual, este trabalho procurou verificar uma possível diferença na neurogênese hipocampal em ratos selecionados para maior resposta ao medo condicionado, utilizando para esse propósito o modelo de injeção e imuno-histoquímica para BrdU, para marcação de células em proliferação, e de imuno-histoquímica para doublecortina (DCX) – proteína associada ao microtúbulo, envolvida na diferenciação e migração de

células jovens - como marcador específico de neurônios imaturos (McDonald e Wojtowicz, 2005). A doublecortina (DCX) é uma proteína associada à diferenciação neuronal que funcionalmente tem sido associada à migração e, possivelmente, a outros aspectos da maturação, como a sinaptogênese. Está localizada no citoplasma de neurônios imaturos podendo ter sua morfologia apreciada por estudos imunohistoquímicos desde os estágios iniciais de diferenciação neuronal (Deuel *et al.*, 2006).

Plümpe *et al.* (2006) descreveram em seu trabalho três estágios de maturação das células reativas à DCX. O primeiro estágio é dito proliferativo e apresenta células ainda sem prolongamento ou com um pequeno prolongamento dendrítico. O segundo estágio é chamado de intermediário e apresenta células com prolongamentos médios que podem atingir ou não a camada molecular. Por fim, o estágio denominado pelos autores de pós-mitótico apresenta células com ramificação dendrítica evidente na camada molecular ou uma delicada árvore dendrítica que se ramifica na camada de células granulares. Neste trabalho, utilizou-se esta classificação para diferenciar os estágios morfológicos das células imunorreativas à doublecortina, com exceção da nomenclatura, descrita aqui como estágios 1, 2 e 3, respectivamente ao proliferativo, intermediário e pós-mitótico, mostrados na figura 9:

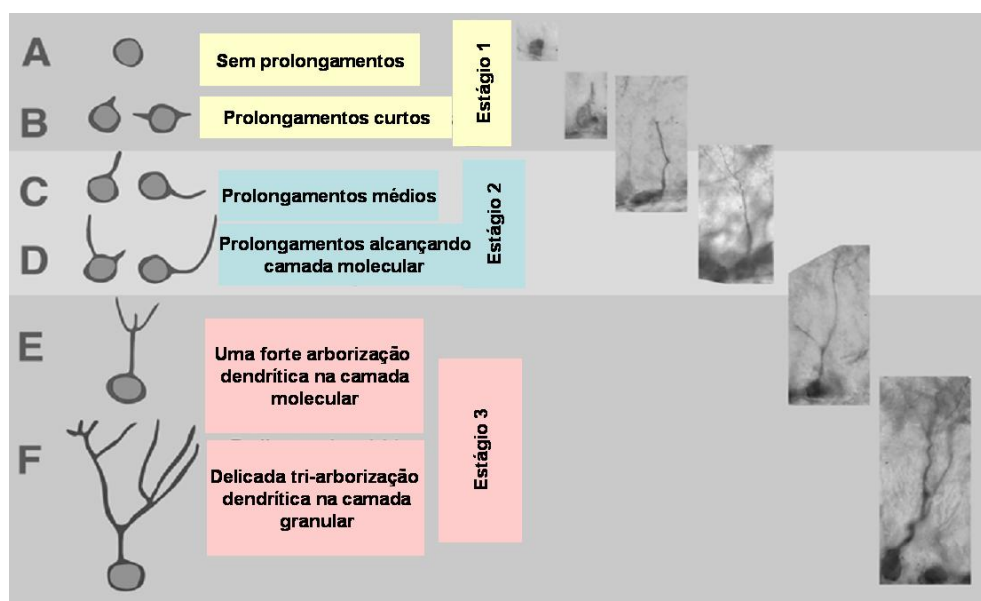


Figura 9: Caracterização da morfologia dendrítica. Imuno-histoquímica para DCX permite a classificação das células marcadas de acordo com seu estágio de desenvolvimento. Retirado e traduzido de Plümp *et al.* (2006).

1.5.3 Neurotransmissores envolvidos nas respostas de medo/ ansiedade

Diversos são os estudos que mostram o envolvimento de uma série de neurotransmissores envolvidos nas respostas de medo/ ansiedade. Entre eles, pode-se destacar o ácido gama aminobutírico (GABA) e a serotonina.

O GABA é o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central e pode ser encontrado em todas as áreas do cérebro humano (Rezayat *et al.*, 2005). Os receptores para GABA são classificados em GABA_A, GABA_B e GABA_C (Borman, 2000). O envolvimento dos receptores de GABA na modulação da ansiedade tem sido objeto de diversos estudos (Nemeroff, 2003), uma vez que a ativação de receptores GABA_A, mas não GABA_B, deflagra efeitos ansiolíticos (Sanders e Shekhar, 1995; Dalvi e Rodgers, 1996; Zarrindast *et al.*, 2001). A atuação do GABA

na modulação da ansiedade parece ser complexa e interativa com outros sistemas de neurotransmissores. Por exemplo, na área CA1 do hipocampo dorsal de ratos, o GABA parece agir em uma complexa interação com a colecistocinina (Rezayat *et al.*, 2005), um peptídeo gástrico também encontrado no cérebro e que age como neurotransmissor (van Megen *et al.*, 1996). A relevância clínica dos estudos acerca dos mecanismos e efeitos do sistema GABAérgico na modulação do medo/ansiedade é notável, tendo em vista que a principal classe de fármacos disponíveis para o tratamento dos transtornos de ansiedade – os benzodiazepínicos – atuam na potencialização da transmissão sináptica mediada pelo receptor GABA_A (Nazar *et al.*, 1997). O receptor GABA_A é composto por 5 diferentes sub-unidades, que podem ser: 6 do tipo alfa, 4 do tipo beta e 3 do tipo gama. A combinação mais comum é a de $(\alpha 1)_2(\beta 2)_2(\gamma 1)$. Quando ativado, o receptor GABA permite o influxo de íons cloreto e a membrana da célula pós-sináptica torna-se hiperpolarizada, resultando em inibição neuronal (Weinberger, 2001). Os benzodiazepínicos ligam-se a subunidades gama ou a uma área da unidade alfa influenciada pela unidade gama, facilitando o processo de abertura dos canais e, dessa forma, potencializando o efeito inibitório GABAérgico. A ação dos benzodiazepínicos está ilustrada a seguir:

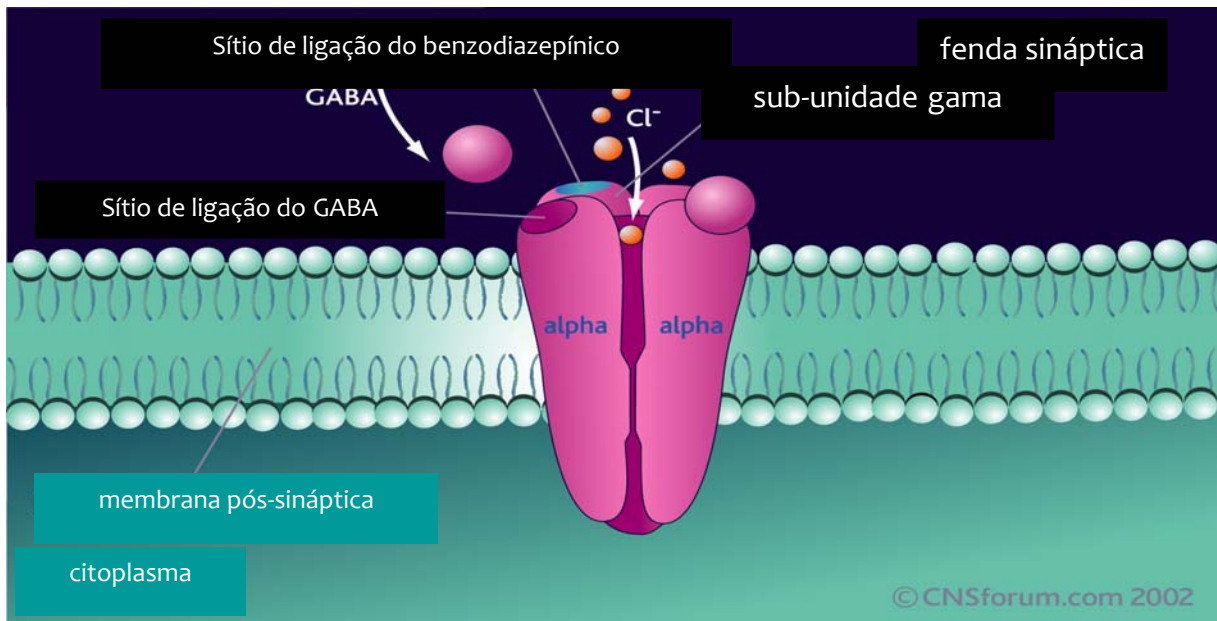


Figura 10: Sítio de ligação dos fármacos benzodiazepínicos. Essa classe de drogas se liga em sítios específicos na sub-unidade gama dos receptores GABA_A, modificando sua conformação e aumentando a atividade do receptor, por aumentar a freqüência de aberturas do canal. Retirado de cnsforum.com

A participação GABAérgica nos transtornos de ansiedade também tem sido demonstrada em estudos com neuroimagem, que relatam reduções nos níveis de GABA e de ligação de benzodiazepínicos a receptores GABA_A em pacientes com esse tipo de transtorno (Malizia *et al.*, 1998; Bremner *et al.*, 2000).

Outro neurotransmissor que merece destaque por seu envolvimento nas respostas de medo/ ansiedade é a serotonina (5-hidroxitriptamina ou 5-HT). Esse neurotransmissor parece estar implicado na etiologia de desordens neuropsiquiátricas, como os transtornos de ansiedade e a depressão (Murphy, 1990). Há cerca de 11 tipos de receptores para a serotonina, sendo a maior parte deles metabotrópicos – isto é, ligados a uma proteína G no domínio intracelular, por meio da qual dá-se os efeitos da transmissão sináptica, em sistemas de segundos mensageiros. Entre os receptores para 5-HT conhecidos, dá-se aqui destaque ao subtipo 5-HT_{1A}, pelas evidências científicas acerca do envolvimento dessa proteína

na modulação da ansiedade (Ramboz *et al.*, 1998; Menard e Treit, 1999). Trata-se de um receptor metabotrópico, conforme mostra a figura 11:

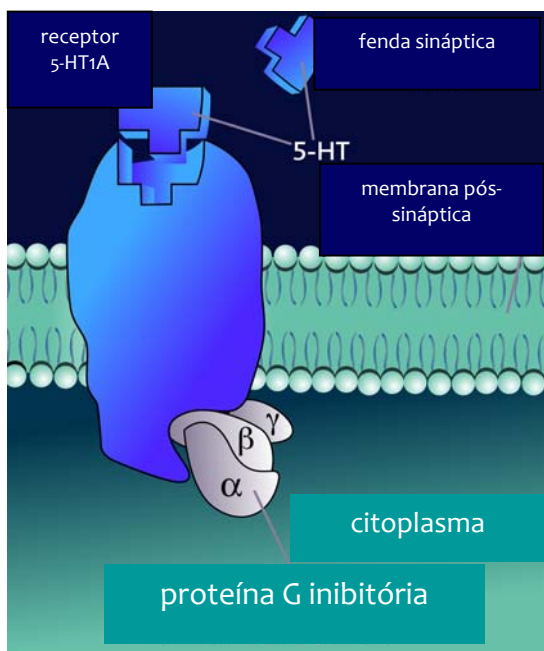


Figura 11: Receptor serotoninérgico 5-HT_{1A}, receptor metabotrópico acoplado à proteína G. Retirado de cnsforum.com

O receptor 5-HT_{1A} é expresso tanto pré- quanto pós-sinápticamente (Sibille *et al.*, 2000). Os receptores 5-HT_{1A} pré-sinápticos são expressos no corpo celular e nos dendritos de neurônios serotoninérgicos localizados nos núcleos da rafe dorsais e mediais (Blier *et al.*, 1988; Hamon, 1997). Quando ativadas, essas proteínas pré-sinápticas, conhecidas como auto-receptores, reduzem a frequência de disparos de neurônios serotoninérgicos (Aghajanian e Lakoski, 1984; Jolas *et al.*, 1993) e suprimem a síntese de 5-HT, bem como o *turnover* e a liberação desse neurotransmissor (Kennett *et al.*, 1987; Bohmaker *et al.*, 1993). As diferentes respostas funcionais associadas à ativação dos receptores 5-HT_{1A} cerebrais estão descritas no quadro a seguir (Barnes e Sharp, 1999):

Nível	Resposta	Mecanismo
<u>Celular</u>	adenilato ciclase (-)	Pós
<u>Eletrofisiológico</u>	hiperpolarização	Pós
<u>Comportamental</u>	hipotermia	Pré/Pós
	hiperfagia	Pré
	ansiolítica	Pré/Pós
	sexual (+)	Pré/Pós
	discriminação de estímulos	Pré/Pós
<u>Neuroquímico</u>	liberação de 5-HT (-)	Pré
	liberação de noradrenalina (+)	Pós
	liberação de acetilcolina (+)	Pós
	liberação de glutamato (-)	?
<u>Neuroendócrino</u>	ACTH (+)	Pós
	prolactina (+)	Pós

Figura 12: Respostas funcionais associadas com a ativação dos receptores 5-HT_{1A} no cérebro. Adaptado de Barnes e Sharp, 1999.

Os receptores 5-HT_{1A} pós-sinápticos são encontrados em regiões como o hipocampo, o septo lateral, o córtex e a amígdala (Jacobs, 1997). Tem sido sugerido que anormalidades na liberação de 5-HT e na função dos receptores 5-HT_{1A} pré-sinápticos poderiam levar a quadros ansiosos (Lucki *et al.*, 1994; De Vry, 1995). Observações mais recentes indicam que uma falta de receptores 5-HT_{1A} nos sítios pós-sinápticos também estaria envolvida no desenvolvimento da ansiedade (Sibille *et al.*, 2000). Outros dados confirmam a hipótese de participação desse receptor no fenótipo ansioso, como os estudos de Lesch (1991) que relatam hipofunção dessa proteína estando associada ao transtorno do pânico, que é um dos quadros de ansiedade patológica, e os estudos de estresse e ansiedade em ratos subordinados à hierarquia por dominância, os quais também apresentam níveis reduzidos de

receptores 5-HT_{1A} (McKittrick *et al.*, 1995). Fortalecendo o envolvimento do receptor 5-HT_{1A} na modulação de respostas emocionais, destaca-se que esse subtipo de receptor também já foi implicado na regulação da liberação de hormônios ligados ao estresse em roedores, como a corticosterona (Carrasco e Van de Kar, 2003).

1.5.4 Medo/ ansiedade e corticosterona

Entre os sistemas neuroendócrinos sugeridos para estarem criticamente envolvidos no comportamento ansioso, destaca-se o chamado eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), bem conhecido por ser ativado a partir da exposição do organismo a estressores emocionais e/ ou físicos (Plotsky, 1991; Aguilera, 1994; LeDoux, 2001), cuja percepção pode estar alterada durante uma série de estados fisiológicos (Hatzinger *et al.*, 1996; Neumann *et al.*, 1998; Windle *et al.*, 2003). A ativação do eixo HPA leva à secreção do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) de neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo para circulação sanguínea da glândula pituitária, o que, por sua vez, estimula a secreção de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) do lobo anterior desta glândula. Em seguida, a corticosterona é secretada do córtex adrenal para o sangue, funcionando como mensageiro para o *feedback* negativo da atividade do eixo HPA (Sapolsky e McEwen, 1985; De Kloet *et al.*, 1991). A elevação dos níveis de glicocorticóides no plasma sanguíneo, isto é, de cortisol em humanos e de corticosterona em roedores, é, portanto, uma consequência da ativação do eixo HPA (Jahn *et al.*, 2007).

A idéia de que o eixo HPA estaria implicado na patogênese da ansiedade e da depressão (Leonardo e Hen, 2006) ganhou força a partir de estudos

neuroendócrinos que forneceram fortes indicações de que a hiperatividade de circuitos centrais do CRH, resultando em uma desregulação do sistema HPA, desempenha um papel causal na sintomatologia de transtornos afetivos e de ansiedade (Keck e Holsboer, 2001). Particularmente, acredita-se que a secreção excessiva de CRH em diversas regiões cerebrais esteja envolvida em muitos fenômenos relacionados ao estresse, incluindo não apenas a ansiedade, mas a anorexia, a redução da libido e uma série de outras disfunções do sistema nervoso (Lancel *et al.*, 2002).

1.6 Transtornos de Ansiedade

A ansiedade normal é evolutivamente adaptativa, mas o medo excessivo pode se tornar incapacitante, podendo indicar um transtorno de ansiedade (Anagnostaras, *et al.*, 1999a; Landgraf *et al.*, 2007). A ansiedade patológica nos seres humanos pode ser definida como uma expressão inapropriada de determinados comportamentos, tais como hipervigilância sob condições basais, respostas de medo exageradas a um contexto apropriado ou inapropriado, isto é, a um contexto anteriormente neutro (Landgraf e Wigger, 2003).

O Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais (APA, 2002) classifica a ansiedade patológica em seis diferentes transtornos: o transtorno de ansiedade generalizada (TAG), a fobia social, a fobia específica, o transtorno do pânico, o transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) e o transtorno obsessivo-compulsivo (TOC). Embora apresentem traços ansiosos bastante diversificados, todos esses transtornos, provavelmente, compartilham características

comportamentais e fisiológicas comuns (Gross e Hen, 2004). A seguir, maior detalhamento será dado quanto ao TAG, tendo em vista que o modelo animal estudado no presente trabalho pode ser concebido como modelo de estudo dessa condição psiquiátrica (Gomes e Landeira-Fernandez, 2008).

1.6.1 Transtorno de Ansiedade Generalizada

A característica principal deste transtorno é a apresentação crônica de excessiva ansiedade e preocupações, acompanhados de queixas somáticas, não estando restritas a uma única situação (Nardi *et al.*, 1996). Dessa forma, o paciente com TAG preocupa-se, excessivamente, com questões variadas, nas diversas áreas de sua vida. O DSM-IV define o TAG da seguinte forma:

A. Ansiedade e preocupação excessivas (expectativa apreensiva), ocorrendo na maioria dos dias pelo período mínimo de 6 meses, com diversos eventos ou atividades (tais como desempenho escolar ou profissional).

B. O indivíduo considera difícil controlar a preocupação.

C. A ansiedade e a preocupação estão associadas com três (ou mais) dos seguintes seis sintomas:

- (1) Inquietação
- (2) Fatigabilidade
- (3) Dificuldade em concentrar-se
- (4) Irritabilidade
- (5) Tensão muscular
- (6) Perturbação do sono

D. O foco da ansiedade ou preocupação não está restrito a aspectos de um outro transtorno de ansiedade.

E. A ansiedade, a preocupação ou os sintomas físicos causam sofrimento clinicamente significativo ou prejuízo no funcionamento social ou ocupacional ou em outras áreas importantes da vida do indivíduo.

F. A perturbação não se deve aos efeitos fisiológicos de uma substância ou de uma condição médica geral.

As respostas inadequadas a eventos estressantes no TAG possivelmente envolvem um complexo circuito neurobiológico, incluindo o sistema simpático de noradrenalina no *locus ceruleus*, o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, e, ainda, a participação de moduladores como a serotonina e o GABA (Brawman-Mintzer e Lydiard, 1997). Por esse motivo, os tratamentos mais eficazes para o transtorno utilizam benzodiazepínicos, inibidores de recaptção de serotonina e, em termos psicoterápicos, terapia cognitivo-comportamental (Gross e Hen, 2004). As principais estruturais que parecem estar envolvidas nas bases biológicas do TAG estão ilustradas na figura 13:

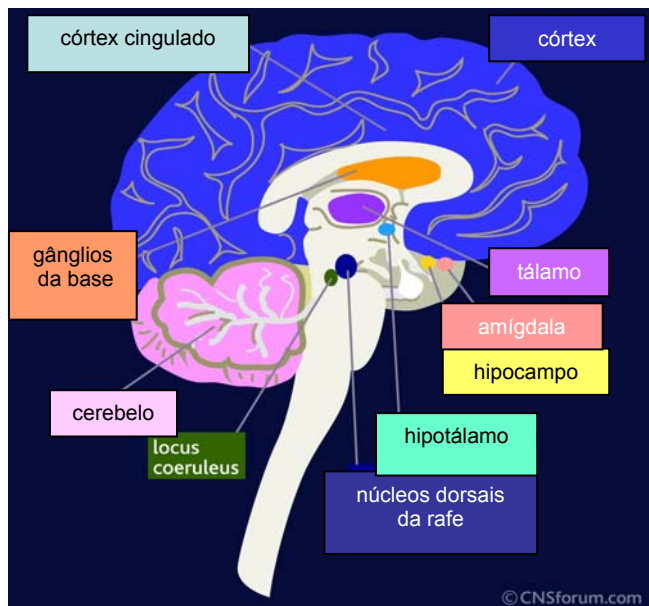


Figura 13: Estruturas cerebrais envolvidas no Transtorno de Ansiedade Generalizada (TAG). Modificado de http://www.cnsforum.com/content/pictures/imagebank/hirespng/Neuro_biol_GAD.png

Tendo como base os modelos animais de estudo do medo/ ansiedade, a criação de linhagens selecionadas de acordo com suas respostas fisiológico-comportamentais diante da aprendizagem do medo (medo contextual) ou da exposição a testes naturalmente ansiogênicos tem se mostrado uma ferramenta importante para os estudos das patologias envolvendo medo/ ansiedade, no que diz respeito às suas características neurobiológicas e comportamentais.

É importante destacar novamente o isomorfismo proposto entre a resposta de congelamento a estímulos contextuais pareados a choques elétricos e o TAG (Brandão *et al.*, 2008). Dessa forma, o modelo utilizado neste trabalho foi proposto como modelo de estudo para esse transtorno (Gomes e Landeira-Fernandez, 2008). É interessante, ainda, observar o envolvimento do hipocampo em todas as patologias de ansiedade mencionadas.

1.7 Modelos animais para estudo de medo/ ansiedade

Estudos de medo e de ansiedade com animais de populações com distribuição fenotípica normalizada nem sempre correspondem a condições clínicas, mas apenas a reações fisiológicas a pré-tratamentos farmacológicos ou à pré-exposição a estímulos aversivos (Liebsch *et al.*, 1998). Assim, a obtenção de linhagens de animais para o fenótipo ansioso constitui ferramenta essencial para o estudo dos mecanismos neurobiológicos subjacentes aos transtornos de ansiedade.

Acredita-se que a grande variabilidade do traço ansioso entre indivíduos e entre espécies, bem como a maioria dos traços característicos de outros repertórios comportamentais, se devam a interações complexas entre fatores ambientais e genéticos durante o desenvolvimento (Bosch *et al.*, 2006). Dessa forma, tentativas de desvendar os principais fatores subjacentes à variação individual com relação à ansiedade destacaram ou a predisposição genética (Wigger *et al.*, 2001; Flint, 2002; Ponder *et al.*, 2007) ou fatores ambientais no início do desenvolvimento pós-natal (Ogawa *et al.*, 1994; Brunson *et al.*, 2001; Levine, 2001) para avaliar a contribuições de tais parâmetros na etiologia e no desenvolvimento do traço ansioso.

Nesse contexto, estudos acerca dos padrões comportamentais, neuroquímicos e neuroendócrinos de animais de laboratório geneticamente selecionados quanto à apresentação e à predisposição a determinadas estratégias comportamentais podem contribuir para um melhor entendimento de estados psicopatológicos em humanos (Keck *et al.*, 2002; Wigger *et al.*, 2004). A

seleção desses animais pode ocorrer de diversas maneiras: por meio de condicionamento aversivo, por seleção em testes de ansiedade (medo incondicionado) ou por manipulação genética (como a geração de animais nocauteados para algum gene regulador de síntese de proteínas envolvidas no traço ansioso), com a ausência ou a menor expressão, por exemplo, de receptores para neurotransmissores conhecidamente envolvidos na etiologia do medo/ ansiedade (Gross *et al.*, 2002).

A obtenção de grupos experimentais pelo paradigma da seleção – grupos esses denominados linhagens pelos neurocientistas comportamentais - baseia-se no construto de que, em uma população selvagem, há subgrupos de indivíduos que, em função da sua base genética e/ ou de suas experiências aversivas prévias, apresentam diferenças marcantes em seu estado de ansiedade (Ribeiro *et al.*, 1999). Assim, a seleção para que sejam obtidas linhagens por condicionamento aversivo contextual age em uma população geneticamente heterogênea, por meio da alteração da frequência de alelos que influenciam o traço a ser selecionado (Ponder *et al.*, 2007). O modelo consiste em apresentar ao animal um estímulo aversivo (como um choque elétrico nas patas) em concomitância ou imediatamente após a apresentação de um estímulo neutro (um som ou a própria arena do teste, como ocorre no condicionamento contextual do medo utilizado pelo grupo de Ponder em camundongos (2007) e no presente trabalho, com ratos). No dia seguinte à apresentação do estímulo neutro, o animal é novamente colocado em contato com este e verifica-se a taxa de resposta condicionada evocada por este estímulo. Os animais que apresentam respostas extremas, por exemplo, de congelamento – alta taxa de

congelamento e baixa taxa de congelamento, medidos pelos segundos em que o animal passa sem emitir movimentos, exceto movimentos respiratórios, imediatamente após a apresentação do estímulo, agora denominado estímulo condicionado - são separados e cruzados entre si. Após gerações de cruzamentos entre estes, percebe-se que os animais gerados apresentam comportamentos característicos de medo (como congelamento e alteração na frequência cardíaca), mesmo sem a prévia apresentação do estímulo aversivo incondicionado, tendo sido selecionado, portanto, o traço de medo.

Outros modelos também têm sido amplamente utilizados nos estudos comportamentais de medo e ansiedade, inclusive em maior escala do que o modelo de aprendizado do medo, descrito acima. Um dos mais utilizados é a seleção a partir do comportamento ansioso medido pelo labirinto em cruz elevado, isto é, a partir do tempo e do número de entradas nos braços abertos do aparato (Liebsch *et al.*, 1998; Henniger *et al.*, 2000; Ohl *et al.*, 2001; Wigger *et al.*, 2001; 2004; Landgraf e Wigger, 2002; Keck *et al.*, 2002).

Há ainda modelos animais para estudo de ansiedade desenvolvidos a partir de manipulação genética, como as linhagens $\alpha 2$ (H101R) e $\alpha 3$ (H126R), que foram construídas a partir de uma mutação pontual que tornou as subunidades $\alpha 2$ e $\alpha 3$, respectivamente, do receptor GABA_A desses camundongos insensíveis ao fármaco benzodiazepínico diazepam (Lów *et al.*, 2000). Por fim, camundongos que não expressam o receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} exibem fenótipo ansioso (Heisler *et al.*, 1998; Ramboz *et al.*, 1998), constituindo um modelo interessante para o estudo da via de 5-HT relacionada à ansiedade (Sibille *et al.*, 2000).

A obtenção de modelos farmacológicos também tem contribuído para o entendimento dos sistemas de neurotransmissores envolvidos na etiologia do medo e da ansiedade. É o caso das linhagens HDS e LDS, selecionadas a partir da alta ou baixa sensibilidade à resposta hipotérmica induzida pelo agonista 8-OH-DPAT do receptor 5-HT_{1A} (File *et al.*, 1999). Essas linhagens apresentam comportamentos significativamente diferentes entre si no que diz respeito à ansiedade medida no teste de interação social, o que fortalece o construto de participação do sistema serotoninérgico e, em especial, do receptor 5-HT_{1A} no desenvolvimento de quadros ansiosos.

1.8 Medo/ ansiedade e depressão

Análises clínicas e epidemiológicas fornecem forte evidência de que um grande número de indivíduos apresenta, simultaneamente, manifestações de ansiedade e de depressão (Maser e Cloninger, 1990; Gonzalez *et al.*, 1998a). Dois modelos têm sido propostos para explicar esse fenômeno: um defende que o indivíduo começa a apresentar sintomas de ansiedade e, mais tarde, tende a desenvolver características depressivas (Angst *et al.*, 1990); o segundo postula que os dois transtornos - ansiedade e depressão - são manifestações de um mesmo fator etiológico subjacente (Merikangas, 1990). A associação observada entre essas duas condições também encontra suporte no envolvimento de sistemas de neurotransmissores similares nos dois quadros, como é o caso da serotonina (Murphy, 1990). Assim, o presente trabalho buscou identificar a presença de traço de depressão em linhagem de ratos selecionados para ansiedade, por meio de teste comportamental validado para análise de traços depressivos em modelos de roedores.

O teste comportamental mais conhecido para a avaliação de parâmetros de depressão é o nado forçado de Porsolt (Porsolt *et al.*, 1977), que consiste em um cilindro de cerca de 60 cm de altura e 20cm de diâmetro, com água a 25-30⁰C, onde o rato é colocado e são avaliados seus comportamentos de fuga (mergulho, nado vigoroso com as quatro patas, tentativas de escalar as paredes do cilindro). Não há possibilidade de fuga do cilindro e, dessa forma, a imobilidade é considerada um indicativo de frustração/ depressão do animal. Este modelo foi validado pelos autores com o uso de drogas antidepressivas, que conseguiam diminuir o tempo de imobilidade do animal, o qual passava, dessa forma, a apresentar mais tempo em estratégias de enfrentamento. Devido a tal validação farmacológica, este teste é também amplamente utilizado para verificar a eficácia clínica de drogas antidepressivas (Ho *et al.*, 2002).

1.9 Medo/ ansiedade e aprendizagem

Há fortes evidências de que aspectos emocionais e cognitivos são fenômenos estreitamente relacionados (Landgraf e Wigger, 2002). Essa relação tem encontrado validação farmacológica em diversos estudos: Bates (1996) e Izquierdo e Medina (1997) demonstraram que, além dos efeitos ansiolíticos, os fármacos benzodiazepínicos são capazes de causar amnésia. Outras drogas que se ligam ao receptor GABA_A, como barbitúricos (Devinsky, 1995), muscimol (Izquierdo e Medina, 1991; 1997) e etanol (Melia *et al.*, 1996) também apresentam propriedades ansiolíticas e amnésicas. Ainda, o antagonista do sítio de ligação do benzodiazepínico flumazenil pode melhorar a memória (Izquierdo e Medina, 1991). Em conjunto, esses dados sugerem que os processos de memória e de ansiedade

podem fortemente interagir, seja por meio do uso de substratos neurais comuns ou por meio da modulação entre eles de forma adaptativa (Ribeiro *et al.*, 1999).

Assim, o presente trabalho buscou investigar possíveis relações entre aprendizagem/ memória e ansiedade, com o objetivo particular de verificar se outros tipos de memória, que não a memória emocional, estariam alterados no modelo aqui apresentado. Para isso, o teste do labirinto em T e o teste de reconhecimento de objetos foram utilizados. Ambos os testes avaliam aspectos cognitivos da memória. O primeiro consiste em um teste de memória espacial, cujo aparato é composto por três braços fechados. O construto baseia-se na capacidade que o animal possui de escolher o braço do labirinto onde há uma recompensa alimentar, destacando-se que o roedor está em privação de alimentos e que a recompensa é colocada alternadamente em um dos três braços do labirinto.

Já o teste de reconhecimento de objetos foi descrito por Ennaceur e Delacour (1988), sendo um teste de memória de longo prazo baseado na exploração diferencial de objetos familiares e de objetos novos. Em uma primeira sessão, os ratos são expostos a uma ou a duas amostras de objetos idênticos e, em uma segunda sessão, a dois objetos dissimilares, a um familiar (a amostra anterior) e a um novo objeto. Em intervalos curtos entre as sessões (intervalos de aproximadamente 1 minuto), a maior parte dos ratos consegue discriminar entre os dois objetos da segunda sessão, passando a explorar o objeto novo por mais tempo do que o familiar. Segundo os autores, esse teste apresenta uma série de características interessantes, a saber: é um procedimento similar aos testes de reconhecimento visual amplamente utilizados em primatas não-humanos, o que

possibilita comparações entre espécies; é inteiramente baseado no comportamento espontâneo dos ratos de preferir objetos novos, podendo ser considerado um teste “puro” de memória, já que é completamente livre de componentes referenciais mnemônicos, isto é, de regras de aprendizagem; não envolve reforçamento ou punição, tais como alimentos ou choques elétricos, o que o torna comparável a testes de memória utilizados em humanos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL:

Este trabalho tem por finalidade investigar alterações em parâmetros comportamentais e histológicos em ratos de linhagem com alta taxa de resposta de congelamento ao condicionamento aversivo, estabelecidas e padronizadas em trabalho anterior (Gomes, 2007).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1) Identificar e comparar comportamentos relacionados à ansiedade e à atividade locomotora medidas no labirinto em cruz elevado e no teste de interação social;
- 2) Identificar e comparar comportamentos relacionados à depressão;
- 3) Identificar e comparar comportamentos relacionados à aprendizagem não-emocional nos diferentes grupos;
- 4) Verificar alterações na quantidade de células do hipocampo (giro denteado e áreas CA1 e CA3) das referidas linhagens e do controle;
- 5) Investigar o padrão de proliferação celular desses animais, por meio de injeções de BrdU; imuno-histoquímica para BrdU e para doublecortina;
- 6) Verificação de morte celular no giro denteado, a partir de marcação para vermelho neutro.

MATERIAIS E MÉTODOS

A manipulação e o sacrifício dos animais nos experimentos realizados no Laboratório de Neurobiologia da Retina (Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ) seguiram as normas estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC) e aprovadas pela comissão de ética do uso de animais experimentais (CEUA) do Centro de Ciências da Saúde da UFRJ, sob protocolo IBCCF002.

3.1 Animais

3.1.1 Obtenção de linhagens de ratos selecionados para o medo condicionado

Os animais selecionados para o medo condicionado foram obtidos no biotério do laboratório de Neuropsicologia Clínica e Experimental da PUC-Rio, sob temperatura de 22°C e luminosidade controlada, com ciclos claro/ escuro alternados a cada 12 horas. O protocolo de criação das linhagens foi desenvolvido e analisado pela equipe do referido laboratório, sob orientação do Drº Landeira-Fernandez, e será descrito a seguir (Gomes, 2007).

A matriz de duas linhagens, com maior e com menor taxa de resposta de congelamento condicionado, foi originada de ratos Wistar com distribuição normal de traços fenotípicos característicos da espécie. Durante todo o procedimento, com exceção das sessões experimentais, os ratos foram acondicionados em caixas de polietileno (31x38cm), forradas com serragem de madeira, em grupos de 6 a 8 animais, tendo acesso *ad libitum* à água e à ração comercial.

Os procedimentos experimentais ocorreram durante as fases claras do ciclo. Nos cinco dias anteriores à primeira sessão de testagem, os animais foram manipulados durante dois minutos, em cada dia, pelo experimentador. Os protocolos utilizados para a obtenção das linhagens seguiram os critérios estabelecidos pela SBNeC.

Todo o procedimento de condicionamento aversivo foi realizado em uma caixa experimental, em cujo assoalho poderia ser administrada amperagem de 1mA, capaz de configurar-se como estímulo aversivo ao rato. A amostra da matriz que gerou os grupos experimentais, identificada como S0, foi de 120 animais, sendo 60 machos e 60 fêmeas, submetidos aos testes de condicionamento na idade de aproximadamente 3 meses. No primeiro dia de treino, cada animal foi colocado, individualmente, na caixa experimental, por 8 minutos. Seguiu-se apresentação de três choques de 1mA, com duração de 1 segundo cada, e intervalo de 20 segundos entre os choques. Após esse primeiro procedimento, o animal permanecia na caixa por 2 minutos. No dia seguinte, o animal era re-colocado na caixa por 8 minutos e filmado, por meio de câmera acoplada à caixa. O tempo em que exibia resposta de congelamento, definida como ausência total de movimentos, exceto por aqueles indispensáveis à respiração, foi analisado por três observadores, cuja concordância foi de 0,98. Os animais com maiores taxas de congelamento foram cruzados entre si, bem como aqueles com as taxas mais baixas de emissão desse comportamento. O mesmo procedimento descrito foi repetido nas gerações subseqüentes, e o traço de medo condicionado foi, portanto, selecionado ao longo do estabelecimento das respectivas linhagens, chamadas CAC (Carioca de Alto Congelamento) e CBC

(Carioca de Baixo Congelamento) (Gomes e Landeira-Fernandez, 2008). O gráfico a seguir mostra os resultados obtidos (Gomes, 2007):

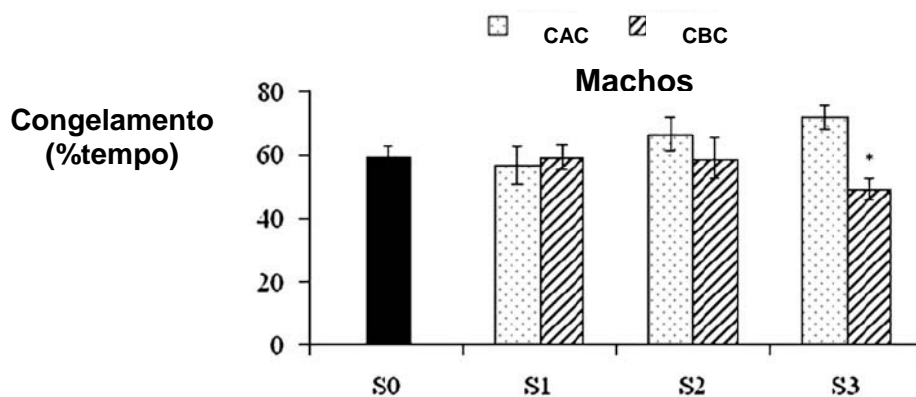


Figura 14: Porcentagem da média (\pm SEM) de congelamento condicionado durante a sessão de testagem de ratos machos selecionados para alto ou baixo congelamento condicionado em relação à população original (S0) e às três gerações seguintes (S1, S2 e S3). Asterisco indica $p < 0.001$. CAC – Cariocas de Alto Congelamento; CBC – Cariocas de Baixo Congelamento.

3.1.2 Sujeitos

Foram utilizados 42 ratos Wistar controles e 42 da linhagem experimental CAC, estes na geração S4 (experimentos histológicos e testes de LCE, interação social e nado forçado) e S6 (aprendizagem operante). Todos os animais utilizados encontravam-se, no momento de testagem, em idade adulta entre 3 e 6 meses e nenhum passou por condicionamento aversivo ou por qualquer outra experiência evocadora de estresse. Os ratos controles foram obtidos no biotério do Instituto de Bioquímica da UFRJ, e as matrizes dos grupos experimentais tiveram como procedência o biotério do Laboratório de Neuropsicologia Clínica e Experimental da PUC-Rio, conforme protocolo descrito anteriormente. Dessa forma, os animais utilizados nesse trabalho nasceram e cresceram sob as mesmas condições, no biotério do Instituto de Bioquímica da UFRJ, a saber: ciclo de luminosidade claro/

escuro de 12h; acondicionamento dos animais em caixas de polietileno (31x38cm), em grupos de 3-6; água e comida à vontade; temperatura de 22°C. Em todos os experimentos foram utilizados ratos machos, de dois grupos: controle e selecionados para alta resposta de congelamento (CAC).

3.2 Testes Comportamentais

3.2.1 Labirinto em cruz elevado

Os experimentos do teste do labirinto em cruz elevado (LCE) foram realizados no Laboratório de Neuropsicologia Clínica e Experimental, da PUC-Rio, sob coordenação do Dr.º Landeira-Fernandez. O labirinto consiste de um aparato de madeira, com dois braços abertos e dois fechados, suspensos 50cm do chão. Para esse experimento, os animais foram levados para a PUC-Rio, onde ambientaram-se por duas semanas antes do início do procedimento.

Durante cinco dias consecutivos anteriores à sessão de testagem, os animais foram manipulados, por dois minutos cada, pelo mesmo experimentador, como forma de amenizar o contato com o pesquisador como variável ansiogênica para os animais, conforme já descrito para a obtenção das linhagens. Na sessão experimental, os animais foram colocados no labirinto, individualmente, com a cabeça voltada para um dos braços fechados, alternadamente, e o labirinto foi limpo com álcool etílico hidratado 92,8° antes da primeira sessão, bem como entre as demais sessões. O objetivo da limpeza do aparato foi o de eliminar possíveis interferências do cheiro de um animal sobre o desempenho do seguinte. Cada teste foi filmado, por meio de câmera disposta verticalmente ao aparato, por 10 minutos. Os vídeos foram posteriormente analisados e o número de entradas em cada braço,

assim como o tempo gasto em cada um deles, foram comparados entre os grupos (n=16 CAC; n=12 controle).

3.2.2 Interação social

A caixa experimental foi feita de PVC preto (54 x 36 x 27 cm), sob luz branca ambiente, de forma adaptada ao modelo original do teste. O fundo da caixa foi dividido, com fita adesiva, em 6 quadrados iguais (18 x 18cm). O procedimento experimental foi realizado de acordo com o protocolo de Henniger e colaboradores. (2000). Pares de ratos da mesma linhagem, mas criados em caixas diferentes e que, portanto, não tiveram contato anteriormente, foram colocados no centro da arena, um de frente para o outro. Os animais (n=12/ grupo) foram familiarizados à caixa, individualmente, durante dois dias antes da testagem, em uma sessão de 10 minutos a cada dia. Os pares foram balanceados pelo peso e o comportamento na sessão de testagem foi gravado em câmera de vídeo, montada verticalmente à arena. Os parâmetros registrados foram: (1) tempo gasto em interação social ativa (cheirar, seguir e chutar o parceiro, assim como montar e pular em cima do mesmo); (2) frequência com que os animais cruzavam as linhas delimitadas no fundo da caixa. Esse comportamento, conhecido como ambulação, permite verificar se há alterações locomotoras entre os grupos, o que poderia interferir na análise dos efeitos de ansiedade.

3.2.3 Nado forçado

O teste do nado forçado foi inicialmente idealizado por Porsolt, LePichon e Jalfre (1977). Neste trabalho, um protocolo modificado do teste foi utilizado, de acordo com as medidas do tanque experimental propostas por Zangen *et al.* (2001).

Os ratos (n=9/ grupo) foram submetidos a duas sessões de treino, uma em cada um dos dois dias anteriores ao dia em que ocorreu a sessão de testagem. Nas sessões de treino, com duração de 10 minutos cada, os animais foram colocados, individualmente, em um tanque de vidro transparente, com formato cilíndrico e com medidas de: 42 cm de altura; 17,5 cm de largura; com profundidade de água a 33 cm e em temperatura de 25-30°C. Essas mesmas condições foram obedecidas na sessão de testagem, quando os animais foram filmados por meio de câmera SONY Video Hi8 TRV238, disposta a 90cm de distância do aparato. Após as sessões, os animais foram gentilmente secos e devolvidos às suas respectivas caixas. O comportamento de nadar foi definido como exibição de respostas de fuga (mergulhar, nadar vigorosamente com as 4 patas, circular o tanque, escalar as paredes do tanque) e a imobilidade foi definida como flutuar apenas o suficiente para deixar o focinho acima do nível da água (Chau *et al.*, 2001; Rada *et al.*, 2003; 2006).

3.2.4 Aprendizagem operante – Labirinto em T

A aprendizagem operante, isto é, aprendizagem sem o emparelhamento de estímulos neutros e incondicionados, pode ser avaliada por uma variedade de testes. O teste escolhido no presente trabalho foi o labirinto em T, que consiste em um labirinto de três braços fechados por uma porta removível em cada braço, formando um T, conforme mostra a figura 15:

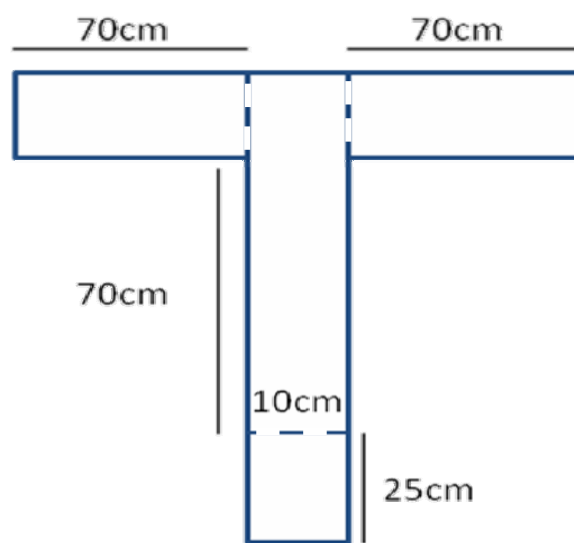


Figura 15: O labirinto em T para teste de aprendizagem operante de tarefa de alternância. Construído em madeira e revestido em fórmica branca, o labirinto apresenta as medidas descritas acima e altura de 30cm. Linhas tracejadas indicam portas removíveis.

O labirinto em T é um teste de memória, baseado na capacidade que o animal possui de, estando em privação alimentar, escolher o braço do labirinto onde há a recompensa (20mg de cereais açucarados). Inicialmente, os animais foram pesados e lhes foram oferecidos 10% do seu peso em ração. Os ratos foram submetidos a essa restrição alimentar por 4 dias consecutivos antes da ambientação no labirinto e durante todo o procedimento experimental, de forma que nos dias de testagem eles pesassem entre 86-90% do seu peso inicial. Eles foram, portanto, pesados todos os dias e a dieta foi adequada ao peso do animal em cada dia, seguindo o critério descrito acima.

Após 4 dias apenas em restrição alimentar, os animais foram habituados, individualmente, no labirinto durante dez minutos, com as portas dos braços estando semi-abertas e com a recompensa nos mesmos, a fim de que o animal explorasse o ambiente e conhecesse as condições deste. Nas sessões experimentais (total de 8 sessões compostas por 6 tentativas em cada uma), esta recompensa é colocada

nos dois braços do labirinto na primeira tentativa e, na tentativa seguinte da mesma sessão, a recompensa é colocada no braço oposto ao que o animal escolheu na primeira tentativa. Assim, quando o animal escolhe um dos braços, a porta deste é fechada por 20s. O rato é então colocado novamente no braço de início por 5s e, dessa vez, o alimento estará no braço oposto ao escolhido na tentativa anterior. O braço escolhido por ele é fechado por 20s novamente, mesmo que ele tenha escolhido o braço errado. Em seguida, o rato é recolocado no braço de início por 5s e começa-se uma nova tentativa. Quando o animal escolhe o braço errado, a recompensa continua no braço oposto, de forma que ele pode se corrigir na tentativa subsequente. Assim, a alternância da recompensa só ocorre após as tentativas acertadas do animal.

O objetivo do teste é, portanto, verificar o aprendizado do animal em uma tarefa de alternância. Todo o procedimento foi realizado pelo mesmo pesquisador, de forma a evitar vieses provocados por ansiedade causada pelo contato com diferentes agentes. Foram utilizados 24 ratos neste teste (12 para cada grupo) e o aparato foi limpo com etanol 98% entre as tentativas de cada animal e entre os sujeitos.

3.2.4 Reconhecimento de objetos

Para o teste de reconhecimento de objetos, foi utilizada uma arena medindo 40 x 40 cm, e os procedimentos experimentais seguiram aqueles descritos por De Lima *et al.* (2005). Os animais (n=12/ grupo) foram habituados na arena sem os objetos durante 20 minutos, por 4 dias. Vinte e quatro horas após o último dia de

habituação, os animais foram, individualmente, colocados no aparato e lhes foram apresentados 2 objetos idênticos (A1 e A2) durante 5 minutos, para exploração livre. Os objetos ou são de plástico, ou de vidro, ou de metal. Foram utilizadas diversas cópias de cada objeto, evitando o rastro olfatório. A exploração foi definida como farejar ou tocar os objetos com o nariz ou patas dianteiras. Vinte e quatro horas após a primeira fase a memória de longo prazo foi avaliada. Nessa fase, os ratos exploraram a arena por 5 minutos na presença de um objeto familiar (A) e de um objeto novo (B). Para metade dos ratos, A é o objeto familiar e B é o objeto novo. Para a outra metade, é selecionado o oposto. O objetivo desse procedimento é reduzir os efeitos de preferência pelo lugar e pelo objeto. Para a análise dos dados, é necessário o cálculo do índice de reconhecimento para cada animal, descrito a seguir (de Lima *et al.*, 2005):

Índice de reconhecimento:

$$d_2 = TB / (TA + TB)$$

TA = tempo gasto explorando o objeto familiar

TB = Tempo gasto explorando o objeto novo

Também foram avaliados os níveis totais de exploração, definidos pelos índices e1 e e2, cujo cálculo está descrito abaixo (Ennaceur e Delacour, 1988):

Medida de exploração dos objetos:

$e_1 = A+A$ (tempo gasto explorando ambos os objetos familiares)

$e_2 = A+B$ (tempo gasto explorando ambos os objetos)

A medida de exploração dos objetos valida o índice de reconhecimento, na medida em que confirma que o animal apresenta a capacidade exploratória, que é condição para o reconhecimento, inalterada.

3.3 Hipocampo - Histologia

3.3.1 Perfusão dos animais

O sacrifício dos animais utilizados para marcação do tecido cerebral visando à verificação de alterações na quantidade de células do hipocampo, bem como para os estudos de neurogênese hipocampal, foi feito por meio de perfusão.

Para a perfusão, os animais foram submetidos à anestesia geral profunda com pentobarbital sódico (30 mg/ml/kg, via intraperitoneal) e após a comprovação do estado de anestesia profunda (verificada segundo teste de reflexos do animal quanto à sensibilidade dos olhos, patas e cauda à pressão tátil), os animais foram imobilizados e em seguida perfundidos por via intracardíaca. A perfusão foi realizada com solução de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato (0,1M, pH 7,4), para fixação, acrescido de 10% de sacarose para crioproteção. Com o auxílio de um escalpe introduzido no ventrículo esquerdo (após a secção do diafragma e rebatimento do gradil costal) a infusão se iniciou e o átrio direito foi seccionado para permitir a saída de sangue e a substituição pelo fixador. Sendo comprovada a eficácia da fixação pela rigidez do animal e palidez dos órgãos foi iniciada a infusão de sacarose a 20% e a 30% em tampão fosfato (0,1M, pH 7,4). Ao final das infusões o cérebro do animal foi dissecado e deixado em sacarose a 30% por pelo menos 24 horas.

3.3.2 – Obtenção do tecido

Após o procedimento de perfusão, os cérebros foram retirados e imersos em solução de sacarose 30% em tampão fosfato (0,1M – pH 7,2), para crioproteção, por um período variável de 3 a 7 dias, em ambiente refrigerado (4°C). Os cérebros foram, individualmente, colocados em um suporte de alumínio para cortes em criostato e congelados em nitrogênio líquido (-196°C), na presença de meio de inclusão aquoso (OCT – Sakura Finetek, Torrance, CA). Cortes transversais de 40µm foram obtidos em criostato, à temperatura entre -19°C e -21°C e colhidos em lâminas de vidro, previamente tratadas com poli-L-lisina (Sigma P-2636) diluída em água destilada (0,2 mg/mL) por duas vezes e postas em estufa (60°C) para secar. O procedimento de obtenção dos cortes no criostato foi feito de modo a cada lâmina conter 3 fatias de cérebro nas coordenadas entre interaural 6,2mm/ bregma -2,8mm a interaural 4,7mm/ bregma -4,3mm (Paxinos e Watson, 1982), sendo mantido um intervalo de 5 fatias entre os cortes da mesma lâmina, de modo a evitar que uma mesma lâmina contivesse células repetidas. As lâminas eram identificadas, mantidas em temperatura ambiente por 24 horas e, após, armazenadas em freezer à temperatura de -20°C.

3.4 – Quantificação de células hipocampais

3.4.1 – Marcação celular com DAPI

Lâminas contendo fatias de cérebro dos diferentes grupos estudados foram lavadas uma vez com solução tampão fosfato salina (PBS) e tratadas com DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol) em concentração de 1mg/mL, um marcador fluorescente e

específico de DNA, por 2,5 minutos em caixa de acrílico escura e protegida da luz. Em seguida, as lâminas foram novamente lavadas com PBS por uma vez, montadas com N-propil galato 0,2M em PBS pH 7,2 e guardadas dentro de caixas envolvidas por alumínio. Por meio de câmera digital (Nikon Coolpix995) acoplada ao microscópio de fluorescência (Zeiss Standard 20), com aumento de 10x e foco de 3,6, foram obtidas fotos do giro dentado e das áreas CA1 e CA3 dos hipocampus em cortes dos diferentes grupos (n=3; total de fatias para cada grupo = 9). Com a utilização do programa Image Proplus 4.0, uma amostra de oito campos de 100 μm^2 /cada foi contada em cada foto das regiões do giro dentado, CA1 e CA3, por um pesquisador cego ao experimento. Após a obtenção das fotos, as lâminas foram re-colocadas em caixas protegidas da luz e guardadas em freezer à temperatura de -20°C .

Foram utilizados cérebros de 3 animais de cada grupo (controle e CAC), com contagem de 10 cortes de hipocampo por animal.

3.5 – Neurogênese hipocampal

3.5.1 – Administração de BrdU

Os animais pertencentes aos dois grupos (controle e CAC; n = 6/ grupo) receberam injeções intraperitoneais de BrdU na concentração de 50 mg/ kg. O BrdU foi diluído em NaOH 7mM e administrado em solução a 10mg/ml. As injeções foram diárias, por 7 dias pela manhã e os ratos foram sacrificados à tarde do sétimo dia.

3.5.2 – Processamento imunohistoquímico

O termo imuno-histoquímica refere-se à técnica utilizada para localizar uma substância em uma preparação histológica por meio de um anticorpo específico que a reconheça. A reação resultante da interação antígeno-anticorpo pode ser visualizada por meio da conjugação desse anticorpo com um marcador, que pode ser um metal, um composto fluorescente ou uma enzima. Nesse trabalho, foram utilizados marcadores fluorescentes e enzimáticos.

3.5.3 Imuno-histoquímica para BrdU

As lâminas contendo os cortes foram descongeladas a temperatura ambiente. A imuno-histoquímica para a detecção do BrdU recebeu um pré-tratamento do tecido para desnaturar o DNA. As lâminas foram aquecidas a 37° C, primeiramente em água destilada por 10 minutos, depois em uma solução de HCl 2N por 30 minutos e por fim em uma solução de tampão borato (0,1M, pH 8,5) por dez minutos. Os cortes foram então expostos a uma solução de peróxido de hidrogênio a 3% em solução salina tamponada (PBS) por 30 minutos, a fim de bloquear marcações de peroxidase endógena. Após este procedimento foram realizadas lavagens das lâminas com PBS três vezes em intervalos de 5 minutos. Passou-se para a pré-incubação com albumina de soro bovino (BSA) a 5% em PBS adicionado de Triton X-100 a 0,25% (PBST) por uma hora com o intuito de se bloquear possíveis sítios antigênicos que poderiam ser reconhecidos pelo

anticorpo secundário. Em seguida, os cortes foram incubados por 24h com o anticorpo primário diluído em PBST. Em nosso trabalho foi utilizado o anticorpo anti-BrdU Amersham produzido em camundongo na diluição de 1:1000 em DNase própria para esta diluição.

Após o período de incubação, os cortes foram lavados com PBS por três vezes a um intervalo de 5 minutos, e incubados com um anticorpo secundário Alexa 488 anti-IgG de camundongo diluído em PBST (1:200), por três horas, protegidos da luz.

Posteriormente, novas três lavagens por 5 minutos com PBS foram feitas e novamente os cortes foram lavados com tampão fosfato 0,1M e montados com lamínulas em N-propil galato (0,2M, pH7,2). Nos experimentos controles da reação imunológica, apenas o anticorpo primário é omitido, enquanto todo o restante do procedimento é o mesmo. As lâminas foram quantificadas em microscópio óptico Zeiss em objetiva de 40X.

O número de células imunorreativas ao BrdU na camada subgranular foi quantificado em nove secções coronais de cérebro contendo o giro denteado com intervalos de seis secções entre elas.

3.5.4 – Processamento imunohistoquímico para doublecortina

O procedimento imunohistoquímico para a doublecortina foi realizado utilizando-se a pré-incubação com o soro de albumina bovino (BSA) a 5% em PBS adicionado de Triton X-100 a 0,25% (PBST) por uma hora. Incubação por 24h com o anticorpo primário anti-DCX (Santa Cruz) na diluição de 1:200 em PBST e como secundário Cy3 anti-cabra diluído em PBST (1:200), por três horas, protegidos da luz. Para melhor quantificação, foi utilizado o secundário anti-cabra biotilado diluído em PBST (1:200 – Vector) seguido pela lavagem com PBS e posterior incubação com o composto avidina-biotina conjugado a peroxidase (Vector), na diluição de 1:50 em PBST, por mais uma hora. Depois de mais três lavagens por 5 minutos com PBS foi iniciada a revelação da peroxidase através do cromógeno (SG) diluído em PBS que promove a formação de um precipitado de coloração azul. Após aproximadamente dez minutos e sob proteção da luz, os cortes foram então lavados com PBS. As lâminas foram montadas em glicerol tamponado e fotografadas em microscópio óptico Zeiss com objetiva de 40X.

O número de células imunorreativas a DCX na camada subgranular foi quantificado em nove secções coronais de cérebro contendo o giro denteado com intervalos de cinco secções entre elas.

Neste procedimento foram utilizados 6 ratos machos (3 ratos para cada grupo).

3.5.5 – Coloração com vermelho neutro

Cortes obtidos segundo o mesmo protocolo utilizado para processamento imunohistoquímico foram imersos em tampão acetato 5% por cinco minutos e, em seguida, imersos em solução de vermelho neutro 1% por 1 minuto. Após, foram novamente imersos em tampão acetato 5% para retirada do excesso da solução anterior, por aproximadamente 10 minutos, e mantidos em temperatura ambiente por 24h. Foram, então, imersos em álcool etílico absoluto por 5 minutos e, em seguida, em xilol por 1 minuto. Finalmente, as lâminas foram montadas em Entellan (Neu/Merck).

Foram utilizados cérebros de 3 animais de cada grupo, com contagem de 10 cortes de hipocampo por animal.

3.7 – Análises Estatísticas

Todos os dados foram analisados no programa Graph Prism 4.0, utilizando-se o teste *t de Student* para amostras não-pareadas. Todos os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. As análises histológicas estão expressas em mm^3 , segundo cálculo obtido a partir da espessura do corte analisado (Silveira, 2008). Dessa forma, se em um campo foram contadas 9 células e se o corte tem $40\mu\text{m}$, a estimativa de células por mm^3 foi obtida de acordo com o cálculo:

$$\begin{aligned} & 9 \text{ células} - 40\mu\text{m} \\ & \times \text{células} - 1000\mu\text{m} = 225 \text{ células}/\text{mm}^3 \end{aligned}$$

RESULTADOS

4.1 Testes Comportamentais

4.1.1 Labirinto em cruz elevado

O LCE é um dos testes mais utilizados para a avaliação do medo inato, identificado a partir do número de entradas nos braços abertos do labirinto, bem como do tempo que o animal gasta nesses braços, e de comportamentos como levantar-se (*rearing*) e taxas de defecação. Os parâmetros utilizados nesse trabalho correspondem aos dois primeiros e os resultados estão expressos como média \pm média do erro padrão. Quanto ao número de entradas nos braços abertos do LCE, a comparação entre os grupos mostra que cariocas com alto congelamento (CAC) apresentam diferença significativa neste parâmetro, indicando maior ansiedade em relação ao grupo controle ($6,83 \pm 1,40$ CTRL; $3,44 \pm 0,72$ CAC ; $p < 0,05$), conforme mostra o gráfico 1:

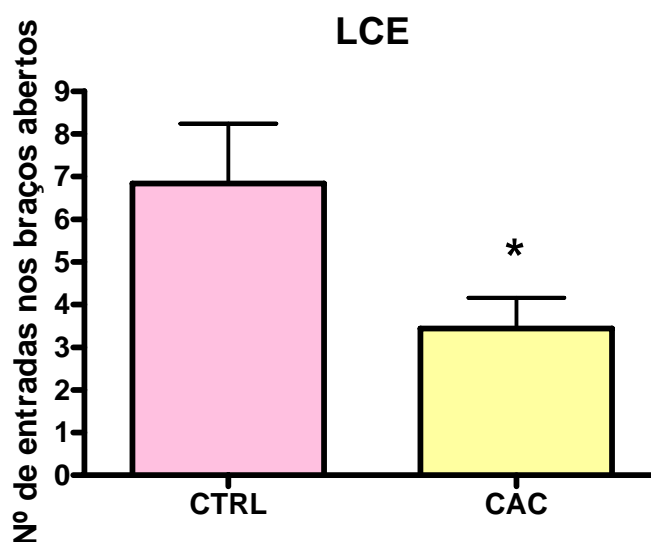


Gráfico 1: Número de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (LCE). ■ CTRL= grupo controle (n=12); ■ CAC = cariocas com alto congelamento (n=16); $p < 0,05$.

Esse dado é um indicativo de maiores níveis de ansiedade no grupo experimental, e a análise da porcentagem do tempo em que os animais passam nesses braços abertos confirma a indicação de maior ansiedade. Assim, a comparação entre os grupos mostra que cariocas com alto congelamento (CAC) passam significativamente menos tempo nos braços abertos do LCE, indicando maior ansiedade em relação ao grupo controle. (35,81% ± 4,52 CTRL; 23,82% ± 3,41 CAC; $p < 0,05$), conforme registrado no gráfico 2:

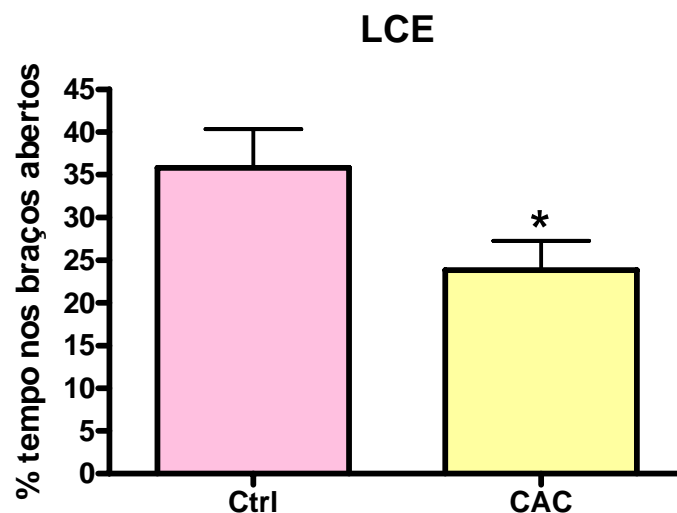


Gráfico 2: Porcentagem do tempo gasto nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (LCE).
■ CTRL = grupo controle (n=12); ■ CAC = cariocas com alto congelamento (n=16); $p < 0,05$.

O teste do LCE também permite a avaliação da atividade locomotora dos animais, medida a partir do número de entradas nos braços fechados do labirinto. A comparação entre os grupos mostra que cariocas com alto congelamento (CAC) não apresentam diferenças significativas com relação ao grupo controle no comportamento analisado (10,42 ± 0,88 CTRL; 7,94 ± 0,94 CAC; $p > 0,05$), conforme mostrado no gráfico 3:

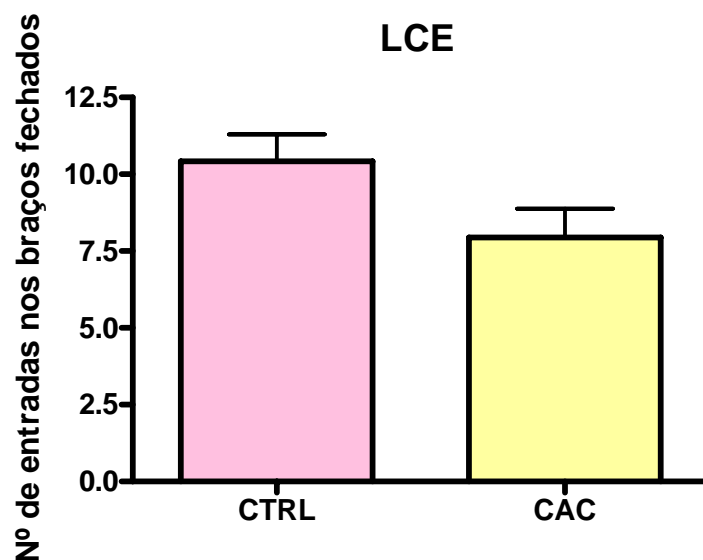


Gráfico 3: Número de entradas nos braços fechados do labirinto em cruz elevado (LCE), parâmetro indicativo de atividade locomotora.; ■ CTRL = grupo controle (n=12); ■ CAC = cariocas com alto congelamento (n=16); $p > 0,05$.

Interessantemente, as diferenças significativas identificadas no LCE quanto ao número de entradas nos braços abertos e ao tempo gasto nesses braços, ambos parâmetros indicativos de níveis de ansiedade, não podem ser explicados a partir da atividade locomotora dos grupos, tendo em vista que não houve diferença significativa entre os mesmos no número de entradas nos braços fechados do labirinto.

4.1.2 Interação social

Conforme colocado anteriormente, o teste de interação social permite também a investigação do comportamento ansioso, por meio da análise do tempo em que os ratos interagem com um parceiro desconhecido, tendo-se como parâmetro que animais mais ansiosos tendem a apresentar menor interação social. É interessante lembrar que a condição de interação é definida como cheirar, seguir e chutar o parceiro, assim como montar e pular em cima do parceiro.

Com relação ao tempo em que os animais exibem esses comportamentos definidos como interativos, a comparação entre os grupos mostra que os grupos apresentam diferença quanto ao tempo gasto em interação social, tendo o grupo carioca com alto congelamento (CAC) exibido menos tempo em comportamentos característicos de interação social quando comparado ao grupo controle ($212,00 \pm 27,19$ CTRL; $70,33 \pm 9,60$ CAC; $p < 0.05$), conforme pode ser verificado no gráfico 4:

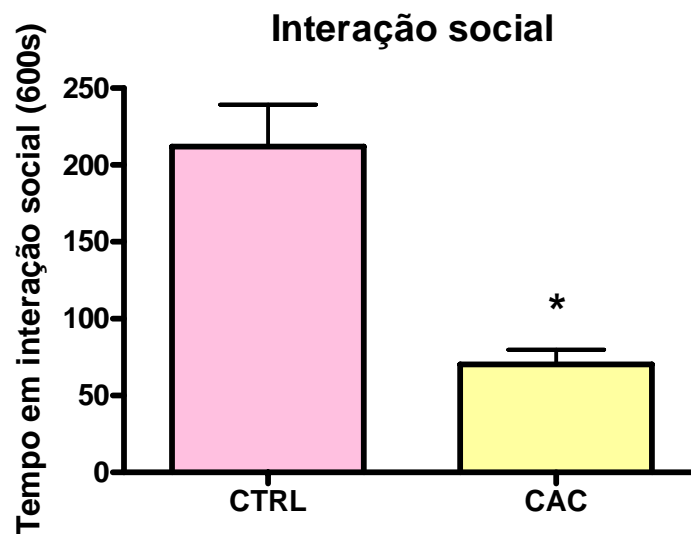


Gráfico 4: Tempo gasto em comportamentos indicativos de Interação social. ■ CTRL = grupo controle (n=6 pares); ■ CAC = cariocas com alto congelamento (n=6 pares); p<0.05.

Ademais, o teste possibilita a identificação de possíveis alterações locomotoras, que poderiam estar entre as causas de alterações na interação social, e que podem ser medidas pela quantificação das vezes em que o animal cruza as marcações estabelecidas no fundo da arena. A comparação entre os grupos mostra que cariocas com alto congelamento (CAC) não apresentam diferenças significativas no comportamento analisado em relação ao grupo controle. ($101,30 \pm 14,59$ CTRL; $71,83 \pm 11,22$ CAC; $p > 0,05$). Os resultados acerca dessa atividade locomotora, conhecida como ambulação, estão descritos no gráfico 5:

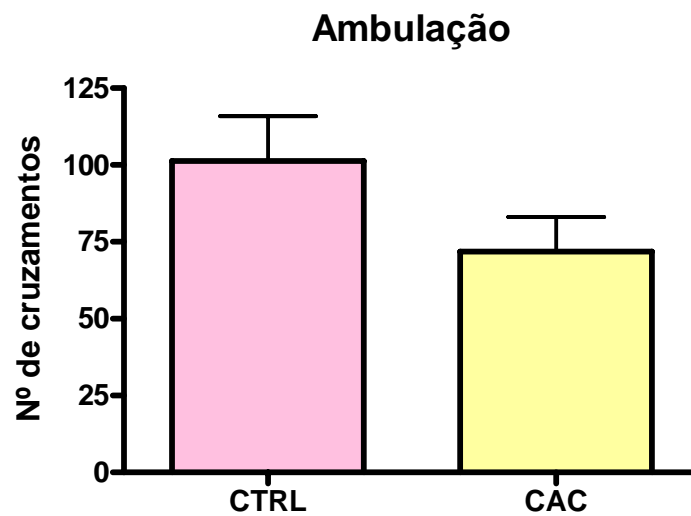


Gráfico 5: Ambulação. ■ CTRL = grupo controle (n=6 pares); ■ CAC = cariocas com alto congelamento (n=6 pares); $p < 0,05$.

Dessa forma, as alterações verificadas no comportamento de interação social podem ser explicadas a partir das diferenças na manifestação do traço ansioso do grupo experimental, não se devendo a uma alteração na capacidade de deslocamento.

Esses dados, em conjunto com aqueles verificados no LCE, sugerem fortemente o traço ansioso como característica da linhagem CAC, sem que seja preciso a apresentação prévia de estímulos aversivos para a manifestação de um perfil comportamental ansioso.

4.1.3 Nado Forçado

Uma questão importante a saber é identificar se o traço ansioso se manifesta com algum outro componente emocional, como a depressão, ou se a seleção da linhagem CAC foi específica para os alelos responsáveis pelos padrões de medo e ansiedade. Nesse sentido, foi utilizado o teste do nado forçado, em que os animais são colocados em um cilindro contendo água e o tempo em que exibem comportamentos de fuga é indicativo de menor depressão.

A comparação entre os grupos mostra que não há diferença significativa entre os mesmos quanto ao tempo gasto em comportamentos de fuga medido no teste do nado forçado ($483,10 \pm 13,31$ CTRL; $427,70 \pm 27,32$ CAC; $p > 0,05$), como mostra o gráfico 6:

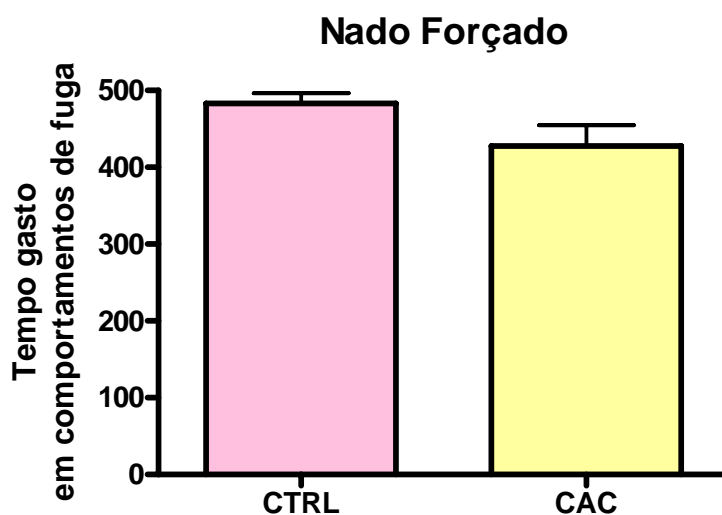


Gráfico 6: Nado forçado. ■ CTRL = grupo controle (n=9); ■ CAC = cariocas com alto congelamento (n=9); $p > 0,05$.

4.1.4 Aprendizagem operante: labirinto em T

Com o objetivo de avaliar se o grupo CAC apresenta alterações em sua memória cognitiva, isto é, não-emocional, foi realizado o teste do labirinto em T. A comparação entre os grupos mostra que não há diferença significativa entre os mesmos quanto à porcentagem de acertos no labirinto em T ($70,08 \pm 2,76$ CTRL; $78,13 \pm 3,01$ CAC; $p > 0,05$), segundo mostra o gráfico 7:

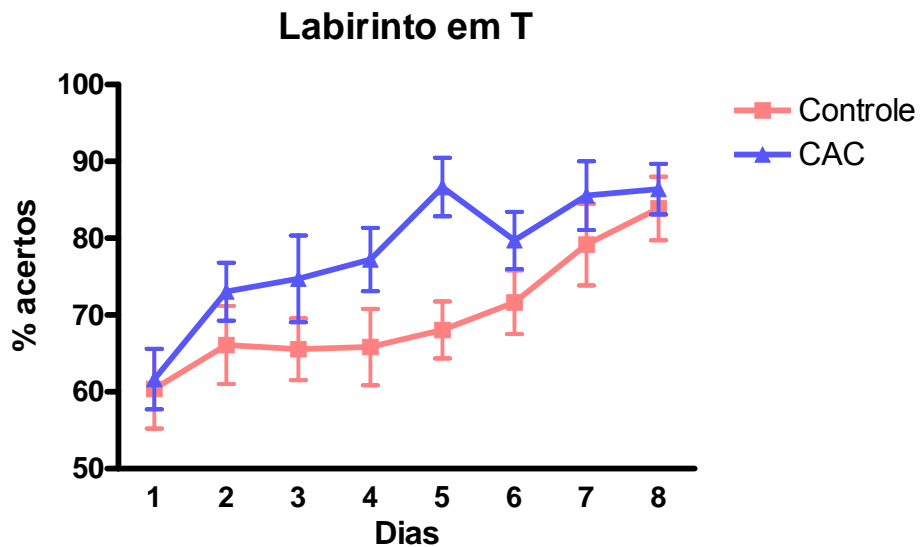


Gráfico 7: Labirinto em T. ■ CTRL = grupo controle (n=12); ■ CAC = cariocas com alto congelamento (n=12); $p > 0,05$.

4.1.5 Teste de reconhecimento de objetos

Para que a memória não-emocional fosse avaliada com mais consistência, o teste de reconhecimento de objetos foi utilizado, em adição ao labirinto em T. A comparação entre os grupos mostra que não há diferença significativa entre os mesmos quanto ao índice de reconhecimento ($0,59 \pm 0,041$ CTRL; $0,53 \pm 0,08$ CAC; $p > 0,05$), como mostra o gráfico 8:

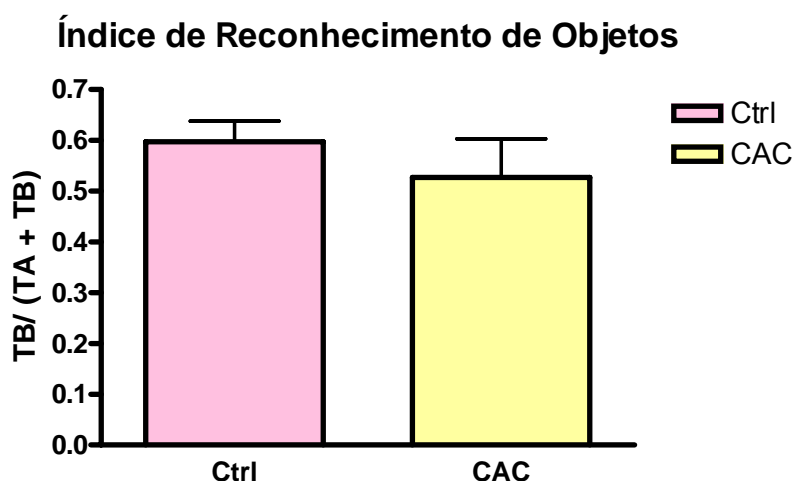


Gráfico 8: Reconhecimento de objetos – Índice de Reconhecimento de Objetos. ■ CTRL = grupo controle (n=12); ■ CAC = cariocas com alto congelamento (n=12); $p > 0,05$.

Tampouco os grupos diferiram significativamente com relação aos índices de exploração (e1: tempo gasto explorando ambos os objetos familiares: $39,92 \pm 8,21$ CTRL; $23,50 \pm 4,46$ CAC; e2: tempo gasto explorando ambos os objetos: o familiar e o novo: $25,92 \pm 4,61$ CTRL; $23,75 \pm 4,44$ CAC; $p > 0,05$). Os gráficos 9 e 10 ilustram a quantificação desses dois parâmetros:

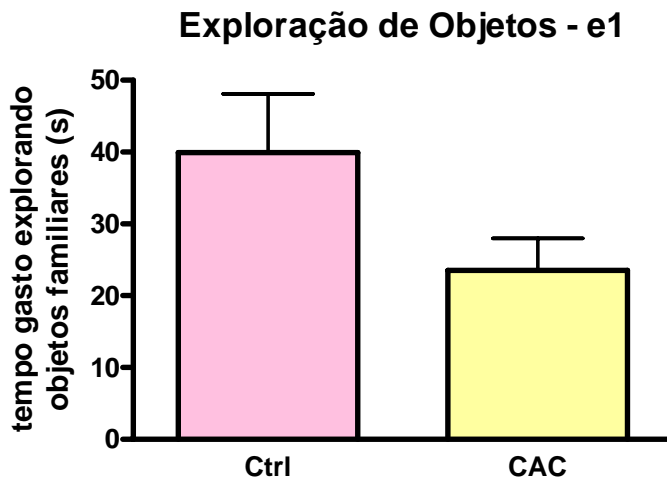


Gráfico 9: Reconhecimento de objetos – Medida de Exploração de Objetos – e1 (tempo gasto explorando ambos os objetos familiares). ■ CTRL = grupo controle (n=12); ■ CAC = cariocas com alto congelamento (n=12); $p > 0,05$.

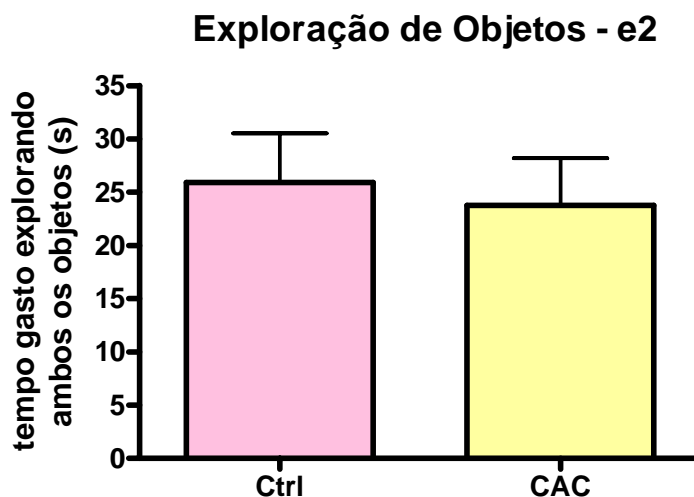


Gráfico 10: Reconhecimento de objetos – Medida de Exploração de Objetos – e2 (tempo gasto explorando ambos os objetos: o familiar e o novo). ■ CTRL = grupo controle (n=12); ■ CAC = cariocas com alto congelamento (n=12); $p > 0,05$.

Assim, não foi observada diferença significativa quanto aos níveis de exploração dos objetos, tanto de novos quanto de familiares, e quanto ao índice de reconhecimento, o qual é função do tempo de exploração dos objetos, confirmando que a linhagem CAC apresenta a memória não-emocional inalterada.

4.2 Avaliações histológicas

4.2.1 Análise qualitativa do tecido hipocampal

Conforme descrito anteriormente, a formação hipocampal é composta por setores com camadas celulares, conhecidos como giro denteado (GD) e regiões CA1 e CA3. Por meio de coloração com DAPI, foi possível verificar que o tecido do hipocampo dorsal do grupo CAC encontra-se preservado, sem alterações qualitativas em nenhuma das três regiões mencionadas. A figura 17 mostra secções de 40 μ m de GD, CA1 e CA3:

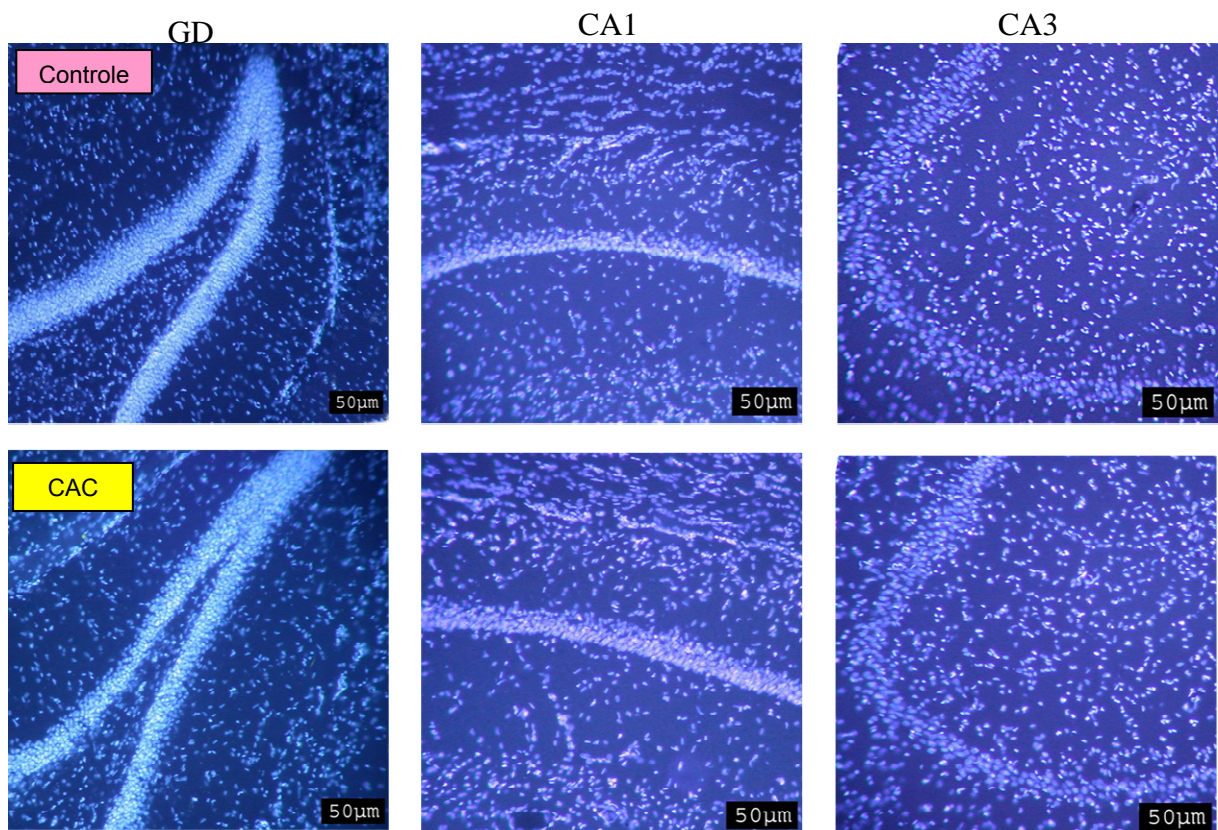


Figura 17: Análise qualitativa do tecido hipocampal dorsal (secções de 40 μ m). ■ CTRL = grupo controle (n=3); ■ CAC = cariocas com alto congelamento (n=3).

4.2.2 Quantificação de células hipocampais

Para a análise quantitativa de células das três regiões hipocampais (giro denteado, CA1 e CA3), foi utilizada a marcação com DAPI e posterior contagem de imagens extraídas do microscópio. Não houve diferença significativa entre os grupos em nenhuma das regiões hipocampais analisadas (GD: 3136,00 ± 50,74 CAC; 3008,00 ± 43,59 CTRL; CA1: 2431,00 ± 48,49 CAC; 2419,00 ± 44,79 CTRL; CA3: 2207,00 ± 43,24 CAC; 2248,00 ± 58,46 CTRL; $p > 0,05$), conforme mostrado nos gráficos 11, 12 e 13:

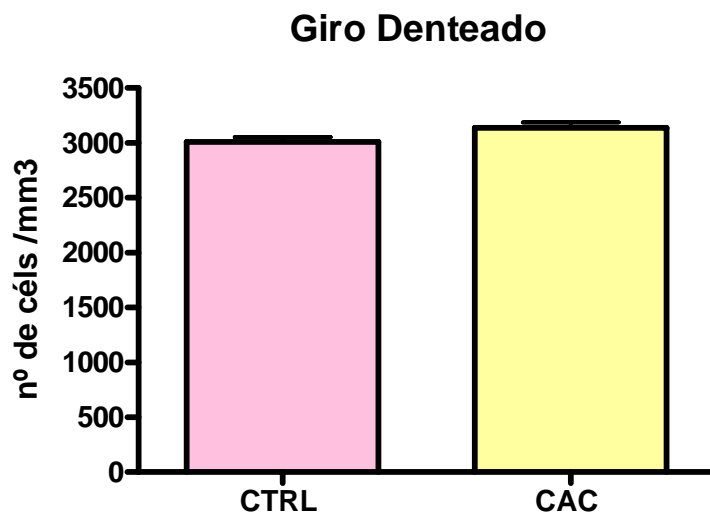


Gráfico 11: Contagem de células marcadas com DAPI no hipocampo, especificamente, no giro denteado de ratos controles e de ratos da linhagem cariocas com alto congelamento (CAC). ■ CTRL = grupo controle (n=3); ■ CAC = cariocas com alto congelamento (n=3); $p > 0,05$.

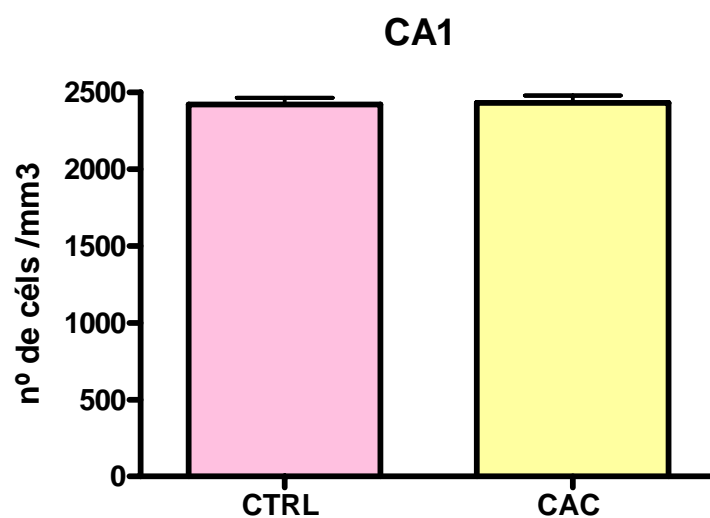


Gráfico 12: Contagem de células marcadas com DAPI no hipocampo, especificamente, na área CA1 de ratos controles e de ratos da linhagem Cariocas com alto congelamento (CAC). ■ CTRL = grupo controle (n=3); ■ CAC = cariocas com alto congelamento (n=3); $p > 0,05$.

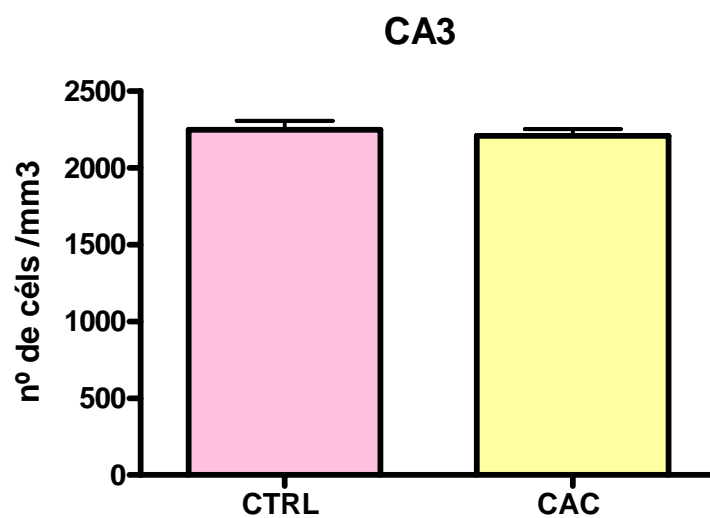


Gráfico 13: Contagem de células marcadas com DAPI no hipocampo, especificamente, na área CA3 de ratos controles e de ratos da linhagem cariocas com alto congelamento (CAC). ■ CTRL = grupo controle (n=3); ■ CAC = cariocas com alto congelamento (n=3); $p > 0,05$.

4.3 Imuno-histoquímica para BrdU

Para investigar se havia diferenças nos níveis de proliferação celular no giro denteado dos grupos estudados, foram efetuadas injeções intra-peritoneais de BrdU e, após a obtenção de secções coronais do hipocampo dorsal (40 μ m), foi realizada imuno-histoquímica para essa molécula, conforme protocolo descrito anteriormente. Comparação entre os grupos mostra que o grupo CAC apresenta significativamente menos células BrdU⁺/ mm³ quando comparado ao grupo controle (281,80 \pm 68,76 CTRL; 145,20 \pm 13,21 CAC; p<0,05), conforme mostra o gráfico 14 e ilustra a figura 18:

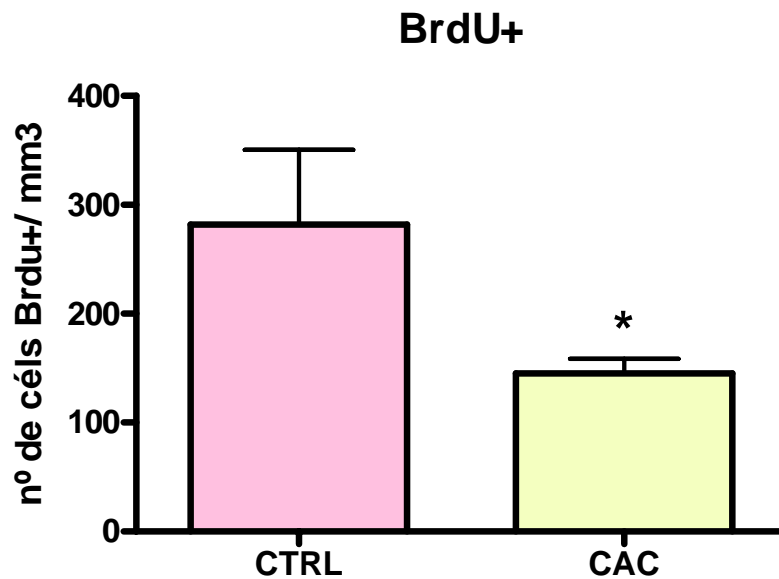


Gráfico 14: Número de células marcadas para BrdU/ mm³. ■ CTRL = grupo controle (n=6); ■ CAC = cariocas com alto congelamento (n=6); p<0,05.

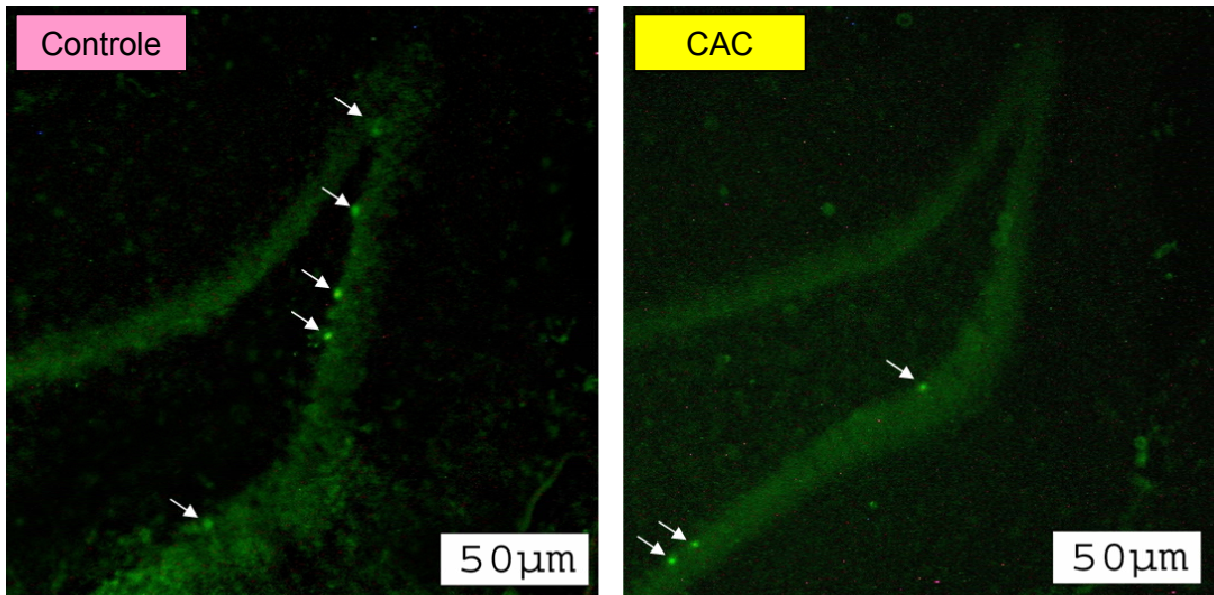


Figura 18: Imuno-histoquímica para BrdU em secções de 40µm do giro denteado do hipocampo dorsal. Setas apontam células BrdU⁺. ■ grupo controle; ■ grupo CAC.

4.4 Imuno-histoquímica para doublecortina

Uma vez identificada a menor proliferação celular no giro denteado do grupo CAC, procedeu-se à imuno-histoquímica para doublecortina em fatias cerebrais de ambos os grupos, com o objetivo de identificar se esses níveis de proliferação corresponderiam a níveis de proliferação neuronal. A comparação entre os grupos mostra que o grupo CAC apresenta significativamente menos células marcadas para doublecortina/ mm³ quando comparado ao grupo controle (550,00 ± 47,97 CTRL; 206,30 ± 40,96 CAC; p<0,05), conforme ilustrado no gráfico 15:

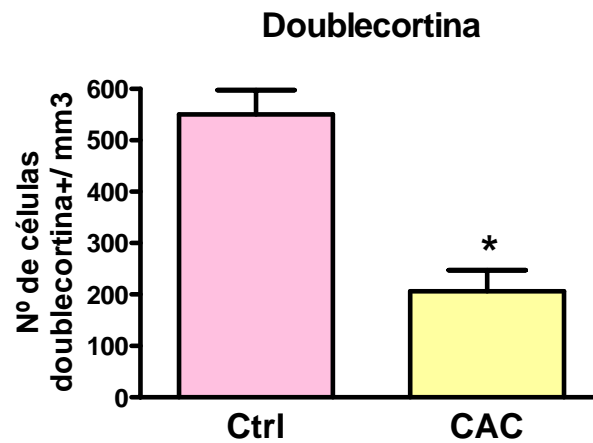


Gráfico 15: Número de células marcadas para doublecortina/ mm³. ■ CTRL = grupo controle (n=3); ■ CAC = cariocas com alto congelamento (n=3); p<0,05.

A figura 19 mostra a marcação para doublecortina em secções coronais de 40µm do giro denteado dorsal:

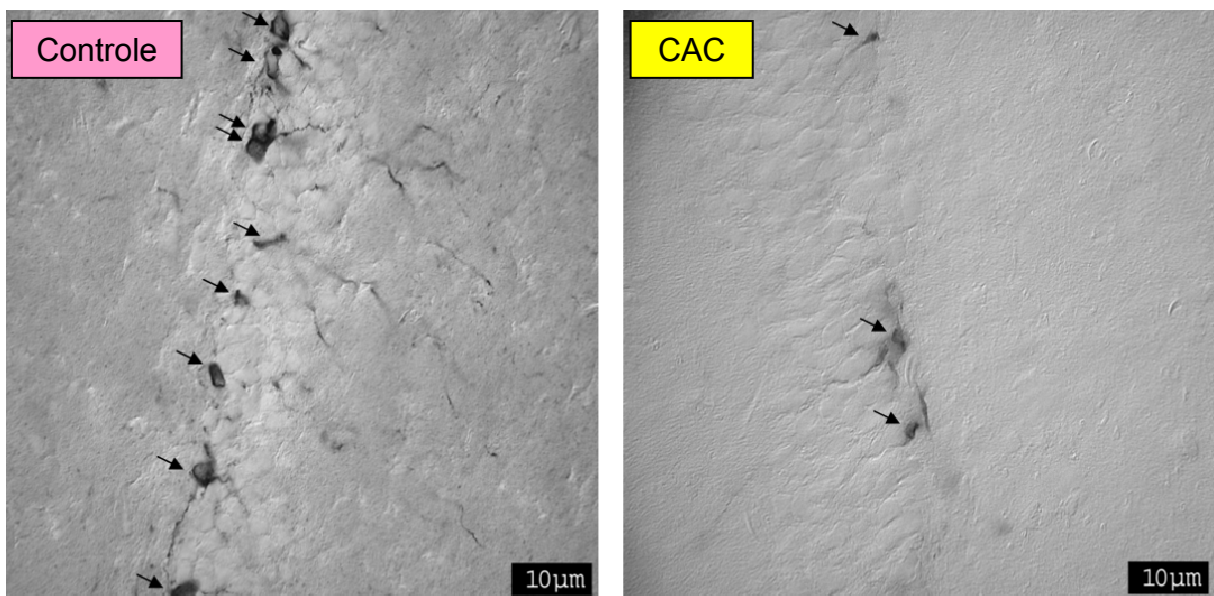


Figura 19: Imuno-histoquímica para DCX. ■ grupo controle; ■ grupo CAC.

Assim, de fato foi observada menor quantidade de células marcadas no grupo experimental. Esta pode ser uma evidência de que esse grupo exibe reduzida

neurogênese em relação ao grupo controle, hipótese que necessita ser confirmada a partir, por exemplo, de dupla marcação para BrdU e DCX.

Foi analisada, adicionalmente, a quantidade de células DCX⁺ nos três estágios descritos por Plümpe *et al.* (2006), referidos aqui como 1, 2 e 3. Como mostram os gráficos 16, 17 e 18, a comparação entre os grupos mostra que o grupo CAC e o grupo controle não apresentam diferenças quanto ao número de células marcadas para doublecortina/ mm³ classificadas, respectivamente, como estágio 1 (3,20 ± 0,63 CAC; 3,44 ± 0,35 CTRL; p>0,05); estágio 2 (4,04 ± 0,96 CAC; 3,19 ± 0,36 CTRL; p>0,05) e estágio 3 (0,93 ± 0,33 CAC; 1,54 ± 0,47 CTRL; p>0,05):

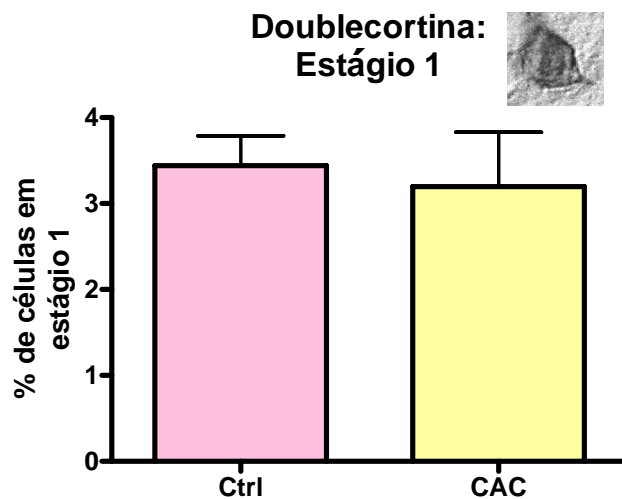


Gráfico 16: Número de células marcadas para doublecortina/ mm³ no estágio 1. ■ CTRL = grupo controle (n=3); ■ CAC = cariocas com alto congelamento (n=3); p>0,05.

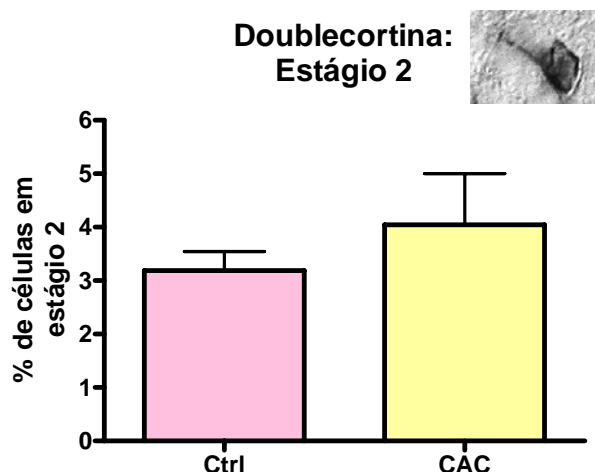


Gráfico 17: Número de células marcadas para doublecortina/ mm^3 no estágio 2. ■ CTRL = grupo controle (n=3); ■ CAC = cariocas com alto congelamento (n=3); $p > 0,05$.

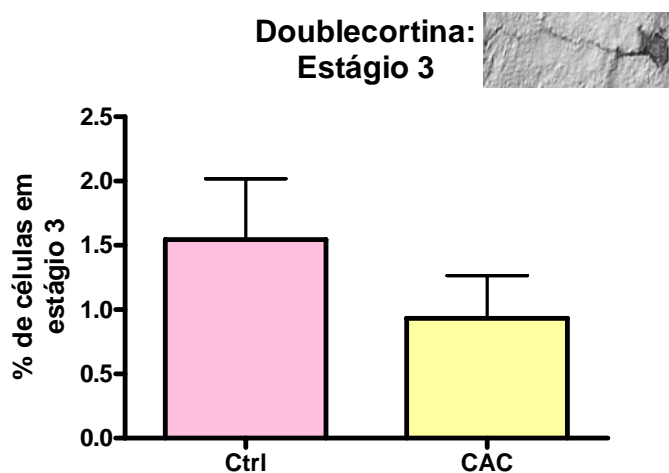


Gráfico 18: Número de células marcadas para doublecortina/ mm^3 no estágio 3. ■ CTRL = grupo controle (n=3); ■ CAC = cariocas com alto congelamento (n=3); $p > 0,05$.

Esses dados mostram que, embora em menor quantidade total, os neurônios imaturos do giro denteado dos animais CAC não diferem quanto aos do grupo controle com relação ao estágio de maturação. Dessa forma, embora haja marcação reduzida para DCX, parece não haver variações quanto aos estágios de desenvolvimento das células marcadas.

4.5 Coloração para vermelho neutro

Com o intuito de verificar se a menor expressão de BrdU e de doublecortina no grupo CAC se devia a uma maior taxa de morte celular e não a um reduzido nível de neurogênese, foi feita coloração com vermelho neutro, a partir da qual é possível identificar núcleos picnóticos, indicativos de células em apoptose (Guimarães e Linden, 2000). A análise qualitativa dos cortes não revelou diferenças significativas entre os grupos, conforme mostrado na figura 20:

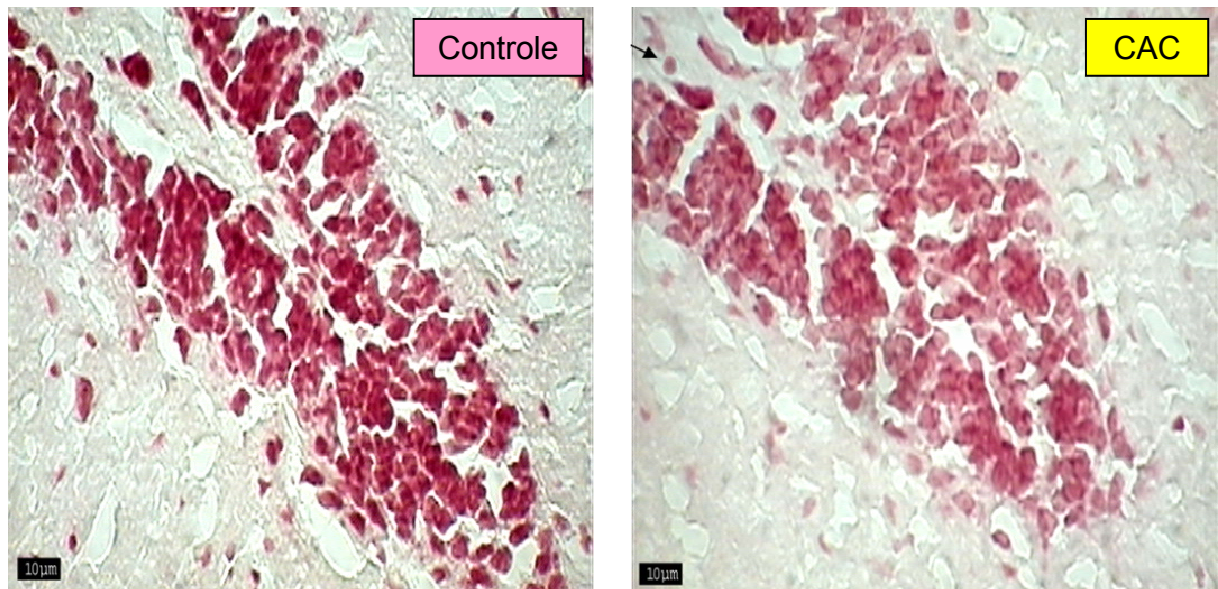


Figura 20: Marcação para vermelho neutro em secções de 40µm do giro denteado dorsal. Seta indica marcação de núcleo picnótico. grupo controle; grupo CAC.

DISCUSSÃO

A capacidade de um organismo avaliar estímulos e emitir respostas adaptativas a eles é um dos processos mais importantes para a sobrevivência em condições ambientais em mudança contínua e, muitas vezes, hostis (Landgraf e Wigger, 2002). A ansiedade é um traço complexo que foi conservado durante a evolução por sua finalidade de possibilitar aos animais a avaliação de situações potencialmente perigosas e, portanto, aumentar suas chances de sobrevivência (Neumann *et al.*, 1998). Os estados ansiosos em humanos caracterizam-se por comportamento de evitação e por uma tendência a perceber estímulos ameaçadores (Crestani *et al.*, 1999). Os processos de atenção e de memória são aumentados e situações ambíguas são interpretadas como potencialmente perigosas (Eysenck, 1992).

A análise dos substratos neurais da ansiedade e do medo está, em sua maior parte, baseada na investigação, em animais, da inibição comportamental induzida por estímulos aversivos naturais ou aprendidos (Phillips e LeDoux, 1992; Rogan e LeDoux, 1996). Embora trabalhos anteriores tenham investigado linhagens de animais desenvolvidas a partir de diferentes testes comportamentais para o fenótipo emocional, como para o campo aberto (Broadhurst, 1962), para a esquiva ativa (Bignami, 1965) e para o labirinto em cruz elevado (Liebsch, 1998; Landgraf e Wigger, 2002), ainda não haviam sido desenvolvidos estudos acerca de alterações neuroendócrinas, comportamentais e neurogênicas provocadas pela seleção de ratos a partir de condicionamento aversivo.

A avaliação do comportamento e de aspectos fisiológicos relacionados ao medo/ ansiedade torna-se fundamental para que uma linhagem possa ser considerada um modelo adequado para os estudos dessas psicopatologias. Segundo Landgraf e Wigger (2003), um fenótipo de medo/ ansiedade deveria apresentar aspectos relacionados a comportamentos, estratégias de enfrentamento e parâmetros neuroendócrinos característicos dessas condições. Ampliando esses parâmetros para aspectos neuroquímicos, este trabalho descreve e valida uma linhagem para o estudo do medo condicionado.

Algumas críticas têm sido colocadas com relação ao uso de modelos animais como forma de descrever condições complexas, tais como transtornos de ansiedade e depressão. Um dos argumentos é o de que os modelos animais representam uma abordagem reducionista, pois não seria possível modelar fielmente todos os aspectos de um transtorno comportamental complexo como a ansiedade ou a depressão estudando-se tais aspectos em animais que não o próprio homem (Leonardo e Hen, 2006). Segundo os autores, esses transtornos envolvem emoções e experiências que podem ser unicamente humanas. Ainda, há autores que argumentam que os quadros clínicos são heterogêneos mesmo entre seres humanos, e tentativas de estudar a base genética desses transtornos ou modelá-los diretamente em animais pode ser errôneo (Chakravarti e Little, 2003; Charney *et al.*, 2002). Por outro lado, se for levada em consideração a contribuição dos estudos farmacológicos em animais, que possibilitaram a comercialização de medicamentos ansiolíticos e antidepressivos a partir da testagem dessas drogas em animais, vê-se que a utilização de modelos animais na descrição de patologias neuropsiquiátricas apresenta valor acadêmico e terapêutico. Embora técnicas de

estudo não-invasivas em humanos estejam sendo amplamente desenvolvidas, como as de neuroimagem, estas ainda não permitem a análise de aspectos moleculares importantes, como a expressão de neurotransmissores, de enzimas, de receptores e de transportadores, assim como de níveis de neurogênese, abordados aqui. Uma vez que um conhecimento mais aprofundado dos mecanismos neurobiológicos subjacentes à emocionalidade considerada normal e àquela considerada patológica podem resultar em abordagens terapêuticas mais eficazes (Wigger *et al.*, 2004), percebe-se a relevância de tais modelos. Tendo em vista, assim, que a experiência humana em transtornos psiquiátricos não é facilmente acessível para estudos neurobiológicos, uma variedade de modelos animais tem sido desenvolvida para mimetizar determinadas condições psicopatológicas (Overstreet *et al.*, 1992; Driscoll *et al.*, 1998; Escorihuela *et al.*, 1999). Nesse contexto, o presente trabalho pretendeu preencher uma pequena lacuna no enorme vazio que ainda existe no entendimento de condições complexas, como o medo e a ansiedade. Dessa maneira, o objetivo deste trabalho foi, em linhas gerais, estabelecer o fenótipo comportamental de uma linhagem de ratos selecionados para o medo condicionado e identificar alguns correlatos neuroquímicos (como a neurogênese hipocampal) a esses comportamentos que, como resultado, seriam exibidos naturalmente pelos animais (Landgraf e Wigger, 2002).

O teste de nado forçado de Porsolt, utilizado na identificação de comportamento depressivo, não indicou haver diferenças entre os grupos. Este dado corrobora a consistência do modelo da linhagem estudada como parâmetro para estudo de medo/ ansiedade, uma vez que traços relativos a outros fenótipos, como o de depressão, não foram selecionados em concomitância. Landgraf e

Wigger (2003) ressaltam a importância deste aspecto, ao colocarem que um modelo animal particular deve ser capaz de capturar um sintoma ou um mecanismo específico da psicopatologia estudada, sem modelar outros processos ou funções. Segundo Gorman (1996), há um alto grau de co-morbidade entre transtornos de ansiedade e depressão, com taxas de co-ocorrência de mais de 60%, o que mostra ser a co-morbidade entre ansiedade e depressão mais a regra do que a exceção. Esse dado corrobora a consistência dos resultados do presente trabalho, pois se pode inferir que, mesmo com grande probabilidade de co-ocorrência de características ansiosas e depressivas, o modelo aqui utilizado mostrou-se capaz de ser considerado um modelo ligado particularmente ao fenótipo de ansiedade/medo. Ainda, o presente trabalho mostra que, embora haja elevado índice de co-morbidade entre ansiedade e depressão, os dois sistemas parecem ser biologicamente distintos, o que estaria em acordo com a hipótese de etiologias distintas entre os dois quadros (Angst *et al.*, 1990). Os resultados aqui apresentados encontram-se em desacordo com algumas linhagens que, selecionadas por algum traço de ansiedade, também são diferentes quanto ao controle e a grupos experimentais menos ansiosos no que diz respeito ao teste de depressão (Liebsch *et al.*, 1998; File *et al.*, 1999; Landgraf e Wigger, 2002). Por outro lado, os dados do presente trabalho encontram-se em consonância com aqueles de Ho *et al.* (2002), que utilizaram ratos Wistar selecionados pelo paradigma do labirinto em cruz elevado e não encontraram diferença entre a linhagem de alta ansiedade e a de menor ansiedade (mais próxima ao comportamento de grupos controle) no que diz respeito ao teste de nado forçado. Assim, pode-se afirmar que o modelo por nós estudado pode ser considerado um

bom preditor de manifestações comportamentais em modelos de avaliação de ansiedade, mas não pode ser considerado um modelo de estudo para depressão.

Por outro lado, os testes de ansiedade utilizados neste trabalho revelam dados consistentes para a validação da linhagem CAC como uma linhagem de ratos com maior resposta de medo/ ansiedade, além daquela já definida por Gomes e Landeira-Fernandez (2008). No teste do labirinto em cruz elevado, o número de entradas e o tempo gasto nos braços abertos são considerados índices de ansiedade, com baixos níveis de entrada e de permanência nesse braço indicando maiores níveis de ansiedade e vice-versa (Johnston e File, 1991; Pellow *et al.*, 1985). No presente trabalho, de fato a linhagem CAC apresentou menos tempo e menos entradas nos braços abertos, quando comparado ao controle. O padrão comportamental ansioso também foi observado no teste de interação social, onde os ratos CAC passaram significativamente menos tempo em comportamentos interativos com seus pares, indicando maior ansiedade, conforme foi também observado por Landgraf e Wigger (2002) com linhagem de ratos selecionados para alta resposta de ansiedade no labirinto em cruz elevado.

Um problema normalmente destacado por autores que trabalham com testes comportamentais de ansiedade baseados no comportamento exploratório é o de que situações não relacionadas à ansiedade podem alterar a atividade locomotora (Rodgers *et al.*, 1997) e comprometer a interpretação dos dados comportamentais. Esse não parece ter sido o caso dos experimentos relatados no presente trabalho. Interessantemente, a diferença no tempo e no número de entradas nos braços abertos do LCE, bem como no comportamento social da linhagem CAC, não pode

ser atribuída a diferenças na atividade locomotora dos animais, pois tanto a quantidade de entradas nos braços fechados do labirinto em cruz elevado quanto a ambulação medida na arena do teste de interação social não revelaram ser diferentes entre os grupos. Assim, os resultados dos testes de avaliação de comportamento ansioso, como o labirinto em cruz elevado e o teste de interação social, revelam que a linhagem utilizada exibe fenótipo comportamental relacionado à ansiedade significativamente diferente em comparação ao grupo controle, sendo, portanto, a diferença comportamental entre a linhagem CAC e o grupo controle um traço estável e robusto em outras situações de conflito que evocam medo e ansiedade, e não uma manifestação comportamental observável apenas no teste utilizado como critério de seleção (Henniger *et al.*, 2000). Os resultados do labirinto em cruz elevado e do teste de interação social confirmam, portanto, as diferenças comportamentais entre a linhagem CAC e o grupo controle.

Tendo em vista que a avaliação emocional de uma situação nova e a estratégia de enfrentamento utilizada podem depender também de funções cognitivas (Neumann *et al.*, 1998), foi investigada a hipótese de que poderia haver alterações na memória não-emocional e no aprendizado da linhagem CAC em relação ao grupo controle. Para isso, foram utilizados os testes do labirinto em T e do reconhecimento de objetos. A tarefa de reconhecer objetos tem sido amplamente utilizada como modelo para a investigação dos mecanismos neurobiológicos da aprendizagem e da memória (de Lima *et al.*, 2005). Interessantemente, não foram observadas diferenças nos índices obtidos nesse teste nem na porcentagem de acertos no labirinto em T, entre os grupos controle e experimental, indicando que os sistemas de memória selecionados na obtenção da linhagem CAC restringiram-se

ao sistema de memória emocional. Ademais, ainda que sejam propostas evidências de que aspectos emocionais e cognitivos são fenômenos estreitamente relacionados (Landgraf e Wigger, 2002), os presentes dados sugerem que modo de funcionamento do sistema emocional independe daquele apresentado pelo sistema cognitivo.

O hipocampo foi a estrutura neural escolhida para a efetuação das análises histológicas de marcação e contagem de células. Essa escolha se deu tendo como base o envolvimento do hipocampo nos processos de avaliação de riscos – o componente cognitivo da memória emocional – e de exibição do comportamento de congelamento em resposta a ameaças potenciais inatas e a estímulos condicionados (Brandão *et al.*, 2008). Optou-se, mais especificamente, por analisar a histologia e a neurogênese do hipocampo dorsal, tendo em vista o envolvimento dessa porção hipocampal na modulação das respostas ansiosas, conforme proposto por Gonzalez *et al.* (1998b), por meio da demonstração de efeitos ansiolíticos no teste de interação social após estimulação dos sítios para benzodiazepínicos nos receptores GABA_A do hipocampo dorsal. Ainda, essa escolha foi embasada pelos dados de Rezayat *et al.* (2005), que mostraram a interação de GABA e do peptídeo colecistocinina na modulação da ansiedade medida no LCE após injeções de doses de agonistas e de antagonistas de ambos os neurotransmissores na porção dorsal do hipocampo. Nazar *et al.* (1999) também apontam para o hipocampo dorsal como uma das áreas centrais para a interação entre GABA e 5-HT na interação do comportamento emocional de ratos ao observar que, quando injetada nessa região hipocampal, a picrotoxina, um antagonista não-competitivo do receptor GABA_A, atenua o efeito ansiolítico causado pela depleção

de serotonina. File *et al.* (1999) também relatam que a linhagem HDS (selecionada para alta sensibilidade à resposta hipotérmica induzida pelo agonista serotoninérgico 8-OH-DPAT) apresenta reduzidos escores no teste de interação social devido, pelo menos em parte, ao funcionamento anormal dos receptores 5-HT_{1A} no hipocampo dorsal dos animais. Kjelstrup *et al.* (2002), por sua vez, mostram que essa região hipocampal está envolvida no medo condicionado, uma vez que lesões nessa área impedem o condicionamento contextual do medo, modelo utilizado no presente trabalho para a seleção dos animais CAC. Por outro lado, esse grupo mostra que lesões no hipocampo ventral alteram as respostas de medo incondicionado no LCE, implicando essa porção do hipocampo na ansiedade. Uma vez que o presente trabalho mostra que a linhagem CAC apresenta fenótipo ansioso em testes de medo incondicionado – como o LCE e o teste de interação social – é plausível hipotetizar que também a área ventral do hipocampo desses animais possa apresentar alterações que contribuam para o esclarecimento das diferenças neurobiológicas entre cérebros mais e menos propensos a exibirem respostas de medo e de ansiedade, o que depende ainda de confirmação.

De toda forma, a análise qualitativa do tecido hipocampal, especificamente do giro denteado e das áreas CA1 e CA3 do hipocampo dorsal, dos animais do grupo CAC não se mostraram alteradas com relação ao controle, entendendo-se, dessa forma, que a seleção da linhagem não provoca danos ao tecido como um todo. A quantificação das células nas três áreas hipocampais mencionadas tampouco revelou alterações entre os grupos, sugerindo que, se houvesse diferenças no hipocampo dos animais conforme hipotetizado, estas ocorreriam em níveis mais moleculares da estrutura. Dando continuidade à investigação, optou-se

por proceder a experimentos para avaliação de neurogênese, por meio da injeção de BrdU e posterior imuno-histoquímica para essa molécula e para DCX, um marcador de proliferação neuronal. Assim, tendo em vista que a ocorrência de neurogênese no hipocampo sugere que a formação de novos neurônios exerça algum papel nessa estrutura (Gould *et al.*, 1999) e considerando-se o envolvimento do hipocampo no condicionamento do medo (Shors *et al.*, 2002), o presente trabalho teve como um de seus objetivos investigar a neurogênese hipocampal de ratos selecionados para o aprendizado do medo – linhagem CAC – e compará-la àquela apresentada pelo grupo controle. Isso foi feito por meio de 1 injeção diária de BrdU durante uma semana, seguido de processamento imunohistoquímico para BrdU, como marcador de células em proliferação, e para doublecortina, como marcador de neurônios. Foi encontrado que esses indicadores de neurogênese no grupo experimental encontram-se reduzidos quando comparados ao grupo controle, e a marcação com vermelho neutro mostrou que esses níveis reduzidos não podem ser explicados por maiores índices de morte celular. Em contrapartida, Cuppini *et al.* (2006) verificaram que a redução da neurogênese em ratos de idade avançada não leva a alterações no condicionamento do medo nesses animais. Os autores sugerem, dessa forma, uma independência entre o condicionamento dependente do hipocampo e a redução da neurogênese devido à idade, defendendo que um número reduzido de novos neurônios hipocampais é suficiente para o aprendizado do medo. O presente trabalho, no entanto, mostra que a redução da neurogênese em animais adultos, mas não em idade avançada, parece estar fortemente associada ao traço de medo. É possível, dessa forma, que fatores diferentes possam modular a associação entre neurogênese e medo em animais de idade avançada e em animais ansiosos. Com relação ao presente trabalho, pode ser

hipotetizado que um número reduzido de neurônios não apenas seja capaz de tornar o animal CAC apto a exibir respostas de congelamento após o condicionamento, como também pode ser a condição para que a memória do medo seja mais forte, o que faz com que o sistema como um todo exiba fenótipo comportamental mais ansioso. Em outras palavras, é possível que alguns parâmetros tenham sido selecionados como parte da circuitaria neural responsável pela exibição do fenótipo comportamental ansioso e possam interagir com a menor neurogênese, resultando na circuitaria neural da linhagem CAC. Dessa maneira, é possível que alterações em sistemas de neurotransmissores ou no sistema neuroendócrino possam atuar junto à neurogênese reduzida, modulando a representação da memória do medo de forma a torná-la mais forte, o que, por sua vez, levaria os animais do grupo experimental a exibirem maiores respostas de medo no teste de aprendizagem contextual aversiva. Outra hipótese seria a de que, uma vez apresentando neurogênese reduzida, o sistema neural CAC exibiria mecanismos compensatórios, como maior expressão de espículas dendríticas para obtenção de maior quantidade de contatos sinápticos nas vias envolvidas com a memória do medo (tais como a via hipocampo-amígdala), o que poderia ter como um dos efeitos a aquisição de uma memória do medo mais intensa. Essa característica, juntamente a possíveis alterações nos sistemas serotoninérgicos e GABAérgicos, poderia afetar as vias do medo e da ansiedade, resultando no padrão comportamental descrito no presente trabalho. É fundamental, por conseguinte, que trabalhos futuros identifiquem essas possíveis alterações nos sistemas de neurotransmissores, bem como a forma como elas interagem entre si na modulação das respostas de medo da linhagem apresentada.

Ainda sobre a interação entre neurogênese hipocampal e medo condicionado, Abrous *et al.* (2005) problematizam se déficits neurogênicos seriam a causa ou a consequência de transtornos psiquiátricos e alterações comportamentais. Assim, os autores propõem dois modelos: um em que o déficit neurogênico resultaria de influências genéticas e ambientais que predisporiam o indivíduo a desenvolver o transtorno em resposta a condições ambientais aversivas; e um que se basearia no construto de que influências genéticas e ambientais podem acarretar em um desenvolvimento cerebral alterado, resultando em transtornos e no impedimento do curso normal da neurogênese, conforme ilustrado na figura 17:

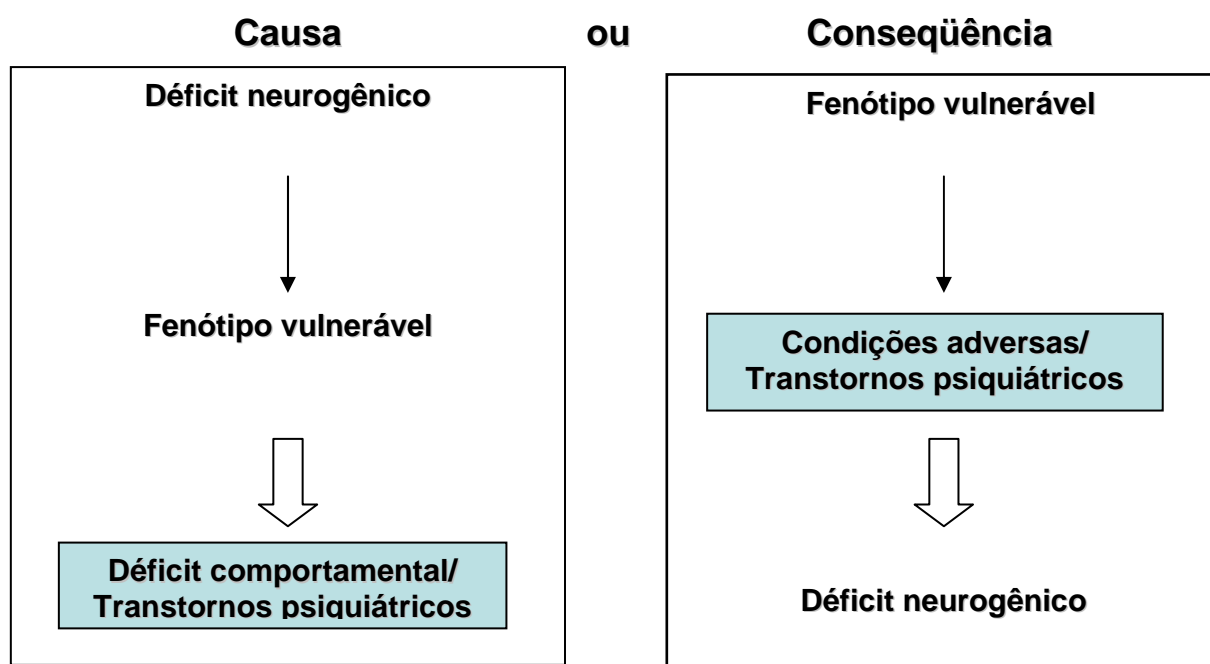


Figura 17: Déficit na neurogênese como causa ou como consequência de transtornos psiquiátricos. Modificado e adaptado de Abrous *et al.* (2005).

É importante destacar que não se trata de modelos excludentes. Muitos estudos mostram que condições ambientais adversas, como separação maternal

(Mirescu *et al.*, 2004; Fabricius *et al.*, 2008), irradiação (Warner-Schmidt *et al.*, 2008; Wojtowicz *et al.*, 2008), bulbectomia olfatória (Jaako-Movits e Zharkovsky, 2005), exposição a lítio (Jaako-Movits *et al.*, 2005) e experiências de medo condicionado (Pham *et al.*, 2005) diminuem a neurogênese e provocam alterações comportamentais e emocionais, corroborando a segunda opção. No entanto, os dados aqui apresentados ainda são inconclusivos quanto a serem considerados correspondentes a uma das respostas sugeridas. A avaliação da neurogênese em diferentes idades, desde o desenvolvimento inicial, pode ser um dos caminhos que apontem se os animais CAC mais provavelmente apresentam o déficit neurogênico como causa ou como consequência do fenótipo psiquiátrico. Ainda sobre o desenvolvimento, é fundamental destacar que muitos estudos mostraram que o comportamento maternal traz consequências duradouras para o comportamento de ansiedade da prole (Gross e Hen, 2004), sendo um aspecto importante a ser investigado no grupo CAC. Estudos de *cross-fostering*, por exemplo, mostraram que ratos criados por mães que apresentam reduzido comportamento de lambar os filhotes exibem mais comportamentos ansiosos do que aqueles criados por mães que lambem mais a prole (Caldji *et al.*, 1998). Quando criados por mães com elevado comportamento de lambar, os filhotes das fêmeas que exibem menos este comportamento passam a apresentar menores índices de ansiedade. O inverso, no entanto, não se revela verdadeiro, indicando que fatores genéticos ou do ambiente intra-uterino das fêmeas com alta taxa de comportamento de lambar conferem a seus filhotes proteção contra efeitos adversos de cuidados maternos posteriores. Dessa maneira, sinais intra e extrauterinos poderiam induzir modificações estruturais e funcionais em circuitos de ansiedade. Essa interação entre genética e

ambiente no desenvolvimento inicial precisa ser investigada como um dos mecanismos subjacentes ao comportamento ansioso do grupo CAC.

Mais especificamente sobre a neurogênese e a ansiedade, a literatura aponta para uma relação similar à encontrada neste trabalho. Em um modelo de isquemia em camundongos, por exemplo, níveis de sobrevivência neuronal foram associados a uma atenuação da ansiedade medida no teste do campo aberto (Killic *et al.*, 2008), sugerindo que uma maior neurogênese implicaria em menores níveis de ansiedade. Utilizando camundongos mutantes que expressam baixos níveis séricos do fator de crescimento IGF-I, Trejo *et al.* (2008) também demonstraram que níveis de neurogênese aumentados relacionam-se à ansiedade reduzida. Se for considerado o inverso, isto é, que menores níveis de neurogênese implicariam em maiores níveis de ansiedade, tem-se o que foi encontrado aqui. Interessantemente, por meio da depleção da forma longa do receptor TrkB para o fator neurotrófico cerebral BDNF em camundongos, Bergami *et al.* (2008) revelaram não apenas que o comprometimento da neurogênese no animal adulto implica em maior nível de ansiedade, mas também que a expressão desse receptor é requerida para a organização básica das conexões sinápticas envolvidas na regulação do comportamento relacionado à emoção. Dessa maneira, o estudo da expressão dessa proteína, bem como dos níveis de BDNF, na linhagem CAC podem contribuir para a caracterização do modelo aqui utilizado e para o melhor entendimento das bases neurobiológicas da ansiedade. Também contribuem para a evidência de relação entre maior neurogênese e ansiedade reduzida os dados de Salam *et al.* (2008), ao mostrarem menores níveis de ansiedade em medidas de estresse induzido por hipertermia, em testes de interação social e em algumas medidas do

campo aberto associados ao exercício, já descrito como fator de estímulo à neurogênese (Brown *et al.*, 2003; Farmer *et al.*, 2004). Finalmente, Ageta *et al.* (2008) mostraram em camundongos transgênicos que a inibição de activina, um membro da superfamília de fatores de crescimento β que atua como hormônio na modulação da morfologia de espículas dendríticas hipocâmpais (Fukazawa *et al.*, 2003; Shoji-Kasai *et al.*, 2007), reduz a neurogênese pós-natal e aumenta o comportamento ansioso em um teste de preferência por novas áreas, o que torna mais forte a evidência de que menores níveis de neurogênese relacionam-se a maiores níveis de ansiedade.

É importante destacar, ainda, que comportamentos relacionados à ansiedade representam fenômenos multifatoriais que, presumidamente, se devem a uma herança complexa, que envolve múltiplos genes, fatores ambientais e epigenéticos de forma ainda desconhecida (Finn *et al.*, 2003; Van Praag, 2005). Uma vez que o presente trabalho descreve o fenótipo comportamental e aspectos relacionados à neurogênese da linhagem CAC, é interessante que trabalhos futuros possam contribuir de forma a desvendar diferenças genéticas presentes no grupo. Entre as propostas futuras de trabalho com a linhagem estudada está, portanto, a possibilidade de identificar polimorfismos e genes candidatos a estarem diferentemente expressos no grupo experimental, por meio de técnicas como o *microarray*. Outra proposta de trabalho consiste na investigação do sistema GABAérgico da linhagem CAC. A ampla utilização de benzodiazepínicos como fármacos ansiolíticos, por meio da sua ação de potencializar a função inibitória mediada pelo receptor GABA_A, contribui para a consolidação do envolvimento desse sistema de neurotransmissão nos processos de medo/ ansiedade, e a

elevada densidade de sub-unidades do receptor GABA_A no hipocampo de ratos (Chen *et al.*, 1999), bem como os efeitos ansiolíticos no teste de interação social provocados pela estimulação dos sítios para benzodiazepínicos desses receptores no hipocampo dorsal de ratos (Gonzalez *et al.*, 1998b), podem embasar futuras análises para melhor esclarecer os mecanismos neurobiológicos hipocampais subjacentes ao fenótipo ansioso da linhagem estudada.

Com relação a parâmetros neuroendócrinos, a literatura tem mostrado um estreito envolvimento do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) com a manifestação de estresse, medo e ansiedade, conforme descrito anteriormente. Dessa maneira, o nível de atividade do eixo HPA tem sido utilizado como um dos parâmetros a se observar em linhagens de ratos selecionados para a ansiedade (Wigger *et al.*, 2004) e, por isso, os níveis de corticosterona consistem em um dos índices que merecem ser estudados futuramente no modelo CAC. Ratos de linhagem mais ansiosa selecionada pelo labirinto em cruz elevado apresentam maior secreção de ACTH (hormônio adrenocorticotrófico) e de corticosterona, quando comparados a ratos de linhagem menos ansiosa (Landgraf e Wigger, 2002; 2003). Interessantemente, evidências significativas apontam que fatores ambientais no desenvolvimento inicial estabelecem uma reatividade do eixo HPA que pode durar por toda a vida, podendo ser transmitido epigeneticamente para gerações subseqüentes (Gorman *et al.*, 2002; Weaver *et al.*, 2004). A maior resposta do eixo HPA em ratos selecionados para alta resposta de medo incondicionado no labirinto em cruz elevado (Landgraf e Wigger, 2002) parece sugerir que animais hiperansiosos interpretam em excesso um mesmo estímulo, preferindo associações negativas na avaliação da qualidade emocional de um determinado cenário, o que

também ocorre com pacientes psiquiátricos. A avaliação dos níveis de corticosterona em fêmeas grávidas de linhagem selecionada para o medo incondicionado pelo labirinto em cruz elevado revelou maiores taxas desse hormônio no grupo de alta ansiedade quando comparado ao grupo de baixa ansiedade (Neumann *et al.*, 1998). Essa pode ser uma das propostas futuras de análise da linhagem CAC, tendo em vista a possível contribuição dos níveis maternos desse hormônio no desenvolvimento dos circuitos cerebrais e na fenotipagem comportamental ansiosa do grupo.

A replicação dos experimentos realizados no presente trabalho em gerações seguintes à S6 da linhagem CAC é também uma proposta que merece destaque, a fim de que se possa monitorar possíveis alterações na expressão dos traços descritos aqui de acordo com futuros cruzamentos. A manutenção do fenótipo caracterizado neste trabalho ou mesmo o aumento das diferenças entre CAC e grupo controle são critérios importantes para que as próximas gerações do grupo experimental possam ser consideradas linhagens ansiosas.

Por fim, tendo em vista que uma abordagem promissora deve focar a geração e o estabelecimento de linhagens de animais com máxima diferença nos comportamentos relacionados à ansiedade e com mínima diferença em outros comportamentos e parâmetros fisiológicos (Liebsch *et al.*, 1998), espera-se que a linhagem CAC possa vir a constituir um modelo robusto para o estudo das condições ansiosas psicopatológicas.

PERSPECTIVAS

Tendo em vista que foi verificada menor neurogênese hipocampal em animais selecionados para o medo condicionado (grupo CAC) e considerando-se o envolvimento dos neurotransmissores serotonina e GABA na mediação das respostas emocionais relacionadas à ansiedade, pretende-se, no futuro:

1. Testar os grupos no labirinto aquático de Morris para que a memória espacial, dependente do hipocampo, seja avaliada de forma mais consistente;
2. Confirmar os dados de morte celular por meio de novas colorações com vermelho neutro ou por meio de métodos diversos, como o TUNEL;
3. Verificar a expressão de proteínas relacionadas ao sistema serotoninérgico (receptor 5-HT_{1A}; transportador de serotonina – SERT) em amostras do hipocampo dorsal e amígdala de animais CAC e controle, por meio de *western blot*;
4. Verificar a expressão de proteínas relacionadas ao sistema GABAérgico (descarboxilase do ácido glutâmico – GAD, enzima de síntese do GABA) em amostras do hipocampo dorsal e da amígdala de animais CAC e controle, por meio de *western blot*;
5. Verificar se o ambiente enriquecido é capaz de aumentar as taxas de proliferação hipocampal dos animais CAC, por meio de imunohistoquímica para BrdU e doublecortina;
6. Verificar se o ambiente enriquecido é um modelo de manipulação ambiental capaz de reduzir, ou mesmo reverter, o comportamento naturalmente ansioso do grupo CAC nos testes do labirinto em cruz elevado e no teste de interação social;

7. Verificar os níveis plasmáticos de corticosterona em todos os grupos e a expressão de receptores hipocampais de glicocorticóides;
8. Tendo verificado as alterações neuroquímicas nos animais CAC, verificar a expressão de proteínas relacionadas aos sistemas serotoninérgico e GABAérgico em amostras do hipocampo dorsal e amígdala de animais CAC mantidos em ambiente enriquecido, por meio de *western blot*.

Estudos de desenvolvimento, a partir de desenho experimental de *cross-fostering*, estão sendo realizados no laboratório de Neuropsicologia Clínica e Experimental da PUC-Rio, sob orientação do Prof^o Landeira-Fernandez. Ensaios de *microarray* também fazem parte do planejamento dos próximos trabalhos a serem desenvolvidos com o grupo CAC.

CONCLUSÕES

O presente trabalho buscou caracterizar um modelo animal para TAG (linhagem CAC), obtido a partir da seleção de ratos pelo condicionamento do medo, podendo-se concluir que:

- ❖ A linhagem CAC apresenta comportamento significativamente mais ansioso, medido tanto no labirinto em cruz elevado como no teste de interação social, em relação ao grupo controle;
- ❖ As diferenças comportamentais entre ratos CAC e controles não podem ser explicadas por diferenças na atividade locomotora, tendo em vista que a linhagem CAC não difere do grupo controle no que diz respeito ao número de entradas nos braços fechados do labirinto em cruz elevado e à ambulação avaliada na arena de interação social;
- ❖ Os animais da linhagem CAC não apresentam diferenças em relação ao grupo controle quanto ao comportamento depressivo medido no teste do nado forçado, sugerindo que o grupo experimental representa um modelo de ansiedade, e não de depressão;
- ❖ Os grupos não diferem quanto à memória não-emocional medida no labirinto em T e no teste de reconhecimento de objetos;
- ❖ As diferenças comportamentais não se devem a uma diferença no número total de células do hipocampo (giro denteado e áreas CA1 e CA3) dos

animais, considerando-se que a análise quantitativa de células DAPI⁺ foi similar entre os grupos;

- ❖ As diferenças comportamentais tampouco se devem a uma maior taxa de morte celular no giro denteado, conforme mostram os experimentos de coloração com vermelho neutro, nem a um déficit de maturação neuronal nesta região hipocampal, como mostram os resultados da classificação morfológica dos neurônios marcados para doublecortina;
- ❖ Finalmente, é possível que as diferenças comportamentais observadas na linhagem CAC possam ser, pelo menos em parte, explicadas pela menor neurogênese hipocampal no grupo experimental, investigada por meio de imuno-histoquímica para BrdU e para doublecortina.

REFERÊNCIAS

- ABROUS, D.N.; KOEHL, M.; LE MOAL, M. (2005) Adult neurogenesis : from precursors to network and physiology. **Physiolo. Rev.**, 85:523-569.
- AGETA, H.; MURAYAMA, A.; MIGISHIMA, R.; KIDA, S.; TSUCHIDA, K.; YOKOYAMA, M.; INOKUCHI, K. (2008) Activin in the brain modulates anxiety-related behavior and adult neurogenesis. **PloS ONE**, 3(4): e1869. doi:10.1371/journal.pone.0001869
- AGHAJANIAN, G.; LAKOSKI, J.M. (1984) Hyperpolarization of serotonergic neurons by serotonin and LSD: studies in brain slices showing increased K⁺ conductance. **Brain Res.**, 305: 181-185.
- AGUILERA, G. (1994) Regulation of pituitary ACTH secretion during chronic estresse. **Front Neuroendocrinol.**, 15: 321-350.
- ALTMAN, J.; DAS, G.D. (1965) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. **J. Comp. Neurol.**, 124: 319-335.
- ALVAREZ-BUYLLA, A.; SERI, B.; DOETSCH F. (2002) Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain. **Brain Res Bull.**, vol. 57(6):751-758.
- ALVAREZ-BUYLLA, A.; LIM, D.A. (2004) For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. **Neuron**, vol. 41(5):683-686.
- ALVES, S.H.S. (2001) Efeitos da microinjeção de TFMPP nas porções ventral e dorsal do hipocampo em ratos submetidos ao labirinto em cruz elevado. **Dissertação de Mestrado**. Brasília: Universidade de Brasília.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (2002) **DSM-IV-TR: Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais**. Porto Alegre: Artmed.
- ANAGNOSTARAS, S.G.; CRASKE, M.G.; FANSELOW, M.S. (1999a) Anxiety: at the intersection of genes and experience. **Nature Neuroscience**, 2(9): 780-782.
- ANAGNOSTARAS, S.G.; MAREN, S.; FANSELOW, M.S. (1999b) Temporally graded retrograde amnesia of contextual fear after hippocampal damage in rats: within-subjects examination. **Journal of Neuroscience**, 19: 1106-1114.
- ANGST, J. VOLLRATH, M.; MERIKANGAS, K.; ERNST, C. Comorbidity of anxiety and depression in the Zurich cohort study of young adults. In: Maser, J.D.; Cloninger, C.R., eds. **Comorbidity of mood and anxiety disorders**. Washington, D.C.: American Psychiatric Press; 1990: 123-137.

ANSORGE, M.S.; ZHOU, M.; LIRA, A.; HEN, R.; GINGRICH, J.A. (2004) Early-life blockade of the 5-HT transporter alters emotional behavior in adult mice. **Science**, 306: 879-881.

BARNES, N.M.; SHARP, T. (1999) A review of central 5-HT receptors and their function. **Neuropharmacology**, 38: 1083-1152.

BATES, P.C. (1996) Anxiolytics – Patent analysis 1990-1995. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, 6: 379-384.

BERGAMI, M.; RIMONDINI, R.; SANTI, S.; GÖTZ, M.; CANOSSA, M. (2008) Deletion of TrkB in adult progenitors alters newborn neuron integration into hippocampal circuits and increases anxiety-like behavior. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, 105(40): 15570-15575.

BIGNAMI, G. (1965) Selection for high rates and low rates of avoidance conditioning in threat. **Animal Behavior**, 13: 221-227.

BLIER, P.; DE MONTIGNY, C.; CHAPUT, Y. (1988) Electrophysiological assessment of the effects of antidepressant treatments on the efficacy of 5-HT neurotransmission. **Clin. Neuropharmacol.**, 11: S1-S10.

BOSCH, O.J.; KRÖMER, S.A.; NEUMANN, I.D. (2006) Prenatal estresse: opposite effects on anxiety and hypothalamic expression of vasopressin and corticotropin-releasing hormone in rats selectively bred for high and low anxiety. **European Journal of Neuroscience**, 23: 541-551.

BOHMAKER, K.; EISON, A.S.; YOCCA, F.D.; MELLER, E. (1993) Comparative effects of chronic 8-OH-DPAT, gepirone and ipsapirone treatment on the sensitivity of somatodendritic 5-HT_{1A} autoreceptors. **Neuropharmacology**, 32: 527-534.

BORMAN, J. (2000) The ABC of GABA receptors. **Trends Pharmacol. Sci.**, 21: 16-9.

BRANDÃO, M.L.; ZANOVELI, J.M.; RUIZ-MARTINEZ, R.C.; OLIVEIRA, L.C.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. (2008) Different patterns of freezing behavior organized in the periaqueductal gray of rats: association with different types of anxiety. **Behavioral Brain Research**, 188: 1-13.

BRAWMAN-MINTZER, O.; LYDIARD, R.B. (1997) Biological basis of generalized anxiety disorder. **J Clin Psychiatry**, 58 (3): 16-25.

BREMNER, J.D.; INNIS, R.B.; SOUTHWICK, S.M.; STAIB, L.; ZOGHBI, S.; CHARNEY, D.S. (2000) Decreased benzodiazepine receptor binding in prefrontal cortex in combat-related posttraumatic estresse disorder. **Am. J. Psychiatry**, 157: 1120-1126.

BROADHURST, P. (1962) A note in further progress in a psychogenetic selection experiment. **Psychological Report**, 10: 65-66.

BROWN, J.; COOPER-KUHN, C.M.; KEMPERMANN, G.; VAN PRAAG, H.; WINKLER, J.; GAGE, F.H., et al.. (2003) Enriched environment and physical activity stimulate hippocampal but not olfactory bulb neurogenesis. **European Journal of Neuroscience**, 17: 2042-46.

BRUNSON, K.L.; AVISHAI-ELINER, S.; HATALSKI, C.G.; BARAM, T.Z. (2001) Neurobiology of the estresse response early in life : evolution of a concept and the role of corticotropin releasing hormone. **Mol. Psychiatr.**, 6: 647-656.

CALDJI, C. TANNENBAUM, B.; SHARMA, S.; FRANCIS, D.; PLOTSKY, P.M.; MEANEY, M.J. (1998) Maternal care during infancy regulates de development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, 95(9): 5335-5340.

CAMERON, H.A.; GOULD, E. (1994) Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus. **Neuroscience**, 61: 203-209.

CAMERON, H.A.; MCKAY, R.D. (2001) Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. **J. Comp. Neurol.**, 435: 406-417.

CARRASCO, G.A.; VAN DE KAR, L.D. (2003) Neuroendocrine pharmacology of estresse. **European Journal of Pharmacology**, 463: 235-272.

CHAKRAVARTI, A.; LITTLE, P. (2003) Nature, nurture and human disease. **Nature**, 421: 412-14.

CHARNEY, D.S.; BARLOW, D.H.; BOTTERON, K.N.; CONHEN, J.D.; GOLDMAN, D. (2002) Neuroscience research agenda to guide development of a psychopathologically based classification system. In: **A research agenda for DSM-IV**, ed. D.J. Kupfer, M.B. First; D.A. Regier, pp. 31-83. Washington, D.C.: American Psychiatric Association.

CHAU. D.T.; RADA, P.; KOSLOFF, R.A.; TAYLOR, J.L.; HOEBEL, B.G. (2001) Nucleus accumbens muscarinic receptors in the control of behavioral depression: antidepressant-like effects of local M1 antagonist in the porsolt swim test. **Neuroscience**, 104 (3): 791-798.

CHEN, S.; HUANG, X.; ZENG, X.J.; SIEGHART, W.; TIETZ, E.I. (1999) Benzodiazepine-mediated regulation of $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1-3$ and $\gamma 2$ GABA_A receptor subunit proteins in the rat brain hippocampus and cortex. **Neuroscience**, 93(1): 33-44.

COSMIDES, L. e TOOBY, J. (2000) Evolutionary psychology and the emotions. IN: **Handbook of Emotions**, 2nd Ed. M. Lewis e J.M. Haviland-Jones (Eds). NY: Guilford.

CRESTANI, F.; LOREZ, M.; BAER, K.; ESSRICH, C.; BENKE, D.; LAURENT, J. P.; BELZUNG, C.; FRITSCHY, J.; LÜSCHER, B.; MOHLER, H. (1999) Decreased GABA_A-receptor clustering results in enhanced anxiety and a bias for threat cues. **Nature Neuroscience**, 2: 833-839.

CRUZ, A.P.M.; FREI, F.; GRAEFF, F.G. (1994) Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacol Biochem Behav**, 49(1):171-6.

CRUZ, A.P.M.; JÚNIOR, H.Z.; GRAEFF, F.G.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. (1997) Modelos animais de ansiedade: implicações para a seleção de drogas ansiolíticas. **Psicologia: Teoria e Pesquisa**, 13(3): 269-278.

CUPPINI, R.; BUCHERELLI, C.; AMBROGINI, P.; CIUFFOLI, S.; ORSINI, L.; FERRI, P.; BALDI, E. (2006) Age-related naturally occurring depression of hippocampal neurogenesis does not affect trace fear conditioning. **Hippocampus**, 16: 141-148.

DALVI, A.; RODGERS, R.J. (1996) GABAergic influences on plus-maze behavior in mice. **Psychopharmacology**, 128: 380-97.

DAVIS, M. (1992) The role of the amygdala in fear and anxiety. **Annu. Rev. Neurosci.**, 15: 353-75.

DE LIMA, M.N.M.; LARANJA, D.C.; BROMBERG, E.; ROESLER, R.; SCHRÖDER, N. (2005) Pre- or post-training administration of the NMDA receptor blocker MK-801 impairs object recognition memory in rats. **Behavioral Brain Research**, 156: 139-143.

DE KLOET, E.R.; JOELS, M.; OITZL, M. ; SUTANTO, W. (1991) Implication of brain corticosteroid receptor diversity for the adaptation syndrome concept. **Meth. Arch. Exp. Pathol.**, 14: 104-132.

DEUEL, T.; LIU, J.; CORBO, J.; YOO, S.; RORKE-ADAMS, L.; WALSH, C. (2006) Genetic interactions between doublecortin and doublecortin-like kinase in neuronal migration and axon outgrowth. **Neuron**, 49(1): 41-53.

DE VRY, J. (1995) 5-HT_{1A} receptor agonists: recent developments and controversial issues. **Psychopharmacology**, 121: 1-26.

DEVILLY, G.J.; WRIGHT, R.; GIST, R. (2003) A função do *debriefing* psicológico no tratamento de vítimas de trauma. **Rev Bras Psiquiatr**, 25(Supl I): 41-5.

DEVINSKY, O. (1995) Cognitive and behavioral effects of antiepileptic drugs. **Epilepsia**, 36: S46-S65.

DOETSCH, F.; HEN, R. (2005) Young and excitable: the function of new neurons in the adult mammalian brain. **Current Opinion in Neurobiology** , vol. 15(1):121-128.

DRANOVSKY, A.; HEN, R. (2006) Hippocampal neurogenesis: regulation by estresse and antidepressants. **Biol. Psychiatry**, 59: 1136-1143.

DRISCOLL, P.; ESCORIHUELA, R.M.; FERNANDEZ-TERUEL, A.; GIORGI, O.; SCHWEGLER, H.; STEIMER, T. (1998) Genetic selection and differential estresse responses. The Roman lines/ strains of rats. **Ann. NY Acad. Sci.**, 851: 501-510.

EARNHEART, J.C.; SCHWEIZER, C.; CRESTANI, F.; IWASATO, T.; ITOHARA, S. et al.. (2007) GABAergic control of adult hippocampal neurogenesis in relation to behavior indicative of trait anxiety and depression states. **J. Neurosci.**, 27: 3845-3854.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. (1988) A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. **Behavioral Brain Research**, 31: 47-59.

ERIKSSON, P.S.; PERFILIEVA, E.; BJORK-ERIKSSON, T.; ALBORN, A.M.; NORDBORG, C.; PETERSON, D.A.; GAGE, F.H. (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. **Nat. Med.**, 4: 1313-1317.

ESCORIHUELA, R.M.; FERNANDEZ-TERUEL, A.; GIL, L.; AGUILAR, R.; TOBENA, A.; DRISCOLL, P. (1999) Inbred Roman high- and low-avoidance rats: differences in anxiety, novelty-seeking, and shuttlebox behaviors. **Physiol. Behav.**, 67: 19-26.

EYSENCK, M.W. (1992) In: **Handbook of Individual Differences: Biological Perspectives** (eds. Gale, A. e Eysenck, M.W.) pp: 157-178. New York: Wiley.

FABRICIUS, K.; WÖRTWEIN, G.; PAKKENBERG, B. (2008) The impact of maternal separation on adult mouse behavior and on the total neuron number in the mouse hippocampus. **Brain Struct Funct**, 212: 403-416.

FARMER, J.; ZHAO, X.; van PRAAG, H.; WODTKE, K.; GAGE, F.H. CHRISTIE, B.R. (2004) Effects of voluntary exercise on synaptic plasticity and gene expression in the dentate gyrus of adult male Sprague-Dawley rats in vivo. **Neuroscience**, 124: 71-9.

FILE, S.E. (1985) Animal models for predicting clinical efficacy of anxiolytic drugs: social behavior. **Neuropsychobiology**, 13: 55-62.

FILE, S.E.; HYDE, J.R.G. (1978) Can social interaction be used to measure anxiety? **British Journal of Pharmacology**, 62: 19-24.

FILE, S.E.; OUAGAZZAL, A-M.; GONZALEZ, L.E.; OVERSTREET, D.H. (1999) Chronic fluoxetine in tests of anxiety in rat lines selectively bred for differential 5-HT_{1A} receptor function. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 62(4): 695-701.

FINN, D.A.; RUTLEDGE-GORMAN, M.T.; CRABBE, J.C. (2003) Genetic animal models of anxiety. **Neurogenetics**, 4: 109-135.

FLINT, J. (2002) Genetic effects on an animal model of anxiety. **FEBS Lett.**, 529: 131-134.

FUKAZAWA, Y.; SAITOH, Y.; OZAWA, F.; OHTA, Y.; MIZUNO, K. et al.. (2003) Hippocampal LTP is accompanied by enhanced F-actin content within the dendritic spine that is essential for late LTP maintenance in vivo. **Neuron**, 38: 447-460.

GODSIL, B.P.; QUINN, J.J.; FANSELOW, M.S. (2000) Body temperature as a conditional response measure for pavlovian fear conditioning. **Learning e Memory**, 7: 353-356.

GOMES, V.C. (2007) Participação do complexo amigdalóide na resposta de congelamento em ratos geneticamente selecionados. **Dissertação de Mestrado**. Rio de Janeiro: PUC-Rio.

GOMES, V.C.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. (2008) Amygdaloid lesions produced similar contextual fear conditioning disruption in the Carioca high- and low-conditioned freezing rats. **Brain Res.**, doi:10.1016/j.brainres.2008.07.044

GONZALEZ, L.E.; FILE, S.E.; OVERSTREET, D.H. (1998a) Selectively bred lines of rats differ in social interaction and hippocampal 5-HT_{1A} receptor function: a link between anxiety and depression? **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 59(4): 787-792.

GONZALEZ, L.; OUAGAZZAL, A-M.; FILE, S.E. (1998b) Stimulation of benzodiazepine receptors in the dorsal hippocampus and median raphe reveals differential GABAergic control in two animal test of anxiety. **European Journal of Neuroscience**, 10: 3673-3680.

GORMAN, J.M. (1996) Comorbid depression and anxiety spectrum disorders. **Depression and Anxiety**, 4:160-68.

GORMAN, J.M.; MATHEW, S.; COPLAN, J. (2002) Neurobiology of early life estresse: nonhuman primate models. **Semin. Clin. Neuropsychiatry**, 160: 636-45.

GOULD, E.; CAMERON, H.A.; DANIELS, D.C.; WOOLLEY, C.S.; MCEWEN, B.S. (1992) Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus. **J. Neurosci.**, 12: 3642-3650.

GOULD, E.; TANAPAT, P.; HASTINGS, N.B.; SHORS, T.J. (1999) Neurogenesis in adulthood: a possible role in learning. **Trends Cogn. Sci.**, 3: 186-192.

GOULD, E.; GROSS, C.G. (2002) Neurogenesis in adult mammals: some progress and problems. **J. Neurosci.**, 22: 619-623.

GRAEFF, F.G. Brain defense systems and anxiety. (1990) In: Roth M. Burrows G.D., Noyes (eds). **Handbook of anxiety**, v. 3, pp. 307-354. Amsterdam: Elsevier.

GROSS, C.G. (2000) Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. **Nat Rev Neurosci.**, vol. 1(1):67-73.

GROSS, C.; ZHUANG, X.; STARK, K.; RAMBOZ, S.; OOSTING, R.; KIRBY, L.; SANTARELLI, L.; BECK, S.; HEN, R. (2002) Serotonin1A receptor acts during development to establish normal anxiety-like behavior in the adult. *Nature*, 416: 396-400.

GROSS, C.; HEN, R. (2004) The developmental origins of anxiety. **Nature Reviews Neuroscience**, 5: 545-552.

GUIMARÃES, C.; LINDEN, R. (2000) Chloramphenicol induces apoptosis in the developing brain. **Neuropharmacology**, 39: 1673-1679.

HALL, C.S. (1934) Emotional behavior in the rat: I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **J. Comp. Psychol.**, 18, 385– 403.

HAMON, M. (1997) The main features of the central 5-HT_{1A} receptors in serotonergic neurons and 5-HT receptors in the CNS. In: Baumgarten, H.G., Gotner, M. (eds), pp: 238-268. New York: Springer.

HANDLEY, S.L.; MITHANI, S. (1984) Effects of alpha-adrenoceptor agonists in a maze-exploration model of fear-motivated behavior. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, 327: 1-5.

HANDLEY, S.L.; MCBLANE, J.W. (1993) An assessment of the elevated X-maze for studying anxiety and anxiety-modulating drugs. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods**, 29: 129-38.

HATZINGER, M.; REUL, M.H.M.J.; LANDGRAF, R.; HOLSBOER, F.; Neumann, I. (1996) Combined Dexamethasone/CRH Test in Rats: Hypothalamo-Pituitary-Adrenocortical System Alterations in Aging. **Neuroendocrinology**, 64: 349-356.

HEISLER, L.K.; CHU, H.M.; BRENNAN, T.J.; DANAIO, J.A.; BAJWA, P.; PARSONS, L.H.; TECOTT, L.H. (1998) Elevated anxiety and antidepressant-like responses in serotonin 5-HT_{1A} receptor mutant mice. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, 95: 15049-15054.

HENNIGER, M.S.H.; OHL, F.; HÖLTER, S.M.; WEIBENBACHER, P.; TOSCHI, N.; LÖRSCHER, P.; WIGGER, A.; SPANAGEL, R.; LANDGRAF, R. (2000) Unconditioned anxiety and social behavior in two rat lines selectively bred for high and low anxiety-related behavior. **Behavioral Brain Research**, 111: 153-163.

HO, Y.-J.; EICHENDORFF, J.; SCHWARTING, R.K.W. (2002) Individual response profiles of male Wistar rats in animal models for anxiety and depression. **Behavioral Brain Research**, 136: 1-2.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. (1991) GABA_A receptor modulation of memory: the role of endogenous benzodiazepines. **Trends in Pharmacological Sciences**, 12: 260-265.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. (1997) The biochemistry of memory formation and its regulation by hormones and neuromodulators. **Psychobiology**, 25: 1-9.

JAAKO-MOVITS, K.; ZHARKOVSKY, A. (2005) Impaired fear memory and decrease hippocampal neurogenesis following olfactory bulbectomy in rats. **European Journal of Neuroscience**, 22: 2871-2878.

JAAKO-MOVITS, K.; ZHARKOVSKY, T.; ROMANTCHIK, R.; JURGENSON, M.; MERISALU, E.; HEIDMETS, L.T.; ZHARKOVSKY, A. (2005) Developmental lead exposure impairs contextual fear conditioning and reduces adult hippocampal neurogenesis in the rat brain. **Int. J. Devl. Neuroscience**, 23: 627-635.

JACOBS, B.L. (1997) Physiology and pharmacology of brain serotonergic neurons. In: **Serotonergic neurons and 5-HT receptors in the CNS** (Van de Kar, L.D., ed.), pp: 91-116. New York: Springer.

JAHN, J.W.; KIM, J.G.; KIM, H.J.; KIM, B.T.; KANG, D.W.; LEE, J.H. (2007) Chronic food restriction in young rats results in depression- and anxiety-like behaviors with decreased expression of serotonin reuptake transporter. **Brain Research**, 1150: 100-107.

JOHNSTON, A.L.; FILE, S.E. (1991) Sex differences in animal tests of anxiety. **Physiol. Behav.**, 49: 245-50.

JOLAS, T.; HAJ-DAHMANE, S.; LANFUMEY, L.; FATTACCINI, C.M.; KIDD, E.J.; ADRIEN, J.; GOZLAN, H.; GUARDIOLA-LEMAITRE, B.; HAMON, M. (1993) Tertatolol is a potent antagonist at pre- and postsynaptic serotonin 5-HT_{1A} receptors in the rat brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 347: 453-463.

KAPLAN, H.I.; SADOCK, B.J. (1990) **Compêndio de Psiquiatria**. Artes Médicas: Porto Alegre, 1990.

KECK, M.E.; HOLSBOER, F. (2001) Hyperactivity of CRH neuronal circuits as a target for therapeutic interventions in affective disorders. **Peptides**, 22: 835-844.

KECK, M.E.; WIGGER, A.; WELT, T.; MÜLLER, M.B.; GESING, A.; REUL, J.M.H.M.; HOLSBOER, F.; LANDGRAF, R.; NEUMANN, I.D. (2002) Vasopressin mediates the response of the combined dexamethasone/ CRH test in hyper-anxious rats: implications for pathogenesis of affective disorders. **Neuropsychopharmacology**, 26(1): 94-105.

KELLY, D. (1980) Clinical aspects of anxiety. In: Thomas, C.C. (ed.) *Anxiety and emotions*. Publisher Springfield: Illinois, 3-19.

KENNETT, G.A.; MARCOU, M.; DOURISH, C.T.; CURZON, G. (1987) Single administration of 5-HT_{1A} agonists decreases 5-HT_{1A} presynaptic, but not postsynaptic receptor-mediated responses: relationship to antidepressant-like action. **Eur. J. Pharmacol.**, 138: 53-60.

KILIC, E.; KILIC, Ü.; BACIGALUPPI, M.; GUO, Z.; ABDALLAH, N.B.; WOLFER, D.P.; REITER, R.J.; HERMANN, D.M.; BASSETTI, C.L. (2008) Delayed melatonin administration promotes neuronal survival, neurogenesis and motor recovery, and attenuates hyperactivity and anxiety after mild focal cerebral ischemia in mice. **J. Pineal Res.**, 45: 142-148.

KIM, J.J.; FANSELOW, M.S. (1992) Modality-specific retrograde amnesia of fear. **Science**, 256: 675-677.

KJELSTRUP, K.G.; TUVNES, F.A.; STEFFENACH, H-A.; EDVARD, R. M.; MOSER, I.; MOSER, M-B. (2002) Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 99(16): 10825-10830.

LANCEL, M.; MÜLLER-PREUSS, P.; WIGGER, A.; LANDGRAF, R.; HOLSBOER, F. (2002) The CRH1 receptor antagonist R121919 attenuates estresse-elicited sleep disturbances in rats, particularly in those with high innate anxiety. **Journal of Psychiatric Research**, 36: 197-208.

LANDGRAF, R.; WIGGER, A. (2002) High x low anxiety-related behavior rats: an animal model of extremes in trait anxiety. **Behav. Genet.**, 32: 301-314.

LANDGRAF, R.; WIGGER, A. (2003) Born to be anxious: neuroendocrine and genetic correlates of trait anxiety in HAB rats. **Estresse**, 6(2): 111-119.

LANDGRAF, R.; KEßLER, M. S.; BUNCK, M.; MURGATROYD, C.; SPENGLER, D.; ZIMBELMANN, M.; NUßBAUMER, M.; CZIBERE, L.; TURCK, C. W.; SINGEWALD, N.; RUJESCU, D.; FRANK, E. (2007) Candidate genes of anxiety-related behavior in HAB/LAB rats and mice: Focus on vasopressin and glyoxalase-I. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 31: 89-102.

LEDOUX, J. (2000) Emotion circuits in the brain. **Annu. Rev. Neurosci.** 23:155-184.

----- (2001) **O cérebro emocional: os misteriosos alicerces da vida emocional**. Rio de Janeiro: Objetiva.

LEONARDO, E.D.; HEN, R. (2006) Genetics of affective and anxiety disorders. **Annual Review of Psychology**, 57: 117-37.

LESCH, K.P. (1991) 5-HT_{1A} receptor responsivity in anxiety disorders and depression. *Prog. Neuropsychopharmacol.* **Biol. Psychiatry**, 15: 723-733.

LEVINE, S. (2001) Primary social relationships influence the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. **Physiol. Behav.**, 73: 225-260.

LIE, D.C.; SONG, H.; COLAMARINO, S.A.; MING, G.L.; GAGE, F.H. (2004) Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.**, 44:399-421.

LIEBSCH, G.; MONTKOWSKI, A.; HOLSBOER, F.; LANDGRAF, R. (1998) Behavioral profiles of two Wistar rat lines selectively bred for high or low anxiety-related behavior. **Behavioral Brain Research**, 94:301-310.

LISTER, R.G. (1990) Ethologically- based animal models of anxiety disorders. **Pharmacology Therapy**, 46: 321-340.

LISTER, R.G. (1991) Ethologically- based animal models of anxiety disorders. In: File, S.F., ed. **Psychopharmacology of anxiolytics and antidepressants**. New York: Pergamon Press Inc; 1991: 155-185.

LORENZ, K.Z. (1995) **Os fundamentos da etologia** (Tradução: A.P.M. Cruz e C. Alberts). São Paulo: Editora UNESP.

LÖW, K.; CRESTANI, F.; KEIST, R.; BENKE, D.; BRÜNIG, I.; BENSON, J.A.; FRITSCHY, J-M.; RÜLICHE, T.; BLUETHMANN, H.; MÖHLER, H.; RUDOLPH, U. (2000) Molecular and Neuronal Substrate for the Selective Attenuation of Anxiety. **Science**, 290 (5489): 131-134.

LUCKI, I.; SINGH, A.; KREISS, D.S. (1994) Antidepressant-like behavioral effects of serotonin receptor agonists. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, 18: 85-95.

MALIZIA, A.L.; CUNNINGHAM, V.J.; BELL, C.J.; LIDDLE, P.F.; JONES, T.; NUTT, D.J. (1998) Decreased brain GABA_A benzodiazepine receptor binding in panic disorder: preliminary results from a quantitative PET study. **Arch. Gen. Psychiatry**, 55: 715-720.

MAREN, S.; FANSELOW, M.S. (1995) Synaptic plasticity in the basolateral amygdala induced by hippocampal formation stimulation in vivo. **Journal of Neuroscience**, 15(11): 7548-64.

MASER, J.D.; CLONINGER, C.R. Comorbidity of mood and anxiety disorders, 1st ed. Washington, D.C.: **American Psychiatric Press**; 1990: 123-137.

MCCREARY, A.C.; MCBLANE, J.W.; SPOONER, H.A.; HANDLEY, S.L. (1996) 5-HT systems and anxiety: multiple mechanisms in the elevated x-maze. **Polish Journal of Pharmacology**, 48: 1-12.

MCDONALD, H.Y.; WOJTOWICZ, J.M. (2005) Dynamics of neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats. **Neuroscience Letters**, 385: 70-75.

MCKITTRICK, C.R.; BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J.; MCEWEN, B.S.; SAKAI, R.R. (1995) Serotonin receptor binding in a colony model of chronic social estresse. **Biol. Psychiatry**, 37: 383-393.

MELIA, K.R.; RYABININ, A.E.; CORODIMAS, K.P.; WILSON, M.C.; LEDOUX, J.E. (1996) Alcohol, C-fos, context, fear conditioning and memory. Hippocampal-dependent learning and experience-dependent activation of the hippocampus are preferentially disrupted by ethanol. **Neuroscience**, 74: 313-322.

MENARD, J.; TREIT, D. (1999) Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 23: 591-613.

MERIKANGAS, K.R. (1990) Comorbidity for anxiety and depression: Review of family and genetic studies. In: Maser, J.D.; Cloninger, C.R. (eds.) **Comorbidity of mood and anxiety disorders**. American Psychiatric Press: Washington, D.C.

MIRESCU, C.; PETERS, J.D.; GOULD, E. (2004) Early life experience alters response of adult neurogenesis to estresse. **Nature Neuroscience**, 7(8): 841-846.

MORGANE PJ, MOKLER DJ, GALLER JR. (2002) Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 26: 471-483.

MURPHY, D.L. (1990) Neuropsychiatric disorders ant the multiple human brain serotonin receptor subtypes and subsystems. **Neuropsychopharmacology**, 3: 457-471.

NARDI, A.E.; MENDLOWICZ, M.; FIGUEIRA, I.; ANDRADE, Y.; CAMISÃO, C.; MARQUES, C.; KINRYS, G.; COSCARELLI, P.; VERSIANI, M. (1996) Transtorno de ansiedade generalizada: questões teóricas e diagnósticas. **J Bras Psiquiatr**, 45(3):173-178.

NAZAR, M.; JESSA, M.; PLAZNIK, A. (1997) Benzodiazepine-GABA_A receptor complex ligands in two models of anxiety. **J. Neural Transm.**, 104: 733-746.

NAZAR, M.; SIEMIATKOWSKI, M.; CZLONKOWSKA, A.; SIENKIEWICZ-JAROSK, H.; PLAZNIK, A. (1999) The role of hippocampus and 5-HT/GABA interaction in the central effects of benzodiazepine receptor ligands. **J. Neural Transm.**, 106: 369-381.

NEMEROFF, C.B. (2003) The role of GABA in the pathophysiology and treatment of anxiety disorders. **Psychopharmacology Bulletin**, 37(4): 133-146.

NEUMANN, I.D.; WIGGER, A.; LIEBSCH, G.; HOLLSBOER, F.; LANDGRAF, R. (1998) Increased basal activity of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis during pregnancy in rats bred for high anxiety-related behaviour. **Psychoneuroendocrinology**, 23(5): 449-463.

NOTTEBOHM, F. (1989) From bird song to neurogenesis. **Sci. Am.**, 260: 74-79.

NOWAKOWSKI, R.S.; LEWIN, S.B.; MILLER, M.W. (1989) Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population. **J Neurocytol.**, vol. 18(3):311-318.

OGAWA, T.; MIKUNI, M.; KURODA, Y.; MUNEOKA, K.; MORI, M.J.; TAKAHASHI, K. (1994) Periodic maternal deprivation alters estresse response in adult offspring: potentiates the negative feedback regulation of restraint estresse-induced adrenocortical response and reduces the frequencies of open-field-induced behavior. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 49: 961-967.

OHL, F.; TOSCHI, N.; WIGGER, A.; HENNIGER, M.S.H.; LANDGRAF, R. (2001) Dimensions of emotionality in a rat model of innate anxiety. **Behav. Neurosci.**, 115: 429-436.

- OVERSTREET, D.H.; REZVANI, A.H.; JANOWSKI, D.S. (1992) Madsley reactive and nonreactive rats differ only in some tasks reflecting emotionality. **Physiol. Behav.**, 52: 149-152.
- PAVLOV, I. (1927) **Conditioned Reflexes**. New York: Dover.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. (1982) **The rat brain in stereotaxic coordinates**. New York: Academic Press.
- PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. (1985) Validation of open:close arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J. Neurosci. Methods**, 14: 149-67.
- PETREANU, L.; ALVAREZ-BUYLLA, A. (2002) Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. **J Neurosci.**, vol. 22(14): 6106-6113.
- PHAM, K.; MCEWEN, B.S.; LEDOUX, J.E.; NADER, K. (2005) Fear learning transiently impairs hippocampal cell proliferation. **Neuroscience**, 130: 17-24.
- PHILLIPS, R.G. e LEDOUX, J. (1992) Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. **Behavioral Neuroscience**, 106: 274-285.
- PLOTSKY, P. (1991) Pathways to the secretion of ACTH: a view from the portal. **J. Neuroendocrinol.**, 3: 1-10.
- PLÜMPE, T.; EHNINGER, D.; STEINER, B.; KLEMPIN, F.; JESSBERGER, S.; BRANDT, M.; RÖMER, B.; RODRIGUEZ, G.R.; KRONENBERG, G.; KEMPERMANN, G. (2006) Variability of doublecortin-associated dendrite maturation in adult hippocampal neurogenesis is independent of the regulation of precursor cell proliferation. **BMC Neurosci**, 7: 77.
- PONDER, C.A.; KLIETHERMES, C.L.; DREW, M.R.; MULLER, J.; DAS, K.; RISBROUGH, V.B.; CRABBE, J.C.; CONRAD GILLIAM, T.; PALMER, A.A. (2007) Selection for contextual fear conditioning affects anxiety-like behaviors and gene expression. **Genes, Brain and Behavior**, 6 (8) , 736–749.
- PORSOLT, R.; LEPICHON, M.; JALFRE, M. (1977) Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, 266: 730-2.
- PRUT, L.; BELZUNG, C. (2003) The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behavior: a review. **European Journal of Pharmacology**, 463: 3-33.
- RADA, P.; MORENO, S.A.; TUCCI, S.; GONZALEZ, L.E.; HARRISON, T.; CHAU, D.T.; HOEBEL, B.G.; HERNANDEZ, L. (2003) Glutamate release in the nucleus accumbens is involved in behavioral depression during the porsolt swim test. **Neuroscience**, 119: 557-565.

- RADA, P.; COLASANTE, C.; SKIRZEWSKI, M.; HERNANDEZ, L.; HOEBEL, B. (2006) Behavioral depression in the swim test causes a biphasic, long-lasting change in accumbens acetylcholine release, with partial compensation by acetylcholinesterase and muscarinic-1 receptors. **Neuroscience**, 141: 67-76.
- RAMBOZ, S.; OOSTING, R.; AMARA, D.A.; KUNG, H.F.; BLIER, P.; MENDELSOHN, M.; MANN, J.; BRUNNER, D.; HEN, R. (1998) Serotonin receptor $1A$ knockout: An animal model of anxiety-related disorder. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 95(24): 14476–14481.
- REZAYAT, M.; ROOHBAKHSH, A.; ZARRINDAST, M-R.; MASSOUDI, R.; DJAHANGUIRI, B. (2005) Cholecystokinin and GABA interaction in the dorsal hippocampus of rats in the elevated plus-maze test of anxiety. **Physiology and Behavior**, 84: 775-782.
- RIBEIRO, R.L.; ANDREATINI, R.; WOLFMAN, C.; VIOLA, H.; MEDINA, J.H.; DA CUNHA, C. (1999) The “anxiety state” and its relation with rat models of memory and habituation. **Neurobiology of Learning and Memory**, 72: 78-94.
- RODGERS, R.J.; COLE, J.C. (1995) The elevated plus- maze: pharmacology, methodology and ethology. In: Cooper S.J., Hendrie, C.A., editors. **Ethology and psychopharmacology**. London: Wiley, 1995: 9-44.
- RODGERS, R.J.; JOHNSON, N.J.T. (1995) Factor Analysis of Spatiotemporal and Ethological Measures in the Murine Elevated Plus-Maze Test of Anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 52(2): 297-303.
- RODGERS, R.J.; CAO, B.J.; DALVI, A.; HOLMES, A. (1997) Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 30: 289-304.
- ROGAN, M.T.; LEDOUX, J.E. (1996) Emotion: systems, cells, synaptic plasticity. **Cell**, 85: 469-475.
- SALAM, J.N.; FOX, J.H.; DETROY, E.M.; GUIGNON, M.H.; WOHL, D.F.; FALLS, W.A. (2008) Voluntary exercise in C57 mice is anxiolytic across several measures of anxiety. **Behavioral Brain Research**, doi:10.1016/j.bbr.2008.07.036
- SANDERS, S.K.; SHEKHAR, A. (1995) Regulation of anxiety by GABA_A receptors in the rat amygdala. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 52: 701-6.
- SAPOLSKY, R.M.; MCEWEN, B.S. (1985) Down-regulation of neural corticosterone receptors by corticosterone and dexamethasone. **Brain Research**, 339: 161-165.
- SHIELDS, J.; KING, J.A. (2008) The role of 5-HT_{1A} receptors in the behavioral responses associated with innate fear. **Behavioral Neuroscience**, 122(3): 611-617.
- SHOJI-KASAI, Y.; AGETA, H.; HASEGAWA, Y.; TSUCHIDA, K.; SUGINO, H., et al.. (2007) Activin increases the number of synaptic contacts and the length of dendritic spines necks by modulating spinal actin dynamics. **J. Cell Sci.**, 120: 3830-3837.

SHORS, T.J.; TOWNSEND, D.A.; ZHAO, M.; KOZOROVITSKIY, Y.; GOULD, E. (2002) Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning. **Hippocampus**, 12: 578-584.

SIBILLE, E.; PAVLIDES, C.; BENKE, D.; TOTH, M. (2000) Genetic inactivation of the serotonin_{1A} receptor in mice results in downregulation of major GABA_A receptor α subunits, reduction of GABA_A receptor binding, and benzodiazepine-resistant anxiety. **The Journal of Neuroscience**, 20(8): 2758-2765.

SILVEIRA, A.C.D.L. (2008) Proliferação, diferenciação e funcionalidade hipocampal de ratos submetidos a estímulos ambientais e/ou insultos nutricionais. **Tese de Doutorado**. Rio de Janeiro: IBCCF-UFRJ.

TALLMAN, J.F.; PAUL, S.M.; SKOLNICK, P.; GALLAGER, D.W. (1980) Receptor for the age of anxiety: pharmacology of the benzodiazepines. **Science**, 207: 274-281.

TREIT, D. (1985) Animal models for the study of anti-anxiety agents: a review. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 9:203-222.

----- (1991) Anxiolytic effects of benzodiazepines and 5-HT_{1A} agonists: animal models. In: Rodgers e S.J. Cooper (orgs). **5-HT_{1A} agonists, 5-HT₃ antagonists and benzodiazepines: their comparative behavioral pharmacology**, pp.107-131. Chichester: John Wiley and Sons.

TREJO, J.L.; LLORENS-MARTÍN, M.V.; TORRES-ALEMÁN, I. (2008) The effects of exercise on spatial learning and anxiety-like behavior are mediated by an IGF-I-dependent mechanism related to hippocampal neurogenesis. **Mol. Cell. Neurosci.**, 37: 402-411.

VAN MEGEN, H.J.; WESTENBERG, H.G.; DEN BOER, J.A.; KAHN, R.S. (1996) Cholecystokinin in anxiety. **Eur. Neuropsychopharmacol.**, 6: 263-80.

VAN PRAAG, H.M. (2005) Can estresse cause depression? **World Journal of Biological Psychiatry**, 6: 5-22.

WARNER-SCHMIDT, J.L.; MADSEN, T.M.; DUMAN, R.S. (2008) Electroconvulsive seizure restores neurogenesis and hippocampus-dependent fear memory after disruption by irradiation. **European Journal of Neuroscience**, 27: 1485-1493.

WEAVER, I.C.; CERVONI, N.; CHAMPAGNE, F.A.; D'ALESSIO, A.C.; SHARMA, S. (2004) Epigenetic programming by maternal behavior. **Nat. Neurosci.**, 7: 847-54.

WEINBERGER, D.R. (2001) Anxiety at the frontier of molecular medicine. **N. Engl. J. Med.**, 344(16): 1247-1249.

WIGGER, A.; LOERSCHER, P.; WEISSENBACHER, P.; HOLSBOER, F.; LANDGRAF, R. (2001) Cross-fostering and cross-breeding of HAB and LAB rats: a genetic rat model of anxiety. **Behav. Genet.**, 31: 371-382.

WIGGER, A.; SÁNCHEZ, M.M.; MATHYS, K.C.; EBNER, K.; FRANK, E.; LIU, D.; KRESSE, A.; NEUMANN, I.D.; HOLSBOER, F.; PLOTSKY, P.M.; LANDGRAF, R. (2004) Alterations in central neuropeptide expression, release, and receptor binding in rats bred for high anxiety: critical role of vasopressin. **Neuropsychopharmacology**, 29: 1-14.

WINDLE, R.J.; WOOD, S.; SHANKS, N.; PERKS, P.; CONDE, G.L.; DA COSTA, A.P.C.; INGRAM, C.D.; LIGHTMAN, S. L. (2003) Endocrine and Behavioural Responses to Noise Estresse: Comparison of Virgin and Lactating Female Rats during Non-Disrupted Maternal Activity. **Journal of Neuroendocrinology**, 9(6): 407-414.

WOJTOWICZ, J.M.; ASKEW, M.L.; WINOCUR, G. (2008) The effects of running and of inhibiting adult neurogenesis on learning and memory in rats. **European Journal of Neuroscience**, 27: 1494-1502.

ZANGEN, A.; NAKASH, R.; OVERSTREET, D.H.; YADID, G. (2001) Association between depressive behavior and absence of serotonin-dopamine interaction in the nucleus accumbens. **Psychopharmacology**, 155: 434-439.

ZARRINDAST, M.R.; ROSTAMI, P.; SADEGHI-HARIRI, M. (2001) GABA_A but not GABA_B receptor stimulation induces anti-anxiety profile in rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 69: 9-15.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)