

Murilo Luiz Cerutti

**AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL DE CAMUNDONGOS
SUBMETIDOS AO MODELO DE TRANSTORNO POR
ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO: UMA ABORDAGEM
EMOCIONAL E BIOQUÍMICA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Adair Roberto Soares Santos

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Bainy Leal

Florianópolis
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Cerutti, Murilo Luiz

Avaliação comportamental de camundongos submetidos a modelos de transtorno por estresse pós - traumático : uma abordagem emocional e bioquímica / Murilo Luiz Cerutti ; orientador, Adair Roberto Soares Santos ; coorientador, Rodrigo Bainy Leal. - Florianópolis, SC, 2014.

80 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Neurociências.

Inclui referências

1. Neurociências. 2. Transtorno por estresse pós - traumático. 3. Depressão, Ansiedade, Medo. 4. Memória. 5. BDNF, CREB, p38 MAPK. I. Santos, Adair Roberto Soares. II. Leal, Rodrigo Bainy. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências. IV. Título.

AGRADECIMENTOS

Sempre tive a certeza de que tão importante quanto o resultado final obtido ao término destes dois anos de muito trabalho e estudo, é reconhecer, e ter a plena convicção de que caminhar sozinho é demasiadamente difícil e que por muitas vezes os obstáculos do caminho são intransponíveis sem a ajuda, presença ou mesmo o pensamento positivo de algumas pessoas, que passam a ocupar um lugar muito importante ou mesmo fundamental em nossas vidas.

Estes seis anos fora de casa me ensinaram muitas coisas, proporcionaram-me experiências das quais jamais esquecerei, conheci pessoas especiais, vivi momentos especiais, e tenho certeza que tudo isso foi importante para minha formação tanto profissional quanto pessoal, sendo fundamental para lapidar meus conceitos, meu caráter. Seria simplesmente impossível transcrever em poucas linhas todas as palavras que eu gostaria de dirigir a tantas pessoas, mas farei o possível.

Início agradecendo ao meu nônio, Selvino *in memória* e a minha nona Deonira. Por vezes em momentos difíceis me agarrei a recordações de vocês. Carrego um pouco de vocês dois comigo, sempre e para sempre. A minha nona Maria *in memória*, nona, eu gostaria de ter a metade da fibra que a Sra tem, ser forte, guerreiro e batalhador como a Sra. Em momentos de fraqueza, a Sra serve de inspiração.

Aos meus queridos pais Vander e Odete, a vocês pai e mãe, devo, além do dom da vida também a educação, o caráter, a dignidade, o respeito, a força de vontade, a esperança. Vocês me ensinaram os valores que um homem deve possuir. Vocês me ensinaram que a honestidade não tem preço, e sem ela, não somos ninguém. A vocês que por diversas vezes privaram-se do próprio conforto em favor do meu, a vocês que não fizeram nada mais na vida do que batalhar para proporcionar a mim aos meus irmãos uma vida melhor do que a que vocês tiveram. Nas vezes em que pensei em desistir era em vocês que eu pensava, e isso me fortalecia. Obrigado por tudo pai e mãe, eu amo muito vocês, e se um dia eu puder ensinar aos meus filhos metade dos valores que aprendi com vocês, já me darei por satisfeito!

Aos meus irmãos de sangue, Maicon e Thais, que mesmo distante sempre me incentivaram e me motivaram e aos meus outros irmãos Karen e Luiz, obrigado pelo apoio sempre! Mesmo ao “malinha sem alça” do Jhonatan “piti” sei que também posso sempre contar com você!

Agradeço a Dandara, minha namorada por 9 anos (agora esposa) pessoa que eu amo muito, que me apoia em tudo, me dá força, está comigo em todos os momentos. Amor, não tenho palavras para descrever o quanto seu carinho e seu conforto foram importantes para mim, com ele toda a jornada foi menos árdua e mais fácil de ser superada. Agora chega de brincar de namorados, agora é vida nova, literalmente. Espero viver muitos e muitos anos ao seu lado, do mesmo jeito que vivemos até hoje.

Tive a grande sorte de ter cruzado com pessoas incríveis ao longo da vida. Acredito que um homem pode ter tudo na vida, mas se ele não tiver amigos ao seu redor, ele jamais será feliz por completo. Eu tenho o prazer e a honra de ter como amigos pessoas como o Paulo, o Róger e a Mayara, o Beto e a Mimi's. Incrivelmente, entra ano e sai ano nós continuamos unidos. Não existem palavras para estimar o quanto vocês são importantes para mim, por isso agradeço a todos vocês.

Durante a faculdade fiz amizades das quais jamais esquecerei. Na turma 2008-1 de farmácia conheci pessoas do mais alto gabarito no quesito parceria, honestidade e companheirismo. Agradeço a todos vocês Serjão, Juju, Mococa, Adriana, Mayara, Fernanda, Samara, Bianca, Camila e Greici, o companheirismo de vocês foi fundamental para o meu crescimento e amadurecimento pessoal.

Durante o quinto semestre de faculdade, decidi que experimentaria a área de pesquisa. E foi então que descobri outra grande paixão, além das ciências farmacêuticas. Em meados de fevereiro de 2010 conheci o Ney que me mostrou esse fantástico mundo da pesquisa, Ney te agradeço por todos os ensinamentos, pela paciência, pelo companheirismo, pelas diversas vezes que você me incentivou, diminuindo as minhas dificuldades e buscando sempre enaltecer o que eu tinha de melhor, por me ensinar que o melhor calçado a se usar é o “kichute branco”, sem palavras, apenas muito obrigado por ter cruzado um dia o meu caminho.

Agradeço imensamente ao Ginho, e ao Gaúcho (vulgo nêne gordinho). Vocês dois foram meus irmãos durante todo o tempo. Sempre estiveram ao meu lado, aprendi muito com vocês, desde a história política do Brasil às 3:00 da manhã num posto de gasolina, até como fazer uma formalina e extrair um hipocampo. Aos demais **AMIGOS** do LANDI, aos quais infelizmente não posso me dirigir individualmente por uma questão de tamanho que ficaria esta sessão da dissertação. Marina, Franciane, Fernanda, Ana, Rafaela, Catarina, Tátilla, Isis, Deise, Róli, Bruno, Ígor, Josiel, Mariza, Ari, Daniel, Leidi, Chico, Tatiane,

Bira, Morgana, junto com todos vocês, esses anos de laboratório foram muito mais divertidos, obrigado, de coração a todos.

Aos amigos que fiz no LIDOC, Katia, Thayz, Cris e especialmente a Amandinha, esta que veio de tão longe para trazer alegria a todos nós e me mostrou que a vida pode ser mais bela e doce do que eu estava acostumado a ver e sentir, seu carinho e companheirismo foram essenciais nesta jornada.

Não poderia deixar de mencionar aqui meu grande amigo e mestre professor Dr Adair, prof Ada para os mais chegados. Muito obrigado professor por ter apostado em mim, por não ter me deixado desistir (o Sr sabe do que eu estou falando), por ter acreditado e confiado na minha capacidade. Quero que saiba, que antes de orientador e mestre, eu o tenho como um amigo. Por tudo o que o Sr fez por mim eu lhe agradeço muito.

Ao grande professor Dr Rodrigo, que me recebeu de braços abertos em seu laboratório, esteve sempre pronto para colaborar como fosse possível para o meu aprendizado e aperfeiçoamento, obrigado professor, são pessoas como o Sr que nos fazem acreditar que vale a pena seguir essa carreira, que por muitas vezes, é ingrata àqueles que dedicam uma vida inteira ao crescimento dos outros. Agradeço muito a Ana Paula, Ana nós que fomos colegas durante a graduação em bioquímica, somos agora colaboradores do mesmo trabalho. Foi um grande prazer trabalhar e aprender com você, sem sua ajuda, paciência e dedicação, não seria possível a elaboração deste trabalho.

Não poderia deixar de concluir esta etapa do trabalho sem agradecer de coração a Dona Vilma e ao Sr Carlos, nossos grandes amigos e colaboradores no CCB. A dedicação de vocês ao trabalho faz de vocês peças fundamentais para o andamento do departamento.

O que dizer do Nivaldinho no comando da secretaria??? Nivaldo, o pequeno grande homem da PGN. Obrigado por tudo!!!

Agradeço ainda a Universidade Federal de Santa Catarina por ter me acolhido durante estes anos maravilhosos. Agradeço ao CNPq pelo apoio financeiro.

Aos camundongos utilizados neste trabalho, ferramentas de estudo, que por muitas vezes foram minhas únicas companhias durante as horas de experimento, meus sinceros agradecimentos e meu profundo respeito.

Dedico este trabalho aos colegas cientistas. Cientistas por amor, por paixão! A ciência não é construída apenas por verdades impostas e provadas numa bancada de laboratório, mas também pela dedicação, perseverança, boa vontade e ética de poucos.

RESUMO

O Transtorno por Estresse Pós-Traumático (TEPT) é um transtorno mental causado por um fator inicialmente estressante, como acidentes automobilísticos, assaltos, guerras, desastres naturais, entre muitos outros exemplos. Os principais sintomas são ansiedade (caracterizada por hiperexcitação, vigília e medo) quando as experiências do indivíduo de algum evento traumático são revividas. Assim, o objetivo deste estudo foi padronizar um modelo de indução de transtorno por estresse pós-traumático (TEPT) em camundongos, por meio de observação emocional (*in vivo*) e avaliação bioquímica (*ex vivo*). Para tal, foram utilizados camundongos Swiss machos (25-35 g) submetidos a uma série de cinco choques elétricos (0,8 mA e duração de 10 s). Estes animais foram expostos novamente ao mesmo aparelho 1, 6 e 24 horas, 7 e 14 dias mais tarde. Imediatamente após a reexposição, avaliou-se o estado de medo, ansiedade e depressão. Em seguida, o hipocampo foi removido para aferir a concentração de proteínas envolvidas na neuroplasticidade. Este protocolo foi capaz de induzir um comportamento excessivo de medo nos animais quando foram reexpostos ao aparelho gerador de choque. Além disso, os animais apresentaram comportamento de ansiedade e depressão avaliados no labirinto em cruz elevado e no nado forçado, respectivamente.

A análise bioquímica mostrou elevação da concentração de BDNF 24 h após a série de choques e imediatamente após a reexposição, bem como um aumento da concentração de CREB 1 e 6 h após os choques. Além disso, observou-se uma redução da concentração 24 e 1 h da caspase 8 e de p38 MAPK após os choques, respectivamente.

Assim, conclui-se que o modelo utilizado induziu mudanças comportamentais (medo, ansiedade e depressão) e bioquímicas condizentes com os sinais observados em humanos, sugerindo que ele pode ser útil para se estudar a fisiopatologia e o tratamento do TEPT.

Palavras-chave: TEPT. Depressão. Ansiedade. Medo. Memória. BDNF. CREB. p38 MAPK.

ABSTRACT

Post-Traumatic Stress Disorder (PTSD) is a mental disorder caused by an factor initially stressful. Automobile accidents, muggings, wars, natural disasters among many other examples. The main symptoms are anxiety (characterized by hyperexcitation, hypervigilance and fear) when the patient relives some traumatic event from the past. Thus, the aim of this study was to standardize a model of PTSD in mice by observation of emotional (*in vivo*) and biochemical (*ex vivo*) parameters. For this purpose male Swiss mice were used (25-35 g) and submitted to a series of five electric shocks (0,8 mA, for 10 s) in a step down apparatus. The animals were re-exposed to the apparatus 1, 6, 24 hours, 7 and 14 days later. Immediately after re-exposure, we evaluated the state of fear, depression and anxiety. After that, the hippocampus was collected to measure the expression of proteins that are involved in hippocampus neuroplasticity. This protocol was able to induce excessive fear behavior in the animals when they were re-exposed to the shock apparatus. Moreover, the animals showed anxiety and depression behavior in the elevated plus maze and forced swimming test, respectively.

Biochemical analysis showed an increase in BDNF concentration 24 h after the shock series and immediately after the exposure, as well as an increase in CREB levels 1 and 6 h after shock series. Further, caspase 8 and p38 MAPK showed a decrease of their levels 24 and 1 h after the shock exposure, respectively.

We can conclude that this PTSD model induced behavioral changes in the animals (fear, anxiety and depression), accompanied by biochemical changes. Thus, this profile is consistent with symptoms observed in humans, suggesting that the model used in this work can be useful to study the physiopathology and treatment of PTSD.

Keywords: PTSD. Depression. Anxiety. Fear. Memory. BDNF. CREB. p38 MAPK.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Participação da carga genética e riscos ambientais para o desenvolvimento do TEPT.....	23
Figura 2 - Regiões límbicas e suas funções, conhecidamente alteradas durante o TEPT.	24
Figura 3 - Diferenças entre o curso de aquisição e extinção das memórias aversivas e em indivíduos normais e com TEPT.....	25
Figura 4 - Representação esquemática da metodologia utilizada para indução do TEPT.....	34
Figura 5 - Fotografia mostrando a postura que o animal adota quando está exibindo o comportamento de congelamento (freezing) durante a reexposição ao aparato de choque.....	35
Figura 6 - Fotografia mostrando a postura do animal durante o comportamento exploratório vertical (rearing) no momento da reexposição ao aparato gerador de choque.....	36
Figura 7 - Fotografia mostrando a postura dos animais ao serem submetidos ao teste do nado forçado logo após terem sido reexpostos ao aparato de choque.....	37
Figura 8 - Fotografia mostrando a postura dos animais ao serem submetidos ao teste suspensão de cauda logo após terem sido reexpostos ao aparato de choque.....	38
Figura 9 - Fotografia mostrando o comportamento exploratório do animal sobre o labirinto em cruz elevado logo após eles terem sido reexpostos ao equipamento gerador de choque.....	39
Figura 10 - Decurso temporal do comportamento de congelamento e de exploração vertical dos camundongos reexpostos ao aparato de choque.....	44
Figura 11 - Comportamento “tipo” depressivo no teste do nado forçado e suspensão de cauda e o tempo de congelamento e explorações verticais durante a reexposição do animal ao aparato de choque.....	45

Figura 12 - Comportamento “tipo” ansiogênico no teste do labirinto em cruz elevado, 24h após a exposição dos animais ao modelo de indução de TEPT e imediatamente após a reexposição dos mesmos ao aparato de choque.	47
Figura 13 - Concentração de BDNF no hipocampo dos animais 1, 6 e 24 h após terem sido submetidos aos choques elétricos e imediatamente após a reexposição dos mesmos ao aparato de choque.	48
Figura 14 - Avaliação da concentração de CREB no hipocampo 1, 6 e 24 h após a exposição dos animais ao choque e imediatamente após a reexposição dos mesmos ao aparato de choque.	49
Figura 15 - Concentração de p38 MAPK no hipocampo 1, 6 e 24 h após a exposição dos animais ao choque e imediatamente após a reexposição dos mesmos ao aparato de choque.	50
Figura 16 - Concentração das caspases 8 e 9 no hipocampo em 1, 6 e 24 h após a exposição dos animais ao choque e imediatamente após a reexposição dos mesmos ao aparato de choque.	51
Figura 17 - Esquema da participação simultânea dos fatores genéticos e ambientais no desenvolvimento de quadros depressivos.	54
Figura 18 - Esquema da sinalização de BDNF via receptores TrkB.	58

LISTA DE ABREVIATURAS

AKT (PKB)	Proteína cinase B
AMPC	Monofosfato Cíclico de Adenosina
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
BLA	Amígdala Basolateral
CaMK	Calmodulina cinase
CREB	Proteína de Ligação do Elemento Responsivo ao AMPc
D2	Receptor dopaminérgico D2
D3	Receptor dopaminérgico D3
DHA	Ácido Docosahexaenoico
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
DO	Densidade Óptica
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ELISA	Imuno Ensaio de Adsorção Enzimática
ERK	Proteína Cinase Regulada Extracelularmente
HPA	Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
mA	Miliampére
NGF	Fator de Crescimento Neural
P38	Proteína cinase p38
PFC	Córtex Pré-Frontal
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinase
PLC	Fosfolipase C
PMSE	Fluoreto de Fenilmetilsulfonilo
RA	Ácido Retinóico
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Simples
TEPT	Transtorno por Estresse Pós-Traumático
TRK B	Receptor de Tirosina cinase do tipo B

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 O QUE É E ONDE SURTIU O TERMO TRANSTORNO POR ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO	21
1.2 PARTICIPAÇÃO DE ESTRUTURAS LÍMBICAS NO TEPT	23
1.3 RELAÇÃO ENTRE MEDO E TEPT	24
1.4 A DOR EM PACIENTES COM TEPT	25
1.5 O TEPT EM ANIMAIS	26
2 JUSTIFICATIVA	29
3 OBJETIVO	31
3.1 OBJETIVO GERAL	31
3.1.1 Objetivos Específicos	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 ANIMAIS	33
4.2 INDUÇÃO DO TRANSTORNO POR ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO (TEPT)	33
4.3 AVALIAÇÃO DO COMPONENTE EMOCIONAL	34
4.4 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE MEDO E ANSIEDADE	35
4.5 TESTE DO NADO FORÇADO	36
4.6 TESTE DE SUSPENSÃO DE CAUDA	37
4.7 TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	38
4.8 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA	39
4.9 WESTERN BLOTTING	39
4.10 QUANTIFICAÇÃO DE BDNF POR ELISA	40
4.11 DOSAGEM DAS CASPASES 8 E 9	41
4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
5 RESULTADOS	43

5.1	COMPORTAMENTO DE MEDO E ANSIEDADE _____	43
5.2	TESTE DO NADO FORÇADO E SUSPENSÃO DE CAUDA _____	44
5.3	TESTE DO LABIRINDO EM CRUZ ELEVADO _____	46
5.4	AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE BDNF NO HIPOCAMPO _____	47
5.5	AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO CREB E DA PROTEÍNA CINASE P38 _____	48
5.6	AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DAS CASPASES 8 e 9 _____	50
6	DISCUSSÃO _____	53
7	CONCLUSÃO _____	63
8	PERSPECTIVAS _____	65
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	67

1 INTRODUÇÃO

1.1 O QUE É E ONDE SURTIU O TERMO TRANSTORNO POR ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO

O Transtorno por Estresse Pós-Traumático (TEPT) é uma síndrome caracterizada por um espectro variado de sintomas que surgem após a exposição de um indivíduo a agentes estressores traumáticos (muitos dos quais com risco de morte) como, por exemplo, assaltos, acidentes automobilísticos, guerras, e outros eventos de forma geral violentos. Os critérios de diagnóstico, na maioria das vezes, incluem uma revivência do evento traumático inicial, evitar locais, objetos ou estímulos associados ao evento estressante e uma hiperexcitação que não estava presente no indivíduo antes do evento estressante (American Psychology Association, 2000).

Uma das primeiras descrições do TEPT remete à guerra civil americana (1861-1865) quando se observou que os soldados veteranos passavam a apresentar arritmia cardíaca, bem como um comportamento hipervigilante que não era evidenciado antes da experiência em combate. Entretanto, apenas em meados da década de 80 o termo TEPT foi introduzido no contexto científico primeiramente nos EUA, e posteriormente na Europa ocidental (LIPOV e KELZEMBERG, 2012).

Embora exista a possibilidade de qualquer evento estressante promover o TEPT, aqueles em que há lesão física do indivíduo são os mais prováveis de provocar alguma seqüela psicológica, sendo o TEPT uma delas (KOREN et al., 2005).

Existe ainda uma grande discrepância entre os indivíduos que desenvolvem o TEPT e aqueles que não o desenvolvem, bem como a intensidade ou a gravidade dos sintomas do transtorno entre estas pessoas. Sabe-se, por exemplo, que o trauma é necessário, mas não suficiente para precipitar o desenvolvimento do TEPT. Esta questão é tão primordial que pode ser a chave para explicar como alguns indivíduos, mas não outros, desenvolvem o transtorno (cerca de 5 a 30%) mesmo todos tendo passado pelo mesmo evento traumático (GILLESPIE et al., 2009; MILLIKE, AUCHTERLONIE e HOGE, 2007; DAVIDSON et al., 2004).

Existe, portanto, uma variedade de fatores que contribuem para a magnitude dos sintomas durante o TEPT, são eles: predisposição genética, a rede social de apoio, ou seja, as pessoas mais próximas que convivem com o indivíduo e experiências de vida que antecedem o evento traumático (àquelas que ocorrem normalmente durante a

infância) (Figura 1). Em suma, estes fatores podem determinar se um indivíduo é resistente ou sensível à exposição a um trauma (BINDER e SCHARFMAN, 2008; JOVANOVIC e RESSLER, 2010).

Estudos de associação alélica buscaram identificar uma associação entre uma variante genética (polimorfismo) e a expressão fenotípica. Estes estudos compararam o DNA (mas não sequências de DNA, e sim marcadores de variações regionais do DNA também conhecidos pela sigla SNP ou polimorfismo de nucleotídeo simples) de indivíduos que passaram por algum tipo de trauma que desenvolveram e outros que não desenvolveram o transtorno (MAHAN e RESSLER, 2012).

Associações genéticas replicadas encontradas em pacientes com TEPT em Val66Met o qual possui função neurotrófica, já que se trata de uma porção do gene responsável pela produção de BDNF, apontou que portadores da variação Met/Met neste SNP mostraram aumento da ativação do lobo temporal medial durante a recuperação do episódio traumático e codificação de tarefas. Por outro lado, portadores Met/Met exibem extinção prejudicada de memórias que está correlacionado com uma ativação alterada da amígdala, PFC (Córtex pré-frontal) e hipocampo; maior recrutamento da amígdala e PFC em portadores Met/Met durante a formação da memória (DENNIS et al., 2010; VAN WINGEN et al., 2010; LONSDORF et al., 2010). De acordo com a literatura, parece que qualquer variação deste SNP que não seja entre uma valina e uma metionina no códon 66, pode promover ou facilitar o desenvolvimento de TEPT em humanos.

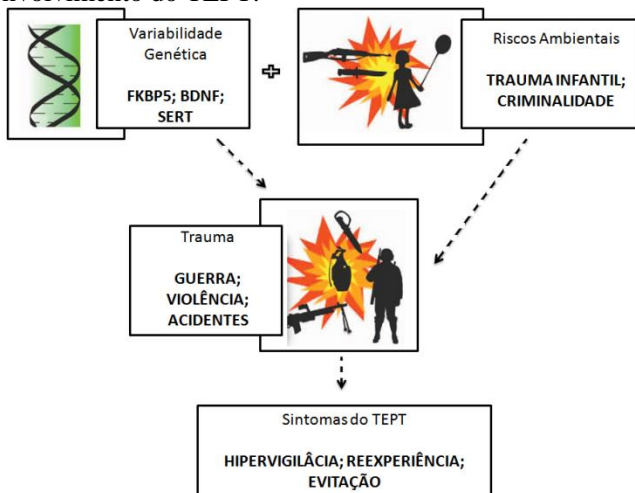
Em relação aos alelos curtos e longos dos genes que estão associados com funções no transportador de serotonina sugeriu-se na ocasião daquele estudo, que o alelo curto estaria associado com uma diminuição do risco para desenvolvimento de TEPT em ambientes de baixo risco, enquanto que em ambientes de risco elevado ele estaria associado a um grande risco de desenvolvimento do TEPT.

Estes achados sugerem que o ambiente pode exercer influência no gene na região polimórfica ligada ao transportador de serotonina e indiretamente ao risco de desenvolvimento de TEPT (GRABE et al, 2009).

A proteína de ligação FK506 com função chaperona (proteínas chaperonas, também conhecidas por proteínas auxiliares que tem como função a indução da correta configuração terciária de outras proteínas) glicocorticóide também se mostraram alteradas em indivíduos com TEPT; o SNP FKBP5, está relacionado com histórico de maus tratos em crianças e serve como um preditor da gravidade dos sintomas do TEPT

no indivíduo adulto (Figura 1). Assim, o FKBP5 pode contribuir para o aumento da sensibilidade da amígdala e a resposta do eixo HPA ao estresse no adulto (MEHTA et al., 2011; BINDER et al., 2008).

Figura 1 - Participação da carga genética e riscos ambientais para o desenvolvimento do TEPT.



FKBP5, SNP do gene que expressa a proteína FK506 esta última com função chaperona glicocorticóide; BDNF, fator neurotrófico derivado do cérebro; Genes associados com funções no transportador de serotonina (Serot). Fonte: Adaptação de MAHAN e RESSLER, 2012.

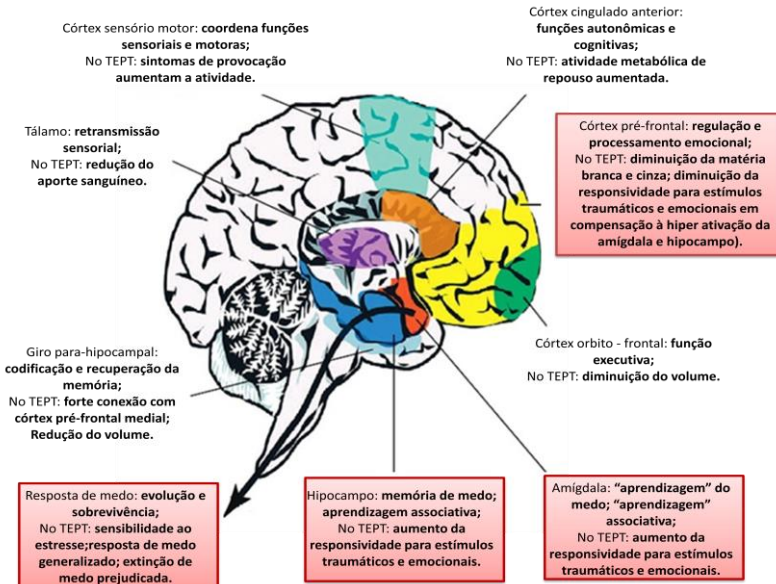
1.2 PARTICIPAÇÃO DE ESTRUTURAS LÍMBICAS NO TEPT

Tanto em homens quanto em animais, as estruturas neuronais mais claramente alteradas durante o TEPT são: amígdala, hipocampo e córtex pré-frontal (PFC) (HEIMER e VAN HOESEN, 2006) (Figura 2).

Com função de regular a “aprendizagem” do medo, a amígdala recebe projeções do hipocampo e do PFC, sendo que indivíduos com TEPT apresentam uma diminuição da ativação do PFC e hipocampo, coincidindo com um aumento da ativação da amígdala devido a uma perda do controle da mesma, possivelmente resultando em uma hiper-responsividade da amígdala frente a estímulos que provocam medo, ou mesmo, resultam nas respostas de medo exagerado frequentemente presentes durante o TEPT e também em outras disfunções psicológicas relacionadas com medo (ETKIN e WAGER, 2007). Outras estruturas

como giro parahipocampal, córtex orbito frontal, córtex sensorio motor, tálamo e o córtex cingulado anterior também estão alterados em indivíduos com o transtorno (ABE et al., 2006; ROGERS et al., 2009) (Figura 2).

Figura 2 - Regiões límbicas e suas funções, conhecidamente alteradas durante o TEPT.



Fonte: Adaptação de MAHAN e RESSLER, 2012.

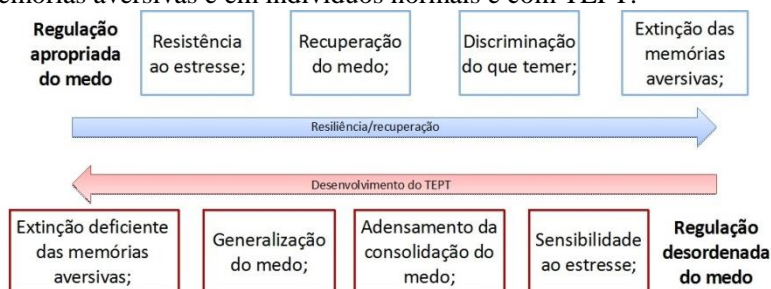
1.3 RELAÇÃO ENTRE MEDO E TEPT

O medo irracional é um grande impedimento para o sucesso e produtividade. Franklin D. Roosevelt (presidente dos EUA de 03/1933 até 04/1945) já sabia disso quando em 1933 reconheceu, referindo-se na ocasião, ao futuro econômico dos EUA que: *“a única coisa que devemos temer é o próprio medo”*. Embora se saiba que a aprendizagem do medo é algo, evolutivamente benéfico e necessário, quando o medo se torna generalizado, este mecanismo passa a ser além de improdutivo, prejudicial ao indivíduo (Figura 3). E durante o TEPT, é exatamente o que acontece, pois o medo aprendido durante um evento traumático torna-se generalizado mesmo em situações consideradas seguras (GILLESPIE et al., 2009; WILCOX, STORR e BRESLAU, 2009).

Evidências de estudos em animais bem como estudos de neuroimagem em humanos, sugerem que um dos mecanismos subjacentes ao TEPT é a plasticidade neuronal exacerbada, que, originalmente é à base da aprendizagem e da memória (LANIUS et al., 2006; FRANCATI, VERMETTEN e BREMNER, 2007; PAPE e PARE, 2010; SHUMYATSKY et al., 2005).

Comportamentalmente, transtornos psiquiátricos como o TEPT apresentam um aumento da sensibilização ao estresse, excesso de generalização de situações rotineiras com situações de medo e finalmente uma deficiência na capacidade de extinguir a memória aversiva (MCLAUGHLIN et al., 2010; JOVANOVIC et al., 2009) (Figura 3).

Figura 3 - Diferenças entre o curso de aquisição e extinção das memórias aversivas e em indivíduos normais e com TEPT.



Fonte: Adaptação de MAHAN e RESSLER, 2012.

1.4 A DOR EM PACIENTES COM TEPT

Além daqueles sintomas já conhecidos e citados até o momento, ainda existem outras disfunções que acometem estes pacientes, sendo a dor crônica uma das mais importantes delas. Estudos com amostras de pacientes com transtornos psiquiátricos apontaram que cerca de 46% deles apresentavam sintomatologia condizente com TEPT, e destes, 24% relatavam também dor crônica em diferentes partes do corpo (VILLANO, ROSENBLUM e MAGURA, 2007).

Em meados de 2007 um extenso estudo canadense verificou uma notável diferença entre indivíduos com e sem diagnóstico de TEPT em relação à dor crônica. Observou-se que entre os pacientes com TEPT, 46% também sofriam de dor crônica na região lombar (em comparação com 20,6% da amostra sem TEPT) e 33% relatavam fortes crises de enxaqueca (em comparação com 10% sem TEPT) (SAREEN,

COX e STEIN, 2007). A relação entre o referido transtorno e quadros de aumento de dor é conhecida há muitos anos e é demonstrada em diversos estudos (BRAS et al., 2011; MOELLER e KELTNER, 2012), porém, ainda há uma carência de estudos para melhor relatar o mecanismo pelo qual isto ocorre.

1.5 O TEPT EM ANIMAIS

Atualmente são descritos alguns modelos animais que tem como propósito mimetizar um quadro típico de TEPT. Estes modelos são comumente utilizados com um resultado satisfatório há alguns anos (WANG et al., 2012) e dentre eles destacam-se: medo condicionado, exposição única e prolongada a um evento estressante, exposição a predadores ou simplesmente ao odor destes. Assim, a indução do TEPT através de choques elétricos é conhecida e utilizada com o propósito de se estudar alterações comportamentais, e também o efeito de algumas substâncias frente a essas alterações (LI et al., 2006).

Um exemplo deste fato, é que a aplicação de sucessivos choques elétricos nas patas de camundongos da linhagem ICR, seguida de reexposição deste evento aversivo, promove alterações comportamentais nos testes do labirinto em cruz elevado e na caixa clara e escura (ambos os testes preditivos para ansiedade) por até quatro semanas após a indução dos choques, e até duas semanas após a última reexposição do evento estressante (LI et al., 2006).

Além das alterações de âmbito comportamental nos animais submetidos ao modelo de indução de TEPT por choques elétricos, também tem sido observado alterações relevantes no que diz respeito ao sono destes animais. Percebeu-se que após a aplicação dos estímulos elétricos, em camundongos, os mesmos demonstraram uma diminuição nos episódios de sono por até 21 dias. A exploração de objetos que haviam sido previamente associados ao evento estressante (choques) também foi significativamente diminuída nos animais que receberam os estímulos quando comparado àqueles do grupo controle, sugerindo um comportamento de medo excessivo (PHILBERT et al., 2011).

Também durante a experimentação animal, evidenciou-se uma significativa redução do volume do hipocampo, naqueles animais submetidos ao modelo de indução de TEPT quando comparados aos animais controle, tal qual ocorre em humanos portadores do transtorno (PYNOOS et al., 1996; BACHMANN et al., 2005).

Através de ressonância magnética, notou-se uma lateralidade no que diz respeito à amígdala dos animais com TEPT, já que ocorreu

também uma diminuição da amígdala direita nestes animais. Concomitantemente com os achados citados, através de western blotting observou-se que também ocorreu uma diminuição da forma fosforilada da proteína GAP43/B-50 a qual é expressa exclusivamente no corpo celular e processos axonais dos neurônios hipocâmpais e possuem um papel importante no crescimento dos neuritos e na sinaptogênese desta região (GOLUB et al., 2011).

Ainda não está totalmente elucidado como essa redução do volume da amígdala ocorre, no hipocampo, entretanto, alguns estudos de imagem por ressonância magnética (RMI) sugerem ser a apoptose (evento também conhecido por morte celular programada) a causa principal dessa atrofia (ZHANG et al., 2006).

A apoptose é um processo extremamente complexo e estreitamente controlado que é fundamental para o desenvolvimento e para manutenção tanto da homeostase como da doença. Este processo que é responsivo a sinais ambientais e intrínsecos tem como função eliminar células defeituosas de forma controlada (YAN et al., 2006; YAO et al., 2007), mantendo e promovendo a homeostase. Existem duas vias de sinalização que promovem a morte celular por apoptose, a via intrínseca que é dependente da mitocôndria e a via extrínseca que é dependente de receptor, sendo que ambas as vias são reguladas por caspases (THORNBERRY e LAZEBNIK, 1998), além de serem moduladas pela família de genes de células de linfomas do tipo B2 (Bcl-2), que compreende proteínas pró apoptóticas como a BCL2 associada à proteína X (Bax) e proteínas anti-apoptóticas como a Bcl-2 (PANARETAKIS et al., 2002; KONOPLEVA et al., 2002).

As caspases compreendem um grupo de proteases que são expressas intracelularmente como pró-caspases. Estas últimas possuem um domínio proteolítico que é capaz de ser clivado, sendo subsequentemente divididas em caspases iniciadoras e efetoras. As caspases iniciadoras se localizam *upstream* na cadeia e estão vulneráveis a clivagem proteolítica e conseqüentemente clivam caspases *downstream* da cadeia, ditas caspases efetoras. A caspase 3 é um exemplo de caspase efetora deste processo, já as caspases 8 e 9 por sua vez, constituem-se de caspases iniciadoras do processo de morte celular sendo estas últimas portanto, *upstream* a caspase 3 (COHEN, 1997; BAO e SHI, 2007; GELDERBLOM et al., 2004).

Estudos *ex vivo* serviram para estabelecer a participação de cada uma das proteínas na manutenção das caspases no processo de apoptose. Assim, descobriu-se que quando ocorria o aumento da concentração de Bax havia concomitantemente um aumento da apoptose (MATTER-

REISSMANN et al., 2002; LANZI et al., 2001; CHANG et al., 2002), enquanto que aumento da concentração de Bcl-2 estava relacionado com uma diminuição da apoptose (USUDA et al., 2002; SUN et al., 2002; TILLI et al., 2002). Desta forma, a relação entre Bcl2/Bax é crítico para a manutenção adequada do processo de apoptose (JARSKOG et al., 2004; PETTERSSON et al., 2002).

2 JUSTIFICATIVA

Sabe-se que a exposição a eventos traumáticos é frequente ao longo da vida, afetando até 90% da população em geral, sendo que os homens são a grande maioria. Somente nos Estados Unidos estima-se que 7% da população irão desenvolver o TEPT ao longo da vida (CERVANTES, TREVISOL e JORNADA, 2013). Após todas as informações mencionadas até então, a execução deste projeto torna-se interessante e principalmente importante devido os seguintes aspectos:

- A padronização de metodologias simples e rápidas que sejam capazes de induzir um comportamento semelhante àqueles evidenciados em indivíduos com TETP, se faz muito importante para melhor compreendermos estes sintomas e também verificar a possibilidade de novos tratamentos;
- A importância de se compreender os mecanismos que favorecem a consolidação das memórias aversivas que são, basicamente, as responsáveis por desencadear todos os efeitos do TEPT em humanos;
- Compreender as vias de sinalização que levam a morte neuronal em algumas regiões cerebrais sabidamente envolvidas no transtorno, e mais importante ainda, descobrir mecanismos ou estratégias para minimizar o máximo possível este “dano” no SNC;

Finalmente, juntando todos os itens, chegamos à principal justificativa para o presente estudo, que seria contribuir a médio e longo prazo para a descoberta de estratégias para melhorar a qualidade de vida dos pacientes acometidos por este transtorno já que o TEPT é capaz de causar prejuízos significativos na qualidade de vida dos seus portadores.

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar se os choques elétricos nas patas de camundongos induzem um quadro semelhante ao TEPT convencionalmente observado em humanos, e verificar possíveis alterações de cunho emocional (*in vivo*) e bioquímico (*ex vivo*), bem como os possíveis mecanismos e estruturas neuronais envolvidas.

3.1.1 Objetivos Específicos

- Padronizar o modelo de indução de TEPT em camundongos;
- Verificação dos comportamentos indicativos de medo excessivo, ansiedade e de depressão;
- Verificar a duração do comportamento de medo e ansiedade;
- Mensurar a concentração de BDNF, p38 MAPK, CREB e das caspases 8 e 9 no hipocampo dos animais submetido ou não ao modelo de TEPT;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Para a realização dos experimentos foram utilizados cerca de 290 camundongos Swiss machos (2 meses de idade), pesando entre 25 a 35 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. Uma vez recebidos do Biotério Central, os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Neurobiologia da Dor e da Inflamação (LANDI), em micro isoladores com circulação de ar (Alesco), em gaiolas de 12x30x18 cm (6 animais por gaiola), com temperatura controlada de 20 ± 2 °C, em ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes acesas às 6:00 h) e com água e ração *ad libidum*.

Antes dos experimentos, os animais foram aclimatados ao laboratório por período mínimo de 1h, e todos os procedimentos foram realizados após aprovação dos protocolos experimentais pela Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) – UFSC (protocolos nº PP00699 e PP00745) e conduzidos de acordo com as normas de cuidados com animais de laboratório e as diretrizes éticas para investigação de dor em animais conscientes (ZIMMERMANN, 1983).

Ressaltamos ainda, que todos os procedimentos foram executados de maneira a preservar ao máximo a integridade física do animal, tendo como princípio reduzir ao máximo o desconforto que eventualmente foi necessário para demonstrar a efetividade do modelo proposto.

4.2 INDUÇÃO DO TRANSTORNO POR ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO (TEPT)

Os animais foram submetidos a uma série de choques elétricos nas patas através de uma grade metálica conforme modelo previamente descrito por Pynnos e colaboradores (1996).

Neste modelo utilizou-se um equipamento de Esquiva Inibitória ou Step-Down (Modelo EFF 342, INSIGHT, São Paulo, SP) no qual se isolou a área/plataforma de escape normalmente utilizada para avaliação cognitiva. Os choques elétricos tiveram uma intensidade de 0,8 mA e duração de 10 s (Figura 4). No total, foram aplicados 5 choques elétricos em intervalos de 30 s. Uma, seis ou vinte e quatro horas após a aplicação dos choques os animais foram reexpostos durante 3 minutos ao mesmo aparato de choque utilizado, para que houvesse uma “lembrança” da situação estressante a qual o animal foi submetido

no dia anterior e então o quadro “tipo” TEPT foi analisado, ressaltando que não houve qualquer estímulo elétrico neste momento.

Três diferentes grupos experimentais foram utilizados neste trabalho. O grupo naive não recebeu qualquer estímulo elétrico, apenas foi exposto ao aparato de choque uma vez, previamente a todas as análises. O grupo controle também não recebeu nenhum choque elétrico, porém, foi apresentado ao equipamento gerador de choque duas vezes, sendo que a última corresponde a reexposição que ocorreu em 1 h, 6 h, 24 h, 7 e 14 dias após a primeira exposição. Por fim, tem-se o grupo TEPT, o qual recebeu os choques elétricos e foi reexposto ao aparato de choque em 1 h, 6 h, 24 h, 7 e 14 dias após os estímulos elétricos.

Figura 4 - Representação esquemática da metodologia utilizada para indução do TEPT.



Fonte: Elaborado pelo autor (2014).

4.3 AVALIAÇÃO DO COMPONENTE EMOCIONAL

Após os animais terem sido expostos aos estímulos elétricos conforme descrito acima, eles foram avaliados em relação ao desenvolvimento de comportamentos “tipo” depressivo, medo e ansiedade, conforme descrito a seguir.

4.4 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE MEDO E ANSIEDADE

Dentro do contexto de medo o qual é evocado pela memória do evento traumático, o comportamento de “congelamento” dos animais submetidos aos choques elétricos tem sido utilizado para mensurar uma resposta de medo exagerado. Portanto, optou-se por gravar em vídeo o comportamento destes camundongos submetidos ao modelo de indução de TEPT durante a reexposição ao aparato gerador de choques para posteriormente mensurar o tempo de congelamento (Figura 5) dos mesmos em comparação aos demais grupos (SZCZYTKOWSKI, LEBONVILLE e LYSLE, 2012).

Figura 5 - Fotografia mostrando a postura que o animal adota quando está exibindo o comportamento de congelamento (freezing) durante a reexposição ao aparato de choque.



Fonte: Elaborado pelo autor (2014).

Durante o período de reexposição, que foi de 3 minutos, quando o tempo de congelamento foi mensurado, também se observou o número de explorações verticais (rearing) (Figura 6) executadas pelos animais submetidos ao modelo em comparação aos demais grupos experimentais, esta foi tomada como uma variável de avaliação motora e de ansiedade conforme descrito por Polesel e colaboradores (2014).

Figura 6 - Fotografia mostrando a postura do animal durante o comportamento exploratório vertical (rearing) no momento da reexposição ao aparato gerador de choque.



Fonte: Elaborado pelo autor (2014).

4.5 TESTE DO NADO FORÇADO

Com o objetivo de observar o possível efeito tipo depressivo que pode ser evidenciado durante o TEPT, os animais foram forçados a nadar individualmente no interior de cilindros de plástico PVC com água a uma profundidade de 20 cm e temperatura de aproximadamente $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ (Figura 7).

Neste ambiente os animais foram filmados durante 6 minutos e posteriormente foi contabilizado o tempo (em segundos) de imobilidade do animal, tempo este em que o animal permanece totalmente imóvel, apenas boiando sobre a água, e a imobilidade mensurada foi considerada como indicativo de comportamento “tipo” depressivo (PORSOLT, 1979).

Figura 7 - Fotografia mostrando a postura dos animais ao serem submetidos ao teste do nado forçado logo após terem sido reexpostos ao aparato de choque.



Fonte: Elaborado pelo autor (2014).

4.6 TESTE DE SUSPENSÃO DE CAUDA

Assim como no teste do nado forçado, com o objetivo de observar o possível efeito tipo depressivo que é evidenciado durante o TEPT, os animais foram suspensos pela cauda a uma altura de aproximadamente 80 cm do chão e separados por divisórias de isopor espaçadas cerca de 25 cm não possibilitando, portanto, que os animais pudessem interagir um com o outro, visualmente, durante o experimento.

Os animais tiveram suas caudas fixadas com fita adesiva aproximadamente a 2 cm da extremidade proximal da cauda na própria bancada de experimento (Figura 8). Neste teste, de forma semelhante ao que ocorre no teste do nado forçado, mensura-se o tempo de imobilidade dos animais, ou seja, o tempo em que eles permaneceram totalmente imóveis sem debater-se buscando uma possibilidade de fuga. Os animais foram filmados e o seu comportamento foi avaliado em vídeo por um período de 6 minutos (SACHARCZUK et al., 2009).

Figura 8 - Fotografia mostrando a postura dos animais ao serem submetidos ao teste suspensão de cauda logo após terem sido reexpostos ao aparato de choque.



Fonte: Elaborado pelo autor (2014).

4.7 TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

Com o objetivo de observar o nível de ansiedade gerado pelo modelo proposto, fez-se uso do Labirinto em Cruz Elevado o qual consiste em dois braços abertos e dois braços fechados ambos com 30 cm de comprimento, conectados entre si por uma plataforma central de 5x5 cm, sendo que os quatro braços estão dispostos em um ângulo de 90° entre si, e elevados do chão cerca de 25 cm (Figura 9).

Um a um, os animais foram levados à plataforma central e avaliados em relação ao tempo de permanência nos braços abertos e fechados, bem como o número de entradas no braço fechado do equipamento. Para tanto, registrou-se com a utilização de uma câmera o comportamento dos animais durante um período de 5 minutos os quais posteriormente foram avaliados utilizando o software Plus MZ v1.v (REHNI et al., 2010).

Figura 9 - Fotografia mostrando o comportamento exploratório do animal sobre o labirinto em cruz elevado logo após eles terem sido reexpostos ao equipamento gerador de choque.



Fonte: Elaborado pelo autor (2014).

4.8 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA

Após a verificação das alterações emocionais induzidas pelos choques elétricos nos camundongos em outro grupo experimental, verificou-se possíveis alterações em nível de expressão de proteínas específicas no hipocampo dos mesmos, bem como a verificação da concentração das caspases 8 e 9, conforme descrito a seguir.

4.9 WESTERN BLOTTING

Após o estabelecimento do quadro “tipo” TEPT, os animais foram sedados com isoflurano e sacrificados por decapitação, posteriormente, extraiu-se o encéfalo e em seguida o hipocampo para semi-quantificação de p38 MAPK e CREB.

As amostras foram imediatamente homogeneizadas mecanicamente a 4°C em homogeneizador de tecidos de vidro (Dounce Grinders, Omni International, Kennesaw, GA, EUA) com 500 µL de Tris-base 50 mM, pH 7,0; EDTA 0,1 mM, NaF 100 mM, PMSF 0,1 mM e Na₃VO₄ 2mM. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (13.000

x g por 10 minutos) para separação dos detritos celulares (OLIVEIRA et al., 2008).

O sobrenadante foi diluído individualmente 1/1 (v/v) com tampão de amostra de eletroforese com concentração final de Tris 50 mM (pH 6,8) EDTA 2 mM, SDS 4% e glicerol 8%. O teor de proteínas foi quantificado pelo método de Lowry utilizando albumina de soro bovino como padrão (LOWRY et al., 1951). Cada uma das amostras foi submetida à eletroforese em 10% de SDS-PAGE em minigéis após a adição de 2% de azul de bromofenol e 5% de mercaptoetanol (CORDOVA et al., 2004).

As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitro-celulose (1,2 mA/cm²; 1,5 h) como descrito por Bjerrum e Heegaard (1988) com adaptações, e o bloqueio das membranas foi feito com uma solução a 5% de leite em pó desnatado em TBS (10 mM Tris, 150 mM de NaCl, pH 7,5) por 1h.

As respectivas proteínas foram detectadas utilizando anticorpos específicos diluídos em TBS-T (Tris 10 mM, 150 mM de NaCl, 0,1% de Tween-20, pH 7,5) contendo BSA a 2,5% nas seguintes diluições: 1:1000 para P - p38 MAPK; 1:10000 para T - p38 MAPK; para P-CREB e T-CREB a diluição foi de 1:1000 e 1:2000 para β - actina. Posteriormente, as membranas foram incubadas com um anticorpo secundário ligado a uma peroxidase (com diluição de 1:2000) por 1h, e o sinal quimioluminescente foi detectado utilizando um kit ECL da Amersham.

Todos os passos de bloqueio e de incubação foram seguidos por três lavagens de 5 minutos cada das membranas com TBS-T e a densidade óptica (D.O.) das bandas foram quantificadas utilizando Scion Image TM (Frederick, MD, EUA) (COSTA et al., 2012).

4.10 QUANTIFICAÇÃO DE BDNF POR ELISA

Vinte e quatro horas após a indução do transtorno, e logo após a reexposição dos animais ao aparato de choque, os mesmos foram sedados com isoflurano e sacrificados por decapitação.

Retirou-se, em seguida, o hipocampo destes animais, os quais foram imediatamente homogeneizados em homogeneizador de tecidos de vidro (Dounce Grinders, Omni International, Kennesaw, GA, EUA), com uma solução de PBS (tampão fosfato salino) contendo Tween 20 (0,05%), fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0,1 mM, EDTA 10 mM, protinina a 2ng/ml, e cloreto de benzetônio 0,1 mM.

Os homogeneizados foram transferidos para tubos de 1,5 ml (Eppendorfs), e centrifugados a 3.000 g durante 10 min a 4 °C, sendo que o sobrenadante obtido foi armazenado a -80 °C até o momento da quantificação do BDNF. O conteúdo total de proteína foi mensurado no sobrenadante utilizando o método de Bradford.

Alíquotas de 100 µl das amostras foram utilizadas para mensurar a quantidade de fator neurotrófico derivado do cérebro (*brain-derived neurotrophic factor* BDNF) nas amostras por ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando o kit da R&D (Minneapolis, MN) de acordo com as instruções do fabricante.

Os valores obtidos foram estimados por meio da interpolação de uma curva padrão, utilizando-se ensaio colorimétrico, medido a 450 nm (comprimento de onda de correção de 540 nm) em um leitor de placa de ELISA (Berthold Technologies – Apollo 8 – LB 912, Alemanha). Assim todos os resultados foram expressos em pico gramas de BDNF por miligrama de proteína (BOBINSKI et al., 2011).

4.11 DOSAGEM DAS CASPASES 8 E 9

Após o estabelecimento do quadro “tipo TEPT” e sob o efeito de isoflurano, os animais foram sacrificados por decapitação. Em seguida extraiu-se o encéfalo e o hipocampo bilateralmente dos mesmos os quais foram armazenados a -80 °C até o momento do ensaio.

As amostras foram homogeneizadas mecanicamente utilizando um homogeneizador de tecidos de vidro (Dounce Grinders, Omni International, Kennesaw, GA, EUA) em tampão TRIS EDTA no mesmo dia do ensaio. Utilizou-se um ensaio de quimioluminescência, utilizando-se de kit comercial (Caspase-Glo® 8 e Caspase-Glo® 9 – Assay, Promega Corporation, USA), conforme instruções do fabricante. Depois de homogeneizadas as amostras foram inseridas na placa de leitura (placa branca fosca com 96 poços) onde se acrescentou igual volume de reagente de trabalho (substrato liofilizado + tampão + inibidor de proteases MG-132) totalizando um volume de 100 µl (50 µl de amostra para 50 µl de reagente de trabalho).

Após um período de incubação de 3h em baixa luminosidade, procedeu-se a leitura do sinal quimioluminescente utilizando um equipamento EnSpire Alpha®, Perkin – Elmer, EUA. A intensidade do sinal quimioluminescente é diretamente proporcional à concentração das caspases na amostra.

Os resultados obtidos no ensaio foram corrigidos pela quantidade de proteína presente em cada amostra, sendo, portanto

representado a concentração da caspase (em unidades arbitrárias) por mg de proteína na amostra conforme metodologia descrita por Andrew et al., 2004, com modificações.

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados no programa Graph Pad Prism versão 5.01 (2005, San Diego, CA, USA). Os dados apresentados possuem uma distribuição normal, de acordo com o teste de Shapiro – Wilk ($P > 0,05$). Desta forma, os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) e foram avaliados através da análise de variância (ANOVA) de uma via seguido pelo teste pos-hoc de Student - Newman-Keuls. Valores de p menores que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

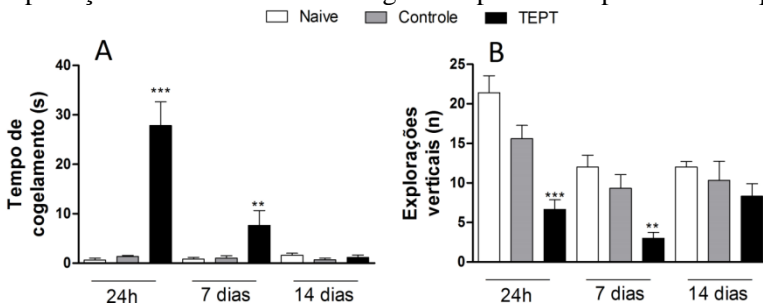
5.1 COMPORTAMENTO DE MEDO E ANSIEDADE

Os dados representados pela figura 10 (A e B) mostram que os animais controle que foram apenas colocados no aparato de choque, e que não receberam qualquer estímulo elétrico, e que foram reexpostos ao aparato 24 h, 7 e 14 dias após a aplicação dos choques elétricos, não apresentaram o comportamento de congelamento e tampouco demonstraram uma diminuição do comportamento de exploração vertical associado ao medo e ansiedade, respectivamente, quando comparados com os animais do grupo naive.

Já os animais do grupo TEPT, (que receberam os estímulos elétricos nas patas) e que foram reexpostos ao aparato de choque, após 24 h e 7 dias desenvolveram o comportamento de congelamento [$F_{(2,16)} = 28,48$, $P=0,0001$] e [$F_{(2,16)} = 4,465$, $P=0,0316$] e de redução da exploração vertical [$F_{(2,15)} = 20,44$, $P=0,0001$] e [$F_{(2,14)} = 11,12$, $P=0,0013$] quando comparados com os grupos naive e controle, respectivamente (Figura 10 A e B).

No entanto, o comportamento de congelamento [$F(2,16) = 1,256$, $P=0,3150$] e de exploração vertical [$F(2,16) = 1,012$, $P=0,3887$] nos animais que receberam os estímulos elétricos e que foram reexpostos ao contexto 14 dias após a aplicação dos estímulos, não foi diferente dos animais do grupo naive e controle, sugerindo que houve uma extinção do comportamento de medo e ansiedade, respectivamente (Figura 10 A e B).

Figura 10 - Decurso temporal do comportamento de congelamento e de exploração vertical dos camundongos reexpostos ao aparato de choque.



Painel A representa o tempo de congelamento e o painel B o número de explorações verticais. Os valores são expressos como média de 5 a 6 animais + EPM (erro padrão da média). O asterisco representa uma diferença significativa no tempo de congelamento e no número de explorações verticais quando comparado com o grupo controle ou naive. *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$.

5.2 TESTE DO NADO FORÇADO E SUSPENSÃO DE CAUDA

Observou-se nestes testes que o grupo que recebeu os estímulos elétricos apresentou um tempo de imobilidade no teste do nado forçado que foi significativamente superior ao grupo naive e controle, respectivamente (Figura 11 A). Além disso, foi possível observar que o tratamento com fluoxetina (10 mg/kg i.p.), 30 minutos antes do teste, foi capaz de reverter significativamente o comportamento tipo depressivo observado nos animais do grupo TEPT [$F_{(4,21)} = 15,12$, $P=0,0001$] quando comparados àquele grupo que não recebeu o tratamento com a fluoxetina (Figura 11 A).

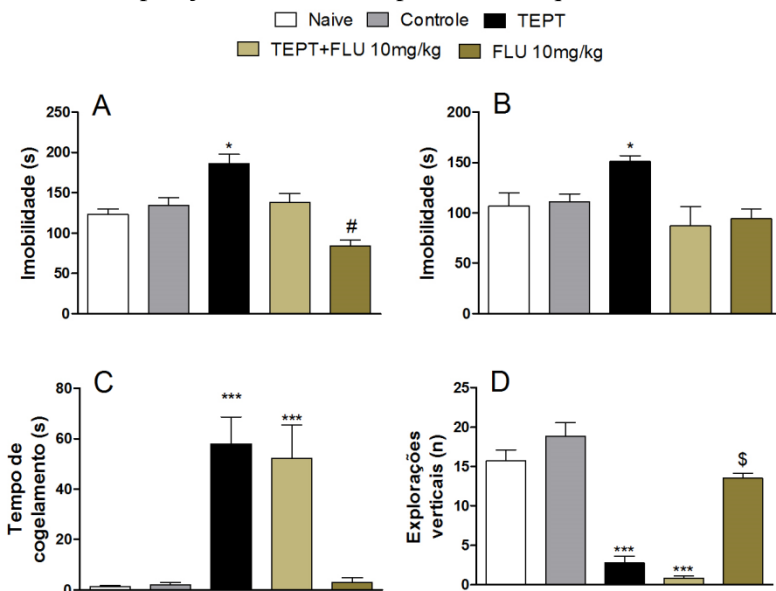
Assim como no teste do nado forçado, o comportamento “tipo” depressivo foi observado nos animais do grupo TEPT quando analisados no teste de suspensão de cauda, uma vez que eles permaneceram imóveis por um tempo significativamente superior quando comparados aos do grupo controle e naive. E tal qual ocorreu anteriormente, o tratamento previamente ao teste com fluoxetina 10mg/kg i.p foi capaz de reverter de forma significativa o comportamento “tipo” depressivo observado [$F_{(4,29)} = 4,027$, $P=0,018$] (Figura 11 B).

Observou-se também durante esta etapa experimental que o tratamento com fluoxetina (10 mg/kg i.p.) previamente à reexposição ao contexto aversivo, não foi capaz de reverter o comportamento de congelamento e de exploração vertical demonstrado pelos animais que

receberam os estímulos elétricos quando comparados aos demais grupos (Figura 11 C e D).

Por fim, observa-se que os animais que não foram submetidos ao modelo de indução de TEPT e foram tratados com fluoxetina não apresentaram alteração comportamental quando comparados aos grupos controle e naive (Figura 11 A e B).

Figura 11 - Comportamento “tipo” depressivo no teste do nado forçado e suspensão de cauda e o tempo de congelamento e explorações verticais durante a reexposição do animal ao aparato de choque.

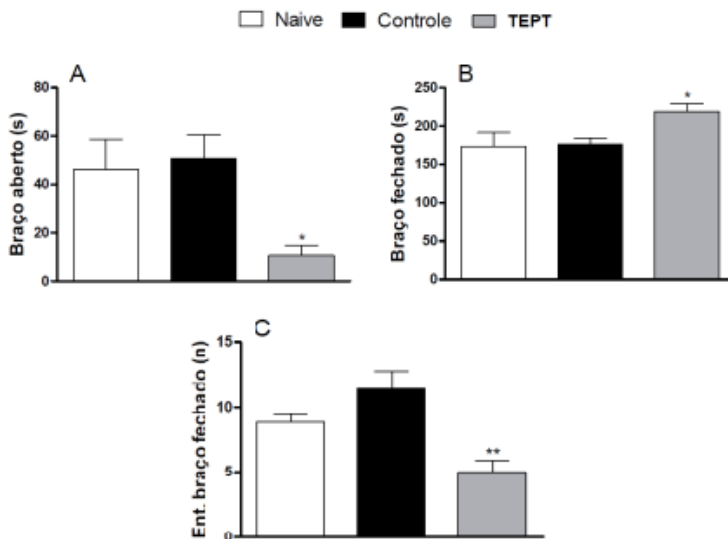


Painel A representa o teste do nado forçado, Painel B a suspensão de cauda e o tempo de congelamento e exploração vertical (Painéis C e D), 24h após a exposição dos animais ao modelo de indução de TEPT e imediatamente após o tratamento com fluoxetina (10 mg/kg i.p.) e reexposição dos mesmos ao aparato de choque. Os valores são expressos como média de 4 a 6 animais + EPM (erro padrão da média). O asterisco e o sustenido representam um aumento no tempo de imobilidade significativo quando comparado com os demais grupos. *** $P < 0,001$, # $P < 0,01$, * $P < 0,05$.

5.3 TESTE DO LABIRINDO EM CRUZ ELEVADO

A fim de verificar se o modelo de indução de TEPT adotado alterava o estado de ansiedade, os animais submetidos aos estímulos elétricos (aqueles do grupo TEPT) bem como aqueles do grupo controle e naive (que não receberam qualquer estímulo elétrico) foram analisados no teste preditivo de ansiedade, o labirinto em cruz elevado sendo que o número de entradas e saídas do braço fechado do aparato, bem como o tempo de permanência tanto no braço aberto quanto no fechado foi mensurado. Conforme pode ser observado na figura 12 A, os animais que receberam os choques elétricos apresentaram redução significativa [$F_{(2,12)} = 6,696$, $P=0,0143$] na permanência no braço aberto quando comparado com o grupo naive e controle, respectivamente. Consequentemente, os animais que receberam os estímulos elétricos permaneceram um tempo significativamente [$F_{(2,18)} = 5,559$, $P=0,0132$] superior nos braços fechados do aparato quando comparado ao grupo naive e ao grupo controle (Figura 12 B), confirmando o comportamento tipo ansiogênico. Por fim, o número de entradas destes animais submetidos aos estímulos elétricos nos braços fechados do aparato também foi reduzido de forma significativa [$F_{(2,16)} = 11,84$, $P=0,001$] quando comparado ao grupo naive e controle, respectivamente (Figura C).

Figura 12 - Comportamento “tipo” ansiogênico no teste do labirinto em cruz elevado, 24h após a exposição dos animais ao modelo de indução de TEPT e imediatamente após a reexposição dos mesmos ao aparato de choque.

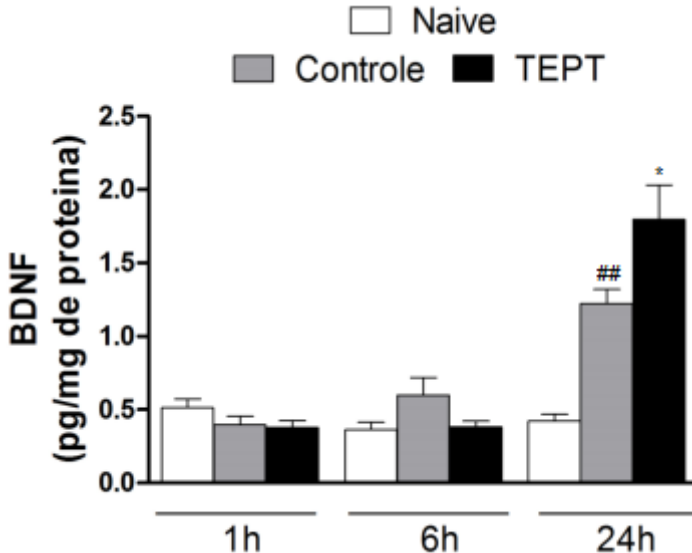


O painel **A** representa o tempo de permanência dos animais no braço aberto, em **B** observa-se o tempo de permanência dos animais no braço fechado e o painel **C** representa o número de entradas no braço fechado do aparato. Os valores são expressos como média de 5 a 6 animais + EPM (erro padrão da média). O asterisco representa diferença estatisticamente significativa quando comparado com os demais grupos. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

5.4 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE BDNF NO HIPOCAMPO

Os dados representados na figura 13 demonstram que os animais do grupo TEPT apresentaram aumento significativo [$F_{(2,14)} = 21,55$, $P=0,0001$] na concentração de BDNF no hipocampo 24 h após a indução dos estímulos elétricos quando comparados aos animais do grupo naive e controle, sendo que não foi observado qualquer alteração na concentração de BDNF em 1 h [$F_{(2,14)} = 1,765$, $P=0,2128$] e 6 h [$F_{(2,14)} = 2,804$, $P=0,1002$] após a aplicação dos estímulos elétricos.

Figura 13 - Concentração de BDNF no hipocampo dos animais 1, 6 e 24 h após terem sido submetidos aos choques elétricos e imediatamente após a reexposição dos mesmos ao aparato de choque.



Os resultados apresentados expressos em pg/mg de proteína. Os valores são expressos como média de 5 a 8 animais + EPM (erro padrão da média). O asterisco e o sustenido representam um aumento significativo da expressão de BDNF em relação aos demais grupos e em relação ao grupo naive respectivamente. *P < 0,05, ## P < 0,01.

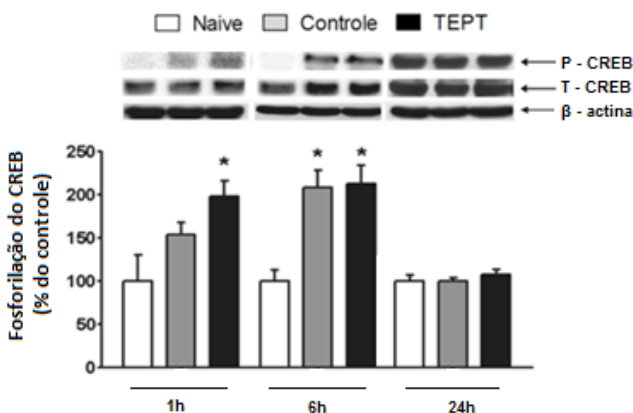
5.5 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO CREB E DA PROTEÍNA CINASE P38

Os dados representados na figura 14 demonstram que os animais do grupo TEPT apresentaram aumento de forma expressiva e significativa da concentração do fator de transcrição CREB no hipocampo 1 h após a indução dos estímulos elétricos e imediatamente após a reexposição quando comparados aos animais do grupo naive e controle, respectivamente. No entanto, 6 h após a indução do estímulo elétrico e da reexposição ocorreu aumento de forma expressiva e significativa da concentração do fator de transcrição CREB no hipocampo dos animais do grupo TEPT bem como controle quando comparado com o grupo naive (Figura 14).

Por outro lado, pode-se observar que a concentração do fator de transcrição CREB no hipocampo foi reestabelecido 24 horas após a reexposição, uma vez que não foi detectada diferença significativa na concentração de CREB nos animais do grupo naive em relação ao grupo TEPT e controle, respectivamente (Figura 14).

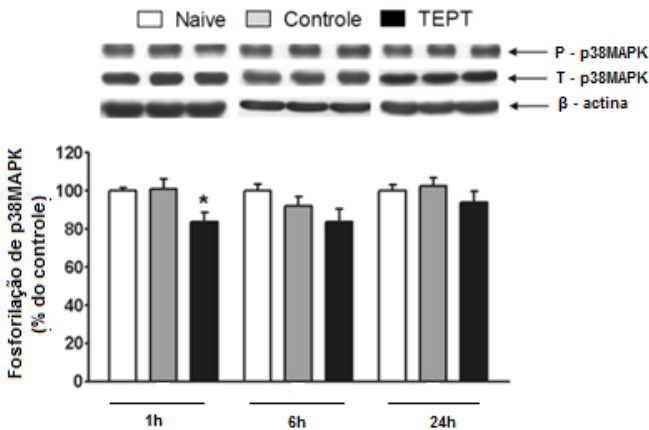
Na figura 15 observa-se que os animais do grupo TEPT apresentaram redução de forma significativa da concentração da proteína cinase p38 no hipocampo 1 h após a indução dos estímulos elétricos e imediatamente após a reexposição quando comparados aos animais do grupo naive e controle, respectivamente. Entretanto, 6 h após a indução do estímulo elétrico e da reexposição ocorreu diminuição de forma não significativa da concentração da proteína cinase p38 no hipocampo dos animais do grupo TEPT quando comparado com o grupo naive e controle (Figura 15). Por fim, pode-se observar que a concentração da proteína cinase p38 no hipocampo foi restabelecido 24 horas após a reexposição, uma vez que os valores encontrados foram semelhantes nos animais do grupo naive em relação ao grupo TEPT e controle, respectivamente (Figura 15).

Figura 14 - Avaliação da concentração de CREB no hipocampo 1, 6 e 24 h após a exposição dos animais ao choque e imediatamente após a reexposição dos mesmos ao aparato de choque.



Os resultados apresentados são expressos em % em função do controle. Os valores são expressos como média de 5 a 6 animais + EPM (erro padrão da média). O asterisco representa uma alteração estatisticamente significativa na concentração de CREB em relação aos demais grupos. * $P < 0,05$.

Figura 15 - Concentração de p38 MAPK no hipocampo 1, 6 e 24 h após a exposição dos animais ao choque e imediatamente após a reexposição dos mesmos ao aparato de choque.



Os resultados apresentados são expressos em % em função do controle. Os valores são expressos como média de 5 a 6 animais + EPM (erro padrão da média). O asterisco representa uma alteração estatisticamente significativa na expressão de P38 MAPK em relação aos demais grupos. * $P < 0,05$.

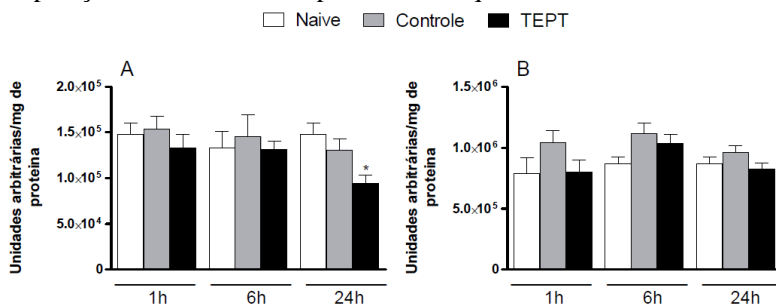
5.6 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DAS CASPASES 8 e 9

O perfil de concentração das enzimas envolvidas na morte celular programada (caspases 8 e 9) também foram avaliadas neste trabalho. Esta atividade foi avaliada em três diferentes períodos: 1, 6 e 24h após a aplicação dos choques elétricos e imediatamente após a reexposição dos animais ao aparato de choque.

Neste experimento observou-se que a concentração da caspase 8 no hipocampo, foi significativamente [$F_{(2,13)} = 5,877$, $P=0,0184$] reduzida no grupo TEPT quando comparado aos grupos naive e controle, somente 24 h após a aplicação dos choques e imediatamente após a reexposição (Figura 16A).

Por outro lado, observou-se que não houve alteração significativa na atividade da caspase 9 no hipocampo dos animais do grupo TEPT, controle e naive em nenhum dos períodos avaliados [$F_{(2,15)} = 1,784$, $P=0,2067$] (Figura 16B), sugerindo que a participação da caspase 8 se sobrepõe à da caspase 9, pelo menos durante os períodos iniciais em que o TEPT está instalado.

Figura 16 - Concentração das caspases 8 e 9 no hipocampo em 1, 6 e 24 h após a exposição dos animais ao choque e imediatamente após a reexposição dos mesmos ao aparato de choque.



O painel **A** representa a concentração da caspase 8 e o painel **B** representa a concentração da caspase 9 no hipocampo em 1, 6 e 24 h após a exposição dos animais ao choque e imediatamente após a reexposição dos mesmos ao aparato de choque. Os resultados apresentados são expressos em unidades arbitrárias/mg de proteína. Os valores são expressos como média de 6 a 8 animais + EPM (erro padrão da média). * $P < 0,05$.

6 DISCUSSÃO

Os dados descritos no presente trabalho claramente mostram que a metodologia que foi empregada com a finalidade de induzir um quadro “tipo” TEPT em camundongos foi bem sucedida, tendo em vista que foi possível observar alguns sinais tais como: depressão, ansiedade e medo que são condizentes com a doença em humanos.

O quadro de ansiedade, caracterizado pelo comportamento de medo exagerado e diminuição da exploração do ambiente aversivo, e depressão, mimetizam em parte sintomas presentes em vários transtornos.

Conforme já mencionado anteriormente, muitos são os fatores que podem contribuir para que um indivíduo possa apresentar os sinais e sintomas clinicamente conhecidos no TEPT, sendo que eles abrangem desde as características genéticas de cada indivíduo, bem como as variáveis ambientais (BINDER et al., 2008; JOVANOVIC e RESSLER, 2010).

Resultados descritos na literatura mostram que essas respostas exacerbadas de medo ocorrem em função do circuito de medo condicionado que é conservado na grande maioria dos vertebrados, e possui uma leitura das memórias aversivas de uma forma extremamente rápida e robusta, facilitando, portanto, o aparecimento das memórias intrusivas, “flash-backs” e o conhecido comportamento de hiperexcitação comumente observada durante o TEPT (JOVANOVIC et al., 2009; YEHUDA e LEDOUX, 2007; LANG, DAVIS e OHMAN, 2000; BELZUNG e PHILIPPOT, 2007).

Portanto, a diminuição do número de explorações verticais dentro do aparato de choque durante a reexposição, aliado ao tempo de congelamento destes animais, são comportamentos originados do medo exagerado e da ansiedade, respectivamente e tais comportamentos não haviam sido observados até então por outros autores utilizando-se a metodologia empregada neste trabalho

Ademais, diferentemente do que se pode inferir, a diminuição do número de explorações verticais não resulta de uma diminuição da atividade locomotora (uma vez que não há diferença na ambulação dos animais que receberam os estímulos elétricos quando comparado com os demais grupos), mas sim uma diminuição da atividade exploratória o que reflete indiretamente no aumento do comportamento ansiogênico do animal (ANKUR, MAHESH e BHATT, 2013).

Sabe-se que dependendo da intensidade e do tempo em que se sustenta a exposição ao estresse, as respostas do indivíduo podem ser

mal adaptadas, ou seja, ocorre uma facilitação do indivíduo desenvolver ansiedade, abuso de drogas e claro, quadros depressivos (BALE e VALE, 2004; KRISHNAN e NESTLER, 2008; BRUCHAS, LAND e CHAVKIN, 2010; KOOB, 2008).

De forma semelhante ao TEPT como um todo, o desenvolvimento de quadros depressivos são também dependentes de fatores ambientais e genéticos. Esta interação (genético-ambiental), porém, pode ser mais bem contextualizada como uma vulnerabilidade genética que pode se expressar em resposta a eventos traumáticos e/ou estressantes durante a vida do indivíduo. Estudos apontam que distúrbios complexos que resultam de fatores genéticos e ambientais são os que melhor prevêm a ocorrência de depressão (WONG e LICINIO, 2001) (Figura 17).

Figura 17 - Esquema da participação simultânea dos fatores genéticos e ambientais no desenvolvimento de quadros depressivos.



Fonte: Adaptação de WONG e LICINIO, 2001.

Em nosso estudo, os choques (eventos extremamente estressantes) foram capazes de induzir nos animais uma resposta mal adaptada, ou seja, o comportamento “tipo” depressivo propriamente dito. Assim, pode-se afirmar que: 1) o modelo de indução de TEPT através de uma única seção de choques foi capaz de induzir um comportamento “tipo” depressivo, avaliado por meio do teste do nado

forçado, e 2) a utilização de um medicamento tradicionalmente utilizado para o tratamento de quadros depressivos como a fluoxetina (inibidor seletivo da recaptação de serotonina), foi capaz de reverter este comportamento, nos levando a crer que pelo menos em parte, a sinalização serotoninérgica está envolvida na sintomatologia do TEPT, pelo menos no que diz respeito ao comportamento “tipo” depressivo.

Um fato relevante em relação ao tratamento com fluoxetina é que a reversão do comportamento “tipo” depressivo ocorre tanto com o tratamento prévio a reexposição do animal ao aparato de choque (dados não mostrados pois representam exatamente o mesmo perfil daquele apresentado na figura 11 A) quanto com o tratamento após esta etapa, sugerindo, portanto, que o processo limitante para o desenvolvimento da depressão durante o TEPT se dá no momento em que ocorre o evento estressante, neste caso o choque propriamente dito. O neurotransmissor serotonina, há tempos vem sendo estudado devido a sua participação direta na manutenção de quadros depressivos. Estudos que utilizaram a separação neonatal de ratos da presença materna são exemplos de que experiências adversas de vida podem ser capazes de promover alterações e/ou mudanças de caráter tanto comportamental como neuroendócrino relacionados a depressão, sendo que estas alterações perduram até a vida adulta destes ratos (LADD et al., 2000).

Entre estas alterações cabe ressaltar a hiper excitação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) em resposta ao estresse gerado (LADD et al., 1996), o qual pode promover ou facilitar ainda, o surgimento de quadros de ansiedade (HUOT et al., 2001). Como já se sabe, a serotonina e a sinalização proveniente da sua liberação na fenda sináptica possuem um importante papel na etiologia da depressão e também da ansiedade (OVERSTREET et al., 2003; SIBILLE e HEN., 2001).

Em roedores, no núcleo dorsal da rafe (DR), estão localizadas cerca de metade dos neurônios serotoninérgicos do SNC, e estes por sua vez inervam numerosas regiões encefálicas responsáveis e/ou que tem envolvimento na regulação da ansiedade e medo tais como o hipotálamo, hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal (AZMITIA e SEGAL, 1978; VERTES, 1991; PYÑEYRO e BLIER, 1999).

Assim como a depressão, a metodologia empregada foi capaz de promover um aumento dos níveis de ansiedade nos animais avaliados. Este fato foi evidenciado no teste do labirinto em cruz elevado, o que corrobora com os dados já disponíveis na literatura, mas também fortalece a suspeita de que situações estressantes agudas

promovem uma intensa reorganização neuronal em regiões de controle emocional.

De fato, foi observado que na amígdala basolateral (BLA), por exemplo, ocorre aumento da densidade das espinhas dendríticas bem como do comportamento de ansiedade dos indivíduos de maneira muito abrupta, sendo que em apenas 10 dias após o trauma estes eventos já são evidenciados (YEHUDA, 2002; American Psychiatric Association, 2000).

Outros estudos em roedores apontaram que um período de duas horas de estresse por imobilização leva a um aumento do comportamento tardio de ansiedade, sendo o mesmo acompanhado por aumento significativo da densidade de espinhas dendríticas em neurônios principais da BLA (MITRA et al., 2005). Assim, estes efeitos são reminiscentes de TEPT no qual um evento traumático único desencadeia mudanças plásticas que promovem ansiedade e outros comportamentos de início rápido ou tardios prolongados, que são acompanhados por hiperatividade da amígdala (YEHUDA e LEDOUX, 2007).

No presente estudo, buscamos também estudar eventuais mudanças plásticas (neuroquímicas) que acreditamos ocorrer em algumas regiões do SNC, em especial no hipocampo, que estão envolvidas no TEPT. Assim, verificamos as concentrações de BDNF, uma proteína segregada (BINDER e SCHARFMAN, 2004) que em humanos é codificada pelo gene conhecido também por *BDNF*, localizado no cromossoma 11 (JONES e REICHARDT, 1990; MAISONPIERRE et al., 1991).

O BDNF é um membro da família das neurotrofinas de fatores de crescimento e relaciona-se com o “fator de crescimento neural”, também dito NGF. O BDNF tem como função manter a sobrevivência de certos neurônios bem como estimular o crescimento e diferenciação de novos neurônios e conseqüentemente de novas sinapses (ACHESON et al., 1995; HUANG e REICHARDT, 2001). No SNC o BDNF é extremamente ativo no hipocampo e córtex, áreas vitais para o processamento de memórias e aprendizagem (YAMADA e NABESHIMA, 2003).

As memórias propriamente ditas são processos neuronais que envolvem algumas etapas, tais como aquisição, consolidação e evocação, não são, portanto adquiridas na sua forma final, sendo portanto, extremamente susceptíveis de interferências durante os primeiros momentos após a aquisição (MC GAUGH, 1966, 2000; IZQUIERDO e MC GAUGH, 2000).

A memória de longo prazo por sua vez, que é fundamental dentro do contexto do TEPT, não é um evento único, mas sim dependente de muitos eventos metabólicos que envolvem a participação de muitas estruturas cerebrais, como por exemplo, o hipocampo, além de necessitar de algumas horas (normalmente de 3 a 8) para se formarem (IZQUIERDO e MEDINA, 1997).

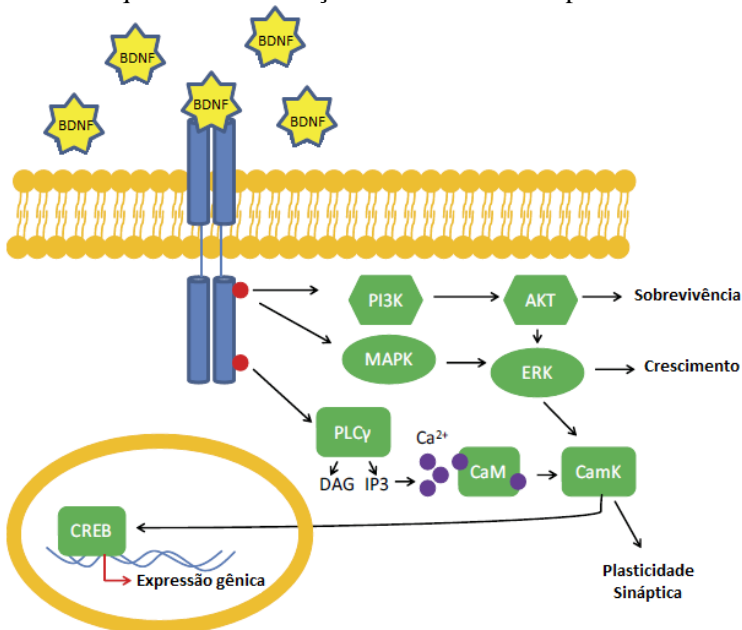
Cabe ainda ressaltar que no decorrer destas horas quando processos metabólicos estão em andamento, as memórias de longa duração são extremamente instáveis e somente ao término de todos os processos metabólicos que estão em andamento, tem-se a consolidação propriamente dita (IZQUIERDO, 2002).

Ainda neste contexto de aquisição de memória e neuroplasticidade, observamos ao término do estudo e durante o tratamento dos dados, que os choques induzidos nos animais foram capazes de promover um aumento significativo na concentração de BDNF no hipocampo destes animais vinte e quatro horas após a aplicação dos estímulos elétricos, quando comparados aos grupos controle e naive, respectivamente. Por outro lado, não foi observado quaisquer alterações nos níveis de BDNF em 1 e tampouco 6 horas após o evento estressante.

É importante salientar que os nossos resultados contrariam de certa forma alguns dados descritos na literatura que mostram que pacientes com TEPT possuem uma concentração reduzida de BDNF no soro quando comparados a outros indivíduos que não possuem o transtorno (HAUCK et al., 2010). Da mesma forma, nossos dados divergem de alguns estudos que apontam uma diminuição do mRNA para BDNF tanto no hipocampo quanto no giro denteado de ratos após a exposição a um trauma (RASMUSSEN, SHI, e DUMAN, 2002),

Compartilhamos da ideia de que o aumento da concentração de BDNF em áreas límbicas, como no hipocampo, por exemplo, durante a instalação do TEPT pode ocorrer devido a uma aquisição/consolidação de memória e/ou aprendizado que é dependente da ativação da via BDNF-TrkB, a qual regula a plasticidade sináptica necessária para a manutenção da memória de longo prazo (NATHAN et al., 2011), tal qual ocorre durante o TEPT (Figura 18).

Figura 18 - Esquema da sinalização de BDNF via receptores TrkB.



Fonte: Adaptação de AUTRY e MONTEGGIA, 2012.

Assim, podemos sugerir que a interação destas vias possa participar, ou mesmo possuem um papel importante para mimetizar em animais sintomas do TEPT de forma muito semelhante àqueles observados em humanos, tais como o medo condicionado e a dificuldade de extinguir memórias aversivas, bem como, a dificuldade cognitiva (ANDERO e RESSLER, 2012; JOHANSEN et al., 2011).

Ainda, acredita-se que o aumento de BDNF que ocorre nas primeiras horas após os choques elétricos, além de promover a consolidação da memória aversiva, também seja, pelo menos em parte, responsável pela hiperativação de algumas regiões límbicas durante o transtorno.

Paralelamente à dosagem de BDNF no hipocampo destes animais, verificamos também a concentração de CREB e p38 MAPK. Os nossos dados mostram que a concentração de CREB, uma e seis horas após a reexposição do animal ao aparato do choque, foi significativamente superior em relação aos grupos naive e controle. Assim, pode-se sugerir mais fortemente que, além de induzir uma alteração de âmbito comportamental (ansiedade, depressão e medo) o

modelo de indução de TEPT em questão é capaz de promover uma mudança plástica e organizacional no hipocampo destes animais uma vez que proteínas e fatores de transcrição estão sendo diretamente alterados pelo evento estressante imposto.

O aumento da concentração de CREB no hipocampo foi também observado por PLIAKAS et al., 2001, nesse estudo, o estresse induzido pela natação forçada em ratos fosforila (ativa) o elemento de resposta ao AMPc e promove no núcleo accumbes (área esta conhecida por desempenhar um papel crucial na resposta de recompensa/prazer e motivação) um aumento da CREB.

Esta resposta neuroadaptativa por sua vez tem efeitos funcionais no comportamento, onde o aumento na concentração do CREB no núcleo accumbes está correlacionado com o aumento do tempo de imobilidade no teste do nado forçado, um claro sinal de comportamento tipo depressivo (NESTLER e CARLEZON, 2006; WISE, 2008; CARLEZON e THOMAS, 2009).

Além de todas as alterações comportamentais e neuroquímicas descrita na literatura e observadas no presente trabalho, sabe-se, que o TEPT também está relacionado com alterações estruturais do cérebro (HEDGES e WOON, 2007).

Essas alterações foram observadas por meio de estudos de neuroimagem em indivíduos com TEPT, dando ênfase ao monitoramento principalmente do hipocampo destes indivíduos, o qual já se sabe ter uma participação ativa durante a instalação e manutenção do transtorno, uma vez que está diretamente envolvida na aprendizagem e nas memórias declarativas, contextuais e espaciais (BREWIN et al., 2007; BURGESS, MAGUIRE e O'KEEFE 2002; EICHENBAUM, OTTO e COHEN, 1992; PHILLIPS e LEDOUX, 1992; SQUIRE, STARK e CLARK, 2004).

Conforme demonstrado por Bremner e colaboradores (1995) há uma redução significativa do volume hipocampal em indivíduos portadores do TEPT, esta diminuição foi observada em indivíduos com experiência prévia em combate (veteranos de guerra) quando comparado a pessoas normais, sem TEPT e tampouco com experiências de combate. Desde então, muitos outros trabalhos passaram a reportar este achado, porém, não apenas em ex-combatentes, mas também em indivíduos adultos com TEPT relacionado a abuso sexual durante a infância (WOON, SOOD e HEDGES, 2010).

Em roedores, a redução da neurogênese hipocampal também é evidente após experimentos em que houve uma separação dos ratos neonatos da presença materna (LEE et al., 2001; MIRESCU et al.,

2004). Assim, sugere-se ainda que esta redução da neurogênese hipocampal tenha um importante papel na fisiopatologia da depressão (DUMAN e MONTEGGIA., 2006) fato este que vai ao encontro com os dados do presente estudo.

Neste momento, qualquer afirmação sobre a relação entre o aumento de BDNF observado e a diminuição do volume hipocampal relatado pela literatura seria mera hipótese, porém, consolidação de memória (aversiva), neuroproteção, ou mesmo um aumento da ativação dessa região nesses indivíduos figuram entre as principais justificativas para este aumento. Em relação à diminuição do volume do hipocampo, ainda carecemos de argumentos para melhor delinear-la.

Em função da hipótese de que esta gradativa redução do volume (e consequentemente massa) hipocampal ocorre devido a morte neuronal que é desencadeada pelos mecanismos intracelulares que controlam a apoptose, decidimos investigar se de fato esta morte neuronal ocorre pelas vias de morte celular programada, tendo, como passos iniciais deste processo a ativação das caspases 8 e 9.

Os resultados observados foram surpreendentes e contrários àqueles esperados, uma vez que ocorreu uma diminuição da concentração da caspase 8 no hipocampo destes animais 24 h após a exposição aos choques elétricos e imediatamente após a reexposição deles ao aparato gerador de choque.

Por outro lado, nossos resultados corroboram com dados da literatura os quais apontam que um aumento da concentração de BDNF está diretamente relacionado com uma diminuição da morte celular via caspase 3 (KLÖCKER et al., 2000), lembrando que esta última é *downstream* a caspase 8 e 9 e portanto dependente da concentração/ativação delas para promover a morte celular programada tal como conhecemos.

Cabe, portanto, inferir que se existe uma tentativa de neuroproteção do hipocampo, isto ocorre devido ao aumento expressivo de BDNF, ele por sua vez será capaz de controlar a morte neuronal que se dá via ativação das caspases, pelo menos durante as primeiras horas que sucedem o evento estressante.

Devido ao fato de termos observado um aumento das concentrações de BDNF no hipocampo dos animais (cujo objetivo aparente é a neuroproteção hipocampal) submetidos ao modelo de indução de TEPT, somados ao fato de que ocorreu uma diminuição da concentração da caspase 8 destes animais, sugerimos que a morte celular hipocampal que ocorre em indivíduos sabidamente portadores do TEPT, a qual resulta na atrofia do hipocampo, deve ocorrer por outros

mecanismos que não pela via das caspases, pelo menos quando analisados de forma aguda (poucas horas após a exposição ao evento aversivo).

Ainda cabe mencionar que diversos estudos têm sugerido a participação das vias das MAPK na morte celular (apoptose). Conforme apontado por Nakagami e colaboradores (2001), que estudou a relação entre p38 MAPK e a ativação das proteases (caspases) induzida por altas concentrações de D-glucose. Verificou-se neste estudo que o tratamento de culturas de células com altas doses de D-glucose promoveu um aumento significativo da fosforilação de p38 MAPK, sendo que o subsequente tratamento destas culturas com um inibidor específico de p38 (SB203580) reduziu significativamente a morte celular induzida pela alta concentração de D-glucose.

A investigação da participação da p38 no aumento da morte celular por apoptose também foi o foco de estudo de Genaro e colaboradores (2013). Neste trabalho verificou-se o papel do ácido retinóico (RA) no que diz respeito a indução de apoptose e diferenciação durante o desenvolvimento de células da retina. Para tanto suplementou-se culturas de células da retina de ratos com RA com e sem ácido docosahexaenoico (DHA) que é um fator de sobrevivência celular.

No referido estudo observou-se que no dia 0, ou seja, depois do primeiro tratamento das culturas com RA ocorreu um significativo aumento da apoptose de fotorreceptores e concomitantemente um aumento da fosforilação de p38, quando esta última foi seletivamente inibida pelo SB203580 verificou-se uma prevenção da morte celular (apoptose) induzida pelo RA.

Assim, os dados obtidos no presente estudo parecem estar de acordo com o que a literatura vem preconizando nos últimos anos, uma vez que a exposição dos animais ao estímulo elétrico foi capaz de promover uma diminuição da concentração de p38 e da via iniciadora da morte celular programada (caspase 8) no hipocampo, sugerindo que essa via de sinalização (p38 MAPK) possui um papel importante na morte celular no hipocampo dos animais com TEPT quando avaliados algumas horas após a exposição aos estímulos elétricos.

7 CONCLUSÃO

Concluimos, com o presente estudo, que a metodologia empregada com o objetivo de induzir em camundongos um quadro semelhante àquele evidenciado em humanos portadores do TEPT foi eficiente, pois mimetizou de forma fiel as alterações tanto de âmbito comportamental quanto bioquímicas que comumente estão atrelados ao transtorno em humanos, bem como foi capaz de dar uma menção da proporção destas alterações que estão atreladas a eventos extremamente aversivos, resultando em novos conhecimentos acerca deste transtorno sendo que alguns deles não haviam até então sido relatados pela literatura.

Sabendo da relevância de se pesquisar esse transtorno psiquiátrico, o presente estudo surge com novas perspectivas para o estudo do TEPT, uma vez que ferramentas de estudo eficientes e fidedignas são fundamentais para o conhecimento contínuo e aplicado a esta área

8 PERSPECTIVAS

- Utilizar outros estímulos estressantes, mais intensos e por períodos mais longos de tempo;
- Avaliar a expressão de proteínas e morte celular em outras áreas encefálicas além do hipocampo;
- Avaliar a participação do cortisol após a aplicação do modelo de indução de TEPT proposto;
- Implementar testes para avaliação da agressividade dos animais submetidos ao modelo;
- Avaliar o perfil nociceptivo dos animais submetidos ao modelo de indução de TEPT.

.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, O.; YAMASUE, H.; KASAI, K.; YAMADA, H.; AOKI, S.; IWANAMI, A.; OHTANI, T.; MASUTANI, Y.; KATO, N.; OHTOMO, K. Voxel-based diffusion tensor analysis reveals aberrant anterior cingulum integrity in posttraumatic stress disorder due to terrorism. **Psychiatry Res.** v. 146, p. 231–242. 2006.

ACHESON, A.; CONOVER, J. C.; FANDL, J. P.; DECHIARA, T. M.; RUSSELL, M.; THADANI, A.; SQUINTO, S. P.; YANCOPOULOS, G. D.; LINDSAY, R. M. "A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death". **Nature.** v. 374, p. 450–3. 1995.

American Psychology Association (2000). Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. American Psychiatric Association, Washington, DC.

ANDERO, R.; RESSLER, K. J. Fear extinction and BDNF: Translating animal models of PTSD to the clinic. **Genes, Brain and Behavior.** v. 1, p. 503–512. 2012.

ANDREW, N. M. S.; KAY R. B. S.; DEBORAH, B. B. S.; RICH, M. B. S.; MARTHA O'BRIEN, PH. D.; TERRY, RISS, PH. D. Detect caspase-8 and -9 activities using the caspase-glo™ assays. **Cell Notes Issue.** v. 8. 2004.

ANKUR, J.; MAHESH, R.; BHATT, S. Anxiolytic-like effect of etazolate, a type 4 phosphodiesterase inhibitor in experimental models of anxiety. **Indian J. Exp. Biol.** v. 51, p. 444-9. 2013.

AUTRY, A. E.; MONTEGGIA, L. M. Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders. **Pharmacol Rev.** v. 64, p. 238-58. 2012.

AZMITIA, E. C.; SEGAL, M. An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. **J. Comp. Neurol.** v. 179, p. 641–67. 1978.

BACHMANN, A. W.; SEDGLEY, T. L.; JACKSON, R. V.; GIBSON, J. N.; YOUNG, R. M.; TORPY, D. J. Glucocorticoid receptor polymorphisms and post-traumatic stress disorder. **Psychoneuroendocrinology**. v. 30, p. 297–306. 2005.

BALE, T. L.; VALE, W. W. CRF and CRF receptors: role in stress responsivity and other behaviors. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** v. 44, p. 525–557. 2004.

BAO, Q.; SHI, Y. The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. **Cell Death Differ.** v. 14, p. 56–65, 2007.

BELZUNG, C.; PHILIPPOT, P. Anxiety from a phylogenetic perspective: is there a qualitative difference between human and animal anxiety? **Neural Plast.** 2007, 59676

BINDER, D. K.; SCHARFMAN, H. E. "Brain-derived Neurotrophic Factor". **Growth Factors**. v. 22, p. 123–31. 2004.

BINDER, E. B.; BRADLEY, R.G.; LIU, W.; EPSTEIN, M. P.; DEVEAU, T.C.; MERCER, K. B.; TANG, Y.; GILLESPIE, C. F.; HEIM, C. M.; NEMEROFF, C. B.; SCHWARTZ, A.C.; CUBELLS, J.F.; RESSLER, K. J. Association of FKBP5 polymorphisms and childhood abuse with risk of posttraumatic stress disorder symptoms in adults. **Jama**. v. 299, p. 1291–1305. 2008.

BJERRUM, O. J.; HEEGAARD, N.H.H. CRC handbook of immunoblotting of proteins, vol. I. **CRC Press**. 1988.

BOBINSKI, F.; MARTINS, D. F.; BRATTI, T.; MAZZARDO-MARTINS, L.; WINKELMANN-DUARTE, E. C.; GUGLIELMO, L. G.; SANTOS, A. R. Neuroprotective and neuroregenerative effects of low intensity aerobic exercise on sciatic nerve crush injury in mice. **Neuroscience**, v.194, p 337–348. 2011.

BRAS, M.; MILUNOVIĆ, V.; BOBAN, M.; BRAJKOVIĆ, L.; BENKOVIĆ, V.; DORDEVIĆ, V.; POLASEK, O. Quality of life in Croatian Homeland war (1991-1995) veterans who suffer from post-traumatic stress disorder and chronic pain. **Health Qual Life Outcomes**. v. 29, p. 9-56. 2011.

BREWIN, C. R.; KLEINER, J. S.; VASTERLING, J. J.; FIELD, A. P. Memory for emotionally neutral information in posttraumatic stress disorder: a meta-analytic investigation. **J. Abnorm. Psychol.** v. 116, p. 448–63. 2007.

BREMNER, J. D.; RANDALL, P.; SCOTT, T. M.; BRONEN, R. A.; SEIBYL, J. P.; SOUTHWICK, S. M.; DELANEY, R. C.; McCARTHY, G.; CHARNEY, D. S.; INNIS, R. B. MRI-based measurement of hippocampal volume in patients with combat-related posttraumatic stress disorder. **Am. J. Psychiatry.** v. 152, p. 973-81, 1995.

BRUCHAS, M.R.; LAND, B. B.; CHAVKIN, C. The dynorphin/kappa opioid system as a modulator of stress-induced and pro-addictive behaviors. **Brain Res.** v. 1314, p. 44–55. 2010.

BURGESS, N.; MAGUIRE, E. A.; O'KEEFE, J. The human hippocampus and spatial and episodic memory. **Neuron.** v. 35, p. 625–41. 2002.

CARLEZON, W. A JR.; THOMAS, M. Biological substrates of reward and aversion: a nucleus accumbens activity hypothesis. **Neuropharmacology.** v. 56, p. 122–132. 2009.

CHANG, W. K.; YANG, K. D.; CHUANG, H.; JAN, J. T.; SHAI, M. F. Glutamine protects activated human T cells from apoptosis by up-regulating glutathione and Bcl-2 levels. **Clin. Immunol. Immunopathol.** v. 104, p. 151–160. 2002.

COHEN, G. M. Caspases: the executioners of apoptosis. **Biochem J.** v. 326, p. 1–16, 1997.

CORDOVA, F.M.; RODRIGUES, A.L.; GIACOMELLI, M.B.; OLIVEIRA, C. S.; POSSER, T.; DUNKLEY, P.R.; LEAL, R.B. Lead stimulates ERK1/2 and p38MAPK phosphorylation in the hippocampus of immature rats. **Brain Res.** v. 998, p. 65–72. 2004.

COSTA, A. P.; TRAMONTINA, A. C.; BIASIBETTI, R.; BATASSINI, C.; LOPES, M. W.; WARTCHOW, K. M.; BERNARDI, C.; TORTORELLI, L. S.; LEAL, R. B.; GONÇALVES, C. A. Neuroglial alterations in rats submitted to the okadaic acid-induced model of dementia. **Behav. Brain Res.** v. 226, p.420-7. 2012.

DAVIDSON, J. R.; STEIN, D.J.; SHALEV, A.Y.; YEHUDA, R. Posttraumatic stress disorder: acquisition, recognition, course, and treatment. **J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.**, v. 16, p. 135–147. 2004.

DENNIS, N. A.; CABEZA, R.; NEED, A. C.; WATERS-METENIER, S.; GOLDSTEIN, D. B.; LABAR, K. S. Brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism and hippocampal activation during episodic encoding and retrieval tasks. **Hippocampus**, v. 9, p. 980-9. 2010.

DUMAN, R. S.; MONTEGGIA, L. M. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. **Biol. Psychiatry**. v. 59, p. 1116–27. 2006.

EICHENBAUM, H.; OTTO, T.; COHEN, N. J. The hippocampus what does it do? **Behav. Neural Biol.** v. 57, p. 2-36. 1992.

ETKIN, A.; WAGER, T.D. Functional neuroimaging of anxiety: a meta-analysis of emotional processing in PTSD, social anxiety disorder, and specific phobia. **Am. J. Psychiatry**, v. 164, p. 1476–1488. 2007.

FRANCATI, V.; VERMETTEN, E.; BREMNER, J. D. Functional neuroimaging studies in posttraumatic stress disorder: review of current methods and findings. **Depress. Anxiety**. v. 24, p. 202–218. 2007.

GELDERBLOM, M.; EMINEL, S.; HERDEGEN, T.; WAETZIG, V. c-Jun Nterminal kinases (JNKs) and the cytoskeleton functions beyond neurodegeneration. **Int. J. Dev. Neurosci.** v. 22, p. 559–564. 2004.

GENARO, P.; SIMÓN, M. V.; ROTSTEIN, N. P.; POLITI L. E. Retinoic Acid Promotes Apoptosis and Differentiation in Photoreceptors by Activating the P38 MAP Kinase Pathway. **The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Inc.** v. 54, p. 3143-3156. 2013.

GILLESPIE, C.F.; BRADLEY, B.; MERCER, K.; SMITH, A. K.; CONNEELY, K.; GAPEN, M.; WEISS, T.; SCHWARTZ, A. C.; CUBELLS, J. F.; RESSLER, K. J. Trauma exposure and stress-related disorders in inner city primary care patients. **Gen. Hosp. Psychiatry**, v. 31, p. 505–514. 2009.

GOLUB, Y.; KALTWASSER, S. F.; MAUCH, C. P.; HERRMANN, L.; SCHMIDT, U.; HOLSBOER, F.; CZISCH, M.; WOTJAK, C. T. Reduced hippocampus volume in the mouse model of Posttraumatic Stress Disorder. **Journal of Psychiatric Research**. v. 45, p. 650-659. 2011.

GRABE, H. J.; SPITZER, C.; SCHWAHAN, C.; MARCINEK, A.; FRAHNOW, A.; BARNOW, S.; LUCHT, M.; FREYBERGER, H. J.; JOHN, U.; WALLASCHOFSKI, H.; VOLZKE, H.; ROSSKOPF, D. Serotonin transporter gene (SLC6A4) promoter polymorphisms and the susceptibility to posttraumatic stress disorder in the general population. **Am. J. Psychiatry**, v. 166, p. 926–933. 2009.

GRAZIELE VIDOTO CERVANTES, FABIANA SCHUELTER-TREVISOL, LUCIANO KURTZ JORNADA. Post-traumatic stress disorder in victims of domestic violence. **Rev Bras Clin Med**. v. 11, p. 145-9. 2013.

HAUCK, S.; KAPCZINSKI, F.; ROESLER, R.; DE MOURA SILVEIRA, E. JR.; MAGALHÃES, P. V.; KRUEL, L. R. Serum brain-derived neurotrophic factor in patients with trauma psychopathology. **Prog. Neuropsychopharmacol and Biol. Psychiatry**. v. 34, p. 459–462. 2010.

HEDGES, D. W, WOON, F. L. Structural magnetic resonance imaging findings in posttraumatic stress disorder and their response to treatment: a systematic review. **Curr. Psychiatry Rev**. v. 3, p. 85–93. 2007.

HEIMER, L.; VAN HOESEN, G.W. The limbic lobe and its output channels: implications for emotional functions and adaptive behavior. **Neurosci. Biobehav. Rev**. v. 30, p. 126–147. 2006.

HUANG, E. J.; REICHARDT, L. F. "Neurotrophins: Roles in Neuronal Development and Function". **Annu. Rev. Neurosci**. v. 24, p. 677–736. 2001.

HUOT, R. L; THRIVIKRAMAN, K. V; MEANEY, M. J; PLOTSKY, P. M. Development of adult ethanol preference and anxiety as a consequence of neonatal maternal separation in Long Evans rats and reversal with antidepressant treatment. **Psychopharmacology**. v. 158, p. 366–73. 2001.

IZQUIERDO, I. **Memória**. Ed. Artmed, Porto Alegre – RS, 2002.

IZQUIERDO, I.; MCGAUGH, J. L. Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. **Behav. Pharmacol.** v. 11, p. 517-534. 2000.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiol Learn Mem.** v. 68, n. 3, p. 285-316. 1997.

JARSKOG, L. F.; SELINGER, E. S.; LIEBERMAN, J. A.; GILMORE, J. H. Apoptotic proteins in the temporal cortex in schizophrenia: high Bax/Bcl-2 ratio without caspase-3 activation. **Am. J. Psychiatry.** v. 161, p. 109–115. 2004.

JOHANSEN, J. P.; CAIN, C. K.; OSTROFF, L. E.; LEDOUX, J. E. Molecular mechanisms of fear learning and memory. **Cell.** v. 147, p. 509–524. 2011.

JONES, K. R.; REICHARDT, L. F. "Molecular cloning of a human gene that is a member of the nerve growth factor family". **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v. 87, p. 8060–4. 1990.

JOVANOVIĆ, T.; NORRHOLM, S. D.; FENNELL, J. E.; KEYES, M.; FIALLOS, A. M.; MYERS, K. M.; DAVIS, M.; DUNCAN, E. J. Posttraumatic stress disorder may be associated with impaired fear inhibition: relation to symptom severity. **Psychiatry Res.** v. 167, p. 151–160. 2009.

JOVANOVIĆ, T.; RESSLER, K.J. How the neurocircuitry and genetics of fear inhibition may inform our understanding of PTSD. **Am. J. Psychiatry,** v. 167, p. 648–662. 2010.

KLÖCKER, N.; KERMER, P.; WEISHAUP, J. H.; LABES, M.; ANKERHOLD, R.; BÄHR, M. Brain-derived neurotrophic factor-mediated neuroprotection of adult rat retinal ganglion cells in vivo does not exclusively depend on phosphatidylinositol-3'-kinase/protein kinase B signaling. **J. Neurosci.** v. 20, p. 6962-6967. 2000.

KOOB, G. F. A role for brain stress systems in addiction. **Neuron**. v. 59, p. 11–34. 2008.

KONOPLEVA, M.; KONOPLEV, S.; HU, W.; ZARITSKEY, A. Y.; AFANASIEV, B. V.; ANDREEFF, M. Stromal cells prevent apoptosis of AML cells by up-regulation of anti-apoptotic proteins. **Leukemia**. v. 16, p. 1713–1724. 2002.

KOREN, D.; NORMAN, D.; COHEN, A.; BERMAN, J.; KLEIN, E. M. Increased PTSD risk with combat-related injury: a matched comparison study of injured and uninjured soldiers experiencing the same combat events. **Am. J. Psychiatry**. v. 162, p. 276–282. 2005.

KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. The molecular neurobiology of depression. **Nature**. v. 455, p. 894–902. 2008.

LADD, C. O.; HUOT, R. L.; THRIVIKRAMAN, K. V.; NEMEROFF, C. B.; MEANEY, M. J.; PLOTSKY, P. M. Long-term behavioral and neuroendocrine adaptations to adverse early experience. **Prog. Brain Res.** v. 22, p. 81–103. 2000.

LANG, P. J.; DAVIS, M.; OHMAN, A. Fear and anxiety: animal models and human cognitive psychophysiology. **J. Affect. Disord.** v. 61, p. 137–159. 2000.

LANIUS, R. A.; BLUHM, R.; LANIUS, U.; PAIN, C. A review of neuroimaging studies in PTSD: heterogeneity of response to symptom provocation. **J. Psychiatr. Res.** v. 40, p. 709–729. 2006.

LANZI, C.; CASSINELLI, G.; CUCCURU, G.; SUPINO, R.; ZUCO, V.; FERLINI, C.; SCAMBIA, G.; ZUNINO, F. Cell cycle checkpoint efficiency and cellular response to paclitaxel in prostate cancer cells. **Prostate**. v. 48, p. 254–264. 2001.

LEE, H. J.; KIM, J. W.; YIM, S. V.; KIM, M. J.; KIM, S. A.; KIM, Y. J. Fluoxetine enhances cell proliferation and prevents apoptosis in dentate gyrus of maternally separated rats. **Mol. Psychiatry**. v. 6, p. 725–8. 2001.

LIPOV, E.; KELZEMBERG, B. Sympathetic system modulation to treat post-traumatic stress disorder (PTSD): A review of clinical evidence and neurobiology. **Journal of Affective Disorder**, v. 142, p. 1-5. 2012.

LONSDORF, T. B.; WEIKE, A. L.; GOLKAR, A.; SCHALLING, M.; HAMM, A. O.; OHMAN, A. Amygdala-dependent fear conditioning in humans is modulated by the BDNFval66met polymorphism. **Behav. Neuroscience**, v. 124, p. 9–15. 2010;

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A.L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** v. 193, p. 265–75. 1951.

MAHAN, A. L.; RESSLER, K.J. Fear conditioning, synaptic plasticity and the amygdala: implications for posttraumatic stress disorder. **Trends Neurosci.** v. 35, p. 24–35. 2012.

MAISONPIERRE, P. C.; LE BEAU, M. M.; ESPINOSA, R.; IP N.Y.; BELLUSCIO, L.; DE LA MONTE S. M.; SQUINTO, S.; FURTH, M. E.; YANCOPOULOS, G. D.; "Human and rat brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3: gene structures, distributions, and chromosomal localizations". **Genomics.** v. 10, p. 558–68. 1991.

MA-LI WONG AND JULIO LICINIO Research and treatment approaches to depression. **Neuroscience.** v.2, p. 343-351. 2001.

MATTER-REISSMANN, U. B.; FORTE, P.; SCHNEIDER, M. K.; FILGUEIRA, L.; GROSCURTH, P.; SEEBACH, J. D. Xenogeneic human NK cytotoxicity against porcine endothelial cells is perforin/granzyme B dependent and not inhibited by Bcl-2 overexpression. **Xenotransplantation.** v. 9, p. 325–327. 2002.

MCLAUGHLIN, K. A.; CONRON, K. J.; KOENEN, K. C.; GILMAN, S. E. Childhood adversity, adult stressful life events, and risk of past-year psychiatric disorder: a test of the stress sensitization hypothesis in a population-based sample of adults. **Psychol. Med.** v. 40, p. 1647–1658. 2010.

McGAUGH, J. L. Time-dependent processes in memory storage. **Science.** v. 153, p. 1351-1358. 1966.

MEHTA, D.; GONIK, M.; KLENGEL, T.; REX-HAFFNER, M.; MENKE, A.; RUBEL, J.; MERCER, K. B.; PUTZ, B.; BRADLEY, B.; HOLSBOER, F. Using polymorphisms in FKBP5 to define biologically distinct subtypes of posttraumatic stress disorder: evidence from endocrine and gene expression studies. **Arch. Gen. Psychiatry.** v. 68, p. 901–910. 2011.

MILLIKEN, C. S.; AUCHTERLONIE, J. L.; HOGE, C. W. Longitudinal assessment of mental health problems among active and reserve component soldiers returning from the Iraq war. **Jama.** v. 18, p. 2141-8. 2007.

MIRESCU, C.; PETERS, J. D.; GOULD, E. Early life experience alters response of adult neurogenesis to stress. **Nat. Neurosci.** v. 7, p. 841–6. 2004.

MITRA, R.; JADHAV, S.; MCEWEN, B. S.; VYAS, A.; CHATTARJI, S. Stress duration modulates the spatiotemporal patterns of spine formation in the basolateral amygdala. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.102, p. 9371–9376. 2005.

MOELLER, B. T.; KELTNER, J. S. Pain and post traumatic stress disorder e Review of clinical and experimental evidence. **Neuropharmacology.** v. 62, n. 2, p. 586-97. 2012.

NAKAGAMI, H.; MORISHITA, R.; YAMAMOTO, K.; YOSHIMURA, S.; TANIYAMA, Y.; AOKI, M.; MATSUBARA, H.; KIM, S.; KANEDA, Y.; OGIHARA, T. Phosphorylation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Downstream of Bax-Caspase-3 Pathway Leads to Cell Death Induced by High D-Glucose in Human Endothelial Cells. **Diabetes.** v, 50, p. 1472-1481. 2001.

NATHAN, P. J.; COBB, S. R.; LU, B.; BULLMORE, E. T.; DAVIES, C. H. Studying synaptic plasticity in the human brain and opportunities for drug discovery. **Current Opinion in Pharmacology.** v. 11, p. 540–548. 2011.

NESTLER, E. J.; CARLEZON, W. A. JR. The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. **Biol. Psychiatry.** v. 59, p. 1151–1159. 2006.

OLIVEIRA, C. S.; RIGON, A. P.; LEAL, R. B.; ROSSI, F. M. The activation of ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinases is dynamically regulated in the developing rat visual system. **Int. J. Dev. Neurosci.** v. 26, p. 355–62. 2008.

OVERSTREET, D. H; COMMISSARIS, R. C; DE LA GARZA 2ND, R; FILE, S. E; KNAPP, D. J; SEIDEN, L. S. Involvement of 5-HT1A receptors in animal tests of anxiety and depression: evidence from genetic models. **Stress.** v.6, p. 101–10. 2003.

PANARETAKIS, T.; POKROVSKAJA, K.; SHOSHAN, M. C.; GRANDÉR, D. Activation of Bak, Bax, and BH3-only proteins in the apoptotic response to doxorubicin. **J. Biolumin Chemilumin.** v. 277, p. 44317–44326. 2002

PAPE, H.C.; PARE, D. Plastic synaptic networks of the amygdala for the acquisition, expression, and extinction of conditioned fear. **Physiol. Rev.** v. 90, p. 419–463. 2010.

PETTERSSON, F.; DALGLEISH, A. G.; BISSONNETTE, R. P.; COLSTON, K. W. Retinoids cause apoptosis in pancreatic cancer cells via activation of RAR-gamma and altered expression of Bcl-2/Bax. **Br. J. Cancer** v. 87, p. 555–561. 2002.

PHILBERT, J.; PICHAT, P.; BEESKÉ, S.; DECOBERT, M.; BELZUNG, C.; GRIEBEL, G. Acute inescapable stress exposure induces long-term sleep disturbances and avoidance behavior: a mouse model of post-traumatic stress disorder (PTSD). **Behav. Brain Res.** v. 221, p. 149–54. 2011.

PHILLIPS, R. G.; LEDOUX, J. E. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. **Behav. Neurosci.** v. 106, p. 274–85. 1992.

PLIAKAS, A. M.; CARLSON, R.; NEVE, R. L.; KONRADI, C.; NESTLER, E. J.; CARLEZON, W. A. JR. Altered responsiveness to cocaine and increased immobility in the forced swim test associated with elevated cAMP response element binding protein expression in nucleus accumbens. **J. Neurosci.** v. 21, p. 7397–7403. 2001.

PIÑEYRO, G; BLIER, P. Autoregulation of serotonin neurons: role in antidepressant drug action. **Pharmacol Rev.** v. 51, p. 533–91. 1999.

POLESEL, D. N.; FUKUSHIRO, D. F.; ANDERSEN, M. L.; NOZOE, K. T.; MÁRI-KAWAMOTO, E.; SAITO, L. P.; CARVALHO, F. R.; ALVARENGA, T. A.; FREITAS, D.; TUFIK, S.; FRUSSA-FILHO, R.; LANARO, R.; COSTA, J. L.; TAVARES, M. F. Anxiety-like effects of meta-chlorophenylpiperazine in paradoxically sleep-deprived mice. **Prog. Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry.** v. 49, p. 70-7. 2014.

PORSOLT, R. D; Animal model of Depression. **Biomedicine.** v. 30, p. 139-140. 1979.

PYNNOS, R. S.; RITZMANN, R. F.; STEINBERG, A.M.; GOENJIAN, A.; PRISECARU, I. A behavioral animal model of posttraumatic stress disorder featuring repeated exposure to situational reminders. **Biol. Psychiatry.** v. 39, p. 129-34. 1996.

RASMUSSEN, A. M.; SHI, L.; DUMAN, R. Down regulation of BDNF mRNA in the hippocampal dentate gyrus after re-exposure to cues previously associated with footshock. **Neuropsychopharmacology.** v. 27, p. 133–142. 2002.

REHNI, A. K.; SINGH, T. G.; BEHL, N.; ARORA, S. Possible Involvement of Ubiquitin Proteasome System and Other Proteases in Acute and Delayed Aspects of Ischemic Preconditioning of Brain in Mice. **Biol. Pharm. Bull.** v. 33, p. 1953—1957. 2010.

ROGERS, M. A.; YAMASUE, H.; ABE, O.; YAMADA, H.; OHTANI, T.; IWANAMI, A.; AOKI, S.; KATO, N.; KASAI, K. Smaller amygdala volume and reduced anterior cingulate gray matter density associated with history of posttraumatic stress disorder. **Psychiatry Res.** v. 174, p. 210–216. 2009.

SACHARCZUK, M.; JUSZCZAK, G.; SWIERGIEL, A. H.; JASZCZAK, K.; LIPKOWSKI, A. W.; SADOWSKI, B. Alcohol reverses depressive and pronociceptive effects of chronic stress in mice with enhanced activity of the opioid system. **Acta Neurobiol. Exp.** v. 69, p. 459–468. 2009.

SAREEN, J.; COX, B. J.; STEIN, M. B. Physical and mental comorbidity, disability and suicidal behavior associated with posttraumatic stress disorder in a large community sample. **Psychosom. Med.** v. 69, p. 242–248. 2007.

SHUMYATSKY, G. P.; MALLERET, G.; SHIN, R. M.; TAKIZAWA, S.; TULLY, K.; TSVETKOV, E.; ZAKHARENKO, S. S.; JOSEPH, J.; VRONSKAYA, S.; YIN, D.; SCHUBART, U. K.; KANDEL, E. R.; BOLSHAKOV, V. Y. Stathmin, a gene enriched in the amygdala, controls both learned and innate fear. **Cell** v. 123, p. 697–709. 2005.

SIBILLE, E.; HEN, R. Serotonin (1A) receptors in mood disorders: a combined genetic and genomic approach. **Behav. Pharmacol.** v.12, p. 429–38. 2001.

SQUIRE, L. R.; STARK, C. E.; CLARK, R. E. The medial temporal lobe. **Annu Rev. Neurosci.** v. 27, p. 279–306. 2004.

SZCZYTKOWSKI, T. J. L.; LEBONVILLE, C. L.; LYSLE, D. T. Morphine prevents stress-enhanced fear learning. **Pharmacol. BiochemBehav.** v. 13. p. 672-7. 2012.

SUN, F.; AKAZAWA, S.; SUGAHARA, K.; KAMIHIRA, S.; KAWASAKI, E.; EQUCHI, K.; KOJI, T. Apoptosis in normal rat embryo tissues during early organogenesis: the possible involvement of Bax and Bcl-2. **Arch. Histol. Cytol.** v. 65, p. 145–157. 2002.

TILLI, C. M.; STAVAST-KOEY, A. J.; RAMAEKERS, F. C.; NEUMANN, H. A. Bax expression and growth behavior of basal cell carcinomas. **J. Cutan. Pathol.** v. 29, p. 79–87. 2002.

THORNBERRY, N. A.; LAZEBNIK, Y. Caspases: enemies within. **Science.** v. 281, p. 1312– 1316. 1998.

USUDA, J.; CHIU, S. M.; AZIZUDDIN, K.; XUE, L. Y.; LAM, M.; NIEMINEN, A. L.; OLEINICK, N. L. Promotion of photodynamic therapy-induced apoptosis by the mitochondrial protein Smac/DIABLO: dependence on Bax. **Photochem Photobiol.** v. 76, p. 217–223. 2002.

VAN WINGEN, G.; RIJKEMA, M.; FRANKE, B.; VAN EIJDHOVEN, P.; TENDOLKAR, I.; VERKES, R. J.; BUITELAAR, J.; FERNANDEZ, G. The brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism affects memory formation and retrieval of biologically salient stimuli. **Neuroimage**, v. 50, p. 1212–1218. 2010.

VILLANO, C. L.; ROSENBLUM, A.; MAGURA, S. Prevalence and correlates of posttraumatic stress disorder and chronic severe pain in psychiatric outpatients. **J Rehabil. Res. Dev.** v. 44, p. 167–177. 2007.

VERTES, R. P. A PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat. **J Comp Neurol.** v. 313, p. 643–68. 1991.

WANG, H.; ZUO, D.; HE, B.; QIAO, F.; ZHAO, M.; WU, Y. Conditioned fear stress combined with single-prolonged stress: a new PTSD mouse model. **Neuroscience res.** v. 73, p. 142–52. 2012.

WILCOX, H. C.; STORR, C. L.; BRESLAU, N. Posttraumatic stress disorder and suicide attempts in a community sample of urban american young adults. **Arch. Gen. Psychiatry**, v. 66, p. 305–311. 2009.

WISE, R. A. Dopamine and reward: the anhedonia hypothesis 30 years on. **Neurotoxicol Res.** v. 14, p. 169–183. 2008.

WONG, M.; LICINIO, J. Research and treatment approaches to depression. **Nature Reviews.** v. 2, p. 343–351. 2001.

WOON, F.L.; SOOD, S.; HEDGES, D.W. Hippocampal volume deficits associated with exposure to psychological trauma and posttraumatic stress disorder in adults: A meta-analysis. **Prog. Neuropsychopharmacol and Biol. Psychiatry.** v. 34, p. 1181–1188. 2010.

YAN, Q.; LIU, J. P.; LI, D. W. Apoptosis in lens development and pathology. **Differentiation.** v. 74, p. 195–211. 2006.

YAMADA, K.; NABESHIMA, T. "Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes". **J. Pharmacol. Sci.** v. 91, p. 267–70. 2003.

YAO, K.; TAN, J.; GU, W. Z.; YE, P. P.; WANG, K. J. Reactive oxygen species mediates the apoptosis induced by transforming growth factor beta(2) in human lens epithelial cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 354, p. 278–283. 2007.

YEHUDA, R.; LEDOUX, J. Response variation following trauma: a translational neuroscience approach to understanding PTSD. **Neuron.** v. 56, p. 19–32. 2007.

YEHUDA, R.; Post-traumatic stress disorder. **N. Engl. J. Med.** v. 346, p. 108–114. 2002.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain,** v.16, p.109-110. 1983.

ZHANG, L.; ZHOU, R.; LI, X.; URSANO, R. J.; LI, H. Stress-induced change of mitochondria membrane potential regulated by genomic and non-genomic GR signaling: a possible mechanism for hippocampus atrophy in PTSD. **Medical Hypotheses,** v. 66, p. 1205–8. 2006.