

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPIRITO SANTO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOQUÍMICA E FARMACOLOGIA**

**RAFAELLA VILA REAL BARBOSA**

**EFEITO DA PRIVAÇÃO DE SONO PARADOXAL E DO BLOQUEIO DA  
SÍNTESE DA CORTICOSTERONA SOBRE OS LIMIARES DA REAÇÃO DE  
DEFESA INDUZIDA PELA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DA MATÉRIA  
CINZENTA PERIAQUEDUTAL E COLÍCULO SUPERIOR**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**VITÓRIA**

**2015**

**RAFAELLA VILA REAL BARBOSA**

**EFEITO DA PRIVAÇÃO DE SONO PARADOXAL E DO BLOQUEIO DA  
SÍNTESE DA CORTICOSTERONA SOBRE OS LIMIARES DA REAÇÃO DE  
DEFESA INDUZIDA PELA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DA MATÉRIA  
CINZENTA PERIAQUEDUTAL E COLÍCULO SUPERIOR**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Farmacologia, do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia, Universidade Federal do Espírito Santo.

Orientador: Prof. Dr. Athelson Stefanon Bittencourt

VITÓRIA

2015

---

Rafaella Vila Real Barbosa, 1988.

Efeito da privação de sono paradoxal e do bloqueio da síntese da corticosterona sobre os limiares reação de defesa induzida pela estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal e colículo superior. [Vitória] 2015

xx, 76 p., 29,7 cm (UFES, M.Sc., Bioquímica e Farmacologia, 2015)

Dissertação, Universidade Federal do Espírito Santo, PPGBF.

---

1. Matéria cinzenta periaquedutal
  2. Pânico
  3. Privação de Sono Paradoxal
  4. Metirapona
  5. Corticosterona
-

**EFEITO DA PRIVAÇÃO DE SONO PARADOXAL E DO BLOQUEIO DA  
SÍNTESE DA CORTICOSTERONA SOBRE OS LIMIARES DA REAÇÃO DE  
DEFESA INDUZIDA PELA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DA MATÉRIA  
CINZENTA PERIAQUEDUTAL E COLÍCULO SUPERIOR**

**Rafaella Vila Real Barbosa**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Farmacologia.

Aprovada em 19/08/2015 por:

---

Prof. Dr. Athelson Stefanon Bittencourt – Orientador  
Departamento de Ciências Morfológicas

---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Ana Paula Santana de Vasconcellos Bittencourt –  
Co-orientadora Departamento de Ciências Fisiológicas, UFES

---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Vanessa Beijamini Harres  
Departamento de Ciências Farmacêuticas, UFES

---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Jeyce Willig Quintino dos Santos  
Departamento de Desportos, UFES

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

Vitória, agosto de 2015

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela força e perseverança que me guiaram até o presente momento. Aos meus pais, Luiz Carlos Manoel Barbosa e Leila Vila Real Barbosa, por tudo que me fizeram e pelo que ainda irão fazer, pelo apoio, conselhos, princípios, sem eles eu certamente não teria chegado até aqui.

Ao meu namorado, Samir Laguardia Silva, por ter estado ao meu lado e me apoiado sempre que precisei, por ter aturado todos meus momentos de estresse, ter você ao meu lado durante essa caminhada foi essencial, e sei que este será só o começo.

Ao meu professor e orientador Dr. Athelson Stefanon Bittencourt, por ter aceitado me orientar e me passar seus conhecimentos e conselhos que me fizeram crescer e amadurecer na pesquisa.

À minha co-orientadora Dr<sup>a</sup> Ana Paula Vasconcelos Bittencourt, pelos conselhos e ajuda na pesquisa.

Aos membros titulares da banca, pelo aceite em avaliar o meu trabalho.

Ao meu aluno de Iniciação científica, aluno da graduação de Biologia da UFES, Thiago Ouverney, pela dedicação na execução deste trabalho.

À minha amiga desde a época do pré-vestibular e companheira de laboratório, Laisa Barroso Ribeiro, pela amizade, companheirismo, conselhos, dentre tantas outras coisas que nem sei como agradecer, você é muito especial na minha vida.

Aos amigos de laboratório, Randri e Martielo, agradeço pelo companheirismo e amizade.

À Claudia Torres, então Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, agradeço pelas inúmeras vezes em que me ajudou, com estatística, histologia, gráficos e mais gráficos! Sua ajuda e conselho foram essenciais para este trabalho.

Ao LABIOM, pelo auxílio nas dosagens bioquímicas.

Ao Biotério Central e seus funcionários pelo fornecimento dos animais para o presente estudo.

Aos Laboratórios de Histologia Molecular e Imunoistoquímica (LHMI) pelo auxílio nos cortes histológicos.

Aos professores do programa de Pós-graduação em Bioquímica e Farmacologia, agradeço por terem passado seus conhecimentos e conselhos, sendo determinante para uma boa formação.

À FAPES, pelo apoio financeiro à minha pesquisa.

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                 |  |
|-----------------|--|
| ACTH            | Hormônio Adrenocorticotrófico                  |
| AP              | Ataque de Pânico                               |
| APA             | Associação de Psiquiatria Americana            |
| CORT            | Corticosterona                                 |
| CO <sub>2</sub> | Dióxido de Carbono                             |
| CS              | Colículo Superior                              |
| CRH             | Hormônio liberador de Corticotrofina           |
| CTB             | Grupo Controle com Bloqueio de Metirapona      |
| CTR             | Grupo Controle                                 |
| DEF             | Defecação                                      |
| DSM             | Diagnostic Statscal Manual of Mental Disorders |
| EDTA            | Ácido Etilenodiamino tetra-acético             |
| EEG             | Eletroencefalograma                            |
| EI              | Estimulação Intracraniana                      |
| EMG             | Eletromiograma                                 |
| EPM             | Erro Padrão da Média                           |
| EXO             | Exoftalmia                                     |

|                 |  |
|-----------------|--|
| GLP             | Galope   |
| HHA             | Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal                             |
| HPLC            | High Performance/Pressure Liquide Chromatography             |
| IMO             | Imobilidade  |
| I <sub>50</sub> | Intensidade Mediana  |
| IP              | Intraperitoneal  |
| MCPD            | Matéria Cinzenta Periaquedutal Dorsal                        |
| MET             | Metirapona   |
| MIC             | Micção   |
| NMDA            | N-Metil-D-Aspartato  |
| NREM            | Sono não REM   |
| PAG             | Periaqueductal Gray  |
| PET             | Tomografia por Emissão Positrônica                           |
| P48             | Sessão de estimulação após 48h de privação de sono paradoxal |
| P96             | Sessão de estimulação após 96h de privação de sono paradoxal |
| PRB             | Grupo Privação com Bloqueio de Metirapona                    |
| PRL             | Prolactina   |
| PRV             | Grupo Privação   |



|                 |   |
|-----------------|---|
| PS              | Privação de Sono  |
| PSP             | Privação de Sono Paradoxal  |
| R48             | Sessão de estimulação após 48h de recuperação da privação de sono paradoxal |
| R96             | Sessão de estimulação após 96h de recuperação da privação de sono paradoxal |
| REM             | <i>Rapid Eye Movement</i>   |
| SP              | Sono Paradoxal  |
| TAG             | Transtorno de Ansiedade Generalizada  |
| TP              | Transtorno do Pânico  |
| TRI             | Sessão de Estimulação Triagem   |
| $\Delta I_{50}$ | Variação da Intensidade Mediana   |
| $X_2$           | Chi-quadrado  |
| $\mu A$         | Microampère   |
| 5-HT            | Serotonina  |
| ACTH            | Hormônio Adrenocorticotrófico   |
| AP              | Ataque de Pânico  |
| APA             | Associação de Psiquiatria Americana   |
| CORT            | Corticosterona  |
| CO <sub>2</sub> | Dióxido de Carbono  |
| CS              | Colículo Superior   |
| CRH             | Hormônio liberador de Corticotrofina  |

|                 |  |
|-----------------|--|
| CTB             | Grupo Controle com Bloqueio de Metirapona                    |
| CTR             | Grupo Controle   |
| DEF             | Defecação  |
| DSM             | Diagnostic Statistical Manual of mental disorders            |
| EDTA            | Ácido Etilenodiamino tetra-acético                           |
| EEG             | Eletroencefalograma  |
| EI              | Estimulação Intracraniana                                    |
| EMG             | Eletromiograma   |
| EXO             | Exoftalmia   |
| GLP             | Galope   |
| HHA             | Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal                             |
| HPLC            | High Performance/Pressure Liquide Chromatography             |
| IMO             | Imobilidade  |
| I <sub>50</sub> | Intensidade Mediana  |
| IP              | Intraperitoneal  |
| MCPD            | Matéria Cinzenta Periaqueductal dorsal                       |
| MET             | Metirapona   |
| MIC             | Micção   |
| NMDA            | N-Metil-D-aspartato  |
| NREM            | Sono não REM   |
| PAG             | Periaqueductal Gray  |
| PET             | Tomografia por emissão positrônica                           |
| P48             | Sessão de estimulação após 48h de privação de sono paradoxal |
| P96             | Sessão de estimulação após 96h de privação de sono paradoxal |
| PRB             | Grupo Privação com Bloqueio de Metirapona                    |

|                 |   |
|-----------------|---|
| PRL             | Prolactina  |
| PRV             | Grupo Privação  |
| PS              | Privação de Sono  |
| PSP             | Privação de Sono Paradoxal  |
| RGs             | Receptores de Glicocorticoides  |
| RMs             | Receptores de Mineralocorticoides   |
| R48             | Sessão de estimulação após 48h de recuperação da privação de sono paradoxal |
| R96             | Sessão de estimulação após 96h de recuperação da privação de sono paradoxal |
| REM             | <i>Rapid Eye Movement</i>   |
| SP              | Sono Paradoxal  |
| TAG             | Transtorno de Ansiedade generalizada  |
| TP              | Transtorno do Pânico  |
| TRI             | Sessão de Estimulação Triagem   |
| $\Delta I_{50}$ | Variação da intensidade mediana   |
| $X_2$           | Chi-quadrado  |
| $\mu A$         | Microampère   |
| 5-HT            | Serotonina  |

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Organização colunar rostro-caudal da MCPD.

Figura 2: Estágios do sono.

Figura 3: Representação esquemática dos circuitos ativados em resposta ao estresse.

Figura 4: Diagrama esquemático da regulação do hipocampo e amígdala sobre o eixo HHA

Figura 5: Rato dez dias após a cirurgia de implantação dos eletrodos intracranianos.

Figura 6: Linha temporal do protocolo experimental.

Figura 7: Montagem da estimulação elétrica intracraniana.

Figura 8: Caixa de privação de sono paradoxal padrão.

Figura 9: Caixa recuperação da privação de sono paradoxal.

Figura 10: Localização dos eletrodos nos grupos experimentais.

Figura 11: Valores de intensidade mediana ( $I_{50}$ ) obtidos para os comportamentos defensivos nas distintas sessões de estimulação elétrica da MCPD e CS no grupo CTR.

Figura 12. Curvas intensidade-resposta: Efeitos da PSP sobre os limiares das respostas de defesa induzidas pela estimulação elétrica da MCPD e CS no grupo CTR.

Figura 13: Valores de intensidade mediana ( $I_{50}$ ) obtidos para os comportamentos defensivos nas distintas sessões de estimulação elétrica da MCPD e CS no grupo PRV

Figura 14. Curvas intensidade-resposta: Efeitos da PSP sobre os limiares das respostas de defesa induzidas pela estimulação elétrica da MCPD e CS no grupo PRV.

Figura 15: Valores de intensidade mediana ( $I_{50}$ ) obtidos para os comportamentos defensivos nas distintas sessões de estimulação elétrica da MCPD e CS no grupo CTB

Figura 16: Curvas intensidade-resposta: Efeitos da PSP sobre os limiares das respostas de defesa induzidas pela estimulação elétrica da MCPD e CS no grupo CTB.

Figura 17: Valores de intensidade mediana ( $I_{50}$ ) obtidos para os comportamentos defensivos nas distintas sessões de estimulação elétrica da MCPD e CS no grupo PRB.

Figura 18: Curvas intensidade-resposta: Efeitos da PSP sobre os limiares das respostas de defesa induzidas pela estimulação elétrica da MCPD e CS no grupo PRB.

Figura 19: Valores de intensidade mediana ( $I_{50}$ ) obtidos nas sessões de estimulação elétrica da MCPD e CS para o comportamento de imobilidade nos 4 grupos.

Figura 20: Valores de intensidade mediana ( $I_{50}$ ) obtidos nas sessões de estimulação elétrica da MCPD e CS para o comportamento de exoftalmia nos 4 grupos.

Figura 21: Valores de intensidade mediana ( $I_{50}$ ) obtidos nas sessões de estimulação elétrica da MCPD e CS para o comportamento de defecação nos 4 grupos.

Figura 22: Valores de intensidade mediana ( $I_{50}$ ) obtidos nas sessões de estimulação elétrica da MCPD e CS para o comportamento de micção nos 4 grupos.

Figura 23: Valores de intensidade mediana ( $I_{50}$ ) obtidos nas sessões de estimulação elétrica da MCPD e CS para o comportamento de trote nos 4 grupos.

Figura 24: Valores de intensidade mediana ( $I_{50}$ ) obtidos nas sessões de estimulação elétrica da MCPD e CS para o comportamento de galope nos 4 grupos.

Figura 25: Valores de intensidade mediana ( $I_{50}$ ) obtidos nas sessões de estimulação elétrica da MCPD e CS para o comportamento de salto nos 4 grupos.

Figura 26: Níveis plasmáticos de CORT em  $\mu\text{g/dl}$  medidos nos diferentes momentos das sessões de estimulação elétrica (TRI, P48, P96, R48 e R96) no grupo CTR.

Figura 27: Níveis plasmáticos de CORT em  $\mu\text{g/dl}$  medidos nos diferentes momentos das sessões de estimulação elétrica (TRI, P48, P96, R48 e R96) no grupo PRV.

Figura 28: Níveis plasmáticos de CORT em  $\mu\text{g/dl}$  medidos nos diferentes momentos das sessões de estimulação elétrica (TRI, P48, P96, R48 e R96) no grupo CTB.

Figura 29: Níveis plasmáticos de CORT em  $\mu\text{g/dl}$  medidos nos diferentes momentos das sessões de estimulação elétrica (TRI, P48, P96, R48 e R96) no grupo PRB.

Figura 30: Níveis plasmáticos de CORT nos 4 grupos experimentais (CTR, PRV, CTB, PRB), nas diferentes sessões de estimulação elétrica (TRI, P48, P96, R48 e R96).

Figura 31: Efeitos da PSP sobre o peso dos animais.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Isomorfismo dos ataques de pânico e das respostas induzidas por estimulação da MCPD em homens e ratos.

Tabela 2: Consequências da privação de sono.

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO.....   | 1  |
| 1.1. Transtorno de Ansiedade.....                                      | 1  |
| 1.1.1. Transtorno do Pânico.....                                       | 2  |
| 1.1.2. Bases neurais do TP.....  | 4  |
| 1.2. SONO.....   | 9  |
| 1.2.1. Sono e suas bases fisiológicas.....                             | 9  |
| 1.2.2. Privação de sono.....   | 11 |
| 1.3. HORMÔNIOS GLICOCORTICÓIDES: ESTRESSE.....                         | 14 |
| 1.3.1. Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA).....                     | 14 |
| 1.3.2. Regulação do eixo HHA pela amígdala e pelo hipocampo.....       | 15 |
| 1.3.3. Metirapona.....   | 17 |
| 2. OBJETIVOS.....  | 19 |
| 2.1. Objetivo geral:.....  | 19 |
| 2.2. Objetivos específicos:.....                                       | 19 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS.....  | 20 |
| 3.1. Animais.....  | 20 |
| 3.2. Confeção de Eletrodos.....  | 20 |
| 3.3. Cirurgia.....   | 20 |
| 3.4. Estimulação Intracraniana e Privação de Sono Paradoxal (PSP)..... | 22 |
| 3.5. Tratamento com Metirapona.....                                    | 25 |
| 3.7. Registros Comportamentais.....                                    | 26 |
| 3.7.1. Etograma:.....  | 27 |
| 3.8. Dosagens Bioquímicas.....   | 28 |
| 3.8.1. Coleta de Plasma.....   | 28 |
| 3.8.2. Extração e quantificação da corticosterona.....                 | 28 |
| 3.9. Análise Histológica.....  | 29 |

|   |    |
|---|----|
| 3.10. Análise Estatística .....   | 30 |
| 4. RESULTADOS .....   | 33 |
| 4.1. Histologia .....   | 33 |
| 4.2. Limiares medianos dos comportamentos defensivos obtidos nas respectivas sessões de estimulação do grupo controle (CTR).....  | 34 |
| 4.3. Limiares medianos dos comportamentos defensivos obtidos nas respectivas sessões de estimulação do grupo privação (PRV).....  | 35 |
| 4.4. Limiares medianos dos comportamentos defensivos obtidos nas respectivas sessões de estimulação do grupo controle com bloqueio (CTB).....   | 37 |
| 4.5. Limiares medianos dos comportamentos defensivos obtidos nas respectivas sessões de estimulação do grupo privação com bloqueio (PRB) .....  | 39 |
| 4.6. Comparação entre os limiares medianos ( $I_{50}$ ) da imobilidade obtidos em cada sessão de estimulação elétrica da MCPD e CS (TRI; P48; P96; R48; R96) dos diferentes grupos experimentais (CTR, CTB, PRV e PRB). ..... | 41 |
| 4.7. Comparação entre os limiares medianos ( $I_{50}$ ) da exoftalmia obtidos em cada sessão de estimulação elétrica da MCPD e CS (TRI; P48; P96; R48; R96) dos diferentes grupos experimentais (CTR, CTB, PRV e PRB). .....  | 43 |
| 4.8. Comparação entre os limiares medianos ( $I_{50}$ ) da defecação obtidos em cada sessão de estimulação elétrica da MCPD e CS (TRI; P48; P96; R48; R96) dos diferentes grupos experimentais (CTR, CTB, PRV e PRB). .....   | 44 |
| 4.9. Comparação entre os limiares medianos ( $I_{50}$ ) da micção obtidos em cada sessão de estimulação elétrica da MCPD e CS (TRI; P48; P96; R48; R96) dos diferentes grupos experimentais (CTR, CTB, PRV e PRB). .....      | 45 |
| 4.10. Comparação entre os limiares medianos ( $I_{50}$ ) do trote obtidos em cada sessão de estimulação elétrica da MCPD e CS (TRI; P48; P96; R48; R96) dos diferentes grupos experimentais (CTR, CTB, PRV e PRB). .....      | 46 |
| 4.11. Comparação entre os limiares medianos ( $I_{50}$ ) do galope obtidos em cada sessão de estimulação elétrica da MCPD e CS (TRI; P48; P96; R48; R96) dos diferentes grupos experimentais (CTR, CTB, PRV e PRB). .....     | 47 |
| 4.12. Comparação entre os limiares medianos ( $I_{50}$ ) do salto obtidos em cada sessão de estimulação elétrica da MCPD e CS (TRI; P48; P96; R48; R96) dos diferentes grupos experimentais (CTR, CTB, PRV e PRB). .....      | 49 |
| 4.13. Efeitos da PSP nos níveis plasmáticos de corticosterona.....  | 50 |
| 4.14. Efeitos da PSP sobre o peso dos animais .....   | 54 |



|                      |    |
|----------------------|----|
| 5. DISCUSSÃO.....    | 55 |
| 6. CONCLUSÃO.....    | 61 |
| 7. REFERÊNCIAS ..... | 62 |
| 8. ANEXOS.....       | 73 |

## RESUMO

**EFEITO DA PRIVAÇÃO DE SONO PARADOXAL E DO BLOQUEIO DA SÍNTESE DA CORTICOSTERONA SOBRE OS LIMIARES DA REAÇÃO DE DEFESA INDUZIDA PELA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DA MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL E COLÍCULO SUPERIOR. Barbosa, R.V.R, Dissertação de Mestrado, Pós-graduação em Bioquímica e Farmacologia, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, Brasil, 2015.** O Transtorno do pânico (TP) é um transtorno mental comum que afeta até 5% da população em algum momento da vida, sendo caracterizada pela presença de ataques de pânico (AP) recorrentes. Constitui uma psicopatologia que pode ser afetada pela privação do sono (PS), relação que ainda é pouco compreendida. Neste contexto, modelos experimentais de AP e de PS são ferramentas úteis na investigação dessa possível correlação, especialmente motivado pela crescente condição de privação de sono, que tem se tornado cada vez mais frequente na sociedade moderna. Assim, este estudo avaliou os efeitos da privação de sono paradoxal (PSP) sobre os limiares dos comportamentos defensivos induzidos por estimulação intracraniana (EI) da MCPD e CS de ratos num modelo experimental de AP, assim como verificou a influência da corticosterona sobre esses limiares. Foram utilizados 160 ratos *Wistar* machos (300g), organizados em 4 grupos com 40 animais cada, como se segue: **Grupo Controle** (CTR) submetido à EI, porém sem PSP; **Grupo Privação** (PRV), submetido à EI e privado por 96 horas; **Grupo Privação + Bloqueio da corticosterona** (PRB), submetido ao tratamento com metirapona, EI, e privado por 96 horas, e **Grupo Controle + Bloqueio da corticosterona** (CTB), submetido ao tratamento com metirapona e EI, porém sem privação de sono. Após 10 dias do implante cirúrgico intracraniano de eletrodo na MCPD e CS, os animais passaram por 5 sessões de estimulação, como se segue: 1ª (TRI) considerada triagem - imediatamente antes da privação, 2ª (P48) após 48h de privação, 3ª (P96) após 96h de privação, 4ª (R48) após 48h de retirada da privação e 5ª (R96) após 96h de retirada da privação. As curvas de limiares das respostas individuais de defesa obtidas nas várias sessões de estimulação da MCPD e CS (TRI, P48, P96, R48 e R96) dos ratos foram comparadas entre si, bem como as curvas de limiares de uma dada resposta nos diferentes grupos (CTR, PRV, CTB e PRB). Além disso, os níveis de corticosterona (CORT) foram dosados nas diferentes sessões de EI, e comparadas num mesmo grupo, bem como nos diferentes grupos. No grupo CTR, todos os comportamentos foram iguais em todas as sessões quando comparados à TRI, entretanto, nos animais privados (PRV), o limiar do galope (GLP) reduziu significativamente em R48 e R96, não ocorrendo

alterações nos demais comportamentos. Em contraste, no grupo PRB, o Trote (TRT) aumentou a partir de P48, enquanto o GLP não foi alterado em nenhuma sessão de EI. Na comparação entre os grupos, em Salto (SLT), Micção (MIC), Exoftalmia (EXO), Imobilidade (IMO), Defecação (DEF), TRT e GLP, não sofreram alterações decorrentes da CORT produzida decorrente da PSP, sugerindo que a corticosterona não altera os comportamentos defensivos característicos do Ataque de Pânico. Em adição, tais resultados sugerem que os efeitos tardios da PSP sobre os limiares de GLP possivelmente se devam a mecanismos neuroquímicos tempo-dependente.

## ABSTRACT

### **EFFECT OF PARADOXICAL SLEEP DEPRIVATION AND SYNTHESIS CORTICOSTERONE LOCK ON THE THRESHOLD OF DEFENSE REACTION INDUCED ELECTRIC STIMULATION OF PERIAQUEDUCTAL GRAY MATTER (PAG) AND DEEP LAYERS OF SUPERIOR COLLICULUS (CS) OF WISTAR RATS.**

**Barbosa, R.V.R, MSc Thesis, Graduate in Biochemistry and Pharmacology, Federal University of Espírito Santo, Vitória, ES, Brazil, 2015.**

Panic Disorder (PD) is a common mental disorder that affects up to 5% of the population at some point in life and is characterized by the presence of recurrent panic attacks (AP). It is a psychopathology that may be affected by sleep deprivation (PS), relation that is still poorly understood. In this context, experimental models of AP and PS are useful tools in investigating this possible correlation, especially motivated by the growing of deprivation of sleep, which has become increasingly common in modern society. This study evaluated the effects of paradoxical sleep deprivation (PSP) in the thresholds of defensive behaviors induced by intracranial stimulation (EI) of MCPD and CS in rats, which is an experimental model of AP, as well as verified the influence of corticosterone on these thresholds. 160 male Wistar rats were used (300g), organized into 4 groups of 40 animals each, as follows: control group (CTR) submitted to EI, but no PSP; Deprivation group (PRV), submitted to EI and sleep deprived for 96 hours; Deprivation Group + corticosterone synthesis inhibition (PRB), undergoing treatment with metyrapone, EI, and sleep deprived for 96 hours, and the control group + corticosterone synthesis inhibition (CTB), undergoing treatment with metyrapone and EI, but without sleep deprivation. After 10 days of intracranial surgical implant of electrode in MCPD, the animals underwent 5 stimulation sessions, as follows: 1st (TRI) considered as a screening session - immediately before the deprivation, 2nd (P48) after 48 hours of deprivation, 3rd (P96) after 96 hours of deprivation, 4th (R48) 48 hours after the end of deprivation, and 5th (R96) after 96 hours of withdrawal of deprivation. The thresholds of the individual curves obtained for defense responses in the various stimulation sessions of CS and MCPD (TRI, P48, P96, R48 and R96) of the rats were compared, as well as a given threshold response curves in different groups (CTR, PRV, CTB and PRB). Furthermore, the levels of corticosterone (CORT) were measured in different sessions of EI and compared in the same group, as well as between the different groups. In the CTR group, all behaviors were equal in all sessions when compared to the TRI, however, in deprived animals (PRV), the threshold for galloping (GLP) was significantly reduced in R48 and R96, without changes in other behaviors. In contrast, in the

PRB group, Trotting (TRT) increased from P48, while the GLP has not changed in any EI session. Comparing the groups, Jumping (SLT), Micturation (MIC), Exophthalmos (EXO), Immobility (IMO), Defecation (DEF), Trotting (TRT) and Galloping (GLP), were not altered in function of CORT levels produced due PSP, suggesting that corticosterone does not influence the characteristic defensive behaviors induced by electrical stimulation of MCPD and CS. In addition, these results suggest that the delayed effect of the PSP on the GLP thresholds is possibly due to time-dependent neurochemical mechanisms.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Transtorno de Ansiedade

A ansiedade tem sido objeto de interesse de estudos da humanidade há bastante tempo. Atualmente, a ansiedade tem sido considerada por diversos autores como o "Mal do século", pois vivemos numa sociedade acelerada, rápida, estressada e ansiosa. Gentil (1996) define ansiedade como sendo um estado emocional desagradável de medo e/ou apreensão, que vem acompanhado por desconforto devido à antecipação de estágios de perigo ou de algo que seja desconhecido. Mas também, de acordo com Castillo, *et al.*, (2000) devemos considerar a ansiedade como sendo um importante fator para a adaptação e sobrevivência do indivíduo ao meio, entretanto, quando se torna persistente pode vir a desencadear importantes transtornos.

A preocupação pelos estados ansiosos iniciou-se com Sigmund Freud (1895), sendo o primeiro a descrever os Transtornos da Ansiedade (Angstneuroses). Ao estudar a ansiedade clínica, Freud distinguiu duas síndromes fundamentais, a "expectativa ansiosa" ou "apreensão" (Angstliche), forma predominante do transtorno de ansiedade, e uma síndrome menos frequente que ele denominou ataque de ansiedade (Angstanfall). De acordo com Freud, a expectativa ansiosa consistia num "quantum de ansiedade livre e flutuante que controlava a escolha de ideias por antecipação". Em contraste, nos ataques de ansiedade a "ansiedade irrompia repentinamente na consciência sem ter sido eliciada por qualquer ideia". Tais descrições são similares aos diagnósticos atuais de Ansiedade Generalizada (TAG) e o Transtorno do Pânico (TP), segundo a Associação de Psiquiatria Americana (APA) (2000).

Embora as classificações clínicas propostas pela Psicanálise tenham sido relativamente bem aceitas no meio psiquiátrico até a primeira metade do século XX, as décadas que se seguiram muito contribuíram para reorientar o curso da Psiquiatria, em especial em direção à biologia. Dentre esses fatores se destacam os avanços na área da Psicofarmacologia, que tem

seu início na década de 60, quando em 1964, Klein descobriu por acaso que a Imipramina, um antidepressivo tricíclico, bloqueava o ataque de pânico aparentemente espontâneo em pacientes não deprimidos, mais tarde considerados agorafóbicos. Em 1967, Pitts descobriu, em estudos controlados com placebo, que o lactato de sódio administrado intravenosamente em pacientes com ataques de pânico espontâneos, então considerados neurose de ansiedade, poderia causar tais ataques regularmente. Entretanto, os transtornos da ansiedade continuaram a ser diagnosticados como neuroses da ansiedade até meados do século passado, e somente em 1980 o Transtorno do Pânico foi incluído no DSM-III ("*Diagnostic Statistical Manual of Mental Disorders*") da APA.

### **1.1.1. Transtorno do Pânico**

De acordo com DSM-III, o TP, ou ansiedade episódica paroxística, inclui-se entre os transtornos de ansiedade, ou seja, estados emocionais repetitivos, ou persistentes, nos quais a ansiedade patológica desempenha o papel fundamental. É um transtorno caracterizado pela presença de ataques de pânico (AP) recorrentes que consistem em uma sensação de medo e mal-estar, intensa ansiedade e sensação de ameaça catastrófica. Eles são acompanhados por sintomas autonômicos e neurológicos, como a dispneia, hipertensão, dor no tórax, sudorese, taquicardia e palpitação, tremores, fuga de situação imediata, congelamento, sensação de sufocação, dentre outros sintomas que se iniciam de forma repentina. Esses ataques podem ser causados pela exposição do paciente a agentes químicos, como, por exemplo, lactato de sódio (Liebowitz *et al*, 1984 e 1985), bem como por fatores exógenos que podem ser capazes de desencadear ataques e/ou aumentar a sua frequência e intensidade, como, por exemplo, agentes farmacológicos auto administrados (caféina, álcool, nicotina, maconha, cocaína), hábitos (privação de sono, dieta, exercício, relaxamento, hiperventilação) e aspectos ambientais (iluminação fluorescente, pressões da vida). (Roy-Byrne e Uhde, 1988).

De acordo com o DSM III, o TP é uma síndrome tripartite caracterizada pela ocorrência de ataques espontâneos de pânico, ansiedade antecipatória e esquiva fóbica. Estes ataques são usualmente precedidos por ansiedade crescente (ansiedade antecipatória), podendo resultar em esquiva fóbica (agorafobia) das situações que os pacientes julguem favorecer estes ataques (pânico situacional). Neste, o TP é definido como a ocorrência de 4 ataques espontâneos em 4 semanas, ou 1 ataque seguido pelo receio de novos ataques ao longo de 4 semanas. O DSM-IV adicionou que os AP também podem ocorrer em outros transtornos de ansiedade (fobias, transtorno de estresse pós-traumático, etc.) podendo ser espontâneos ou induzidos pela exposição a objetos fóbicos (aranhas, sangue, cães, etc.), ou situações que o predisõem (multidões, locais fechados, altura, etc.). (APA, 2000).

Em sua versão mais recente, o DSM-V, publicado em maio de 2013, o TP e a Agorafobia foram separados como diagnósticos independentes reconhecendo a existência de casos nos quais a Agorafobia ocorre sem a presença de sintomas de pânico. (APA, 2013).

Agorafobia no DSM-IV é definido como medos múltiplos e comportamentos de esquiva, centralizado em três temas principais: medo de sair de casa, medo de ficar sozinho e medo de estar fora de casa em situações em que pode se sentir ameaçado. O paciente passa a ter pavor de ter um novo ataque, então, nos intervalos entre as crises ele desenvolve um comportamento de esquiva fóbica com o intuito de se preservar do ataque seguinte.

O TP é um transtorno mental comum que afeta até 5% da população em algum momento da vida. É frequentemente incapacitante, especialmente quando complicada por agorafobia, e está associado a uma morbidade funcional substancial e qualidade de vida reduzida, além de custo social elevado, e raramente ocorre sem outra comorbidade psicopatológica, como transtorno bipolar, transtorno de ansiedade, depressão, entre outros (Roy-Byrne *et al*, 2006).



### 1.1.2. Bases neurais do TP

Hunsperger e colaboradores (1956) foram os primeiros a salientar que a estimulação elétrica da MCPD, ou tegumento adjacente, como o colículo superior, produzia reações defensivas em gatos não anestesiados e que estas ocorriam independentemente de estruturas mais rostrais, também envolvidas com o comportamento de defesa, como a amígdala e o hipotálamo. De fato, embora o hipotálamo tenha sido tradicionalmente considerado como a estrutura-chave na integração das reações emocionais, animais com hipotálamo lesado ou cirurgicamente isolado ainda podem apresentar reações integradas de defesa (Ellinson & Flynn, 1968; Fernandez de Molina & Hunsperger, 1962). Em contraste, a lesão da MCPD abole ou atenua as respostas comportamentais de defesa, naturais ou induzidas por estimulação intracraniana do hipotálamo e amígdala (Bandler & Keay, 1996).

A estrutura da MCPD varia pouco entre mamíferos. Tal estabilidade evolutiva sugere que ela esteja envolvida em funções importantes de proteção e na regulação homeostática (Carrive, 1993). A estimulação da MCPD de ratos, em especial das colunas dorsolateral e lateral, produz um complexo de comportamentos incondicionais denominados de reação de defesa (Schenberg *et al.*, 2001). A reação de defesa compõe-se das respostas somáticas e autonômicas das reações de "congelamento" (*freezing behavior*) ou "fuga". A reação de congelamento caracteriza-se por uma postura imóvel e tensa (imobilidade tensa - IMO) acompanhada de exoftalmia (EXO), paralisia das vibrissas (mistacioplegia) e, frequentemente, micção (MIC) e defecação (DEF). Por sua vez, a reação de fuga caracteriza-se por respostas ativas como o trote (TRT), galope (GLP) e saltos (SLT), além da exoftalmia. Essas respostas foram mapeadas funcionalmente no teto do mesencéfalo por Bittencourt *et al.*, 2004.

Os sintomas dos AP são similares às respostas aversivas evocadas pela estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPD), tanto em humanos quanto em ratos. A MCPD é funcionalmente organizada em colunas longitudinais dispostas ao longo do aqueduto cerebral, de acordo com a Figura 1.

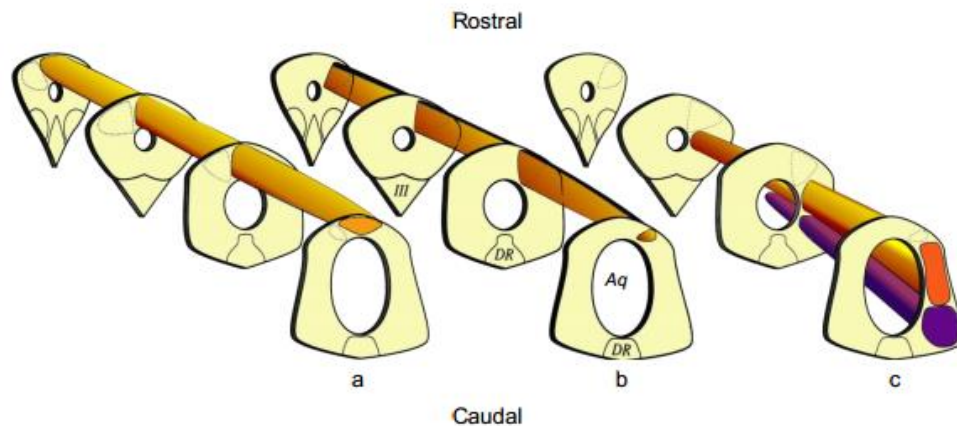


Figura 1. Organização colunar rostro-caudal da MCPD. As figuras ilustram as colunas: (a) dorso medial, (b) dorsolateral, (c) lateral (coluna superior) e ventrolateral (coluna inferior). (Aq) Aqueduto cerebral, (DR) núcleo dorsal da rafe, (III) núcleo óculo-motor. Fonte: Adaptado de Bandler *et al.*, 1991)

Os comportamentos defensivos também são eliciados pela estimulação das camadas profundas do colículo superior (CS) (Sudré *et al.*, 1993), região que parece ser a principal fonte de informações visuais relevantes ao controle da reação de defesa em roedores (Dean *et al.*, 1988a). De fato, tanto os estudos neuroanatômicos quanto histoquímicos sugerem uma relação íntima entre as camadas coliculares intermediárias e profundas com a coluna dorsolateral da MCPD (Graybiel *et al.*, 1984). Evidências anatômicas sugerem a existência de múltiplas vias de acesso de informações visuais à MCPD: 1) conexões diretas das camadas intermediárias e profunda do colículo superior para os segmentos rostral e caudal da MCPD, 2) conexões diretas, via dendritos dos neurônios da MCPD que se estende dorsalmente para a camada profunda do colículo superior, 3) conexões indiretas do colículo superior para a

MCPD via núcleo cuneiforme. (Redgrave & Dean, 1991). De acordo com Bittencourt *et al.*, 2004, a estimulação elétrica das camadas intermediárias e profundas do colículo superior induziram um padrão de resposta de defesa similar àquela observada para a estimulação da MCPD, e o mesmo foi observado com a estimulação química com N-metil-D-aspartato (NMDA). Esses resultados ressaltam a importância das camadas profundas e intermediárias do CS nas respostas de defesa a ameaças distais, bem como na inicialização da MCPD para a deflagração das respostas de defesa.

Estudos desenvolvidos por Schenberg e colaboradores (2001) propõem que a estimulação elétrica ou química da MCPD possa ser um modelo experimental de ataques de pânico. De fato, a estimulação da MCPD de humanos produz medo, pânico, ansiedade, terror, paranoia, ou o sentimento de morte iminente, além de inúmeras respostas autonômicas, respiratórias e neurológicas típicas dos ataques de pânico (Amano *et al.*, 1978; Nashold *et al.*, 1969; Young, 1989) (Tabela 1), enquanto não altera o eixo HHA em ratos (Armini *et al.*, 2015). Sendo assim, esse isomorfismo entre os comportamentos defensivos evocados por estimulação da substância cinzenta periaquedutal dorsal de ratos e humanos e os ataques de pânico frequentes no transtorno de pânico foi demonstrado por Schenberg *et al.*, 2001, conforme tabela 1.

Tabela 1. Isomorfismo dos ataques de pânico e das respostas induzidas por estimulação da MCPD em homens e ratos. Abreviações: n.d. - dados não disponíveis, n.o. - resposta não observada (adaptado de Schenberg *et al.*, 2001).

|   | <b>Ataques de pânico espontâneos ou induzidos por lactato em homens</b>   | <b>Estimulação da MCPD em homens</b>  | <b>Estimulação da MCPD em ratos</b>   |
|---|---|---|---|
| Sensações/<br>Comportamento               | 'Bloqueio do andar'<br>Desejo de fugir<br>Intenso desconforto<br>Ansiedade severa<br>Pânico, terror<br>Sensação de morte iminente<br>Medo de ficar louco<br>medo de perder o controle | n.d.<br>Interrupção do estímulo<br>Intenso desconforto<br>Ansiedade severa<br>Pânico, terror<br>'Medo de morrer'<br>n.d.<br>n.d.          | Congelamento<br>Fuga<br>Aversão<br>---<br>---<br>---<br>---   |
| Respostas<br>Autonômicas                  | Taquipnéia<br>Hiperventilação<br>Dispneia<br>Sensação de asfixia<br>Taquicardia<br>Hipertensão<br>urgência de esvaziamento da bexiga<br>Peristalse<br>sudorese                        | Hiperventilação<br>Apneia<br>Respiração profunda<br>Taquicardia<br>Urgência de esvaziamento da bexiga<br>Abertura dos olhos<br>piloereção | Taquipnéia<br>Hiperventilação<br>Respiração profunda<br>Taquicardia<br>Hipertensão<br>Micção<br><br>Defecação<br>Exoftalmia |
| Respostas<br>Endócrinas                   | Ausência de resposta da PRL<br>Ausência de resposta do ACTH<br>Ausência de resposta do cortisol   | n.d.<br>n.d.<br>n.d.  | Ausência de resposta da PRL<br>Ausência de resposta do ACTH<br>Ausência de resposta da corticosterona                       |
| Respostas<br>Neurológicas/<br>Parestesias | Sensação de tremor<br>Dor torácica<br>Sensação de calor/frio<br>Tonteira<br>n.d.<br>n.d.  | Sensação de vibração<br>Dor torácica e no coração<br>Sensação de calor/frio<br>n.d.<br>Entorpecimento dor facial medial                   | ---<br>---<br>---<br>---<br>---   |
| Áreas comuns estimuladas ou ativadas      | MCPD, camadas profundas do colículo superior. (PET)   | MCPD e teto adjacente (0-5 mm lateral ao aqueduto) (raio-X)   | MCPD, camadas profundas do colículo superior  |

Como se pode observar é surpreendente o isomorfismo entre a estimulação da MCPD e a ocorrência do ataque de pânico com relação às reações emocionais e autonômicas.

Schenberg *et al.* (2001) demonstraram ainda que enquanto o agente panicogênico pentilenotetrazol produz uma redução marcante dos limiares de galope (-51%) e micção (-66%), o flumazenil, um antagonista de benzodiazepínicos, causa aumentos seletivos e acentuados dos limiares de micção. Adicionalmente, doses não sedativas de diazepam, um benzodiazepínico com efeitos ansiolíticos, não atenuaram as respostas defensivas. Por outro lado, a administração aguda de um ansiolítico não-benzodiazepínico, a buspirona, facilitou a resposta de salto, mas não teve efeitos quando administrada cronicamente, enquanto a administração crônica de maprotilina, um inibidor seletivo da recaptação de noradrenalina, causou aumentos seletivos e acentuados dos limiares de imobilidade (118%). Mais importante, as respostas defensivas foram atenuadas pelo tratamento crônico com clomipramina, outro antidepressivo de propriedades panicolíticas estabelecidas. Dentre as respostas de defesa induzidas pela estimulação da MCPD, o galope foi atenuado de forma seletiva pelo tratamento crônico com fluoxetina, um panicolítico que é um inibidor seletivo da recaptação de serotonina (5-HT). Assim, enquanto a imobilidade parece ser uma resposta meramente atencional mediada por noradrenalina, o galope parece ser a resposta mais representativa deste estado emocional. Por essa razão a estimulação da MCPD de ratos passou a ser considerada como um modelo experimental de ataque de pânico, uma vez que estes estudos corroboram o isomorfismo farmacológico dos ataques de pânico e da resposta de galope evocada pela estimulação elétrica da MCPD de ratos.

O TP constitui um tipo específico de psicopatologia relacionada à ansiedade, o qual pode ser afetado pela privação do sono. De fato, trabalhos recentes sugerem que a privação do sono aumenta os níveis basais de ansiedade e excitação corporal (Sagaspe, Sanchez-Ortuno, & Charles, 2006), e essa elevação da ansiedade basal resultante da privação de sono

provavelmente potencializa os ataques de pânico, tal como a ansiedade prediz fortemente a ocorrência do mesmo (Coplan *et al.*, 1998; Ehlers *et al.*, 1986). Apesar de sua relevância, a relação entre a privação de sono e ataques de pânico ainda não é bem conhecida. Neste contexto, modelos experimentais de ataques de pânico e de privação de sono podem ser ferramentas úteis na investigação de possíveis correlações entre a privação de sono e o TP.

## 1.2. SONO

### 1.2.1. Sono e suas bases fisiológicas

O sono é um estado funcional, reversível e cíclico, com algumas manifestações comportamentais características, como uma imobilidade relativa e o aumento do limiar de resposta aos estímulos externos. Em termos orgânicos, ocorrem variações dos parâmetros biológicos, acompanhados por uma modificação da atividade mental, que correspondem ao comportamento de dormir (Buela, 1990). Embora não se compreenda especificamente a importância do sono em nosso organismo, se sabe que ele é vital, e sua privação total ou parcial, em determinadas condições, é fatal, como de acordo com o trabalho de Rechtschaffen & Bergmann (1995), em que ratos submetidos à privação total de sono morrem geralmente após 2-3 semanas de privação, ao passo que ratos submetidos à privação de uma determinada fase do sono sobrevivem por um tempo maior.

O ser humano, assim como outros animais, apresenta dois estados comportamentais básicos: vigília e sono. Durante a vigília, importantes funções são executadas. O sono, por outro lado, é de fundamental relevância para o descanso do organismo e apresenta basicamente duas fases, com mecanismos fisiológicos distintos: Sono REM (*Rapid Eye Movement* - movimentos oculares rápidos), e sono de ondas lentas (não REM), que alternam entre si ciclicamente durante o período de sono. O sono não-REM (NREM) é caracterizado por 4 fases, sendo que as duas primeiras fases, 1 e 2, são mais leves e muitas vezes se

alternam com breves períodos de vigília. Já as fases 3 e 4 são mais profundas e predominam no início da noite (Fernandes, 2006). Durante o sono não-REM, a atividade neuronal é baixa e a taxa metabólica e a temperatura encefálica estão em seus menores níveis. Além disso, há um declínio da atividade simpática e um aumento da atividade parassimpática, que predomina durante a fase não-REM. Há também o relaxamento muscular comparativamente à vigília, porém, mantém-se sempre alguma tonicidade basal. O Eletroencefalograma (EEG) exhibe aumento progressivo de ondas lentas, conforme se avança do estágio I para o estágio IV do sono NREM (Fernandes, 2006).

O sono REM é um sono mais profundo e apresenta padrões de EEG similares aos da vigília e, por essa razão, o sono REM também tem sido chamado de *Sono Paradoxal (SP)* ou *dessincronizado* (Fig. 2). Nesta fase, há um aumento global da atividade neuronal, metabólica e temperatura encefálica (Kandel *et al*, 2014). Além disso, apesar da atonia muscular que acompanha este estágio, observam-se movimentos corporais fásicos e erráticos, de diversos grupamentos musculares, principalmente na face e nos membros, bem como emissão de sons (Fernandes, 2006).



Figura 2: Estágios do Sono. **Fonte:** Guyton & Hall - Fundamentos de Fisiologia, 12ª Ed.

### 1.2.2. Privação de sono

Uma boa noite de sono é fundamental para uma boa saúde mental e emocional. Ela é essencial na manutenção de uma vida saudável e na fisiologia do organismo, regulando processos de reparo corporal, regulação homeostática diversa e para a consolidação da memória (Andersen *et al.*, 2005; Tufik *et al.*, 2009).

A remoção parcial ou supressão do sono em um organismo é conhecida como privação de sono (Chen W, 2005). Os estudos sobre a privação de sono tiveram início em 1894 com os experimentos de De Manacéine, que demonstrou que filhotes e cães adultos morriam após alguns dias de privação de sono, e que essa privação causava severas lesões no sistema nervoso central desses animais. Em humanos, o primeiro estudo foi conduzido por Patrick e Gilbert (1896). Os autores privaram de sono indivíduos jovens por 88 a 90 horas, e



observaram prejuízos no tempo de reação, na habilidade motora voluntária e na habilidade em memorizar. Ao término do experimento, os voluntários dormiram por 10,5 a 12 horas e recuperaram a sua condição basal após acordar. De acordo com Rechtschaffen & Bergmann 1995, ratos privados de sono total ou parcial apresentaram aumento da taxa metabólica e perda excessiva de calor, além de alterações hormonais e perda acentuada de peso, indicando a importância fisiológica do sono. As consequências da privação de sono podem ser visualizadas na tabela 2.

Tabela 2: Consequências da Privação de sono. (Adaptado de Tufik *et al.*, 1978, 2008; Andersen *et al.*, 2004).

| Consequências evidenciadas da privação de sono  |  |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Diminuição da longevidade.</li> <li>• Alterações do controle glicêmico e seu metabolismo.</li> <li>• Aumento do risco de mortalidade cardiovascular.</li> <li>• Diminuição da regeneração tecidual.</li> <li>• Fadiga e dor muscular.</li> <li>• Diminuição da capacidade imunológica.</li> <li>• Diminuição do limiar de convulsão.</li> <li>• Aumento do estresse oxidativo.</li> <li>• Alteração de neuroreceptores (principalmente monoaminérgicas)</li> <li>• Alteração no eixo Hipotalâmico-pituitário-adrenal.</li> <li>• Aumento do risco de fibromialgia</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumento da capacidade aditiva às drogas pela sensibilização dos receptores dopaminérgicos na via nigro-estriatal.</li> <li>• Danos à integridade da pele.</li> <li>• Alterações na atividade dos nervos simpáticos, principalmente no coração e rim e consequente hipertensão crônica.</li> <li>• Alterações hormonais, como diminuição da liberação de hormônio do crescimento (HGH).</li> <li>• Diminuição da capacidade de aprendizado e prejuízo de memória.</li> <li>• Alteração no ciclo estral (animal)</li> <li>• Capacidade antidepressiva.</li> </ul> |

Distúrbios do sono são sintomas comuns em vários quadros de ansiedade, bem como nos transtornos do humor. Perturbações do sono estão inclusas no DSM-V como critério diagnóstico para o transtorno de ansiedade generalizada, assim como para o transtorno de estresse pós-traumático, mas não como critério para o TP. No entanto, os indivíduos com TP

geralmente relatam distúrbios do sono, incluindo despertares frequentes, mesmo na ausência de depressão concomitante (Stein, Chartier, & Walker, 1993).

Pesquisas anteriores já haviam demonstrado que indivíduos com TP apresentam perturbações significativas do sono, embora o mecanismo dessa perturbação não esteja claro. Os distúrbios do sono em pacientes com TP foram relatados como sendo uma consequência da ansiedade subjacente à condição clínica, devido à maior sensibilidade à ansiedade desses pacientes (Hoge *et al*, 2011). A hipótese de que a privação do sono pode provocar manifestações de pânico foi levantada, com pouca ênfase, por Milasius *et al*. (1990) em coelhos e por Labbate *et al*. (1997) nos seres humanos. De acordo com estes dados, tem sido documentado que o aumento da pressão parcial de gás carbônico (CO<sub>2</sub>), uma condição reconhecida como panicogênica, aumenta os sintomas de pânico em pacientes com TP quando submetidos à privação do sono (Gorman *et al*, 1988).

Os modelos animais são ferramentas valiosas para a pesquisa experimental sobre a ansiedade. Independentemente do método utilizado, a privação de sono paradoxal (PSP) resulta em reações de estresse, além do aumento da ansiedade (Labbate, *et al*, 1998). Nesse contexto, a privação do sono paradoxal em animais gera um aumento no comportamento de luta, reconhecido como uma natureza defensiva do animal. Isto sugere que tal comportamento seja uma manifestação do ataque de pânico, uma vez que a administração de Fluoxetina em ratos privados de sono gerou uma redução no comportamento de luta, corroborando a hipótese de que a privação de sono pode provocar manifestações de pânico (Furlan & Hoshino, 2001).

### 1.3. HORMÔNIOS GLICOCORTICÓIDES: ESTRESSE

#### 1.3.1. Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA)

A resposta ao estresse está centrada principalmente na atividade do eixo HHA (Figura 3). Durante o ciclo circadiano, os hormônios corticosteroides são secretados pela glândula adrenal em duas zonas distintas, a fasciculada e reticulada do córtex da adrenal. A síntese e liberação destes hormônios depende da adrenocorticotropina (ACTH), sendo este um hormônio peptídico produzido pela adeno-hipófise, cuja liberação é controlada pelo CRH (Hormônio Liberador de Corticotropina). O CRH é sintetizado na parte anterior dos núcleos paraventriculares hipotalâmicos e secretado no plexo capilar do hipotálamo, sendo, em seguida, transportado até a adeno-hipófise, onde induz a secreção do ACTH, o qual age sobre as glândulas adrenais na produção de Cortisol/Corticosterona (Feldman, 1997).

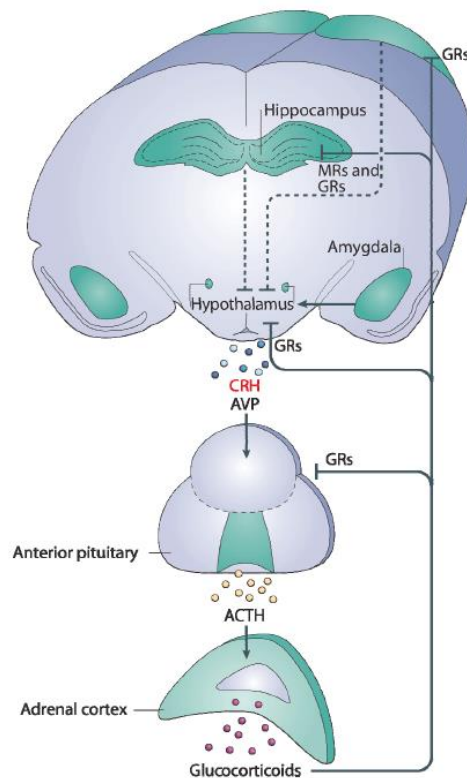


Figura 3- Representação esquemática dos circuitos ativados em resposta ao estresse. (Figura adaptada de Lupien *et al.*, 2009).

Tensões físicas, emocionais e químicas, como a dor, traumatismo, cirurgia, infecção, hipóxia, hipoglicemia aguda, exposição ao frio, pirógenos (Feldman, 1997), restrição alimentar e hídrica, restrição espacial, isolamento social, exposição a um ambiente novo e privação de sono (Marinelli *et al*, 1996) são processos que ativam o eixo HHA e são regulados por um sistema de retroalimentação negativo, no qual os níveis circulantes de glicocorticoides (cortisol em humanos e corticosterona em roedores) atuam diretamente sobre o hipotálamo e a adeno-hipófise para a regulação dos níveis plasmáticos de glicocorticoides. A secreção de CRH e ACTH é estimulada por baixos níveis de corticosterona (CORT), sendo inibida por níveis elevados deste hormônio (Feldman, 1997).

### **1.3.2. Regulação do eixo HHA pela amígdala e pelo hipocampo**

Os neurônios hipotalâmicos que secretam CRH são regulados pela amígdala e pelo hipocampo (Juruena, *et al.*, 2004). As informações sensoriais entram na amígdala basolateral, onde são processadas e transmitidas para os neurônios do núcleo central. Quando o núcleo central da amígdala é ativado, a resposta ao estresse é emitida ativando o eixo HHA. A ativação inapropriada da amígdala tem sido relacionada aos transtornos de ansiedade (Swanson & Petrovich, 1998). O eixo também é regulado pelo hipocampo, porém, sua ativação suprime, em vez de estimular, a liberação de CRH. O hipocampo contém receptores de glicocorticoides que são ativados pelo cortisol/corticosterona liberados pela adrenal em resposta à ativação do eixo. Assim, o hipocampo normalmente participa da regulação por retroalimentação do eixo, inibindo a liberação de CRH e a subsequente liberação de ACTH e cortisol/corticosterona quando estes estão em níveis muito altos (Herman & Cullinan, 1997) (Figura 4). A exposição contínua ao cortisol/corticosterona, entretanto, como ocorre nos períodos de estresse crônico, pode levar à disfunção e à morte de neurônios hipocampais. Assim, a degeneração do hipocampo cria um círculo vicioso no qual a resposta ao estresse torna-se mais pronunciada, levando a uma maior liberação de cortisol/corticosterona e mais

danos ao hipocampo (Issa *et al.*, 1990). Os transtornos da ansiedade têm sido relacionados tanto com a hiperatividade da amígdala quanto com a diminuição de atividade do hipocampo (Herman, *et al.*, 2005).

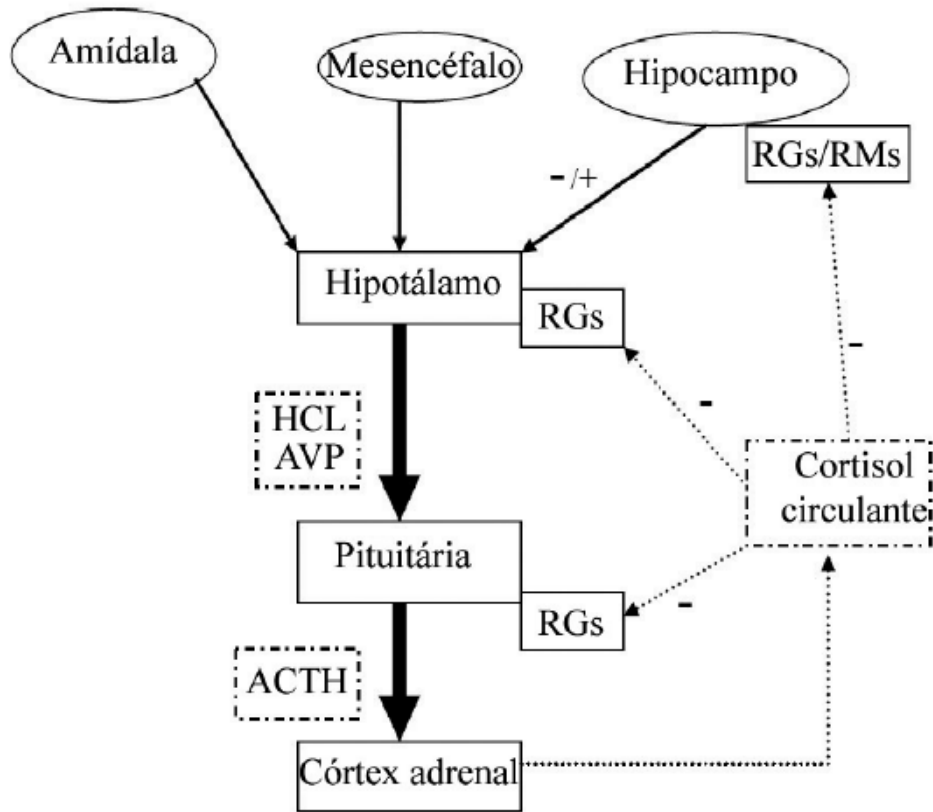


Figura 4: Diagrama esquemático da regulação do Hipocampo e Amígdala sobre o eixo HHA. Adaptado de Juruena, *et al.*, 2004.

As pressões e a competitividade da vida moderna têm feito com que as pessoas durmam cada vez menos. A redução do tempo de sono ou sua privação produzem efeitos danosos ao organismo, incluindo prejuízos cognitivos, aumento de irritabilidade e da liberação de cortisol/corticosterona e ACTH (Suchecki & Tufik 2000; Andersen *et al.* 2005a). Portanto, a utilização de métodos capazes de produzir privação prolongada de sono é de fundamental importância para investigar as alterações que essa condição pode causar no organismo.

### 1.3.3. Metirapona

A Metirapona (MET) pertence a um grupo de agentes farmacológicos designados "inibidores da biossíntese de esteróides adrenocorticais", entre os quais, incluem-se: mitotano, trilostano, cetoconazol e aminoglutetimida (Schimmer e Parker, 1996). Ela atua reduzindo a síntese de corticoides, inibindo a enzima P-450-esteróide-hidroxilase, que converte a 11-desoxicorticosterona e o 11-desoxicortisol em corticosterona e cortisol, respectivamente (Schimmer e Parker, 1996), sendo, portanto, usada para testar a integridade do eixo HHA (Neylan *et al.*, 2003).

A resposta mais característica ao estresse é a mediada pela ativação do eixo HHA, com consequente liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e corticoides (cortisol em humanos e corticosterona em ratos) na corrente sanguínea. Os estímulos ou situações que eliciam a síndrome de adaptação geral são denominados estressores e a resposta do organismo é a reação ao estresse (Graeff, 2004). É bem estabelecido na literatura que a privação de sono paradoxal (PSP) ativa o eixo HHA, promovendo o aumento dos níveis plasmáticos de CORT, como observado nos trabalhos de Suchecki, Tiba & Tufik, 2002; Machado, Tufik & Suchecki, 2013; Suchecki & Tufik, 2000; Andersen *et al.*, 2004b, 2005a. Em contrapartida, é sabido que os ataques de pânico, tanto em humanos quanto em ratos, não promovem ativação do eixo HHA (Armini *et al.*, 2015), sem que, no entanto, sejam compreendida a relação inversa. Dessa forma, o uso da MET faz-se necessário para avaliar a influência da corticosterona produzida pela ativação do eixo mediante a PSP, sobre os limiares de reação de defesa induzidos por estimulação elétrica da MCPD e CS.

A privação de sono é uma condição cada vez mais observada na sociedade moderna, o que resulta em vários efeitos neurocomportamentais. Este fato é suficientemente forte para garantir a importância da investigação sobre a relação entre privação de sono e ataques de

pânico. Portanto, considerando o exposto acima, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da PSP sobre os limiares da reação de defesa em um modelo experimental de ataques de pânico, gerados por meio de estimulação elétrica de estruturas notoriamente conhecidas como responsáveis pela eliciação dos comportamentos defensivos: a substância cinzenta periaquedutal e o colículo superior.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral:**

- Avaliar o efeito da PSP sobre os limiares da reação de defesa induzida pela estimulação elétrica da MCPD e CS e suas correlações neuroendócrinas.

### **2.2. Objetivos específicos:**

- Registrar e comparar os limiares da reação de defesa induzidos pela estimulação elétrica da MCPD e colículo superior nos diferentes momentos do protocolo de privação de sono: antes, após 48 e 96 h de privação, e após 48 e 96h da interrupção da privação.
- Dosar, no plasma, os níveis de CORT, relacionando-os com os registros comportamentais obtidos nas diferentes sessões: Antes da privação, após 48 e 96 h de privação, e após 48 e 96h de interrupção da privação.
- Avaliar a participação da CORT secretada durante a privação de sono sobre as possíveis alterações de limiares da reação de defesa induzidos pela estimulação elétrica da MCPD e colículo superior através do bloqueio na produção de CORT.



### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Animais**

Foram utilizados 160 ratos Wistar, pesando entre 250-300 g e organizados em 4 grupos com 40 animais cada, como se segue: **Grupo Controle (CTR)** que recebeu estimulações, porém não foi privado de sono; **Grupo Privação (PRV)**, que foi estimulado e privado por 96 horas; **Grupo Privação + Bloqueio da corticosterona (PRB)**, estimulado, privado por 96 horas e submetido à administração de Metirapona e **Grupo Controle + Bloqueio da corticosterona (CTB)**, que recebeu as estimulações, não foi privado de sono mas foi submetido à administração de MET. Os animais foram mantidos em caixas de privação de sono paradoxal padrão (Figura 7) com assoalho coberto com serragem e/ou água, dependendo do grupo e da fase do protocolo. Durante todo o experimento, os ratos tiveram livre acesso à água e comida, e permaneceram em ambiente com ciclo de iluminação de 12 h (luzes acesas às 6:00 h) e temperatura controlada (23-25°C).

#### **3.2. Confeção de Eletrodos**

Os eletrodos foram confeccionados com um fio de aço inoxidável de 250 µm de diâmetro, isolado em toda a sua extensão exceto na seção transversal de sua extremidade (Califórnia Fine Wire Company, Grover City, CA, EUA). Outro fio de aço inoxidável, não isolado, servia como eletrodo indiferente. Os eletrodos eram soldados a um soquete de circuito integrado (Celis, BCPT 50, São Paulo, SP, Brasil).

#### **3.3. Cirurgia**

Para o implante de eletrodos, os animais foram anestesiados com cetamina (70 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) intraperitoneal (ip) e fixados ao aparelho estereotáxico (David Koff, EUA) e cobertos com uma manta para evitar perda de calor. Em seguida, fazia-se assepsia da parte superior da cabeça com álcool 70° e então se removia uma pequena área oval de pele e

tecido subcutâneo, expondo a calota craniana na altura do lambda. Após a limpeza e secagem desta área, quatro orifícios eram feitos com o auxílio de uma broca odontológica (KG Sorensen 1016), um em cada osso parietal e dois no interparietal, para a fixação de pequenos parafusos de aço inoxidável que serviam de âncora para a prótese cirúrgica. Em seguida, o eletrodo era implantado num ângulo de 15° utilizando-se o bregma como referência ântero-posterior (-1,8mm), a linha mediana do cérebro como referência lateral (-2,6mm) e a uma profundidade de 5mm da superfície do córtex como referência vertical. Após a implantação do eletrodo, o campo cirúrgico era preenchido com resina acrílica autopolimerizável (JET, São Paulo, Brasil), soldando o eletrodo e os parafusos numa prótese sólida. Estas coordenadas correspondem àquelas da MCPD (Paxinos e Watson, 2013).

Ao término da cirurgia os animais receberam uma dose de 1mg/Kg de anti-inflamatório subcutâneo (Diclofenaco) e uma dose de 30mg/Kg de antibiótico (Ceftriaxona Sódica). Vinte e quatro horas após, uma 2ª dose de anti-inflamatório era aplicada. Para a recuperação da anestesia, por cerca de 2 horas, os animais foram alojados sobre chapas aquecidas, e então transferidos para as suas gaiolas no biotério, onde permaneceram durante toda a duração do experimento.



Figura 5: Rato com eletrodo implantado na MCPD dez dias após a cirurgia de implante. É possível observar o soquete com os dois polos onde o cabo de estimulação é plugado. **Fonte:** Arquivo pessoal

### 3.4. Estimulação Intracraniana e Privação de Sono Paradoxal (PSP)

Após 10 dias de recuperação das cirurgias, os animais de todos os grupos (CTR, PRV, PRB e CTB) eram colocados numa arena cilíndrica de acrílico transparente, com 60 cm de diâmetro e altura, onde recebiam as estimulações. Os animais eram submetidos a 5 sessões de estimulações, que eram distribuídas ao longo do protocolo experimental, como se segue: 1ª sessão - Triagem (TRI), 10 dias após a cirurgia de implantes; 2ª sessão - Privação de sono paradoxal por 48 horas (P48); 3ª sessão - Privação de sono paradoxal 96 horas (P96); 4ª sessão - 48 horas (R48) e 5ª sessão - 96 horas após retirada da privação de sono paradoxal (R96). (Fig. 6)

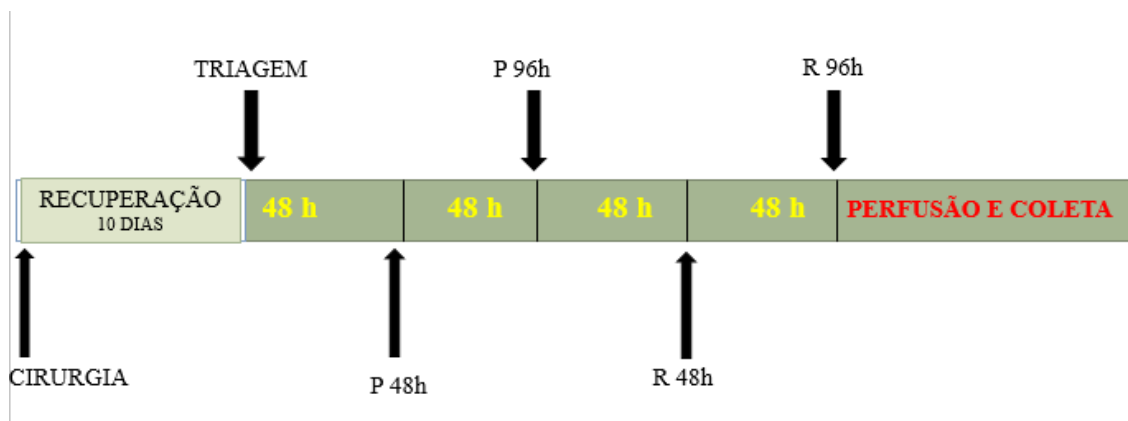


Figura 6: Linha temporal do protocolo experimental.



Figura 7: Montagem da estimulação elétrica intracraniana, onde pode-se observar o animal na arena de acrílico com eletrodo implantado conectado ao estimulador de pulso senoidal que é monitorado por um osciloscópio analógico. **Fonte:** Arquivo pessoal.

As estimulações elétricas foram feitas com pulso senoidal (60 Hz) utilizando intensidades crescentes de 0-70  $\mu\text{A}$ , em passos de 5  $\mu\text{A}$ , até a obtenção da resposta de fuga do tipo galope intenso e/ou salto. Todas as sessões foram realizadas na mesma arena, por meio de um cabo elétrico leve e flexível acoplado a um conector giratório. Os pulsos foram monitorados por meio de um osciloscópio (V-121 Hitachi-Denshi, Malásia).

O método de privação de sono utilizado no presente estudo baseia-se no modelo experimental aplicado por Andersen (2002, 2003a, 2003b, 2004a, 2004b, 2005) no qual os animais são colocados sobre plataformas presentes em um tanque preenchido com água. Este método faz uso da característica atonia muscular do sono paradoxal para promover a sua privação. Assim, por meio deste método, os animais são capazes de se comportar livremente, mover e interagir com outros animais durante a vigília, bem como a dormir quase normalmente. No entanto, cada vez que o animal entra em sono paradoxal, devido à atonia

muscular, cai da plataforma ou, mais comumente, toca o focinho na água, e, por conseguinte, acorda (Pires, *et al*, 2013).



Figura 8: Caixa de privação de sono paradoxal padrão, aberta à esquerda e fechada com tela à direita. Nível de água 1 cm abaixo do topo da plataforma. **Fonte:** Arquivo pessoal.

Durante os 10 dias de recuperação da cirurgia, o animal permanecia na gaiola com fundo forrado de maravalha, após este período, dava-se início ao protocolo de estimulação intracraniana com a 1ª sessão (TRI), para os grupos PRV e PRB. Após a qual a serragem da gaiola era substituída por uma lâmina d'água de 9 cm de altura (Figura 8), e o animal colocado em uma plataforma central de 6,5cm de diâmetro com 1cm acima da lâmina d'água. Os animais permaneciam por 48 horas até a 2ª sessão (P48), e mais 48 horas até a 3ª sessão (P96), quando então a água da gaiola era substituída por maravalha (Figura 9). Após 48 horas sem privação se procedia à 4ª sessão (R48h) e após mais 48 horas de recuperação a última sessão de estimulação (5ª R96). No caso dos grupos controles da privação, CTR e CTB, o assoalho da caixa esteve sempre coberto por maravalha (Figura 9).

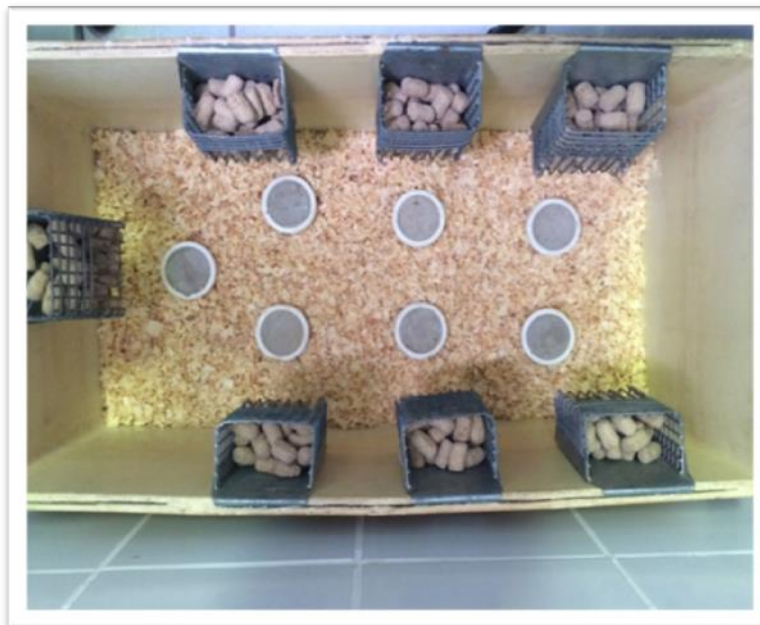


Figura 9: Caixa recuperação da privação de sono paradoxal, mostrando fundo forrado com maravalha, plataformas e comedouros. **Fonte:** Arquivo pessoal.

Durante a 1ª sessão, considerada triagem, os animais que, por algum motivo, não apresentaram reação de defesa (considerados negativos), não foram considerados para efeito de registro e comparação dos comportamentos, pois o experimento depende da eliciação das respostas defensivas para avaliar o efeito da privação e de sua retirada, bem como do tratamento com metirapona sobre os limiares das repostas. No entanto, estes animais "negativos" ainda assim foram úteis para a coleta de plasma para dosagens de corticosterona, evitando que utilizássemos outros animais exclusivamente para este fim.

### **3.5. Tratamento com Metirapona**

Nos grupos com bloqueio da corticosterona (CTB e PRB), os animais foram tratados com MET, duas vezes ao dia (às 7:00 h e 19:00 h) durante os quatro dias de privação do sono e imediatamente após o final do período de privação (às 7:00 h), metirapona (pó, Sigma Aldrich, Alemanha), sendo administrada na dose de 100 mg/kg, ip, diluído em propilenoglicol

morno, totalizando nove administrações. Os grupos que não receberam a Metirapona foram tratados com Salina 0,9%, ip.

### **3.6. Pesagem dos animais**

Os animais de todos os grupos experimentais foram pesados antes de cada sessão de estimulação elétrica, seus pesos foram registrados na planilha de estimulação elétrica (Anexo D).

### **3.7. Registros Comportamentais**

Após serem acoplados ao sistema de estimulação, os ratos foram colocados na arena, e aguardava-se 10 minutos para o início da estimulação para a sua habituação ao novo ambiente. Durante a estimulação, os comportamentos foram registrados de forma binária, como emitidos ou não (Anexo I), independentemente de sua frequência ou duração ao longo dos 20 segundos de estimulação.

Durante as sessões de estimulações foi dado um intervalo de 30 segundos entre cada estimulação, porém, quando o animal apresentava qualquer resposta defensiva (exoftalmia, imobilidade, defecação, micção, trote, galope e salto) aguardava-se 4 minutos para aplicar a intensidade subsequente, permitindo o retorno do animal ao estado de repouso (relaxamento). O registro dos comportamentos foi realizado em uma planilha (Anexo I) com os itens do etograma a seguir.

### 3.7.1. Etograma:

*Dormir* - Postura horizontal com olhos fechados e sem atividade olfativa, com relaxamento muscular indicado pelo rebaixamento do tronco, cabeça e pescoço e pela flexão dos membros.

*Repouso* - Postura horizontal com olhos abertos ou semiabertos, atividade olfativa reduzida e relaxamento muscular indicado pelo rebaixamento do tronco e pela flexão dos membros, e/ou rebaixamento da cabeça e pescoço. Com a cabeça erguida o rato assume uma "postura de esfinge".

*Olfação* - Jorros de atividade olfativa indicada pelo movimento do focinho e vibrissas.

*Esquadrinhar* - Exploração visuo-motora do ambiente caracterizada por movimentos laterais da cabeça, geralmente, acompanhados de olfação.

*Autolimpeza* - Postura ereta sobre as patas posteriores flexionadas ("rato sentado"), acompanhada da manipulação repetitiva e sequencial dos pelos da cabeça, tronco e genitálias, usando as patas dianteiras ou a boca.

*Levantar* - Postura ereta com extensão das patas posteriores.

*Marcha* - Locomoção lenta do animal, com movimentos de apoio e balanço em oposição de fase das patas contralaterais.

*Imobilidade Tensa* - Cessar brusco de todos os movimentos, exceto da respiração, frequentemente acompanhado da extensão dos membros, elevação do tronco, orelhas e pescoço e, às vezes, da cauda, indicando o aumento do tônus muscular. O cessar brusco das atividades pode resultar em posturas anômalas.

*Trote* - Locomoção rápida do animal ao longo do perímetro da arena (peritaxia) mantendo o padrão da marcha.



*Galope* - Locomoção muito rápida ao longo do perímetro da arena, alternando movimentos de apoio e projeção dos membros anteriores e posteriores.

*Saltos* - Impulso vertical ou oblíquo em direção à borda da arena.

*Exoftalmia* - Abertura máxima dos olhos, que assumem a forma esférica e cor brilhante, presumivelmente devido à maior entrada de luz.

*Defecação* - Eliminação de fezes.

*Micção* - Eliminação de urina.

### **3.8. Dosagens Bioquímicas**

#### **3.8.1. Coleta de Plasma**

A coleta de plasma para as dosagens hormonais de CORT foi feita nos 5 momentos de cada grupo (CTR, PRV, PRB e CTB). Imediatamente antes de cada sessão de estimulação (TRI, P48, P96, R48 e R96), 5 ratos de cada grupo foram anestesiados com cetamina (70 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) intraperitoneal (ip) para se proceder à coleta de plasma, sempre no período da manhã, entre 10 até 12 horas.

A coleta de sangue era realizada no momento da perfusão peristáltica, quando era realizada a retirada de sangue (1,5 ml) por punção cardíaca, utilizando-se solução de EDTA 1%. O sangue foi transferido para frascos eppendorfs e centrifugado em temperatura 4°C à 2 mil RPM por 10 min (Armini, *et al.*, 2015).

#### **3.8.2. Extração e quantificação da corticosterona**

A CORT foi extraída das amostras de plasma de acordo com o método utilizado por J. Velázquez-Moctezuma *et al.*, (2002) e Woodward & Emery, (1987): 1ml de plasma foi adicionado à 5 ml de uma mistura de éter etílico (Alphatec) e diclorometano (Vetec) (60:40,

v/v) e em seguida foi levado ao vórtex por 30 segundos. Após se proceder a mistura, a solução resultante foi centrifugada imediatamente a 600G por 5 minutos. O sobrenadante, 4 ml, era transferido para um segundo tubo e levado ao vórtex com 1ml de água grau HPLC (*High Performance/Pressure Liquide Chromatography*), por mais 30 segundos e então era centrifugado novamente a 600g por 5 minutos. O sobrenadante, 3 ml, era então evaporado à vácuo, por aproximadamente 50 minutos, e o resíduo era reconstituído em 100 µl de uma mistura de metanol (Sigma-Aldrich) - água (grau HPLC, 55:45, v/v).

Foram injetados 20 µL da amostra em um aparelho de HPLC usando uma coluna de fase reversa (The ShimadzuShim-pack "CLC(M)" 4.6 mm *i.d.* x 15 cm, 5µm tamanho da partícula) em um fluxo cromatográfico de 0,4ml/min. A fase móvel era composta de uma solução de Acetonitrila (Merk) em água mili-Q, na proporção 65:35 v/v, a qual foi submetida à filtração a vácuo com membrana de 0,22µm de porosidade (filtro PVDF - Aprolab).

### **3.9. Análise Histológica**

A análise histológica para a determinação das áreas cerebrais estimuladas foi feita conforme protocolo descrito em Bittencourt *et al.*, 2004, e com base nos diagramas coronais do atlas do cérebro de rato (Paxinos e Watson, 2013).

Ao término dos experimentos, os animais foram perfundidos por bomba de perfusão peristáltica para análise histológica dos cérebros. Após a exposição do coração, ligadura da aorta torácica, e um pequeno corte no átrio direito, foi introduzida uma agulha no ventrículo esquerdo do rato, por onde foi perfundido 100 ml de solução salina e 100ml de formaldeído a 10%. Os ratos foram decapitados e suas cabeças mantidas em formaldeído também a 10% por, pelo menos, 7 dias. Em seguida, os encéfalos foram retirados da caixa craniana e colocados em solução de formaldeído 10% (pH 7,6) por um período mínimo de 4 dias.

Em seguida, os encéfalos foram seccionados para obtenção de blocos da região mesencefálica. Os blocos foram posicionados em um criostato (Leica, CM1850, Wetzlar, Alemanha) e seccionados em cortes de 40µm de espessura, que foram estendidos em lâminas previamente gelatinizadas e desidratados. Em seguida, os cortes foram corados com vermelho neutro (Sigma, EUA) e as lâminas montadas com DPX (Aldrich Chemical Company, EUA). Os sítios estimulados foram identificados, fotografados por microscópio de baixo aumento (Leica DM 2500 acoplado a uma câmera DFC 300FX, Wetzlar, Alemanha) e registrados em diagramas coronais do atlas do cérebro de rato de Paxinos e Watson (2013).

### 3.10. Análise Estatística

As curvas de limiares das respostas individuais de defesa obtidas nas várias sessões de estimulação da MCPD e CS dos ratos (TRI, P48, P96, R48 e R96) foram comparadas entre si, bem como numa mesma sessão dos diferentes grupos (CTR PRV, PRB e CTB). Estas curvas de probabilidade de resposta foram obtidas por meio de ajuste logístico das frequências acumuladas de resposta em função do logaritmo das intensidades de corrente, conforme modelo descrito em Bittencourt *et al.*, (2004).

$$P(y_{ij}|x_{ij}) = [1 + \exp(-(\alpha_j + \beta_j x_{ij}))]^{-1}$$

Onde P é a probabilidade esperada da resposta  $y_{ij}$  para um dado estímulo  $x_{ij}$ ,  $\alpha_j$  é o intercepto e  $\beta_j$  a inclinação da *jésima* curva intensidade-resposta.

Ajustes logísticos significantes foram avaliados pelo qui-quadrado de Wald ( $\chi^2 = [\beta_j/EP]^2$ ), onde EP é o erro padrão do parâmetro de curvatura  $\beta_j$ . As curvas intensidade-resposta foram parametrizadas por meio de variáveis indicadoras (0 e 1) e comparadas através de testes de coincidência por razão de verossimilhanças, tanto para locação, quanto paralelismo das regressões. Segundo este método, as regressões são comparadas pela

diferença dos desvios de verossimilhança (*-Log Likelihooddeviances* ou *-2LogLD*) do modelo completo (*k* parâmetros) e dos respectivos modelos reduzidos (*k-r* parâmetros), proporcionando valores de  $\chi^2$  com *r* graus de liberdade ( $\chi^2_r$ ). Os  $\chi^2_r$  dos testes gerais de locação e paralelismo, assim como o  $\chi^2$  de Wald (descrito acima), foram considerados significantes ao nível de 5%. Os  $\chi^2_r$  dos testes pareados de locação e paralelismo (*r* = 1 g.l.) foram considerados significantes ao nível de 5% segundo o critério de Bonferroni (por exemplo: *p*=0,0125 para a comparação das 4 curvas de limiares). O ajuste por máxima verossimilhança foi realizado pelo procedimento "Logistic" do programa SAS (SAS®, Cary, EUA). As intensidades medianas (*I*<sub>50</sub>) assim como seu erro padrão (EP) e o respectivo intervalo de confiança (I.C. 95%) foram computados pelas fórmulas que se seguem,

$$\text{Log}(I_{50}) = -\alpha/\beta$$

$$I_{50} = 10^{-\alpha/\beta}$$

$$\text{EP}\{\text{Log}(I_{50})\} = \{[\text{Var}(\alpha) - 2(\alpha/\beta)\text{Cov}(\alpha, \beta) + (\alpha/\beta)^2\text{Var}(\beta)] / \beta^2\}^{1/2}$$

$$\text{EP}(I_{50}) = I_{50} \{\text{EP}[\text{Log}(I_{50})]\}$$

$$\text{I.C. 95\%}(I_{50}) = \pm 1,96 \{\text{EP}(I_{50})\}$$

Onde as variâncias (Var) e covariâncias (Cov) dos parâmetros foram obtidas pela matriz estimada de covariância do procedimento Logistic. A descrição detalhada destes métodos pode ser encontrada em Collett (2003).

A premissa básica do presente estudo considera que a estimulação elétrica da MCPD e CS é capaz de eliciar respostas defensivas, e a probabilidade de ocorrência desta resposta são dependentes da magnitude do estímulo, que por sua vez podem sofrer influência de diferentes intervenções do protocolo experimental. Em nosso modelo, estes aumentos seguem a função logística.

Os dados relativos à avaliação dos níveis de CORT nos diferentes tempos de privação e recuperação foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), e comparados, dentro de cada grupo, por análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Duncan. A avaliação do efeito dos tratamentos sobre os níveis de corticosterona em cada uma das sessões foi feita por ANOVA de duas vias, e verificou-se a diferença entre os grupos pelo teste de Duncan. Por fim, a variação de peso dos animais ao longo das sessões de estimulação elétrica foi comparada por ANOVA de medidas repetidas.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Histologia

Os sítios estimulados localizaram-se predominantemente na MCPD e nas camadas profundas do colículo superior. (Fig. 31)

#### MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL E COLÍCULO SUPERIOR

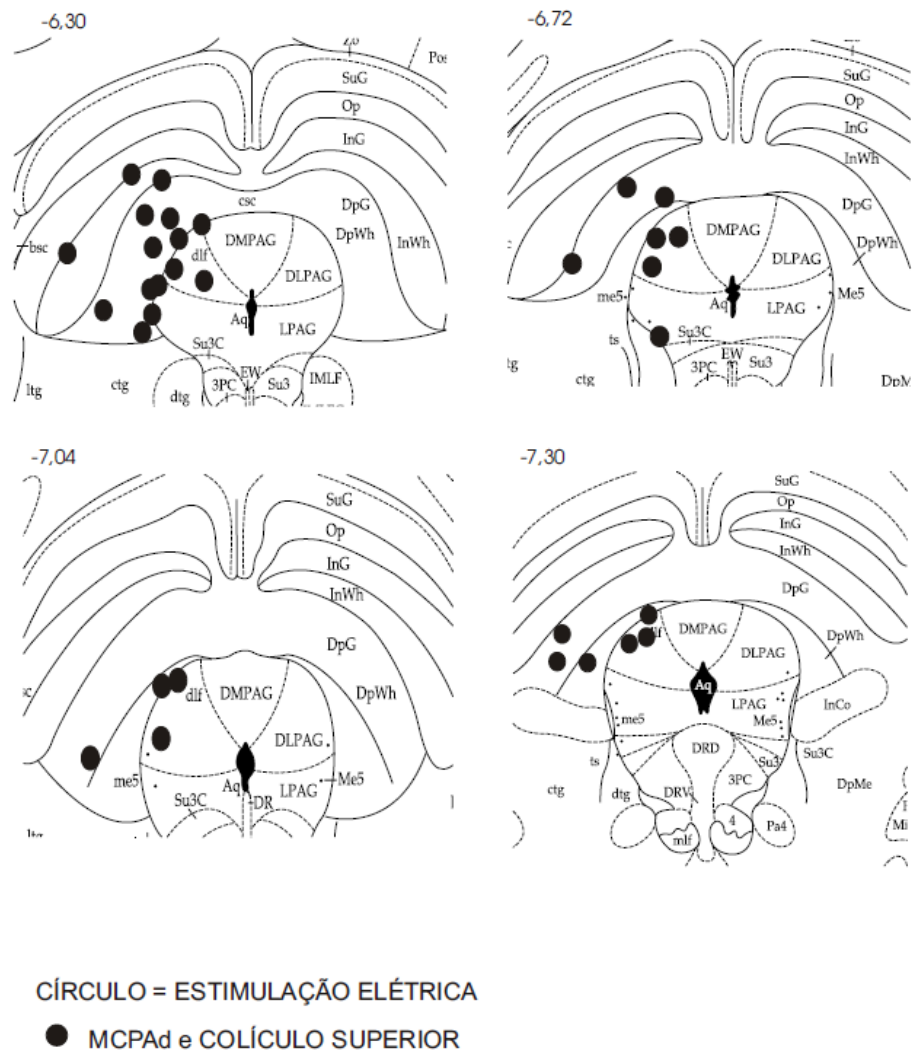


Figura 10. Localização dos eletrodos dos grupos CTR, PRV, CTB e PRB (N=15 animais em cada grupo). Os números representam as coordenadas anteroposteriores em relação ao bregma de cortes coronais do atlas do cérebro do rato de Paxinos e Watson (2013).

#### 4.2. Limiares medianos dos comportamentos defensivos obtidos nas respectivas sessões de estimulação do grupo controle (CTR)

Na análise dos limiares medianos das respostas defensivas obtidos com as diferentes sessões de estimulação da MCPD e CS do grupo controle, exceto pela micção, que apresentou aumento de 161,5% ( $\chi^2$ :19,666; 1g.l;  $p<0,05$ ) do limiar na sessão R48 em relação à TRI, P96 ( $\Delta I_{50}$ : +100%;  $\chi^2$ : 18,831; 1g.l;  $p<0,05$ ) e R96 ( $\Delta I_{50}$ : +73,5%;  $\chi^2$  : 10,613; 1g.l;  $p<0,05$ ) em relação a R48, as demais respostas não apresentaram qualquer diferença significativa quando comparados com as respectivas sessões triagem e entre si com  $p>0,005$  (figura 11 e 12).

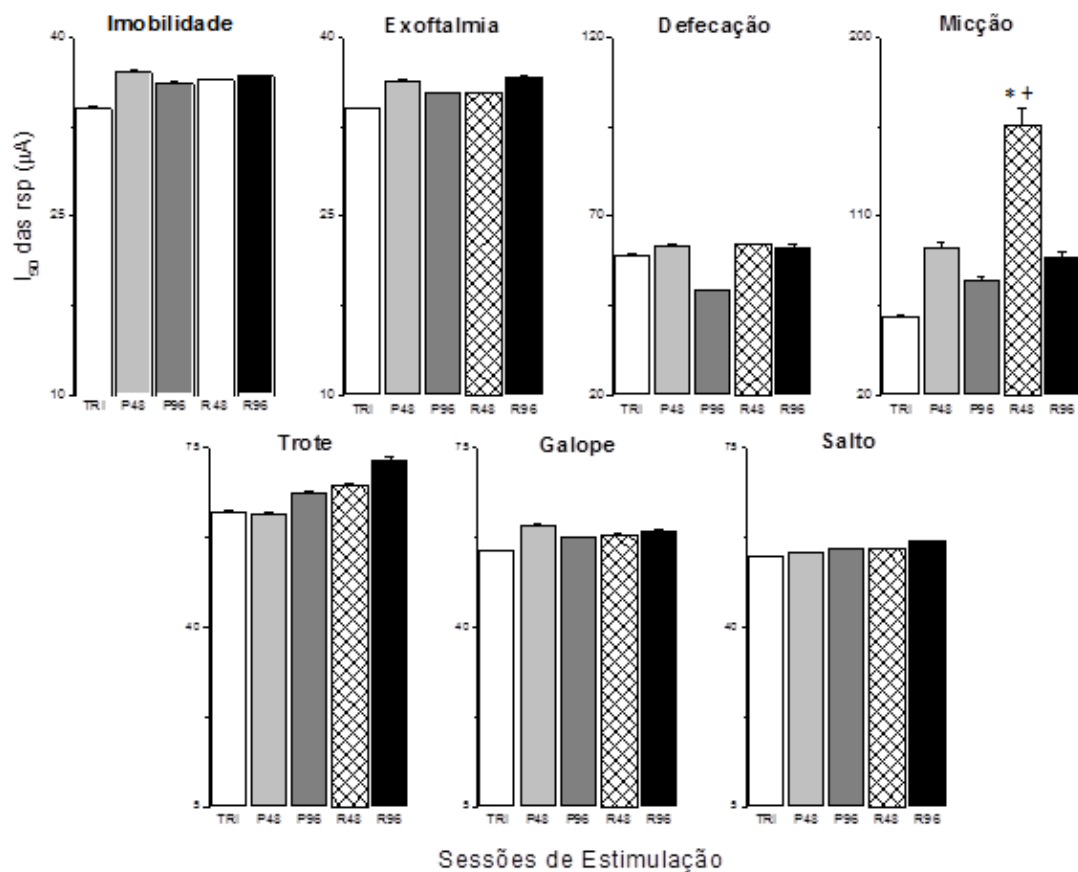


Figura 11: Valores de intensidade mediana ( $I_{50}$ ) obtidos para os comportamentos defensivos nas distintas sessões de estimulação elétrica da MCPD e CS no grupo CTR (N=15) (TRI; P48; P96; R48; R96). \*, + e o, mediana significativamente diferente na comparação com os respectivos comportamentos da sessão TRI, P96 e R48, respectivamente.

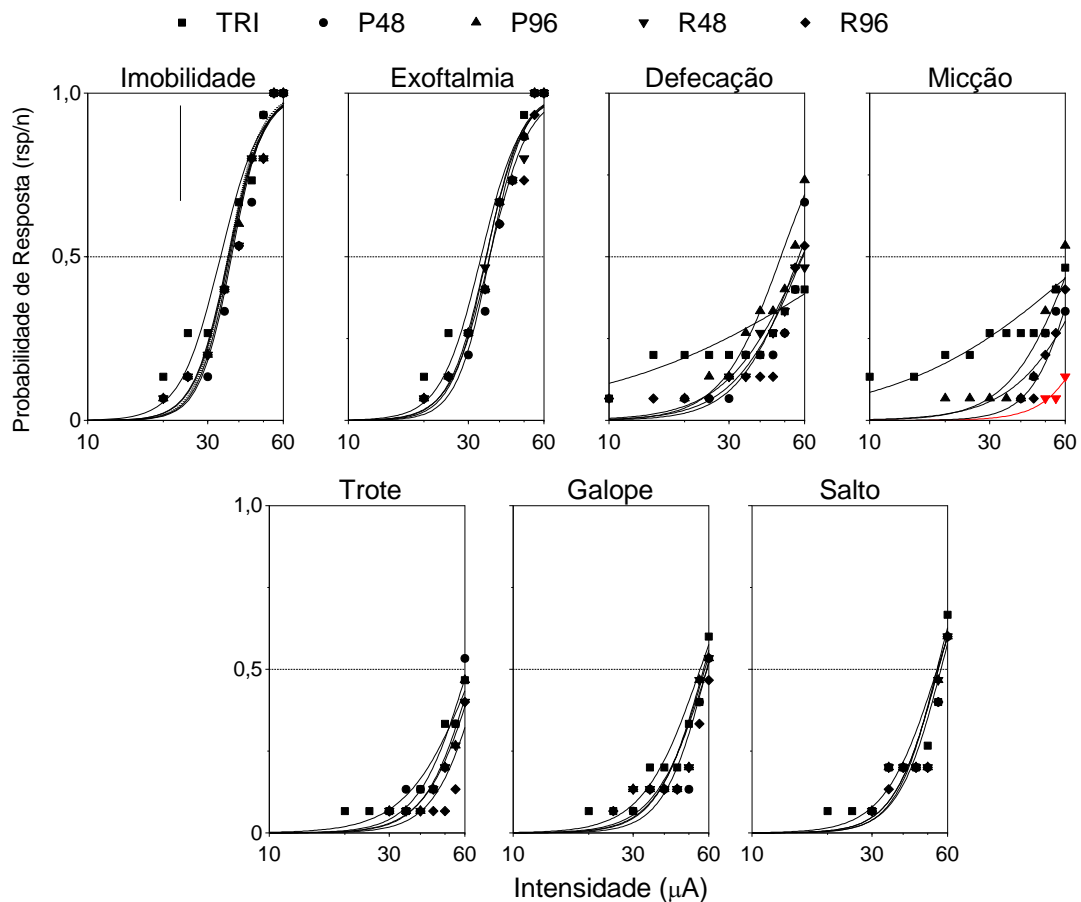


Figura 12: Curvas intensidade-resposta: limiares das respostas de defesa induzidas pela estimulação elétrica da MCPD e CS (N=15) nos animais do grupo CTR. As curvas intensidade-resposta representam o ajuste logístico das frequências acumuladas das respostas limiares (rsp, número de respostas, n, número de ratos estimulados) das sessões. Linha em vermelho indica diferença significativa na comparação com a TRI ( $p < 0,005$ , teste do  $X^2$  da razão de verossimilhanças).

#### 4.3. Limiares medianos dos comportamentos defensivos obtidos nas respectivas sessões de estimulação do grupo privação (PRV)

Na análise dos limiares medianos do Grupo PRV, pode-se observar nos comportamentos atencionais, IMO e EXO, bem como para o TRT e o SLT, que não houve alterações significativas. Em contraste, o comportamento de DEF apresentou um aumento significativo do limiar na sessão P48 ( $\Delta I_{50}$ : 49,4%;  $\chi^2$ : 8,055; 1g.l  $p < 0,001$ ), e foi virtualmente abolido em P96, pois a baixa frequência de resposta não permitiu ajuste significativo. Além



disso, reduções significativas em R48 ( $\Delta I_{50}$ : 59,3%;  $\chi^2$  :39,995; 1g.l  $p < 0,005$ ) e em R96 ( $\Delta I_{50}$ : 53,9%;  $\chi^2$ :43,009 ; 1g.l  $p < 0,005$ ) foram observadas quando comparados com a TRI. A análise do comportamento de MIC mostra que não houve ajuste logístico nas sessões P48 e R48, havendo aumento dos limiares medianos em P96 ( $\Delta I_{50}$ : 60,6%;  $\chi^2$  : 10,818; 1g.l  $p < 0,001$ ) (Figuras 13 e 14).

Adicionalmente, para o comportamento GLP, percebe-se uma notável e significativa diferença nas sessões R48 e R96, tendo o limiar para tal resposta reduzido em 22,5% e 30,4% ( $\chi^2$ : 9,825/17,254; 1g.l  $p < 0,005$ ), respectivamente. Pode-se notar que uma tendência de redução de limiar (14,5%) já é observada em P96, porém, esta não é estatisticamente significativa. (Figuras 13 e 14)

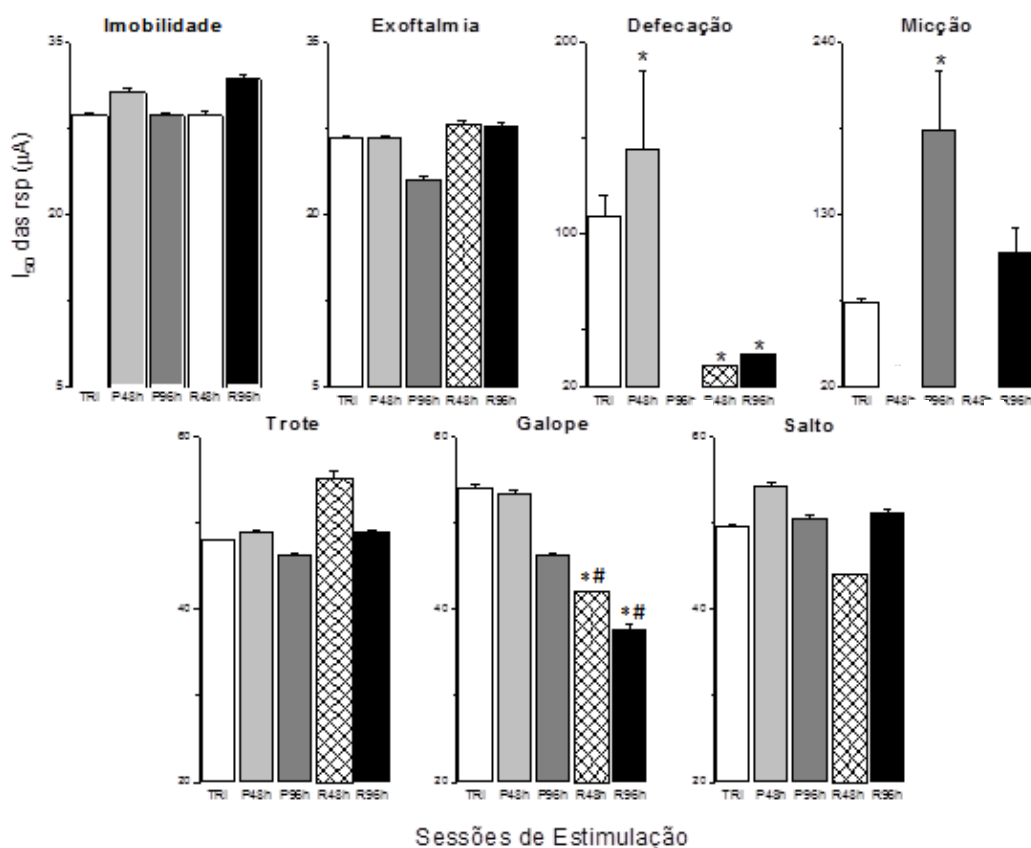


Figura 13: Valores de intensidade mediana ( $I_{50}$ ) obtidos para os comportamentos defensivos nas distintas sessões de estimulação elétrica da MCPD e CS no grupo PRV (N=15) (TRI; P48; P96; R48; R96). \* e #, medianas significativamente diferentes na comparação com os respectivos comportamentos da sessão TRI e P48, respectivamente. ( $p < 0,005$ , teste do  $X^2$  da razão de verossimilhanças).

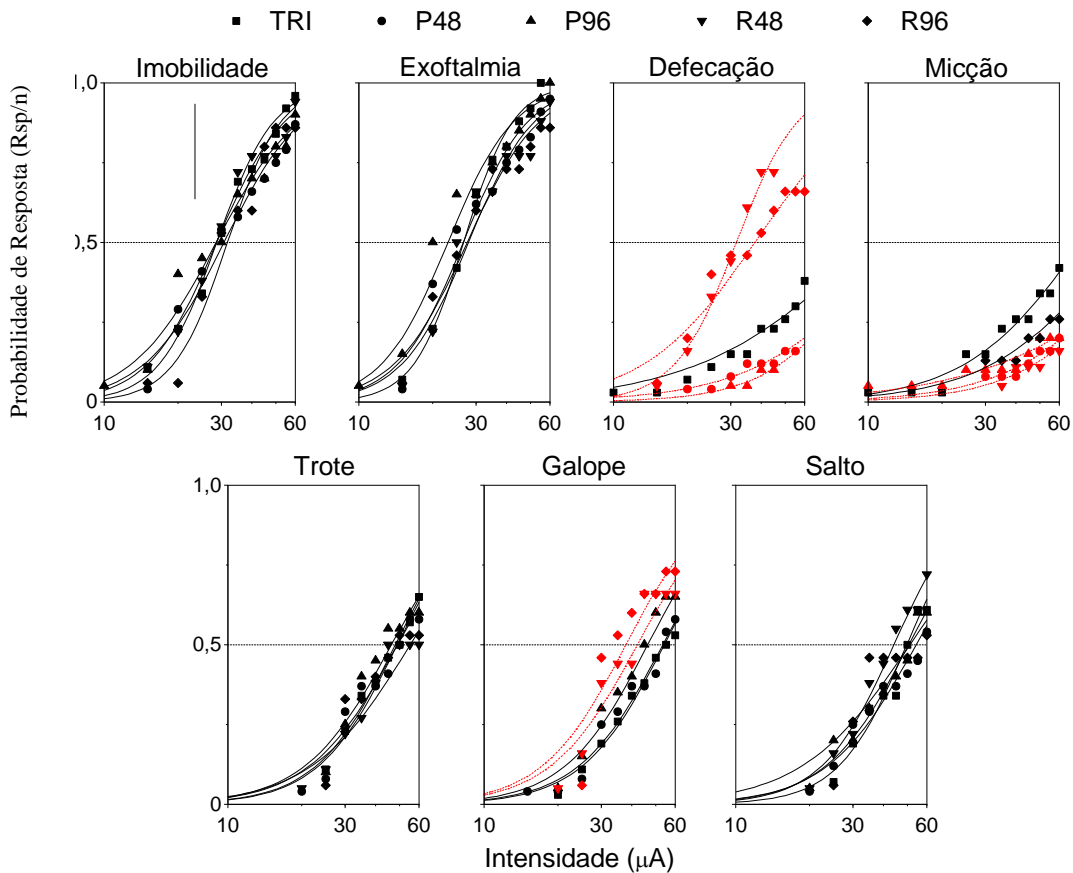


Figura 14. Curvas intensidade-resposta: Efeitos da PSP sobre os limiares das respostas de defesa induzidas pela estimulação elétrica da MCPD e CS (N=15) nos animais do grupo PRV. As curvas intensidade-resposta representam o ajuste logístico das frequências acumuladas das respostas limiares (rsp, número de respostas, n, número de ratos estimulados) das sessões. Linhas em vermelho indicam diferenças significativas das demais sessões em relação à sessão de TRI ( $p < 0,005$ , teste do  $\chi^2$  da razão de verossimilhanças).

#### 4.4. Limiares medianos dos comportamentos defensivos obtidos nas respectivas sessões de estimulação do grupo controle com bloqueio (CTB)

No grupo controle com bloqueio da corticosterona por metirapona, na comparação com a sessão TRI, analisando as demais sessões, se observa que os comportamentos atencionais, IMO e EXO, não foram alterados, assim como o comportamento de fuga SLT. Em contraste, o comportamento de DEF teve uma redução significativa em P96 ( $\Delta I_{50}$ : 39,2%;  $\chi^2$ : 19,056;  $p < 0,001$ ) e R48 ( $\Delta I_{50}$ : 31%;  $\chi^2$ : 10,102;  $p < 0,001$ ). A sessão P96 também se mostrou estatisticamente menor que P48 ( $\Delta I_{50}$ : -32,8%;  $\chi^2$ : 11,580; 1g.l  $p < 0,005$ ). Já no

comportamento de MIC, houve um aumento significativo do limiar mediano apenas na sessão P48 ( $\Delta I_{50}$ : 41,2%;  $\chi^2$ :11,263; 1g.1  $p<0,001$ ), porém sem diferir significativamente nas demais sessões. Para o comportamento TRT, observa-se aumento do limiar mediano em P48 ( $\Delta I_{50}$ : 34,9%;  $\chi^2$ : 10,856; 1g.1  $p< 0,001$ ) e P96 ( $\Delta I_{50}$ : 30,8%;  $\chi^2$ : 9,472; 1g.1  $p<0,001$ ). Notavelmente, no comportamento de GLP, houve aumento expressivamente significativo em P96 ( $\Delta I_{50}$ : 95,5%;  $\chi^2$ : 38,910; 1g. 1  $p<0,001$ ) e um menor, porém também significante em R48 ( $\Delta I_{50}$ : 33,4%;  $\chi^2$ : 9,621; 1g. 1  $p<0,001$ ) e R96 ( $\Delta I_{50}$ : 40,8%,  $\chi^2$ : 13,184; 1g. 1  $p<0,001$ ), respectivamente. (Figuras 15 e 16).

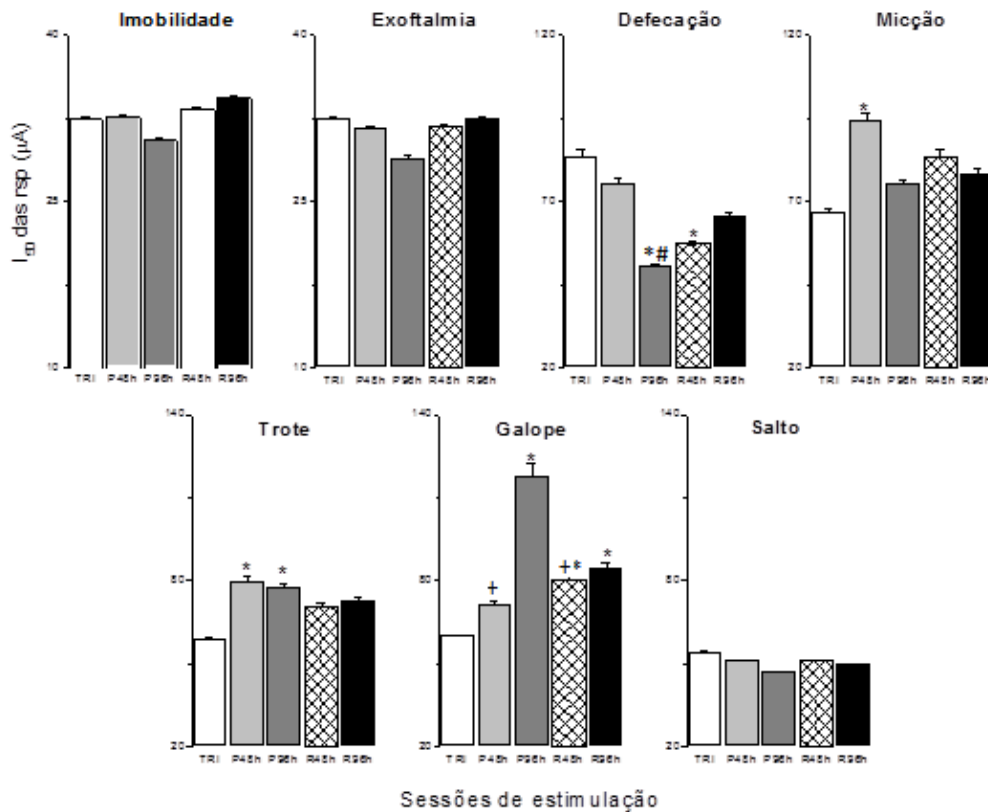


Figura 15: Valores de intensidade mediana ( $I_{50}$ ) obtidos para os comportamentos defensivos nas distintas sessões de estimulação elétrica da MCPD e CS no grupo CTB (TRI; P48; P96; R48; R96). \* medianas significativamente diferentes na comparação com os respectivos comportamentos da sessão TRI, # e +, medianas diferentes respectivamente de P48 e P96 ( $p< 0,005$ , teste do  $X^2$  da razão de verossimilhanças).

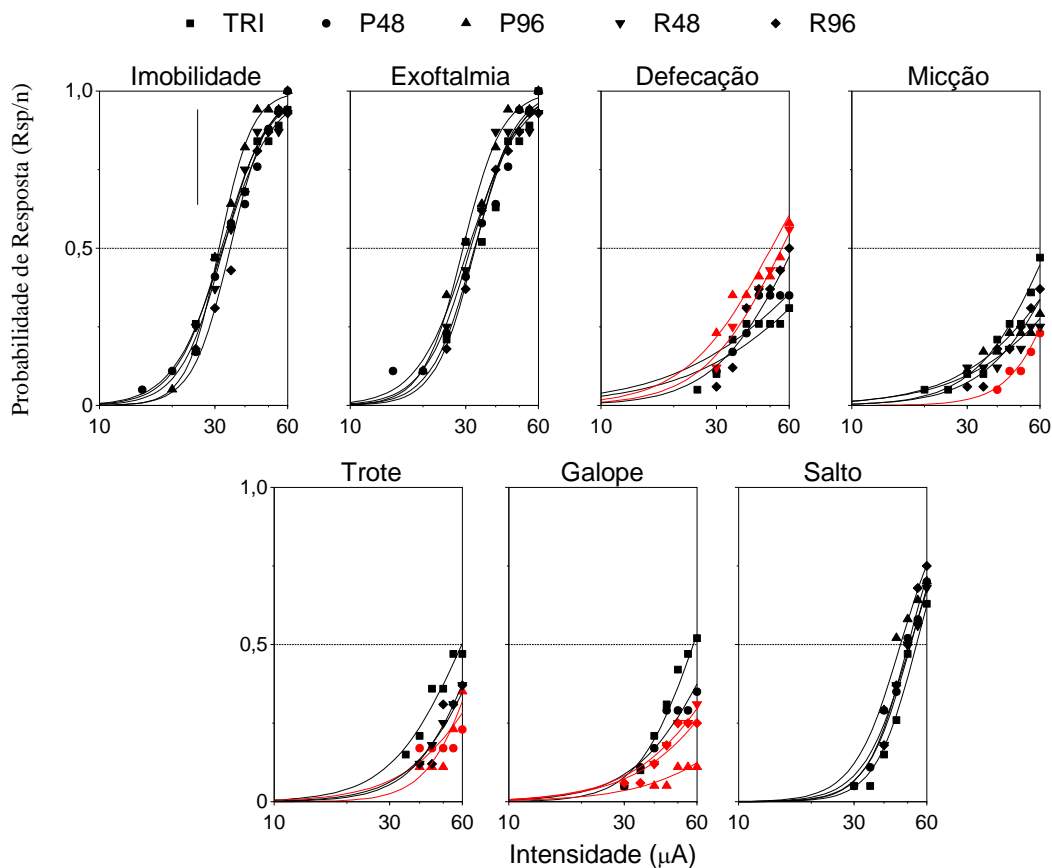


Figura 16: Curvas intensidade-resposta: limiares das respostas de defesa induzidas pela estimulação elétrica da MCPD e CS (N=15) dos animais no grupo CTB. As curvas intensidade-resposta representam o ajuste logístico das frequências acumuladas das respostas limiares (rsp, número de respostas, n, número de ratos estimulados) das sessões. Linhas em vermelho indicam diferenças significativas das demais sessões em relação à sessão de TRI ( $p < 0,005$ , teste do  $\chi^2$  da razão de verossimilhanças).

#### 4.5. Limiares medianos dos comportamentos defensivos obtidos nas respectivas sessões de estimulação do grupo privação com bloqueio (PRB)

Com exceção da resposta de TRT, que apresentou notável aumento em P48 ( $\Delta I_{50}$ : 46,6%;  $\chi^2$ : 17,205;  $p < 0,005$ ), R48 ( $\Delta I_{50}$ : 66,9%;  $\chi^2$ : 16,415; 1g. 1  $p < 0,005$ ) e R96 ( $\Delta I_{50}$ : 93,9%;  $\chi^2$ : 31,564; 1g. 1  $p < 0,005$ ) em relação à TRI, as respostas de IMO, EXO, MIC, GLP e SLT, não apresentaram diferenças significativas em relação à mesma sessão. Entretanto, no galope, em relação à P48, as sessões R48 ( $\Delta I_{50}$ : 25,6%;  $\chi^2$ : 9,953; 1g. 1  $p < 0,005$ ) e R96 ( $\Delta I_{50}$ : 23,2%;

$\chi^2$ : 9,453; 1g. 1  $p < 0,005$ ) apresentaram limiares significativamente maiores. Já no comportamento de salto, a única diferença observada foi um maior limiar mediano na sessão R96 em comparação com P96 ( $\Delta I_{50}$ : 18,7%;  $\chi^2$ : 8,360; 1g. 1  $p < 0,005$ ).

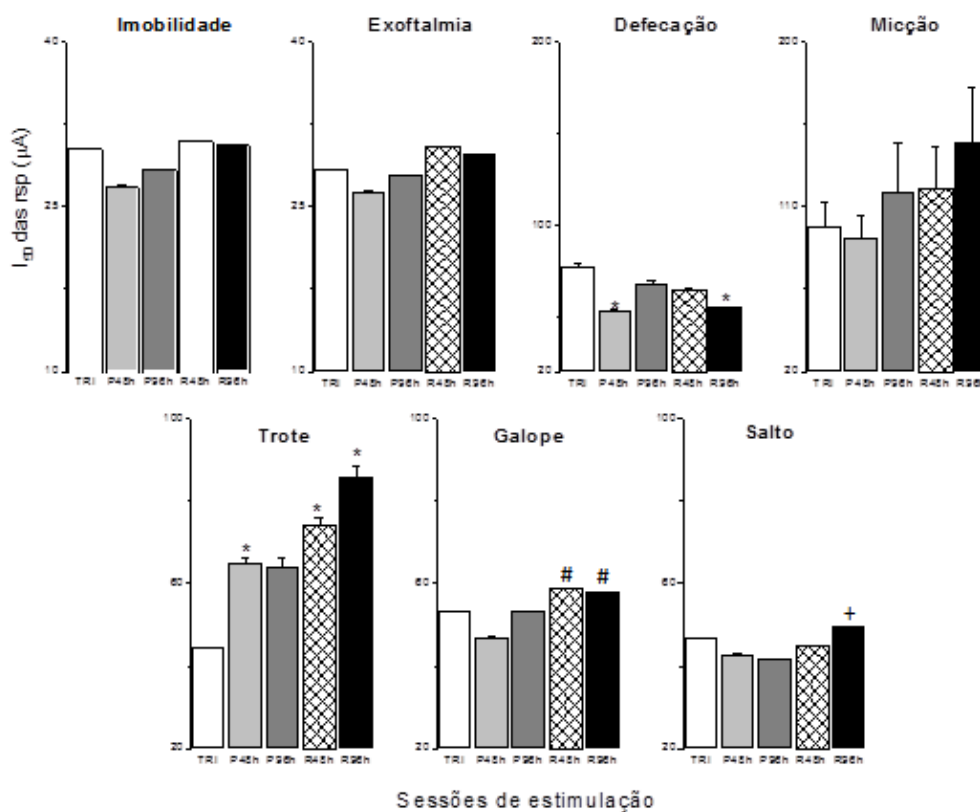


Figura 17: Valores de intensidade mediana ( $I_{50}$ ) obtidos para os comportamentos defensivos nas distintas sessões de estimulação elétrica da MCPD e CS no grupo PRB (TRI; P48; P96; R48; R96). \* medianas significativamente diferentes na comparação com os respectivos comportamentos da sessão TRI, # e +, medianas diferentes respectivamente de P48 e P96 ( $p < 0,005$ , teste do  $X^2$  da razão de verossimilhanças).

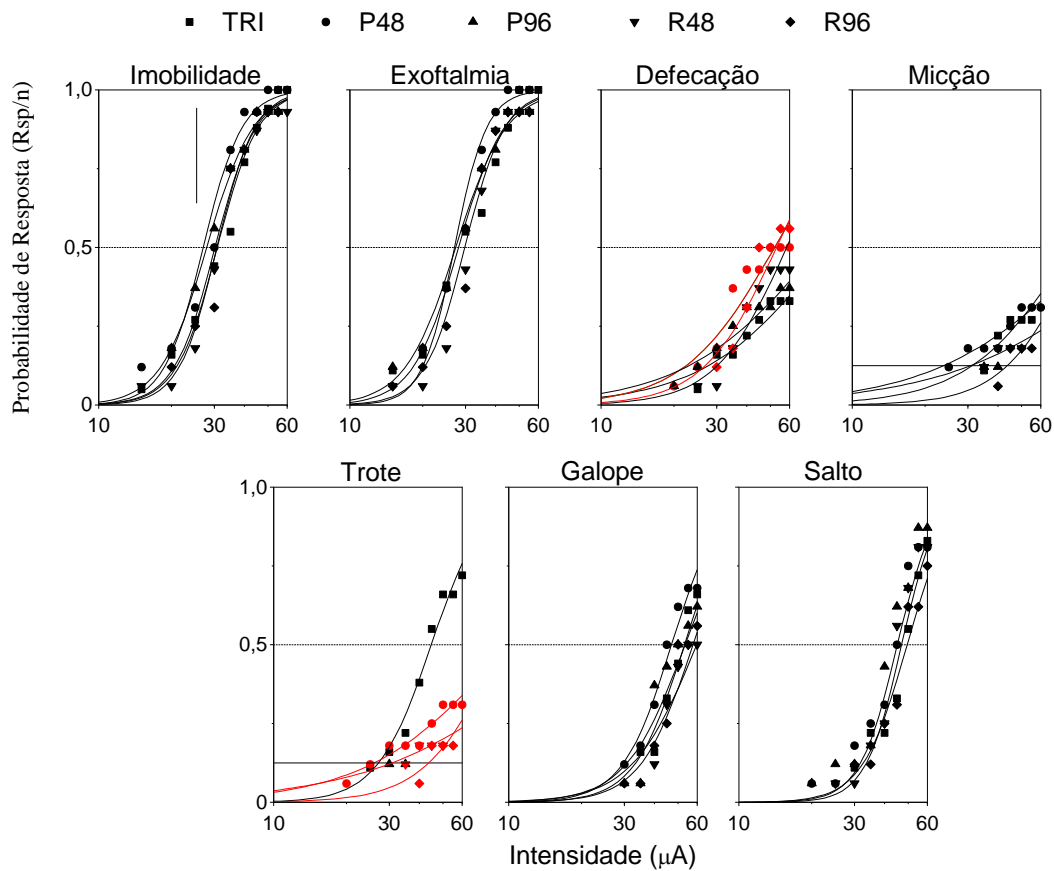


Figura 18: Curvas intensidade-resposta: Efeitos da PSP sobre os limiares das respostas de defesa induzidas pela estimulação elétrica da MCPD e CS (N=15) no grupo PRB. As curvas intensidade-resposta representam o ajuste logístico das frequências acumuladas das respostas limiares ( $r$ , número de respostas,  $n$ , número de ratos estimulados) das sessões. Linhas em vermelho indicam diferenças significativas das demais sessões em relação à sessão de TRI ( $p < 0,005$ , teste do  $X^2$  da razão de verossimilhanças).

#### 4.6. Comparação entre os limiares medianos ( $I_{50}$ ) da imobilidade obtidos em cada sessão de estimulação elétrica da MCPD e CS (TRI; P48; P96; R48; R96) dos diferentes grupos experimentais (CTR, CTB, PRV e PRB).

Na comparação do comportamento de Imobilidade entre os grupos para cada sessão de estimulação da MCPD, observa-se que somente o grupo PRB apresentou diferença estatisticamente significativa, quando comparado aos demais grupos. Na sessão de estimulação P48, PRB apresentou um limiar da corrente mediana inferior aos dos grupos CTR, PRV e CTB ( $\Delta I_{50}$ : 27%, 19,8% e 18,2%;  $\chi^2$ : 26,356/8,744/9,613; 1g. 1  $p < 0,008$ ). Enquanto nas

sessões P96 e R96, PRB apresentou redução do limiar da corrente mediana significativa somente quando comparado com o grupo CTR ( $\Delta I_{50}$ : 21,6% e 15,3%;  $\chi^2$ : 13,835 e 7,942; 1g. 1  $p < 0,008$ ). (Fig. 19).

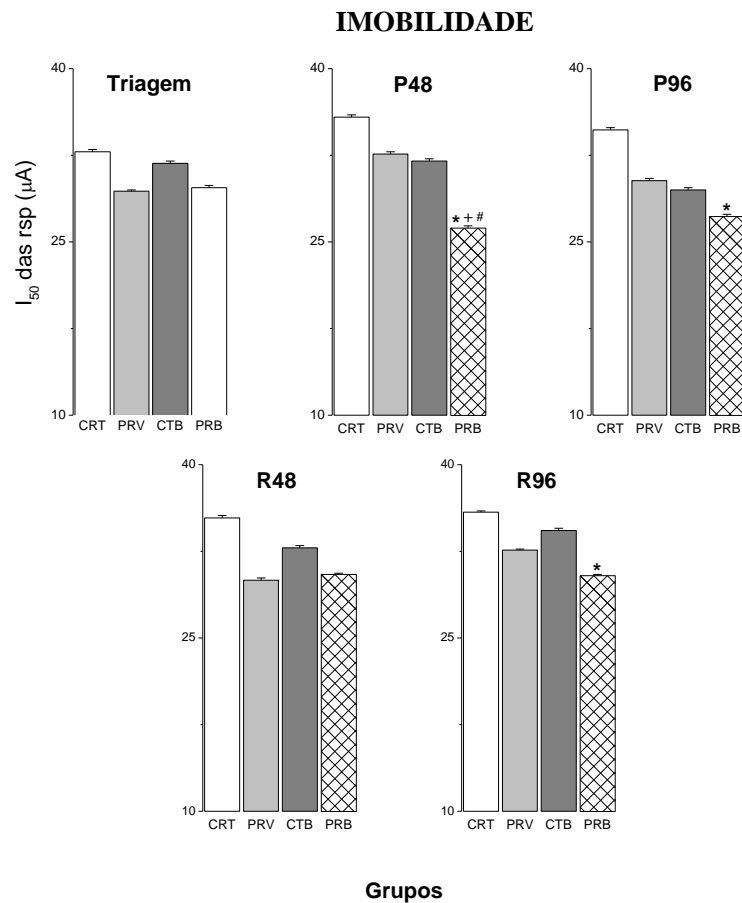


Figura 19: Comparação dos valores de intensidade mediana ( $I_{50}$ ) do comportamento de Imobilidade entre os grupos experimentais. (CTR; PRV; CTB; PRB), em cada sessão de estimulação da MCPD e CS. \*, #, + mediana significativamente diferente na comparação com os grupos CTR, CTB, PRV, respectivamente. ( $p < 0,008$ , teste do  $X^2$  da razão de verossimilhanças).

**4.7. Comparação entre os limiares medianos ( $I_{50}$ ) da exoftalmia obtidos em cada sessão de estimulação elétrica da MCPD e CS (TRI; P48; P96; R48; R96) dos diferentes grupos experimentais (CTR, CTB, PRV e PRB).**

Em EXO, o grupo PRV foi estatisticamente igual ao grupo PRB em todas as sessões de estimulação elétrica, tendo sua  $I_{50}$  reduzida quando comparado ao grupo CTR nas sessões TRI, P48 e P96 ( $\Delta I_{50}$ : -18,5%, -21,1% e -29,7%;  $\chi^2$ : 10,64/12,917 e 22,751; 1g. 1  $p < 0,008$ , respectivamente). Já o grupo CTB apresentou diferença estatística significativa em relação ao CTR somente na sessão de P96, tendo um aumento do limiar da corrente mediana em 95,4% ( $\chi^2$ : 90,355; 1g. 1  $p < 0,008$ ). Adicionalmente, nas sessões de privação de sono, P48 e P96, o grupo PRB apresentou redução do limiar em 18,4% e 59,0% ( $\chi^2$ : 9,32 e 112,432; 1g. 1  $p < 0,008$ ), respectivamente, quando foi comparado com seu controle (CTB).

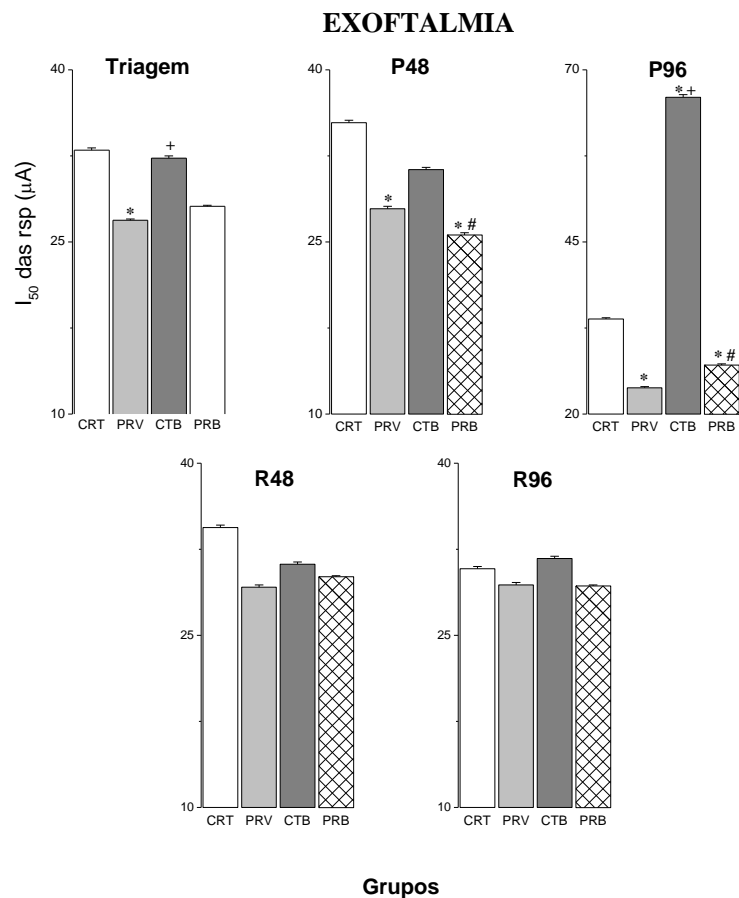




Figura 20: Comparação dos valores de intensidade mediana ( $I_{50}$ ) do comportamento de Exoftalmia entre os grupos experimentais. (CTR; PRV; CTB; PRB), em cada sessão de estimulação da MCPD e CS. \*, #, + mediana significativamente diferente na comparação com os grupos CTR, CTB, PRV, respectivamente. ( $p < 0,008$ , teste do  $X^2$  da razão de verossimilhanças).

#### **4.8. Comparação entre os limiares medianos ( $I_{50}$ ) da defecação obtidos em cada sessão de estimulação elétrica da MCPD e CS (TRI; P48; P96; R48; R96) dos diferentes grupos experimentais (CTR, CTB, PRV e PRB).**

Para o comportamento de Defecação, em P48 e P96, o grupo PRV apresentou um aumento no limiar da corrente mediana quando comparado ao grupo CTR ( $\Delta I_{50}$ : 52,3% e 105,3%;  $\chi^2$ : 9,015/17,643; 1g. 1  $p < 0,008$ ), apresentando redução nas sessões R48 e R96 ( $\Delta I_{50}$ : 46,3% e 37%;  $\chi^2$ : 34,937/22,847; 1g. 1  $p < 0,008$ ). Já para o grupo PRB a resposta foi facilitada em relação ao grupo PRV em P48 e P96 ( $\Delta I_{50}$ : -44,8% e -37,2%;  $\chi^2$ : 24,757/10,284; 1g. 1  $p < 0,008$ ), sendo dificultada nas sessões R48 e R96 ( $\Delta I_{50}$ : +81,7 e +42,2%;  $\chi^2$ : 32,546/12,302; 1g. 1  $p < 0,008$ ). Os grupos PRV e PRB foram estatisticamente iguais em todas as sessões para a defecação e na sessão TRI todos os grupos foram estatisticamente iguais. (Figura 21)

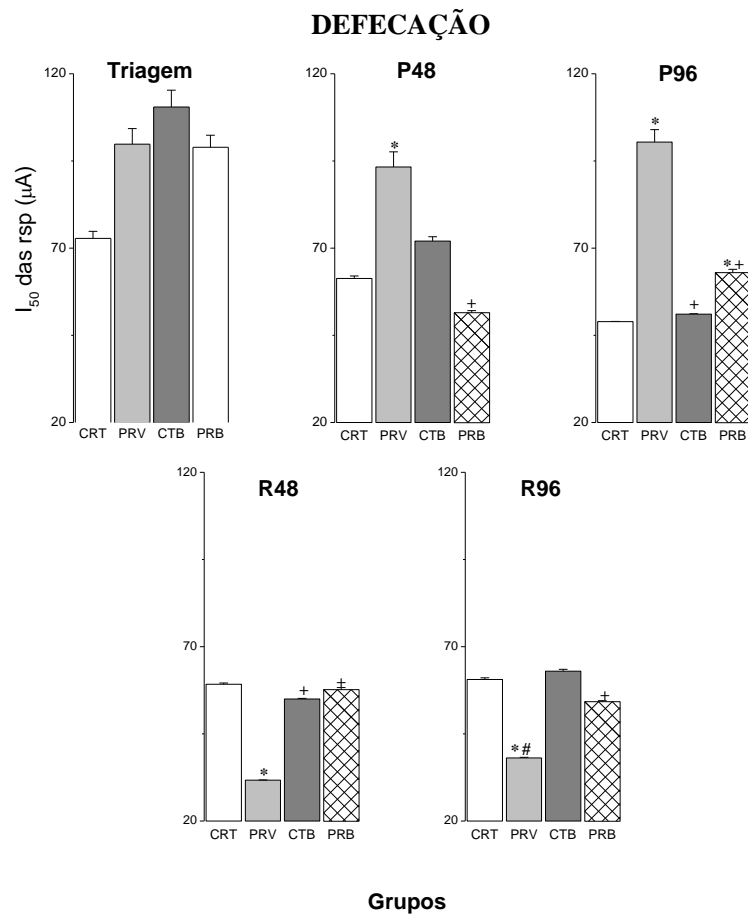


Figura 21: Comparação dos valores de intensidade mediana ( $I_{50}$ ) do comportamento de Defecação entre os grupos experimentais. (CTR; PRV; CTB; PRB), em cada sessão de estimulação da MCPD e CS. \*, #, + mediana significativamente diferente na comparação com os grupos CTR, CTB, PRV, respectivamente. ( $p < 0,008$ , teste do  $X^2$  da razão de verossimilhanças).

**4.9. Comparação entre os limiares medianos ( $I_{50}$ ) da micção obtidos em cada sessão de estimulação elétrica da MCPD e CS (TRI; P48; P96; R48; R96) dos diferentes grupos experimentais (CTR, CTB, PRV e PRB).**

Para o comportamento de Micção, não houve diferença estatística entre os grupos nas sessões de estimulação elétrica conforme a figura 22.

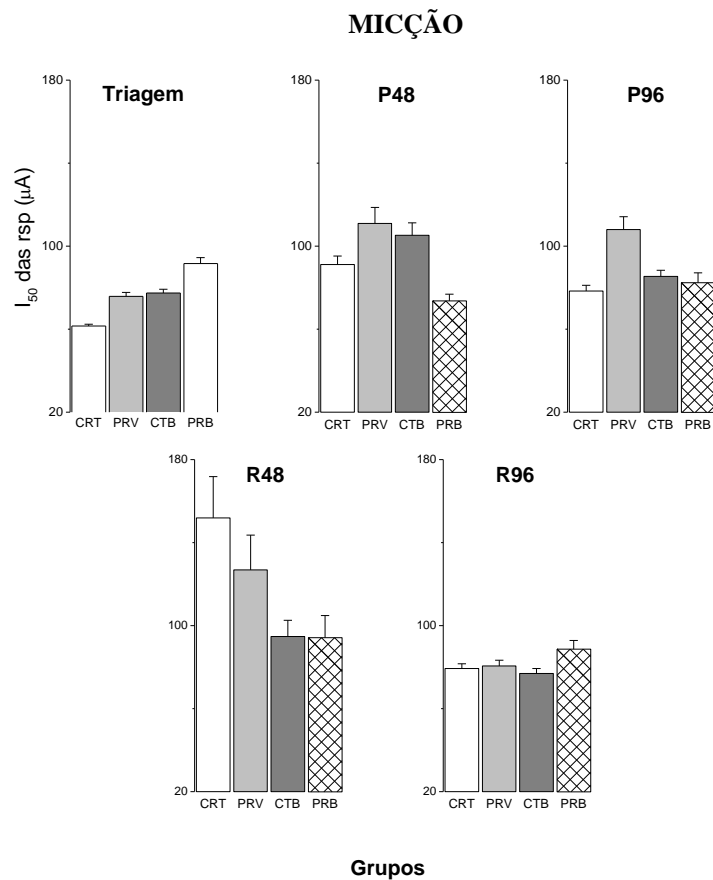


Figura 22: Valores de intensidade mediana ( $I_{50}$ ) obtidos nas sessões de estimulação elétrica da MCPD e CS para o comportamento de Micção nos 4 grupos. (CTR; PRV; CTB; PRB). Não foi observada diferença estatística ( $p < 0,008$ , teste do  $X^2$  da razão de verossimilhanças).

#### 4.10. Comparação entre os limiares medianos ( $I_{50}$ ) do trote obtidos em cada sessão de estimulação elétrica da MCPD e CS (TRI; P48; P96; R48; R96) dos diferentes grupos experimentais (CTR, CTB, PRV e PRB).

Para o comportamento TRT, o grupo PRV apresentou redução do limiar da corrente mediana quando comparado ao CTR e CTB (em relação ao CTR -  $\Delta I_{50}$ : -26,8, -27,6, -34,5, -29,9 e -39,6%;  $\chi^2$ : 16,895/13,931/25,427/13,109/28,637; 1g. 1  $p < 0,008$  em relação ao CTB -  $\Delta I_{50}$ : -20,0, -41,8, -40,9, -27,8 e -34,4%;  $\chi^2$ : 9,557/33,44/36,975/9,026/17,214; 1g. 1  $p < 0,008$ ) nas respectivas sessões de estimulação. Em contraste, no grupo PRB a resposta de TRT foi dificultada em relação ao grupo PRV nas sessões P48 ( $\Delta I_{50}$ : +37,0%;  $\chi^2$ : 11,673; 1g. 1

p<0,008), R48 ( $\Delta I_{50}$ : +45,5%;  $\chi^2$ : 9,939; 1g. 1 p<0,008) e R96 ( $\Delta I_{50}$ : +73,7;  $\chi^2$ : 21,047; 1g. 1 p<0,008).

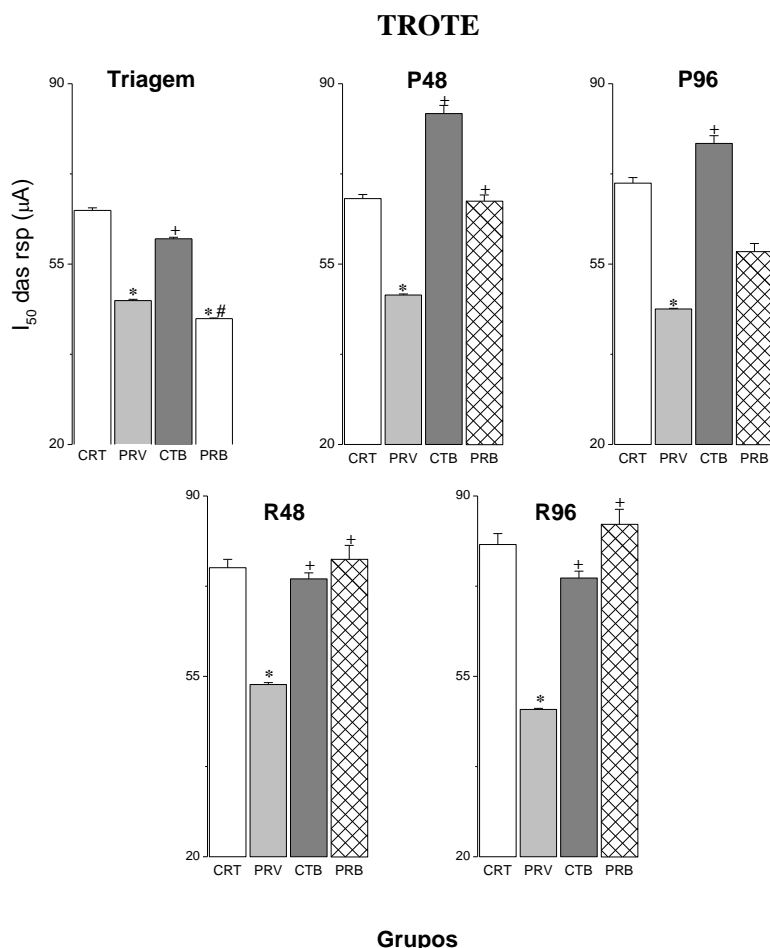


Figura 23: Comparação dos valores de intensidade mediana ( $I_{50}$ ) do comportamento de Trote entre os grupos experimentais. (CTR; PRV; CTB; PRB), em cada sessão de estimulação da MCPD e CS. \*, #, + mediana significativamente diferente na comparação com os grupos CTR, CTB, PRV, respectivamente. (p< 0,008, teste do  $X^2$  da razão de verossimilhanças).

#### 4.11. Comparação entre os limiares medianos ( $I_{50}$ ) do galope obtidos em cada sessão de estimulação elétrica da MCPD e CS (TRI; P48; P96; R48; R96) dos diferentes grupos experimentais (CTR, CTB, PRV e PRB).

O comportamento de GLP foi igual para todos os grupos na sessão TRI. Entretanto, o grupo PRV teve o limiar reduzido em relação ao grupo CTR nas sessões R48 ( $\Delta I_{50}$ : -30,5%;

$\chi^2$ : 19,171; 1g. 1  $p < 0,008$ ) e R96 ( $\Delta I_{50}$ : -36,9%;  $\chi^2$ : 30,413; 1g. 1  $p < 0,008$ ) e em relação ao CTB ( $\Delta I_{50}$ : -24,7, -59,5, -46,5 e -51,9%;  $\chi^2$ : 13,135/73,818/44,108/63,715; 1g. 1  $p < 0,008$ ) em todas as sessões, exceto na TRI. Já o grupo PRB, apresentou redução do limiar da corrente mediana quando comparado ao grupo CTB nas sessões P48 ( $\Delta I_{50}$ : -31,8%,  $\chi^2$ : 23,007; 1g. 1  $p < 0,008$ ), P96 ( $\Delta I_{50}$ : -52,4%;  $\chi^2$ : 49,02; 1g. 1  $p < 0,008$ ) e R96 ( $\Delta I_{50}$ : -26,8%;  $\chi^2$ : 12,194; 1g. 1  $p < 0,008$ ) e em relação ao CTR na sessão P48 ( $\Delta I_{50}$ : -24,7%;  $\chi^2$ : 13,533; 1g. 1  $p < 0,008$ ). Além disso, no grupo PRB a resposta de GLP foi dificultada quando comparada ao grupo PRV nas sessões R48 e R96 ( $\Delta I_{50}$ : +44,8 e +52,2%;  $\chi^2$ : 17,157 e 25,021; 1g. 1  $p < 0,008$ ). (Figura 24).

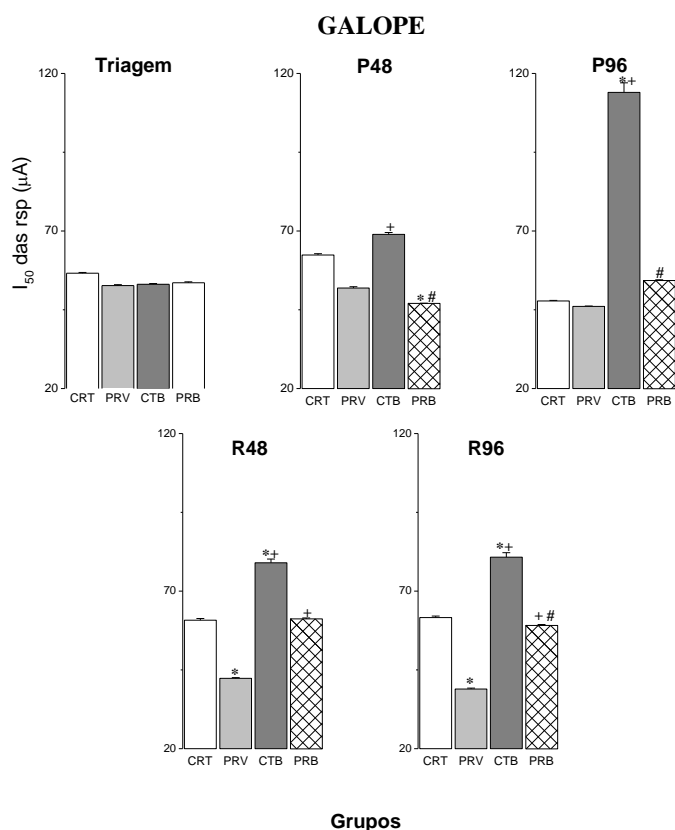


Figura 24: Comparação dos valores de intensidade mediana ( $I_{50}$ ) do comportamento de Galope entre os grupos experimentais. (CTR; PRV; CTB; PRB), em cada sessão de estimulação da MCPD e CS. \*, #, + mediana significativamente diferente na comparação com os grupos CTR, CTB, PRV, respectivamente. ( $p < 0,008$ , teste do  $X^2$  da razão de verossimilhanças)

**4.12. Comparação entre os limiares medianos ( $I_{50}$ ) do salto obtidos em cada sessão de estimulação elétrica da MCPD e CS (TRI; P48; P96; R48; R96) dos diferentes grupos experimentais (CTR, CTB, PRV e PRB).**

Na resposta de SLT, o grupo PRB apresentou redução significativa do limiar da corrente mediana na comparação com o CTR em P48, P96 e R48 ( $\Delta I_{50}$ : -23,9; -25,8 e -19,3%;  $\chi^2$ : 17,494/20,388/11,969; 1g. 1 p<0,008), e em relação ao grupo CTB nas sessões TRI ( $\Delta I_{50}$ : -15,1%;  $\chi^2$ : 8,957; 1g. 1 p<0,008) e P48 (-18,0%;  $\chi^2$ : 103152; 1g. 1 p<0,008). Adicionalmente, a resposta do SLT foi facilitada no grupo PRB quando comparada ao grupo PRV na sessão P48 ( $\Delta I_{50}$ : -18,5%;  $\chi^2$ : 9,971; 1g. 1 p<0,008).

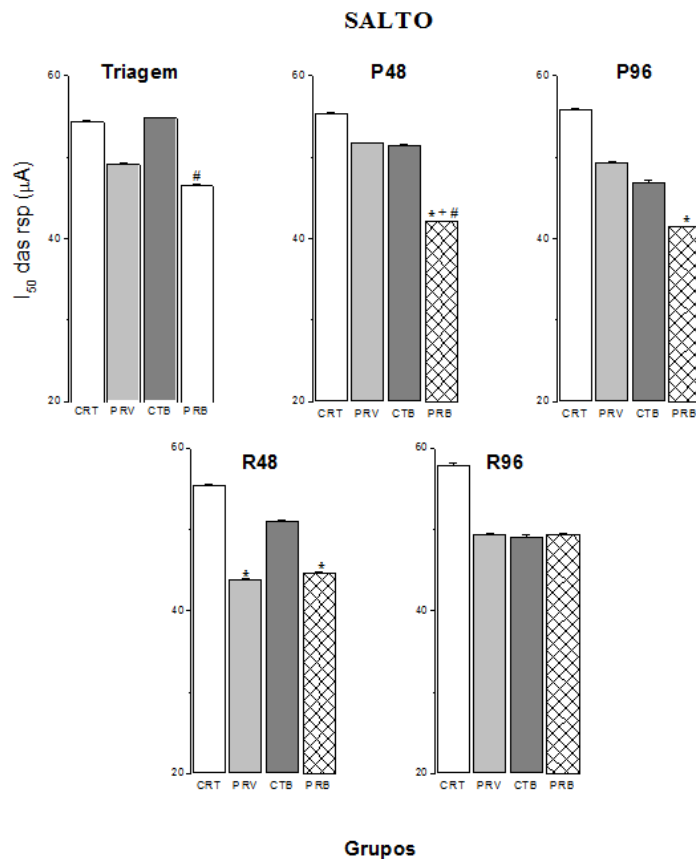


Figura 25: Comparação dos valores de intensidade mediana ( $I_{50}$ ) do comportamento de Salto entre os grupos experimentais. (CTR; PRV; CTB; PRB), em cada sessão de estimulação da MCPD e CS. \*, #, + mediana significativamente diferente na comparação com os grupos CTR, CTB, PRV, respectivamente. (p< 0,008, teste do  $X^2$  da razão de verossimilhanças).

#### 4.13. Efeitos da PSP nos níveis plasmáticos de corticosterona

Na avaliação do grupo CTR, observa-se que não há diferença estatística nos níveis plasmáticos de CORT entre as amostras coletadas imediatamente antes das sessões de estimulação elétrica, conforme mostra figura 26 [ANOVA de uma via,  $F(4, 20) = 0,292$ ,  $P > 0,05$ ]. Em contraste, no grupo PRV, embora não significativa, observa-se uma tendência ao aumento da concentração plasmática de CORT em P48 e a redução gradativa até a sessão R96, sendo esta última, diferente estatisticamente de todas as sessões anteriores [ANOVA de uma via,  $F(4, 20) = 11,762$ ,  $P < 0,001$ ] (Figura 27).

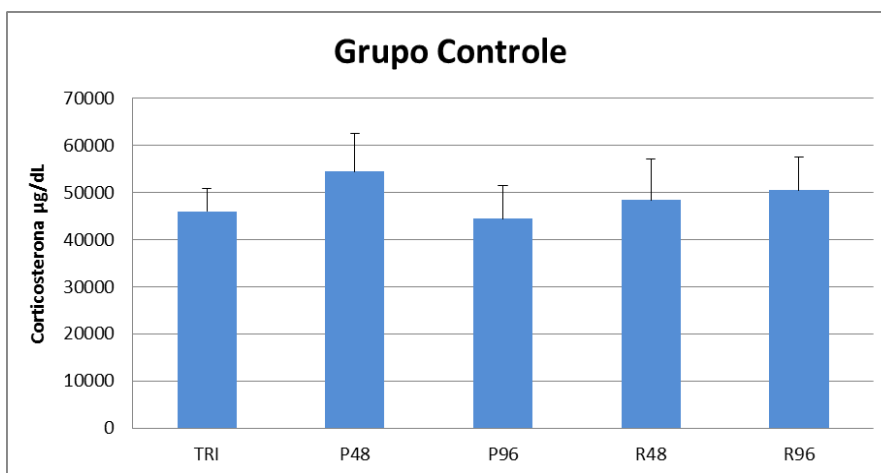


Figura 26: Níveis plasmáticos de CORT em µg/dl obtidos nos diferentes momentos das sessões de estimulação elétrica (TRI, P48, P96, R48 e R96) no grupo CTR (N=25). Nenhuma diferença significativa foi observada (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Duncan,  $p < 0,05$ ).

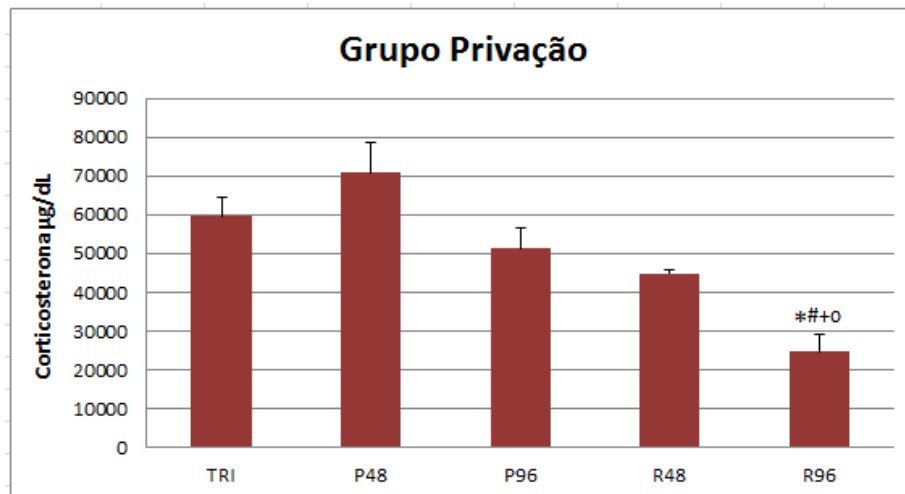


Figura 27: Níveis plasmáticos de CORT em µg/dl medidos nos diferentes momentos das sessões de estimulação elétrica (TRI, P48, P96, R48 e R96) no grupo PRV (N=25). \* Valores médios significativamente diferente na comparação com os da TRI, e #, + e o, diferentes respectivamente de P48, P96 e R48. (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Duncan,  $p < 0,05$ ).

Na análise dos níveis plasmáticos da CORT dos animais dos grupos CTB [ANOVA de uma via,  $F(4, 20) = 43,801$ ,  $P < 0,001$ ] (Figura 28) e PRB [ANOVA de uma via,  $F(4, 20) = 60,793$ ,  $P < 0,001$ ] (Figura 29) observou-se uma redução a partir de P48, mantendo-se em P96, dia no qual o animal recebeu a última dose da MET. Entretanto, nas sessões seguintes, R48 e R96, observa-se um aumento significativo da concentração de CORT. Tal comportamento foi observado em ambos os grupos tratados com MET.



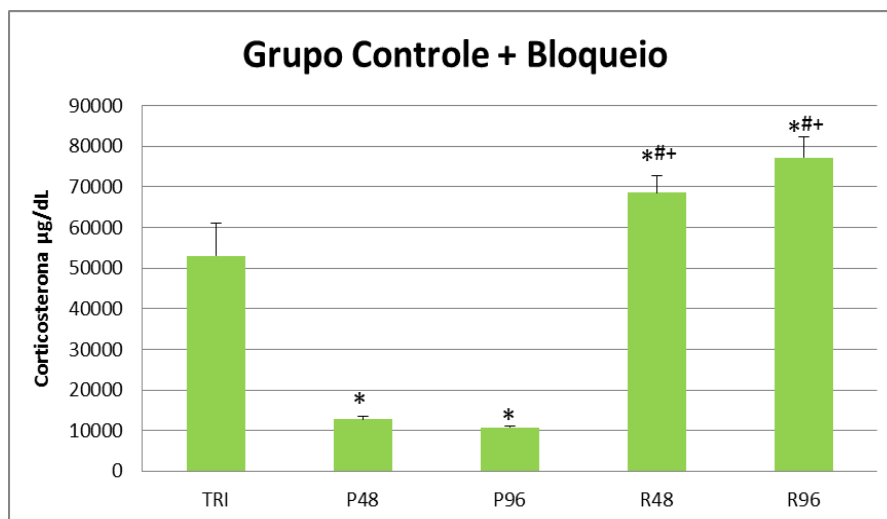


Figura 28: Níveis plasmáticos de CORT em µg/dl medidos nos diferentes momentos das sessões de estimulação elétrica (TRI, P48, P96, R48 e R96) no grupo CTB (N=25). \* Valores médios significativamente diferente na comparação com os da TRI, e #, + e o, diferentes respectivamente de P48, P96 e R48. (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Duncan,  $p < 0,05$ ).

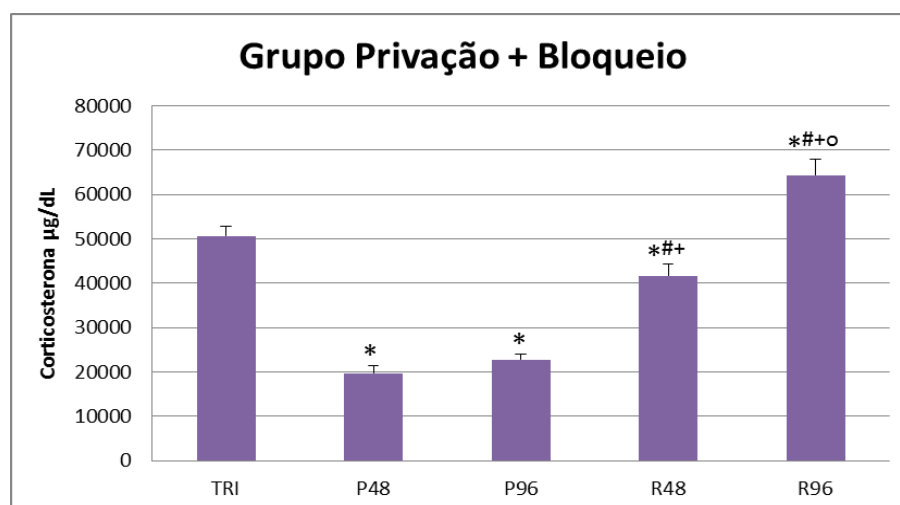


Figura 29: Níveis plasmáticos de CORT em µg/dl medidos nos diferentes momentos das sessões de estimulação elétrica (TRI, P48, P96, R48 e R96) no grupo PRB (N=25). \* Valores médios significativamente diferente na comparação com os da TRI, e #, + e o, diferentes respectivamente de P48, P96 e R48. (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Duncan,  $p < 0,05$ ).

Ao compararmos os níveis de corticosterona dos quatro grupos nas diferentes sessões, observamos que não houve diferença na sessão triagem, quando os tratamentos ainda não haviam iniciado. Na sessão P48, houve forte tendência a efeito da privação [ANOVA de duas

vias,  $F(1,16) = 4,254$ ,  $P = 0,056$ ], e efeito significativo do bloqueio com metirapona [ANOVA de duas vias,  $F(1,16) = 66,438$ ,  $P < 0,001$ ], sem interação entre as duas variáveis [ANOVA de duas vias,  $F(1,16) = 0,692$ ,  $P > 0,05$ ]. Em P96, observamos efeito significativo tanto da privação [ANOVA de duas vias,  $F(1,16) = 4,64$ ,  $P > 0,05$ ] quanto do bloqueio com metirapona [ANOVA de duas vias,  $F(1,16) = 50,12$ ,  $P > 0,001$ ], sem interação entre as duas variáveis. Na sessão R48, observou-se efeito significativo da privação [ANOVA de duas vias,  $F(1,16) = 9,151$ ,  $P > 0,05$ ], mas não do bloqueio, havendo interação entre as duas condições [ANOVA de duas vias,  $F(1,16) = 5,448$ ,  $P > 0,05$ ]. Na última sessão de estimulação, observamos efeito significativo da privação [ANOVA de duas vias,  $F(1,16) = 14,036$ ,  $P > 0,05$ ] e do bloqueio com metirapona [ANOVA de duas vias,  $F(1,16) = 41,316$ ,  $P > 0,001$ ], não havendo interação entre elas. (Fig.30)

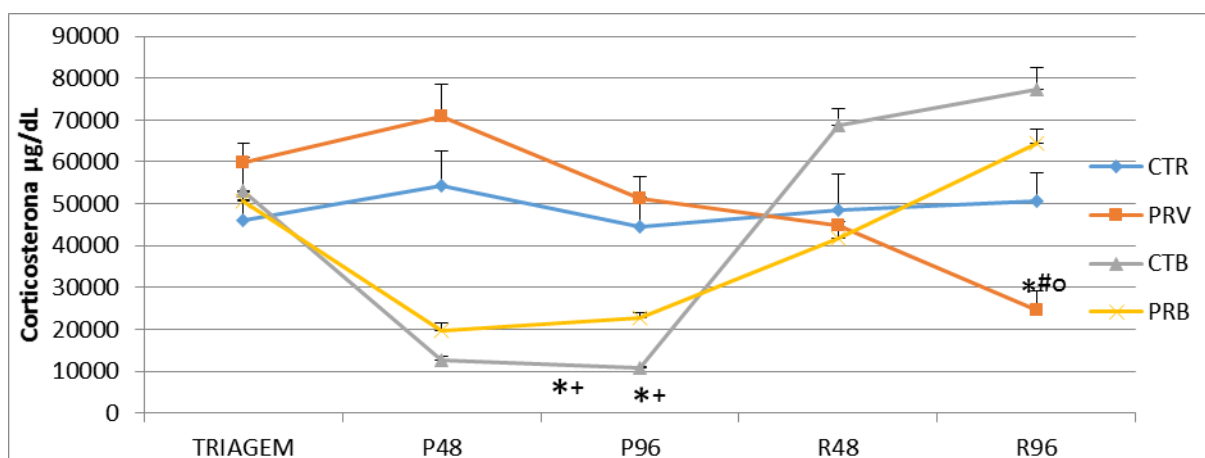


Figura 30: Nível plasmático de CORT observado em cada momento (TRI, P48, P96, R48 e R96) dos diferentes grupos (CTR, PRV, CTB e PRB). \*, #, +, o, valores médios de CORT de um dado momento significativamente diferentes quando comparado ao mesmo momento dos demais grupos grupo CTR, CTB, PRV ou PRB (teste de Duncan,  $p < 0,05$ ).

#### 4.14. Efeitos da PSP sobre o peso dos animais

A análise da variação de peso em cada sessão de estimulação elétrica da MCPD e CS, não demonstrou diferença estatística significativa entre os grupos experimentais.

Entretanto, observou-se a influência do tempo e da privação de sono na variação do peso dos animais [ANOVA de medidas repetidas,  $F(2,279; 127,6) = 15,826$ ,  $P < 0,001$  e  $F(2,279; 127,6) = 15,826$ ,  $P > 0,001$ , respectivamente]. Além disso, observou-se interação entre o tempo, bloqueio com metirapona e a privação de sono [ANOVA de medidas repetidas,  $F(2,279; 127,6) = 5,03$ ,  $P < 0,05$ ], não havendo interação significativa entre o tempo e o bloqueio com metirapona [ANOVA de medidas repetidas,  $F(2,279; 127,6) = 0,257$ ,  $P > 0,05$ ]. (Fig.31).

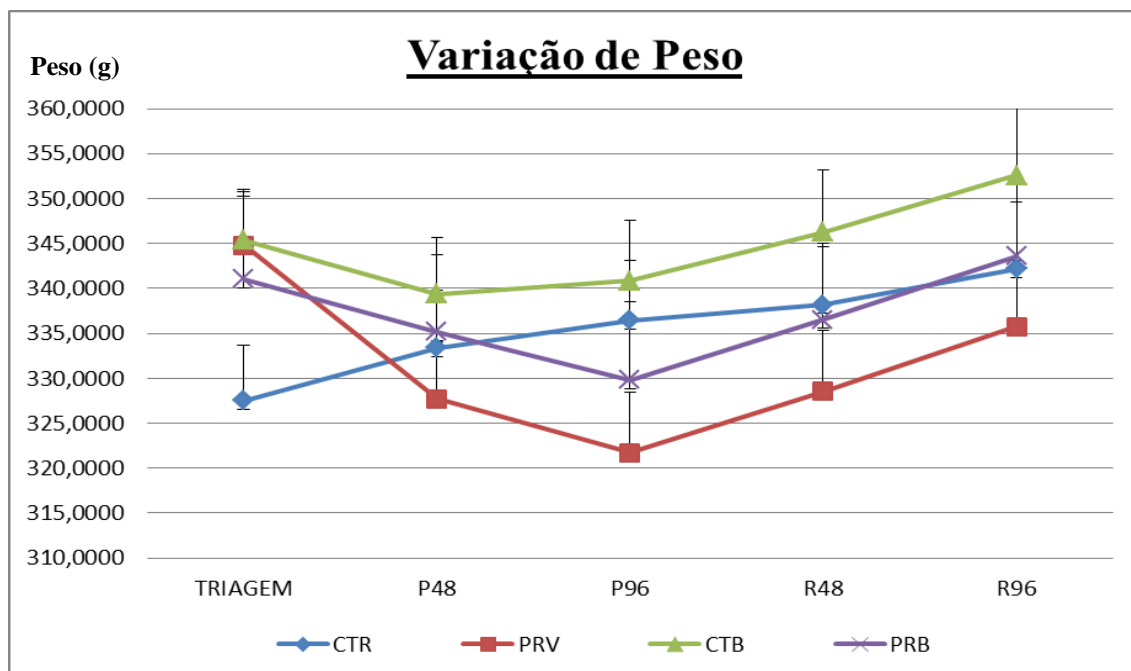


Figura 31: Efeitos da PSP sobre o peso dos animais observados em cada momento (TRI, P48, P96, R48 e R96) dos diferentes grupos (CTR, CTB, PRV e PRB) (ANOVA de medidas repetidas,  $p < 0,05$ ).

## 5. DISCUSSÃO

A redução do limiar do galope, observada no grupo PRV, parece ter sido um efeito tardio da privação de sono paradoxal, pois se apresentou significante durante todo o período de recuperação (R48 e R96). No entanto, uma redução significativa já era observada na sessão P96 (Fig. 13 e 14). Tais resultados sugerem que a privação de sono é capaz de facilitar os ataques de pânico, porém, em nosso modelo, isso foi visto tardiamente, provavelmente por algum mecanismo tempo dependente. O GLP foi considerado como o comportamento de defesa que melhor representa os ataques de pânico por Schenberg e colaboradores em 2001, pois tal comportamento foi exclusivamente atenuado pelo uso da Fluoxetina, um antidepressivo inibidor seletivo da recaptação da serotonina (ISRS) clinicamente eficaz no tratamento do Transtorno do Pânico. É notável a redução do limiar do GLP quando se compara os animais privados de sono paradoxal com aqueles que não foram privados (CTR) (fig. 11).

Algumas evidências sugerem que a PSP altera a transmissão serotoninérgica, embora os mecanismos subjacentes a este efeito permaneçam pouco esclarecidos. Hipólide e colaboradores, 2005, demonstraram por meio do uso do ligante de alta afinidade pelo receptor de serotonina, que a frequência de ligação aos receptores 5HT<sub>2A</sub> foi geralmente diminuída após 96h de PSP em 81 áreas do cérebro em animais privados de sono paradoxal, e essa redução foi mais pronunciada no período de recuperação de sono. O mesmo fenômeno ocorreu com transportador de serotonina (SERT) após a PSP. Dentre essas áreas, foi evidenciada redução da ligação na MCPD dorsal (-8%), CS (-9%) e NDR (-9%), contrastando com aumento da ligação na Amígdala (+22%).

Deakin e Graeff (1991) postularam que as projeções serotoninérgicas do núcleo dorsal da rafe ao córtex pré-frontal, amígdala e hipotálamo facilitaríamos comportamentos passivos de

defesa (imobilidade e esquiva), enquanto as projeções serotoninérgicas à MCPD teriam um papel inibitório das respostas ativas de fuga (trotos, galopes e saltos). Conseqüentemente, os AP seriam devidos ao funcionamento inadequado das projeções serotoninérgicas do NDR à MCPD. Ainda, a elevação dos níveis de CORT durante o estresse prolongado resultaria na subregulação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> do hipocampo, causando uma falha no "sistema de resiliência" e desencadeando transtornos de ansiedade.

Para explorar o modo de ação da serotonina (5-HT) sobre a MCPD, uma série de experimentos foi realizada, dentre eles a administração intracerebral de drogas combinada com estimulação elétrica da MCPD. O efeito anti-pânico parece ser mediado por receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2A</sub>, uma vez que microinjeções de antagonistas desses receptores na MCPD bloqueou os efeitos da estimulação do NDR na resposta de fuga (Pobbe & Zangrossi, 2005), enquanto a microinjeção de agonistas desses receptores inibiu tal efeito (de Bortoli *et al.*, 2008). Dessa forma, de acordo com os resultados obtidos neste trabalho e o exposto acima, pode-se sugerir que a redução da ligação a receptores de 5-HT na MCPD provocada pela PSP, reduziria a inibição serotoninérgica proveniente do NDR, facilitando assim a resposta de GLP observada nos animais privados de sono, e este processo, por depender de expressão de receptores, ocorre tardiamente, como foi também observado neste estudo. Em contraste, os comportamentos de IMO, EXO, TRT e SLT, não foram alterados pela PSP.

Estudos recentes têm mostrado que a hiperatividade do eixo HHA é um fator de risco para o desenvolvimento de psicopatologias e o mecanismo pelo qual isso ocorre não é claramente conhecido (Karten, *et. al.*, 1999). Karten, *et. al.*, 1999, demonstrou por meio de injeções diárias, que, animais expostos a altos níveis de corticosterona apresentam menor sensibilidade à serotonina em células hipocâmpais provavelmente causada por um resultado de uma redução funcional de receptores 5-HT<sub>1A</sub>. Dessa forma, a redução da capacidade de

resposta desses receptores provocada pelo nível elevado de glicocorticoides, em longo prazo, pode desempenhar um papel no aparecimento de transtornos de ansiedade.

Sendo assim, é bem estabelecido na literatura que a PSP ativa o eixo HHA aumentando os níveis plasmáticos de cortisol em humanos e corticosterona nos roedores. Suchecki, Tiba & Tufik, 2002, demonstraram que a PSP ativa o eixo após 96 horas, aumentando os níveis de CORT e ACTH nesses animais. Além disso, Machado, Tufik & Suchecki, 2013, observaram que a PSP aumenta não somente os níveis plasmáticos de CORT, como também o período de sono REM no momento da recuperação da privação. Hairston, *et al.* 2001, também relatou o aumento dos níveis plasmáticos de CORT em ratos neonatos privados de sono, tendo seus níveis mais elevados na idade acima de 24 dias, demonstrando que a perda de sono é um importante agente estressor nessa idade, e que ratos mais velhos são mais sensíveis aos efeitos da PSP. Adicionalmente, é bem descrito na literatura que o eixo HHA exerce um papel fundamental na resposta aos estímulos externos e internos, incluindo os estressores psicológicos. Anormalidades na função do eixo HHA têm sido descritas em pessoas que experimentam transtornos psiquiátricos. Cerca de 50% dos pacientes com depressão maior apresentam hipercortisolemia e 40% apresentam resposta aumentada de ACTH no teste de dexametasona/CRH (Sachar *et al.*, 1980; Erhardt *et al.*, 2006). Assim, embora os AP não ativem o eixo HHA, eles podem ser facilitados pela ativação concorrente do eixo em situações estressantes.

Tais achados na literatura nos levaram a avaliar a participação da CORT produzida pela PSP nos limiares da reação de defesa induzidos pela estimulação elétrica da MCPD e CS. Dessa forma, com o uso da Metirapona (MET), um inibidor da síntese da CORT, foi possível avaliar tal influência. A MET, por ser um inibidor da 11- $\beta$ -hidroxilase, a enzima que converte a 11-deoxicortisol/11-deoxicorticosterona em cortisol/corticosterona, promove uma redução na produção de CORT e conseqüentemente em seus níveis plasmáticos (Machado, Tufik &

SucHECKI, 2013). De fato, a MET preveniu a formação de CORT em P48 e P96 (fig. 27 e 28), tanto nos ratos submetidos à PSP (grupo PRB), quanto nos que não foram submetidos à PSP, mas foram tratados com MET (grupo CTB). O mesmo foi visto no trabalho de Machado, Tufik & SucHECKI, 2013.

O aumento não significativo dos níveis plasmáticos de CORT observado em P48 do grupo PRV demonstra a ativação do eixo HHA provocada pela PSP, reduzindo então a partir de P96, com significância estatística em R96, quando comparado à TRI (fig. 27). Tal resultado sugere um efeito adaptativo ao estresse, observado a partir da sessão P96. Adicionalmente, observa-se no grupo PRB, um efeito rebote com o aumento da concentração plasmática de CORT nas sessões de recuperação (R48 e R96), momento no qual os animais não estavam sob efeito da MET, como se pode visualizar na figura 29. Quando se relacionam os níveis plasmáticos da CORT nas sessões de recuperação (R48 e R96) nos grupos PRV e PRB, com a  $I_{50}$  do comportamento de GLP obtido nos dois grupos, nos mesmos momentos, observa-se que, pelo menos diretamente, a corticosterona não foi responsável pela redução dos limiares do GLP observada no grupo PRV (fig. 24). O mesmo foi observado para o comportamento de Trote, pois nas sessões de privação de sono (P48 e P96; fig. 15 e 17), o aumento da  $I_{50}$  nos grupos bloqueados com metirapona foi acompanhado da redução dos níveis de corticosterona, enquanto que nos períodos de recuperação foi acompanhado do aumento desses níveis (fig. 28 e 29).

Para os comportamentos de IMO, EXO e SLT, os limiares de corrente mediana não foram alterados na comparação entre as sessões dentro de um mesmo grupo, em todos os grupos experimentais, exceto o SLT do R96 teve um pequeno aumento de 10%, porém significativo em relação ao R48 do grupo PRB. A redução da corrente mediana em P48 e P96 observada no grupo PRB para o comportamento de SLT na comparação entre os grupos (fig.25) é acompanhada pela redução dos níveis plasmáticos de CORT em decorrência do uso

da MET (fig.29), o mesmo para os comportamentos de IMO e EXO (fig. 19 e 20, respectivamente), quando se comparou os grupos PRB e PRV com seus respectivos controles. Ao passo que, nas sessões de recuperação (R48 e R96 - níveis de CORT altos; fig. 28 e 29) nos grupos tratados com MET (CTB e PRB), esses comportamentos não apresentaram alteração do limiar de corrente mediana, enquanto que os níveis baixos de CORT no grupo PRV nas mesmas sessões (fig. 27) foram acompanhados da redução do limiar de corrente mediana somente na sessão R48 quando comparado ao CTR para o comportamento de SLT, não alterando na sessão seguinte. Já nos comportamentos de IMO e EXO (fig. 19 e 20, respectivamente), não ocorre alteração nos limiares de corrente mediana nessas sessões.

Para as respostas de DEF e MIC, nos grupos privados de sono (PRV e PRB), embora sejam comportamentos de baixa frequência e bastante variados, tiveram seus limiares significativamente aumentados ou virtualmente abolidos, o que se reverteu durante a recuperação, sugerindo um efeito rebote, onde os limiares reduziram para níveis abaixo ao da triagem. Tal resultado pode ser devido a uma possível redução na ingestão de comida, o que é reforçado pela perda de peso observada nos animais privados de sono (PRV e PRB) nesta fase do experimento (Fig. 31). Na MIC o retorno parcial de seu limiar observado em R96, também sugere uma influência do protocolo de privação, porém não conhecemos o possível mecanismo envolvido (fig. 13 e 14), e a literatura carece de discussão a respeito do controle desta resposta. A ausência de diferenças significantes para os comportamentos na comparação entre suas respectivas sessões mostra uma estabilidade das condições experimentais, objetivo do grupo controle (CTR, Figuras 11 e 12). O aumento de limiar em R48 observado para o comportamento de MIC pode ser interpretado como resultado da sua típica baixa frequência e alta variabilidade natural, já descrita em Bittencourt *et al.*, 2004 e Schenberg *et al.*, 2001.

Os resultados discutidos acima demonstram que a CORT produzida em decorrência da PSP não influenciou em momento algum os comportamentos defensivos avaliados. Dessa



forma, a redução da ligação aos receptores e transportador de serotonina em decorrência da PSP observada por Hipólido e colaboradores, 2005, poderia ser o mecanismo pelo qual ocorre facilitação da resposta de GLP, nos animais privados de sono (PRV) no período de recuperação, uma vez que esses autores observaram que tal redução foi mais pronunciada no período de recuperação. Tal redução em estruturas de defesa como a MCPD e o CS, reduziria a inibição das respostas de fuga causada por fibras serotoninérgica provenientes do NDR (Deakin & Graeff, 1991), facilitando assim a resposta de GLP, como foi observado em nossos resultados.

## **6. CONCLUSÃO**

Os resultados encontrados no presente estudo sugerem que, o efeito tardio da privação de sono sobre o comportamento de Galope, possivelmente se deva a mecanismos neuroquímicos tempo-dependente. Além disso, as alterações dos níveis plasmáticos de corticosterona induzidos pela privação de sono e sua retirada parecem não ter relação com possíveis variações de limiar das respostas de defesa. Dessa forma, nossos resultados sugerem fortemente a hipótese inicial, de que a privação de sono pode facilitar a ocorrência dos Ataques de Pânico e, portanto, estar relacionado ao transtorno de pânico em humanos.

## 7. REFERÊNCIAS

- Allan Rechtschaffen & Bernard M. Bergmann. Sleep deprivation in the rat by the disk-over-water method. *Behavioural Brain Research* 69: 55-63, 1995.
- Allan Rechtschaffen & Bernard M. Bergmann. Sleep deprivation in the rat by the disk-over-water method. *Behavioural Brain Research* 69: 55-63, 1995.
- Amano, K.; Tanikawa, T.; Iseki, H.; Kawabatake, H.; Notani, M.; Kawamura, H.; Kitamura, K. Single neuron analysis of the human mid brain tegmentum (rostral mesencephalicreticulotomy for pain relief). *Appl. Neurophysiol.*, 41: 66-78, 1978.
- Andersen M.L, Martins P.J.F., D'Almeida V., Bignotto M. And Tufik S. Endocrinological alterations during sleep deprivation and recovery in male rats. *J Sleep Res* 14: 83-90, 2005a.
- Andersen M.L., Bignotto M., Tufik S. Facilitation of ejaculation after methamphetamine administration in paradoxical sleep deprived rats. *Brain Res.*, 978 (1-2), pp. 31-37, 2003a.
- Andersen M.L., Bignotto M., TufikS. Influence of paradoxical sleep deprivation and cocaine on development of spontaneous penile reflexes in rats of different ages. *Brain Res.*, 968 (1), pp. 130-138, 2003b.
- Andersen, M.L.; Bignotto, M.; Machado R.B., Tufik, S. Does paradoxical sleep deprivation and cocaine induce penile erection and ejaculation in old rats? *Addict. Biol.*, 7 (3) pp. 285-290, 2002.

- Andersen, M.L.; Bignotto, M.; Papale, L.A.; Tufik S. Age-related effects on genital reflexes induced by paradoxical sleep deprivation and cocaine in rats. *Exp.Gerontol.*, 39 (2), pp. 233-237, 2004a.
- Andersen, M.L.; Bignotto, M.; Tufik, S. Hormone treatment facilitates penile erection in castrated rats after sleep deprivation and cocaine. *J. Neuroendocrinol.*, 16 (2), pp. 154-159, 2004b.
- Andersen, M.L.; Martins, P.J., D' Almeida, V., Santos, R. F., Bignotto, M., and Tufik, S. Effects of paradoxical sleep deprivation on blood parameters associated with cardiovascular risk in aged rats. *Exp. Gerontol.*, 39: 817-824, 2004.
- Andersen, M.L.; Martins, P.J.; D'Almeida, V.; Bignotto, M.; Tufik, S. Endocrinological and catecholaminergic alterations during sleep deprivation and recovery in male rats. *J. Sleep Res.*, 14 (1), pp. 83-90, 2005.
- APA, 1980. *DSM-III: Diagnostic and Statistical Manual for Mental Disorders of American Psychiatric Association.*, 3rd ed. American Association Psychiatry, Washington, DC.
- APA, 2000. *DSM-IV-TR: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders of American Psychiatric Association.*, 4th ed. American Psychiatry Association, Washington, DC.
- APA, 2013. *DSM-V-TR: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders of American Psychiatric Association.*, 5th ed. American Psychiatry Association, Washington, DC.
- Armini, R.S., Bernabé, C.S., Rosa, C.A., Siller, C.A., Schimitel, F.G., Tufik, S., Klein, D.F., Schenberg, L.C. In a rat model of panic, corticotropin responses to dorsal

periaqueductal gray stimulation depend on physical exertion.  
*Psychoneuroendocrinology* 53: 136-147. 2015.

Bandler, R, Carrive, P, Depaulis, A. Emerging principles of organization in the midbrain periaqueductal gray matter. *The Midbrain Periaqueductal Gray Matter: Functional, Anatomical and Neurochemical Organization*. Plenum Press, New York, pp. 1-8, 1991.

Bandler, R. and Keay, K. A., Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray and the integration of emotional expression, *Brain Res.*, 107: 285-300, 1996.

Bittencourt, A. S.; Carobrez, A. P.; Zamprogno, L. P.; Tufik, S.; Schenberg, L. C. Organization of single components of defensive behaviors within distinct columns of periaqueductal gray matter of the rat: role of n-methyl-d-aspartic acid glutamate receptors. *Neuroscience*, v. 125, p. 71-89, 2004.

Buela G. Avaliação dos distúrbios de iniciar e manter o sono. In: Reimão R. *Sono: aspectos atuais*. Rio de Janeiro: Atheneu Editora, v. 33, 1990.

Carrive, P. The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. *Behavioural Brain Research* 58: 27-47, 1993.

Castillo, A. R G. L., Recondo, F., Asbahr, F. R. & Manfro, G. G. Transtornos de ansiedade. *Revista Brasileira de Terapia Comportamental e Cognitiva*, 22: 20-23, 2000.

Chen W, Kushida CA. Perspectives. In: *Sleep deprivation: basic science, physiology and behavior*. New York: Marcel Dekker. 1-30, 2005.

Collett D (2003) *Modelling Binary Data*. London: Chapman & Hall/CRC.

- Coplan, J. D., Goetz, R., Klein, D. F., Papp, L. A., Fyer, A. J., Liebowitz, M. R., et al. Plasma cortisol concentrations preceding lactate-induced panic: Psychological, biochemical, and physiological correlates. *Archives of General Psychiatry*, 55: 130-136, 1998.
- De Bortoli, V.C., Nogueira, R.L., Zangrossi Jr., H. Alprazolam potentiates the antiaversive effect induced by the activation of 5-HT<sub>(1A)</sub> and 5-HT<sub>(2A)</sub> receptors in the rat dorsal periaqueductal gray. *Psychopharmacology (Berl.)* 198: 341-349, 2008.
- De Manacéine M. Quelques observations expérimentales sur l'influence de l'insomnie absolue. *Arch Ital Biol.* 21: 332-5, 1894.
- Deakin, J.F.; Graeff, F.G. 5-HT and mechanisms of defence. *J Psychopharmacol.* Jan;5(4):305-15, 1991.
- Dean, P., Redgrave, P. and Mitchell, I.J. Response resembling defensive behavior produced by microinjection of glutamate into the superior colliculus of rats, *Neuroscience*, 24: 501-510, 1988a.
- Ehlers, A., Margraf, J., Roth, W. T., Taylor, C. B., Maddock, R. J., Sheik, J., et al. Lactate infusions and panic attacks: Do patients and controls respond differentially? *Psychiatry Research*, 17, 295-308, 1986.
- Ellison, G. D.; Flynn, J. P., Organized aggressive behavior in cats after surgical isolation of the hypothalamus. *Arch. Ital. Biol.*, 106: 1-20, 1968.
- Erhardt A., Ising M., Unschuld P.G., Kern N., Lucae S., Putz B., Uhr M., Binder E.B., Holsboer F., Keck M.E.. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system in patients with panic disorder. *Neuropsychopharmacology* 31: 2515-2522, 2006.

- Feldman, E. C. Hiperadrenocorticism. Tratado de Medicina Interna Veterinária. 1 ed. Ed. Manole Ltda, p. 2123-2177, 1997.
- Fernandes, M. F. F. Sono normal. Simpósio: distúrbios respiratórios do sono. Medicina, Ribeirão Preto, 39 (2): 157-168, abr./jun. 2006
- Fernandez de Molina, A. and Hunsperger, R. W., Organization of the subcortical system governing defense and flight reactions in the car. J. Physiol. (London), 160: 200-213, 1962.
- Frederico G Graeff. Anxiety, panic and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. Rev Bras Psiquiatr. 29(Supl I):S3-6, 2007.
- Freud, S.. On the right to separate from neurasthenia a definite symptom-complex as "anxiety neurosis" (Angstneurose). Em: Hutchins, R.M. (Ed.), The Major Works of Sigmund Freud (Great Books of Western World). Encyclopaedia Britannica, London, p. 884, 1895
- Furlan, F.A.; Hoshino, K. Fighting by sleep-deprived rats as a possible manifestation of panic: effects of sodium lactate. Braz J Med Biol Res 34(3), 2001.
- Gentil, V., & Lotufo, F. N. Ansiedade e Transtornos Ansiosos. Pânico, Fobias e Obsessões: A Experiência do Projeto Amban. São Paulo: Ed.USP. (pp. 17-30), 1996.
- Gorman JM, Fyer MR, Goetz R, Askanazi J, Liebowitz MR, Fyer AJ, Kinney J & Klein DF. Ventilatory physiology of patients with panic disorder. Archives of General Psychiatry , 45: 31-39, 1988.
- Graeff, F.G. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. Neurosci. Biobehav.Rev. 28, 239-259, 2004.

- Graybiel, A. M., Brecha, N., and Karten, H. J., Cluster and sheer pattern of enkephalin like immunoreactivity in the superior colliculus of the cat. *Neuroscience*, 12: 191-214, 1984.
- Hairston et al. Sleep deprivation elevates plasma corticosterone levels in neonatal rats. *Neuroscience Letters* 315: 29-32, 2001.
- Herman, J. P., Ostrander M. M., Mueller N. K., Figueiredo H.. Limbic system mechanisms of stress regulation: Hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 29: 1201 - 1213, 2005.
- Herman, J.P., Cullinan, W.E. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Tins* 20: 78 - 83, 1997.
- Hipólido, D.C, Moreira, K.M, Barlow, K.B, Wilson, A.A, Nobrega, J.N and Tufik, S. Distinct effects of sleep deprivation on binding to norepinephrine and serotonin transporters in rat brain. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29: 297-303. 2005.
- Hoge, E.A.; Marques, L.; Wechsler, R.S.; Lasky, A.K.; Delong, H.R.; Jacoby, R.J.; Worthington, J.J.; Pollack, M.H.; Simon, N.M. The role of anxiety sensitivity in sleep disturbance in panic disorder. *Journal of Anxiety Disorders*.v.25 p. 536-538, 2011.
- Horne, J. A. *Why we sleep: The functions of sleep in humans and other mammals*. New York: Oxford University Press, 1988.
- Hunsperger, R. W., Affektreaktionen auf elektrische Reizung im Hirnstamm der Katze. *Helv. Physiol. Acta*, 14: 70-92, 1956.
- Issa, A.M., Rowe, W., Gauthier, S., Meaney, M.J. Hypothalamicpituitary-adrenal activity in aged, cognitively impaired and cognitively unimpaired rats. *J. Neurosci.* 10, 3247 - 3254, 1990.



- J. Velazquez-Moctezuma S., Retana-Márquez, H. Bonilla-Jaime, G. Vázquez-Palacios, E. Domínguez-Salaza, R. Martínez-García,. Body weight gain and diurnal differences of corticosterone changes in response to acute na chronic stress in rats. *Psychoneuroendocrinology* 28: 207-227, 2002.
- Juruena, M. F., Cleare, A.J., Pariante, C.M. The hypothalamic pituitary adrenal axis, glucocorticoid receptor function and relevance to depression. *Rev Bras Psiquiatr* 26(3):189-201, 2004.
- Kandel, E.R; Schwartz, J.H; Jessell, T.M. *Princípios de Neurociência*. 5° ed. Barueri, SP: Manole, 2014.
- Karten, Y. J. G., Nair, S. M., Van Essen L., Sibug, R., and Joe, M. Long-term exposure to high corticosterone levels attenuates serotonin responses in rat hippocampal CA1 neurons. *PNAS* v. 96: 13456-13461, 1999.
- Klein, D F. Delineation of Two Drug-Responsive Anxiety Syndromes. *Psychopharmacologia* 5: 397-408, 1964.
- Labbate LA, et al. Sleep Deprivation in social phobia and generalized anxiety disorder. *Biol Psychiatry*. Jun1;43(11):840-2, 1998.
- Labbate LA, Johnson MR, Lydiard RB, Brawman-Mintzer O, Emmanuel N, Crawford M, Kapp R & Ballenger JC. Sleep deprivation in panic disorder and obsessive-compulsive disorder. *Canadian Journal of Psychiatry* , 42: 982-983, 1997.
- Liebowitz M.R.; Fyer, A.J.; Gorman, J.M.; Dillon, D.; Appleby, I.L; Levy, G.; Anderson, S.; Levitt, M.; Palij, M.; Davies, S.O. Lactate provocation of panic attacks. I. Clinical and behavioral findings. *Arch Gen Psychiat*. 41:764-70, 1984.

- Liebowitz M.R.; Fyer, A.J.; Gorman, J.M.; Dillon, D.; Appleby, I.L; Levy, G.; Anderson, S.; Levitt, M.; Palij, M.; Davies, S.O. Lactate provocation of panic attacks.II. Clinical and behavioral findings. *Arch Gen Psychiat.* 42:709-19, 1985.
- Lupien SJ, McEwen BS, Gunnar MR, Heim C. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nat Rev Neurosci* 10: 434-445, 2009.
- Machado RB, Tufik S, Suchecki D. Role of Corticosterone on Sleep Homeostasis Induced by REM Sleep Deprivation in Rats. *PLoS ONE* 8(5): e63520. 2013.
- Machado RB, Tufik S, Suchecki D. Role of Corticosterone on Sleep Homeostasis Induced by REM Sleep Deprivation in Rats. *PLoS ONE* 8(5): e63520, 2013.
- Marinelli, M.; LE Moal, M.; Piazza,P. V. Acute pharmacological blockade of corticosterone secretion reverses food restriction induced sensitization of the locomotor response to cocaine. *Brain Research*, 724:251-255, 1996.
- Milasius AM, Grinevicius K-KA & Lapin IP. Effect of quinolinic acid on wakefulness and sleep in the rabbit. *Journal of Neural Transmission* , 82: 67-73, 1990.
- Nashold, B.S; Wilson, W.P; Slaughter, D.G. Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. *J Neurosurg* 30: 14-24, 1969.
- Neylan et al., Delta Sleep Response to Metyrapone in Post-Traumatic Stress Disorder. *Neuropsychopharmacology.* 28: 1666-1676, 2003.
- Patrick GTW, Gilbert JA. On the effects of loss of sleep.*Psychol Rev* 3: 469-83, 1896.
- Paxinos, G.; Watson, C.The rat brain in stereotaxic coordinates. Elsevier, Amsterdam, 7 ed°, 2013.

- Pires, G.N., Tufik, S; Andersen, M. L. Grooming analysis algorithm: Use in the relationship between sleep deprivation and anxiety-like behavior. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* (41) 6–10, 2013.
- Pitts, F.N., McClure, J.N. Lactate metabolism in anxiety neurosis. *The New England Journal of Medicine* 277: 1329–1336, 1967
- Pobbe, R.L., Zangrossi Jr., H. 5-HT<sub>(1A)</sub> and 5-HT<sub>(2A)</sub> receptors in the rat dorsalperiaqueductal gray mediate the antipanic-like effect induced by the stimulation of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. *Psychopharmacology (Berl.)* 183, 314–321, 2005.
- Redgrave, P. and Dean, P., Does the PAG learn about emergencies from the superior colliculus? In A. Depaulis and R. Bandler (Eds.), *The Midbrain Periaqueductal Gray Matter*, New York, Plenum Press, págs. 199-209, 1991.
- Roy-Byrne PP, Uhde TW. Exogenous factors in panic disorder: clinical and research implications. *J Clin Psychiatry*. Feb;49(2):56-61, 1988.
- Roy-Byrne, P.P; Michelle G Craske, Murray B Stein. Panic disorder. *Lancet*. v. 368 September 16, 2006.
- Sachar E. J, G. Asnis, R. S. Nathan, U. Halbreich, M. A. Tabrizi, and F. S. Halpern. Dextroamphetamine and cortisol in depression. Morning plasma cortisol levels suppressed. *Arch.Gen.Psychiatry*. 37 (7):755-757, 1980.
- Sagaspe, P., Sanchez-Ortuno, M., & Charles, A. Effects of sleep deprivation on color-word, emotional, and specific stroop interference on self-reported anxiety. *Brain and Cognition*, 60: 76–87, 2006.

Schenberg, L.C.; Bittencourt, A.S.; Sudré, E.C.M.; Vargas, L.C. Modeling panic attacks. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 25 p. 647-659, 2001.

Schimmer, B. P.; Parker, K. L. Hormônio Adrenocorticotrófico, esteróides adrenocorticais e seus análogos sintéticos, inibidores da síntese e das ações dos hormônios adrenocorticais. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 9 ed. Mc Graw Hill Interamericana, p. 1082-1102, 1996.

Stein, M. B., Chartier, M., & Walker, J. R.. Sleep in nondepressed patients with panic disorder: I. Systematic assessment of subjective sleep quality and sleep disturbance. *Sleep: Journal of Sleep Research & Sleep Medicine*, 16: 724–726, 1993.

Suckecki D., Tiba P.A. and Tufik S. Hormonal and behavioural responses of paradoxical sleep-deprived rats to the elevated plus maze. *J Neuroendocrinol* 14: 549-554, 2002.

Suckecki D. And Tufik S. Social stability attenuates the stress in the modified multiple platform method for paradoxical sleep deprivation in the rat. *Physiol Behav* 68: 309–316, 2000.

Suckecki D. and Tufik S. Social stability attenuates the stress in the modified multiple platform method for paradoxical sleep deprivation in the rat. *Physiol Behav* 68: 309-316, 2000.

Suckecki D. And Tufik S.. Social stability attenuates the stress in the modified multiple platform method for paradoxical sleep deprivation in the rat. *Physiol Behav* 68: 309–316, 2000.

- Sudré, E. C. M., Barros, R. R. Sudré, G. N. Schenberg, L. C. Thresholds of electrically induced defense reaction of the rat: short and long-term adaptation mechanisms. *Behav. Brain Res.*, 58: 141-154, 1993
- Swanson, L.W., Petrovich, G.D. What is the amygdala? *Trends Neurosci.* 21: 323 – 331, 1998.
- Tufik, S., Andersen, M.L., Bittencourt, L.R.A., Mello, M.T. Paradoxical Sleep Deprivation: neurochemical, hormonal and behavioral alterations. Evidence from 30 years of research. *Biomedical and medical sciences.* 81(3): 521-538. 2009.
- Tufik, S., Lindsey, C. J., Carlini, E. A. Does REM sleep-deprivation induce a supersensitivity of dopaminergic receptors in the rat brain? *Pharmacology.* 16: 95-108. 1978.
- Woodward and Emery. Determination of plasma corticosterone using high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 419: 280-284, 1987.
- Young R.F. Brain and spinal stimulation: how and to whom! *ClinNeurosurg* 35: 429-47, 1989.

## 8. ANEXOS

### Anexo I - Planilha de Estimulação:

#### PLANILHA DE ESTIMULAÇÃO

Onda senoidal, frequência. 60 Hz e intensidade variável

Rato: \_\_\_\_\_. Grupo: CTR ( ) PRV ( ) CTB ( ) PRB ( ) Responsável: **Rafaella**. Peso (g): \_\_\_\_\_.  
 Data da Implantação do eletrodo: \_\_\_\_/\_\_\_\_/201\_. Data da Perfusão: \_\_\_\_/\_\_\_\_/201\_.

| Coordenadas      | Zero | Varição | Ponto de Implante |
|------------------|------|---------|-------------------|
| Lateral          |      | -2,6    |                   |
| Vertical         |      | +5,0    |                   |
| Ântero-posterior |      | -1,8    |                   |

Sessão: Triagem. Estimulador: \_\_\_\_\_. Data: \_\_/\_\_/20\_\_\_. Período: ( )M ( )T ( )N Peso (g): \_\_\_\_

| Comportamento | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 | 45 | 50 | 55 | 60 | 65 | 70 |
|---------------|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| Dormir        |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Repouso       |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Olfção        |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Esquadrinhar  |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Autolimpeza   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Levantar      |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Marcha        |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Exoftalmia    |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Imobilidade   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Defecção      |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Micção        |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Trote         |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Galope        |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Saltos        |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |

Obs.: \_\_\_\_\_

Sessão: Privação de sono 48h. Estimulador: \_\_\_\_\_ Data: \_\_/\_\_/20\_\_\_. Período: ( ) M ( ) T ( ) N Peso (g): \_\_\_\_

| Comportamento | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 | 45 | 50 | 55 | 60 | 65 | 70 |
|---------------|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| Dormir        |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Repouso       |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Olfção        |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Esquadrinhar  |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Autolimpeza   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Levantar      |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Marcha        |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Exoftalmia    |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Imobilidade   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Defecção      |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Micção        |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Trote         |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Galope        |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Saltos        |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |

Obs.: \_\_\_\_\_

Sessão: P96, Privação de Sono 96h. Estimulador: \_\_\_\_\_. Data: \_\_\_/\_\_\_/20\_\_\_. Período: ( )M ( )T ( )N  
 Peso(g): \_\_\_\_\_

| Comportamento | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 | 45 | 50 | 55 | 60 | 65 | 70 |
|---------------|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| Dormir        |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Repouso       |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Olfacção      |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Esquadrinhar  |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Autolimpeza   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Levantar      |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Marcha        |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Exoftalmia    |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Imobilidade   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Defecação     |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Micção        |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Trote         |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Galope        |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Saltos        |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |

Obs.: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Sessão: R48, Recuperação 48h. Estimulador: \_\_\_\_\_. Data: \_\_\_/\_\_\_/20\_\_\_. Período: ( )M ( )T ( )N  
 Peso(g): \_\_\_\_\_

| Comportamento | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 | 45 | 50 | 55 | 60 | 65 | 70 |
|---------------|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| Dormir        |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Repouso       |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Olfacção      |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Esquadrinhar  |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Autolimpeza   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Levantar      |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Marcha        |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Exoftalmia    |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Imobilidade   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Defecação     |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Micção        |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Trote         |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Galope        |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Saltos        |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |

Obs.: \_\_\_\_\_

Sessão: R96, Recuperação 96h. Estimulador: \_\_\_\_\_. Data: \_\_\_/\_\_\_/20\_\_\_. Período: ( )M ( )T ( )N Peso (g): \_\_\_\_\_

| Comportamento | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 | 45 | 50 | 55 | 60 | 65 | 70 |
|---------------|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| Dormir        |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Repouso       |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Olfacção      |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Esquadrinhar  |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Autolimpeza   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Levantar      |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Marcha        |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Exoftalmia    |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Imobilidade   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Defecação     |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Micção        |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Trote         |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Galope        |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Saltos        |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |

Obs.: \_\_\_\_\_



## Anexo II - Aprovação do comitê de ética:

Via do pesquisador

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**  
Centro de Ciências da Saúde  
COMISSÃO DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS – CEUA

**COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO PROTOCOLO**

Nº CEUA: 2512013

**Título do projeto:**  
EFEITO DA PRIVAÇÃO DE SONO PARADOXAL SOBRE LIMIARES DA REAÇÃO DE DEFESA E SUAS CORRELAÇÕES NEUROQUÍMICAS

**Responsável pelo projeto:** Prof. Dr. Athelson Stefanon Bittencourt  
**Instituição / cidade / UF:** Universidade Federal do Espírito Santo / Vitória / ES

Recebido em 23 / 05 / 13  
  
(Rubrica do funcionário da CEUA)

Para informações sobre as reuniões da CEUA e aprovação ou pendências no projeto, entre em contato:  
Secretaria: Elizete Calenzani - Tel.: (27) 3335-7211 – E-mail: ceua.ufes@hotmail.com  
www.ccs.ufes.br/uso-de-animais

