UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Ribeirão Preto
Departamento de Farmacologia

MELINA MATTHIESEN

Regulação serotoninérgica do núcleo basolateral do complexo amigdalóide, da substância cinzenta periaquedutal dorsal e do hipotálamo medial por diferentes sub-regiões do núcleo dorsal da rafe: importância para a expressão de comportamentos defensivos associados à ansiedade e ao pânico.

Ribeirão Preto

2018

MELINA MATTHIESEN

Regulação serotoninérgica do núcleo basolateral do complexo amigdalóide, da substância cinzenta periaquedutal dorsal e do hipotálamo medial por diferentes sub-regiões do núcleo dorsal da rafe: importância para a expressão de comportamentos defensivos associados à ansiedade e ao pânico

Tese de doutorado apresentada à
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para a obtenção
do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Hélio Zangrossi Júnior

Ribeirão Preto

2018

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na biblioteca da Unidade que aloja o programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)"

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada para a Biblioteca Central do Campus Administrativo
de Ribeirão Preto / USP

Matthiesen, Melina

Regulação serotoninérgica do núcleo basolateral do complexo amigdalóide, da substância cinzenta periaquedutal dorsal e do hipotálamo medial por diferentes sub-regiões do núcleo dorsal da rafe: importância para a expressão de comportamentos defensivos associados à ansiedade e ao pânico. Ribeirão Preto, 2018.

p. 99. il.

Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Zangrossi Júnior, Hélio.

1. Ansiedade generalizada. 2. Pânico. 3. Núcleo dorsal da rafe. 4. Receptores 5-HT_{1A}. 5. Receptores 5-HT_{2C}.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Matthiesen, Melina

Título: Regulação serotoninérgica do núcleo basolateral do complexo amigdalóide, da substância cinzenta periaquedutal dorsal e do hipotálamo medial por diferentes sub-regiões do núcleo dorsal da rafe: importância para a expressão de comportamentos defensivos associados à ansiedade e ao pânico

Tese apresentada ao Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. : _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. : _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. : _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. : _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. : _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho a todos que
sofrem ou já sofreram de algum
transtorno mental e aos seus
familiares.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Hélio Zangrossi Júnior pelos ensinamentos proporcionados durante estes sete anos de colaborações. Agradeço por ter sido um orientador presente e por ter me direcionado na caminhada à maturidade científica.

Ao Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra pela frutífera colaboração na realização dos experimentos de neurotraçamento. Obrigada pelos ensinamentos e pela motivação nas mais diversas e adversas situações. Tenho muita estima pelo senhor.

Ao Prof. Dr. Fernando Morgan de Aguiar Corrêa por sempre me receber, tão gentilmente, para esclarecer dúvidas ou para um cafézinho em seu laboratório. Agradeço pelo seu mais encorajador ensinamento: “nada está tão ruim, que não possa piorar”.

Ao Prof. Dr. Norberto Garcia Cairasco por sempre incentivar a enxergar além. Obrigada por mostrar a importância da interdisciplinaridade e da parceria Universidade-Sociedade.

Ao Prof. Dr. Ricardo Maurício Xavier Leão por introduzir a eletrofisiologia à minha vida. Obrigada por disponibilizar seu laboratório e seus conhecimentos em meus primeiros passos neste novo mundo. Agradeço, também, os cafezinhos com bolachas e conversas junto a seu querido grupo.

À Prof^a. Dr^a. Alline Cristina de Campos pela disponibilidade, atenção e ensinamentos imuno-histoquímicos durante as tentativas de marcar receptores serotoninérgicos.

I would like to sincerely thank Dr. Ingrid Ehrlich for giving me the opportunity to join her lab, for training me in electrophysiology and for her priceless inputs throughout this period.

Aos membros da banca por aceitaram o convite, pela disponibilidade e pela colaboração na discussão e enriquecimento do presente trabalho.

Aos colaboradores desse estudo, Leonardo Daniel Mendes, minha dupla, pelos inúmeros experimentos realizados juntos; Eduardo Albino Trindade Fortaleza, por me ensinar e ajudar na cirurgia da amígdala basolateral; Rafael Carvalho Almada e Daoud Hibrahim Elias Filho pelo auxílio no procedimento de imuno-histoquímica nos experimentos de neurotraçamento.

Ao Afonso Paulo Padovan pelo excelente suporte técnico e por resolver/organizar todo o necessário para que sempre tivéssemos as melhores condições para realizar os experimentos.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Farmacologia, em especial, à Gislaíne Pedroso de Moraes Marques, à Sônia Maria Stefanelli de Andrade, à Fátima Helena Petean e ao José Waldick Ramon. Aos técnicos Tadeu Franco Vieira, Eleni Luiza Tamburus Gomes, Ivanilda Castrechini Fortunato, Diva Amábile Montanha de Souza, Sandra de Oliveira Conde Tella, Marcos Antônio de Carvalho, Eliana Beatriz Castrechini de Barros, Marco Antônio Ribeiro da Silva, Maria Inês Castrechini Nemoto e Orlando Mesquita Júnior. À vigilante universitária Cláudia Aparecida Lima Santos e a cantineira Walkiria Chaina. Agradeço a vocês pelo suporte e carinho durante esta longa jornada.

Aos colegas do Laboratório de Farmacologia do Comportamento, Ailton Spiacci Júnior, Alana Tercino Frias, Ana Beatriz Sant'Ana, Daiane dos Santos Rosa, Gabriel Gripp Fernandes, Heloísa Helena Vilela Costa e Leonardo Daniel Mendes pelas ideias compartilhadas e demais contribuições.

I would also like to appreciate all my colleagues at the Centre for Integrative Neuroscience for the friendly working atmosphere.

In particular, I would like to thank the amazing people I met in Tübingen, who made me feel at home and gave me a memorable 2017, my dearest friends Irene Melo, Flávia Frattini, Nevena Stajković, Alexandra Eritja, Aleksandra Arsic, Charalampos Brakatselos, Ayla Aksoy-Aksel, Zeina Wassouf, Priscila Sena and Carolina Schroeder.

Aos queridos amigos do Departamento de Fisiologia, Alexandra Cunha, Junia de Deus e César Ceballos por todos os ensinamentos em eletrofisiologia, pelos deliciosos intervalos regados a café, bolachas e bolos, e pela carinhosa amizade.

Às queridas amigas do grupo do Prof. Fernando Morgan, Silvana Lopes-Azevedo e Cristiane Busnardo, pelas colaborações científicas, pelos cafés terapêuticos e pelo positivismo e motivação nos momentos árdusos.

Ao querido amigo Thiago Augusto Moreira Costa pelas inúmeras vezes que consertou meu computador, impedindo a perda de dados, análises, apresentações e da minha cabeça. Obrigada por sempre me ajudar prontamente e pela divertida amizade.

Às inestimáveis amigadas que a USP e Ribeirão Preto me proporcionaram: Jana de Ross, Ana Brogгинi, Mariana Queiroz, Thaís Pimentel, Paulo de Tarso Barros, Letícia Arruda, Jonilson Berlink, Taís Lopes e Débora Ramos. “O que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida”.

À minha querida terapeuta Maria Armanda Lopes por me ajudar a ter força, coragem e gratidão nos momentos mais inóspitos.

À Capes e ao DAAD pelo apoio financeiro.

Finalmente e mais importante, agradeço aos meus pais, José Antônio e Iriane, pelo amor incondicional, pelo suporte emocional, profissional e financeiro, por vibrarem com cada conquista, por me acolherem em cada derrota, por serem meu maior exemplo, meu esteio e por sempre me incentivarem a voar à altitude dos meus sonhos.

“There are indeed (who might say Nay) gloomy & hypochondriac minds, inhabitants of diseased bodies, disgusted with the present, & despairing of the future; always counting that the worst will happen, because it may happen. To these I say How much pain have cost us the evils which have never happened!”

Thomas Jefferson, Letter to John Adams, Apr. 8, 1816

RESUMO

Matthiesen, Melina. **Regulação serotoninérgica do núcleo basolateral do complexo amigdalóide, da substância cinzenta periaquedutal dorsal e do hipotálamo medial por diferentes sub-regiões do núcleo dorsal da rafe: importância para a expressão de comportamentos defensivos associados à ansiedade e ao pânico.** 2018. 99 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Uma série de evidências indica que a ativação de neurônios serotoninérgicos no subnúcleo dorsomedial (DRD) do núcleo dorsal da rafe (NDR) facilita a expressão de comportamentos defensivos relacionados à ansiedade, como a esquia inibitória. Por outro lado, a ativação de neurônios serotoninérgicos nas asas laterais do NDR inibe a expressão da resposta de fuga, uma reação defensiva associada ao pânico. Essas evidências indicam que vias serotoninérgicas distintas provenientes do NDR modulam comportamentos defensivos associados à ansiedade e ao pânico. No presente estudo investigamos se as asas laterais do NDR enviam projeções serotoninérgicas para substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd) e para o hipotálamo dorsomedial (Hdm). Com base nos resultados neuroanatômicos, investigamos, através do uso do labirinto em T elevado (LTE), se a facilitação da neurotransmissão serotoninérgica na SCPd e no Hdm é responsável pelas consequências comportamentais induzidas pela ativação de neurônios serotoninérgicos nas asas laterais. Também avaliamos se a facilitação da neurotransmissão serotoninérgica no núcleo basolateral da amígdala (BLA) é responsável pelas consequências comportamentais desencadeadas pela ativação de neurônios serotoninérgicos no DRD. Vale ressaltar que, enquanto na SCPd e no Hdm, a ativação dos receptores 5-HT_{1A} inibe a resposta de fuga, no BLA, a estimulação dos receptores 5-HT_{2C} facilita a aquisição da resposta de esquia inibitória. Com base em estudos que mostraram que a tarefa de esquia inibitória e a administração intraperitoneal de drogas ansiogênicas ativam o subnúcleo caudal (DRC) do NDR, realizamos as primeiras observações das consequências comportamentais no LTE decorrentes da manipulação farmacológica deste subnúcleo. Os resultados neuroanatômicos mostraram que as asas laterais enviam projeções para todas as colunas da SCP, incluindo a SCPd, e para núcleos hipotalâmicos como o Hdm, o ventromedial e o periventricular. Os resultados farmacológicos mostraram que o antagonismo dos receptores 5-HT_{1A} tanto na SCPd, quanto no Hdm, bloqueou o efeito panicolítico causado pela ativação de neurônios serotoninérgicos nas asas laterais do NDR pela administração local do antagonista de receptores 5-HT_{1A} WAY-100635. O pré-tratamento do BLA com o antagonista de receptores 5-HT_{2C} SB-242084 bloqueou o efeito ansiogênico, tanto no LTE, como no teste de transição claro/escuro, causado pela ativação de neurônios serotoninérgicos no DRD. Os resultados das análises no DRC mostraram que a administração local do agonista de receptores 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT ou de WAY-100635 no DRC não alterou o comportamento de ratos submetidos ao LTE, sugerindo que, diferentemente do observado no DRD ou nas asas laterais, a manipulação farmacológica de neurônios serotoninérgicos nesse subnúcleo não altera a expressão de respostas defensivas associadas à ansiedade ou ao pânico. Nossos resultados sugerem que enquanto os receptores 5-HT_{1A} localizados na

SCPd e no Hdm medeiam o efeito anti-pânico provocado pela estimulação de neurônios serotoninérgicos nas asas laterais, os receptores 5-HT_{2C} no BLA são recrutados para o efeito ansiogênico causado pela ativação de neurônios serotoninérgicos no DRD. Disfunções nas vias serotoninérgicas que ligam as asas laterais à SCPd e ao Hdm ou o DRD ao BLA podem estar criticamente envolvidas na fisiopatologia dos transtornos de pânico e de ansiedade generalizada, respectivamente.

Palavras-chave: ansiedade; pânico; núcleo dorsal da rafe; receptores 5-HT_{1A}; receptores 5-HT_{2C}.

ABSTRACT

Matthiesen, Melina. **Serotonergic regulation of the basolateral nucleus of the amygdaloid complex, the dorsal periaqueductal gray and the medial hypothalamus by different sub-regions of the dorsal rafe nucleus: importance for the expression of defensive behaviors associated with anxiety and panic.** 2018. 99 f. PhD thesis (Doctoral Degree) – School of Medicine of Ribeirão Preto – University of São Paulo – Ribeirão Preto.

A wealth of evidence indicates that the activation of serotonergic neurons in the dorsomedial subnucleus (DRD) of the dorsal raphe nucleus (DR) facilitates the expression of defensive behaviors related to anxiety, such as inhibitory avoidance. On the other hand, the stimulation of serotonergic neurons in the lateral wings (lwDR) of the DR inhibits the expression of escape, a defensive reaction related to panic. These findings indicate that distinct DR serotonergic pathways modulate defensive behaviors associated with anxiety and panic. The present study aimed to investigate whether the lwDR send serotonergic projections to the dorsal periaqueductal gray (dPAG) and to the dorsomedial hypothalamus (dmH). Based on the results of this neuroanatomical analysis, we investigated, using the elevated T-maze (ETM), whether the facilitation of serotonergic neurotransmission in the dPAG or the dmH is implicated in the behavioral consequences induced by the activation of serotonergic neurons in the lwDR. We also assessed whether the facilitation of serotonergic neurotransmission in the basolateral nucleus of amygdala (BLA) is implicated in the behavioral consequences induced by the activation of serotonergic neurons in the DRD. It is noteworthy that, while in dPAG and dmH, activation of 5-HT_{1A} receptors causes an anti-escape effect, in the BLA, stimulation of 5-HT_{2C} receptors facilitates inhibitory avoidance acquisition. Based on evidence showing that inhibitory avoidance expression and intraperitoneal administration of anxiogenic drugs activate the DR caudal subnucleus (DRC), we also investigated the behavioral consequences in the LTE induced by the pharmacological manipulation of this subnucleus. Our results showed that the lwDR send projections to all PAG columns, including dPAG, and to hypothalamic nuclei such as dmH, ventromedial and periventricular. They also revealed that the antagonism of 5-HT_{1A} receptors in the dPAG and dmH blocked the panicolytic-like effect caused by the activation of serotonergic neurons in the lwDR by local administration of 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY-100635. BLA pretreatment with the 5-HT_{2C} receptor antagonist SB-242084 blocked the anxiogenic effect in the ETM and light/dark transition test, caused by the activation of serotonergic neurons in the DRD. In the DRC, injection of WAY-100635 or the 5-HT_{1A} agonist 8-OH-DPAT had no effect in the ETM, suggesting that, different from that observed in the DRD or lwDR, the pharmacological manipulations of serotonergic neurons in this subnucleus does not interfere with defensive behaviors associated with anxiety or panic. Our results suggest that while dPAG and dmH 5-HT_{1A} receptors mediate the anti-panic effect caused by serotonergic neurons stimulation in the lwDR, 5-HT_{2C} receptors in the BLA are recruited for the anxiogenic effect caused by activation of serotonergic neurons in the DRD. Dysfunctions in the serotonergic pathways that connect the lwDR to the dPAG and the dmH or the DRD to the BLA may be critically involved in the pathophysiology of panic and generalized anxiety disorders, respectively.

Keywords: anxiety; panic; dorsal raphe nucleus; 5-HT_{1A} receptors; 5-HT_{2C} receptors.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	16
1.1. Ansiedade	16
1.2. Comportamentos defensivos	17
1.3. O papel da serotonina na modulação de comportamentos defensivos	21
1.4. Labirinto em T elevado	23
1.5. Heterogeneidade anatômica e funcional do núcleo dorsal da rafe	26
2. Objetivos	32
2.1. Objetivo geral	32
2.2. Objetivos específicos.....	32
3. Material e métodos:.....	34
3.1. Animais	34
3.2. Drogas.....	34
3.3. Aparatos	35
3.3.1. Labirinto em T elevado	35
3.3.2. Campo aberto.....	36
3.3.3. Caixa claro-escuro.....	36
3.4. Procedimentos gerais.....	37
3.4.1. Procedimento cirúrgico.....	37
3.4.2. Injeções.....	38
3.5. Procedimentos específicos.....	39
3.5.1. Estudo neuroanatômico	39
3.5.1. Estudo da via que parte das asas laterais do núcleo dorsal da rafe para a substância cinzenta periaquedutal dorsal e para o hipotálamo dorsomedial utilizando um neurotraçador anterógrado	39
3.5.2. Estudos comportamentais	40

3.5.2.1. <i>Papel da regulação serotoninérgica na substância cinzenta periaquedutal dorsal e no hipotálamo dorsomedial, após bloqueio de receptores 5-HT_{1A} nas asas laterais do núcleo dorsal da rafe.....</i>	41
3.5.2.2. <i>Papel dos receptores 5-HT_{1A} do subnúcleo caudal do núcleo dorsal da rafe na modulação de respostas defensivas avaliadas no labirinto em T elevado.....</i>	42
3.5.2.3. <i>Papel da regulação serotoninérgica no núcleo basolateral do complexo amigdalóide, após bloqueio de receptores 5-HT_{1A} no subnúcleo dorsomedial do núcleo dorsal da rafe</i>	43
3.6. <i>Perfusão.....</i>	44
3.6.1. <i>Perfusão para verificação da localização dos sítios de injeção</i>	44
3.6.2. <i>Perfusão para procedimento de imuno-histoquímica</i>	44
3.7. <i>Histologia.....</i>	45
3.7. <i>Verificação da localização do sítio de injeção</i>	45
3.7. <i>Preparo do encéfalo para o procedimento de imuno-histoquímica</i>	45
3.8. <i>Imuno-histoquímica para revelação do neurotraçador e detecção da enzima triptofano hidroxilase</i>	45
3.9. <i>Análise estatística dos resultados</i>	46
4. <i>Resultados:.....</i>	49
4.1. <i>Experimento 1</i>	49
4.2. <i>Experimento 2</i>	54
4.3. <i>Experimento 3</i>	57
4.4. <i>Experimento 4</i>	60
4.5. <i>Experimento 5</i>	63
4.6. <i>Experimento 6</i>	65
4.7. <i>Experimento 7</i>	68
5. <i>Discussão</i>	74
6. <i>Conclusões</i>	85
7. <i>Referências Bibliográficas</i>	87

Introdução

1. Introdução

1.1. Ansiedade

A ansiedade é uma emoção caracterizada por sentimentos subjetivos de tensão e apreensão, acompanhados por alterações autonômicas, como, por exemplo, o aumento da pressão arterial (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013). A ansiedade ocorre em situações de possíveis danos físicos ou de risco à sobrevivência. Diferentemente do medo, que é uma emoção experimentada quando estamos realmente em uma situação perigosa, a ansiedade é uma emoção que ocorre quando esperamos ou antecipamos que algo desagradável pode acontecer (BRANDÃO, 2001).

Quando a ansiedade manifesta-se de forma persistente e exacerbada, passando a interferir negativamente na execução de tarefas cotidianas e no funcionamento psicossocial, passa a ser considerada patológica (BARLOW, 2004; BRANDÃO, 2001).

A quinta edição do Manual de Diagnóstico e Estatística das Doenças Mentais – DSM classifica a ansiedade patológica primária em diferentes categorias nosológicas de acordo com a sintomatologia, decurso temporal e respostas terapêuticas (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013), a saber:

- Transtorno de ansiedade de separação

- Mutismo seletivo

- Fobia específica

- Transtorno de ansiedade social

- Transtorno do pânico

- Agorafobia

- Transtorno de ansiedade generalizada

- Transtorno de ansiedade devido a outra condição médica

- Transtorno de ansiedade induzido por substâncias químicas

- Outro transtorno de ansiedade especificado

- Transtorno de ansiedade não especificado.

Dentre os transtornos citados, o transtorno de ansiedade generalizada (TAG) e o transtorno do pânico (TP) são os de interesse para o presente trabalho.

O TAG tem como característica essencial a ansiedade e a preocupação persistente e excessiva acerca de diversos eventos ou atividades rotineiras por um período de, no mínimo, seis meses. A intensidade, duração e frequência das preocupações são desproporcionais à probabilidade real ou ao impacto do evento antecipado. Além disso, as preocupações são acompanhadas por sintomas físicos e cognitivos, incluindo inquietação ou sensação de “nervos à flor da pele”, fadiga, dificuldade de concentração ou “ter brancos”, irritabilidade, tensão muscular e perturbação do sono (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

O TP é caracterizado pela ocorrência de ataques de pânico recorrentes e inesperados. Os ataques de pânico são surtos abruptos de intenso medo que atingem um pico em poucos minutos e são acompanhados de, pelo menos, quatro sintomas físicos e/ou cognitivos, como: taquicardia, sensação de sufocamento, náuseas, parestesias e medo de morrer (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

Um estudo epidemiológico realizado na região metropolitana de São Paulo mostrou que a prevalência do TAG e do TP durante 12 meses é de 2,3 % e 1,1 %, respectivamente. Em cerca de 50 % dos casos, estes transtornos apresentam-se na sua forma mais severa (ANDRADE; WANG; ANDREONI; et al., 2012). Nos EUA e na Europa, estima-se que o TAG apresente prevalência de 2 % e 0,9 % durante 12 meses, e o TP de 2,4 % e 0,7 %, respectivamente (BANDELOW; 2015; KESSLER; PETUKHOVA; SAMPSON, et al., 2012).

Estudos clínicos e experimentais têm proporcionado avanços importantes no entendimento da neurobiologia desses transtornos. Dentre eles, a experimentação animal tem contribuído com o progresso da farmacoterapia dos diferentes transtornos de ansiedade (ZANGROSSI; GRAEFF, 2004).

1.2. Comportamentos defensivos

O livro *The Expression of Emotions in Man and Animals* (1872), de Charles Darwin, constituiu uma das primeiras fontes de informação sobre as emoções dentro da perspectiva evolucionista. Nele, emoções como dor, surpresa, alegria, horror,

raiva, medo, ansiedade, dentre outras, foram comparadas em faces humanas e de outros animais. A grande semelhança entre as expressões faciais e os gritos inarticulados emitidos pelo homem e pelos animais quando expostos às mesmas condições, sugeria a descendência a partir de um ancestral comum (CASTILHO; MARTINS; 2012). Sob esta perspectiva, a ansiedade e o medo no homem teriam suas raízes biológicas nos comportamentos defensivos de animais frente a ameaças a sua integridade física ou a sua sobrevivência.

Caroline e Robert Blanchard, em seus estudos etoexperimentais, observaram que roedores selvagens expressavam estratégias defensivas distintas dependendo do estímulo ameaçador presente (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988, 1989). Os resultados destes estudos levaram os autores a formularem o conceito de níveis de defesa, definidos pela presença ou ausência do predador e pela distância que se encontra da presa. O primeiro nível de defesa ocorre quando o perigo é incerto. Neste ambiente, os roedores mantêm o corpo estendido, com o ventre junto ao solo, avançando e recuando a cabeça repetidas vezes. Este padrão de comportamento denomina-se avaliação de risco. O segundo nível de defesa é caracterizado pela existência real de estímulos ameaçadores, mas estes se encontram distantes da presa, não representando um perigo imediato. Se não houver possibilidade de escapar da situação, o animal fica imóvel, com a finalidade de não ser detectado pelo predador. O último nível de defesa ocorre quando predador e presa estão muito próximos. A principal estratégia defensiva adotada é a fuga, mas caso não haja uma rota disponível, a presa adota a luta defensiva (BLANCHARD; FLANNELLY; BLANCHARD, 1986; BLANCHARD; YUDKO; RODGERS, et al., 1993).

A identificação de um conjunto de estratégias defensivas que são comuns a várias espécies foi uma das principais contribuições da análise etoexperimental (SHUHAMA; DEL-BEM; LOUREIRO, et al., 2007). Embora a influência da cultura na conduta humana dificulte a extrapolação do comportamento animal para o humano, estudos realizados no Brasil e nos Estados Unidos identificaram semelhanças nas estratégias de defesa adotadas por humanos com as já descritas em roedores. Mais especificamente, nos estudos foram descritos 12 cenários diferentes, nos quais estímulos ameaçadores potenciais ou reais estavam presentes, e os voluntários precisavam escolher a estratégia defensiva adequada para cada cenário. Ao encontro do observado nos estudos realizados com roedores, os cenários foram

capazes de provocar diferentes respostas comportamentais defensivas em humanos, dependendo das características da ameaça, como a magnitude, a presença ou ausência de rotas de fuga e a distância do perigo. Esses dados sugerem que um repertório básico de estratégias defensivas é conservado ao longo da evolução dos mamíferos por apresentarem valor adaptativo (BLANCHARD; HYND; MINKE, et al., 2001; SHUHAMA; DEL-BEM; LOUREIRO, et al., 2008).

Além da semelhança nos comportamentos defensivos adotados frente a uma ameaça, humanos e outros mamíferos recrutam estruturas neurais equivalentes frente aos diferentes perigos (GRAY; MCNAUGHTON, 2000; MCNAUGHTON; CORR, 2004; MOBBS; MARCHANT; HASSABIS, et al., 2009; MOBBS; PETROVIC; MARCHANT, et al., 2007; MOBBS; YU; ROWE, et al., 2010). Por exemplo, Mobbs e colaboradores (2010) observaram, por ressonância magnética funcional, que quando uma tarântula era colocada próxima ao pé de um indivíduo, este relatava medo, o que coincidia com um aumento preponderante da atividade da substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd), entre outras estruturas neurais monitoradas. Por outro lado, à medida que a tarântula se distanciava, o indivíduo relatava uma diminuição do medo e o córtex pré-frontal era ativado (MOBBS; YU; ROWE, et al., 2010).

Neste sentido, enquanto estruturas prosencefálicas como a amígdala, o córtex pré-frontal e o sistema septo-hipocampal seriam recrutados frente a uma ameaça potencial (GRAY; MCNAUGHTON, 2000; MCNAUGHTON; CORR, 2004; SHIN; LIBERZON; 2010), o hipotálamo medial e a SCPd seriam as principais estruturas neurais ativadas frente a um perigo real, favorecendo as respostas defensivas de fuga e luta (CANTERAS; CHIAVEGATTO; RIBEIRO, et al., 1997; CANTERAS; GOTO, 1999; SCHENBERG, 2010).

Com relação à SCPd, é importante ressaltar que, em humanos, a estimulação elétrica desta estrutura elicia reações de medo intenso e aumento da atividade do sistema nervoso simpático (NASHOLD; WILSON; SLAUGHTER, 1969). Quanto ao hipotálamo, foi mostrado que a estimulação elétrica do hipotálamo ventromedial de indivíduos desencadeia ataques de pânico (WILENT; OH; BUETEFISCH, 2010).

Em animais, a estimulação elétrica ou química destas estruturas gera comportamentos defensivos como a luta e fuga, que são semelhantes aos observados em situações de perigo extremo, como no confronto com predadores (JENCK; MOREAU; MARTIN, 1995). Na SCPd, esses procedimentos eliciam

respostas defensivas vigorosas, como fuga e/ saltos, e respostas autonômicas como piloereção, taquicardia e hipertensão arterial (CARRIVE, 1993; HILTON; REDFERN, 1986; KRIEGER; GRAEFF, 1985; FERNANDEZ DE MOLINA; HUNSPERGER, 1959; SCHENBERG, 2010; VIANNA; BORELLI; FERREIRA-NETO, et al., 2003).

Quanto ao hipotálamo, às primeiras evidências a relacionar esta estrutura à evocação de comportamentos defensivos, como a fuga, foram obtidas através de estudos de estimulação elétrica em gatos (FERNANDEZ DE MOLINA; HUNSPERGER, 1959). A partir destes achados, uma série de trabalhos tem mostrado a importância de diferentes núcleos do hipotálamo, como o hipotálamo medial, na modulação de comportamentos defensivos (BRANDÃO; DI SCALA; BOUCHET, et al., 1986; DI SCALA; SCHMITT; KARLI, 1984; MILANI; GRAEFF, 1986; SILVEIRA; GRAEFF, 1992). Neste sentido, estudos realizados em ratos com a estimulação elétrica do hipotálamo medial, bem como a estimulação química com o aminoácido excitatório ácido caínico (SILVEIRA; SANDNER; DI SCALA, et al., 1995) ou com o antagonista de receptores GABA_A bicuculina (BIAGIONI, DE FREITAS; DA SILVA, et al., 2013; DI SCALA; SCHMITT; KARLI, 1984; FREITAS; URIBE-MARIÑO; CASTIBLANCO-URBINA, et al., 2009), mostraram a evocação de respostas de levantamento, saltos direcionados e fuga coordenada. Com base nestes e outros estudos, a resposta de fuga gerada tanto pela estimulação da SCPd como do hipotálamo medial tem sido utilizada como um índice de pânico (para uma revisão, ver MOREIRA; GOBIRA; VIANA, et al., 2013)

A fim de estabelecer uma relação entre os diferentes níveis de defesa e os distintos transtornos de ansiedade, como o TAG e o TP, experimentos de validação farmacológica também foram conduzidos por Blanchard e colaboradores (BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2001; BLANCHARD; GRIEBEL; HENRIE; et al., 1997; BLANCHARD; YODKO; RODGER, et al., 1993). Os pesquisadores observaram que o emprego de drogas utilizadas no tratamento do TAG, como ansiolíticos benzodiazepínicos e o agonista de receptores serotoninérgicos do subtipo 5-HT_{1A}, a buspirona, causava uma redução nos comportamentos de avaliação de risco e de esquiva. Já as respostas defensivas de fuga e ataques defensivos emitidos por roedores frente a uma ameaça proximal, não eram alteradas com estes tratamentos. No entanto, a administração crônica do inibidor seletivo da recaptação de serotonina, a fluoxetina, uma droga eficaz no tratamento do TAG e do

TP, alterou tanto a resposta de avaliação de risco quanto à resposta de fuga (BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2001; BLANCHARD; GRIEBEL; HENRIE; et al., 1997; BLANCHARD; RODGERS; HENDRIE, et al., 1988; BLANCHARD; YODKO; RODGER, et al., 1993).

A eficácia de drogas que interferem com a neurotransmissão serotoninérgica no tratamento de transtornos de ansiedade tem levado a investigações da participação da serotonina na modulação de comportamentos defensivos associados, entre outros, à ansiedade e ao pânico (BALDWIN; ANDERSON; NUTT, et al., 2005; GRAEFF, 1994; 2004; GRAEFF; ZANGROSSI, 2010) .

1.3. O papel da serotonina na modulação de comportamentos defensivos

A serotonina é uma indolamina sintetizada a partir do aminoácido triptofano em duas etapas: a hidroxilação do triptofano pela enzima triptofano hidroxilase, para formar o 5-hidroxitriptofano, e a descarboxilação subsequente desse intermediário pela enzima L-aminoácido aromático descarboxilase, produzindo a serotonina. A serotonina é sintetizada por células enterocromafins no intestino e por neurônios serotoninérgicos nos núcleos da rafe (DAVID; GARDIER; 2016).

As primeiras evidências experimentais a demonstrarem o envolvimento da serotonina na modulação de respostas defensivas associadas à ansiedade foram obtidas em modelos animais baseados no paradigma de conflito de Geller-Seifter. Este teste é baseado tanto no conceito de condicionamento operante, quanto no conceito de conflito, quando o animal se vê em uma situação em que precisa escolher entre opções antagônicas, gerando um conflito do tipo esquiva-aproximação (GELLER; SEIFTER, 1960). Os testes de conflito são empregados na identificação e caracterização de agentes ansiolíticos e das bases neurobiológicas da ansiedade.

Estudos empregando modelos de conflito mostraram que a redução da neurotransmissão serotoninérgica, através da administração de inibidores da síntese de serotonina ou de antagonistas serotoninérgicos, aumentava a expressão de respostas punidas, apontando para o papel ansiogênico da serotonina (GELLER; BLUM, 1970; GRAEFF; SCHOENFELD, 1970; ROBICHAUD; SLEDGE, 1969). Somados a estas evidências, estudos farmacológicos mostraram que a serotonina

promovia um aumento nos níveis de ansiedade devido sua ação em substratos neurais como o complexo amigdalóide (HODGES; GREEN; GLENN, 1987; PETERSEN; SCHEEL-KRUGER, 1984). Em paralelo aos achados obtidos em modelos animais de conflito, estudos que utilizaram o modelo animal de estimulação elétrica da SCPd observaram que a redução da neurotransmissão serotoninérgica promovia a facilitação da resposta de fuga, sugerindo que a serotonina apresentava um papel anti-aversivo (KISER; LEOVITZ, 1975; KISER; LEOVITZ; GERMAN, 1978; SCHENBERG; GRAEFF, 1978; SCHULTZ; AGUIAR, GRAEFF, 1985).

A contradição referente ao papel da serotonina na ansiedade foi configurada ao assumir que ambos os modelos animais geravam o mesmo estado emocional. No entanto, admitindo-se que os diferentes modelos animais estariam relacionados a transtornos de ansiedade distintos, foi possível estabelecer uma teoria para tentar explicar esta divergência (GRAEFF, 2004).

A partir deste pressuposto, Deakin e Graeff (1991) postularam a hipótese do papel dual da serotonina na modulação de respostas defensivas frente a estímulos aversivos que representam ameaças potenciais ou reais. De acordo com os autores, estímulos aversivos incondicionados, como a asfixia, a dor aguda e o medo inato, evocariam respostas defensivas do tipo fuga/luta, principalmente pela ativação da SCPd. Já em situações de perigo incerto ou na presença de estímulos aversivos condicionados, as respostas defensivas evocadas seriam de congelamento e esquiva inibitória, a partir da ativação de estruturas como o complexo amigdalóide e o córtex.

Ainda segundo a proposta de Deakin e Graeff (1991), a ativação das vias serotoninérgicas prosencefálica e periventricular, que partem do núcleo dorsal da rafe (NDR) para a amígdala e para a SCPd, respectivamente, modulariam a expressão de respostas defensivas diferentes. Enquanto o aumento de serotonina na amígdala favoreceria a expressão de comportamentos associados à ansiedade, na SCPd, inibiria os comportamentos associados ao pânico (para revisão ver GRAEFF, 2002, 2004). O papel biológico deste mecanismo seria o de impedir reações extremas, como a fuga ou a luta, quando o perigo é incerto, evitando assim que o animal seja detectado pelo predador (GRAEFF, 1991). Disfunções nestas vias estariam relacionadas à fisiopatologia do TAG e do TP, respectivamente (DEAKIN; GRAEFF, 1991; GRAEFF; ZANGROSSI, 2010).

1.4. Labirinto em T elevado

A fim de testar a teoria do papel dual da serotonina na ansiedade, foi desenvolvido o modelo do labirinto em T elevado (LTE; GRAEFF; NETTO; ZANGROSSI, 1998; GRAEFF; VIANA; TOMAZ, 1993; VIANA; TOMAZ; GRAEFF, 1994; ZANGROSSI; GRAEFF, 1997). Este modelo foi elaborado a partir do labirinto em cruz elevado, com base na aversão que os roedores sentem de lugares altos e desprotegidos (PELLOW; CHOPIN; FILE, et al., 1985). Ele permite avaliar, em um mesmo animal, os comportamentos de esquiva inibitória e de fuga, relacionados, respectivamente, ao TAG e ao TP (GRAEFF, 2002, 2004; GRAEFF; ZANGROSSI, 2002; TEIXEIRA; ZANGROSSI; GRAEFF, 2000; ZANGROSSI; VIANA; ZANOVELI, et al., 2001).

O LTE é constituído por um braço fechado, disposto perpendicularmente a dois braços abertos, todos elevados em relação ao solo. Neste modelo, o comportamento de esquiva inibitória é avaliado colocando o animal, por três vezes consecutivas, na extremidade distal do braço fechado e então é registrada a latência para o mesmo sair deste braço com as quatro patas. Já o comportamento de fuga é avaliado colocando o animal, também por três vezes consecutivas, na extremidade distal de um dos braços abertos e em cada uma das tentativas registra-se a latência para o mesmo sair deste braço com as quatro patas (GRAEFF; NETTO; ZANGROSSI, 1998; ZANGROSSI; GRAEFF, 1997).

Uma série de experimentos realizados com compostos ansiolíticos e antidepressivos permitiu a validação farmacológica do LTE (para revisão ver GRAEFF; ZANGROSSI, 2014). Resumidamente, a administração aguda e sistêmica de compostos como o diazepam, o midazolam, a buspirona ou a ritanserina, prejudicaram a aquisição da esquiva inibitória, sem alterar a expressão da fuga (CALIXTO; VANDRESEN; DE NUCCI, et al., 2001; GRAEFF; NETTO; ZANGROSSI, 1998; GRAEFF; VIANA; TOMAZ, 1993; POLTRONIERI; ZANGROSSI; VIANA, 2003; VIANA; TOMAZ; GRAEFF, 1994). O efeito seletivo sobre a resposta de esquiva inibitória correlaciona-se com a eficácia clínica destes fármacos no tratamento do TAG (BALDWIN; WALDMAN; ALLGULANDER, 2011; BALDWIN; WOODS; LAWSON, et al., 2011; NUTT, 1991). Já a administração crônica de antidepressivos

como a imipramina, o escitalopram, a fluoxetina, a paroxetina ou a sertralina, prejudicaram a resposta de fuga, efeito do tipo panicolítico, e podem prejudicar a esquiva inibitória (imipramina e escitalopram) ou não (fluoxetina, paroxetina e sertralina) (GRAEFF; ZANGROSSI, 2010; PINHEIRO; DEL-BEM; ZANGROSSI, ET AL., 2008; POLTRONIERI; ZANGROSSI; VIANA, 2003; TEIXEIRA; ZANGROSSI; GRAEFF, 2003; ZANOVELI; NOGUEIRA; ZANGROSSI, 2005, 2007). Estes efeitos correlacionam-se com a eficácia clínica destes fármacos no tratamento do TAG e do TP (JOHNSON; LYDIARD, 1995; STAHL; GERGEL; Li, 2003).

O papel diferencial do NDR na modulação de respostas defensivas foi abordado em uma série de estudos utilizando o LTE. Enquanto a administração de ácido caínico no NDR facilita a aquisição da esquiva inibitória e inibe a resposta de fuga (POBBE; ZANGROSSI, 2005), a lesão neurotóxica com 5,7-dihidroxitriptamina deste núcleo, bem como a administração do agonista de receptores GABA_A muscimol, causam efeitos opostos sobre estas duas respostas defensivas (SENA; BUENO; POBBE, 2003).

Além disso, foi avaliado o papel do NDR na modulação de respostas defensivas no LTE através da manipulação farmacológica de receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT_{1A}. Sena e colaboradores (2003) mostraram que a administração do agonista de receptores 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT neste núcleo prejudica a aquisição da esquiva inibitória e facilita a expressão da resposta de fuga. Já a administração local do antagonista de receptores 5-HT_{1A} WAY-100635 promove efeito oposto, ou seja, facilita a aquisição da esquiva inibitória e apresenta efeito anti-fuga, sendo o último bloqueado pelo antagonismo de receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A}, mais especificamente o WAY-100635 e a quetanserina, na SCPd (POBBE; ZANGROSSI, 2005).

Os receptores 5-HT_{1A} estão acoplados à proteína G_{ai/o} e sua ativação resulta em hiperpolarização celular, principalmente, via inibição da enzima adenilato ciclase (DRAGO; RONCHI; SERRETTI, 2008). Estes receptores podem ser encontrados no encéfalo como autorreceptores ou como heterorreceptores (CALIZO; AKANWA; MA, et al., 2011; CHALMERS; WATSON, 1991; KIRBY; PERNAR; VALENTINO, 2003; PAZOS; PALACIOS, 1985).

Em relação aos autorreceptores, eles são encontrados tanto no soma, como nos dendritos dos neurônios serotoninérgicos nos núcleos da rafe (CHALMERS;

WATSON, 1991; PAZOS; PALACIOS, 1985). Enquanto a ativação destes receptores com drogas agonistas, como o 8-OH-DPAT, inibe a taxa de disparo destes neurônios (HAJÓS; HAJÓS-KORCSAK; SHARP, 1999; HJORTH; SHARP, 1991), a administração do antagonista WAY-100635 causa o efeito oposto (COMMONS, 2008; DUDLEY; DINARDO; GLASS, 1999; FORMAL; METZLER; GALLEGOS, et al., 1996).

Este efeito do WAY-100635 tem sido interpretado à luz da ocorrência de um controle inibitório tônico exercido pela serotonina sobre neurônios serotoninérgicos da rafe. Estudos eletrofisiológicos mostraram que a ativação dos receptores 5-HT_{1A} nestes neurônios provoca hiperpolarização celular e, por implicação, uma redução na liberação de serotonina em suas áreas de projeção (BLIER AND DE MONTIGNY, 1987; HJORTH AND SHARP, 1991; KREISS AND LUCKI, 1994; PARSON; KERR; TECOTT, 2001; RICHER; HEN; BLIER, 2002; SPROUSE; AGHAJANIAN, 1987).

Outros estudos com o LTE mostraram que o papel desempenhado pela serotonina na amígdala e, principalmente, na SCPd é mais complexo do que aquele proposto na teoria de Deakin e Graeff (1991).

Na SCPd, a administração de serotonina facilita a aquisição da esquiva inibitória e inibe a resposta de fuga no LTE, efeitos ansiogênico e panicolítico, respectivamente (DE PAULA SOARES; ZANGROSSI, 2004; ZANOVELI; NOGUEIRA; ZANGROSSI, 2003). Ou seja, nesta estrutura mesencefálica, a serotonina não atua apenas inibindo a resposta de fuga, como proposto por Deakin e Graeff. Os estudos posteriores com a SCPd mostraram ainda que, enquanto o efeito panicolítico é desencadeado pela ativação dos receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} (ZANOVELI; NOGUEIRA; ZANGROSSI, 2003), o efeito ansiogênico é decorrente da ativação dos receptores 5-HT_{2C} (DE PAULA SOARES; ZANGROSSI, 2004; YAMASHITA; DE BORTOLI; ZANGROSSI, 2011).

Os receptores da família 5-HT₂ estão acoplados à proteína G_{q/11} e sua ativação exerce influência excitatória na atividade neuronal pela inibição de canais de potássio (HANNON; HOYER, 2008; WEBER; SCHMITT; WISCHMEYER, et al., 2008). Em especial, os receptores do tipo 5-HT_{2C} são, predominantemente, pós-sinápticos e apresentam isoformas, refletindo a edição do RNA mensageiro (BERG; CROPPER; NISWENDER, 2001; HERRICK-DAVIS; GRINDE; NISWENDER, 1999; NISWENDER; COPELAND; HERRICK-DAVIS, et al., 1999).

Quanto à amígdala, de acordo com o proposto na teoria de Deakin e Graeff (1991), observou-se que a administração de serotonina no núcleo basolateral (BLA) facilita a aquisição da esquivia inibitória, sem alterar a resposta de fuga no LTE. Este efeito ansiogênico é decorrente da ação da serotonina em receptores 5-HT_{2C} (VICENTE; ZANGROSSI, 2012, 2014).

Por fim, estudos com o Hdm mostram que, como observado na SCPd, a ativação de receptores do subtipo 5-HT_{1A} inibe a resposta de fuga, sem, no entanto, alterar a aquisição da tarefa de esquivia inibitória (NASCIMENTO; KIKUCHI, DE BORTOLI, et al., 2014). Nesta sub-área não foi ainda investigado o papel de receptores 5-HT_{2C} na mediação destas duas respostas defensivas.

1.6. Heterogeneidade anatômica e funcional do NDR

As primeiras evidências da presença de neurônios serotoninérgicos nos núcleos da rafe foram obtidas por Dahlström e Fuxe (1964) com o auxílio da técnica de fluorescência induzida por formaldeído. Os autores identificaram a existência de 9 grupamentos de células serotoninérgicas, classificadas de B₁ a B₉, que se sobrepunham aos núcleos da rafe. As porções B₆ e B₇ formam o que hoje denominamos de NDR (DAHLSTRÖM; FUXE, 1964 apud PIÑEIRO; BLIER, 1999).

O NDR é uma estrutura mesencefálica, localizada abaixo do aqueduto cerebral, caracterizado pela alta densidade de corpos celulares serotoninérgicos (MICHELSEN; SCHMITZ; STEINBUSCH, 2007). Estes neurônios projetam-se para diversas estruturas neurais, sendo a principal fonte de inervação serotoninérgica para o sistema límbico (AZMITIA; SEGAL, 1978; VERTES, 1991).

Há cerca de uma década, estudos têm mostrado que o NDR não é uma estrutura homogênea, como originalmente abordada na teoria de Deakin e Graeff (1991), mas sim um aglomerado de grupamentos celulares formados por neurônios serotoninérgicos e não-serotoninérgicos, que podem diferir tanto morfológica, quanto anatômica e funcionalmente (ABRAMS; JOHNSON; HOLLIS, et al., 2004; CALIZO; AKANWA; MA et al., 2011).

Em 1981, Steinbusch observou, através da técnica de imuno-histoquímica, que o NDR era formado por grupamentos de corpos celulares serotoninérgicos organizados em *clusters* distintos, a saber: dorsomedial, ventromedial e lateral,

correspondentes ao grupamento B₇ proposto por Dahlström e Fuxe (1964), e o caudal, correspondente ao grupamento B₆.

Trabalhos mais recentes consideram que o NDR é dividido em 5 subnúcleos, denominados: dorsal (DRD), ventral (DRV), asas laterais (lwDR, do inglês *lateral wings*), caudal (DRC) e interfascicular (DRI). Esta classificação utilizou como base os estudos originais de Steinbusch (1981) e também estudos realizados por Baker e colaboradores (1990), que delimitaram os diferentes subnúcleos a partir da morfologia e densidade neuronal predominante em cada subnúcleo. Por exemplo, os neurônios das asas laterais são predominantemente ovóides, já os do DRD são fusiformes, triangulares e ovóides.

A existência de uma organização topográfica dos neurônios do NDR ao longo do eixo rostro-caudal foi inicialmente descrita em estudos de neurotraçamento realizados por Imai e colaboradores (1986). Os autores observaram que neurônios da porção caudal do NDR de ratos projetavam-se para estruturas como o hipocampo e o *locus coeruleus*, já neurônios da porção rostral do NDR projetavam-se, principalmente, para os núcleos da base (IMAI; STEINDLER; KITAI, 1986). Este estudo trouxe informações importantes ao mostrar que projeções que inervam estruturas límbicas e motoras partem de diferentes regiões do NDR, sugerindo assim, a existência de uma organização funcional neste núcleo.

A ideia da organização funcional do NDR ganhou força, anos mais tarde, após a publicação de resultados obtidos através da técnica de imuno-histoquímica para detecção da proteína Fos, um marcador indireto da atividade neuronal (DRAGUNOW; FAULL, 1989). Entre estes, Grahn e colaboradores (1999) mostraram que ratos submetidos a choques inescapáveis nas patas apresentam um aumento na expressão da proteína Fos em neurônios serotoninérgicos restritos às porções média e caudal do NDR.

Em 2004, o grupo de pesquisa liderado por Christopher A. Lowry publicou uma revisão adicionando que não apenas os subnúcleos do NDR deveriam ser diferentemente reconhecidos, mas também a subdivisão deste núcleo em, pelo menos, três partes iguais ao longo do eixo rostro-caudal, isto é, a porção rostral, média e caudal (ABRAMS; JOHNSON; HOLLIS, et al., 2004).

Somadas a estas evidências, diversos estudos apontaram para a heterogeneidade funcional dos subnúcleos do NDR. Por exemplo, evidências de

imuno-histoquímica mostraram que a administração intraperitoneal de drogas ansiogênicas, como a cafeína, o agonista não seletivo de receptores 5-HT_{2C} mCPP e o agonista inverso de receptores benzodiazepínicos FG-7142 (ABRAMS; JOHNSON; HAY-SCHMIDT et al., 2005), a microinjeção do agonista de receptores CRF do tipo 1 urocortina 1 no BLA (SPIGA; LIGHTMAN; SHEKHAR, 2006), a administração intra-cerebroventricular do agonista de receptores CRF do tipo 2 urocortina 2 ou a exposição à ambientes iluminados (BOUWKNECHT; SPIGA; STAUB, et al., 2007) promovem a ativação seletiva de neurônios serotoninérgicos localizados no DRD e no DRC. Já a exposição de animais a agentes ou situações indutoras de pânico, como a inalação de uma alta concentração de CO₂ (JOHNSON; HOLLIS; MORATALLA et al., 2005), a infusão periférica de lactato (JOHNSON; LOWRY; TRUITT et al., 2008) ou a primeira exposição ao teste do nado forçado (ROCHE; COMMONS; PEOPLES et al., 2003), ativa predominantemente neurônios nas asas laterais do NDR.

Levando em consideração tais resultados, Lowry e colaboradores (2008) sugeriram que a ativação dos neurônios serotoninérgicos localizados no DRD e DRC exerce importante papel na facilitação de respostas associadas à ansiedade. Para estes autores, tais grupos de neurônios do NDR originariam o trato prosencefálico proposto por Deakin e Graeff. Adicionalmente, neurônios situados nas asas laterais dariam origem à via serotoninérgica periventricular mencionada na teoria de Deakin e Graeff (para revisão ver PAUL; JOHNSON; SHEKHAR et al., 2014; PAUL; LOWRY, 2013). Ainda segundo Lowry, uma área adjacente às asas laterais, a substância cinzenta periaquedutal ventrolateral (SCPvl), onde também estão situados neurônios serotoninérgicos, também daria origem, juntamente com as asas laterais, à via periventricular (PAUL; LOWRY, 2013).

Ainda sustentando a heterogeneidade funcional do NDR, o nosso grupo de pesquisa comparou o padrão de marcação da proteína Fos e da enzima triptofano hidroxilase em diferentes subnúcleos do NDR durante a exposição de ratos às tarefas de esquiva inibitória e de fuga no LTE. Enquanto a marcação da proteína Fos sinaliza atividade neuronal, a da enzima triptofano hidroxilase sinaliza que os neurônios marcados são serotoninérgicos. Os resultados deste estudo mostraram que a execução da tarefa de esquiva inibitória ativa neurônios serotoninérgicos localizados nos subnúcleos DRD e DRC. Já a tarefa de fuga gerada pelo mesmo

teste ativa primariamente neurônios não-serotoninérgicos localizados nas asas laterais (SPIACCI; COIMBRA; ZANGROSSI, 2012).

Estudos com manipulações farmacológicas, também realizados por nosso grupo, mostraram que enquanto a administração no DRD do antagonista de receptores 5-HT_{1A} WAY 100635 facilita a aquisição da esquiva inibitória e inibe a resposta de fuga, nas asas laterais, a injeção deste antagonista inibe apenas a resposta de fuga, sem alterar a resposta de esquiva inibitória no teste do LTE. A administração do agonista 8-OH-DPAT causou o efeito contrário (SPIACCI; POBBE; MATTHIESEN; ZANGROSSI, 2016). Esses resultados indicam que neurônios serotoninérgicos no DRD modulam comportamentos defensivos relacionados à ansiedade e ao pânico, enquanto que as asas laterais apresentam um papel primordial na mediação de respostas associadas ao pânico.

Também em apoio à importância das asas laterais na modulação da resposta de fuga, recentemente relatamos que a infusão de doses não excitotóxicas de ácido caínico neste subnúcleo evoca prontamente uma reação de fuga vigorosa. Através da marcação da proteína Fos, observamos que esta resposta está vinculada a um aumento da ativação neuronal das colunas dorsomedial (SCPdm) e lateral(SCPl) da substância cinzenta periaquedutal (SCP) e dos núcleos dorsomedial (Hdm) e ventromedial do hipotálamo medial, sugerindo que possa haver projeções das asas laterais para estas estruturas neurais. Curiosamente, não houve ativação de neurônios localizados nos núcleos BLA, medial e central do complexo amigdalóide (MATTHIESEN; SPIACCI; ZANGROSSI, 2017).

Enquanto estudos neuroanatômicos em ratos e camundongos mostram que os subnúcleos DRD e DRC enviam projeções serotoninérgicas para estruturas neurais que desempenham papel crítico na modulação de comportamentos relacionados à ansiedade, como o BLA, o córtex pré-frontal e o hipocampo (FERNANDEZ; CAULI; CABEZAS et al., 2015; HALE; HAY-SCHMIDT; MIKKELSEN et al., 2008; MUZERELLE; SCOTTO-LOMASSESE; BERNARD et al., 2016), pouco se sabe sobre as projeções que partem das asas laterais do NDR.

Em 1991, Vertes mostrou que a injeção do neurotraçador anterógrado *Phaseolus vulgaris leucoagglutinin* (PHA-L) nas porções rostrais e caudais do NDR marcava, densamente, corpos celulares presentes na SCP e em alguns núcleos hipotalâmicos. Anos mais tarde, Stezhka e Lovick (1997) mostraram que a injeção

dos neurotraçadores retrógrados FluoroGold ou DiO na coluna dorsolateral da SCP (SCPdl) de fatias coronais do mesencéfalo de ratos marcavam corpos celulares no NDR. Embora, nesta época, os subnúcleos do NDR ainda não tivessem sido oficialmente diferenciados, o estudo de Stezhka e Lovick sugere que as projeções que chegam na SCPdl são provenientes do DRD, do DRV e das asas laterais do NDR e também da SCPvl.

Desta forma, ainda que a proposta de Paul e Lowry (2013) aponte que neurônios situados nas asas laterais dariam origem à via serotoninérgica periventricular mencionada na teoria de Deakin e Graeff (1991), ainda não há evidências satisfatórias que comprovem esta hipótese.

Diante do exposto, o presente projeto teve como objetivo geral investigar o papel da via serotoninérgica que parte das asas laterais para a SCPd e para o Hdm, e do DRD para o BLA na modulação de respostas defensivas avaliadas no LTE. Além disso, através de manipulações farmacológicas, procuramos obter as primeiras informações sobre os efeitos da modulação da neurotransmissão serotoninérgica mediada por receptores 5-HT_{1A} no DRC na modulação de comportamentos defensivos associados à ansiedade e ao pânico.

Na primeira etapa, avaliamos se as asas laterais do NDR envia projeções para a SCPd e para o Hdm através da microinjeção do neurotraçador anterógrado não-fluorescente biodextrana (BDA). Adicionalmente, com o objetivo de verificar se estas projeções eram serotoninérgicas, realizamos a imuno-histoquímica para detecção da enzima triptofano hidroxilase.

Diante dos resultados obtidos no estudo neuroanatômico, na segunda etapa do trabalho, investigamos a atividade destas vias neurais através de injeções combinadas. Como descrito anteriormente, nosso grupo observou que a administração de WAY-100635 nas asas laterais do NDR prejudica a fuga, sem alterar a resposta de esquiva inibitória no LTE (SPIACCI; POBBE; MATTHIESEN, et al., 2016). Nossa hipótese é que a facilitação da neurotransmissão serotoninérgica na SCPd e no Hdm esteja envolvida na mediação deste efeito panicolítico. Para tal, avaliamos os efeitos da administração prévia de WAY-100635 na SCPd, seguida da administração desta mesma droga nas asas laterais do NDR, sobre as respostas defensivas avaliadas no LTE. A mesma investigação foi estendida para o Hdm.

Na terceira etapa, com base em estudos que mostraram que a tarefa de esquiva inibitória (SPIACCI; COIMBRA; ZANGROSSI, 2012) e a administração sistêmica de drogas ansiogênicas (ABRAMS; JOHNSON; HAY-SCHMIDT et al., 2005) também ativam neurônios serotoninérgicos no DRD, realizamos as primeiras observações sobre os efeitos no LTE da manipulação farmacológica dos receptores do tipo 5-HT_{1A} deste subnúcleo pela administração local de WAY-100635 e 8-OH-DPAT. Tendo em vista que este subnúcleo envia projeções serotoninérgicas para o BLA (HALE; HAY-SCHMIDT; MIKKELSEN et al., 2008), nossa hipótese é que a administração de WAY-100635 favorecerá a aquisição da resposta de esquiva inibitória, enquanto a administração de 8-OH-DPAT apresentará efeito oposto, assim como observado no DRD.

Por fim, na quarta etapa, fundamentados nos estudos anatômicos que mostram que o DRD envia projeções serotoninérgicas para o BLA (FERNANDEZ; CAULI; CABEZAS et al., 2015; HALE; HAY-SCHMIDT; MIKKELSEN et al., 2008; MUZERELLE; SCOTTO-LOMASSESE; BERNARD et al., 2016), investigamos a hipótese de que o efeito ansiogênico observado pelo bloqueio dos receptores 5-HT_{1A} no DRD (SPIACCI; POBBE; MATTHIESEN, et al., 2016) é mediado pela ativação de receptores do tipo 5-HT_{2C} no BLA. Além do LTE, este estudo também empregou o teste de transição claro-escuro, um modelo preditivo de ansiedade bastante utilizado (BOURIN; HASCOET, 2003; BUENO; ZANGROSSI; VIANA, 2005; SENA; BUENO; POBBE, et al., 2003).

2. Objetivos

2.1. *Objetivo geral*

O presente estudo teve como objetivo investigar o papel das vias serotoninérgicas que partem das asas laterais do NDR para a SCPd e para o Hdm, e da via que parte do DRD para o BLA na modulação de respostas defensivas associadas à ansiedade e ao pânico. Além disso, investigamos os efeitos da manipulação farmacológica dos receptores do tipo 5-HT_{1A} no DRC na modulação de respostas defensivas avaliadas no LTE.

2.2. *Objetivos específicos*

- Identificar a anatomia conectiva entre as asas laterais do NDR com a SCPd e o Hdm, utilizando a microinjeção de biodextrana, um neurotraçamento anterógrado, seguida de reações imuno-histoquímicas para detecção da enzima triptofano hidroxilase.
- Averiguar se o bloqueio prévio de receptores 5-HT_{1A} na SCPd altera a resposta do tipo panicolítica observada no LTE após o antagonismo de receptores 5-HT_{1A} nas asas laterais.
- Verificar se o bloqueio prévio de receptores 5-HT_{1A} no Hdm altera a resposta do tipo panicolítica observada no LTE após o antagonismo de receptores 5-HT_{1A} nas asas laterais.
- Avaliar os efeitos da injeção de WAY-100635 ou de 8-OH-DPAT no DRC sobre as respostas de esQUIVA inibitória e fuga avaliadas no LTE.
- Investigar se o bloqueio prévio de receptores 5-HT_{2C} no BLA altera a resposta ansiogênica observada no LTE e no teste de transição claro-escuro após o antagonismo de receptores 5-HT_{1A} no DRD.

Material e Métodos

3. Material e métodos

3.1. Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto, pesando em média 300 g no dia do procedimento cirúrgico. Os animais permaneceram durante todo o experimento no biotério do Laboratório de Farmacologia do Comportamento, onde foram alojados (quatro animais por caixa) em caixas de polipropileno (38 x 32 x 18 cm), forradas com serragem, tendo livre acesso à água e à comida. O biotério foi mantido com temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ \text{C}$) e ciclo claro-escuro de 12 horas (período iluminado das 07:00 às 19:00 h). Todos os procedimentos experimentais adotados nesta etapa do trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em pesquisa da Universidade de São Paulo (protocolo nº 138/2014).

3.2. Drogas

Foram utilizadas as seguintes drogas: o agonista de receptores 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT [{(±)-8-Hydroxy-2-(dipropylamino)tetralin hydrobromide; Sigma, EUA}]; o antagonista de receptores 5-HT_{1A} WAY-100635 [{N-[2-[4-(2-metoxifenil)-1-piperazinil]etil]-N (2, piridinil-ciclohexanocarboxamida maleato; Sigma, EUA}]; o antagonista de receptores 5-HT_{2C} SB-242084 [{dicloreto hidratado de 6-Cloro-2,3-dihidro-5-metil-N-[6-[(2-metil-3-piridinil)oxi]-3-piridinil]-1H-indol-1-carboxiamida; Sigma, EUA}] e o neurotraçador biodextrana a 10% (Peso molecular 10,000; Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). As drogas utilizadas foram dissolvidas em salina estéril. A biodextrana foi dissolvida em tampão fosfato salina (0,01 M; pH 7.4).

3.3. Aparatos

3.3.1. Labirinto em T elevado

O LTE (Figura 1) é constituído por três braços de madeira de mesmas dimensões, medindo 50 cm de comprimento por 12 cm de largura. Um dos braços é circundado por paredes laterais opacas, 40 cm de altura, e está disposto perpendicularmente aos outros dois braços, que permanecem abertos. Todo o conjunto está elevado a 50 cm do solo. Para evitar a queda dos animais, os braços abertos são circundados por uma proteção de acrílico translúcido de 1 cm de altura. A luminosidade na sala experimental, medida na área de cruzamento entre os braços abertos e o braço fechado do LTE foi de 40 lux.

Figura 1. Labirinto em T elevado.

3.3.2. *Campo aberto*

O teste foi conduzido em uma arena de acrílico preta (Figura 2), medindo 60 x 60 cm, com paredes laterais de 40 cm de altura.

A luminosidade na sala experimental foi de 40 lux, medida no centro da arena.

Figura 2. Campo aberto.

3.3.3. *Caixa claro-escuro*

O teste de transição claro-escuro (Figura 3) foi realizado em uma caixa confeccionada em madeira, medindo 47 x 22 x 22 cm, dividida em dois compartimentos de iguais dimensões, um de cor branca (compartimento claro) e outro de cor preta (compartimento escuro). Entre os dois compartimentos há um orifício (7 x 6 cm) que permite a livre transição do animal. O assoalho é constituído por barras de aço espaçadas em 1 cm. A caixa possui ainda uma tampa de acrílico preta sobre o compartimento escuro e uma translúcida sobre o compartimento claro. A luminosidade na sala experimental foi de 40 lux, medida no centro do compartimento claro da caixa claro-escuro.

Figura 3. Caixa claro-escuro.

3.4. Procedimentos gerais

3.4.1. Procedimento cirúrgico

Os animais foram anestesiados com 2,2,2 tribromoetanol (Aldrich, EUA) a 2,5% (10 ml/kg, i.p.). Após tricotomia na região da cabeça, o animal foi fixado a um aparelho estereotáxico (David-Kopf, EUA) pelo rochedo temporal e incisivos superiores. A fim de prevenir possíveis infecções, uma associação antibiótica de amplo espectro foi administrada (Pentabiótico, Fort-Dodge-Brasil, 0,2ml/ animal, i.m.).

Após a realização da anti-sepsia do campo cirúrgico com uma solução hidroalcoólica contendo iodo a 2%, foi administrado, por via subcutânea, o anestésico local cloridrato de lidocaína associado a um vasoconstritor (Novocol® 100, S.S. White-Brasil). Posteriormente, foi realizada a incisão longitudinal dos tecidos cutâneos e subcutâneos, e a remoção do periósteo por raspagem, a fim de expor o crânio.

Através de orifícios na superfície craniana, perfurados por uma broca, cânulas-guia de 26 gauge e 12 mm de comprimento foram introduzidas unilateralmente no DRC, no DRD ou nas asas laterais do NDR, hemisfério esquerdo, de acordo com as seguintes coordenadas: DRC: ântero-posterior (AP) = - 8,4 mm, lateral (L) = + 1,7 mm e (dorso-ventral) DV = -4,7 mm, com inclinação da haste =

14°; DRD: AP = - 7,8 mm, L = + 1,4 mm e DV = -4,2 mm, com inclinação da haste = 12°; nas asas laterais: AP = - 7,8 mm, L = + 1,8 mm e DV = -4,3 mm, com inclinação da haste = 12°; tendo o bregma como referência (PAXINOS; WATSON, 2007). Na SCPd e no Hdm, cânulas-guias de 0.6 mm de diâmetro externo e 12 mm e 16 mm de comprimento, respectivamente, foram introduzidas unilateralmente, de acordo com as seguintes coordenadas: SCPd: AP = lambda, L = + 1,9 mm e DV = -3,1 mm, com inclinação da haste = 22°; Hdm, hemisfério esquerdo: AP = -2.8 mm, L = + 0,5 mm e DV = -7,2 mm, sem inclinação da haste. No BLA, cânulas-guias de 0.6mm de diâmetro externo e 14 mm de comprimento foram introduzidas bilateralmente, de acordo com as seguintes coordenadas: BLA: AP = -2,5mm, L = $\pm$ 5,1 mm e DV = -6,5 mm, sem inclinação da haste. As cânulas foram fixadas no crânio por uma prótese de resina acrílica auto-polimerizante, estabilizada por um parafuso de aço inoxidável fixado à calota craniana. Finalmente, foi introduzido em cada cânula guia um mandril de aço inoxidável, de mesmo comprimento, para prevenir possíveis obstruções.

Ao final do procedimento, foi administrada, por via subcutânea, uma dose do agente analgésico com atividade anti-inflamatória e antipirética flunixinina meglumina (2,5 mg/ ml/ kg; Banamine®, Schering-Ploug S/A-Brasil).

Após a cirurgia, os animais retornaram ao biotério do laboratório, respeitando-se as mesmas condições de alojamento.

3.4.2. Injeções

As injeções na SCPd e no Hdm foram feitas por meio de agulhas odontológicas (14 mm de comprimento para a SCPd e 17,5 mm para o Hdm) inseridas pelas cânulas guia até atingir o alvo a 2,0 (SCPd) ou 1,5 mm (Hdm) abaixo da extremidade das cânulas. Já no BLA, as injeções foram feitas simultaneamente nos dois hemisférios encefálicos por meio de duas agulhas odontológicas (Mizzy, 16 mm de comprimento) inseridas pelas cânulas guia, até atingir o alvo a 2,0 mm abaixo da extremidade das cânulas. Cada agulha odontológica foi conectada a uma microseringa de 10 μ l (Hamilton 701-RN, EUA) através de um tubo de polietileno (PE-10), o qual foi preenchido com água destilada. O deslocamento de uma bolha

de ar no polietileno auxiliou na verificação do sucesso da microinjeção. Para controle do volume e do tempo de injeção, foi utilizada uma bomba microinjetora digital (Harvard Apparatus, modelo 55-2222) programada para injeção de um volume de 200 nl, a uma taxa de 100 nl/min. Ao término da injeção, a agulha permaneceu no local por mais um minuto para evitar o refluxo da droga.

As injeções no DRC, no DRD e nas asas laterais do NDR foram feitas por meio de agulhas confeccionadas pelo experimentador. As agulhas, medindo 0.18 mm de diâmetro externo e 14 mm de comprimento, foram inseridas pelas cânulas guia até atingir o alvo a 2,0 mm abaixo da extremidade das cânulas. Cada agulha foi conectada a uma microseringa de 1 µl (Hamilton 7001-KH SYR, EUA) através de um tubo de polietileno (PE-10), o qual foi preenchido com água destilada. O volume de 50 nL de droga foi injetado a mão, durante 30 segundos. O deslocamento de uma bolha de ar no polietileno auxiliou na verificação do sucesso da microinjeção. Ao término da injeção, a agulha permaneceu no local por mais um minuto para evitar o refluxo da droga.

3.5. Procedimentos específicos

3.5.1 Estudo neuroanatômico

3.5.1.1 Estudo da via que parte das asas laterais do NDR para a SCPd e para o Hdm utilizando um neurotraçador anterógrado.

Experimento 1:

Neste experimento, foi utilizado o neurotraçador anterógrado não fluorescente biodextrana (BDA) a 10%, dissolvido em 0.01 M de tampão fosfato-salino (pH 7.4).

Os ratos passaram pelo mesmo procedimento cirúrgico descrito na **seção 3.4.1** para o implante de uma cânula-guia (26 gauge de diâmetro e 12 mm de comprimento) direcionada para as asas laterais do NDR, hemisfério esquerdo. Três dias após a recuperação cirúrgica, os ratos foram anestesiados com 2,2,2 tribromoetanol (Aldrich, EUA) a 2,5% (10 ml/kg, i.p.) e o BDA foi injetado nas asas laterais usando uma agulha de 0.18 mm de diâmetro e 14 mm de comprimento,

conectada a uma microseringa de 1 μ l (Hamilton 7001-KH SYR, EUA) através de um tubo de polietileno (PE-10), o qual foi preenchido com água destilada. O deslocamento de uma bolha de ar no polietileno auxiliou na verificação do sucesso da microinjeção. Para o controle do volume e do tempo de injeção, foi utilizada uma bomba de infusão digital (Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, EUA) programada para injeção de um volume de 50 nL, a uma taxa de 100nL/min. Ao término da injeção, a agulha permaneceu no local por cinco minutos para evitar o refluxo do BDA. Após 15 dias da injeção do neurotraçador, os animais foram perfundidos e os encéfalos removidos.

3.5.2. Estudos comportamentais

Avaliação no LTE

No dia anterior ao teste, os animais foram pré-expostos por 30 minutos a um dos braços abertos do LTE. Cada animal foi colocado individualmente em um dos braços abertos, isolado dos demais braços por uma parede de madeira disposta na linha de separação entre a área central do labirinto e a porção proximal do braço aberto. Este procedimento potencializa a expressão do comportamento de fuga medido durante o teste por reduzir respostas comportamentais relacionadas à novidade (TEIXEIRA; ZANGROSSI; GRAEFF, 2000).

O teste do LTE foi iniciado com a avaliação da tarefa de esquiva inibitória. Para tal, o animal foi colocado na extremidade distal do braço fechado e a latência de saída, com as quatro patas, deste braço foi cronometrada (linha de base). A mesma medida foi tomada por mais 2 vezes, com intervalos regulares de 30 segundos entre elas (esquivas 1 e 2). O tempo máximo de permanência do animal neste braço, em cada uma das tentativas, foi de cinco minutos. Depois deste período, o animal era retirado pelo experimentador para dar continuidade ao teste.

Trinta segundos após a tomada da esquiva 2, foi verificada a latência de fuga dos animais em um dos braços abertos do LTE. Para tal, cada animal foi colocado na extremidade distal do mesmo braço aberto ao qual foi anteriormente pré-exposto, e o tempo de saída deste braço, com as quatro patas, foi cronometrado (fuga 1). A latência de saída do braço aberto foi tomada por mais duas vezes (fugas 2 e 3),

também com intervalos de trinta segundos entre elas. Durante os intervalos, o animal foi colocado em uma caixa de acrílico translúcido. Ao final do teste de cada animal, o aparato foi limpo com álcool a 20%, assim como todos os outros aparatos utilizados.

Avaliação no campo aberto

Nos experimentos 4 - 7, imediatamente após a tomada da fuga 3, cada animal foi colocado individualmente no centro do campo aberto e durante 5 minutos, a distância total percorrida por cada animal foi registrada por meio do programa analisador de imagem (ANY- Maze Video Tracking System, Stoelting Co, EUA).

3.5.2.1. Papel da regulação serotoninérgica na SCPd e no Hdm, após bloqueio de receptores 5-HT_{1A} nas asas laterais do NDR

Experimento 2:

No experimento 2, cerca de 24h após a sessão de pré-exposição ao braço aberto, os animais foram submetidos à avaliação comportamental no LTE. Para tal, os animais receberam, aleatoriamente, a administração de WAY-100635 (0,37 nmol/ 200 nL) ou salina intra-SCPd e, após 10 minutos, receberam a microinjeção de WAY-100635 (0,74 nmol/ 50 nL) ou salina nas asas laterais. Os seguintes grupos foram formados: Sal SCPd/ Sal asas laterais, n=9; WAY SCPd/ SAL asas laterais, n=9; SAL SCPd/ WAY asas laterais, n=5; WAY SCPd/ WAY asas laterais, n=9. Dez minutos após a última injeção central, os animais foram submetidos ao LTE. As doses utilizadas foram selecionadas com base em estudos anteriores realizados por nosso grupo de pesquisa (POBBE; ZANGROSSI, 2005; SPIACCI; POBBE; MATTHIESEN; ZANGROSSI, 2016).

Experimento 3:

Os animais passaram pelo mesmo protocolo do experimento 2, mas receberam a administração de WAY-100635 (0,74 nmol/ 200 nL) ou salina intra-Hdm

e, após 10 minutos, receberam a microinjeção de WAY-100635 (0,74 nmol/ 50 nL) ou salina nas asas laterais. Os seguintes grupos foram formados: Sal Hdm/ Sal asas laterais, n=9; WAY Hdm/ SAL asas laterais, n=5; SAL Hdm / WAY asas laterais, n=9; WAY Hdm/ WAY asas laterais, n=6. Dez minutos após a última injeção central, os animais foram submetidos ao LTE. As doses utilizadas foram selecionadas com base em estudos anteriores (DE BORTOLI; YAMASHITA; ZANGROSSI, 2013; NASCIMENTO; KIKUCHI; DE BORTOLI, et al., 2014; SPIACCI; POBBE; MATTHIESEN; ZANGROSSI, 2016).

3.5.2.2. Papel dos receptores 5-HT_{1A} do DRC na modulação de respostas defensivas avaliadas no LTE

Experimento 4:

No dia do teste, foi injetado WAY-100635 (0,18; 0,37 ou 0,74 nmol/ 50 nL) ou salina no DRC. Os seguintes grupos foram formados: Sal, n=10; WAY 0,18 nmol, n=5; WAY 0,37 nmol, n=7; WAY 0,74 nmol, n=8. Dez minutos após a injeção central, os animais foram submetidos ao LTE. As doses utilizadas foram selecionadas com base em estudos anteriores realizados no NDR por nosso grupo de pesquisa (SPIACCI; POBBE; MATTHIESEN; ZANGROSSI, 2016).

Imediatamente após a última fuga, cada animal foi colocado individualmente no centro do campo aberto. Neste, a distância total percorrida por cada animal foi registrada durante 5 minutos.

Experimento 5:

Neste experimento, o mesmo protocolo descrito acima foi utilizado, mas os animais receberam a injeção de 8-OH-DPAT (1,6; 3,2 ou 6,4 nmol/ 50 nL) ou salina no DRC. Os seguintes grupos foram formados: Sal, n=9; DPAT 1,6 nmol, n=5; DPAT 3,2 nmol, n=6; DPAT 6,4 nmol, n=6.

Experimento 6:

De acordo com os resultados dos experimentos 4 e 5, no experimento 6 reavaliamos os efeitos da injeção de 8-OH-DPAT e WAY-100635 no DRC, seguindo o mesmo protocolo descrito anteriormente. Os animais receberam a injeção de 8-OH-DPAT (3,2 nmol/ 50 nL), de WAY-100635 (0,74 nmol/ 50 nL) ou salina no DRC. Os seguintes grupos foram formados: Sal, n=6; DPAT 3,2 nmol, n=7; WAY 0,74 nmol, n=10.

3.5.2.3. Papel da regulação serotoninérgica no BLA, após bloqueio de receptores 5-HT_{1A} no DRD

Experimento 7:

Os animais receberam a administração de SB-242084 (0,01 nmol/ 200 nL) ou salina, bilateralmente, no BLA e, após 10 minutos, receberam a microinjeção de WAY-100635 (0,37 nmol/ 50nL) ou salina no DRD. Os seguintes grupos foram formados: Sal BLA/ Sal DRD, n=7; SB BLA/ SAL DRD, n=8; SAL BLA/ WAY DRD, n=8; SB BLA/ WAY DRD, n=8. Dez minutos após a última injeção central, os animais foram submetidos ao LTE. As doses utilizadas foram selecionadas com base em estudos anteriores do nosso grupo (VICENTE; ZANGROSSI, 2012; SPIACCI; POBBE; MATTHIESEN; ZANGROSSI, 2016).

Imediatamente após o teste do LTE, os animais foram colocados no centro do campo aberto e sua atividade locomotora registrada por 5 minutos.

Após o teste no campo aberto, os animais foram submetidos ao teste de transição claro-escuro. Para a execução do teste, os animais foram colocados, individualmente, no compartimento claro da caixa claro-escuro, com a cabeça voltada para a porta divisória. O comportamento dos animais no teste foi filmado e gravado para posterior análise. Durante os cinco minutos que sucederam a primeira entrada do animal no compartimento escuro, foi avaliada a porcentagem de tempo gasto no compartimento claro e o número de transições feitas de um compartimento para o outro, medida que pode ser considerada como um parâmetro para avaliar

possíveis interferências dos tratamentos adotados sobre a atividade locomotora dos animais.

3.6. Perfusão

3.6.1. Perfusão para verificação da localização dos sítios de injeção

Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral a 4 % (3 ml/ animal, i.p.) e receberam a injeção (50 nL) de corante azul de Evans a 1 % nos subnúcleos do NDR, e de 200 nL do mesmo marcador nas demais estruturas. Em seguida, os animais foram submetidos à perfusão intra-cardíaca com salina (NaCl a 0,9 %), seguida por formol (10 %). Os encéfalos foram removidos e mantidos por, no mínimo, 48 horas em formol, até a confecção das lâminas histológicas.

3.6.2. Perfusão para procedimento de imuno-histoquímica

Quinze dias após a injeção de BDA nas asas laterais do NDR, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral a 4 % (3 ml/ animal, i.p.) e submetidos à perfusão intra-cardíaca com solução salina tamponada (PBS 0,01 M; pH 7,4, 1000 mL/ kg), seguida de solução de paraformaldeído a 4 % (pH 7,4, 1000 mL/ kg, 4 °C). A perfusão foi realizada com auxílio de uma bomba de perfusão mantida a um fluxo de 22 mL/ minuto.

Após a perfusão, os encéfalos foram cuidadosamente removidos e fixados por 2 horas em solução de paraformaldeído a 4%. Em seguida, os encéfalos foram crioprotetidos em solução de sacarose a 30 % em tampão fosfato (PB 0, 2 M, 4 °C/ 3 dias). Após estes procedimentos, os encéfalos foram congelados em isopentano (mantido em gelo seco) e estocados em freezer (-20°C) até serem processados.

3.7. Histologia

3.7.1. Verificação da localização do sítio de injeção

Os encéfalos foram levados ao criostato (Leica CM1850), onde foram cortadas secções coronais de 60 μm . Estas secções foram adequadamente montadas em lâminas para verificação microscópica dos sítios de injeção, segundo diagramas reproduzidos do Atlas de Paxinos e Watson (2007). Foram incluídos nas análises estatísticas somente os dados dos animais que tiverem os sítios de injeção localizados nas áreas de interesse.

3.7.2. Preparo do encéfalo para procedimento de imuno-histoquímica

Os encéfalos dos animais que receberam injeção de BDA nas asas laterais (experimento 1) foram cortados ao longo do seu eixo ântero-posterior em secções coronais de 30 μm de espessura com o auxílio de um criostato (LEICA CM1950, Alemanha). As secções contendo o NDR, a SCPd e o Hdm foram coletadas e armazenadas em solução de PBS.

3.8. Imuno-histoquímica para revelação do neurotraçador e detecção da enzima triptofano hidroxilase

As reações de imuno-histoquímica para revelação do BDA e para a marcação da enzima triptofano hidroxilase foram realizadas utilizando a técnica *free-floating* conduzida em um agitador orbital.

As secções foram lavadas três vezes, durante 5 minutos, em solução de salina tamponada com fosfato (PBS 0,1M, pH 7,4). Em seguida, foram imersas em solução de peróxido de hidrogênio a 1% (diluída em PBS 0,1 M) por 30 minutos, a fim de bloquear a atividade endógena da peroxidase. Depois foram lavadas vinte vezes em PBS 0,1 M e incubadas, por 1 hora, com o complexo avidina-biotina-peroxidase (soluções A e B do kit ABC Vectastain Elite, Laboratório Vector, California, USA) diluído uma gota para 10 ml de PBS 0,1 M. Após lavar 4 vezes em PBS 0,1 M, o BDA foi revelado colocando as secções em uma solução contendo 1

pastilha de 3,3' diaminobenzidina tetrahidrocloreto (DAB; 10 mg) diluída em 33 ml de PBS 0,1 M + 1 ml de sulfato de níquel a 1% + 10 µl de peróxido de hidrogênio a 1%, por 10 minutos, e então lavadas 5 vezes em PBS 0,1 M.

Para detecção da enzima triptofano hidroxilase, as secções permaneceram imersas em solução de peróxido de hidrogênio a 1% por 10 minutos e, em seguida, lavadas 4 vezes em PBS 0,1 M. Os tecidos foram pré-incubados por 1 hora em BSA 2% diluído em PBS. Em seguida, as secções foram incubadas *overnight* com o anticorpo primário anti-triptofano hidroxilase (IgG de ovelha, 1:1000, Millipore, AB1541) diluído em solução de PBS. Após a incubação com o anticorpo primário, as secções foram lavadas 6 vezes em PBS 0,1 M e incubadas por duas horas com o anticorpo secundário biotinilado (anti-IgG de ovelha, 1:200, Vector, BA-6000). As secções foram então lavadas 6 vezes em PBS 0,1 M e incubadas por uma hora com complexo avidina-biotina-peroxidase (1:200, reagente ABC Elite, Vector). Por fim, a reação imuno-histoquímica foi revelada com solução contendo 1 pastilha de DAB, 33 ml de PBS 0,1 M e 10 µl de peróxido de hidrogênio a 1%. Após a lavagem, os cortes foram montadas em lâminas e cobertas com lamínula usando-se Permount® (Fisher Scientific). Os cortes também foram corados com hematoxilina.

Os neurônios e as vias neurais traçadas foram capturadas por meio de fotomicroscópio motorizado Axiolmager Z1, Zeiss com APOTOME II e o estudo neuroanatômico das conexões marcadas pelo neurotraçador foi realizado através de microscopia de campo claro.

3.9. Análise estatística dos resultados

Os dados obtidos no LTE foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) de medidas repetidas, tendo como fator independente o tratamento farmacológico e como medidas repetidas as diferentes tentativas efetuadas (latências de esquia inibitória ou fuga). Para os estudos do DRC, a distância total percorrida no campo aberto foi analisada através da ANOVA. Para os demais experimentos, a distância total percorrida no campo aberto e os dados obtidos no teste de transição claro-escuro foram analisados utilizando a ANOVA de duas vias, tendo como fatores independentes os tratamentos farmacológicos. Quando apropriado, foi empregado o

teste *post-hoc* de Duncan. Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média (EPM).

Resultados

4. Resultados

4.1. Experimento 1 - *Estudo da via que parte das asas laterais do NDR para a SCPd e para o Hdm utilizando um neurotraçador anterógrado.*

Por meio da microinjeção do neurotraçador anterógrado BDA (peso molecular 10.000) nas asas laterais do NDR (figura 4A) pode-se observar fibras conectivas que partem desta região para todas as colunas da SCP (figuras 4C, D, E e F) e para os núcleos Hdm, periventricular (Pe) e ventromedial (Hvm) do hipotálamo (ilustrados na figura 5A, B e C). Outros núcleos do hipotálamo, como o arqueado e o lateral, também parecem receber projeções, mas estes resultados ainda estão sendo analisados.

A análise histológica confirmou o sítio de injeção do BDA nas asas laterais do NDR em três animais. Os resultados demonstrados nas figuras 4 e 5 são referentes ao animal R4, mas o mesmo padrão foi observado nos outros dois animais.

As fibras conectivas identificadas são, predominantemente, varicosas e algumas delas foram observadas próximas a células triptofano hidroxilase-positivas e triptofano hidroxilase-negativas, sugerindo contato sináptico do tipo axo-somático ou axo-dendrítico.

Curiosamente, foram identificados corpos celulares marcados com o BDA na SCP e no hipotálamo medial, indicando que estes se conectam reciprocamente com as asas laterais do NDR (figuras 4F, 5A e 5B).

Figura 4. Fotomicrografias das secções coronais do mesencéfalo do rato R4. O animal foi injetado com o neurotraçador anterógrado biodextrana (BDA, peso molecular 10.000) nas asas laterais do núcleo dorsal da rafe (lwDR), hemisfério esquerdo, e o tecido do mesencéfalo foi submetido ao procedimento de imunohistoquímica para detecção da enzima triptofano-hidroxilase. A: Localização do sítio de injeção nas asas laterais. B: neurônios marcados com triptofano-hidroxilase em diferentes sub-regiões do núcleo dorsal da rafe (NDR). C e D: secções coronais das colunas dorsomedial (dmPAG, em C) e dorsolateral (dIPAG, em D) da substância

cinzenta periaquedutal (PAG) mostrando os corpos celulares positivos para triptofano-hidroxilase (setas abertas) e fibras varicosas (pontas de setas pretas) provenientes das asas laterais. E e F: secções coronais das colunas lateral (IPAG, em E) e ventrolateral (vIPAG, em F) da PAG mostrando corpos celulares positivos para triptofano-hidroxilase (setas abertas), neurônios marcados com BDA (setas pretas) e fibras varicosas (pontas de setas pretas). Contra-colaração: Hematoxilina de *Harris*. Aq: Aqueduto cerebral; DRD: subnúcleo dorsomedial do NDR; DRV: subnúcleo ventromedial do NDR. A escala em C, D e E corresponde a 50 µm.

Figura 5. Fotomicrografias das secções coronais do diencéfalo do rato R4, passando pelos núcleos hipotalâmicos: dorsomedial (DMH, em A), periventricular (Pe, em B) e divisão dorsomedial do núcleo ventromedial (dmVMH, em C). As pontas de setas pretas mostram aferências provenientes das asas laterais do NDR, onde microinjetou-se o neurotraçador biodextrana (BDA, peso molecular 10.000). Note neurônios positivos para o BDA (setas pretas) presentes no Pe e no DMH, que se conectam reciprocamente com as asas laterais. As setas abertas indicam corpos celulares positivos para a enzima triptofano hidroxilase. As pontas de setas abertas apontam varicosidades sugestivas de contatos sinápticos, alguns deles com dendritos e corpos celulares positivos para a enzima triptofano hidroxilase. Contracoloração: Hematoxilina de *Harris*.

4.2. Experimento 2 - Papel da regulação serotoninérgica na SCPd, após bloqueio de receptores 5-HT_{1A} nas asas laterais do NDR

Figura 6. Diagramas representativos de secções coronais do mesencéfalo de ratos mostrando a localização dos sítios de injeções (círculos negros) nas asas laterais do NDR, hemisfério esquerdo, e na SCPd (bregma: -7.32 a -7.92 mm) de acordo com o atlas de Paxinos & Watson (2007). O número de sítios de injeções representado para cada estrutura é menor que o número total de ratos devido à sobreposição dos sítios de injeções. Aq: Aqueduto cerebral.

A **figura 7** mostra o efeito do tratamento com WAY-100635 nas asas laterais e na SCPd sobre as respostas de esquiva inibitória (A) e de fuga (B) no LTE.

Em relação à esquiva, A ANOVA de medidas repetidas mostrou que houve aquisição da esquiva inibitória [efeito tentativa: $F(2,56)= 14,61$; $p=0,00$], houve efeito do tratamento central na SCPd [$F(1,28)= 5,34$; $p=0,02$], mas não houve efeito do tratamento central nas asas laterais [$F(1,28)= 0,08$; $p=0,77$] e nem interação entre os dois tratamentos [$F(1,28)= 1,69$; $p=0,20$]. Além disso, não houve interação entre o tratamento nas asas laterais e as tentativas [$F(2,56)= 0,45$; $p=0,63$], mas houve interação entre o tratamento na SCPd e as tentativas [$F(2,56)= 3,30$; $p=0,04$] e interação entre os tratamentos centrais e as tentativas [$F(2,56)= 3,85$; $p=0,02$].

O teste *post hoc* de Duncan mostrou que a latência de esquiva 2 do grupo SAL SCPd/ WAY asas laterais é significativamente maior ($p<0,05$) do que aquela do grupo WAY SCPd/ WAY asas laterais.

Quanto à fuga, a ANOVA de medidas repetidas mostrou que não houve efeito da tentativa [efeito tentativa: $F(2,56)= 1,48$; $p=0,23$], mas houve efeito marginal à significância estatística da administração central na SCPd [$F(1,28)= 3,05$; $p=0,09$] e

da administração central nas asas laterais [$F(1,28)=3,82$; $p=0,06$] e houve interação entre os dois tratamentos [$F(1,28)=6,40$; $p=0,01$].

O teste *post hoc* de Duncan mostrou que a latência das fugas 1 e 2 do grupo Sal SCPd/ WAY asas laterais foi significativamente maior quando comparada aos demais grupos.

Para fins ilustrativos, a Figura 7C mostra o efeito das drogas quando se obtém a média das 3 latências de fuga realizadas (fuga colabada = latência de fuga 1 + fuga 2 + fuga 3/3). A ANOVA de duas vias mostrou que houve efeito do tratamento na SCPd [$F(1,92)=6,57$; $p=0,01$], nas asas laterais [$F(1,92)=8,24$; $p=0,00$] e a interação entre os tratamentos [$F(1,92)=13,78$; $p=0,00$].

O teste *post hoc* de Duncan mostrou que a latência de fuga do grupo Sal SCPd/ WAY asas laterais foi significativamente maior quando comparada aos demais grupos.

Figura 7. Efeito da administração prévia de WAY-100635 (0 ou 0,37nmol/ 200 nL) na SCPd, seguida da injeção de WAY-100635 (0 ou 0,74 nmol/ 50 nL) nas asas laterais do NDR, hemisfério esquerdo, sobre as respostas de esquiva inibitória (A), fuga (B) e fuga colabada (C) no teste do LTE (n= 5-9/ grupo). Os valores estão representados pela média (+EPM). * $p < 0.05$ comparado aos demais grupos.

4.3. Experimento 3 - *Papel da regulação serotoninérgica no Hdm, após bloqueio de receptores 5-HT_{1A} nas asas laterais do NDR*

A)

B)

Figura 8. Diagramas representativos de secções coronais do mesencéfalo (A) e do diencéfalo (B) de ratos mostrando a localização dos sítios de injeções, no hemisfério esquerdo do encéfalo, nas asas laterais (círculos negros em A; bregma: -7.32 a -8.04 mm) e no Hdm (círculos negros em B; bregma: -2.76mm a -3.24 mm), de acordo com o atlas de Paxinos & Watson (2007). O número de sítios de injeções representado para cada estrutura é menor que o número total de ratos devido à sobreposição dos sítios de injeção. Aq: Aqueduto cerebral; 3V: Terceiro ventrículo.

A **figura 9** mostra o efeito do tratamento com WAY-100635 nas asas laterais e no Hdm sobre as respostas de esquiva inibitória (A) e de fuga (B) no LTE.

Quanto à esquiva, a ANOVA de medidas repetidas revelou que houve aquisição da esquiva inibitória [$F(2,50)= 11,71$; $p=0,00$], mas não houve efeito da administração central no Hdm [$F(1,25)= 2,39$; $p=1,35$], da administração central nas asas laterais [$F(1,25)= 0,26$; $p=0,61$] e nem interação entre os dois tratamentos [$F(1,25)=1,90$; $p=0,18$].

Em relação à fuga, A ANOVA de medidas repetidas mostrou que não houve efeito da tentativa [$F(2,50)= 0,81$; $p=0,44$], mas houve efeito da administração central no Hdm [$F(1,25)= 7,02$; $p=0,01$], da administração central nas asas laterais [$F(1,25)=$

11,79; $p=0,00$], bem como interação entre os dois tratamentos [$F(1,25)= 5,67$; $p=0,02$], **figura 9B**.

O teste *post hoc* de Duncan mostrou que a latência da fuga 3 do grupo Sal Hdm/ WAY asas laterais foi significativamente maior quando comparada aos demais grupos.

A ANOVA de duas vias mostrou que na fuga colabada houve efeito do tratamento no Hdm [$F(1,83)= 7,54$; $p=0,00$], nas asas laterais [$F(1,83)= 12,65$; $p=0,00$] ou interação entre os tratamentos [$F(1,83)= 6,40$; $p=0,01$], **figura 9C**.

O teste *post hoc* de Duncan mostrou que a latência de fuga do grupo Sal Hdm/ WAY asas laterais foi significativamente maior quando comparada aos demais grupos.

Figura 9. Efeito da administração prévia de WAY-100635 (0 ou 0,74 nmol/ 200 nL) no Hdm, seguida da injeção de WAY-100635 (0 ou 0,74 nmol/ 50 nL) nas asas laterais do NDR sobre as respostas de esquivas inibitória (A), fuga (B) e fuga colabada (C) no teste do LTE (n= 5-9/ grupo). Os valores estão representados pela média (+EPM). * $p < 0.05$ comparado aos demais grupos.

4.4. Experimento 4 - Efeito do antagonismo de receptores 5-HT_{1A} do DRC sobre as respostas defensivas avaliadas no LTE

Figura 10. Diagramas representativos de secções coronais do mesencéfalo de ratos mostrando a localização dos sítios de injeções no DRC (círculos negros; bregma: - 8.16 a -8.52 mm) de acordo com o atlas de Paxinos & Watson (2007). O número de sítios de injeções representados é menor que o número de ratos devido à sobreposição dos sítios de injeções. Aq: Aqueduto cerebral; 4V: Quarto ventrículo.

A **figura 11** mostra o efeito da administração de WAY-100635 no DRC sobre as latências de esquiva e de fuga avaliadas no LTE

A ANOVA de medidas repetidas mostrou que houve aquisição da esquiva inibitória [$F(2,52) = 7,91$; $p = 0,00$], houve um efeito marginal à significância estatística do tratamento [$F(3,26) = 2,49$; $p = 0,08$] e não houve interação entre os dois fatores [$F(6,52) = 1,74$; $p = 0,13$], **figura 11A**.

Quanto à resposta de fuga (ver **figura 11B**), não houve efeito do tratamento [$F(3,26) = 1,37$; $p = 0,27$], mas houve efeito da tentativa [$F(2,52) = 4,34$; $p = 0,01$] e da interação entre tentativa e tratamento [$F(6,52) = 4,22$; $p = 0,00$].

O teste *post hoc* de Duncan mostrou que o tratamento com a dose de 0,18 nmol de WAY-100635 no DRC aumentou a latência de saída do braço aberto na fuga 2 em relação ao grupo controle e ao grupo WAY 0,74 nmol.

Quanto à fuga colabada, A ANOVA mostrou que o tratamento com WAY-100635 não altera significativamente esta medida [$F(3,89) = 2,19$; $p = 0,09$].

Não houve alteração na atividade locomotora dos animais no teste do campo aberto em nenhuma das doses testadas [$F(3,29) = 2,04$; $p = 0,13$], ver tabela 1.

Figura 11. Efeito da administração de WAY-100635 (0; 0,185; 0,37 e 0,74 nmol/ 50 nL) no DRC sobre as respostas de esquiva inibitória (A), fuga (B) e fuga colabada (C) no teste do LTE (n= 5-10/ grupo). Os valores estão representados pela média (+EPM). *p<0.05 em relação ao grupo salina e ao grupo WAY 0,74 nmol.

4.5. Experimento 5 - Efeito da estimulação de receptores 5-HT_{1A} do DRC sobre as respostas defensivas avaliadas no LTE

Figura 12. Diagramas representativos de secções coronais do mesencéfalo de ratos mostrando a localização dos sítios de injeções no DRC (círculos negros; bregma: - 8.16 a -8.52 mm) de acordo com o atlas de Paxinos & Watson (2007). O número de sítios de injeções representados é menor que o número de ratos devido à sobreposição dos sítios de injeções. Aq: Aqueduto cerebral; 4V: Quarto ventrículo.

A **figura 13** mostra que não houve alteração nas latências de esquiva e de fuga avaliadas no LTE após a administração de 8-OH-DPAT no DRC.

A ANOVA (medidas repetidas) mostrou que houve aquisição da esquiva inibitória [$F(2,44)= 6,98$; $p=0,01$], mas não houve efeito do tratamento [$F(3,22)= 2,04$; $p=0,13$] ou interação entre estes dois fatores [$F(6,44)= 1,64$; $p=0,20$], **figura 13A**.

Quanto à resposta de fuga (ver **figura 13B**), a ANOVA de medidas repetidas revelou que não houve efeito do tratamento [$F(3,22)= 0,81$; $p=0,49$], das tentativas [$F(2,44)= 2,09$; $p=0,13$] ou interação entre os fatores [$F(6,44)= 0,42$; $p=0,85$].

A ANOVA de uma via mostrou que não houve efeito do tratamento [$F(3,77)= 1,37$; $p=0,25$] sobre a resposta de fuga colabada.

Não houve alteração na atividade locomotora dos animais no teste do campo aberto em nenhuma das doses testadas [$F(3,25)= 0,04$; $p=0,98$], ver tabela 1.

Figura 13. Ausência de efeito após a administração de 8-OH-DPAT (0; 1,6; 3,2 e 6,4 nmol/ 50 nL) no DRC sobre as respostas de esquiva inibitória (A), fuga (B) e fuga colabada (C) no teste do LTE (n= 5-9/ grupo). Os valores estão representados pela média (+EPM).

4.6. Experimento 6 – Reavaliação do efeito do 8-OH-DPAT e do WAY-100635 injetados no DRC sobre as respostas defensivas avaliadas no LTE

Figura 14. Diagramas representativos de secções coronais do mesencéfalo de ratos mostrando a localização dos sítios de injeções no DRC (círculos negros; bregma: - 8.16 a -8.52 mm) de acordo com o atlas de Paxinos & Watson (2007). O número de sítios de injeções representados é menor que o número de ratos devido à sobreposição dos sítios de injeções. Aq: Aqueduto cerebral; 4V: Quarto ventrículo.

No experimento 6, reavaliámos o efeito do antagonista e do agonista de receptores 5-HT_{1A} no DRC.

A **figura 15** mostra a ausência do efeito da administração de WAY-100635 (0,74 nmol/ 50 nL) ou de de 8-OH-DPAT (3,2 nmol/ 50 nL) no DRC.

A ANOVA (medidas repetidas) mostrou que houve aquisição da esQUIVA inibitória [$F(2,38) = 8,65$; $p=0,00$], mas não houve efeito do tratamento [$F(2,19) = 1,14$; $p=0,33$] ou interação entre estes dois fatores [$F(4,38) = 1,00$; $p=0,41$], **figura 15A**.

Quanto à resposta de fuga (ver **figura 15B**), a ANOVA revelou que não houve efeito do tratamento [$F(2,19) = 1,60$; $p=0,22$], da tentativa [tentativa: $F(2,38) = 0,11$; $p=0,89$] ou da interação entre os fatores [$F(4,38) = 0,52$; $p=0,71$].

A ANOVA de uma via mostrou que não houve efeito do tratamento [$F(2,65) = 1,49$; $p=0,23$] sobre a resposta de fuga colabada.

Também não houve alteração na atividade locomotora dos animais no teste do campo aberto em nenhuma das doses testadas [$F(2,21) = 0,72$; $p=0,49$], ver tabela 1.

Figura 15. Ausência de efeito após a administração de WAY-100635 (0,74 nmol/ 50 nL) ou de 8-OH-DPAT (3,2 nmol/ 50 nL) no DRC sobre as respostas de esquiva inibitória (A), fuga (B) e fuga colabada (C) no teste do LTE (n= 6-10/ grupo). Os valores estão representados pela média (+EPM).

Tabela 1 - Média ($\pm$ EPM) da distância percorrida no teste do campo aberto por animais submetidos à administração de WAY-100635 (0; 0,18; 0,37 ou 0,74 nmol/ 50nL) ou 8-OH-DPAT (0; 1,6; 3,2 ou 6,4 nmol/ 50 nL) no DRC.

TRATAMENTO	DISTÂNCIA PERCORRIDA (m)
Experimento 4:	
Salina	11,11 $\pm$ 1,06
WAY 0,185 nmol	16,17 $\pm$ 2,86
WAY 0,37 nmol	14,53 $\pm$ 1,92
WAY 0,74 nmol	16,41 $\pm$ 2,05
Experimento 5:	
Salina	14,12 $\pm$ 1,35
DPAT 1,6 nmol	14,19 $\pm$ 2,11
DPAT 3,2 nmol	15,12 $\pm$ 3,33
DPAT 6,4 nmol	14,16 $\pm$ 1,84
Experimento 6:	
Salina	8,77 $\pm$ 2,17
WAY 0,74 nmol	12,52 $\pm$ 2,29
DPAT 3,2 nmol	10,57 $\pm$ 1,92

4.7. Experimento 7- *Papel da regulação serotoninérgica no BLA, após bloqueio de receptores 5-HT_{1A} no DRD*

A)

B)

Figura 16. Diagramas representativos de secções coronais do mesencéfalo (A) e do complexo amigdalóide (B) de ratos mostrando a localização dos sítios de injeções no DRD (círculos negros em A; bregma: -7.32 a -8.04 mm) e, bilateralmente, no BLA (círculos negros indicando o hemisfério esquerdo e círculos cinzas, o hemisfério direito, em B; bregma: -1.80 mm a -2.64 mm) de acordo com o atlas de Paxinos & Watson (2007). O número de sítios de injeções representados para cada estrutura é menor que o número total de ratos devido à sobreposição dos sítios de injeção. Aq: Aqueduto cerebral.

Como pode ser observada na **figura 17**, a microinjeção de WAY-100635 no DRD facilitou a resposta de esquiva inibitória no LTE e este efeito foi bloqueado pela microinjeção prévia de SB242084 no BLA.

A ANOVA de medidas repetidas revelou que houve aquisição da esquiva inibitória [efeito tentativa: $F(2,54)= 17,75$; $p=0,00$], não houve efeito da administração central no DRD [$F(1,27)= 1,91$; $p=0,17$], mas houve efeito da administração central no BLA [$F(1,27)= 5,39$; $p=0,02$] e interação entre os dois tratamentos [$F(1,27)=12,97$; $p=0,00$]. Além disso, houve efeito marginal à significância estatística da interação entre as tentativas e o tratamento no BLA [$F(2,54)= 3,38$; $p=0,06$] e houve efeito da interação entre as tentativas e os tratamentos na BLA e no DRD [$F(2,54)= 3,97$; $p=0,04$].

O teste *post hoc* de Duncan mostrou que a latência das esquivas 1 e 2 do grupo Sal BLA/ WAY DRD foi significativamente maior quando comparada aos demais grupos. A latência da esquiva 1 do grupo Sal BLA/ WAY DRD não é diferente do grupo SB BLA/SAL DRD.

No que diz respeito à fuga, A ANOVA de medidas repetidas mostrou que não houve efeito da tentativa [efeito tentativa: $F(2,54)= 0,46$; $p=0,63$], não houve efeito da administração central no DRD [$F(1,27)= 1,05$; $p=0,29$], no BLA [$F(1,27)= 1,15$; $p=0,29$] e nem interação entre os dois tratamentos [$F(1,27)= 0,48$; $p=0,49$], **figura 17B**.

A ANOVA de duas vias mostrou que não houve efeito do tratamento no BLA [$F(1,89)= 2,48$; $p=0,11$], no DRD [$F(1,89)= 2,25$; $p=0,13$] ou interação entre os tratamentos [$F(1,89)= 1,03$; $p=0,31$] na fuga colabada.

Figura 17. Efeito da administração prévia de SB242084 (0 ou 0,01 nmol/ 200 nL) no BLA, seguida da administração de WAY-100635 (0 ou 0,37 nmol/ 50 nL) no DRD sobre as respostas de esquiva inibitória (A), fuga (B) e fuga colabada (C) no teste do LTE (n= 7-8/ grupo). Os valores estão representados pela média (+EPM). *p<0.05 comparado aos demais grupos; exceto na esquiva 1, onde o grupo Sal BLA/ WAY DRD não é diferente do grupo SB BLA/ SAL DRD .

Os tratamentos empregados não foram capazes de promover alterações no desempenho dos animais no teste do campo aberto, como pode ser observado na tabela 2. A ANOVA de duas vias mostrou que não houve efeito significativo do tratamento no BLA [$F(1,27)= 2,80$; $p=0,10$], no DRD [$F(1,27)= 1,39$, $p=0,24$] e nem interação entre os dois tratamentos [$F(1,27)= 0,30$; $p=0,58$].

Tabela 2 - Média ($\pm$ EPM) da distância percorrida no teste do campo aberto por animais submetidos à administração prévia de SB242084 (0,01 nmol/ 200 nL) no BLA, seguido da administração de WAY-100635 (0,37 nmol/ 50 nL) no DRD.

TRATAMENTO	DISTÂNCIA PERCORRIDA (m)
Salina BLA - Salina DRD	14,42 $\pm$ 0,84
Salina BLA - WAY DRD	12,22 $\pm$ 1,13
SB BLA - Salina DRD	15,84 $\pm$ 1,87
SB BLA - WAY DRD	15,04 $\pm$ 1,65

A **Figura 18** ilustra o efeito da injeção de SB-242084 no BLA, previamente à injeção de WAY-100635 no DRD, sobre o tempo de permanência no compartimento claro e o número de transições entre os compartimentos claro e escuro no teste de transição claro-escuro.

Quanto ao primeiro índice, a ANOVA de duas vias revelou que não houve efeito significativo do tratamento no BLA [$F(1,27)= 0,28$; $p=0,60$] ou no DRD [$F(1,27)= 0,95$; $p=0,33$], mas houve interação entre os dois tratamentos [$F(1,27)= 6,78$; $p=0,01$].

O teste *post hoc* de Duncan mostrou que o tempo de permanência no compartimento claro do grupo Sal BLA/ WAY DRD foi significativamente maior quando comparada aos grupos controle e SB BLA/ WAY DRD.

Os resultados mostraram que nenhum dos tratamentos adotados alterou o número de transições entre os compartimentos [tratamento no BLA: $F(1,27)= 1,99$; $p=0,16$; tratamento no DRD: $F(1,27)= 0,00$; $p=0,96$; interação entre os dois tratamentos: $F(1,27)= 0,40$; $p=0,53$].

Figura 18. Efeito da administração prévia de SB242084 (0 ou 0,01 nmol/ 200 nL) na BLA, seguida da injeção de WAY-100635 (0 ou 0,37 nmol/ 50 nL) no DRD sobre o tempo de permanência no compartimento claro (A) e o número de transições entre os dois compartimentos (B) avaliado no teste de transição claro-escuro (n= 7-8/ grupo). Os valores estão representados pela média (+EPM). *p<0.05 comparado aos grupos controle e SB BLA/ WAY DRD.

Discussão

5. Discussão

A primeira etapa do trabalho teve por objetivo verificar se as asas laterais enviam projeções para a SCPd e para o Hdm através da administração do neurotraçador anterógrado BDA neste subnúcleo do NDR.

Os resultados neuroanatômicos do presente trabalho sugerem que as asas laterais enviam projeções para todas as colunas da SCP (SCPdm, SCPdl, SCPI e SCPvl) e para os núcleos Hdm, Hvm e Pe do hipotálamo (como observado nas figuras 4 e 5, respectivamente). Estas observações são consistentes nos três animais que tiveram o sítio de injeção do BDA confirmado nas asas laterais do NDR.

A análise histológica mostrou ainda que as fibras eferentes que se originam nas asas laterais do NDR trafegam próximo ao aqueduto cerebral, enviando colaterais para as colunas dorsais e ventrais da SCP, e dirigem-se para os aspectos mais rostrais da SCP, até atingir as estruturas periventriculares no diencéfalo, conectando-se com os núcleos dorsomedial e ventromedial do hipotálamo, ipsi e contralateralmente, ao sítio de depósito do neurotraçador no tegmento mesencefálico. Mesmo no diencéfalo, o trato NDR-hipotalâmico situa-se predominantemente em posição paramediana, enviando colaterais para os núcleos do hipotálamo medial e dorsal adjacentes. Outros núcleos do hipotálamo, como o arqueado e o lateral também parecem receber projeções das asas laterais, no entanto, estes resultados ainda estão sob análise.

As fibras conectivas identificadas são, predominantemente, varicosas, sugerindo contato sináptico axo-dendrítico e axo-somático com neurônios serotoninérgicos e não serotoninérgicos (observar figuras 4C, 4E, 5B e 5C), presentes em todas as colunas da SCP e nos núcleos hipotalâmicos analisados.

Curiosamente, foram identificados, tanto na SCP como no hipotálamo medial, corpos celulares marcados com o BDA, ipsi- e contralateralmente ao sítio de injeção, sugerindo que estes núcleos conectam-se reciprocamente com as asas laterais do NDR (ver figuras 4F, 5A e 5B). Vale ressaltar que o neurotraçador BDA é predominantemente, mas não exclusivamente, anterógrado. Este resultado guarda correspondência com o de Peyron e colaboradores (1998) ao mostrar que as asas laterais do NDR recebem projeções do hipotálamo medial. No estudo de Peyron, embora a injeção tenha sido direcionada para as asas laterais do NDR, o

neurotraçador foi injetado em uma área maior (450-950 μm de diâmetro) que a área das asas laterais (aproximadamente 400 μm de diâmetro), atingindo subnúcleos circunvizinhos, o que pode levantar questionamentos quanto à especificidade dos resultados obtidos. Além disso, é importante ressaltar que os autores utilizaram um neurotraçador retrógrado, a subunidade b da toxina da cólera (CTb), pois tinham por interesse identificar as estruturas que enviam projeções para as asas laterais e não as eferências que partem desta área, como no presente trabalho.

Quanto à SCP, os resultados observados neste trabalho vão ao encontro dos achados de Stezhka e Lovick (1997) que mostraram que a coluna SCPdl recebe projeções das asas laterais do NDR. Como citado na introdução, através da administração dos neurotraçadores retrógrados FluoroGold e DiO na SCPdl, os pesquisadores observaram a presença de corpos celulares marcados nas asas laterais, no DRD, no DRV e na SCPvl. É importante ressaltar que este estudo se valeu da técnica de neurotraçamento em fatias de cérebros (aproximadamente 400 μm de espessura), e não da injeção do neurotraçador no animal vivo, como no presente estudo. Como discutido pelos autores, os resultados obtidos por eles precisam, dessa forma, ser interpretados com cuidado, pois apresentam um grande número de axônios e dendritos rompidos, o que pode acarretar em marcações inespecíficas.

Ao nosso conhecimento, apenas um trabalho foi realizado até o momento com o intuito de se investigar os alvos das projeções, mais especificamente das projeções serotoninérgicas, que partem das asas laterais para diferentes áreas do encéfalo. Muzerelle e colaboradores (2016) injetaram no NDR de camundongos um vírus adeno-associado (AAV) que expressa a proteína verde fluorescente condicionalmente em neurônios serotoninérgicos. Usando este método, os autores identificaram pequenos grupos de neurônios serotoninérgicos nos diferentes subnúcleos do NDR e mapearam suas projeções para estruturas alvos. No único animal em que o sítio de injeção do AAV estava localizado nas asas laterais, os pesquisadores observaram projeções serotoninérgicas para a SCP. Porém, no trabalho não é feita a menção sobre quais colunas da SCP as projeções das asas laterais chegam, nem são apresentadas figuras da onde se possam inferir as colunas alvos.

No presente trabalho, tentamos avaliar a colocalização da marcação do neurotraçador com a da enzima triptofano-hidroxilase a fim de determinar se as fibras conectivas que chegaram à SCP e ao hipotálamo medial eram serotoninérgicas. Contudo, em um número substancial de cortes, a marcação do neurotraçador (preta) ficou semelhante à marcação da enzima triptofano-hidroxilase (marrom-alaranjada), dificultando a avaliação/quantificação de conexões serotoninérgicas provenientes das asas laterais para as estruturas alvos. Diante disso, confirmamos a existência das vias, mas não podemos afirmar que se trata de projeções serotoninérgicas. Para elucidar esta questão, novos estudos se fazem necessário.

É interessante ressaltar que Muzerelle e colaboradores (2016) não observaram a existência de vias que partem das asas laterais para os núcleos BLA, medial, central e cortical da amígdala. Em uma análise preliminar de nossas lâminas histológicas, também não identificamos a marcação com o neurotraçador no complexo amigdalóide, o que vai ao encontro dos resultados de Muzerelle e colaboradores. Nesse sentido, é digno de nota que em um estudo recente mostramos que a resposta de fuga eliciada pela administração de ácido caínico nas asas laterais do NDR é acompanhada pelo aumento da expressão da proteína Fos nas colunas SCPdm e SCPI, e nos núcleos Hdm e Hvm, mas não nos núcleos BLA, central e medial do complexo amigdalóide (MATTHIESEN; SPIACCI; ZANGROSSI, 2017). No conjunto, estes achados vão ao encontro de resultados de estudos neuroanatômicos que mostram que as aferências serotoninérgicas para estes núcleos do complexo amigdalóide são provenientes do DRD, DRC e DRV, e não das asas laterais (FERNANDEZ; CAULI; CABEZAS et al., 2015; HALE; HAY-SCHMIDT; MIKKELSEN et al., 2008; MUZERELLE; SCOTTO-LOMASSESE; BERNARD et al., 2016).

Com base nos resultados neuroanatômicos, na segunda etapa do trabalho, verificamos a importância da facilitação da neurotransmissão serotoninérgica na SCPd e no Hdm na modulação do efeito panicolítico gerado após o bloqueio dos receptores 5-HT_{1A} das asas laterais do NDR.

Os resultados dos experimentos 2 e 3 mostraram que a administração de WAY-100635 nas asas laterais do NDR prejudica a resposta de fuga, sem alterar a aquisição da esQUIVA inibitória no LTE. Estes resultados reproduzem os do estudo

realizado anteriormente por nosso grupo (SPIACCI; POBBE; MATTHIESEN, et al., 2016). É importante ressaltar que este efeito não parece ser devido a uma ação inespecífica da droga, pois, embora não tenhamos realizado um teste para avaliar a atividade locomotora dos animais, apenas a tarefa de fuga foi prejudicada. Era de se esperar que caso a droga tivesse afetado a locomoção do animal, haveria uma facilitação da resposta de esquiva inibitória, já que as demandas motoras para realização das tarefas no LTE são as mesmas.

Em relação ao efeito do WAY-100635 nesta sub-região do NDR, o resultado obtido fornece evidências adicionais de que a serotonina exerce um controle inibitório tônico sobre a atividade dos neurônios serotoninérgicos na rafe. Estudos eletrofisiológicos apontam para esta direção ao mostrarem que a administração periférica de WAY-100635 aumenta a taxa de disparo de neurônios serotoninérgicos localizados no NDR (HADDJERI; LAVOIE; BLIER, 2004; HAJÓS; HOFFMANN; TETKO, et al., 2001), resultando em um aumento na liberação de serotonina em estruturas encefálicas inervadas por este núcleo (DUDLEY; DINARDO; GLASS, 1999). Mais especificamente, em relação às asas laterais do NDR, estudo de imunohistoquímica para marcação da proteína Fos mostrou que a administração sistêmica de WAY-100635 promove um aumento da ativação de neurônios serotoninérgicos localizados nesta sub-região, sugerindo que a atividade tônica da serotonina tem impacto sobre os autorreceptores 5-HT_{1A} das asas laterais (COMMONS, 2008).

Nossos resultados mostraram ainda que a injeção prévia de WAY-100635 na SCPd (experimento 2) ou no Hdm (experimento 3) foi capaz de bloquear o efeito panicolítico observado após a administração desta mesma droga nas asas laterais do NDR. Estes achados indicam que a facilitação da neurotransmissão serotoninérgica mediada por receptores 5-HT_{1A} na SCPd e no Hdm estão envolvidos no desencadeamento do efeito anti-pânico.

Em relação ao papel dos receptores 5-HT_{1A} na SCPd, diferentes trabalhos mostram que a ativação destes receptores com 8-OH-DPAT facilita a aquisição da esquiva inibitória e prejudica a resposta de fuga no LTE (DE PAULA SOARES; ZANGROSSI, 2004; ZANOVELI; NOGUEIRA; ZANGROSSI, 2003), além de aumentar o limiar de fuga no modelo de estimulação elétrica (NOGUEIRA; GRAEFF, 1995). O antagonismo prévio destes receptores com WAY-100635 ou NAN-190 bloqueia estes efeitos (DE PAULA SOARES; ZANGROSSI, 2004; NOGUEIRA;

GRAEFF, 1995; ZANOVELI; NOGUEIRA; ZANGROSSI, 2003). Vale ressaltar que o antagonismo dos receptores 5-HT_{1A} na SCPd por si só não tem nenhum efeito, mostrando o controle fásico da serotonina nesta estrutura (DE PAULA SOARES; ZANGROSSI, 2004).

Como mencionado na introdução, as manipulações farmacológicas com 8-OH-DPAT e WAY-100635 no Hdm mostraram que os efeitos sobre a resposta de fuga são semelhantes aos descritos na SCPd, tanto no modelo da estimulação elétrica, quanto no LTE. Ademais, no Hdm, assim como na SCPd, a serotonina parece desempenhar um papel inibitório fásico sobre os receptores 5-HT_{1A}, visto que a administração local de WAY-100635 não interfere com a expressão da resposta de fuga (BORTOLI; YAMASHITA; ZANGROSSI, 2013; NASCIMENTO; KIKUCHI, DE BORTOLI, et al., 2014).

Na terceira etapa do trabalho, investigamos a participação dos receptores 5-HT_{1A} do DRC na modulação de respostas defensivas associadas à ansiedade e ao pânico que são eliciadas pelo LTE. Como ressaltado previamente, nossa predição era que a manipulação farmacológica dos receptores 5-HT_{1A} do DRC resultaria em efeitos sobre a resposta de esquiva inibitória semelhantes aos observados no DRD, ou seja, a administração de 8-OH-DPAT promoveria efeito ansiolítico, enquanto a de WAY-100635 promoveria efeito ansiogênico no LTE (SPIACCI; POBBE; MATTHIESEN, et al., 2016). Nesse sentido, há uma série de evidências na literatura sugerindo a participação do DRC na modulação de respostas defensivas relacionadas à ansiedade. Por exemplo, um estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa mostrou que neurônios serotoninérgicos no DRC e no DRD são ativados após a tarefa de esquiva inibitória no LTE. Além disso, análises de correlações revelaram que quanto mais expressiva é a resposta de esquiva, maior o número de neurônios serotoninérgicos ativados nestes subnúcleos (SPIACCI; COIMBRA; ZANGROSSI, 2012).

Os resultados dos experimentos 4 e 5 não confirmaram nossas predições, já que nem o WAY-100635 ou o 8-OH-DPAT no DRC foram capazes de alterar significativamente a tarefa de esquiva inibitória no LTE. É, no entanto, interessante ressaltar que, embora a significância estatística não tenha sido atingida, o efeito do WAY-100635 sobre a resposta de esquiva vai na mesma direção daquele observado após a administração de 8-OH-DPAT, isto é, ambas as drogas tendem a diminuir a

latência de saída do braço fechado, o que sinalizaria um potencial efeito ansiolítico. Isto nos motivou a reproduzir estes experimentos. No entanto, como pode ser visto no experimento 6, mais uma vez, os resultados obtidos não corroboraram nossa predição ao mostrarem que os receptores 5-HT_{1A} do DRC não participam da modulação de respostas defensivas avaliadas no LTE.

É digno de nota que no experimento 4, a administração da menor dose de WAY-100635 foi capaz de aumentar a latência de fuga dos animais. No entanto, este efeito não ocorreu de maneira consistente, já que apenas uma das tentativas de fuga foi significativamente alterada pela droga, sendo que o efeito sobre as outras tentativas foi até em direção contrária. Em consonância com essa observação, a droga não altera a expressão da resposta de fuga quando as 3 tentativas são combinadas (fuga colabada).

Na última etapa do trabalho verificamos a importância dos receptores 5-HT_{2C} do BLA na modulação do efeito ansiogênico desencadeado após o bloqueio dos autorreceptores 5-HT_{1A} no DRD.

Neste estudo, observamos que a administração de WAY-100635 no DRD facilitou a aquisição da esquivas inibitória, sem alterar a resposta de fuga no LTE. De acordo, os animais que tiveram a administração desta droga no DRD também apresentaram uma redução no tempo de permanência no compartimento claro no teste de transição claro-escuro, também sugestivo de efeito ansiogênico.

Nossos dados no LTE não reproduziram completamente os obtidos por Spiaci e colaboradores (2016), que observaram que a administração de WAY-100635 no DRD, no mesmo volume e dose do presente estudo, promove além do efeito ansiogênico, um prejuízo na resposta de fuga, efeito do tipo panicolítico. Em consonância com estes resultados, estudo prévio realizado por nosso grupo de pesquisa mostrou que a administração de 200 nL de WAY-100635, um volume 4 vezes maior que o do presente estudo, na região de intersecção do DRD/ DRV, também promoveu efeito ansiogênico e panicolítico no LTE (POBBE; ZANGROSSI, 2005).

Os motivos para esta dissonância não são claros. É interessante observar que no estudo de Spiaci e colaboradores (2012) a tarefa de fuga recrutou, ainda que de maneira tênue, neurônios do DRD. Já mais recentemente, no trabalho de Costa-Vilela (2017), onde foi avaliada a expressão da proteína Fos e da enzima

triptofano hidroxilase, a expressão da fuga não causou este efeito. Uma possibilidade para explicar tal diferença é que a magnitude da expressão da fuga em cada circunstância pode determinar ou não o recrutamento do DRD. No entanto, mais trabalhos são necessários para se testar esta hipótese.

Os resultados do experimento 7 mostraram ainda que o efeito ansiogênico evocado pela administração de WAY-100635 no DRD foi bloqueado pela injeção prévia do antagonista de receptores 5-HT_{2C} SB-242084 no BLA.

Vários estudos demonstraram o importante papel dos receptores do tipo 5-HT_{2C} no BLA na modulação de comportamentos associados à ansiedade. Por exemplo, Christianson e colaboradores (2010) mostraram que a exposição ao choque incontrolável potencializa a liberação de serotonina no BLA e reduz a exploração social, sugestivo de efeito ansiogênico. Enquanto a administração do agonista de receptores 5-HT_{2C} CP 809,101 mimetiza o efeito do estresse, o antagonismo destes receptores com SB-242084 bloqueia este efeito no BLA.

A ativação dos receptores 5-HT_{2C} no BLA também tem importância no efeito de drogas antidepressivas. Vicente e Zangrossi (2012) mostraram que a administração sistêmica aguda de imipramina ou de fluoxetina promove efeito ansiogênico no teste do lambar punido de Vogel, um modelo preditivo de ansiedade. A administração prévia de SB-242084 no BLA bloqueia este efeito, sugerindo que a ativação de receptores 5-HT_{2C} nesta estrutura medeia o efeito ansiogênico promovido pelo uso de curto prazo destes antidepressivos. Por outro lado, o tratamento crônico com a imipramina ou com a fluoxetina bloqueia o efeito ansiogênico desencadeado pela administração do agonista de receptores 5-HT_{2C} MK-212 no BLA (VICENTE; ZANGROSSI, 2014), indicando haver uma dessensibilização funcional e/ou uma diminuição na densidade destes receptores no BLA após o tratamento prolongado com estes antidepressivos.

O BLA contém duas classes principais de neurônios, os piramidais (~85%) e os não-piramidais (~15%). Os neurônios piramidais são neurônios de projeção que utilizam o glutamato como neurotransmissor e expressam a proteína quinase dependente de cálcio e calmodulina II (MCDONALD; MULLER; MASCAGNI, 2002). Já os neurônios não-piramidais são interneurônios que utilizam o GABA como neurotransmissor e controlam a atividade de neurônios piramidais (EHRlich; HUMEAU; GRENIER, et al., 2009; SPAMPANATO; POLEPALLI; SAH, 2011).

De maneira intrigante, pouco se sabe sobre a expressão dos receptores 5-HT_{2C} nos tipos neuronais do BLA. Um estudo de hibridização *in situ* mostrou que o RNA mensageiro dos receptores 5-HT_{2C} é encontrado em 30% dos interneurônios que expressam o neuropeptídeo Y (NPY) e em um grande número de células NPY-negativas, que podem ser neurônios piramidais (BONN; SCHMITT; LESCH, et al., 2003). Recentemente, um estudo demonstrou que ratos submetidos à dor neuropática induzida pela ligação do nervo espinhal apresentam um aumento da expressão de receptores 5-HT_{2C} em neurônios não-GABAérgicos do BLA. A alteração na expressão destes receptores foi acompanhada de um aumento da neurotransmissão excitatória do BLA para a amígdala central e de respostas associadas à ansiedade e à depressão (JI; ZHANG; MAHIMAINATHAN, et al., 2016).

Do ponto de vista eletrofisiológico, evidências indicam que a ativação dos receptores 5-HT_{2C} não tem, ou tem apenas um efeito pequeno, na despolarização de interneurônios no BLA (BOCCHIO; FUCSINA; OIKONOMIDIS, et al, 2015; JIANG; FUCSINA; OIKONOMIDIS, et al, 2009). No entanto, tem sido sugerido que a serotonina pode aumentar a atividade de neurônios piramidais através da ativação de receptores, ainda não identificados, da família 5-HT₂ (DAFTARY; CALDERON; RIOS, 2012; RANNIE, 1999). Assim, o efeito da ativação dos receptores 5-HT_{2C} em células piramidais do BLA ainda permanece desconhecido.

Com base nestas evidências, nós elaboramos a hipótese de que os receptores 5-HT_{2C} estão, primariamente, localizados em neurônios piramidais no BLA e sua ativação aumenta a neurotransmissão excitatória para estruturas neurais relacionadas com a evocação de comportamentos relacionados à ansiedade.

A fim de testar esta hipótese, realizamos uma colaboração com o laboratório da Dra. Ingrid Ehrlich, na Universidade de Tuebingen, Alemanha. Nós avaliamos através da técnica de *patch-clamp* de células inteiras: 1) o efeito da administração de serotonina sobre o potencial de repouso da membrana de células piramidais no BLA; 2) se o agonista de receptores 5-HT_{2C} WAY-629 replicaria o efeito da serotonina no banho; 3) se o antagonista destes receptores SB-242084 bloquearia o efeito da serotonina. Como controle, analisamos estes mesmos efeitos em neurônios piramidais do núcleo lateral da amígdala (LA), previamente descritos despolarizarem

na presença de serotonina, através da ativação de receptores 5-HT_{2C} (YAMAMOTO; HATANO; SUGAI, et al., 2014).

Nossos resultados preliminares indicaram que a serotonina induz uma despolarização no LA de maneira dose-dependente. Entretanto, sua ação parece ser mais complexa no BLA, com uma baixa concentração de serotonina (10 µM) promovendo uma despolarização tardia e uma maior concentração (50 µM) um efeito bifásico, com uma hiperpolarização seguida por uma discreta despolarização. Estes resultados indicam que, além dos receptores 5-HT_{2C}, outros receptores serotoninérgicos podem estar envolvidos nas respostas observadas com a administração de serotonina.

Além disso, estas primeiras análises parecem indicar que, embora as respostas induzidas pela serotonina não tenham sido completamente abolidas pelo antagonista de receptores 5-HT_{2C}, o agonista destes receptores induziu uma despolarização em cerca de 50% das células piramidais do BLA e do LA, que foram selecionadas aleatoriamente. É digno de nota que o BLA compreende um conjunto diversificado de neurônios piramidais, com projeções e funções distintas. (BEYELER; CHANG; SILVESTRE, et al, 2018; FELIX-ORTIZ; BEYELER; SEO, et al., 2013; MCGARRY; CARTER, 2017; SENN; WOLFF; HERRY, et al., 2014). Portanto, é possível que os receptores 5-HT_{2C} estejam localizados em uma população específica de neurônios piramidais no BA e no LA.

Diante dos resultados obtidos e apresentados na presente tese, podemos afirmar que as asas laterais do NDR enviam projeções para todas as colunas da SCP e para o hipotálamo medial e Pe. Estudos futuros irão esclarecer se estas projeções são serotoninérgicas, bem como a intensidade destas projeções para cada região.

Os resultados farmacológicos indicam que o efeito panicolítico promovido pelo bloqueio dos receptores 5-HT_{1A} nas asas laterais do NDR deve-se à ativação dos receptores 5-HT_{1A} na SCPd ou no Hdm. Já o efeito ansiogênico observado após o bloqueio dos receptores 5-HT_{1A} no DRD é promovido pela ativação dos receptores 5-HT_{2C} no BLA.

A somatória das evidências neuroanatômicas e farmacológicas obtidas no presente trabalho dão respaldo à proposta de Paul e Lowry (2013) de que neurônios serotoninérgicos das asas laterais do NDR projetam-se para a SCPd, formando o

trato periventricular. Além disso, acrescentamos que projeções deste subnúcleo do NDR para o Hdm também fazem parte do trato periventricular. Já neurônios serotoninérgicos que partem do DRD para o BLA dão origem ao trato prosencefálico. Disfunções nestas vias podem estar criticamente envolvidas na fisiopatologia dos transtornos de ansiedade generalizada e do pânico, respectivamente.

Por fim, os resultados obtidos pela manipulação farmacológica dos receptores 5-HT_{1A} no DRC não sustentam a participação de neurônios serotoninérgicos deste subnúcleo na modulação das respostas defensivas avaliadas no LTE.

Conclusões

6. Conclusões

- As asas laterais enviam projeções para todas as colunas da SCP e para o hipotálamo medial e periventricular;
- O efeito panicolítico promovido pelo bloqueio dos receptores 5-HT_{1A} nas asas laterais do NDR é decorrente da ativação dos receptores 5-HT_{1A} na SCPd e no Hdm;
- O efeito ansiogênico observado após o bloqueio dos receptores 5-HT_{1A} no DRD é promovido pela ativação dos receptores 5-HT_{2C} no BLA;
- Enquanto a via asas laterais - SCPd e asas laterais - Hdm modulam comportamentos de defesa associados ao pânico, a via DRD - BLA está relacionada à modulação de respostas defensivas referentes à ansiedade.
- As manipulações farmacológicas dos receptores do tipo 5-HT_{1A} no DRC não indicam o envolvimento de neurônios serotoninérgicos deste subnúcleo na modulação das respostas defensivas avaliadas no LTE.

Referências bibliográficas

7. Referências bibliográficas

Abrams, J. K., Johnson, P. L., Hay-Schmidt, A., Mikkelsen, J. D., Shekhar, A., Lowry, C. A. (2005). Serotonergic systems associated with arousal and vigilance behaviors following administration of anxiogenic drugs. *Neuroscience*, 133(4): 983-997.

Abrams, J. K., Johnson, P. L., Hollis, J. H., Lowry, C. A. (2004). Anatomic and functional topography of the dorsal raphe nucleus. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1018: 46-57.

American Psychiatry Association. (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*. 5^a ed. Washington DC: APA Press.

Andrade, L. H., Wang, Y-P., Andreoni S., Silveira C. M., Alexandrino-Silva C., et al. (2012). Mental Disorders in Megacities: Findings from the São Paulo Megacity. *Mental Health Survey, Brazil*. PLoS ONE 7(2): e31879.

Azmitia, E. C., Segal, M. (1978). An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *J Comp Neurol*. 179(3):641-667.

Baker, K. G., Halliday, G. M, Törk, I. (1990). Cytoarchitecture of the Human Dorsal Raphe Nucleus. *The Journal of Comparative Neurology*, 301(2): 147-161.

Baldwin, D. S., Anderson, I. M., Nutt, D. J., Bandelow, B., Bond, A., Davidson, J. R.T., et al. (2005). Evidence-based guidelines for the pharmacological treatment of anxiety disorders: recommendations from the British Association for Psychopharmacology. *Journal of Psychopharmacology*, 19(6): 567-596.

Baldwin, D. S., Waldman, S., Allgulander, C. (2011). Evidence based pharmacological treatment of generalized anxiety disorder. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 14(5): 697-710.

Baldwin, D., Woods, R., Lawson, R., Taylor, D. (2011). Efficacy of drug treatments for generalised anxiety disorder: systematic review and meta-analysis. *British Medical Association*, 342: 1-11.

Bandelow B. (2015). Generalized Anxiety Disorder and Pain. *Mod Trends Pharmacopsychiatry*. 30:153-65.

Barlow, D. H. (2004). *Anxiety and its disorders*. 2^a Ed., New York: The Guilford Press.

Berg, K. A., Cropper, J. D., Niswender, C. M., Sanders-Bush, E., Emeson, R. B., Clarke, W. P. (2001). RNA-editing of the 5-HT(2C) receptor alters agonist-receptor-effector coupling specificity. *Br J Pharmacol*. 134(2):386-92.

Biagioni, A. F., de Freitas, R. L., da Silva, J. A., de Oliveira, R. C., de Oliveira, R., Alves, V. M., Coimbra, N. C. (2013). Serotonergic neural links from the dorsal raphe nucleus modulate defensive behaviours organised by the dorsomedial hypothalamus and the elaboration of fear-induced antinociception via locus coeruleus pathways. *Neuropharmacology*, 67:379-94.

Blanchard, D. C., Blanchard, R. J. (1988). Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annual Review of Psychology*, 39: 43-68.

Blanchard, R. J., Blanchard, D. C. (1989). Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system. *Journal of Comparative Psychology*, 103(1): 70-82.

Blanchard, R.J., Flannelly, K.J., Blanchard, D.C. (1986). Defensive behavior of laboratory and wild *rattus norvegicus*. *J Comp Psychol*. 100:101-107.

Blanchard, D. C., Griebel, G., Blanchard, R. J. (2001). Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Neurosci Biobehav Rev*. 25(3):205-18.

Blanchard, R. J., Griebel, G., Henrie, J. A., Blanchard, D. C. (1997). Differentiation of anxiolytic and panicolytic drugs by effects on rat and mouse defense test batteries. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 21(6): 123-136.

Blanchard, D. C., Hynd, A. L., Minke, K. A., Minemoto, T., Blanchard, R. J. (2001). Human defensive behaviors to threat scenarios show parallels to fear- and anxiety-related defense patterns of non-human mammals. *Neurosci Biobehav Rev*. 25(7-8): 761-70.

Blanchard, D. C., Rodgers, R. J., Hendrie, C. A., Hori, K. (1988). 'Taming' of wild rats (*Rattus rattus*) by 5HT1A agonists buspirone and gepirone. *Pharmacol Biochem Behav*. 31(2):269-78.

Blanchard, R.J., Yudko, E.B., Rodgers, R.J., et al. (1993). Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. *Behav Brain Res*. 58(1-2):155-165.

Blier, P., de Montigny, C. (1987). Modification of 5-HT neuron properties by sustained administration of the 5-HT1A agonist gepirone: electrophysiological studies in the rat brain. *Synapse*. 1(5):470-80.

Beyeler, A., Chang, C.J., Silvestre, M., Lévêque, C., Namburi, P., Wildes, C.P., Tye, K.M. (2018). Organization of Valence-Encoding and Projection-Defined Neurons in the Basolateral Amygdala. *Cell Rep*. 22(4):905-918.

Bocchio, M., Fucsina, G., Oikonomidis, L., McHugh, S.B., Bannerman, D.M., Sharp, T., Capogna, M. (2015). Increased Serotonin Transporter Expression Reduces Fear and Recruitment of Parvalbumin Interneurons of the Amygdala. *Neuropsychopharmacology*. 40(13):3015-26.

- Bonn, M., Schmitt, A., Lesch, K.P., Van Bockstaele, E.J., Asan, E. (2013). Serotonergic innervation and serotonin receptor expression of NPY-producing neurons in the rat lateral and basolateral amygdaloid nuclei. *BrainStructFunct.* 218(2):421-35
- Bourin, M., Hascoët, M. (2003). The mouse light/dark box test. *Eur J Pharmacol.* 463(1-3):55-65.
- Bouwknicht, J. A., Spiga, F., Staub, D. R., Hale, M. W., Shekhar, A., Lowry, C. A. (2007). Differential effects of exposure to low-light or high-light open-field on anxiety-related behaviors: relationship to c-Fos expression in serotonergic and non-serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. *Brain Research Bulletin*, 72(1): 32-43.
- Brandão, M. L. (2001). *Psicofisiologia: as bases fisiológicas do comportamento*. 2ª Ed., São Paulo: Atheneu.
- Brandão, M. L., Di Scala, G., Bouchet, M. J., Schmitt, P. (1986). Escape behavior produced by the blockade of glutamic acid decarboxylase (GAD) in mesencephalic central gray or medial hypothalamus. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, 24(3):497-501.
- Bueno, C. H., Zangrossi, H. Jr., Viana, M. B. (2005). The inactivation of the basolateral nucleus of the rat amygdala has an anxiolytic effect in the elevated T-maze and light/dark transition tests. *Braz J Med Biol Res.* 38(11):1697-701.
- Calixto, A. V., Vandesen, N., De Nucci, G., Moreno, H., Faria, M. S. (2001). Nitric oxide may underlie learned fear in the elevated T-maze. *Brain Res. Bull.* 55,3742.
- Calizo, L. H., Akanwa, A., Ma, X., Pan, Y. Z., Lemos, J. C., Craige, C., et al. (2011). Raphe serotonin neurons are not homogenous: electrophysiological, morphological and neurochemical evidence. *Neuropharmacology*. 61(3): 524-543.
- Canteras, N. S., Chiavegatto, S., Ribeiro do Valle, L. E., Swanson, L. W. (1997). Severe reduction of rat defensive behavior to a predator by discrete hypothalamic chemical lesions. *Brain Research Bulletin*, 44(3):297-305.
- Canteras, N. S., Goto, M. (1999). Fos-like immunoreactivity in the periaqueductal gray of rats exposed to a natural predator. *NeuroReport*, 10(2):413-418.
- Carrive, P. (1993). The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. *Behavioural Brain Research*, 58(1-2):27-47.
- Castilho, F. M., Martins, L. A. P. (2012). As concepções evolutivas de Darwin sobre expressão das emoções no homem e nos animais. *Revista da Biologia*, 9(2): 12-15.

- Chalmers, D. T., Watson, S. J. (1991). Comparative anatomical distribution of 5-HT_{1A} receptor mRNA and 5-HT_{1A} binding in rat brain--a combined in situ hybridisation/in vitro receptor autoradiographic study. *Brain Res.* 561(1):51-60.
- Christianson, J.P., Ragole, T., Amat, J., Greenwood, B.N., Strong, P.V., Paul, E.D., Fleshner, M., Watkins, L.R., Maier, S.F. (2010). 5-hydroxytryptamine 2C receptors in the basolateral amygdala are involved in the expression of anxiety after uncontrollable traumatic stress. *Biol Psychiatry.* 15;67(4):339-45.
- Commons, K. G. (2008). Evidence for topographically organized endogenous 5-HT_{1A} receptor-dependent feedback inhibition of the ascending serotonin system. *Eur J Neurosci.* 27(10):2611-2618.
- Costa-Vilela, H. H. (2017). Envolvimento de diferentes sub-regiões do núcleo dorsal da rafe no mecanismo de ação anti-pânico de fármacos antidepressivos. *Ribeirão Preto*, 115p.
- Daftary, S.S., Calderon, G., Rios, M. (2012). Essential role of brain-derived neurotrophic factor in the regulation of serotonin transmission in the basolateral amygdala. *Neuroscience*, 224, 125–134.
- Darwin, C. A. (2000). A expressão das emoções nos homens e nos animais. Tradução de Garcia LSL, Companhia das letras, São Paulo.
- David, D. J., Gardier, A. M. (2016). [The pharmacological basis of the serotonin system: Application to antidepressant response]. *Encephale.* 42(3):255-63.
- De Bortoli, V. C., Yamashita, P. S. M., Zangrossi, H. Jr. (2013). 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptor control of a panic-like defensive response in the rat dorsomedial hypothalamic nucleus. *Journal of Psychopharmacology*, 27(12):1116-23.
- De Paula Soares, V., Zangrossi, H. Jr. (2004). Involvement of 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors of the dorsal periaqueductal gray in the regulation of the defensive behaviors generated by the elevated T-maze. *Brain. Res. Bull.*, 64(2), 181-188.
- Deakin, J. F. W., Graeff, F. G. (1991). 5-HT and mechanisms of defense. *Journal of Psychopharmacology*, 5(4): 305-315.
- Di Scala, G., Schmitt, P., Karli, P. (1984). Flight induced by infusion of bicuculline methiodide into periventricular structures. *Brain Research*, 309(2):199-208.
- Drago, A., Ronchi, D. D., Serretti, A. (2008). 5-HT_{1A} gene variants and psychiatric disorders: a review of current literature and selection of SNPs for future studies. *Int J Neuropsychopharmacol.* 11(5):701-21.
- Dragunow M., Faull, R. (1989). The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. *Journal of Neuroscience Methods*, 29(3):261-265.

Dudley, T. E., Dinardo, L. A., Glass, J. D. (1999). In vivo assessment of the midbrain raphe nuclear regulation of serotonin release in the hamster suprachiasmatic nucleus. *J Neurophysiol.* 81(4):1469-77.

Ehrlich, I., Humeau, Y., Grenier, F., Cioocchi, S., Herry, C., Lüthi, A. (2009). Amygdala inhibitory circuits and the control of fear memory. *Neuron.* 25;62(6):757-71.

Felix-Ortiz, A.C., Beyeler, A., Seo, C., Leppla, C.A., Wildes, C.P., Tye, K.M. (2013). BLA to vHPC inputs modulate anxiety-related behaviors. *Neuron.* 29(4):658-64.

Fernandez, S. P., Cauli, B., Cabezas, C., Muzerelle, A., Poncer, J. C., Gaspar, P. (2015). Multiscale single-cell analysis reveals unique phenotypes of raphe 5-HT neurons. *Brain Struct Funct.* 221(8):4007-4025.

Fernandez de Molina, A., Hunsperger, R. W. (1959). Central representation of affective reactions in forebrain and brain stem: electrical stimulation of amygdala, stria terminalis and adjacent structures. *The Journal of Physiology*, 145(2): 251-265.

Fornal, C. A., Metzler, C. W., Gallegos, R. A., Veasey, S. C., McCreary, A. C., Jacobs, B. L. (1996). WAY-100635, a potent and selective 5-hydroxytryptamine_{1A} antagonist, increases serotonergic neuronal activity in behaving cats: comparison with (S)-WAY-100135. *J Pharmacol Exp Ther.* 278(2):752-62.

Freitas, R. L., Uribe-Mariño, A., Castiblanco-Urbina, M. A., Elias-Filho, D. H., Coimbra, N. C. (2009). GABA(A) receptor blockade in dorsomedial and ventromedial nuclei of the hypothalamus evokes panic-like elaborated defensive behavior followed by innate fear-induced antinociception. *Brain Research*, 1305:118-31.

Geller, I., Blum, K. (1970). The effects of 5-HTP on para-Chlorophenylalanine (p-CPA) attenuation of "conflict" behavior. *European Journal of Pharmacology*, 9(3):319-324.

Geller, I., Seifter, J. (1960). The effects of meprobamate, barbiturates, D-amphetamine, and promazine on experimentally induced conflict in the rat, *Psychopharmacologia*, 482-492.

Graeff, F. G. (1991) In: *New Concepts in Anxiety*; Briley, M.; File, S. E., Eds.; Macmillan Press: London, pp. 288-312.

Graeff, F. G. (1994). Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 27(4): 811-29.

Graeff, F. G. (2002). On serotonin and experimental anxiety. *Psychopharmacology*, 163(3-4): 467-476.

Graeff, F. G. (2004). Serotonin, the periaqueductal gray and panic. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 28(3): 239-259.

Graeff, F. G., Netto, C. F., Zangrossi, H. Jr. (1998). The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 23(2): 237-46.

Graeff, F. G., Schoenfeld, R. I. (1970). Tryptaminergic mechanisms in punished and nonpunished behavior. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 173(2):277-283.

Graeff, F. G., Viana, M. B., Tomaz, C. (1993). The elevated T maze, a new experimental model of anxiety and memory: effect of diazepam. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 26(1): 67-70.

Graeff, F. G., Zangrossi, Jr. H. (2002). Animal models of anxiety disorders. In: D'haenen H., Den Boer J. A., Willner P. *Biological Psychiatry*. John Wiley & Sons: London, pp 879-893.

Graeff, F. G., Zangrossi, H. Jr. (2010). The dual role of serotonin in defense and the mode of action of antidepressants on generalized anxiety and panic disorders. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry*, 10(3): 207-217.

Grahn, R. E., Will, M. J., Hammack, S. E., Maswood, S., McQueen, M. B., Watkins, L. R., Maier, S. F. (1999). Activation of serotonin-immunoreactive cells in the dorsal raphe nucleus in rats exposed to an uncontrollable stressor. *Brain Research*, 826(1): 35-43.

Gray, J., Mcnaughton, N. (2000). *The Neuropsychology of anxiety*. 2^a ed. Oxford: Oxford University Press.

Haddjeri, N., Lavoie, N., Blier, P. (2004). Electrophysiological evidence for the tonic activation of 5-HT(1A) autoreceptors in the rat dorsal raphe nucleus. *Neuropsychopharmacology*. 29(10):1800-6.

Hajós, M., Hajós-Korcsok, E., Sharp, T. (1999). Role of the medial prefrontal cortex in 5-HT_{1A} receptor-induced inhibition of 5-HT neuronal activity in the rat. *Br J Pharmacol*. 126(8):1741-50.

Hajós, M., Hoffmann, W. E., Tetko, I. V., Hyland, B., Sharp, T., Villa, A. E. (2001). Different tonic regulation of neuronal activity in the rat dorsal raphe and medial prefrontal cortex via 5-HT(1A) receptors. *Neurosci Lett*. 304(3):129-32.

Hale, M. W., Hay-Schmidt, A., Mikkelsen, J. D., Poulsen, B., Bouwknecht, J. A., Evans, A. K., et al. (2008). Exposure to an open-field arena increases c-Fos expression in a subpopulation of neurons in the dorsal raphe nucleus, including neurons projecting to the basolateral amygdaloid complex. *Neuroscience*, 157(4): 733-748.

Hannon, J., Hoyer, D. (2008). Molecular biology of 5-HT receptors. *Behav Brain Res*. 195(1):198-213

- Herrick-Davis, K., Grinde, E., Niswender, C. M. (1999). Serotonin 5-HT_{2C} receptor RNA editing alters receptor basal activity: implications for serotonergic signal transduction. *J Neurochem.* 73(4):1711-7.
- Hilton, S. M., Redfern, W. S. (1986). A search for brain stem cell groups integrating the defence reaction in the rat. *The Journal of Physiology*, 378:213-28.
- Hjorth, S., Sharp, T. (1991). Effect of the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT on the release of 5-HT in dorsal and median raphe-innervated rat brain regions as measured by in vivo microdialysis. *Life Sci.* 48(18): 1779-86.
- Hodges, H., Green, S., Glenn, B. (1987). Evidence that the amygdala is involved in benzodiazepine and serotonergic effects on punished responding but not on discrimination. *Psychopharmacology*, 92(4): 491-504.
- Imai, H., Steindler, D. A., Kitai, S. T. (1986). The organization of divergent axonal projections from the midbrain raphe nuclei in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 243(3): 363-380.
- Jenck, F., Moreau, J. L., Martin, J. R. (1995). Dorsal periaqueductal gray-induced aversion as a simulation of panic anxiety: elements of face and predictive validity. *Psychiatry Research*, 57(2): 181-191.
- Ji, G., Zhang, W., Mahimainathan, L., Narasimhan, M., Kiritoshi, T., Fan, X., Wang, J., Green, T.A., Neugebauer, V. (2017). 5-HT_{2C} Receptor Knockdown in the Amygdala Inhibits Neuropathic-Pain-Related Plasticity and Behaviors. *J Neurosci.* 37(6):1378-1393.
- Jiang, X., Xing, G., Yang, C., Verma, A., Zhang, L., Li, H. (2009). Stress impairs 5-HT_{2A} receptor-mediated serotonergic facilitation of GABA release in juvenile rat basolateral amygdala. *Neuropsychopharmacology*, 34(2), 410–423.
- Johnson, P. L., Hollis, J. H., Moratalla, R., Lightman, S. L., Lowry, C. A. (2005). Acute hypercarbic gas exposure reveals functionally distinct subpopulations of serotonergic neurons in rats. *Journal of Psychopharmacology*, 19(4): 327-341.
- Johnson, P., Lowry, C., Truitt, W., Shekhar, A. (2008). Disruption of GABAergic tone in the dorsomedial hypothalamus attenuates responses in a subset of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus following lactate-induced panic. *Journal of Psychopharmacology*, 22(6): 642-652.
- Johnson, M. R., Lydiard, R. B. (1995). The neurobiology of anxiety disorders. *Psychiatr Clin North Am*, 8(4):681-725.
- Kirby, L. G., Pernar, L., Valentino, R. J., et al. (2003). Distinguishing characteristics of serotonin and nonserotonin-containing cells in the dorsal raphe nucleus: electrophysiological and immunohistochemical studies. *Neurosci.* 116: 669-683.

- Kiser, R. S., Lebovitz, R. M. (1975). Monoaminergic mechanisms in aversive brain stimulation. *Physiology & Behavior*, 15(1): 47-53.
- Kiser, R. S., Lebovitz, R. M., German, D. C. (1978). Anatomic and pharmacologic differences between two types of aversive midbrain stimulation. *Brain Research*, 155(2): 331-342.
- Kreiss, D. S., Lucki, I. (1994). Differential regulation of serotonin (5-HT) release in the striatum and hippocampus by 5-HT_{1A} autoreceptors of the dorsal and median raphe nuclei. *J Pharmacol Exp Ther.* 269(3):1268-79.
- Krieger, J. E., Graeff, F. G. (1985). Defensive behavior and hypertension induced by glutamate in the midbrain central gray of the rat. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 18(1):61-67.
- Lowry, C. A., Hale, M. W., Evans, A. K., Heerkens, J., Staub, D. R., Gasser, P. J., Shekhar, A. (2008). Serotonergic systems, anxiety, and affective disorder: focus on the dorsomedial part of the dorsal raphe nucleus. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1148: 86-94.
- Matthiesen, M., Spiaci, A. Jr., Zangrossi, H. Jr. (2017). Effects of chemical stimulation of the lateral wings of the dorsal raphe nucleus on panic-like defensive behaviors and Fos protein expression in rats. *Behav Brain Res.* 326:103-111.
- McDonald, A.J., Muller, J.F., Mascagni, F. (2002). GABAergic innervation of alpha type II calcium/calmodulin-dependent protein kinase immunoreactive pyramidal neurons in the rat basolateral amygdala. *J Comp Neurol.* 446(3):199-218.
- McGarry, L.M., Carter, A.G. (2017). Prefrontal Cortex Drives Distinct Projection Neurons in the Basolateral Amygdala. *Cell Rep.* 21(6):1426-1433.
- McNaughton, N., Corr, P. J. (2004). A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defense distance. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 28(3): 285-305.
- Michelsen, K. A., Schmitz, C., Steinbusch, H. W. M. (2007). The dorsal raphe nucleus-From silver stainings to a role in depression. *Brain Research Reviews*, 55(2): 329-342.
- Milani, H, Graeff, F. G. (1987). GABA-benzodiazepine modulation of aversion in the medial hypothalamus of the rat. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, 28(1):21-7.
- Mobbs, D., Marchant, J. L., Hassabis, D., Seymour, B., Tan, G., Gray, M., Petrovic, P., Dolan, R. J., Frith, C. D. (2009). From threat to fear: the neural organization of defensive fear systems in humans. *J Neurosci.* 29(39):12236-43.
- Mobbs, D., Petrovic, P., Marchant, J. L., et al. (2007). When fear is near: threat imminence elicits prefrontal-periaqueductal gray shifts in humans. *Science.* 317(5841):1079-1083.

- Mobbs, D., Yu, R., Rowe, J. B., Eich, H., FeldmanHall, O., Dalgleish, T. (2010). Neural activity associated with monitoring the oscillating threat value of a tarantula. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107(47):20582-6.
- Moreira, F. A., Gobira, P. H., Viana, T. G., Vicente, M. A., Zangrossi, H., Graeff, F. G. (2013). Modeling panic disorder in rodents. *Cell Tissue Res*. 354(1):119-25.
- Muzerelle, A., Scotto-Lomassese, S., Bernard, J.F., Soiza-Reilly, M., Gaspar, P. (2016). Conditional anterograde tracing reveals distinct targeting of individual serotonin cell groups (B5-B9) to the forebrain and brainstem. *Brain Struct Funct*, 535–561.
- Nascimento, J. O., Kikuchi, L. S., de Bortoli, V. C., et al. (2014). Dorsomedial hypothalamus serotonin 1A receptors mediate a panic-related response in the elevated T-maze. *Brain Res Bull*. 109:39-45.
- Nashold, B. S. Jr, Wilson, W.P., Slaughter, D.G. (1969). Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. *Journal of Neurosurgery*, 30(1):14-24.
- Niswender, C. M., Copeland, S. C., Herrick-Davis, K., Emeson, R. B., Sanders-Bush, E. (1999). RNA editing of the human serotonin 5-hydroxytryptamine 2C receptor silences constitutive activity. *J Biol Chem*. 274(14):9472-8.
- Nutt, D. J. (1991). Anxiety and its therapy: today and tomorrow. In: Briley, M., File, S. E. *New concepts in anxiety*. London: Macmillan.
- Parsons, L. H., Kerr, T. M., Tecott, L. H. (2001). 5-HT(1A) receptor mutant mice exhibit enhanced tonic, stress-induced and fluoxetine-induced serotonergic neurotransmission. *J Neurochem*. 77(2):607-17.
- Paul, E. D., Johnson, P. L., Shekhar, A., Lowry, C. A. (2014). The Deakin/Graeff hypothesis: focus on serotonergic inhibition of panic. *Neurosci Biobehav Rev*. 3:379-96.
- Paul, E. D., Lowry, C. A. (2013). Functional topography of serotonergic systems supports the Deakin/Graeff hypothesis of anxiety and affective disorders. *J Psychopharmacol*. 27(12):1090-106.
- Paxinos, G., Watson, C. (2007). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 6ªEd, Amsterdam: Elsevier Academic Press.
- Pazos, A., Palacios, J. M. (1985). Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. I. Serotonin-1 receptors. *Brain Res*. 346(2):205-230.
- Peyron, C., Petit, J. M., Rampon, C., Jouvét, M., Luppi, P. H. (1998). Forebrain afferents to the rat dorsal raphe nucleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing methods. *Neuroscience*. 82(2):443-68.
- Piñeyro, G., Blier, P. (1999). Autoregulation of serotonin neurons: Role in antidepressant drug action. *Pharmacological Reviews*, 51(3): 533-591.

- Pinheiro, S. N., Del-Ben, C. N., Zangrossi Jr. H., Graeff, F. G. (2008). Anxiolytic and pan-icolytic effects of escitalopram in the elevated T-maze. *J. Psychopharmacol.* 22,132-137.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., Briley, M. (1985). Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 14(3): 149-167.
- Petersen, E. N., Scheel-Krüger, J. (1984). Anticonflict effect of 5-HT antagonists by intra amygdaloid injection. In: 14 The International College of. (pp.399). Florence: Italy.
- Pobbe, R. L., Zangrossi, H. Jr. (2005). 5-HT(1A) and 5-HT(2A) receptors in the rat dorsal periaqueductal gray mediate the antipanic-like effect induced by the stimulation of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. *Psychopharmacology*, 183(3): 314-321.
- Poltronieri, S., Zangrossi H. Jr., Viana, M. B. (2003). Antipanic-like effect of serotoninreuptake inhibitors in the elevated T-maze. *Behav. Brain Res.* 147, 185–192.
- Rainnie, D.G. (1999). Serotonergic modulation of neurotransmission in the rat basolateral amygdala. *J Neurophysiol.* 82(1):69-85.
- Richer, M., Hen, R., Blier, P. (2002). Modification of serotonin neuron properties in mice lacking 5-HT1A receptors. *Eur J Pharmacol.* 435(2-3):195-203.
- Robichaud, R. C., Sledge, K. L. (1969). The effects of p-chlorophenylalanine on experimentally induced conflict in the rat. *Life Sciences*, 8(17): 965-969.
- Roche, M., Commons, K. G., Peoples, A., Valentino, R. J. (2003). Circuitry underlying regulation of the serotonergic system by swim stress. *The Journal of Neuroscience*, 23(3): 970-977.
- Schenberg, L. C. (2010). Towards a translational model of panic attack. *Psychology & Neuroscience*, 3(1): 9-37.
- Schenberg, L. C., Graeff, F. G. (1978). Role of the periaqueductal gray substance in the antianxiety action of benzodiazepines. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 9(3): 287-295.
- Schütz, M. T., de Aguiar, J. C., Graeff, F. G. (1985). Anti-aversive role of serotonin in the dorsal periaqueductal grey matter. *Psychopharmacology*, 85(3): 340-345.
- Sena, L. M., Bueno, C., Pobbe, R. L., Andrade, T. G., Zangrossi, H. Jr., Viana, M. B. (2003). The dorsal raphe nucleus exerts opposed control on generalized anxiety and panic-related defensive responses in rats. *Behavioural Brain Research*, 142(1-2): 125-133.

Senn, V., Wolff, S.B., Herry, C., Grenier, F., Ehrlich, I., Gründemann, J., Fadok, J.P., Müller, C., Letzkus, J.J., Lüthi, A. (2014). Long-range connectivity defines behavioral specificity of amygdala neurons. *Neuron*. 81(2):428-37.

Shin, L. M., Liberzon, I. (2010). The neurocircuitry of fear, stress, and anxiety disorders. *Neuropsychopharmacology*. 35(1):169-91.

Shuhama, R., Del-Ben, C. M., Loureiro, S. R., Graeff, F. G. (2007). Animal defense strategies and anxiety disorders. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 79(1): 97-109.

Shuhama, R., Del-Ben, C. M., Loureiro, S. R., Graeff, F. G. (2008). Defensive responses to threat scenarios in Brazilians reproduce the pattern of Hawaiian Americans and non-human mammals. *Braz J Med Biol Res*. 41(4):324-332.

Silveira, M. C., Graeff, F. G. (1992). Defense reaction elicited by microinjection of kainic acid into the medial hypothalamus of the rat: antagonism by a GABAA receptor agonist. *Behavioral and Neural Biology*, 57(3):226-32.

Spampanato, J., Polepalli, J., Sah, P. (2011). Interneurons in the basolateral amygdala. *Neuropharmacology*. 60(5):765-73.

Spiacci, A. Jr., Coimbra, N. C., Zangrossi, H. Jr. (2012). Differential involvement of dorsal raphe nuclei in the regulation of anxiety- and panic-related defensive behaviors. *Neuroscience*, 227: 350-360.

Spiacci, A. Jr., Pobbe, R. L. H., Matthiesen, M., Zangrossi, H. Jr. (2016). 5-HT1A receptors of the rat dorsal raphe lateral wings and dorsomedial subnuclei differentially control anxiety- and panic-related defensive responses. *Neuropharmacology*. 107:471-479.

Spiga, F., Lightman, S. L., Shekhar, A., Lowry, C. A. (2006). Injections of urocortin 1 into the basolateral amygdala induce anxiety-like behavior and c-Fos expression in brainstem serotonergic neurons. *Neuroscience*, 138(4): 1265-1276.

Sprouse, J. S., Aghajanian, G. K. (1987). Electrophysiological responses of serotonergic dorsal raphe neurons to 5-HT1A and 5-HT1B agonists. *Synapse*. 1(1):3-9.

Steinbusch, H. W. (1981). Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals. *Neuroscience*, 6(4): 557-618.

Stezhka, V. V., Lovick, T. A. (1997). Projections from dorsal raphe nucleus to the periaqueductal grey matter: studies in slices of rat midbrain maintained in vitro. *Neurosci Lett*. 230(1):57-60.

Stahl, S. M., Gergel, I., Li, D. (2003). Escitalopram in the treatment of panic disorder: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Clin Psychiatry*, 64(11):1322-7.

Teixeira, R. C., Zangrossi, H. Jr., Graeff, F. G. (2000). Behavioral effects of acute and chronic imipramine in the elevated T-maze model of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 65(4): 571-576.

Vertes, R. P. (1991). A PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat. *J Comp Neurol*. 313(4):643-668.

Viana, M. B., Tomaz, C., Graeff, F. G. (1994). The elevated T-maze: a new animal model of anxiety and memory. *Pharmacology Biochemistry Behavior*, 49(3): 549-554.

Vianna, D. M., Borelli, K. G., Ferreira-Netto, C., Macedo, C. E., Brandão, M. L. (2003). Fos-like immunoreactive neurons following electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray at freezing and escape thresholds. *Brain Research Bulletin*, 62(3):179-189.

Vicente, M. A., Zangrossi, H. Jr. (2014). Involvement of 5-HT_{2C} and 5-HT_{1A} receptors of the basolateral nucleus of the amygdala in the anxiolytic effect of chronic antidepressant treatment. *Neuropharmacology*. 79:127-135.

Vicente, M. A., Zangrossi, H. Jr. (2012). Serotonin-2C receptors in the basolateral nucleus of the amygdala mediate the anxiogenic effect of acute imipramine and fluoxetine administration. *Int J Neuropsychopharmacol*. 15(3):389-400.

Weber, M., Schmitt, A., Wischmeyer, E., Döring, F. (2008). Excitability of pontine startle processing neurones is regulated by the two-pore-domain K⁺ channel TASK-3 coupled to 5-HT_{2C} receptors. *Eur J Neurosci*. 28(5):931-40.

Wilent, W. B., Oh, M. Y., Buetefisch, C. M., Bailes, J. E., Cantella, D., Angle, C., Whiting, D. M. (2010). Induction of panic attack by stimulation of the ventromedial hypothalamus. *Journal of Neurosurgery*, 112(6):1295-8.

Yamamoto, R., Hatano, N., Sugai, T., Kato, N. (2014). Serotonin induces depolarization in lateral amygdala neurons by activation of TRPC-like current and inhibition of GIRK current depending on 5-HT_{2C} receptor. *Neuropharmacology*. 82:49-58.

Yamashita, P. S. M., De Bortoli, V. C. Zangrossi, H. Jr. (2011). 5-HT_{2C} receptor regulation of defensive responses in the rat dorsal periaqueductal gray. *Neuropharmacology*, 60(2-3):216-222.

Zangrossi, H. Jr., Graeff, F. G. (1997). Behavioral validation of the elevated T-maze, a new animal model of anxiety. *Brain Research Bulletin*, 44(1): 1-5.

Zangrossi, H. Jr., Graeff, F. G. (2004). Modelos animais. In: HETEM, L.A.B.; GRAEFF, F.G. (Ed.). *Transtornos de Ansiedade*. São Paulo: Ateneu, p 55-73.

Zangrossi, H. Jr., Graeff, F. G. (2014). Serotonin in anxiety and panic: Contributions of the elevated T-maze. *Neurosci Biobehav Rev.*, 46(3):397-406.

Zangrossi, H. Jr., Viana, M. B., Zanoveli, J., Burno, C., et al., (2001). Serotonergic regulation of inhibitory avoidance and one-way escape in the rat elevated T-maze. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 25(7-8): 637-645.

Zanoveli, J. M., Nogueira, R. L., Zangrossi, H. Jr. (2003). Serotonin in the dorsal periaqueductal gray modulates inhibitory avoidance and one-way escape behaviors in the elevated T-maze. *Eur J Pharmacol*. 473(2-3):153-61.

Zanoveli, J. M., Nogueira, R. L., Zangrossi, H. Jr. (2005). Chronic imipramine treatment sensitizes 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in the dorsal periaqueductal gray matter: evidence from the elevated T-maze test of anxiety. *Behav Pharmacol*, 16(7):543-52.

Zanoveli, J. M., Nogueira, R. L., Zangrossi, H. Jr. (2007). Enhanced reactivity of 5-HT_{1A} receptors in the rat dorsal periaqueductal gray matter after chronic treatment with fluoxetine and sertraline: evidence from the elevated T-maze. *Neuropharmacology* 52, 1188-1195.