**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

AILTON SPIACCI JUNIOR

**Envolvimento de diferentes sub-regiões do núcleo dorsal
da rafe de ratos na mediação de respostas defensivas
associadas à ansiedade e ao medo.**

**Ribeirão Preto
2012**

AILTON SPIACCI JUNIOR

Envolvimento de diferentes sub-regiões do núcleo dorsal da rafe de ratos na mediação de respostas defensivas associadas à ansiedade e ao medo.

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

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Hélio Zangrossi Junior

Ribeirão Preto
2012

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.

Catálogo da Publicação
Serviço de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Spiacci Junior, Ailton

Envolvimento de diferentes sub-regiões do núcleo dorsal da rafe de ratos na mediação de respostas defensivas associadas à ansiedade e ao medo. Ribeirão Preto, 2012.

127 p.: il.; 30 cm

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

Orientador: Zangrossi Junior, Hélio.

1. Núcleo dorsal da rafe. 2. Núcleo mediano da rafe. 3. Substância cinzenta periaquedutal. 4. Labirinto em T elevado. 5. Serotonina.

Nome: Spiacci Junior, Ailton

Título: Envolvimento de diferentes sub-regiões do núcleo dorsal da rafe de ratos na mediação de respostas defensivas associadas à ansiedade e ao medo.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. Hélio Zangrossi Junior
Instituição: FMRP – USP

Assinatura: _____

Prof. Dr. Frederico Guilherme Graeff
Instituição: FMRP – USP

Assinatura: _____

Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães
Instituição: FMRP – USP

Assinatura: _____

Prof^a. Dra. Rúbia M. M. W de Oliveira
Instituição: UEM

Assinatura: _____

Prof^a. Dra. Milena de Barros Viana
Instituição: UNIFESP

Assinatura: _____

*Dedico este trabalho aos meus pais e a
minha esposa pelo amor incondicional e
pelo apoio ao longo do período de
realização deste trabalho.*

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Hélio Zangrossi Junior, pelos ensinamentos, pela confiança e pela paciência durante a realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Norberto Cysne Coimbra, por colaborar com o desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Dr. Francisco Silveira Guimarães, por permitir o acesso ao seu laboratório para o desenvolvimento de parte deste trabalho.

A professora Sâmia Regiane Lourenço Joca, pela assessoria prestada ao trabalho, pelos conselhos e pela amizade.

Ao professor Dr. Leonardo Resstel Barbosa Moraes, pelos ensinamentos, pelos conselhos e pela amizade.

Aos membros da banca examinadora, por prontamente aceitarem participar desta banca, e por analisarem este trabalho, mesmo com pouco tempo para isto.

Ao Afonso Paulo Padovan, pelo apoio técnico durante a realização deste trabalho, pelos conselhos, pela amizade e pelas piadas.

A Eleni Gomes e Tadeu Vieira, pelo apoio técnico de histologia.

A Sonia Maria Stefanelli, a Fátima Petean e José Waldik Ramon, pelo auxílio com toda a papelada e procedimentos.

A minha esposa Gabriela, por estar ao meu lado em todos os momentos, pelo apoio incondicional, pelos conselhos, por ser meu porto seguro, por alegrar a minha vida.

Aos meus pais Ailton e Vani, por me apoiarem em todas as decisões, pela ajuda financeira, por alegrarem a minha vida, por serem uma fonte de inspiração e meu exemplo de vida.

Aos amigos do laboratório, Valquíria, Vanessa, Roger, Thatiane, Paula, Plínio, Maria Adrielle, Daniele, Marcel, Ana Beatriz, Melina, por todos os momentos que passamos juntos, pelas bobagens conversadas e por tornarem agradável o dia a dia no laboratório.

A todos os amigos do departamento.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

RESUMO

Spiacci Jr, A. *Envolvimento de diferentes sub-regiões do núcleo dorsal da rafe de ratos na mediação de respostas defensivas associadas à ansiedade e ao medo*. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2012. 127 p. Tese de Doutorado em Farmacologia.

O núcleo dorsal da rafe (NDR) é a principal fonte de projeções serotoninérgicas que inervam o sistema límbico. Estudos mostram que o NDR é uma estrutura complexa, formada por distintas sub-regiões topograficamente organizadas e que apresentam diferentes propriedades neuroquímicas e funcionais. Tem sido proposto que duas vias serotoninérgicas oriundas do NDR, o trato prosencefálico e o trato periventricular, modulam diferentemente a expressão de comportamentos defensivos associados aos transtornos de ansiedade generalizada e de pânico. O presente trabalho investigou se as respostas defensivas de esquiva e de fuga evocadas no modelo do labirinto em T elevado (LTE), relacionadas à ansiedade generalizada e ao pânico, respectivamente, recrutam diferentes sub-regiões do NDR. Na primeira etapa do trabalho, usando a técnica de imunoistoquímica para detecção da proteína Fos e da enzima triptofano hidroxilase, avaliamos a expressão da proteína Fos por neurônios serotoninérgicos e não-serotoninérgicos em diferentes sub-regiões do NDR, bem como em estruturas mesencefálicas vizinhas ao NDR, ou seja, o núcleo mediano da rafe (NMR) e substância cinzenta periaquedutal (SCP) de ratos em decorrência da expressão dos comportamentos de esquiva inibitória ou fuga no LTE. Nossos resultados mostraram que os comportamentos de fuga e de esquiva evocados no LTE recrutam distintas populações neuronais do NDR, do NMR, bem como da SCP. Enquanto neurônios serotoninérgicos localizados no nível médio e caudal do NDR, mais precisamente, nas sub-regiões dorsal (DRD), caudal (DRC) e interfascicular (DRI), bem como do NMR, estão envolvidos com a aquisição do comportamento de esquiva inibitória, neurônios não serotoninérgicos das asas laterais do NDR/SCP ventrolateral, bem como das colunas, dorsomedial e dorsolateral da SCP participam da expressão da fuga. Na segunda parte deste trabalho, avaliamos os efeitos da administração do agonista de receptores AMPA/cainato, ácido caínico, no DRD, DRC e asas laterais do NDR sobre os comportamentos defensivos avaliados no LTE. Os resultados mostraram que a injeção de ácido caínico, tanto no DRD, quanto no DRC, facilita a aquisição da esquiva inibitória e também prejudica a expressão do comportamento de fuga. Já, a estimulação das asas laterais do NDR com ácido caínico induz a expressão do comportamento de fuga, sem alterar o comportamento de esquiva. Efeito oposto sobre o comportamento de fuga foi observado com a administração nesta região de cloreto de cobalto, um inibidor da transmissão sináptica. Nossos resultados mostraram ainda que a administração de ácido caínico nas asas laterais aumenta a distância percorrida pelos animais em uma arena circular, resultado indicativo da evocação da resposta de fuga. Por fim, avaliamos a o envolvimento da neurotransmissão mediada por receptores GABA_A e por receptores CRF₁ nas asas laterais do NDR, na expressão do comportamento de fuga expressa no LTE. Os resultados mostram que o bloqueio dos receptores GABA_A nas asas laterais facilitou a expressão da fuga. Por outro lado a administração de antalarmina, antagonista de receptores CRF₁ não alterou a expressão da resposta de fuga, porém prejudicou a aquisição da esquiva inibitória. Em conjunto, os resultados da primeira etapa indicam o envolvimento de diferentes sub-populações neuronais do NDR na expressão dos comportamentos de esquiva e

fuga avaliados no LTE. Nossos resultados também apontam o envolvimento de neurônios serotoninérgicos do NMR na expressão da esquia inibitória, bem como a participação da SCP na resposta de fuga. Os resultados da segunda etapa indicam que neurônios serotoninérgicos localizados no DRD e DRC possam dar origem aos tratos prosencefálico e periventricular abordados pela teoria de Deakin & Graeff (1991). Embora as asas laterais do NDR estejam marcadamente envolvidas na expressão/regulação da resposta de fuga, populações neuronais específicas dessa região também estão envolvidas na modulação do comportamento de esquia inibitória.

Palavras-Chave: Núcleo dorsal da rafe. Núcleo mediano da rafe. Substância cinzenta periaquedutal, Labirinto em T elevado, Serotonina

ABSTRACT

Spiacci Jr, A. *Differential involvement of dorsal raphe subregions in the regulation of defensive responses associated with anxiety and fear*. Ribeirão Preto: Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 2012. 127 p. PhD Thesis in Pharmacology.

The dorsal raphe nucleus (DRN) is the main source of serotonergic projections that innervate the limbic system. A wealth of evidence indicates that the DRN is a complex structure composed by topographically organized sub-regions with distinct functional and neurochemical properties. It has been proposed that two serotonergic pathways originating in the DRN, the forebrain and periventricular tracts, distinctly modulate defensive behaviors associated with generalized anxiety disorder and panic disorder. The present study addressed the hypothesis that the two defensive responses evoked by the elevated T maze (ETM), i.e. escape and inhibitory avoidance which have been related to generalized anxiety and panic disorders, respectively, would recruit different subregions of the DRN. In the first part of this work, the number of doubly-immunostained cells for Fos protein and tryptophan hydroxylase, a marker of serotonergic neurons, was assessed within the rat DRN, median raphe nucleus (MRN) and PAG following inhibitory avoidance and escape performance in the ETM. Our results showed that these two defensive responses recruited distinct neuronal populations within the DRN, MRN and PAG. While serotonergic neurons located at the middle and caudal level of the DRN, specifically within the sub-regions dorsal (DRD), caudal (DRC) and interfascicular (DRI), and the MRN are implicated in the acquisition of inhibitory avoidance, non-serotonergic neurons in lateral wings (lwDR) of the DRN /ventrolateralPAG and the dorsal columns of PAG are implicated in the escape expression. In the second part of this study, we evaluated the effects caused by the administration of AMPA/kainate receptor agonist, kainic acid, into the DRD, DRC and lwDR of rats tested in the ETM. The results showed that injection of kainic acid into DRD and DRC facilitated inhibitory avoidance acquisition and impaired escape expression. On the other hand, stimulation of the lwDR by kainic acid facilitated escape expression, without interfering with inhibitory avoidance acquisition. Opposite effect on escape behavior was observed in this region followed injection of cobalt chloride, a synaptic transmission inhibitor. Our results also showed that administration of higher doses of kainic acid into the lwDR promptly evoked a vigorous escape reaction in animals tested in a circular arena. Finally, we evaluated the involvement of GABA_A and CRF₁ receptor-mediated neurotransmission in the lwDR in the regulation of the escape behavior measured by the ETM. Our results showed that the GABA_A receptor antagonist bicuculine injected into the lwDR favored escape expression, without affecting inhibitory avoidance acquisition. On the other hand, local microinjection of the CRF₁ receptor antagonist antalarmin impaired the acquisition of inhibitory avoidance, without changing escape expression. Together, our immunohistochemical results indicate the involvement of distinct DRN neuronal subpopulations in the regulation of escape and inhibitory avoidance responses. Our results also suggested that, while serotonergic neurons within the DRD, DRC, DRI and MRN are involved in inhibitory avoidance acquisition, non-serotonergic neurons of the vlPAG, dlPAG and dmPAG are involved in escape expression. The behavioral results with kainic acid indicated that the DRC and DRD may be the origin of the forebrain and periventricular tracts addressed by Deakin & Graeff's theory (1991). Although the

lwDR are markedly implicated in escape regulation, specific neuronal populations within this region may also modulate inhibitory avoidance behavior.

Keywords: Dorsal Raphe Nucleus. Median Raphe Nucleus. Periaqueductal Grey Matter. Elevated T-maze. Serotonin.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5-HT	Serotonina
5-HT _{1A}	Receptor de Serotonina do tipo 1A
5-HT ₂	Receptor de Serotonina do tipo 2
CRF	Fator Liberador de Corticotrofina
CRF ₁	Receptor do Fator Liberador de Corticotrofina do tipo 1
CRF ₂	Receptor do Fator Liberador de Corticotrofina do tipo 2
DRC	Sub-região Caudal do Núcleo Dorsal da Rafe
DRD	Sub-região Dorsal do Núcleo Dorsal da Rafe
DRI	Sub-região Interfascicular do Núcleo Dorsal da Rafe
DRV	Sub-região Ventral do Núcleo Dorsal da Rafe
Fos/TrpOH-IR	Co-localização Imunorreativa para Proteína Fos e para Enzima Triptofano Hidroxilase
Fos-IR	Imunorreativo para Proteína Fos
LTE	Labirinto em T Elevado
NDR	Núcleo Dorsal da Rafe
NMR	Núcleo Mediano da Rafe
SCP	Substância Cinzenta Periaquedutal
SCPD	Substância Cinzenta Periaquedutal Dorsal
SCPdl	Sub-região Dorsolateral da Substância Cinzenta Periaquedutal
SCPdm	Sub-região Dorsomedial da Substância Cinzenta Periaquedutal
SCPl	Sub-região Lateral da Substância Cinzenta Periaquedutal
SCPvl	Sub-região Ventrolateral da Substância Cinzenta Periaquedutal
TrpOH-IR	Imunorreativo para Enzima Triptofano Hidroxilase
TrpOR	Enzima Triptofano Hidroxilase

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Ansiedade.....	15
1.2 Comportamentos Defensivos.....	17
1.3 Serotonina	20
1.4 Papel da serotonina no transtorno de ansiedade	21
1.5 Labirinto em T elevado.....	25
1.6 Heterogeneidade morfológica e funcional do NDR.....	27
2 OBJETIVOS.....	34
2.1 Objetivo Geral.....	35
2.2 Objetivos Específicos.....	35
3 MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1 ETAPA 1 – ANÁLISES IMUNOISTOLÓGICAS	37
3.1.1 Animais	37
3.1.2 Aparelhos Experimentais.....	37
3.1.3 Procedimentos Experimentais	38
3.1.4 Análise Estatística	43
3.2 ETAPA 2 – ANÁLISES COMPORTAMENTAIS.....	45
3.2.1 Animais	45
3.2.2 Droga	45
3.2.3 Aparelhos Experimentais.....	45
3.2.4 Procedimentos Experimentais	46
3.2.5 Análise Estatística	50
4 RESULTADOS.....	52
4.1 ETAPA 1 – ANÁLISES IMUNOISTOLÓGICAS	53
4.1.1 Análise Comportamental	53
4.1.2 Análise Imunoistoquímica.....	55
4.2 ETAPA 2 – ANÁLISES COMPORTAMENTAIS.....	65
4.2.1 Experimento 2A - Efeitos da injeção de ácido caínico no DRC sobre os comportamentos de esquia inibitória e de fuga no LTE.	65
4.2.2 Experimento 2B - Efeitos da injeção de ácido caínico no DRD sobre os comportamentos de esquia inibitória e de fuga no LTE.	68
4.2.3 Experimento 2C – Efeitos da injeção de ácido caínico nas asas laterais sobre os comportamentos de esquia inibitória e de fuga no LTE.	71

4.2.4 Experimento 2D - Efeitos das administrações de ácido caínico nas asas laterais sobre a atividade motora avaliada na arena circular.....	77
4.2.5 Experimento 2E - Efeitos da administração de cloreto de cobalto nas asas laterais sobre os comportamentos de esquiva inibitória e de fuga no LTE.....	79
4.2.6 Experimento 2F - Efeitos da administração de bicuculina nas asas laterais do NDR sobre os comportamentos de esquiva inibitória e de fuga no LTE.	81
4.2.7 Experimento 2G - Efeitos da administração de antalarmina nas asas laterais sobre os comportamentos de esquiva inibitória e de fuga no LTE.....	83
5 DISCUSSÃO.....	86
6 CONCLUSÃO.....	99
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101
ANEXO.....	105

1. Introdução

1.1 Ansiedade

A ansiedade é um estado emocional subjetivo de apreensão ou tensão, acompanhado de alterações comportamentais, fisiológicas e cognitivas (Graeff, 1999; Brandão, 2001). Embora seja normalmente vivenciada, favorecendo o bom desempenho do indivíduo em tarefas cognitivas e motoras, a ansiedade pode apresentar-se de maneira exacerbada, interferindo na execução de tarefas cotidianas e no convívio social do indivíduo, sendo neste caso considerada patológica (Barlow, 1988; Graeff, 2004).

No século XIX, a ansiedade patológica era denominada de “neurastenia”. Este termo foi introduzido em 1869, pelo neurologista americano George Miller Beard, para nomear o conjunto de sintomas físicos, como dores no corpo associadas a perturbações gástricas e sexuais, os quais eram eficazmente tratados com eletroterapia (para maiores detalhes ver Viana, 2010). Além disto, de acordo com Beard, a neurastenia seria resultante de uma “exaustão do sistema nervoso central” (Beard¹, 1869 apud Zorzanelli, 2010).

Anos mais tarde, o neurologista austríaco Sigmund Freud sugeriu a distinção nosológica entre o quadro de neurastenia de um grupo particular de sintomas denominado de “*Angstneurose*” ou neurose de angústia. Segundo Freud, a neurose de angústia poderia ser caracterizada pelos seguintes sintomas: irritabilidade geral, expectativa ansiosa, ataques de ansiedade, vertigem, fobias, distúrbios digestivos e parestesia. Além disto, esta síndrome poderia apresentar-se como um estado crônico (Freud, 1895). Assim, a ansiedade patológica passou a ser considerada uma categoria nosológica específica (Viana, 2010).

¹ Beard, G. M. (1869). Neurasthenia, or nervous exhaustion. *Boston Medical and Surgical Journal*, .80: 217-221.

Na prática clínica atual, a ansiedade patológica tem sido categorizada como transtornos de ansiedade, a qual é diagnosticada, mais comumente com base no manual diagnóstico estatístico de transtornos mentais (DSM, do inglês *Diagnostic Statistical Manual of Mental Disorders*), proposto pela Associação Psiquiátrica Americana. De acordo com o DSM-IV-TR (American Psychiatry Association, 2000) a ansiedade patológica, com base na sintomatologia e no decurso temporal, é classificada nos transtornos listados abaixo:

- Fobias (específicas, social ou agorafobia)
- Transtorno do Pânico (com ou sem agorafobia)
- Transtorno de Ansiedade Generalizada
- Transtorno Obsessivo-Compulsivo
- Transtorno de Estresse Pós-Traumático
- Transtorno de Estresse Agudo
- Transtorno de Ansiedade devido a uma condição médica geral
- Transtorno de Ansiedade induzido por substâncias químicas
- Transtorno Atípico de Ansiedade (não especificado)

De interesse para o presente trabalho, serão enfatizados os transtornos de ansiedade generalizada e transtorno de pânico.

O transtorno de ansiedade generalizada caracteriza-se por preocupações excessivas, que persistem por pelo menos seis meses, acompanhada por pelo menos três dos seguintes sintomas: inquietação, fadiga, dificuldade de concentração, irritabilidade, tensão muscular e/ou perturbações do sono (American Psychiatry Association, 2000).

Por sua vez, o transtorno de pânico é diagnosticado pela recorrência de ataques de pânico inesperados e inexplicáveis, caracterizados como um período de

intenso medo ou desconforto acompanhado de, pelo menos, 4 sintomas somáticos e/ou cognitivos (taquicardia, sudorese, tremores ou espasmos, sensação de asfixia, desconforto ou dor torácica, náusea ou desconforto abdominal, sensação de tontura, vertigem ou desmaio, despersonalização, medo de perder o controle ou enlouquecer, sensação de morte iminente, sensação de dormência nas mãos, calafrios ou ondas de calor. Estes sintomas perduram por aproximadamente 30 minutos, alcançando um pico em 10 minutos (American Psychiatry Association, 2000).

1.2 Comportamentos Defensivos

Grande parte do conhecimento sobre as bases neurobiológicas da ansiedade é derivado de observações experimentais empregando animais de laboratório.

Estes estudos se baseiam na proposta evolutiva de Charles Darwin, segundo a qual, os estados emocionais de medo e ansiedade vivenciados pela espécie humana teriam raízes filogenéticas nos comportamentos defensivos de animais frente a estímulos que ameacem a integridade física e/ou a sobrevivência (Darwin², 1872, apud Viana 2010). Assim, tanto o medo como a ansiedade teriam a função de preparar o organismo para enfrentar situações de perigo, favorecendo a sobrevivência da espécie.

Os comportamentos defensivos podem ser definidos como um conjunto de respostas evocadas por situações ou estímulos de ameaça (Shuhama, et al., 2007; Blanchard & Blanchard, 2008). As fontes de perigo ou ameaça variam entre as diferentes espécies animais. Em laboratório, os estímulos aversivos rotineiramente

² Darwin, C. R. (1872). The expression of emotion in man and animals. London: John Murray.

utilizados incluem: estímulos dolorosos, exposição a ambientes desconhecidos, confronto com predador, dentre outros (Blanchard & Blanchard, 2008; Graeff & Zangrossi, 2002).

De acordo com análises etológicas, frente a esses estímulos de ameaça, os animais podem expressar diferentes padrões de respostas defensivas, tais como avaliação de risco, esquiva, imobilidade, fuga, ataque defensivo ou submissão (Blanchard & Blanchard, 2008; Graeff & Zangrossi, 2002; Adams, 1979; 2006). Além disto, o padrão de resposta adotada pelo animal está diretamente relacionado com o nível de ameaça que o estímulo representa ao mesmo, como a presença de um predador. Assim, estes estímulos têm sido classificados em potencial ou incerto, distal e proximal (Blanchard & Blanchard, 1988; Blanchard, et al., 2008). Ainda, com base em resultados experimentais, tem sido proposto que os padrões de respostas defensivas envolveriam a ativação de substratos neurais específicos (McNaughton & Corr, 2004; Graeff, 1981; 2004).

Em um ambiente onde a ameaça é apenas potencial (incerto), a estratégia adotada é o comportamento de exploração cautelosa. Acredita-se que este padrão de resposta envolveria a ativação de estruturas prosencefálicas, como por exemplo, o complexo amigdalóide, o sistema septo-hipocampal e o córtex pré-frontal (Gray & McNaughton, 2000; McNaughton & Corr, 2004). Abordagens experimentais utilizam este padrão de resposta como um índice de ansiedade, visto que drogas com propriedades ansiolíticas alteram o comportamento de avaliação de risco (Gray & McNaughton, 2000; Blanchard, et al., 1997; 2003).

Quando o perigo é real, porém encontra-se distante, observa-se o comportamento de fuga ou imobilidade. A estratégia dependerá da existência ou não de uma rota de saída.

Por fim, quando o animal encontra-se muito próximo, ou em contato com o perigo (ameaça proximal), são observados comportamentos de fuga explosiva e/ou ataques defensivos (Blanchard & Blanchard, 1988; para revisão ver Blanchard et al., 2003). Estruturas cerebrais que compõem o sistema encefálico aversivo, isto é, os núcleos hipotalâmicos e a substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPD) parecem estar diretamente relacionadas com a expressão destes comportamentos (Fernandez de Molina & Hunsperger, 1959; Graeff, 1981; 2002; McNaughton & Corr, 2004). Este padrão de resposta tem sido sistematicamente correlacionado a ataques de pânico, desde que estes comportamentos são sensíveis a drogas clinicamente eficazes no tratamento do transtorno de pânico (Graeff, 1994; 2002; Jenck, et al., 1995; Blanchard, et al., 1997; Schenberg, 2010).

Atualmente várias substâncias neurotransmissoras têm sido implicadas na mediação ou modulação da expressão dos comportamentos defensivos, como por exemplo: ácido gama-aminobutírico (GABA), glutamato, serotonina (5-HT), óxido nítrico, colecistocinina, fator liberador de corticotrofina (CRF). Dentre estas, a serotonina tem recebido amplo destaque, principalmente após a descoberta de que compostos que inibem preferencialmente a recaptação de 5-HT são clinicamente eficazes no tratamento de vários transtornos de ansiedade incluindo o transtorno de ansiedade generalizada, o transtorno de pânico e o transtorno do estresse pós-traumático (Kahn, et al., 1986; Baldwin, et al., 2005; para revisão ver Graeff & Zangrossi, 2010).

1.3 Serotonina

A 5-HT é uma indolamina sintetizada a partir da hidroxilação do aminoácido essencial L-triptofano pela enzima triptofano hidroxilase (TrpOH) originando o composto 5-hidroxitriptofano, que posteriormente é descarboxilado pela enzima aminoácido descarboxilase, formando a 5-hidroxitriptamina (Clark, et al., 1954; para revisão ver Frazer & Hensler, 1999). A síntese da 5-HT é limitada às células que contém a enzima TrpOH, ou seja, plaquetas, células enterocromafins e neurônios encefálicos localizados principalmente na ponte e no mesencéfalo, denominados de núcleos da rafe (Dahlstrom & Fuxe, 1964; Hagen & Cohen, 1966; Tyce, 1990).

A hipótese funcional da 5-HT como um mediador químico do sistema nervoso central foi abordada pioneiramente por Twarog & Page (1953), após estes identificarem a presença desta substância em extratos de tecido cerebral de ratos e coelhos.

Atualmente, sabe-se que a 5-HT é um importante neurotransmissor do sistema nervoso central e atua pré e/ou pós-sinapticamente sobre pelo menos 14 subtipos de receptores (Andrade, et al., 2012), estando desta maneira envolvida em numerosas funções homeostáticas, como por exemplo, nas respostas a estímulos estressores, no ciclo sono-vigília, no controle da ingestão alimentar, na modulação da dor e na regulação da temperatura (Molliver, 1987; Monti, 2011; Bardin, 2011; Garattini, et al., 1988; Jacobs & Azmitia, 1992; Maier, et al., 1993; McGinty & Harper, 1976; Abrams, et al., 2004; Buhot, 1997; Herman & Cullinan, 1997; Lopez, et al., 1999; Lowry, 2002; Meneses, 1998; Wang & Nagai, 1994; Hale, et al., 2011; 2012), e também em processos patológicos, por exemplo, na depressão, nos transtornos de ansiedade, psicoses, na adicção (Kirby, et al., 2011; Wilson, et al., 1993; Kroeze &

Roth, 1998; Meltzer, 1999; Mourilhe & Stoker, 1998; Graeff & Zangrossi, 2010; Hale, et al., 2012).

1.4 Papel da serotonina no transtorno de ansiedade

O envolvimento da 5-HT nos transtornos de ansiedade tem sido amplamente estudado nos últimos anos.

Dentro de uma perspectiva histórica, conforme descrito por Graeff (2004), os primeiros resultados experimentais que demonstraram o envolvimento da serotonina na ansiedade foram obtidos nos modelos animais baseados no paradigma de conflito proposto por Geller e Seifter (1960). Nestes modelos, o comportamento operante (como por exemplo: pressionar uma barra) é estimulado pela apresentação de uma recompensa (alimento ou água) e suprimido por estímulos aversivos (choque nas patas), gerando um conflito do tipo aproximação *versus* esquiva. Assim, a administração sistêmica de drogas que reduzem a ação da 5-HT, como o inibidor da enzima TrpOH, o para-clorofenilalanina (p-CPA), bem como dos antagonistas serotoninérgicos, metisergida e ácido bromolisérgico, liberavam a expressão de comportamentos operante suprimidos pela punição (Robichaud & Sledge, 1969; Graeff & Schoenfeld, 1970; para revisão ver Graeff, 2002). Estes efeitos eram semelhantes aos observados após a administração de ansiolíticos benzodiazepínicos (Wuttke & Kelleher, 1970). Paralelamente, Wise e colaboradores (1972) demonstraram que a administração sistêmica do ansiolítico benzodiazepínico oxazepam reduziu a concentração de 5-HT no cérebro de ratos.

Com base nestes achados, Wise e colaboradores (1972) propuseram o primeiro modelo teórico para explicar o envolvimento da 5-HT na ansiedade.

Segundo estes pesquisadores, a 5-HT facilitaria a supressão comportamental devido sua ação em estruturas prosencefálicas (para revisão ver Stein, et al., 1975).

Diversas evidências suportavam esta proposta. Por exemplo, Tye e colaboradores (1977) observaram que a destruição de neurônios serotoninérgicos localizados na região ventral do mesencéfalo, através da administração local da neurotoxina 5,7-di-hidroxitriptamina (5,7-DHT), além de reduzir os níveis corticais de 5-HT, também inibia a supressão comportamental causada por choques elétricos.

Estudos empregando a manipulação farmacológica do complexo amigdalóide, uma estrutura prosencefálica com papel pivô na expressão da ansiedade condicionada, sugeriram que esta estrutura estaria diretamente correlacionada com os efeitos pró-aversivos da 5-HT. Assim, Petersen & Scheel-Kruger (1984) observaram que no complexo amigdalóide, a administração do antagonista preferencial de receptores serotoninérgicos 5-HT₂, quetanserina, liberava a expressão de comportamentos punidos. Por outro lado, a manipulação farmacológica da mesma área através da administração de 5-HT ou do agonista preferencial de receptores 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT promoveu efeitos opostos (Hodges, et al., 1987).

Desta forma, os resultados obtidos em modelos de conflito sugeriam que a 5-HT aumentava os níveis de ansiedade, devido sua ação em estruturas prosencefálicas como, por exemplo, no complexo amigdalóide (para revisão ver Graeff, 2002).

Paralelamente, em meados da década de 1970, evidências também sugeriam que a 5-HT diminui a ansiedade. Estes achados foram obtidos utilizando o modelo experimental de estimulação elétrica da SCPD.

A estimulação elétrica da SCPD em animais de laboratório induz a expressão de comportamentos defensivos semelhantes aos evocados por animais frente a um

perigo proximal, como por exemplo, a resposta de fuga (Bandler & DePaulis, 1991). Desta forma, animais de laboratório aprendem facilmente a expressar comportamentos operantes (pressionar uma barra) com o intuito de desligar o estímulo elétrico aplicado à SCPD.

Resultados obtidos neste modelo mostraram que a administração sistêmica de drogas que prejudicam a neurotransmissão 5-HT, como por exemplo, pCPA, bem como do antagonista de receptores 5-HT, a ciproheptadina, aumentam a expressão do comportamento operante, um efeito caracterizado como ansiogênico (Kiser & Liebovitz, 1975; Schenberg & Graeff, 1978). Por outro lado, a facilitação da neurotransmissão 5-HT prejudica a expressão da fuga induzida pela estimulação da SCPD (Kiser, et al., 1978).

Com a introdução de técnicas que permitiam a análise do efeito de drogas injetadas diretamente na SCPD, o grupo liderado por Frederico G. Graeff demonstrou que nesta região, as administrações tanto da 5-HT, bem como do agonista de receptores serotoninérgicos, a 5-metoxi-N,N-dimetiltriptamina, elevam o limiar de corrente elétrica necessária para induzir a expressão da fuga. Além disto, este efeito inibitório sobre a fuga promovido por estas drogas foi bloqueado pelos antagonistas de receptores 5-HT₂, a quetanserina ou ritanserina (Schütz, et al., 1985; Audi, et al., 1988).

Em suma, enquanto os estudos conduzidos em modelos animais de conflito sugeriam que a 5-HT elevaria os níveis de ansiedade (Geller & Blum, 1970; Petersen & Scheel-Krüger, 1984; Hodges et al., 1987), trabalhos que avaliavam a expressão da resposta de fuga indicavam que a 5-HT atenuaria a ansiedade (Kiser & Liebovitz, 1975; Schenberg & Graeff, 1978; Kiser, et al., 1978, Brandão, 1981; Audi, et al., 1988).

Visando explicar estes resultados conflitantes, Deakin & Graeff (1991) propuseram que a 5-HT desempenharia uma função dual na modulação de respostas defensivas associadas à ansiedade e ao pânico, devido sua atuação em estruturas prosencefálicas e na SCPD, respectivamente. Ainda, de acordo com os autores, no cerne desta teoria estaria o núcleo dorsal da rafe (NDR).

O NDR é uma estrutura localizada na linha média do mesencéfalo, caracterizada pela alta densidade de corpos celulares serotoninérgicos (Dahlström & Fuxe, 1964; Joh, et al., 1975; Steinbusch, et al., 1978), que se projetam para diversas áreas do sistema nervoso central (Vertes, 1991), sendo considerado a principal fonte de inervação serotoninérgica para o sistema límbico (Azmitia & Segal, 1978).

De acordo com Deakin & Graeff (1991), o NDR participaria na modulação das respostas defensivas através de duas vias serotoninérgicas distintas. A ativação do trato serotoninérgico prosencefálico, que inervam o complexo amigdalóide e o córtex cerebral, facilitaria a expressão dos comportamentos de esquiva inibitória e avaliação de risco. Por outro lado, a ativação do trato serotoninérgico periventricular, que inerva a SCPD, inibiria a expressão da fuga. Além disto, segundo os autores, disfunções destas vias estariam envolvidas na neurobiologia do transtorno de ansiedade e pânico (Deakin & Graeff, 1991; para revisão ver Graeff & Zangrossi, 2010).

Para testar esta hipótese em animais de laboratório, o grupo de pesquisa do Frederico G. Graeff desenvolveu o modelo do labirinto em T elevado (LTE; Graeff, et al., 1993; Viana, et al., 1994; Zangrossi & Graeff, 1997).

1.5 Labirinto em T elevado

O LTE foi desenvolvido a partir do modelo do labirinto em cruz elevado, tendo como base a observação de que roedores possuem aversão natural de locais elevados e desprovidos de proteção (Montgomery, 1955; Pellow, et al., 1985). Neste caso, acredita-se que a aversão seja desencadeada pela impossibilidade do animal realizar tigmotaxia (Falter, et al., 1992; Treit, et al., 1993).

O LTE é constituído por um braço fechado, disposto perpendicularmente a dois braços abertos, todos elevados em relação ao solo. Sua execução permite avaliar separadamente o comportamento de esquiva inibitória e de fuga em um mesmo animal.

Neste modelo, o comportamento de esquiva inibitória é avaliado colocando o animal por três vezes consecutivas na extremidade distal do braço fechado e em cada uma das tentativas verifica-se a latência para o mesmo sair deste braço com as quatro patas. Já o comportamento de fuga é avaliado colocando o animal por três vezes consecutivas na extremidade distal de um dos braços abertos e em cada uma das tentativas verifica-se a latência para o mesmo sair deste braço com as quatro patas.

Estudos objetivando a validação farmacológica do LTE demonstraram que a administração aguda e sistêmica de compostos ansiolíticos, como por exemplo, o agonista benzodiazepínico, diazepam, e o agonista parcial de receptores 5-HT_{1A}, buspirona, prejudicam a aquisição da resposta de esquiva inibitória, sem alterar a expressão da fuga (Graeff, et al., 1998). Este efeito seletivo sobre a resposta de esquiva inibitória se correlaciona com eficácia clínica destes compostos no

tratamento do transtorno da ansiedade generalizada (Nutt, 1991; Baldwin, et al., 2011a; 2011b; Bandelow, et al., 2012).

Já a administração repetida (21 dias) dos compostos antidepressivos imipramina ou escitalopram prejudicaram a aquisição da esquiva inibitória e a expressão da fuga (Teixeira, et al., 2000; Poltronieri, et al., 2003; Pinheiro, et al., 2008; Zanoveli, et al., 2005). Estes efeitos correlacionam-se com a eficácia clínica dos antidepressivos no tratamento do transtorno da ansiedade generalizada (Stahl, et al., 2003; Baldwin, et al., 2011a; 2011b; Bandelow, et al., 2012) e no tratamento do transtorno de pânico. Ainda, a administração aguda de imipramina facilita a aquisição da esquiva inibitória, sem afetar a expressão da fuga (Vicente & Zangrossi, 2011). Estando em consonância com a observação clínica de que os antidepressivos elevam os níveis de ansiedade no início do tratamento (Baldwin, et al., 2011a).

Os resultados obtidos com a validação farmacológica do LTE sustentam a correlação entre os comportamentos de esquiva inibitória e fuga com o transtorno de ansiedade generalizada e transtorno de pânico, respectivamente (Blanchard, et al., 1986; 1993; 2001; Gray e McNaughton, 2000; Zangrossi e Graeff, 2010).

Como mencionado anteriormente, para testar a hipótese de Deakin & Graeff (1991), foram realizados estudos para avaliar o efeito da manipulação farmacológica do NDR de ratos sobre os comportamentos avaliados no LTE. Os primeiros resultados obtidos mostraram que administrações intra-NDR do agonista glutamatérgico, o ácido caínico, do agonista inverso de receptores benzodiazepínicos, o FG 7142, compostos estes que promovem a estimulação dos neurônios do NDR, favoreceram a aquisição da esquiva inibitória, bem como

prejudicaram a expressão da fuga (Pobbe & Zangrossi, 2005; Graeff, et al., 1996a; 1996b; 1997).

Por outro lado, a lesão neurotóxica do NDR com 5,7-DHT prejudicou a aquisição da esquiva inibitória e facilitou a expressão da fuga (Sena, et al., 2003). Efeitos semelhantes foram observados após a infusão intra-NDR de compostos capazes de inibir os neurônios desta região, tais como do agonista de receptores GABA_A, muscimol, ou do agonista de receptores de 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT (Sena, et al., 2003).

Em suma, as evidências comportamentais obtidas no LTE sustentam o papel diferencial do NDR na mediação de respostas defensivas associadas à ansiedade e ao pânico, conforme proposto por Deakin & Graeff (1991).

1.6 Heterogeneidade morfológica e funcional do NDR

Apesar de não ter sido uma questão abordada na teoria de Deakin & Graeff (1991), fortes evidências sugerem que o NDR não é uma estrutura homogênea, mas um agregado de diferentes subpopulações de neurônios serotonérgicos e não serotonérgicos, que são morfológica e funcionalmente distintos (Abrams, et al., 2004; Calizo, et al., 2011; Hale, et al., 2012).

As primeiras evidências experimentais que sugeriram a heterogeneidade morfológica e funcional do NDR foram obtidas no início da década de 1980, através de técnicas histológicas. Mais especificamente, Steinbusch (1981) demonstrou através da técnica de imunoistoquímica para a detecção da 5-HT, que o NDR é formado por corpos celulares serotonérgicos organizados em 5 grupamentos

distintos, isto é, dorsal (DRD), ventral (DRV), lateral, caudal (DRC) e interfascicular (DRI).

Posteriormente, através da técnica de neurotraçamento, Imai e colaboradores (1986) relataram a existência de uma organização topográfica dos neurônios do NDR ao longo do eixo rostro-caudal, com base nas diferenças entre suas aferências. De acordo com os autores, os neurônios da porção rostral do NDR se projetam mais densamente para os gânglios da base, isto é, caudado, putâmen e substância negra. Já os neurônios da porção caudal do NDR se projetam para regiões límbicas, sugerindo assim, a existência de uma organização topográfica funcional (Imai, et al., 1986).

Entretanto, estes achados foram “ofuscados” pelas evidências experimentais oriundas de estudos eletrofisiológicos “*in vivo*” realizados por Barry Jacobs & Casimir Fornal (para revisão Jacobs & Fornal, 1999). Nestes estudos, os pesquisadores avaliaram a atividade elétrica de neurônios serotoninérgicos do NDR de gatos frente a diferentes estímulos aversivos. De acordo com os resultados, estímulos estressores, tais como restrição física, confronto com o predador, sons de alta intensidade não foram capazes de alterar a atividade eletrofisiológica dos neurônios serotoninérgicos do NDR (Wilkinson & Jacobs, 1988). Por outro lado, a atividade locomotora e movimentos faciais elevaram a atividade elétrica destes neurônios em 30 a 50% (Fornal, et al., 1996; Veasey, et al., 1997). Desta maneira, concluiu-se que o NDR seria uma estrutura funcionalmente homogênea e os neurônios serotoninérgicos ali presentes seriam “neutros a estressores” e funcionalmente envolvidos com a atividade motora (Wilkinson & Jacobs, 1988; para revisão Jacobs & Fornal, 1999; 2010).

Anos mais tarde, a idéia proposta por Imai e colaboradores (1986) de que o NDR apresentaria uma organização topográfica funcional ganhou força devido a resultados experimentais obtidos através do uso da técnica de imunohistoquímica para detecção da proteína Fos.

A proteína Fos é o produto do gene *c-fos*, um proto-oncogene pertencente a uma família de fatores de transcrição induzíveis, conhecida como “*immediate early genes*”. Estudos biomoleculares demonstraram que alguns estímulos específicos, como por exemplo, a ativação neuronal, fatores neurotróficos e hormônios são capazes de desencadear a transcrição do gene *c-fos* (Hoffman, et al., 1993; Chaudhuri, 1997; Kovács, 1998; 2008). Consequentemente, a proteína Fos tem sido amplamente utilizada por neurocientistas como um marcador indireto da atividade neuronal (Dragunow & Faull, 1989).

Grahn e colaboradores (1999), avaliando a expressão da proteína Fos por neurônios do NDR de ratos expostos a choques inescapáveis nas patas, demonstraram que este estressor promove a ativação de neurônios triptofano hidroxilase imunorreativos (TrpOH-IR, neurônios serotoninérgicos) restritos às porções média e caudal do NDR.

Já, Roche e colaboradores (2003), utilizando o teste do nado forçado, observaram que a primeira exposição de ratos ao tanque com água, situação que evoca a expressão de comportamentos ativos de defesa semelhantes à fuga, eleva a expressão da proteína Fos predominantemente na sub-região lateral do NDR, também conhecida por asas laterais. Ainda, investigando a identidade química destes neurônios, os pesquisadores observaram que estes não eram serotoninérgicos, mas sim GABAérgicos.

Em conjunto, estes resultados sustentaram a proposta de Imai et al. (1986) quanto a heterogeneidade funcional das diferentes sub-regiões do NDR, e além disto, sugeriam a participação tanto de neurônios serotonérgicos quanto de neurônios não serotonérgicos do NDR nos circuitos neurais das respostas defensivas.

Motivado por estes achados, o grupo de pesquisa liderado pelo pesquisador Christopher A. Lowry publicou uma revisão intitulada: “*Anatomic and funcional topography of the dorsal raphe nucleus*” (2004), onde abordaram que o NDR seria formado por diferentes sub-regiões com características neuroanatômicas, neuroquímicas e funcionais distintas, e estas estariam organizadas topograficamente ao longo do eixo rostro-caudal (Abrams, et al., 2004). Ainda, os autores reforçam que, além daquelas 5 sub-regiões do NDR definidas originalmente por Steinbusch (1981), isto é: DRD, DRV, asas laterais, DRC e DRI, estudos posteriores deveriam considerar a subdivisão deste núcleo em pelo menos três partes iguais ao longo do eixo rostro-caudal, ou seja, rostral, médio e caudal (Abrams, et al., 2004).

Em consonância com esta proposição, trabalhos recentes têm apontado que a exposição de ratos a estímulos ansiogênicos, como por exemplo, a administração sistêmica de substâncias ansiogênicas (Abrams, et al., 2005), a exposição a ambientes iluminados (Bouwknicht, et al., 2007), a administração intra-complexo amigdalóide do agonista de receptor CRF do tipo 1 (CRF1), urocortina 1 (Spiga, et al., 2006), a administração intra-cérebro ventricular do agonista de receptor CRF₂, urocortina 2 (Staub, et al., 2005; Hale, et al., 2010), induzem a expressão da proteína Fos em neurônios serotonérgicos localizados predominantemente nas porções média e caudal do NDR. Baseado nestes resultados imunoistoquímicos, bem como em análises de neurotraçamento, Lowry e colaboradores (2008)

sugeriram que os neurônios serotonérgicos localizados nestas porções do NDR formariam o trato prosencefálico hipotetizado por Deakin & Graeff (1991).

Por outro lado, Johnson e colaboradores (2005) sugerem que o trato periventricular seria formado por neurônios serotonérgicos das asas laterais do NDR, bem como a substância cinzenta periaquedutal ventrolateral (SCPvl). Esta proposta é baseada em resultados obtidos com a exposição de ratos a um ambiente com altas concentrações de dióxido de carbono (Johnson, et al., 2005).

A exposição de ratos a ambientes contendo alta concentração CO_2 , um estímulo que provoca ataques de pânico em pacientes com transtorno de pânico (Griez, et al., 1987), ativa neurônios serotonérgicos das asas laterais do NDR e da SCPvl (Johnson, et al. 2005). De acordo com os autores, a ativação destes neurônios desencadearia o aumento na liberação de 5-HT em estruturas encefálicas inervadas por estas regiões, dentre estas a SCPdl e a medula rostral ventrolateral. Assim, justificando a inefetividade deste estímulo em gerar comportamentos de luta/fuga, ao invés disto, causando nos animais o comportamento de imobilidade.

Nesta mesma direção, Johnson e colaboradores (2008) mostraram que a administração endovenosa de lactato de sódio em ratos, um composto que induz ataques de pânico em pacientes com o transtorno de pânico (Liebowitz, et al., 1985), induz a expressão da proteína Fos em neurônios serotonérgicos das asas laterais do NDR, mas não promove alterações comportamentais significativas nestes animais. Entretanto, em ratos predispostos a ataques de pânico, via manipulação farmacológica do hipotálamo dorsomedial, (para detalhes ver Johnson & Shekhar, 2006), a administração sistêmica de lactato de sódio desencadeia reações autonômicas e comportamentais que se assemelham a um ataque de pânico. Estes

autores também mostraram que estas alteração autonômicas e comportamentais são correlacionadas com a diminuição na expressão da proteína Fos por neurônios serotoninérgicos nas asas laterais/SCPvl.

Em suma, evidências obtidas com a técnica imunoistoquímica de dupla marcação para as proteínas Fos e TrpOH sugerem uma organização topográfica funcional do NDR. Mais especificamente, neurônios serotoninérgicos localizados nos níveis médio e caudal do NDR, primariamente nos sub-núcleos DRD e DRC, formariam o trato prosencefálico, envolvido com a expressão da ansiedade (Abrams, et al., 2005; Spiga, et al., 2006; para revisão ver Lowry, et al., 2005). Por outro lado, os neurônios serotoninérgicos localizados nas asas laterais do NDR e da SCPvl originariam o trato periventricular, implicados com a inibição do pânico (Johnson, et al., 2004; Johnson, et al., 2005; Johnson, et al., 2008; para revisão ver Hale, et al., 2012)

Com base nestas evidências, na primeira etapa do presente trabalho investigamos a hipótese de que os comportamentos de esquiva inibitória e fuga observados no LTE recrutem diferentes sub-regiões do NDR. Mais especificamente investigamos se a resposta de esquiva inibitória observada no LTE promoveria o aumento na expressão da proteína Fos por neurônios serotoninérgicos localizados primariamente nos níveis médio e caudal do NDR. Também foi de interesse investigar se a resposta de fuga teria correlação com uma ativação de neurônios não-serotoninérgicos localizados nas asas laterais do NDR.

Nesta primeira etapa, também verificamos o padrão de expressão da proteína Fos em neurônios serotoninérgicos e não serotoninérgicos em estruturas mesencefálicas vizinhas ao NDR, ou seja, o núcleo mediano da rafe (NMR) e diferentes sub-regiões da SCP. No primeiro caso, estudos do nosso laboratório

mostram o envolvimento desta estrutura encefálica na mediação da resposta de esquiva inibitória (Silveira, et al., 2001; Andrade, et al., 2004; Dos Santos, et al., 2005; Dos Santos, et al., 2008). Já as sub-regiões da SCP têm sido implicadas na expressão de comportamentos ativos e passivos de defesa, tais como, fuga e imobilidade. (Fernandez de Molina & Hunsperger, 1959; Graeff, 1981; Bandler & Shipley, 1994; Morgan, et al., 1998; Schenberg, 2010).

Na sequência, baseados nos resultados da primeira etapa (estudo imunoistoquímico), investigamos se a estimulação química inespecífica das sub-regiões DRC, DRD e asas laterais, afetaria de maneira diferencial os comportamentos defensivos avaliados no LTE.

Interessados nos efeitos resultantes da estimulação química das asas laterais do NDR, avaliamos ainda o efeito das administrações de ácido caínico nesta sub-região sobre a atividade locomotora dos ratos em uma arena circular.

Na sequência, através da administração local de cloreto de cobalto, avaliamos os efeitos decorrentes da inibição da atividade sináptica ao nível das asas laterais do NDR sobre os comportamentos defensivos avaliados no LTE.

Por fim, investigamos o papel da neurotransmissão mediada por receptores GABA_A e CRF₁ presentes nas asas laterais do NDR sobre as respostas defensivas avaliadas no LTE.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Investigar a participação de diferentes sub-regiões do NDR, SCP e NMR de ratos na mediação dos comportamentos defensivos de esquiva inibitória e fuga medidos no LTE.

2.2 Objetivos Específicos

Etapas 1:

Avaliar a expressão da proteína Fos por neurônios serotoninérgicos e não-serotoninérgicos em diferentes sub-regiões do NDR, SCP e núcleo mediano da rafe (NMR) de ratos em decorrência da execução das tarefas de esquiva inibitória e fuga no LTE.

Etapas 2:

1. Avaliar os efeitos da estimulação química inespecífica com ácido caínico das sub-regiões DRC, DRD e asas laterais do NDR sobre os comportamentos de esquiva inibitória e de fuga emitidos por ratos no LTE.

2. Avaliar os efeitos da administração de ácido caínico nas asas laterais do NDR sobre a atividade locomotora avaliada em uma arena circular.

3. Avaliar os efeitos da administração do inibidor da atividade sináptica, cloreto de cobalto, sobre os comportamentos de esquiva inibitória e de fuga evocados no LTE.

4. Avaliar os efeitos da administração do antagonista de receptores GABA_A, bicuculina, e do antagonista preferencial de receptores CRF₁, antalarmina, nas asas laterais do NDR sobre os comportamentos de fuga e esquiva inibitória evocados no LTE.

3. Materiais e Métodos

3.1 ETAPA 1 – ANÁLISES IMUNOISTOLÓGICAS

3.1.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar, experimentalmente ingênuos, provenientes do Biotério Central do Campus da Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto, com peso entre 270 – 320 gramas no início do experimento. Os animais foram mantidos em caixas comunitárias (4 animais por caixa) com livre acesso a água e alimento (ração, Nuvital Nutrientes, Brasil). Entre a chegada dos animais do Biotério Central do Campus e o término do experimento, os animais permaneceram no biotério local do laboratório sob um ciclo de luz claro/escuro de 12 horas (período claro das 7:00 às 19:00 horas), temperatura controlada em $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e luminosidade de 40 lux.

Todos os procedimentos experimentais adotados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de São Paulo (protocolo nº: 108/2008).

3.1.2 Aparelhos Experimentais

Labirinto em T elevado

O LTE é um aparelho de madeira composto de três braços de iguais dimensões (50 cm de comprimento por 12 cm de largura). Um dos braços é fechado por paredes laterais 40 cm de altura e está disposto perpendicularmente aos outros dois braços, que são desprovidos de paredes. O aparelho é elevado 50 cm acima do solo. Para evitar a queda dos animais, os braços abertos são circundados por uma tira de acrílico transparente de 1 cm de altura.

Labirinto em T fechado

O labirinto em T fechado é um aparelho de madeira composto de três braços de iguais dimensões (50 cm de comprimento por 12 cm de largura) dispostos em forma de T, circundados por paredes laterais 40 cm de altura.

3.1.3 Procedimentos Experimentais

Habituação

Durante cinco dias consecutivos, os animais foram levados para a sala de teste a fim de serem habituado às condições experimentais. Nesta sala, os animais foram manuseados pelo experimentador por 5 minutos/dia e, em seguida, foram colocados em uma gaiola de acrílico (24 x 18 x 35 cm) com serragem no assoalho onde permaneceram por 5 minutos/dia. Esta mesma caixa foi utilizada durante a execução dos testes comportamentais.

O procedimento de habituação foi realizado em uma sala nas mesmas condições do experimento, no período das 8:00 às 13:30 horas, temperatura controlada em $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, luminosidade de 40 lux e constante ruído de fundo produzido por um aparelho exaustor de ar.

Pré-exposição ao braço aberto do LTE

Este procedimento foi realizado 24 horas antes da realização do teste do LTE. Para tal, cada animal foi submetido individualmente a um dos braços abertos do LTE, no qual permaneceu confinado durante 30 minutos. Para este fim, o braço aberto foi isolado dos demais braços por uma parede de madeira (50 cm de comprimento por 12 cm de largura).

O procedimento de pré-exposição facilita a evocação do comportamento de fuga, por reduzir a expressão de comportamentos à novidade, tais como a exploração e imobilidade (Teixeira et al. 2000).

Exposição ao labirinto em T

Vinte e quatro horas após a pré-exposição, os animais foram aleatoriamente distribuídos em 3 grupos experimentais: grupo I = esquiva, grupo II = fuga e grupo III = Labirinto em T fechado

Os animais do grupo esquiva foram submetidos ao braço fechado do LTE. Para isto, o animal foi colocado na extremidade distal do braço fechado, determinando-se a latência de saída deste braço, com as quatro patas deste braço, em três tentativas consecutivas (tentativa 1, tentativa2 e tentativa3) separadas por um intervalo de 30s, no qual o animal permanecia na caixa de acrílico descrita na sessão *habituação*. Foi estabelecido um tempo de corte de 300 segundos para cada tentativa.

Os animais do grupo fuga foram submetidos ao braço aberto do LTE (o mesmo braço onde foi realizada a pré-exposição no dia anterior). Neste procedimento, o animal foi colocado na extremidade distal do braço aberto e foi determinada a latência para o animal sair com as quatro patas do braço aberto, o qual fora previamente confinado, em três tentativas consecutivas (tentativa 1, tentativa2 e tentativa3) separadas por um intervalo de 30 segundos. Foi estabelecido um tempo de corte de 300 segundos para cada tentativa.

Os animais do grupo labirinto em T fechado foram submetidos a um dos braços fechado do labirinto em T fechado (o mesmo braço em que foi realizada a esquiva no LTE). Para tal, o animal foi colocado na extremidade distal do braço

fechado, e foi determinada a latência para o animal sair com as quatro patas deste braço, em três tentativas consecutivas (tentativa 1, tentativa2 e tentativa3) separadas por um intervalo de 30 segundos. Foi estabelecido um tempo de corte de 300 segundos para cada tentativa.

Em todos os grupos, imediatamente após a realização da tentativa 3, o animal foi levado de volta ao biotério do laboratório e acomodado em uma caixa de polietileno, a qual já estava previamente habituado.

Perfusão

Duas horas após a exposição aos braços do labirinto em T, os animais foram anestesiados com solução de hidrato de cloral 4% (10ml/Kg) e submetidos a perfusão intracardíaca com solução salina tamponada (PBS 0,01 M, pH: 7,4; 4°C), seguida de solução de paraformaldeído 4% (pH: 7,4, 1000 mL/Kg; 4°C). A perfusão foi realizada com auxílio de uma bomba de perfusão, e mantida a uma taxa de 22 ml/minuto.

Após a perfusão os encéfalos foram cuidadosamente removidos, posteriormente fixados por 2 horas em solução de paraformaldeído 4%, seguido por 2 horas em solução de PBS (PBS 0,01 M; pH: 7,4). Em seguida, os encéfalos foram crioprotetidos em solução de sacarose 30% em tampão fosfato (PB 0,2M, 4°C / 5 dias). Após estes procedimentos, os encéfalos foram cuidadosamente congelados em isopentano (mantido em gelo seco) e estocados em freezer (-20°C) até serem processados.

Histologia

Com o auxílio de um criostato (LEICA CM1850, Alemanha), os encéfalos foram cortados em secções coronais de 40 µm de espessura. As secções contendo o NDR, o NMR e a SCP foram coletadas e armazenadas em solução de PBS.

Imunoistoquímica para Fos e TrpOH.

As reações de imunoistoquímica para detecção da proteína Fos e da enzima triptofano hidroxilase (Trp-OH) foram realizadas utilizando a técnica *free-floating*.

Inicialmente, foi realizada a técnica imunoistoquímica para detecção da proteína Fos, conforme descrito a seguir. As secções foram lavadas 3 vezes em solução de PBS, permaneceram imersas em solução de peróxido de hidrogênio 1% em PBS por 10 minutos e foram lavadas 4 vezes em PBS. Os tecidos foram imersos em solução de albumina bovina (BSA 1% em PBS) por 30 minutos, seguida pela incubação “*overnight*” com o anticorpo primário anti-Fos (IgG de coelho, 1:800, Santa Cruz Biotechnology, cat. nº sc-52, Estados Unidos) diluído em solução de PBST (PBS 0,01M, albumina bovina 0,3%, triton x-100 0,2%). Após a incubação com o anticorpo primário, as secções foram lavadas 4 vezes em PBS e incubadas por 2 horas com anticorpo secundário biotinelado, anti-IgG de coelho (1:800, Vector, cat nº BA-1000, Estados Unidos). As secções foram então lavadas 4 vezes em PBS e incubadas por duas horas com complexo avidina-biotina-peroxidase (1:800, reagente ABC Elite, Vector, Estados Unidos). A reação imunoistoquímica foi revelada com solução de PBS contendo 3,3-diaminobenzidina 0,02%, peróxido de hidrogênio 0,0015% e sulfato de níquel 0.05%.

Após os ensaios imunoistoquímicos para proteína Fos, as secções foram lavadas 4 vezes em PBS, seguida pelo ensaio imunoistoquímico para detecção da enzima TrpOH, conforme descrito a seguir. Inicialmente, os tecidos foram incubados

“overnight” com o anticorpo primário anti-TrpOH (IgG de ovelha, 1:800, Santa Cruz Biotechnology, cat. nº sc-52, Estados Unidos) diluído em solução de PBST (PBS 0,01M, albumina bovina 0,3%, triton x-100 0,2%). Após a incubação com o anticorpo primário, as secções foram lavadas 4 vezes em PBS e incubadas por 2 horas com anticorpo secundário biotinelado, anti-IgG de ovelha (1:800, Vector, cat nº BA-6000, Estados Unidos). As secções foram então lavadas 4 vezes em PBS e incubadas por duas horas com complexo avidina-biotina-peroxidase (1:800, reagente ABC Elite, Vector, Estados Unidos). A reação imunoistoquímica foi revelada com solução de PBS contendo 3,3-diaminobenzidina 0,02% e peróxido de hidrogênio 0,0015%.

As secções coronais foram montadas em lâmina, foram desidratadas, diafanizadas, cobertas com lamínula usando-se Permount® (Fisher Scientific, UK).

Análise e Quantificação Neuronal

As reações imunoistoquímicas foram visualizadas com o auxílio de microscópio (Olympus DX50). O NDR, o NMR e a SCP foram fotografadas e analisadas através do software Image Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, USA).

Os neurônios Fos positivos puderam ser identificados pela presença de pigmentação preta restrita ao núcleo neuronal, enquanto que os neurônios TrpOH positivos foram identificados pela presença de pigmentação marrom-alaranjada restrita ao citoplasma neuronal (ver **figura 4**).

No NDR foram mensurados o número total de células Fos-imunorreativas (Fos-IR), o número total de neurônios TrpOH-imunorreativos (TrpOH-IR) e o número total de duplas-marcações (Fos/TrpOH-IR) em diferentes sub-regiões, em 4 diferentes níveis do eixo rostro-caudal, de acordo com Gardner, et al. (2005). As

sub-regiões avaliadas foram (ver **figura 2**): no nível rostral (-6.84 a -7.08mm bregma) foi analisada a sub-região dorsal (DRD). Nos níveis médio-rostral (-7.20 a -7.80mm bregma) e médio-caudal (-7.92 a -8.28mm bregma) foram analisadas as sub-regiões DRD, ventral (DRV) e asas laterais. Ao nível caudal (-8.52 to -9.00mm bregma) foram analisadas as sub-regiões caudal (DRC) e interfaccicular (DRI).

No NMR foram mensurados o número total de células Fos-IR, o número total de neurônios TrpOH-IR e o número total de neurônios Fos/TrpOH-IR em 1 nível do eixo rostro-caudal (-7,92 a -8,28mm de bregma; ver **figura 2**), de acordo com o estudo de Silveira et al. (2001).

Na SCP, a quantidade destas células foram mensuradas em diferentes sub-regiões, e em 3 diferentes níveis do eixo rostro-caudal (ver **figura 3**). Nos níveis rostral (-6.60 to -6.84mm bregma) e médio (-7.32 to -7.80mm bregma) foram analisadas as sub-regiões dorsomedial (SCPdm), dorsolateral (SCPdl), lateral (SCPl) e ventrolateral (SCPvl). No nível caudal (-8.28 to -8.52mm bregma) foram analisadas as sub-regiões SCPdm, SCPl e SCPvl.

3.1.4 Análise Estatística

Os dados comportamentais foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas, tendo como fator independente a exposição ao labirinto em T, e as tentativas como medidas repetidas. Quando apropriado, foi realizado o teste *post hoc* de Tukey.

Os dados referentes a técnica de imunoistoquímica, isto é, o número total de células Fos-IR, o número total de neurônios TrpOH-IR e número de neurônios Fos/TrpOH-IR quantificados nas diferentes sub-regiões do NDR ou da SCP foram

submetidos à análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas, tendo como fator independente as tarefas comportamentais no labirinto em T, e as sub-regiões como medidas repetidas. Quando apropriado, foi realizado o teste *post hoc* de Tukey. Também foram realizadas, quando apropriado, análises de correlação entre as latências de saída dos braços do labirinto em T e o número de células imunorreativas utilizando o teste de Person.

Nas análises de medidas repetidas, quando violado o pré-requisito de esfericidade, adotou-se o fator de correção épsilon (ϵ) de Greenhouse-Geisser. Neste procedimento os graus de liberdade são multiplicados pelo fator épsilon, assim a razão F é avaliada com os graus de liberdade corrigidos, consequentemente obtendo-se uma análise estatística mais conservadora (Vasey & Thayer, 1987).

3.2 ETAPA 2 – ANÁLISES COMPORTAMENTAIS

3.2.1 Animais

Conforme descrito na etapa 1.

3.2.2 Droga

Foram utilizadas as seguintes drogas: ácido caínico (Cat#K0250, Sigma-Aldrich, EUA), cloreto de cobalto (Cat#C8661, Sigma-Aldrich, EUA), bicuculina (Cat#14343, Sigma-Aldrich, EUA) e antalarmina (Cat#A8727, Sigma-Aldrich, EUA).

O ácido caínico, o cloreto de cobalto e a bicuculina foram diluídas em solução de salina estéril 0,9%, enquanto que a antalarmina foi suspensa em solução de álcool etílico 5% e cremafor 5% em salina estéril 0.9%.

3.2.3 Aparelhos Experimentais

Labirinto em T elevado

Conforme descrito na etapa 1.

Campo Aberto

O campo aberto consiste de uma arena quadrada de madeira (60 x 60 cm) circundada por paredes laterais de 40 cm de altura.

Arena Circular

Este aparelho é constituído por uma arena circular de acrílico (60 cm de diâmetro por 70 cm de altura), posicionado sobre uma plataforma de madeira.

3.2.4 Procedimentos Experimentais

Procedimento Cirúrgico

Os animais foram anestesiados com solução de 2,2,2-tribromoetanol 2,5% (Aldrich, EUA, 10 mL/Kg, i.p.) e fixados a um aparelho estereotático (Stoelting Co, EUA). Na sequência, foi realizada a anti-sepsia do campo cirúrgico com solução de iodopovidona 10%, seguida pela administração local da solução de cloridrato de lidocaína 2% e fenilefrina 0,04% (Novocol 100, S.S. White, Brasil). Após alguns minutos, foi realizada uma incisão longitudinal com o intuito de expor a calota craniana e identificar suas suturas (com aplicação local de solução de peróxido de hidrogênio 10 volumes).

Após a identificação das suturas cranianas (coronal, sagital e lambdóide), a posição vertical da barra incisiva foi ajustada, de maneira que o bregma e o lambda estivessem na mesma altura.

Foi realizado o procedimento de trepanação do osso parietal para a fixação de parafuso de aço inoxidável e implante de cânulas-guia direcionadas ao DRC, DRD ou as asas laterais, de acordo com as seguintes coordenadas: DRC (anteroposterior: 9,00 mm de bregma, lateral: 2,0 mm – ângulo de 14°, Profundidade: 4,8 mm), ou DRD (anteroposterior: 7,80 mm de bregma, lateral: 2,0 mm – ângulo de 12°, Profundidade: 4,4 mm), ou asas laterais (anteroposterior: 7,80 mm de bregma, lateral: 1,8 mm – ângulo de 14°, Profundidade: 4,4 mm).

No caso das asas laterais, cânulas-guia foram implantadas nos 2 hemisférios cerebrais. As cânulas-guia consistiam de um segmento tubular de aço inoxidável (12 mm de comprimento por 0.5 mm de diâmetro externo), confeccionada a partir de

uma agulha de injeção endovenosa. Finalmente, as cânulas-guia foram fixadas à calota craniana por meio de resina acrílica auto polimezante.

Após o procedimento cirúrgico, foram administradas solução de flunixin meglumina (Banamine®, Schering-Plough, Brasil; 2,5 mg/Kg, subcutânea) e solução de associação antibiótica de amplo espectro (Pentabiótico®, Fort Dodge, Brasil; 1 ml/Kg, intramuscular). Os animais receberam identificação e após recuperação e foram retornados ao biotério do laboratório, onde permaneceram até a realização dos testes comportamentais.

Habituação

Dois dias antes do teste, os animais foram manuseados pelo experimentador por 5 minutos/dia, em seguida, os animais foram colocados em uma gaiola de acrílico (24 x 18 x 35 cm) com serragem no assoalho onde permaneceram por 5 minutos/dia. Esta mesma caixa foi utilizada durante a execução do LTE

O procedimento de habituação foi realizada em uma sala nas mesmas condições do experimento, isto é, temperatura controlada em $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, luminosidade de 40 lux e constante ruído de fundo produzido por um aparelho exaustor de ar.

Testes Comportamentais

Labirinto em T elevado

Previamente ao teste, os animais foram pré-expostos ao braço aberto do LTE, conforme descrito na etapa 1.

Sete dias após a cirurgia estereotáxica, os animais receberam injeção de droga ou veículo. As injeções foram feitas por meio de uma agulha hipodérmica dental 33 gauge (14 mm de comprimento e 0,18 mm de diâmetro externo) conectada a uma microseringa de 1 μ L (Hamilton, EUA) através de um tubo de polietileno (P-10), o qual foi preenchido com água destilada.

O procedimento de injeção foi realizado com os animais tendo livre movimentação em uma caixa de polietileno (39 x 32 x 16 cm) com serragem no assoalho. O êxito do procedimento de microinjeção foi avaliado através do deslocamento de uma bolha de ar no segmento do polietileno.

No **experimento 2A**, foram injetados (50 nL / 30 segundos) ácido caínico (60 pmol; n=8) ou salina (n=8) no DRC.

No **experimento 2B**, foram injetados (50 nL / 30 segundos) ácido caínico (60 pmol; n=6) ou salina (n=6) no DRD.

No **experimento 2C**, foram bilateralmente injetados (50 nL / 30 segundos) ácido caínico (0,6; 6 ou 60 pmol; n=7 por grupo) ou salina (n=7) nas asas laterais.

No **experimento 2E**, foram injetados (50 nL / 30 segundos) cloreto de cobalto (1 mM; n=14) ou salina (n=13) nas asas laterais.

No **experimento 2F**, foram injetados (50 nL / 30 segundos) bicuculina (0,04; 0,2 ou 1 pmol; n=6; 9; 8 respectivamente) ou salina (n=7) nas asas laterais.

No **experimento 2G**, foram injetados (50 nL / 30 segundos) antalarmina (125, 250 ou 500 ng; n=8; 10; 8) ou veículo (n=11) nas asas laterais.

Sessenta segundos após o término das administrações, as agulhas foram removidas. Dez minutos após as injeções, os animais foram submetidos a avaliação comportamental no LTE.

No LTE, inicialmente foi avaliado o comportamento de esquiva inibitória. Para isto, os animais foram colocados na extremidade distal do braço fechado, determinando-se a latência de saída deste braço, com as quatro patas deste braço, em três tentativas consecutivas (Linha de base, esquiva 1 e esquiva 2) separadas por um intervalo de 30s, no qual o animal permanecia na caixa de acrílico descrita na sessão *habituação*. Posteriormente, foi avaliado o comportamento de fuga do braço aberto. Neste procedimento foi determinada a latência para os animais saírem com as quatro patas do braço aberto, o qual fora previamente confinado, em três tentativas consecutivas (fuga 1, fuga 2 e fuga 3) separadas por um intervalo de 30 segundos. Foi estabelecido um tempo de corte de 300 segundos para cada tentativa (esquiva e fuga).

Imediatamente após a fuga, os animais foram submetidos ao teste do campo aberto, para avaliação da atividade locomotora. Para tal, os animais foram colocados no centro do campo aberto, no qual foi determinada a distância total percorrida pelos animais durante o período de 5 minutos, com auxílio do software Ethovision (Noldus, Holanda).

Após os testes, os aparatos foram limpos com álcool a 20%

Arena Circular.

Grupos independentes de animais foram submetidos ao teste da arena circular.

Sete dias após a cirurgia estereotáxica os animais receberam injeção de droga ou veículo, conforme descrito anteriormente.

No **experimento 2D**, foram injetados (50 nL) ácido caínico (30 ou 60 pmol; n=6 por grupo) ou veículo (n=6) nas asas laterais.

Imediatamente após as injeções, a agulha foi removida e os animais foram submetidos a avaliação da atividade locomotora na arena circular. Para isto, os animais foram colocados no centro desta arena, na qual, foi determinada a distância total percorrida durante o período de 5 minutos, bem como as distâncias percorridas pelos animais em frações de minuto, com auxílio do software Ethovision (Noldus, Holanda).

Após o teste, a arena foi limpa com álcool a 20%.

Análise Histológica

Após o término dos testes comportamentais, os animais foram anestesiados com solução de hidrato de cloral 5% (Sigma, EUA; 10ml/kg, intra-peritoneal). Foi realizada a microinjeção 200 nL do corante azul de Evans a 1%, seguida pela perfusão intracardiaca com solução de cloreto de sódio 0,9% (150 mL) e solução de formol 10% (150 mL). Após a perfusão os encéfalos foram removidos e armazenados em solução de formol a 10% para posterior fixação.

Após fixados, os cérebros foram cortados em secções coronais de 40µm de espessura com o auxílio de um criostato (Leica CM-1850). As secções coronais foram dispostas em laminas para verificação microscópica do sítio de microinjeção.

3.2.5 Análise Estatística

Os dados obtidos no LTE (latências de esquia inibitória e fuga) foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas, tendo o tratamento como fator independente, e as latências de esquia ou de fuga como medidas repetidas. Quando apropriado, foi realizado o teste *post hoc* de Duncan.

Os dados da distância total percorrida no teste do campo aberto e arena circular foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma via ou teste *t* de student. Quando apropriado, foi realizado o teste *post hoc* de Duncan.

Os dados da distância percorrida em diferentes frações de tempo na arena circular foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas, tendo o tratamento como fator independente, o tempo como medidas repetidas. Quando apropriado, foi realizado o teste *post hoc* de Duncan.

4. Resultados

4.1 ETAPA 1 – ANÁLISES IMUNOISTOLÓGICAS

4.1.1 Análise Comportamental

A figura 1 mostra que os grupos analisados diferiram significativamente quanto a latência de saída dos braços do labirinto em T [$F(2,18)=23.15$, $p<0.05$]. Houve ainda, diferenças no fator tentativas [$F(2,36)=16.13$, $p<0.05$] e interação entre os fatores tarefa comportamental x tentativas [$F(4,36)=15.88$, $p<0.05$]. A análise *post hoc* revelou que somente no grupo esquiva, a latência de saída do braço fechado aumentou ao longo das tentativas, indicando aquisição de esquiva inibitória.

Figura 1 - Comportamento de ratos submetidos a diferentes tarefas no LTE (esquiva ou fuga) ou no labirinto em T fechado (controle). Dados expressos por média $\pm$ EPM (n: 7). T = tentativa. * $p < 0.05$ em relação ao grupo controle.

4.1.2 Análise Imunoistoquímica

NDR

NMR

Figura 2 - Fotomicrografia (magnificação 10x) ilustrando secções coronais do NDR e do NMR processadas pelo método imunoistoquímico para detecção da proteína Fos e TrpOH. **(A)** NDR nível rostral. **(B)** NDR nível médio-rostral. **(C)** NDR nível médio-caudal. **(D)** NDR nível caudal. **(E)** NMR. As linhas tracejadas delimitam as subdivisões do NDR que foram analisadas, tendo como referência o atlas de Paxinos & Watson (2007). Em (B), As setas amarelas apontam grandes vasos sanguíneos utilizados como referência para localizar a borda entre as asas laterais do NDR e a coluna SCPvl. Aq: aqueduto cerebral; DRD: sub-região dorsal do NDR; DRC: sub-região caudal do NDR; DRV: sub-região ventral do NDR; DRI: sub-região interfascicular do NDR. Barra de escala: 300 μ m

SCP

Figura 3 - Fotomicrografia (magnificação 10x) ilustrando secções coronais da SCP processadas pelo método imunohistoquímico para detecção da proteína Fos e TrpOH. **(A)** SCP nível rostral. **(B)** SCP nível médio. **(C)** SCP nível caudal. As linhas tracejadas delimitam as subdivisões da SCP que foram analisadas, tendo como referência o atlas de Paxinos & Watson (2007).

Figura 4 – Fotomicrografia de alta magnificação (40x) de uma sub-região do NDR processadas pelo método imunoistoquímico para detecção da proteína Fos e TrpOH. Na figura podemos observar células Fos imunopositivas (seta azul), células TrpOH imunopositivas (seta verde) e dupla marcação (neurônios Fos e TrpOH imunopositivos; setas pretas). Barra de escala: 40 μm.

NDR

Conforme mostrado na **tabela 1**, o número total de células TrpOH-IR variou significativamente entre as sub-regiões do NDR [$F(8,144)=186.36$, $p<0.05$], entretanto estes valores não foram diferentes entre os grupos testados no LTE e no labirinto em T fechado [$F(16,144)=0.24$, NS].

A análise estatística do número total de células Fos-IR nas diferentes sub-regiões do NDR mostrou efeito significativo nos fatores tarefa [$F(2,18)=9.75$, $p<0.01$] e região [$F(8,144)=49.90$, $p<0.01$], bem como a interação entre o fator tarefa x sub-região [$F(16,144)=10.66$, $p<0.01$]. A análise *Post-hoc* revelou que a tarefa de fuga promoveu uma intensa indução na expressão da proteína Fos nas asas laterais (**figura 5**, painéis D e G), assim como promoveu um aumento moderado no número de células Fos-IR no DRC, e no DRD do nível médio-caudal (**figura 5**, painéis B e E). Já a tarefa de esquiva promoveu o aumento significativo no número de células Fos-IR no DRC e DRI (**figura 5**, painéis H e I), assim como no DRD no nível médio-caudal (**figura 5**, painel E).

Como mostrado na **figura 7**, o número total de células Fos-IR nas asas laterais apresenta uma tendência em correlacionar-se negativamente com a soma das latências (soma das latências T1 + T2 + T3) de fuga do braço aberto ($r = -0.73$, $p=0.06$). Entretanto, quando considerado somente os neurônios Fos-IR não reativos para TrpOH, esta correlação alcança significância estatística ($r = -0.77$, $p=0.045$).

A análise do número de neurônios Fos/TrpOH-IR nas sub-regiões do NDR também mostrou efeito significativo nos fatores tarefa [$F(2,18)=10.45$, $p<0.01$] e região [$F(8,144)=27.74$, $p<0.01$], bem como a interação entre os fatores tarefa x sub-região [$F(16,144)=13.27$, $p<0.01$]. Entretanto, como observado na **figura 5** (painéis E, H e I) somente o grupo esquiva apresentou um aumento significativo no número

de neurônios duplamente marcados nas sub-regiões DRC, DRI e no DRD no nível médio-caudal.

A **figura 7** mostra que o número de células duplamente marcadas Fos/TrpOH-IR nas sub-regiões DRC ($r = 0.74$, $p = 0.04$), DRD no nível médio-caudal ($r = 0.86$, $p = 0.013$), foram positivamente correlacionadas com a soma das latências ($T1 + T2 + T3$) para os ratos saírem do braço fechado do LTE (grupo esquiava). O mesmo não foi observado no DRI ($r=0,52$, $p= NS$). Por outro lado, o número de células Fos-IR nas asas laterais tende a ser inversamente correlacionadas com a soma das latências para os ratos saírem do braço aberto do LTE (grupo fuga; $r = -0,73$, $p=0,06$). Porém a correlação foi significativa quando consideradas somente as células TrpOH não imunorreativas ($r = -0,77$, $p = 0,04$).

NMR

A **figura 5** mostra que os grupos testados diferenciam significativamente quanto ao número de células Fos-IR [$F(2,20)=5.82$, $p<0.05$], bem como quanto ao número de neurônios Fos/TrpOH-IR [$F(2,20)=5.03$, $p<0.05$] no NMR. A análise *post-hoc* revelou que no grupo esquiava ambos os números de células tiveram um aumento significativo. Foram observadas correlações marginalmente significativas entre a soma das latências de saída do braço fechado do LTE e os números de células Fos-IR ($r = 0.72$, $p = 0.07$), e o número de neurônios Fos/TrpOH-IR ($r = 0.71$, $p = 0.07$), ver figura 7.

SCP

A análise estatística do número de células Fos-IR nas diferentes sub-regiões da SCP mostrou o efeito significativo nos fatores tarefa e região [$F(2,18)=7.24$,

$p < 0.01$ e $F(10,180) = 22.70$, $p < 0.01$, respectivamente]. Entretanto não houve interação entre os fatores tarefa x região [$F(20,180) = 1.68$, NS].

A análise *post-hoc* revelou que no grupo fuga, mas não no grupo esquiva, o número de células Fos-IR foram maiores nas sub-regiões da SCPdm e SCPdl (**figura 6, painéis A, B, E e F**), assim como na sub-região da SCPvl (**figura 6, painel H**).

A figura 7 mostra que existe uma correlação inversa entre o número de células Fos-IR das sub-regiões dorsais da SCP e a soma das latências de saída dos braços abertos (SCPdm rostral: $r = -0.79$, $p = 0.03$; SCPdl rostral: $r = -0.81$, $p = 0.02$; SCPdm médio: $r = -0.80$, $p = 0.032$; SCPdl médio: $r = -0.84$, $p = 0.019$). Uma correlação inversa marginal entre estas duas variáveis foram encontradas na sub-região da SCPvl do nível médio ($r = -0.69$, $p = 0.085$).

Nenhuma diferença entre os três grupos testados foi detectada no número de neurônios Fos/TrpOH-IR contados nas sub-regiões da SCP, onde foi detectada a presença de neurônios TrpOH-IR, ou seja, a SCPvl e SCPI (ver **Tabela 1 e Figura 6**).

Tabela 1 – Média $\pm$ EPM do número total de neurônios TrpOH-IR presentes nas diferentes sub-regiões do NDR, NMR e SCP.

	Nível rostro-caudal (mm from Bregma)	Sub-região	TrpOH-IR / mm ²		
			Controle	Esquiva	Fuga
NDR	-6.84 to -7.08	DRD	112 $\pm$ 5	107 $\pm$ 6	109 $\pm$ 5
	-7.20 to -7.80	DRD	106 $\pm$ 4	110 $\pm$ 4	108 $\pm$ 4
		DRV	189 $\pm$ 6	192 $\pm$ 7	196 $\pm$ 7
		Asas laterais	104 $\pm$ 3	100 $\pm$ 3	105 $\pm$ 5
	-7.92 to -8.28	DRD	86 $\pm$ 4	90 $\pm$ 3	88 $\pm$ 4
		DRV	142 $\pm$ 7	139 $\pm$ 6	138 $\pm$ 5
		Asas laterais	83 $\pm$ 5	81 $\pm$ 5	89 $\pm$ 6
	-8.52 to -9.00	DRC	85 $\pm$ 4	87 $\pm$ 4	89 $\pm$ 4
		DRI	48 $\pm$ 5	51 $\pm$ 4	49 $\pm$ 4
NMR	-7.92 to -8.28		62 $\pm$ 6	59 $\pm$ 8	64 $\pm$ 6
SCP	-6.60 to -6.84	SCPdm	-	-	-
		SCPdl	-	-	-
		SCPI	0.7 $\pm$ 0.4	0.6 $\pm$ 0.3	0.7 $\pm$ 0.3
		SCPvl	14 $\pm$ 0.9	13 $\pm$ 1.2	14 $\pm$ 2
	-7.20 to -7.80	SCPdm	-	-	-
		SCPdl	-	-	-
		SCPI	2.6 $\pm$ 0.3	2.4 $\pm$ 0.3	2.5 $\pm$ 0.4
		SCPvl	20 $\pm$ 1.7	19 $\pm$ 1.5	19 $\pm$ 1.1
	-8.25 to -8.52	SCPdm	-	-	-
		SCPI	1 $\pm$ 0.3	1 $\pm$ 0.4	1.1 $\pm$ 0.4
		SCPvl	11 $\pm$ 1.2	10.5 $\pm$ 1.4	11.5 $\pm$ 1.8

- nenhuma célula detectada.

Figura 5 – Média $\pm$ EPM do número total de células Fos imunorreativas (Fos-IR; barras brancas) e número de neurônios duplamente marcados (Fos/TrpOH-IR; barras preenchidas) quantificadas em diferentes sub-regiões do NDR ou no NMR de animais submetidos ao comportamento de esquiva (ESQ) ou fuga (FUG) no LTE. O grupo controle (CTL) foi submetido ao labirinto em T fechado. * $p < 0.05$, em relação ao número total de células Fos comparado com o grupo controle; + $p < 0.05$ em relação ao número total de células Fos comparado com todos os grupos; # $p < 0.05$ em relação ao número total de duplas-marcações comparado com todos os grupos.

Figura 6 - Média $\pm$ EPM do número total de células Fos imunorreativas (Fos-IR; barras brancas) e número de neurônios duplamente marcados (Fos/TrpOH-IR; barras preenchidas) quantificadas em diferentes sub-regiões da SCP de animais submetidos ao comportamento de esquiva (ESQ) ou fuga (FUG) no LTE. O grupo controle (CTL) foi submetido ao labirinto em T fechado. * $p < 0.05$, em relação ao número total de células Fos comparado com o grupo controle.

Figura 7 – Gráficos de dispersão ilustrando as correlações entre: a soma das latências de fuga e o número de neurônios Fos/TrpOH-IR no DRD (A) e DRC (B); o número de células Fos-IR não serotoninérgicas nas asas laterais (C); e o número total de células Fos-IR na SCPdm (D) e SCPdl (E).

4.2 ETAPA 2 – ANÁLISES COMPORTAMENTAIS

4.2.1 Experimento 2A - Efeitos da injeção de ácido caínico no DRC sobre os comportamentos de esquiva inibitória e de fuga no LTE.

Figura 8 – Diagramas representativos de secção coronal do encéfalo de rato mostrando a localização dos sítios de injeção (círculos) na sub-região DRC (de -8,52 a - 9,00 mm de bregma) de acordo com o atlas de Paxinos & Watson (2007). O número de pontos representados em **A**, **B** e **C** é menor do que o número total de ratos devido a sobreposição dos sítios de injeção. Aq: aqueduto cerebral. 4v: quarto ventrículo.

A **figura 9A** mostra o efeito da administração de ácido caínico 60 pmol no DRC sobre as latências e esquia inibitória no LTE. A análise de variância de medidas repetidas mostrou efeito significativo no fator tratamento [$F(1,14)=10,36$; $p<0,05$]. Além disto, houve efeito no fator tentativa [$F(2,28)=24,92$; $p<0,05$], bem como interação entre os fatores tentativas x tratamento [$F(2,28)=3,52$; $p<0,05$].

A análise *post-hoc* revelou que o tratamento com ácido caínico elevou a latência de saída do braço fechado na esquia 2 em relação ao grupo controle.

Na **figura 9B** pode ser observado o efeito do mesmo tratamento sobre a latência de fuga no LTE. A análise de variância de medidas repetidas mostrou efeito significativo no fator tratamento [$F(1,14)=11,14$; $p<0,05$]. Entretanto, não houve efeito no fator tentativa [$F(2,28)=1,92$; NS], nem interação entre os fatores tentativas x tratamento [$F(2,28)=0,22$; NS].

A análise *post-hoc* revelou que o tratamento com ácido caínico elevou as latências de saída do braço aberto nas fugas 2 e 3 em relação ao grupo controle.

Com pode ser observado na **tabela 3**, o tratamento não alterou a distância percorrida pelos animais no teste do campo aberto [$t(14) = 1,12$; NS].

Figura 9 - Média $\pm$ EPM da latência de saída do braço fechado (esquiva inibitória, painel **A**), e a latência de saída do braço aberto (fuga, painel **B**) de animais submetidos ao LTE após a administração de ácido caínico (60 pmol) no DRC. LB = linha de base, E = esquiva, F = fuga, * $p < 0.05$ em relação ao grupo controle. ($n = 8$).

4.2.2 Experimento 2B - Efeitos da injeção de ácido caínico no DRD sobre os comportamentos de esquiva inibitória e de fuga no LTE.

Figura 10 - Diagramas representativos de secção coronal do encéfalo de rato mostrando a localização dos sítios de injeções (círculos) na sub-região DRD (de -7,32 a - 8,04 mm de bregma) de acordo com o atlas de Paxinos & Watson (2007). Para outras informações ver legenda da figura 8.

A **figura 11A** mostra o efeito da administração de ácido caínico 60 pmol no DRD sobre as latências e esquia inibitória no LTE. A análise de variância de medidas repetidas mostrou efeito significativo no fator tratamento [$F(1,10)=8,77$; $p<0,05$]. Além disto, houve efeito no fator tentativa [$F(2,20)=29,62$; $p<0,05$]. Entretanto, não houve interação entre os fatores tentativas x tratamento [$F(2,20)=2,21$; NS].

A análise *post-hoc* revelou que o tratamento com ácido caínico elevou a latência de saída do braço fechado na esquia 1 em relação ao grupo controle.

Na **figura 11B** pode ser observado o efeito do mesmo tratamento sobre a latência de fuga no LTE. A análise de variância de medidas repetidas mostrou efeito significativo no fator tratamento [$F(1,10)=15,16$; $p<0,05$]. Entretanto, não houve efeito no fator tentativa [$F(2,20)=1,82$; NS], nem interação entre os fatores tentativas x tratamento [$F(2,20)=1,82$; NS].

A análise *post-hoc* revelou que o tratamento com ácido caínico elevou as latências de saída do braço aberto nas fugas 1 e 3 em relação ao grupo controle.

Com pode ser observado na **tabela 3**, o tratamento não alterou a distância percorrida pelos animais no teste do campo aberto [$t(10) = 0,33$; NS].

Figura 11 - Média $\pm$ EPM da latência de saída do braço fechado (esquiva inibitória, painel **A**), e a latência de saída do braço aberto (fuga, painel **B**) de animais submetidos ao LTE após a administração de ácido cañico (60 pmol) no DRD. Em **(C)** efeito sobre a distância total percorrida no teste do campo aberto. LB = linha de base, E = esquiva, F = fuga, * $p < 0.05$ em relação ao grupo controle. (n= 6).

4.2.3 Experimento 2C – Efeitos da injeção de ácido caínico nas asas laterais sobre os comportamentos de esquiva inibitória e de fuga no LTE.

Figura 12 - Diagramas representativos de secção coronal do encéfalo de rato mostrando a localização dos sítios de injeção (círculos) na sub-região das asas laterais do NDR (de -7,32 a - 8,04 mm de bregma) de acordo com o atlas de Paxinos & Watson (2007). Para outras informações ver legenda da figura 8.

Neste experimento com as asas laterais, observamos que 100% dos animais que receberam a maior dose de ácido caínico (60pmol) expressaram uma reação de fuga, que foi vigorosa e desencadeada imediatamente após as injeções. Nestes animais foram observados comportamentos de corrida vigorosa interposta por tentativas de saltos para fora da caixa onde ocorriam as injeções. De imediato, estes animais foram colocados no campo aberto para uma avaliação qualitativa da reação observada (**ver tabela 2**).

Estas reações não foram observadas com as doses mais baixas, desta forma, apenas os dados destes animais foram considerados nas análises estáticas descritas abaixo.

A **figura 13A** mostra a ausência de efeito das administrações de ácido caínico (0,6 ou 6 pmol) nas asas laterais do NDR sobre as latências e esQUIVA inibitória no LTE. A análise de variância de medidas repetidas não mostrou efeito significativo no fator tratamento [$F(2,18)=0,10$; NS]. Foi observado efeito no fator tentativa [$F(2,36)=25,25$; $p<0,05$]. Todavia, não houve interação entre os fatores tentativas x tratamento [$F(4,36)=0,03$; NS].

Na **figura 13B** pode ser observado o efeito do mesmo tratamento sobre a latência de fuga no LTE. A análise de variância de medidas repetidas mostrou efeito significativo no fator tratamento [$F(2,18)=6,83$; $p<0,05$]. Entretanto, não houve efeito no fator tentativa [$F(2,36)=0,49$; NS], nem interação entre os fatores tentativas x tratamento [$F(4,36)=2,04$; NS].

A análise *post-hoc* revelou que o tratamento com ácido caínico na dose de 6 pmol reduziu as latências de saída do braço aberto nas fugas 2 e 3 em relação ao grupo controle.

Com pode ser observado na **tabela 3**, o tratamento não alterou a distância percorrida pelos animais no teste do campo aberto [$F(2,18)=0,04$; NS].

Tabela 2 - Comportamentos desencadeado pela administração do ácido caínico (60 pmol/50nL) nas asas laterais do NDR de ratos expostos ao teste do campo aberto.

TRATAMENTO	Episódios de Fuga	Ocorrência de Saltos
	Percentagem de casos	Percentagem de casos
Controle n=4	0%	0%
Ác. Caínico 60pmol n=6	100%	50%

Figura 13 - Média $\pm$ EPM da latência de saída do braço fechado (esquiva inibitória, painel **A**), e a latência de saída do braço aberto (fuga, painel **B**) de animais submetidos ao LTE após a administração de ácido caínico (0.6 ou 6 pmol) nas asas laterais do NDR. Em (**C**) efeito sobre a distância total percorrida no teste do campo aberto. LB = linha de base, E = esquiva, F = fuga, * $p < 0.05$ em relação ao grupo controle. (n= 7).

Tabela 3 - Média $\pm$ EPM da distância total percorrida no teste do campo aberto por animais submetidos às administrações de ácido caínico no DRC, DRD ou asas laterais.

PROCEDIMENTO	DISTÂNCIA PERCORRIDA (cm)
Experimento 2A (DRC)	
Salina	1629 $\pm$ 210
Ác. Caínico 60pmol	1316 $\pm$ 183
Experimento 2B (DRD)	
Salina	1414 $\pm$ 210
Ác. Caínico 60pmol	1506 $\pm$ 181
Experimento 2C (Asas laterais)	
Salina	1507 $\pm$ 128
Ác. Caínico 0,6pmol	1548 $\pm$ 218
Ác. Caínico 6pmol	1538 $\pm$ 296

4.2.4 Experimento 2D - Efeitos das administrações de ácido caínico nas asas laterais sobre a atividade motora avaliada na arena circular.

A **figura 14A** mostra o efeito das administrações de ácido caínico (30 ou 60pmol) nas asas laterais do NDR sob a distância percorrida em diferentes frações de tempo na arena circular. A análise de variância de medidas repetidas mostrou efeito significativo no fator tratamento [$F(2,15)=6,71$; $p<0,05$]. Foi observado efeito no fator tempo [$F(4,60)=3,71$; $p<0,05$]. Todavia, não houve interação entre os fatores tentativas x tratamento [$F(8,60)=0,78$; NS].

A análise *post-hoc* revelou que o tratamento com ácido caínico na dose de 60 pmol elevou significativamente as distâncias percorridas nos minutos 1, 2, 3 e 4 em relação ao grupo controle.

A **figura 14B** mostra o efeito das administrações de ácido caínico (30 ou 60pmol) nas asas laterais do NDR sob a distância total percorrida na arena circular. A análise de variância de uma via mostrou efeito significativo no fator tratamento [$F(2,15)=6,17$; $p<0,05$].

A análise *post-hoc* revelou que o tratamento com ácido caínico na dose de 60 pmol elevou significativamente a distância total percorrida em relação ao grupo controle.

Figura 14 - Média $\pm$ EPM da distância percorrida no teste da arena circular após a administração de ácido caínico (30 ou 60 pmol) nas asas laterais do NDR. Distância percorrida frações de minutos (**A**); distância total percorrida em 5 minutos (**B**). * $p < 0.05$ em relação ao grupo controle. (n= 6).

4.2.5 Experimento 2E - Efeitos da administração de cloreto de cobalto nas asas laterais sobre os comportamentos de esquiva inibitória e de fuga no LTE.

A **figura 15A** mostra a ausência de efeito das administrações de cloreto de cobalto 1 mM nas asas laterais do NDR sobre as latências e esquiva inibitória no LTE. A análise de variância de medidas repetidas não mostrou efeito significativo no fator tratamento [$F(1,24)=1,16$; NS]. Foi observado efeito no fator tentativa [$F(2,48)=8,80$; $p<0,05$]. Todavia, não houve interação entre os fatores tentativas x tratamento [$F(2,48)=0,82$; NS].

Na **figura 15B** pode ser observado o efeito do mesmo tratamento sobre a latência de fuga no LTE. A análise de variância de medidas repetidas mostrou efeito significativo no fator tratamento [$F(1,24)=9,50$; $p<0,05$]. Entretanto, não houve efeito no fator tentativa [$F(2,48)=0,42$; NS], nem interação entre os fatores tentativas x tratamento [$F(2,48)=0,24$; NS].

A análise *post-hoc* revelou que o tratamento com cloreto de cobalto elevou as latências de saída do braço aberto nas fugas 2 e 3 em relação ao grupo controle.

Com pode ser observado na **tabela 4**, o tratamento não alterou a distância percorrida pelos animais no teste do campo aberto [$t(24)=0,001$, NS].

Figura 15 - Média $\pm$ EPM da latência de saída do braço fechado (esquiva inibitória, painel **A**), e a latência de saída do braço aberto (fuga, painel **B**) de animais submetidos ao LTE após a administração de cloreto de cobalto (1mM) nas asas laterais do NDR. Em **(C)** efeito sobre a distância total percorrida no teste do campo aberto. LB = linha de base, E = esquiva, F = fuga, * $p < 0.05$ em relação ao grupo controle. (n: 13 – 14).

4.2.6 Experimento 2F - Efeitos da administração de bicuculina nas asas laterais do NDR sobre os comportamentos de esquiva inibitória e de fuga no LTE.

A **figura 16A** mostra a ausência de efeito das administrações de bicuculina (0,04; 0,2 ou 1 pmol) nas asas laterais do NDR sobre as latências e esquiva inibitória no LTE. A análise de variância de medidas repetidas não mostrou efeito significativo no fator tratamento [$F(3,26)=0,45$; NS]. Foi observado efeito no fator tentativa [$F(2,52)=23,71$; $p<0,05$]. Todavia, não houve interação entre os fatores tentativas x tratamento [$F(6,52)=0,86$; NS].

Na **figura 16B** pode ser observado o efeito do mesmo tratamento sobre a latência de fuga no LTE. A análise de variância de medidas repetidas mostrou efeito significativo no fator tratamento [$F(3,26)=3,95$; $p<0,05$]. Entretanto, não houve efeito no fator tentativa [$F(2,52)=0,88$; NS], nem interação entre os fatores tentativas x tratamento [$F(6,52)=0,17$; NS].

A análise *post-hoc* revelou que o tratamento com bicuculina na dose de 1pmol reduziu as latências de saída do braço aberto nas fugas 1 e 3 em relação ao grupo controle.

Com pode ser observado na **tabela 4**, o tratamento não alterou a distância percorrida pelos animais no teste do campo aberto [$F(3,26)=0,03$; NS].

Figura 16 - Média $\pm$ EPM da latência de saída do braço fechado (esquiva inibitória, painel **A**), e a latência de saída do braço aberto (fuga, painel **B**) de animais submetidos ao LTE após a administração de bicuculina (4, 200 ou 1000 fmol) nas asas laterais do NDR. Em (**C**) efeito sobre a distância total percorrida no teste do campo aberto. LB = linha de base, E = esquiva, F = fuga, *p<0.05 em relação ao grupo controle. (n: 6 – 9).

4.2.7 Experimento 2G - Efeitos da administração de antalarmina nas asas laterais sobre os comportamentos de esquiva inibitória e de fuga no LTE.

A **figura 17A** mostra o efeito das administrações de antalarmina (125; 250 ou 500 ng) nas asas laterais do NDR sobre as latências e esquiva inibitória no LTE. A análise de variância de medidas repetidas mostrou efeito significativo no fator tratamento [$F(3,33)=5,64$; $p<0,05$]. Foi observado efeito no fator tentativa [$F(2,66)=13,79$; $p<0,05$], bem como interação entre os fatores tentativas x tratamento [$F(6,66)=3,59$; $p<0,05$].

A análise *post-hoc* revelou que a administração de antalarmina nas doses (125; 250 e 500ng) reduziu as latências de saída do braço fechado nas esquivas 1 e 2 em relação ao grupo controle.

Na **figura 17B** pode ser observada a ausência de efeito do mesmo tratamento sobre a latência de fuga no LTE. A análise de variância de medidas repetidas não mostrou efeito significativo no fator tratamento [$F(3,33)=1,55$; NS]. Também não houve efeito no fator tentativa [$F(2,66)=2,50$; NS], nem interação entre os fatores tentativas x tratamento [$F(6,66)=0,84$; NS].

Com pode ser observado na **tabela 4**, o tratamento não alterou a distância percorrida pelos animais no teste do campo aberto [$F(3,33)=0,55$; NS].

Figura 17 - Média $\pm$ EPM da latência de saída do braço fechado (esquiva inibitória, painel **A**), e a latência de saída do braço aberto (fuga, painel **B**) de animais submetidos ao LTE após a administração de antalarmina (125, 250 ou 500 ng) nas asas laterais do NDR. Em (**C**) efeito sobre a distância total percorrida no teste do campo aberto. LB = linha de base, E = esquiva, F = fuga, * $p < 0.05$ em relação ao grupo controle. (n: 8 – 11).

Tabela 4 - Média $\pm$ EPM da distância total percorrida no teste do campo aberto por animais submetidos às administrações nas asas laterais de cloreto de cobalto, bicuculina ou antalarmina.

PROCEDIMENTO	DISTÂNCIA PERCORRIDA (cm)
Experimento 2E	
Salina	1551 $\pm$ 102
Cloreto de Cobalto 1mM	1497 $\pm$ 94
Experimento 2F	
Salina	1410 $\pm$ 94
Bicuculina 0,04pmol	1423 $\pm$ 213
Bicuculina 0,2pmol	1450 $\pm$ 150
Bicuculina 1pmol	1405 $\pm$ 138
Experimento 2G	
Veículo	1573 $\pm$ 223
Antalarmina 125ng	1904 $\pm$ 156
Antalarmina 250ng	1710 $\pm$ 209
Antalarmina 500ng	1842 $\pm$ 162

5. Discussão

O presente trabalho investigou o envolvimento de diferentes sub-regiões do NDR, da SCP e NMR de ratos na mediação das respostas defensivas observadas no modelo do LTE.

Na primeira etapa deste estudo, observamos uma clara diferença no padrão de expressão da proteína Fos em diferentes sub-regiões do NDR, da SCP, assim como no NMR, de animais que expressaram o comportamento de esquiva inibitória ou fuga no LTE.

Como demonstraram nossos resultados, a resposta de esquiva aumenta significativamente o número de células Fos-imunorreativas localizadas ao nível médio-caudal do NDR, mais precisamente, nas sub-regiões DRC, DRI e DRD. Ainda, nessas sub-regiões, expressivas quantidades de marcações da proteína Fos foram encontradas em neurônios TrpOH-imunorreativos, sugerindo o recrutamento de neurônios serotoninérgicos durante este comportamento. Além disto, análises de correlação revelaram que quanto mais expressivo o comportamento de esquiva, maior o número de neurônios serotoninérgicos ativados no DRD e DRC.

Nossos dados revelaram também que a resposta de esquiva, mas não a de fuga, induziu a expressão da proteína Fos por neurônios do NMR, sendo que a maior percentagem destes neurônios eram TrpOH-imunorreativos, sugerindo também o recrutamento de neurônios serotoninérgicos desta estrutura.

O recrutamento de neurônios serotoninérgicos tanto do DRD quanto do DRC pelo comportamento de esquiva está de acordo com evidências da literatura as quais apontam que os neurônios destas sub-regiões são ativados por diferentes situações ou estímulos que promovam o aumento nos níveis de ansiedade. Por exemplo, Abrams e colaboradores (2005) demonstraram que a administração sistêmica de cafeína, do agonista não seletivo de receptores 5-HT_{2C}, o m-clorofenil-

piperazina (mCPP), ou do agonista inverso de receptores benzodiazepínicos, o FG-7142, induzem a expressão da proteína Fos preferencialmente em neurônios TrpOH-imunorreativos localizados nas porções dorsomedial e caudal do NDR. Vale ressaltar também que efeitos semelhantes são observados em animais submetidos ao modelo de derrota social (Gardner et al., 2005), a exposição a choques elétricos inescapáveis nas patas (Grahn et al., 1999), assim como, após a administração intra-cerebroventricular de CRF (Staub et al., 2006).

A observação de que a resposta de esquiva recrutou predominantemente neurônios serotoninérgicos do DRD e DRC corrobora a hipótese de Lowry e colaboradores (2005) a qual sugere que estas sub-regiões são a fonte de projeções serotoninérgicas que innervam estruturas límbicas relacionadas com a gênese/regulação de reações defensivas a ameaças potenciais, como proposto por Deakin & Graeff (1991).

Esta idéia é corroborada por achados neuroanatômicos que apontam que neurônios serotoninérgicos do DRD e DRC apresentam projeções recíprocas para estruturas encefálicas consideradas críticas para a expressão de comportamentos relacionados à ansiedade, como por exemplo, o núcleo basolateral da amígdala, o núcleo leito da estria terminal e o córtex pré-frontal medial (para revisão ver Hale et al., 2012). De acordo com estudo de neurotraçamento realizado por Hale et al. (2008), grande parte das projeções aferentes do NDR para o núcleo basolateral da amígdala partem das sub-regiões DRD, DRV e DRC, sendo que expressivas quantidades destas projeções (aproximadamente 80%) são serotoninérgicas. Ainda, embora a quantidade de projeções serotoninérgicas para o núcleo basolateral da amígdala oriundos do DRI serem relativamente baixas (Hale et al., 2008), esta sub-região está conectada com outras importantes áreas que modulam a ansiedade,

como por exemplo, o córtex pré-frontal, o hipotálamo e hipocampo (Azmitia 1981; Lowry et al., 2009). Além disso, estudos de neurotraçamento mostram que o DRI também se conecta com o NMR (Phillipson, 1979).

Motivados por nossos achados imunoistoquímicos, na segunda etapa deste trabalho, investigamos se a estimulação química do DRD ou DRC facilitariam a aquisição da esquiva inibitória no LTE.

Como demonstrado por nossos resultados, as administrações de ácido caínico tanto no DRD quanto no DRC facilitaram a aquisição da esquiva inibitória, mas também prejudicaram a expressão da resposta de fuga no LTE, resultados preditivos de ação ansiogênica e panicolítica, respectivamente.

Embora estes tratamentos tenham causado o aumento nas latências de saída tanto do braço fechado bem como do braço aberto do LTE, estes resultados não parecem ser resultantes de uma interferência inespecífica com a atividade locomotora dos animais. Assim, observa-se que nenhum dos tratamentos modificou a primeira latência de saída do braço fechado, conhecida como linha da base, nem a distância percorrida no teste do campo aberto, que foi realizado imediatamente após o LTE.

O efeito ansiogênico produzido pela administração de ácido caínico no DRC e DRD está em consonância com nossos resultados imunoistoquímicos, e reforçam a proposta de Lowry et al (2005), segundo a qual neurônios serotonérgicos localizados ao nível médio e caudal do NDR, mais precisamente, no DRD e DRC sejam a fonte de projeções serotonérgicas que inervam estruturas límbicas relacionadas com a gênese/regulação de reações defensivas a ameaças potenciais, como proposto por Deakin & Graeff (1991).

Os resultados por nós obtidos com a resposta de esquiva são compatíveis com a idéia de que a facilitação da neurotransmissão mediada pela 5-HT no núcleo basolateral da amígdala possa estar envolvida no efeito ansiogênico causada pela administração intra-DRD de ácido caínico. Neste sentido, Viana e Colaboradores (1997) mostraram que a injeção da mesma dose de ácido caínico usada neste trabalho, porém em um volume maior (200nL), no nível médio do NDR (mais precisamente na área de intersecção do DRD com o DRV) aumenta os níveis extracelulares de 5-HT no núcleo basolateral da amígdala. No mesmo sentido, resultados prévios de nosso laboratório mostraram que a facilitação da neurotransmissão serotoninérgica mediada pelos receptores 5-HT_{2C} neste núcleo facilita a aquisição da esquiva inibitória no LTE, um efeito ansiogênico (Vicente & Zangrossi, 2011). Vale ressaltar ainda que, a administração de 5-HT diretamente na amígdala basolateral promove efeito ansiogênico no LTE, sem interferir no comportamento de fuga (Vicente & Zangrossi, 2011).

Por sua vez, o efeito do tipo panicolítico produzido pela administração de ácido caínico tanto no DRC, quanto no DRD se contrapõem a proposta de Johnson et al (2004), a qual sugere que o trato periventricular abordado pela teoria de Deakin & Graeff (1991) seria formado basicamente por neurônios serotoninérgicos das asas laterais do NDR e da SCPvl. Nossos resultados sugerem que tanto DRD quanto o DRC possam também dar origem a neurônios serotoninérgicos que formam o trato periventricular.

Evidências da literatura dão suporte a esta proposta. Assim, tanto o DRD, quanto o DRC, enviam projeções serotoninérgicas para a SCPD (Beitz, 1982; Stezhka & Lovick 1994; 1997). Em relação ao DRD, Viana e colaboradores (1997) mostraram que a administração de ácido caínico (60pmol/200nL) na área de intersecção deste

núcleo com o DRV, além de aumentar os níveis extracelulares de 5-HT no núcleo basolateral da amígdala, como já mencionado, também o faz na SCPD. Vale ressaltar ainda que Pobbe & Zangrossi (2005) relataram que a administração de ácido caínico (60 pmol/200 nL), na mesma área do NDR estudada por Viana e colaboradores (1997), causa tanto efeito ansiogênico como panicolítico no LTE. Os autores mostraram ainda que este efeito panicolítico é bloqueado pela administração prévia intra-SCPD tanto do antagonista preferencial de receptores 5-HT_{1A}, WAY-100635, quanto do antagonista preferencial de receptores 5-HT₂, quetanserina (Pobbe & Zangrossi, 2005).

No conjunto, os resultados mostrados até aqui corroboram com a proposta da heterogeneidade funcional das sub-regiões do NDR. Mais especificamente, enquanto o comportamento de esquiva recruta neurônios serotoninérgicos do DRD e DRC, estas sub-regiões parecem conter também neurônios serotoninérgicos implicados na inibição do comportamento de fuga.

O padrão imunoistoquímico encontrado pelo presente trabalho no NMR está em conformidade com os achados de Silveira e colaboradores (2001), que mostraram que a esquiva inibitória no LTE aumenta a expressão da proteína Fos em células desta região. Por outro lado, contrastando com nossos resultados, De Andrade e colaboradores (2012) reportaram que a expressão da resposta de esquiva no LTE não altera o número de células Fos-imunorreativas nesta mesma área mesencefálica. Embora as causas deste resultado dissonante sejam desconhecidas, esta divergência poderia ser explicada por possíveis diferenças no plano em que a contagem de células foi realizada nesta estrutura. Neste sentido, Spiga et al. (2006) mostraram diferenças na expressão da proteína Fos ao longo do eixo rostro-caudal do NMR em decorrência da apresentação de um estímulo

ansio gênico, a injeção de urocortina 1 no núcleo basolateral da amígdala. Cabe ressaltar que no trabalho de De Andrade et al. (2012) não há alusão a posição do eixo rostro-caudal em que as análises no NMR foram realizadas.

Nossos achados mostrando o recrutamento de neurônios serotonérgicos do NMR pela resposta de esquiva somam a outras evidências que indicam o envolvimento destes neurônios na modulação da ansiedade. Trabalhos neuroanatômicos apontam o NMR como sendo a principal fonte de inervação serotonérgica para o hipocampo dorsal (Moore & Halaris, 1975), estrutura envolvida na modulação da ansiedade. Tem sido mostrado que a estimulação química do NMR promove tanto aumento nos níveis extracelulares de 5-HT no hipocampo dorsal (Tao, et al., 1997), quanto a facilitação da aquisição da esquiva inibitória no LTE (Dos Santos, et al., 2005). Ainda, o efeito ansiogênico observado no LTE decorrente da estimulação de neurônios 5-HT do NMR, através da injeção local do antagonista preferencial de receptores 5-HT_{1A}, WAY-100635, é bloqueado pela administração prévia desta mesma droga no hipocampo dorsal (Dos Santos, et al., 2008).

Em relação à resposta de fuga, observamos que este comportamento aumentou significativamente a expressão da proteína Fos em neurônios não-serotonérgicos nas asas laterais do NDR e moderadamente no DRD. Além disto, foi observada uma correlação inversa entre o número de células Fos-imunorreativas não-serotonérgicas nas asas laterais, mas não no DRD, com o tempo de fuga. Assim, quanto maior o número de células ativadas nas asas laterais, mais eficiente foi a resposta de fuga no LTE.

A expressão da fuga também aumentou o número de células Fos-imunorreativas na SCP, mais especificamente, nas sub-regiões SCPdm, SCPdl e

SCPvl. Semelhante ao observado nas asas laterais do NDR, foi evidenciada uma correlação inversa entre o tempo de fuga e a quantidade de células Fos-imunorreativas tanto na SCPdm, quanto na SCPdl.

O recrutamento da SCPD pela fuga está de acordo com os resultados prévios obtidos por Silveira et al. (2001) no LTE, porém em animais que não foram pré-expostos a um dos braços abertos antes do teste. Tem sido demonstrado que o procedimento de pré-exposição reduz a latência de fuga do braço aberto, um efeito atribuído a habituação de reações comportamentais a novidade (Teixeira, 2000). Como em nosso estudo, De Andrade e colaboradores (2012) também observaram que a resposta de fuga, realizada por animais expostos previamente ao braço aberto do LTE, aumenta significativamente a expressão da proteína Fos na SCPdl. No estudo de De Andrade e colaboradores (2012), esta mesma tarefa defensiva tende a fazer o mesmo na SCPdm.

Em relação à SCPvl, nossos dados confirmam os achados de Jacobs et al. (1984) que apontaram a existência de um número moderado de neurônios TrpOH-imunorreativos nesta região. Além disso, nossos dados demonstram que estes neurônios serotoninérgicos não são recrutados pela resposta de fuga. Por outro lado, nossos resultados contrastam com as evidências da literatura, as quais mostram que a expressão da resposta de fuga no LTE não alteram o número de células Fos-imunorreativas na SCPvl (Silveira et al., 2001; De Andrade et al., 2012). Neste sentido, é interessante observar que em nosso estudo, o número de células Fos-imunorreativas na SCPvl foi maior somente ao nível médio desta estrutura, uma área em contato direto com as asas laterais do NDR. Nos estudos de Silveira et al. (2001) e De Andrade et al. (2012) não há alusão a posição do eixo rostro-caudal em que as análises na SCPvl foram realizadas.

A observação de que a resposta de fuga recrutou neurônios não-serotonérgicos das asas laterais do NDR vai de encontro com os resultados obtidos por Roche e colaboradores (2003) em ratos que foram colocados a nadar em um tanque com água, situação que evoca a expressão de comportamentos ativos de defesa semelhantes à fuga. Estes pesquisadores observaram que esta sessão de nado forçado promove um aumento significativo na expressão da proteína Fos por neurônios GABAérgicos, mas não serotonérgicos, localizados nas asas laterais do NDR.

Corroborando o envolvimento das asas laterais do NDR na regulação da resposta de fuga, os resultados da segunda etapa deste trabalho mostraram que a administração de ácido caínico nesta região facilita a expressão deste comportamento de fuga, sem interferir com a aquisição da esquiva inibitória, resultados preditivos de efeito panicogênico. Ainda, a administração de ácido caínico em doses mais elevadas evocou uma reação de fuga imediata e vigorosa que foi evidenciada por marcante aumento na distância percorrida em uma arena circular. Vale ressaltar que, apesar de não terem sido mensuradas, os episódios de fuga na arena circular foram acompanhados de significativas alterações comportamentais e autonômicas nos animais, como por exemplo, hiperventilação, piloereção e arqueamento do dorso.

Ao contrário do observado com a injeção de ácido caínico, a administração nas asas laterais do NDR de um inibidor da transmissão sináptica, o cloreto de cobalto, prejudicou a expressão da fuga no LTE, indicando um efeito do tipo panicolítico, sem alterar o comportamento de esquiva inibitória.

Motivados por estes resultados indicativos da participação de neurônios não-serotonérgicos das asas laterais do NDR na expressão do comportamento de fuga,

procuramos investigar o possível envolvimento das neurotransmissões mediadas por GABA e CRF no controle desta resposta.

Evidências da literatura mostram que as asas laterais do NDR são ricas em corpos celulares de neurônios GABAérgicos (Allers & Sharp, 2003; Commons et al., 2003; Day et al., 2004; Calizo et al., 2011; Shikanai et al., 2012) e são densamente inervadas por fibras imunorreativas para o CRF (Valentino et al., 2001; Roche, et al., 2003). Conforme supracitado, Roche e colaboradores (2003) observaram que ratos submetidos ao nado forçado apresentam um aumento significativo na expressão da proteína Fos por neurônios GABAérgicos, mas não serotonérgicos, localizados nas asas laterais do NDR. Segundo os autores, a atividade destes neurônios GABAérgicos parece ser controlada pelo CRF, através de receptores de CRF do tipo 1. Mais especificamente, Roche e colaboradores (2003) observaram que estes receptores de CRF₁ estão localizados nos neurônios GABAérgicos que são ativados pelo estímulo estressor. Os autores mostraram ainda que a administração sistêmica do antagonista de receptores CRF₁, a antalarmina, antes da sessão de nado forçado, previne o aumento da expressão da proteína Fos nestes neurônios GABAérgicos. Com base nas evidências de que a exposição aguda de ratos ao estresse do nado forçado reduz os níveis extracelulares de 5-HT em regiões prosencefálicas (Kirby et al. 1995; Kirby & Lucki, 1997), os autores sugerem que a exposição a este estressor aumenta a liberação de CRF nas asas laterais do NDR, o que ocasiona a ativação de interneurônios GABAérgicos ali presentes. Como consequência, o GABA liberado localmente induziria a inibição dos neurônios serotonérgicos desta região, reduzindo a liberação de serotonina em estruturas encefálicas inervadas pelas asas laterais, resultando nos efeitos comportamentais observados. Esta proposição é compatível com evidências que mostram que a

neurotransmissão mediada por GABA exerce um controle inibitório tônico sobre neurônios serotoninérgicos do NDR (Gallager & Aghajanian, 1976).

Com base nesta proposta de Roche e colaboradores (2003), verificamos se uma facilitação na neurotransmissão mediada por receptores GABA_A ou CRF₁ nas asas laterais do NDR estaria relacionada com a resposta de fuga no LTE. Neste caso, a hipótese testada foi a de que na resposta de fuga, neurônios GABAérgicos das asas laterais seriam recrutados via ativação de receptores CRF₁. Em decorrência, haveria uma inibição da atividade de neurônios serotoninérgicos ali presentes, o que poderia ocasionar uma diminuição na liberação de 5-HT em áreas como a SCPD. Como supracitado, a facilitação da neurotransmissão serotoninérgica na SCPD inibe a expressão da resposta de fuga (Pobbe & Zangrossi, 2005). Efeito oposto é obtido com a inibição desta neurotransmissão (Sena et al., 2003; Miguel et al., 2010).

Nossos resultados mostraram que a administração local de bicuculina causa um efeito oposto ao esperado pela proposição de Roche e colaboradores (2003), ou seja, facilita a expressão do comportamento de fuga no LTE. Também em discordância com a proposição de Roche e colaboradores (2003), nossos resultados mostraram que a injeção intra-asas laterais de antalarmina não alterou a expressão da fuga, mas prejudicou a aquisição da esquiva inibitória, resultados preditivos de ação ansiolítica.

Estes resultados sugerem que, embora as asas laterais do NDR estejam criticamente envolvidas com a expressão da resposta de fuga, esta sub-região também está envolvida com a modulação da ansiedade. Assim, o padrão de resposta evocada parece ser dependente da população neuronal recrutada.

Em conjunto nossos resultados corroboram a hipótese de que diferentes sub-regiões do NDR estão envolvidas na expressão dos comportamentos de esquiva inibitória e fuga evocados no LTE. Enquanto neurônios serotoninérgicos das sub-regiões DRD, DRC e DRI participam da facilitação do comportamento de esquiva, neurônios não serotoninérgicos das asas laterais do NDR estariam envolvidos na expressão da fuga. Por outro lado, contrariando a hipótese de Lowry e colaboradores (2005), nossos resultados sugerem que os tratos prosencefálico e periventricular citados por Deakin e Graeff (1991) possam originar-se das mesmas sub-regiões do NDR.

5.1 Considerações Técnicas

Em relação aos ensaios imunoistoquímicos, é importante ressaltarmos que a interpretação dos resultados baseia-se na premissa de que a ativação neuronal induz a expressão da proteína Fos (Dragunow and Faull, 1989). Apesar desta técnica ser amplamente utilizada para o mapeamento funcional de grandes áreas do sistema nervoso central, com resolução a nível celular (de Oliveira et al. 2000; Silveira et al., 2001; Roche et al., 2003; Barth, 2007; Bonassoli et al. 2011; Sperling and Commons, 2011; Silva et al. 2012), a ausência de alterações da expressão desta proteína em determinadas sub-regiões não exclui a ocorrência da ativação dos neurônios ali presentes com diferentes consequências transcricionais. Além disto, uma mudança na expressão da proteína Fos não indica necessariamente uma alteração nas propriedades eletrofisiológicas dos neurônios (Hoffman et al., 1993; Luckman et al., 1994; Kovács, 2008).

É importante ressaltar que os neurônios do NDR, NMR e SCP não estão envolvidos exclusivamente na regulação de comportamentos defensivos, mas também participam de diversos processos fisiológicos, tais como, regulação da temperatura corporal, modulação da dor, controle da atividade locomotora e funções cardiovasculares (Rossi et al., 1994; Behbehani, 1995; Jacobs & Fornal, 1993; 2010; Hale et al., 2012). Desta forma, as alterações na expressão da proteína Fos observadas no presente trabalho, podem ser decorrentes de variações nestes processos fisiológicos ocorridos em paralelo às alterações comportamentais observadas pela exposição ao LTE.

Devemos mencionar ainda que, no estudo de imunoistoquímica, os animais do grupo esquiva permaneceram mais tempo no LTE que os outros dois grupos testados. Assim, seria possível argumentar que algumas das alterações na expressão da proteína Fos observadas no NDR, NMR e SCP foram resultantes desta diferença. Entretanto, isto parece ser improvável, uma vez que análises de correlação (dados não mostrados) não mostraram que no grupo fuga quanto maior a latência de saída do braço aberto, maior o número de neurônios serotoninérgicos ativados no DRD, DRC e DRI, ou seja, resultado que se equivaleria encontrado no grupo esquiva. Neste mesmo sentido, análises de correlação também não mostraram que no grupo esquiva, quanto menor a latência de saída do braço fechado, maior o número de células não-serotoninérgicas recrutadas nas asas laterais, resultado este observado no grupo fuga.

Conclusões

Os resultados do presente trabalho indicam que:

- Distintas populações neuronais do NDR, do NMR, bem como da SCP são diferentemente recrutadas pelos comportamentos de esquiva inibitória e fuga evocados no LTE. Além disto, o padrão de resposta apresentado parece ser dependente da população neuronal recrutada. Enquanto neurônios serotoninérgicos localizados no nível médio e caudal do NDR, mais precisamente das sub-regiões DRD, DRC e DRI, bem como do NMR, estão envolvidos com a aquisição do comportamento de esquiva inibitória, neurônios não serotoninérgicos das asas laterais do NDR/SCPvl, da SCPdm e da SCPdl participam da expressão da fuga.
- Tanto o trato prosencefálico quanto o trato periventricular abordados pela teoria de Deakin & Graeff (1991) podem ser originários de neurônios serotoninérgicos presentes no DRD e DRC. Projeções serotoninérgicas oriundas do DRI também podem compor o trato prosencefálico.
- Embora as asas laterais do NDR estejam marcadamente envolvidas com a expressão/regulação da resposta de fuga, populações neuronais específicas dessa região também estão envolvidas na modulação do comportamento de esquiva inibitória.

Referências Bibliográficas

- 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.
- 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.
- Adams, D. B. (1979). Brain mechanisms for offense, defense and submission. *The Behavioral and Brain Sciences*, 2: 201 – 241.
- Adams, D. B. (2006). Brain mechanisms of aggressive behavior: an updated review. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 30(3): 304-318.
- Allers, K. A., Sharp, T. (2003). Neurochemical and anatomical identification of fast- and slow-firing neurones in the rat dorsal raphe nucleus using juxtacellular labelling methods in vivo. *Neuroscience*, 122(1): 193-204.
- American Psychiatry Association. (2000). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*. 4^a ed. Washington DC: APA Press.
- Andrade, R., Barnes, N. M., Baxter, G., Bockaert, J. Branchek, T., Cohen, M. L., et al. (2012). 5-hydroxytryptamine receptors. IUPHAR database. Acessado em: 29/08/2012, em: <http://www.iuphar-db.org/DATABASE/FamilyMenuForward?familyId=1>.
- Andrade, T. G., Macedo, C. E., Zangrossi, H. Jr., Graeff, F. G. (2004). Anxiolytic-like effects of median raphe nucleus lesion in the elevated T-maze. *Behavioural Brain Research*, 153(1):55-60.
- Audi, E. A., de Aguiar, J. C., Graeff, F. G. (1988). Mediation by serotonin of the antiaversive effect of zimelidine and propranolol injected into the dorsal midbrain central grey. *Journal of Psychopharmacology*, 2(1): 26-32.
- Azmitia, E. C., Segal, I. M. (1978). An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 179(3): 641-667.
- Azmitia, E. C. (1981). Bilateral serotonergic projections to the dorsal hippocampus of the rat: simultaneous localization of 3H-5HT and HRP after retrograde transport. *The Journal of Comparative Neurology*, 203(4): 737-43.
- Baldwin, D. S., Anderson, I. M., Nutt, D. J., Bandelow, B., Bond, A., Davidson, J. R., 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. (2011a). 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. (2011b). Efficacy of drug treatments for generalised anxiety disorder: systematic review and meta-analysis. *British Medical Association*, 342: 1-11.
- Bandelow, B., Sher, L., Bunevicius, R., Hollander, E., Kasper, S., Zohar, J., et al. (2012). Guidelines for the pharmacological treatment of anxiety disorders, obsessive-compulsive disorder and posttraumatic stress disorder in primary care. *International Journal of Psychiatry in Clinical Practice*, 16(2): 77-84.
- Bandler, R., DePaulis, A. (1991) *The midbrain periaqueductal gray matter: functional, anatomical and neurochemical organization*. New York: Plenum Press.
- Bandler, R., Shipley, M. T. (1994). Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression?. *Trends in Neurosciences*, 17(9): 379-389.
- Bardin, L. (2011). The complex role of serotonin and 5-HT receptors in chronic pain. *Behavioural Pharmacology*, 22(5-6): 390-404.
- Barlow, D. H. (1988). *Anxiety and its disorders*. New York: The Guilford Press.
- Barth, A. L. (2007). Visualizing circuits and systems using transgenic reporters of neural activity. *Current Opinion in Neurobiology*, 17(5): 567-771.
- Behbehani, M. M. (1995). Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. *Progress in Neurobiology*, 46: 575-605.
- Beitz, A. J. (1982). The organization of afferent projections to the midbrain periaqueductal gray of the rat. *Neuroscience*, 7(1): 133-159.
- Blanchard, R. J., Flannelly, K. J., Blanchard, D. C. (1986). Defensive behavior of laboratory and wild rattus norvegicus. *Journal of Comparative Psychology*, 100: 101-107.
- Blanchard, D. C., Blanchard, R. J. (1988). Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annual Review of Psychology*, 39: 43-68.
- Blanchard, D. C., Griebel, G., Blanchard, R. J. (2003). Conditioning and residual emotionality effects of predator stimuli: some reflections on stress and emotion. *Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 27: 1177-1185.
- Blanchard, R. J., Yudko, E. B., Rodgers, R. J., Blanchard, D.C. (1993). Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. *Behavioural Brain Research*, 58(1-2): 155-165.
- 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: 123-136.
- Blanchard, D. C., Griebel, G., Blanchard, R. J. (2001). Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 25(3): 205-218.

- Blanchard, D. C., Blanchard, R. J. (2008). Defensive behaviors, fear and anxiety. In: Blanchard, R. J., Blanchard, D. C., Griebel, G., Nutt, D. J. *Handbook of anxiety and fear*. Elsevier Science Publishers.
- Bonassoli, V. T., Milani, H., de Oliveira, R. M. (2011). Ethanol withdrawal activates nitric oxide-producing neurons in anxiety-related brain areas. *Alcohol*, 45(7): 641-652.
- 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. (1981). *Modo de ação dos agentes ansiolíticos e mediação química na matéria cinzenta periaquedutal*. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- Brandão, M. L. (2001). *Psicofisiologia: as bases fisiológicas do comportamento*. 2ª Ed., São Paulo: Atheneu.
- Buhot, M. C. (1997). Serotonin receptors in cognitive behaviors. *Current Opinion in Neurobiology*, 7(2):243-54.
- 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.
- Chaudhuri, A. (1997). Neural activity mapping with inducible transcription factors. *Neuroreport*, 8(16): V-IX.
- Clark, C. T., Weissbach, H., Udenfriend, S. (1954). 5-Hydroxytryptophan decarboxylase: preparation and properties. *The Journal of Biological Chemistry*, 210: 139-48.
- Commons, K. G., Connolly, K. R., Valentino, R. J. (2003). A neurochemically distinct dorsal raphe-limbic circuit with a potential role in affective disorders. *Neuropsychopharmacology*, 28(2): 206-215.
- Commons, K. G. (2009). Locally collateralizing glutamate neurons in the dorsal raphe nucleus responsive to substance P contain vesicular glutamate transporter 3 (VGLUT3). *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 38(4): 273-281.
- Dahlström, A., Fuxe, K. (1964). Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia*, 20(7):398-999.
- Day, H. E., Greenwood, B. N., Hammack, S. E., Watkins, L. R., Fleshner, M., Maier, S. F., Campeau, S. (2004). Differential expression of 5HT-1A, alpha 1b adrenergic, CRF-R1, and CRF-R2 receptor mRNA in serotonergic, gamma-aminobutyric acidergic, and catecholaminergic cells of the rat dorsal raphe nucleus. *Journal of Comparative Neurology*, 474: 364–378.

- De Andrade, J. S., Abrão, R. O., Céspedes, I.C., Garcia, M. C., Nascimento, J. O., Spadari-Bratfisch, R. C., et al. (2012). Acute restraint differently alters defensive responses and fos immunoreactivity in the rat brain. *Behavioural Brain Research*, 232(1): 20-29.
- De Bortoli, V. C., Nogueira, R.L., Zangrossi, H. Jr. (2006). Effects of fluoxetine and buspirone on the panicolytic-like response induced by the activation of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in the rat dorsal periaqueductal gray. *Psychopharmacology*, 183(4): 422-8.
- De Oliveira Sergio, T., de Bortoli, V. C., Zangrossi, H. Jr. (2011). Serotonin-2A receptor regulation of panic-like behavior in the rat dorsal periaqueductal gray matter: the role of GABA. *Psychopharmacology*, 218(4): 725-732.
- De Oliveira, R. W., Del Bel, E. A., Guimarães, F.S. (2000). Behavioral and c-fos expression changes induced by nitric oxide donors microinjected into the dorsal periaqueductal gray. *Brain Research Bulletin*, 51(6): 457-464.
- Dos Santos L, de Andrade TG, Zangrossi H Jr. (2005) Serotonergic neurons in the median raphe nucleus regulate inhibitory avoidance but not escape behavior in the rat elevated T-maze test of anxiety. *Psychopharmacology*, 179(4): 733-741.
- Dos Santos, L., de Andrade, T. G., Zangrossi Junior, H. (2008). 5-HT_{1A} receptors in the dorsal hippocampus mediate the anxiogenic effect induced by the stimulation of 5-HT neurons in the median raphe nucleus. *European Neuropsychopharmacology*, 18(4):286-294.
- Deakin, J. W. F., Graeff, F. G. (1991). 5-HT and mechanisms of defense. *Journal of Psychopharmacology*, 5: 305-315.
- 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.
- Falter, U., Gower, A. J., Gobert, J. (1992). Resistance of baseline activity in the elevated plus-maze to exogenous influences. *Behavioural Pharmacology*, 3(2): 123-128.
- 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: 251-265.
- Fornal, C. A., Metzler, C. W., Marrosu, F., Ribiero-do-Valle, L. E., Jacobs, B. L. (1996). A subgroup of dorsal raphe serotonergic neurons in the cat is strongly activated during oral-buccal movements. *Brain Research*, 716: 123-133.
- Frazer, A., Hensler, J. G. (1999). Serotonin. In: Siegel, G. J., Agranoff, B. W., Albers, R. W., et al. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven.
- Freud, S. (1985). On the right to separate from neurasthenia a definite symptom-complex as "anxiety neurosis". In: Freud, S. (1912). *Selected papers on hysteria*

- and other psychoneuroses* (A. A. Brill, trad). New York: The Journal of Nervous and Mental Disease Publishing Company.
- Gallager, D. W., Aghajanian, G. K. (1976). Effect of antipsychotic drugs on the firing of dorsal raphe cells. II. Reversal by picrotoxin. *European Journal of Pharmacology*, 39(2): 357-364.
- Garattini, S., Bizzi, A., Caccia, S., Mennini, T., Samanin, R. (1988). Progress in assessing the role of serotonin in the control of food intake. *Clinical Neuropharmacology*, 1: 8-32.
- Gardner, K. L., Thrivikraman, K. V., Lightman, S. L., Plotsky, P. M., Lowry, C. A. (2005). Early life experience alters behavior during social defeat: focus on serotonergic systems. *Neuroscience*, 136(1): 181-191.
- Geller, I., Seifter, J. (1960). The effects of meprobamate, barbiturates, d-anphetamine and promazine on experimentally induced conflict in the rat. *Psychopharmacology*, 1: 482-492.
- 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.
- 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. (1981). Minor tranquilizers and brain defense systems. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 14:239-265.
- 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. (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., Guimarães, F. S., De Andrade, T. G., Deakin, J. F. (1996a). Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 54(1): 129-141.
- Graeff, F. G., Viana, M. B., Mora, P. O. (1996b). Opposed regulation by dorsal raphe nucleus 5-HT pathways of two types of fear in the elevated T-maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 53(1): 171-177.
- Graeff, F. G., Viana, M. B., Mora, P. O. (1997). Dual role of 5-HT in defense and anxiety. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 21(6): 791-799.
- 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. (1999). Ansiedade. In: Graeff, F. G., Brandão, M. L. *Neurobiologia das doenças mentais*. 5ª Ed., São Paulo: Lemos.
- Graeff, F.G. (2002). On serotonin and experimental anxiety. *Psychopharmacology*, 163: 467-476.
- Graeff, F. G., Zangrossi, Jr. H. (2002). Animal models of anxiety disorders. In: D'haenen H, Den Boer JA, Willner P. *Biological Psychiatry*. John Wiley Sons: Londres, pp 879-893.
- Graeff, F.G. (2004). Serotonin, the periaqueductal gray and panic. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 28: 239-259.
- 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*. 2ª ed. Oxford: Oxford University Press.
- Griez, E. J., Lousberg, H., Van Den Hout, M. A., Van Der Molen, G. M. (1987). CO2 vulnerability in panic disorder. *Psychiatry Research*, 20(2): 87-95.
- Hagen, P. B., Cohen, L. H., (1966) Biosynthesis of indolealkylamines. Physiological release and transport of 5-hydroxytryptamine. In: Eichler O, Farah A (eds). *Handbook of Experimental Pharmacology*. Heidelberg: Springer Verlag Berlin.
- 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.
- Hale, M. W., Stamper, C. E., Staub, D. R., Lowry, C. A. (2010). Urocortin 2 increases c-Fos expression in serotonergic neurons projecting to the ventricular/periventricular system. *Experimental Neurology*, 224(1): 271-281.
- Hale, M. W., Dady, K. F., Evans, A. K., Lowry, C. A. (2011). Evidence for in vivo thermosensitivity of serotonergic neurons in the rat dorsal raphe nucleus and raphe pallidus nucleus implicated in thermoregulatory cooling. *Experimental Neurology*, 227(2): 264-78.
- Hale, M. W., Shekhar, A., Lowry, C. A. (2012) Stress-related serotonergic systems: implications for symptomatology of anxiety and affective disorders. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 32(5): 695-708.

- Herman, J. P., Cullinan, W. E. (1997). Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary- adrenocortical axis. *Trends in Neuroscience*, 20: 78–84.
- 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.
- Hoffman, G. E., Smith, M. S., Verbalis, J. G. (1993). c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 14(3): 173-213.
- 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.
- Jacobs, B. L., Gannon, P. J., Azmitia, E. C. (1984). Atlas of serotonergic cell bodies in the cat brainstem: an immunocytochemical analysis. *Brain Research Bulletin*, 13: 1-31.
- Jacobs, B. L., Azmitia, E. C. (1992). Structure and function of the brain serotonin system. *Physiological Reviews*, 72(1): 165-229.
- Jacobs, B. L., Fornal, C. A. (1993). 5-HT and motor control: A hypothesis. *Trends in Neurosciences* 16: 346-352.
- Jacobs, B. L., Fornal, C. A. (1999). Activity of serotonergic neurons in behaving animals. *Neuropsychopharmacology*, 21(2): 9-15.
- Jacobs, B. L., Fornal, C. A. (2010). Activity of brain serotonergic neurons in relation to physiology and behavior. In: Müller, C. P., Jacobs, B. L. *Handbook of the behavioral neurobiology of serotonin*, pp 153-162. San Diego: Elsevier.
- 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, 181-191.
- Joh, T. H., Shikimi, T., Pickel, V. M., Reis, D. J. (1975). Brain tryptophan hydroxylase: purification of, production of antibodies to, and cellular and ultrastructural localization in serotonergic neurons of rat midbrain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72(9): 3575-3579.
- Johnson, P. L., Lightman, S. L., Lowry, C. A. (2004). A functional subset of serotonergic neurons in the rat ventrolateral periaqueductal gray implicated in the inhibition of sympathoexcitation and panic. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1018: 58-64.
- 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. L., Shekhar, A. (2006). Panic-prone state induced in rats with GABA dysfunction in the dorsomedial hypothalamus is mediated by NMDA receptors. *The Journal of Neuroscience*, 26(26): 7093-7104.
- 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.
- Kahn, R. J., McNair, D. M., Lipman, R. S., Covi, L., Rickels, K., Downing, R., Fisher, S., Frankenthaler, L. M. (1986). Imipramine and clordiazepoxide in depressive and anxiety disorders. II. Efficacy in anxious outpatients. *Archives General Psychiatry*, 43: 79-85.
- Kirby, L. G., Allen, A. R., Lucki, I. (1995). Regional differences in the effects of forced swimming on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid. *Brain Research*, 682(1-2): 189-196.
- Kirby, L. G., Lucki, I. (1997). Interaction between the forced swimming test and fluoxetine treatment on extracellular 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid in the rat. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 282(2): 967-976.
- Kirby, L. G., Zeeb, F. D., Winstanley, C. A. (2011). Contributions of serotonin in addiction vulnerability. *Neuropharmacology*, 61(3): 421-432.
- 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.
- Kovács, K. J. (1998). c-Fos as a transcription factor: a stressful review from a functional map. *Neurochemistry International*, 33(4): 287-297.
- Kovács, K. J. (2008). Measurement of immediate-early gene activation- c-fos and beyond. *Journal of Neuroendocrinology*, 20(6): 665-672.
- Kroeze, W. K., Roth, B. L. (1998). The molecular biology of serotonin receptors: therapeutic implications for the interface of mood and psychosis. *Biological Psychiatry*, 44(11): 1128-42.
- Liebowitz, M. R., Gorman, J. M., Fyer, A. J., Levitt, M., Dillon, D., Levy, G., et al. (1985). Lactate provocation of panic attacks. II. Biochemical and physiological findings. *Archives of General Psychiatry*, 42(7): 709-719.
- López, J. F., Akil, H., Watson, S. J. (1999). Neural circuits mediating stress. *Biological Psychiatry*, 46(11):1461-71.

- Lowry, C. A. (2002). Functional subsets of serotonergic neurones: implications for control of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Journal of Neuroendocrinology*, 14(11): 911-23.
- Lowry, C. A., Johnson, P. L., Hay-Schmidt, A., Mikkelsen, J., Shekhar, A. (2005). Modulation of anxiety circuits by serotonergic systems. *Stress*, 8(4): 233-246.
- 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.
- Lowry, C. A., Lightman, S. L., Nutt, D. J. (2009). That warm fuzzy feeling: brain serotonergic neurons and the regulation of emotion. *Journal of Psychopharmacology*, 23(4): 392-400.
- Luckman, S. M., Dyball, R. E., Leng, G. (1994). Induction of c-fos expression in hypothalamic magnocellular neurons requires synaptic activation and not simply increased spike activity. *The Journal of neuroscience*, 14(8): 4825-4830.
- Maier, S. F., Grahn, R. E., Kalman, B. A., Sutton, L. C., Wiertelak, E. P., Watkins, L. R. (1993). The role of the amygdala and dorsal raphe nucleus in mediating the behavioral consequences of inescapable shock. *Behavioral Neuroscience*, 107: 377-388.
- McGinty, D. J., Harper, R. M. (1976). Dorsal raphe neurons: depression of firing during sleep in cats. *Brain Research*, 101: 569-575.
- Mcnaughton, N., Corr, P. J. (2004). A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defense distance. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 28: 285-305.
- Meltzer, H. Y. (1999). The role of serotonin in antipsychotic drug action. *Neuropharmacology*, 21: 106-115.
- Meneses, A. (1998). Physiological, pathophysiological and therapeutic roles of 5-HT systems in learning and memory. *Reviews in the Neurosciences*, 9(4): 275-89.
- Miguel, T. L., Pobbe, R. L., Spiacci Junior, A., Zangrossi Junior, H. (2010). Dorsal raphe nucleus regulation of a panic-like defensive behavior evoked by chemical stimulation of the rat dorsal periaqueductal gray matter. *Behavioural Brain Research*, 213(2): 195-200.
- Molliver, M. E. (1987). Serotonergic neuronal systems: What their anatomic organization tells us about function. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 7(6s): 3-23.
- Montgomery, K. C. (1955). The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 48(4): 254-260.

- Monti, J. M. (2011). Serotonin control of sleep-wake behavior. *Sleep medicine reviews*, 15(4):269-81.
- Moore, R. Y., Halaris, A. E. (1975). Hippocampal innervations by serotonin neurons of the midbrain raphe in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 164: 171-183.
- Morgan MM, Whitney PK, Gold MS. (1998). Immobility and flight associated with antinociception produced by activation of the ventral and lateral/dorsal regions of the rat periaqueductal gray. *Brain Research*, 804(1): 159-166.
- Mourilhe, P., Stokes, P. E. (1998). Risks and benefits of selective serotonin reuptake inhibitors in the treatment of depression. *Drug safety : an international journal of medical toxicology and drug experience*, 18(1): 57-82.
- Nutt, D. J. (1991). Anxiety and its therapy: today and tomorrow. In: Briley, M., File, S. E. *New concepts in anxiety*. London: Macmillan.
- Ochi, J., Shimizu, K. (1978). Occurrence of dopamine-containing neurons in the midbrain raphe nuclei of the rat. *Neuroscience Letters*, 8(4): 317-320.
- Paxinos, G., Watson, C. (2007). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. (6 ed). Amsterdam: Elsevier Academic Press.
- 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 Neuropsychopharmacology*. (pp.399). Florence: Italy.
- Phillipson, O. T. (1979). Afferent projections to the ventral tegmental area of Tsai and interfascicular nucleus: a horseradish peroxidase study in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 187: 117-43.
- Pinheiro, S. N., Del-Bem, C. M., Zangrossi, H. Jr., Graeff, F. G. (2008). Anxiolytic and panicolytic effects of escitalopram in the elevated T-maze. *Journal of Psychopharmacology*, 22(2): 132-137.
- 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. C., Zangrossi, H. Jr., de Barros Viana, M. (2003). Antipanic-like effect of serotonin reuptake inhibitors in the elevated T-maze. *Behavioural Brain Research*, 147(1-2): 185-192.
- 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.
- Rossi, F., Maione, S., Berrino, L. (1994). Periaqueductal gray area and cardiovascular function. *Pharmacology Research*, 29:27-36.
- 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.
- Schenberg, L. C. (2010). Towards a translational model of panic attack. *Psychology & Neuroscience*, 3(1): 9 – 37.
- 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.
- Shikanai, H., Yoshida, T., Konno, K., Yamasaki, M., Izumi, T., Ohmura, Y., et al. (2012). Distinct Neurochemical and Functional Properties of GAD67-Containing 5-HT Neurons in the Rat Dorsal Raphe Nucleus. *The Journal of Neuroscience*, 32(41): 14415-14426.
- 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: 97-109.
- Silva, M., Aguiar, D. C., Diniz, C. R., Guimarães, F.S., Joca, S. R. (2012). Neuronal NOS inhibitor and conventional antidepressant drugs attenuate stress-induced fos expression in overlapping brain regions. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 32(3): 443-453.
- Silveira, M.C., Zangrossi, H., De Barros Viana, M., Silveira, R., Graeff, F. G. (2001). Differential expression of Fos protein in the rat brain induced by performance of avoidance or escape in the elevated T-maze. *Behavioural Brain Research*, 126: 13-21.
- Silveira, M. C., Sandner, G., Di Scala, G., Graeff, F. G. (1995). c-fos immunoreactivity in the brain following electrical or chemical stimulation of the medial hypothalamus of freely moving rats. *Brain Research*, 674(2): 265-274.
- Sperling, R., Commons, K. G. (2011). Shifting topographic activation and 5-HT_{1A} receptor-mediated inhibition of dorsal raphe serotonin neurons produced by nicotine exposure and withdrawal. *The European Journal of Neuroscience*, 33(10): 1866-1875.

- 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.
- Stahl, S. M., Gergel, I., Li, D. (2003). Escitalopram in the treatment of panic disorder: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 64(11): 1322-1327.
- Staub, D. R., Spiga, F., Lowry, C. A. (2005). Urocortin 2 increases c-Fos expression in topographically organized subpopulations of serotonergic neurons in the rat dorsal raphe nucleus. *Brain Research*, 1044(2): 176-189.
- Stein, L., Wise, C. D., Belluzzi, J. D. (1975). Effects of benzodiazepines on central serotonergic mechanisms. *Advances in Biochemical Psychopharmacology*, 14: 29-44.
- Steinbusch, H. W., Verhofstad, A. A., Joosten, H. W. (1978). Localization of serotonin in the central nervous system by immunohistochemistry: description of a specific and sensitive technique and some applications. *Neuroscience*, 3(9): 811-819.
- 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. (1994). Inhibitory and excitatory projections from the dorsal raphe nucleus to neurons in the dorsolateral periaqueductal gray matter in slices of midbrain maintained in vitro. *Neuroscience*, 62(1): 177-187.
- 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. *Neuroscience Letters*, 230(1): 57-60.
- Tao, R., Ma, Z., Auerbach, S. B. (1997). Influence of AMPA/kainate receptors on extracellular 5-hydroxytryptamine in rat midbrain raphe and forebrain. *British Journal of Pharmacology*, 121(8):1707-1715.
- Teixeira, R. C., Zangrossi, H., 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.
- Treit, D., Menard, J., Royan, C. (1993). Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 44(2): 463-9.
- Twarog, B. M., Page, I. H. (1953). Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. *American Journal of Physiology*, 175:175-161.
- Tyce, G. M. (1990). Origin and metabolism of serotonin. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 16: 1-7.
- Tye, N. C., Everitt, B. J., Iversen, S. D. (1977). 5-Hydroxytryptamine and punishment. *Nature*, 268(5622):741-743.

- Valentino, R. J., Liouterman, L., Van Bockstaele, E.J. (2001). Evidence for regional heterogeneity in corticotropin-releasing factor interactions in the dorsal raphe nucleus. *The Journal of Comparative Neurology*, 435(4): 450-463.
- Vasey, M. W., Thayer, J. F. (1987). The continuing problem of false positives in repeated measures ANOVA in psychophysiology: a multivariate solution. *Psychophysiology*, 24(4): 479-486.
- Veasey, S. C., Fornal, C. A., Metzler, C. W., Jacobs, B. L. (1997). Single-unit responses of serotonergic dorsal raphe neurons to specific motor challenges in freely moving cats. *Neuroscience*, 79: 161-169.
- Vertes, R. P. (1991). A PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 313(4): 643-68.
- 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.
- Viana, M. B., Graeff, F. G., Löschmann, P.A. (1997). Kainate microinjection into the dorsal raphe nucleus induces 5-HT release in the amygdala and periaqueductal gray. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 58(1): 167-172.
- Viana, M. B. (2010). *Mudanças nos conceitos de ansiedade nos séculos XIX e XX: da "Angstneurose" ao DSM-IV*. Tese de Doutorado. Centro de educação e ciências humanas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- Vicente, M. A., Zangrossi, H. (2011). Serotonin-2C receptors in the basolateral nucleus of the amygdala mediate the anxiogenic effect of acute imipramine and fluoxetine administration. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 14: 1-12.
- Wang, Q. P., Nakai, Y. (1994). The dorsal raphe: an important nucleus in pain modulation. *Brain Research Bulletin*, 34(6): 575-85.
- Wilkinson, L. O., Jacobs, B. L. (1988). Lack of response of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus of freely moving cats to stressful stimuli. *Experimental Neurology*, 101(3): 445-57.
- Wilson, M. A., Mamounas, L. A., Fasman, K. H., Axt, K. J., Molliver, M. E. (1993). Reactions of 5-HT neurons to drugs of abuse: neurotoxicity and plasticity. *NIDA Research Monograph Index*, 136: 155-187.
- Wise, C. D., Berger, B. D., Stein, L. (1972). Benzodiazepines: anxiety-reducing activity by reduction of serotonin turnover in the brain. *Science*, 177(4044):180-183.
- Wuttke, W., Kelleher, R. T. (1970). Effects of some benzodiazepines on punished and unpunished behavior in the pigeon. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 172(2):397-405.

- 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.
- 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. *Behavioural Pharmacology*, 16(7): 543-552.
- Zanoveli, J. M., Pobbe, R. L., de Bortoli, V. C., Carvalho, M. C., Brandão, M. L., Zangrossi, H. Jr. (2010). Facilitation of 5-HT_{1A}-mediated neurotransmission in dorsal periaqueductal grey matter accounts for the panicolytic-like effect of chronic fluoxetine. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 13(8): 1079-1088.
- Zorzanelli, R. T. (2010). Neurastenia. *História, Ciências, Saúde –Manguinhos*, 17(2): 431-446.

Anexo

Please cite this article in press as: Spiaci Jr. A et al. Differential involvement of dorsal raphe subnuclei in the regulation of anxiety- and panic-related defensive behaviors. *Neuroscience* (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.09.061>

Neuroscience xxx (2012) xxx–xxx

DIFFERENTIAL INVOLVEMENT OF DORSAL RAPHE SUBNUCLEI IN THE REGULATION OF ANXIETY- AND PANIC-RELATED DEFENSIVE BEHAVIORS

A. SPIACCI Jr., N. C. COIMBRA AND H. ZANGROSSI Jr. *

Department of Pharmacology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto, CEP 14049-900, Brazil

Abstract—A wealth of evidence indicates that the dorsal raphe nucleus (DR) is not a homogenous structure, but an aggregate of distinctive populations of neurons that may differ anatomically, neurochemically and functionally. Other findings suggest that serotonergic neurons within the mid-caudal and caudal part of the DR are involved in anxiety processing while those within the lateral wings (lwDR) and ventrolateral periaqueductal gray (vlPAG) are responsive to panic-evoking stimuli/situations. However, no study to date has directly compared the activity of 5-HT and non-5HT neurons within different subnuclei of the DR following the expression of anxiety- and panic-related defensive responses. In the present investigation, the number of doubly immunostained cells for Fos protein and tryptophan hydroxylase, a marker of serotonergic neurons, was assessed within the rat DR, median raphe nucleus (MRN) and PAG following inhibitory avoidance and escape performance in the elevated T-maze, behaviors associated with anxiety and panic, respectively. Inhibitory avoidance, but not escape, significantly increased the number of Fos-expressing serotonergic neurons within the mid-caudal part of the dorsal subnucleus, caudal and interfascicular subnuclei of the DR and in the MRN. Escape, on the other hand, caused a marked increase in the activity of non-5HT cells within the lwDR, vlPAG, dorsolateral and dorsomedial columns of the PAG. These results strongly corroborate the view that different subsets of neurons in the DR are activated by anxiety- and panic-relevant stimuli/situations, with

important implications for the understanding of the pathophysiology of generalized anxiety and panic disorders. © 2012 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Key words: dorsal raphe, periaqueductal gray, serotonin, anxiety, panic, elevated T-maze.

INTRODUCTION

The dorsal raphe nucleus (DR) is the main source of 5-HT innervation to limbic structures involved in the pathophysiology of anxiety (Azmitia and Segal, 1978; Vertes, 1991). Based on clinical and experimental evidence, Deakin and Graeff (1991) have proposed that different serotonergic pathways originating in the DR, by innervating brain substrates controlling defensive behaviors associated with anxiety and fear, play distinctive roles in two subtypes of anxiety pathologies: generalized anxiety disorder (GAD) and panic disorder (PD). According to this view, activation of the ascending DR-5-HT forebrain pathway that innervates the amygdala and frontal cortex facilitates defensive responses to potential or distal threat stimuli, such as inhibitory avoidance and risk-assessment behaviors. Based on the effect of anxiolytic drugs, these behaviors have been related, in clinical terms, to GAD (Gray and McNaughton, 2000; Blanchard et al., 2003). On the other hand, activation of the DR 5-HT periventricular pathway that innervates the dorsal columns of the periaqueductal gray (dPAG) inhibits escape response to proximal danger, a behavioral reaction that has been related to panic attacks (Gray and McNaughton, 2000; Blanchard et al., 2003).

Although not an issue contemplated by Deakin and Graeff's theory, strong evidence supports that the DR is not a homogenous structure, but an aggregate of different subpopulations of 5-HT and non-5-HT neurons that are morphologically and functionally distinct (Calizo et al., 2011). For instance, anxiety-provoking stimuli/situations, such as social defeat and anxiogenic drugs/neuropeptides, activate 5-HT neurons, as evidenced by Fos/tryptophan hydroxylase (TrpOH) dual labeling, predominantly in the mid-rostricaudal and caudal parts of the DR (for a review see Hale et al., 2012). Based on these results and the analysis of local efferent projections, Lowry et al. (2008) have suggested that 5-HT neurons located within these DR subregions may

*Corresponding author. Tel: +55-16-3602-3353; fax: +55-16-3633-2301.

E-mail address: zangrossi@fmrp.usp.br (H. Zangrossi Jr.).

Abbreviations: 5-HT1A, serotonin-1A receptor; 5-HT2C, serotonin-2C receptor; ANOVA, analysis of variance; BLA, basolateral amygdala; CO₂, carbon dioxide; CRF, corticotrophin-releasing factor; DH, dorsal hippocampus; dlPAG, dorsolateral column of the periaqueductal gray matter; dmPAG, dorsomedial column of the periaqueductal gray matter; dPAG, dorsal column of the periaqueductal gray matter; DR, dorsal raphe; DRC, caudal subnucleus of the dorsal raphe; DRD, dorsal subnucleus of the dorsal raphe; DRI, interfascicular subnucleus of the dorsal raphe; DRV, ventral subnucleus of the dorsal raphe; Fos+, Fos-immunolabeled neurons; Fos+/+TrpOH, double-labeled neurons; GAD, generalized anxiety disorder; lPAG, lateral column of the periaqueductal gray matter; lwDR, lateral wings of the dorsal raphe; MRN, median raphe nucleus; NO, nitric oxide; PAG, periaqueductal gray matter; PBS, phosphate-buffered saline; PD, panic disorder; TrpOH, tryptophan hydroxylase; TrpOH+, tryptophan hydroxylase immunopositive neurons; vlPAG, ventrolateral column of the periaqueductal gray matter.

give rise to the DR forebrain tract hypothesized by Deakin and Graeff.

Other evidence indicates that neurons within the lateral wings of the DR (lwDR) and the adjacent area of the ventrolateral periaqueductal gray (vlPAG) may be the source of 5-HT within the periventricular path mentioned in Deakin and Graeff's theory. For instance, exposure of rats to an elevated concentration of carbondioxide (CO₂), a stimulus that may precipitate panic attacks in panic disorder patients (Griez et al., 1987), induces Fos immunostaining in 5-HT neurons located predominantly within the lwDR/vlPAG (Johnson et al., 2005). According to the authors, the activation of these neurons could be associated with 5-HT release within specific brain areas (e.g. dPAG) to inhibit ongoing panic-associated responses.

In order to extend our knowledge on the role played by distinct local circuits within the raphe in anxiety and fear, we here compared the pattern of Fos expression in serotonergic cells of the DR, median raphe nucleus (MRN) and PAG of rats displaying anxiety- or panic-related defensive behaviors. More specifically, Fos/TrpOH dual labeling in these midbrain areas was analyzed after rats were exposed to the elevated T-maze test of anxiety (Graeff et al., 1998; Graeff and Zangrossi, 2002), which allows measurement of both inhibitory avoidance (anxiety-like) and escape (panic-like) defensive responses.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals

Male Wistar rats (University of Sao Paulo, Campus of Ribeirão Preto) weighing 270–310 g were housed in groups of 4 per cage in Plexiglas-walled cages in a room maintained at 22 ± 1 °C, with an alternating 12 h:12-h light/dark cycle (lights on at 07:00), and with free access to food and water except during testing. The experimental procedures adopted had been approved by the Experimental Animal Ethics Committee of the University of São Paulo (protocol number: 108/2008). Efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals employed.

Apparatus

The elevated T-maze was made of wood and had three arms of equal dimensions (50 × 12 cm). One arm, the stem of the T, was enclosed by 40-cm high walls and was perpendicular to two opposed open arms. To prevent the rats from falling down, the open arms were surrounded by a Plexiglas rim 1-cm high. The whole apparatus was elevated 50 cm above the floor.

The enclosed T-maze used as control had all three arms (50 × 12 cm) surrounded by 40-cm-high wooden walls.

Luminosity at the level of the T-maze arms was 60 lux.

Procedure

In order to familiarize the animals to the experimental conditions and to reduce non-specific stress responses, the animals were daily handled for 5 min for five consecutive days before the experiment.

One day before the test, all rats were exposed to one of the open arms of the T-maze for 30 min. A wood barrier mounted on the border of the maze central area and the open arm's proximal end isolated this arm from the rest of the maze.

On the day of the experiment, the animals were randomly allocated to the avoidance ($n = 7$), escape ($n = 7$) or control (enclosed T-maze, $n = 7$) groups.

In the avoidance group, the rats were placed at the distal end of the enclosed arm of the elevated T-maze, facing the intersection of the arms. The time taken by the animal to leave this arm with all four paws was recorded (Trial 1 latency). This procedure was repeated in two subsequent trials (T2 and T3) at 30-s intervals. When first placed at the end of the enclosed arm, the rat does not see the open arms until it pokes its head beyond the walls of the closed arm. Being on the open arm seems to be an aversive experience, since rats have an innate fear of height and openness (Treit et al., 1993). As such, in the two succeeding trials the animal gradually leaves the enclosed arm with longer latencies, indicating the acquisition of inhibitory avoidance.

In the escape group, the rats were placed at the end of the same previously experienced open arm, facing the intersection of the arms and the time taken to leave this arm was registered in three consecutive trials (T1, T2 and T3), again with 30-s intertrial intervals. The same procedure was employed in the control group, except that the animals were placed in the distal end of the stem arm of the enclosed T-maze.

A cutoff time of 300 s was established for all latencies measured. Animals of all three groups were included in each experimental session and their brains were afterward processed in parallel, as described below.

Tissue collection and preparation. Two hours after testing in the T-maze, all animals were deeply anaesthetized with urethane (1.25 g/kg; Sigma, USA) and then transcardially perfused with 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4) at 4 °C followed by 4% paraformaldehyde in PBS (pH 7.4). Brains were immediately removed, post-fixed for 2 h in the same fixative, rinsed in PBS, then immersed in cryoprotectant solution (30% sucrose in 0.2 M PB, pH 7.4) at 4 °C for 5 days. Brains were then quickly frozen in isopentane (−40 °C). Serial coronal sections were cut in three alternate sets of 40 μm using a cryostat (Leica Microsystems, Germany), collected in a cryoprotectant storage buffer (30% ethylene glycol, 20% glycerol in PB), and stored at −20 °C.

Double immunohistochemistry. One set of sections was selected and subsequently immunostained for Fos protein using a free-floating methodology conducted on an orbital shaker. Staining for Fos was performed as follows: the slices were first washed 3 times in PBS, immersed in 1% hydrogen peroxide in PBS for 10 min, followed by washing in PBS 4 times. Tissue was then incubated in a blocking solution of 1% bovine serum albumin (BSA) in PBS for 30 min and then incubated overnight with the primary rabbit anti-Fos protein polyclonal antibody (1/800, Santa Cruz, USA, SC-52). After incubation in the primary antiserum, the tissue sections were washed in PBS and sequentially incubated for 2 h with biotinylated goat anti-rabbit antibody (1/800, Vectastin, Vector Laboratories). Sections were incubated in avidin–biotin complex (Vectastain ABC kit, Vector Laboratories) for 2 h. Fos-immunoreactivity was revealed after immersing the sections in a solution containing 0.02% chromogen 3,3'-di-aminobenzidine tetrahydrochloride, 0.0015% hydrogen peroxide and 0.05% nickel ammonium sulfate in PBS for 10 min.

After Fos revelation, the tissue sections were washed 4 times in PBS and processed for TrpOH immunostaining: the slices were incubated overnight with primary sheep anti-TrpOH antibody (1/1000, Millipore, USA, AB1541). After incubation, the tissue sections were washed 3 times in PBS, sequentially

incubated for 2 h with biotinylated anti-sheep antibody (1/800, Vectastin, Vector Laboratories, PK-6106) and washed 3 times with PBS. Sections were then incubated in avidin–biotin complex (Vectastain ABC kit, Vector Laboratories) and washed 3 times in PBS. TrpOH-immunoreactivity was revealed after immersing the sections in a solution containing 0.02% chromogen 3,3'-di-aminobenzidine tetrahydrochloride and 0.0015% hydrogen peroxide in PBS for 10 min. Sections were then washed 3 times in PBS to stop the reaction.

The tissue sections were then mounted on gelatin-coated glass slides, dehydrated in a graded alcohol series, cleared in xylol, and coverslipped using Permount histological mounting medium (Fisher Scientific, UK).

Immunohistochemistry labeling was visualized using a microscope (Olympus DX50), and images were captured with a digital camera using the software Image Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, USA). Cell counts were conducted at 400 $\times$ magnification by an investigator blinded to the assignment of task groups. The color reaction of the Fos immunostaining was blue-black and localized to the nucleus while TrpOH immunostaining was orange-brown and localized to the cytoplasm (see a representative photomicrograph of these neurons in Fig. 1).

The number of double-labeled neurons (i.e. Fos-immunopositive/TrpOH-immunopositive cells; Fos+/+TrpOH), the total number of Fos-immunolabeled neurons (i.e. both

Fos-immunopositive/TrpOH-immunonegative and Fos-immunopositive/TrpOH-immunopositive cells; Fos+), or the total number of TrpOH-immunopositive neurons (i.e. both Fos-immunopositive/TrpOH-immunopositive and Fos-immunonegative/TrpOH-immunopositive; TrpOH+) was counted in different regions of the DR at four rostrocaudal levels (from –6.84 to –9.00 mm bregma, see Fig. 1), following the study of Gardner et al. (2005). The subdivisions of the DR analyzed were the dorsal subnucleus (DRD) at the rostral level (–6.84 to –7.08 mm bregma), the DRD, the ventral (DRV) and the lwDR subnuclei at the mid-rostral level (–7.20 to –7.80 mm bregma), the DRD, DRV and lwDR subnuclei at the mid-caudal level (–7.92 to –8.28 mm bregma) and the caudal (DRC) and interfascicular (DRI) subnuclei at the caudal level (–8.52 to –9.00 mm bregma). The number of cells sampled within the lateral wings of the DR was the sum of cells counted in the right and left sides of this subnucleus.

In the MRN, the number of Fos+/+TrpOH, Fos+ or TrpOH+ cells was counted at one rostrocaudal level (from –7.92 to –8.28 mm bregma, see Fig. 1), following the study by Silveira et al. (2001). In the PAG, the quantity of these cells was analyzed at three rostrocaudal levels (from –6.60 to –8.52 mm bregma, see Fig. 1), and the areas sampled were: the dorsomedial (dmPAG), dorsolateral (dlPAG), lateral (lPAG) and ventrolateral (vlPAG) subnuclei at the rostral (–6.60 to –6.84 mm

DR

PAG

MRN

Fig. 1. Photomicrographs illustrating immunolabeled sections for Fos and TrpOH from different rostrocaudal levels of the DR, MRN and PAG from a rat tested in the enclosed T-maze. Photomicrographs are arranged in rostrocaudal order from left to right. Dotted lines demarcating subdivisions of the DR and PAG and the area sampled in the MRN were traced from a rat brain stereotaxic atlas (Paxinos and Watson, 2007). The yellow arrows show large blood vessels that served as reference to localize the border between the lwDR and vlPAG, as indicated by Roche et al., 2003. The bottom left panel is a higher magnification photomicrograph showing Fos- (blue arrows), TrpOH- (green arrows) and double- (black arrows) labeled neurons. Aq = cerebral aqueduct, DRD = dorsal raphe dorsal subnucleus, DRC = dorsal raphe caudal subnucleus; DRI = dorsal raphe interfascicular subnucleus, DRV = dorsal raphe ventral subnucleus, lwDR = dorsal raphe lateral wings, MRN = median raphe nucleus, dlPAG = dorsolateral periaqueductal gray subnucleus, dmPAG = dorsomedial periaqueductal gray subnucleus, lPAG, lateral periaqueductal gray subnucleus, vlPAG = ventrolateral periaqueductal gray subnucleus. Scale bars = 300 μ m.

bregma) and middle levels (−7.32 to −7.80 mm bregma) and the dmPAG, IPAG and vlPAG subnuclei at the caudal level (−8.28 to −8.52 mm bregma). The number of cells sampled within the dlPAG, IPAG or vlPAG was the sum of cells counted in the left and right sides of these subnuclei.

Statistical analysis

A repeated measure analysis of variance (ANOVA) was used to analyze behavioral data from the T-maze, with task as the independent factor (control, avoidance or escape) and trials (T1, T2 or T3) as the repeated measure.

The number of Fos-immunoreactive neurons (Fos+), double-labeled neurons (Fos+/+TrpOH) and TrpOH-immunopositive cells (TrpOH+) measured in different subdivisions of the DR or PAG was analyzed separately using repeated measures ANOVA with task as between-subject factor and subregions as within-subject factor. In the MRN, the same variables were analyzed by one-way ANOVA.

When appropriate, post hoc comparisons were performed by Tukey's test.

RESULTS

Behavioral analysis

As seen in Fig. 2, the statistical analysis of data showed a significant difference in the behavior of the three groups of animals tested [task effect: $F(2, 18) = 23.15$, $p < 0.05$]. It was also seen that latencies to leave the arms of the T-maze were different over trials [trial effect: $F(2, 36) = 16.13$, $p < 0.05$] and that this difference changed across groups [task $\times$ trial: $F(4, 36) = 15.88$, $p < 0.05$]. Post hoc comparisons revealed that latencies to leave the enclosed arm of the elevated T-maze increased over trials, indicating the acquisition of inhibitory avoidance.

Immunohistochemistry

As shown in Table 1, the number of TrpOH-reactive cells either within the DR or PAG varied significantly among the

Fig. 2. Mean $\pm$ SEM of the time taken by rats to withdraw from an enclosed arm of an enclosed T-maze (Control) or from the enclosed (Avoidance) or open (Escape) arm of the elevated T-maze, in three consecutive trials (T1, T2 and T3). $n = 7$, for each group. * $p < 0.05$ compared to T1 within the same group.

different subregions of each structure [DR – $F(8, 144) = 186.36$, $p < 0.01$; PAG – $F(10, 180) = 214.54$, $p < 0.01$], but these values were not different among the experimental groups tested in the T-maze. There was no significant difference among the three groups tested in the total number of TrpOH-positive neurons counted in the MRN (see Table 1).

DR. Statistical analysis of the total number of Fos-positive neurons within the subdivisions of the DR showed a task $\times$ subregion interaction [$F(16, 144) = 10.66$, $p < 0.01$]. Post hoc comparisons revealed that escape, but not avoidance reaction markedly increased Fos expression within the lwDR (Fig. 3, panels D and G). Escape also induced a moderate but significant increase in Fos expression within the mid-rostral and mid-caudal parts of the DRD (Fig. 3, panels B and E). This increase in Fos immunolabeling was also observed in the avoidance group, but only at the latter subset of neurons (Fig. 3, panel E). Avoidance, but not escape, significantly enhanced the number of Fos-immunopositive neurons within the DRC and DRI (Fig. 3, panels H and I).

The analysis of Fos-immunoreactive serotonergic neurons (Fos+/+TrpOH) within the subnuclei of the DR also showed a task $\times$ subdivision interaction [$F(16, 144) = 13.27$, $p < 0.01$]. As can be seen in Fig. 3 (panels E, H and I), the avoidance group had the highest number of double-labeled cells within the mid-caudal part of the DRD, DRC and DRI when compared to both the control and escape groups. In none of the subdivisions of the DR did escape performance alter the number of Fos-immunoreactive serotonergic neurons.

Correlation analysis by Pearson test (see Fig. 5) revealed that the number of serotonergic cells doubly labeled for Fos (Fos+/+TrpOH) within the DRC ($r = 0.74$, $p = 0.04$), mid-caudal DRD ($r = 0.86$, $p = 0.01$), but not DRI ($r = 0.52$, $p = 0.23$) was positively correlated with the total time taken (T1 + T2 + T3) by the rats to leave the enclosed arm of the elevated T-maze (avoidance task). On the other hand, the total number of Fos-immunopositive profiles (Fos+) within the lwDR tended to be inversely correlated with the total time taken by the rats to leave one of the open arms (escape task) of the elevated T-maze ($r = -0.73$, $p = 0.06$). When only the number of Fos-immunoreactive non-serotonergic cells (Fos+/−TrpOH) was taken into account, this correlation reaches significance ($r = -0.77$, $p = 0.04$).

MRN. One-way ANOVA showed that the three groups tested differed significantly in the number of Fos-immunopositive [$F(2, 20) = 5.82$, $p < 0.05$] and double-immunostained [$F(2, 20) = 5.03$, $p < 0.05$] cells within the MRN. Post hoc comparisons revealed that both numbers of cells was significantly higher in the avoidance group, in comparison to the control and escape groups (see Fig. 3). Marginally significant positive correlations were found between the number of Fos-positive neurons ($r = 0.72$, $p = 0.07$) and Fos-immunoreactive serotonergic cells ($r = 0.71$,

Table 1. Numbers of TrpOH-immunopositive neurons (mean $\pm$ SEM) sampled in subdivisions of DR, MRN and PAG

Rostrocaudal level (mm from Bregma)	Subnucleus	TprOH + /mm ²		
		Enclosed T-maze	Avoidance	Escape
DR				
−6.84 to −7.08	DRD	112 ± 5	107 ± 6	109 ± 5
−7.20 to −7.80	DRD	106 ± 4	110 ± 4	108 ± 4
	DRV	189 ± 6	192 ± 7	196 ± 7
	lwDR	104 ± 3	100 ± 3	105 ± 5
−7.92 to −8.28	DRD	86 ± 4	90 ± 3	88 ± 4
	DRV	142 ± 7	139 ± 6	138 ± 5
	lwDR	83 ± 5	81 ± 5	89 ± 6
−8.52 to −9.00	DRC	85 ± 4	87 ± 4	89 ± 4
	DRI	48 ± 5	51 ± 4	49 ± 4
MRN				
−7.92 to −8.28		62 ± 6	59 ± 8	64 ± 6
PAG				
−6.60 to −6.84	dmPAG	—	—	—
	dIPAG	—	—	—
	IPAG	0.7 ± 0.4	0.6 ± 0.3	0.7 ± 0.3
	vlPAG	14 ± 0.9	13 ± 1.2	14 ± 2
−7.20 to −7.80	dmPAG	—	—	—
	dIPAG	—	—	—
	IPAG	2.6 ± 0.3	2.4 ± 0.3	2.5 ± 0.4
	vlPAG	20 ± 1.7	19 ± 1.5	19 ± 1.1
−8.25 to −8.52	dmPAG	—	—	—
	IPAG	1 ± 0.3	1 ± 0.4	1.1 ± 0.4
	vlPAG	11 ± 1.2	10.5 ± 1.4	11.5 ± 1.8

–, no cell detected.

$p = 0.07$) and the total time spent avoiding the open arms.

PAG. The analysis of the number of Fos-immunopositive neurons (Fos+) within the PAG showed significant task and region effects [$F(2,18) = 7.24$, $p < 0.01$ and $F(10,180) = 22.70$, $p < 0.01$, respectively], but not a task by region interaction [$F(20,180) = 1.68$, NS]. Post hoc comparisons revealed that in the escape, but not the avoidance group, Fos expression was higher within the rostral and middle poles of the dlPAG and dmPAG (Fig. 4, panels A, B, E and F) and within the mid-level of the vlPAG (Fig. 4, panel H).

Fig. 5 shows that there were significant negative correlations between the number of Fos-immunopositive cells within the dorsal subdivisions of the PAG and the total time taken by the rats to escape from the open arm (rostral dmPAG: $r = -0.79$, $p = 0.03$, rostral dlPAG: $r = -0.81$, $p = 0.02$, mid-dmPAG: $r = -0.80$, $p = 0.032$, mid-dlPAG: $r = -0.84$, $p = 0.019$). A marginally significant inverse correlation between these two variables was found in the mid-level of the vlPAG ($r = -0.69$, $p = 0.085$).

No difference among the three groups tested was detected in the number of Fos-immunoreactive serotonergic neurons counted within the subdivisions of the PAG where the presence of serotonergic neurons (TrpOH+) was detected; i.e. the vlPAG and IPAG (see Table 1 and Fig. 4).

DISCUSSION

We report here a clear-cut difference in the pattern of Fos/TrpOH immunolabeling within the DR, MRN and PAG following inhibitory avoidance or escape expression in the elevated T-maze.

In the inhibitory avoidance group, the number of Fos-immunoreactive neurons was significantly higher within the DRC, DRI and mid-caudal part of the DRD. No change in the number of Fos-immunoreactive cells was observed within the rostral portion of the DR or within the DRV or lwDR. In each of the Fos-responsive subnuclei, there were a higher number of doubly labeled cells for TrpOH, indicating the recruitment of serotonergic neurons. Correlation analyses revealed that the greater the avoidance reaction, the higher the number of serotonergic cells activated in the DRD and DRC.

These findings are in full agreement with evidence in the literature showing that neurons within the mid-caudal and caudal parts of the DR are engaged by different anxiety-provoking stimuli/situations such as anxiogenic drugs (Staub et al., 2006), social defeat (Paul et al., 2011) and inescapable shocks (Grahn et al., 1999). The observation that serotonergic cells were predominantly affected by the avoidance task suggests that these subsets of neurons may be the source of 5-HT innervation to limbic structures involved in the genesis/regulation of defensive reactions to potential/distal threats proposed by Deakin and Graeff (1991). This idea is fully supported by neuroanatomical findings

Fig. 3. Mean $\pm$ SEM of the number of Fos-positive cells (Fos +; open bars) and Fos-immunoreactive serotonergic neurons (Fos +/+ TrpOH; dark bars) counted in the different subdivisions of the DR and in the MRN of animals submitted to the avoidance (AVD) or escape (ESC) tasks in the elevated T-maze. Control animals (CTL) were tested in an enclosed T-maze, as described in the procedure section. $n = 7$, for each group. * $p < 0.05$, with respect to the number of Fos-immunostained neurons (Fos+) compared to the control group. + $p < 0.05$, with respect to the number of Fos-immunostained neurons (Fos+) compared to all other groups. # $p < 0.05$, with respect to the number of double-labeled cells (Fos +/+ TrpOH) compared to all other groups.

showing that the DRD and DRC have reciprocal projections to key anxiety-related areas such as the basolateral amygdala (BLA), bed nucleus of the stria

terminalis and medial prefrontal cortex (for a review see Hale et al., 2012). For instance, the majority of DR projections to the BLA arise in the mid-caudal DR,

Fig. 4. Mean $\pm$ SEM of the number of Fos-positive cells (Fos +; open bars) and Fos-immunoreactive serotonergic neurons (Fos + / + TrpOH; dark bars) counted in the different subdivisions of the PAG of animals submitted to the avoidance (AVD) or escape (ESC) tasks in the elevated T-maze. Control animals (CTL) were tested in an enclosed T-maze. $n = 7$, for each group. * $p < 0.05$, with respect to the number of Fos-immunostained neurons (Fos +) compared to the control group.

DRV and DRC. In the former nuclei, around 80% of the projecting neurons to the BLA are serotonergic (Hale et al., 2008). Although the number of BLA-projecting serotonergic neurons from the DRI is very low (Hale et al., 2008), this subnucleus is connected with other important anxiety-modulating areas such as the prefrontal cortex, hypothalamus and hippocampus (Azmitia, 1981; Lowry et al., 2009). Besides, the DRI has connection with the MRN (Phillipson, 1979), which in turn is the main source of 5-HT innervation to the dorsal hippocampus (Moore and Halaris, 1975).

Previous findings from our lab showed that facilitation of 5-HT-mediated neurotransmission in the BLA and DH increases inhibitory avoidance in the elevated T-maze, an anxiogenic effect (Dos Santos et al., 2008; Vicente and Zangrossi, 2011). While in the former area this effect was due to the recruitment of serotonin-2C receptors (5-HT_{2C}), in the latter, activation of serotonin-1A receptors (5-HT_{1A}) was involved. It is of note that after microinjection of 5-HT into the BLA or 5-HT_{1A} agonists into the DH, only inhibitory avoidance was altered, without interference with escape expression.

Moreover, the pharmacological stimulation of serotonergic neurons within the MRN is equally anxiogenic in the T-maze, an effect blocked by intra-DH injection of 5-HT_{1A} receptor antagonists (Dos Santos et al., 2008). As mentioned before, the MRN, a nucleus also engaged by inhibitory avoidance but not escape task in the present study, sends dense 5-HT projections to the DH. Altogether, these results are in line with the task-dependent pattern of Fos/TrpOH immunolabeling found here.

Our data also revealed that escape performance markedly increased Fos expression in non-serotonergic cells within the lwDR and moderately in the DRD. There was a significant inverse correlation between the number of Fos-immunoreactive non-serotonergic cells within the lwDR, but not in the DRD, and the escape time. Therefore, the more efficiently the animals escaped, the greater the number of non-serotonergic cells engaged within the lwDR.

Escape also increased the amount of Fos-immunostained cells in the dmPAG, dIPAG and vlPAG. As in the lwDR, a negative correlation was found

Fig. 5. Scatterplots illustrating correlations between: the total avoidance time (for details see the result section) and the number of double-labeled neurons (Fos + / + TrpOH) in the dorsal raphe dorsal subnucleus (DRD) and dorsal raphe caudal subnucleus (DRC); the total escape time and the number of non-serotonergic (Fos + / - TrpOH)-immunostained neurons in the lateral wings of the DR (lwDR) and the total escape time and the total number of Fos-immunoreactive (Fos +) neurons in the dorsomedial periaqueductal gray subnucleus (dmPAG) and dorsolateral periaqueductal gray subnucleus (dlPAG).

between escape time and the quantity of Fos-expressing cells within both dPAG nuclei. The engagement of the dPAG by this task is in agreement with the results of a previous study of our group also conducted in the elevated T-maze, but in animals without a prior exposure to the open arm before testing (Silveira et al., 2001). It has been shown that this pre-exposure shortens escape time, an effect that has been attributed to the habituation of behavioral reactions to novelty (Teixeira et al., 2000).

In the viPAG, while our data confirmed previous findings showing that it contains a moderate number of TrpOH-immunopositive neurons (Jacobs et al., 1984), they also revealed that these serotonergic cells were not engaged by escape performance. It is interesting to note that the number of Fos-immunopositive non-serotonergic cells within the viPAG was higher only in its mid-rostrorocaudal part, an area in close vicinity to the

lwDR, and tended to be negatively correlated with escape time.

Our findings with escape are in line with the proposal that neurons within the lwDR/viPAG are critically involved in modulation of fear/panic-associated stimuli. More specifically, Lowry and co-workers (see Hale et al., 2012) suggested that this area is the main source of serotonergic inhibitory innervation to key panic-related structures described in Deakin and Graeff's theory. This idea is supported by studies showing that rats exposed to an environment with high concentrations of CO₂ present a greater number of Fos-immunopositive 5-HT neurons, predominantly within the lwDR/viPAG (Johnson et al., 2005). Hypercapnia is a well-known panic-evoking stimulus in panic disorder patients (Griez et al., 1987). According to the authors, activation of these neurons resulted in 5-HT release into the dPAG with the consequent inhibition of ongoing panic-associated

responses. This would explain why in their experiments animals exposed to this panicogenic stimulus did not react with fight or flight-like behaviors, but instead remained mostly immobile. Interestingly, Johnson et al. (2008) also reported that in a group of pharmacologically-induced panic-prone rats (see details in Johnson and Shekhar, 2006), the systemic injection of sodium lactate, a compound that evokes panic attacks in panic disorder patients, but not healthy individuals (Liebowitz et al., 1985) causes panic-like autonomic and behavioral reactions. More importantly, they reported that this effect was accompanied by the expression of a greater number of Fos-immunopositive non-serotonergic neurons preponderantly within the lwDR/vIPAG. In control animals, lactate injection increased Fos expression in the same subregion, but in serotonergic cells, strengthening the view that the activation of this subset of serotonergic neurons serves to inhibit panic-like responses, presumably by its connection with structures such as the dPAG. The inhibitory effect of 5-HT within the dPAG has been consistently reported by ours and other research groups. For instance, intra-dPAG microinjection of 5-HT inhibits the escape response generated by the elevated T-maze or that evoked by electrical stimulation of the same midbrain region (Schutz et al., 1985; Zanoveli et al., 2005).

Our data do not allow conclusions on the neurochemical identity of the non-serotonergic neurons activated in response to escape expression. However, immunohistochemical studies show that the lwDR/vIPAG is particularly rich in GABAergic neurons (Calizo et al., 2011) and these cells can be activated by escape-oriented active coping responses. Thus, Roche et al. (2003) observed that rats submitted to a forced swimming task expressed a higher number of Fos-immunopositive GABAergic, but not serotonergic or glutamatergic neurons within the lwDR. Based on evidence that extracellular levels of 5-HT in certain stress-related regions innervated by the lwDR (e.g. lateral septum and amygdala) are decreased by acute swim stress (Kirby et al., 1995; Kirby and Lucki, 1997), it was hypothesized that the expression of active coping behaviors (e.g. swimming, climbing) during the test activates these lwDR GABAergic neurons. This, in turn, inhibits 5-HT neuronal activity in this subarea and 5-HT release in the forebrain regions mentioned above. This suggestion is compatible with evidence showing GABA exerts a tonic inhibitory control upon DR 5-HT cells (Gallager and Aghajanian, 1976).

In light of this idea, one intriguing possibility is that exposure to the open arm in our study may have also stimulated GABAergic interneurons in the lwDR/vIPAG, with the consequent inhibition of 5-HT neuronal activity and 5-HT release in the dPAG, which ultimately favored escape expression. However, it is important to highlight that in the lwDR, besides the existence of 5-HT and GABA neurons, populations of cells containing other neurotransmitters/neuromodulators, such as NO and CRF, are also described (Commons et al., 2003; Vasudeva et al., 2011). Therefore, there is also the possibility that the exposure to the open-arm may have

activated some of these cells which drove an excitatory input to the dPAG and/or other panic-associated areas that resulted in escape expression. Consistent with this idea is the observation that glutamate agonists and NO-donors in the dPAG evoke vigorous escape reactions (Beckett and Marsden, 1995; de Oliveira et al., 2001). Further studies to address the neurochemical phenotype(s) of cells engaged by the escape task are in progress.

Technical considerations

The present work used Fos protein immunostaining for functional anatomical mapping. Although this is supported by numerous studies (Dragunow and Faull, 1989; Silveira et al., 2001; Roche et al. 2003; Barth, 2007; Sperling and Commons, 2011), the lack of Fos expression in a given structure or subnucleus does not preclude neuronal activation with distinct transcriptional consequences (Hoffman et al., 1993; Chaudhuri, 1997; Kovács, 2008). In addition, a change in Fos expression does not necessarily indicate an alteration in electrophysiological properties of neuronal cells (Hoffman et al., 1993; Luckman et al., 1994; Kovács, 2008).

It is also important to acknowledge that neurons within the DR, MRN and PAG are not exclusively involved in defense regulation, but also in many other physiological processes such as thermo- and pain-regulation, cardiorespiratory function and locomotor activity (Jacobs and Fornal, 1993, 2010; Rossi et al., 1994; Behbehani, 1995; Hale et al., 2012). Therefore, increases in Fos-expression may be associated with changes in some of these regulatory mechanisms which may have occurred in parallel to the alterations observed in animals' behavior.

It is also noteworthy that animals of the avoidance group spent longer time in the test apparatus than the other two groups tested by us. It is therefore conceivable that some of the differences reported on brainstem cells activity reflect this discrepancy. However, this interpretation seems unlikely since further correlation analyses (data not shown) failed to demonstrate that in the escape group, the longer animals spent to withdrawal from the open arm, the closer their results were to those found in the avoidance group; i.e. the presence of a higher number of doubly labeled cells in the DRD, DRC and DRI. Neither of these analyses revealed that the shorter the avoidance time, the greater the number of non-5-HT cells in the lwDR.

Finally, although the present paper reports remarkable differences between the control and escape groups on DR and PAG neuronal activity, these two groups did not differ behaviorally (i.e. latencies to leave the T-maze were not significantly different). This question was previously addressed by our research group in a study aimed at the behavioral validation of the elevated T-maze. In that study (Zangrossi and Graeff, 1997) latencies to leave one of the enclosed arms of the enclosed T-maze (control task) or one of the open arms of the elevated T-maze (escape task)

were measured up to 8 times with 30-s intervals. As in the present paper, these groups did not differ from each other in the first trials, but with repetition, withdrawal latencies increased only in the control group, remaining unalterably low in the escape group. Therefore, while habituation seems to have taken place in the enclosed T-maze, the absence of such process in the open arm unveils the aversive motivation determined by this situation. It is noteworthy that in the validation study as in the present investigation, avoidance from the open arms in a group tested in the stem of the elevated T-maze was acquired already in the second trial. As a whole, these results indicate that different motivational drives determined locomotion in the three test conditions employed by us.

CONCLUSIONS

Altogether our results strongly corroborate the view that different subsets of neurons in the DR are activated by anxiety- and panic-relevant stimuli/situations. They are indicative that serotonergic neurons within the DRD, DRC and DRI, together with those in the MRN, are involved in processing of the former emotion, while non-serotonergic cells in the lwDR/vPAG are engaged in the latter.

Acknowledgements—This work was supported by CNPq and FAPESP, Brazil. The authors thank Afonso P. Padovan and Eleni T. Gomes for helpful technical support.

REFERENCES

- Azmitia EC, Segal M (1978) An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *J Comp Neurol* 179:641–667.
- Azmitia EC (1981) Bilateral serotonergic projections to the dorsal hippocampus of the rat: simultaneous localization of 3H-5HT and HRP after retrograde transport. *J Comp Neurol* 203:737–743.
- Barth AL (2007) Visualizing circuits and systems using transgenic reporters of neural activity. *Curr Opin Neurobiol* 15:567–571.
- Beckett S, Marsden CA (1995) Computer analysis and quantification of periaqueductal grey-induced defense behaviour. *J Neurosci Methods* 58:157–161.
- Behbehani MM (1995) Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. *Prog Neurobiol* 46:575–605.
- Blanchard DC, Griebel G, Blanchard RJ (2003) Conditioning and residual emotionality effects of predator stimuli: some reflections on stress and emotion. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27:1177–1185.
- Calizo LH et al (2011) Raphe serotonin neurons are not homogenous: electrophysiological, morphological and neurochemical evidence. *Neuropharmacology* 61:524–543.
- Chaudhuri A (1997) Neural activity mapping with inducible transcription factors. *Neuroreport* 8:3–8.
- Commons KG, Connolly KR, Valentino RJ (2003) A neurochemically distinct dorsal raphe-limbic circuit with a potential role in affective disorders. *Neuropsychopharmacology* 28:206–215.
- Deakin JWF, Graeff FG (1991) 5-HT and mechanisms of defense. *J Psychopharmacol* 5:305–315.
- De Oliveira RM, Del Bel EA, Guimarães FS (2001) Effects of excitatory amino acids and nitric oxide on flight behavior elicited from the dorsolateral periaqueductal gray. *Neurosci Biobehav Rev* 25:679–685.
- Dos Santos L, De Andrade TG, Zangrossi Jr H (2008) 5-HT1A receptors in the dorsal hippocampus mediate the anxiogenic effect induced by the stimulation of 5-HT neurons in the median raphe nucleus. *Eur Neuropsychopharmacol* 18:286–294.
- Dragunow M, Faull R (1989) The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. *J Neurosci Methods* 29:261–265.
- Gallager DW, Aghajanian GK (1976) Effect of antipsychotic drugs on the firing of dorsal raphe cells. II. Reversal by picrotoxin. *Eur J Pharmacol* 39:357–364.
- Gardner KL, Thiruvikraman KV, Lightman SL, Plotsky PM, Lowry CA (2005) Early life experience alters behavior during social defeat: focus on serotonergic system. *Neuroscience* 136:181–191.
- Graeff FG, Netto CF, Zangrossi Jr H (1998) The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. *Neurosci Biobehav Rev* 23:237–246.
- Graeff FG, Zangrossi Jr H (2002) Animal models of anxiety disorders. In: D'haenen H, Den Boer JA, Willner P, editors. *Biological Psychiatry*. London: John Wiley & Sons. p. 879–893.
- Grahn RE et al (1999) Activation of serotonin-immunoreactive cells in the dorsal raphe nucleus in rats exposed to an uncontrollable stressor. *Brain Res* 826:35–43.
- Gray JA, McNaughton N (2000) The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system. Oxford: Oxford University Press.
- Griez EJ, Lousberg H, Van Der Hout MA, Van Der Moed GM (1987) CO₂ vulnerability in panic disorder. *Psychiatry Res* 20:87–95.
- Hale MW 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* 157:733–748.
- Hale MW, Shekhar A, Lowry CA (2012) Stress-related serotonergic systems: implications for symptomatology of anxiety and affective disorders. *Cell Mol Neurobiol* 32:695–708.
- Hoffman GE, Smith MS, Verbalis JG (1993) C-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine system. *Front Neuroendocrinol* 14:173–213.
- Jacobs BL, Fornal CA (1993) 5-HT and motor control: a hypothesis. *Trends Neurosci* 16:346–352.
- Jacobs BL, Fornal CA (2010) Activity of brain serotonergic neurons in relation to physiology and behavior. In: Müller CP, Jacobs BL, editors. *Handbook of the behavioral neurobiology of serotonin*. San Diego: Elsevier. p. 153–162.
- Jacobs BL, Gannon PJ, Azmitia EC (1984) Atlas of serotonergic cell bodies in the cat brainstem: an immunocytochemical analysis. *Brain Res Bull* 13:1–31.
- 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. *J Psychopharmacol* 22:642–652.
- Johnson PL, Hollis JH, Moratalla R, Lightman SL, Lowry CA (2005) Acute hypercarbic gas exposure reveals functionally distinct subpopulations of serotonergic neurons in rats. *J Psychopharmacol* 19:327–341.
- Johnson PL, Shekhar A (2006) Panic-prone state induced in rats with GABA dysfunction in the dorsomedial hypothalamus is mediated by NMDA receptors. *J Neurosci* 26:7093–7104.
- Kirby LG, Lucki I (1997) Interaction between the forced swimming test and fluoxetine treatment on extracellular 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 282:967–976.
- Kirby LG, Allen AR, Lucki I (1995) Regional differences in the effects of forced swimming on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid. *Brain Res* 682:189–196.
- Kovács KJ (2008) Measurement of immediate-early gene activation – c-fos and beyond. *J Neuroendocrinol* 20:665–672.
- Liebowitz MR et al (1985) Lactate provocation of panic attacks. II. Biochemical and physiological findings. *Arch Gen Psychiatry* 42:709–719.
- Lowry CA, Lightman SL, Nutt DJ (2009) That warm fuzzy feeling: brain serotonergic neurons and the regulation of emotion. *J Psychopharmacol* 23:392–400.

- Lowry CA et al (2008) Serotonergic system, anxiety, and affective disorder: focus on the dorsomedial part of the dorsal raphe nucleus. *Ann N Y Acad Sci* 1148:86–94.
- Luckman SM, Dyball RE, Leng G (1994) Induction of c-fos expression in hypothalamic magnocellular neurons requires synaptic activation and not simply increased spike activity. *J Neurosci* 14:4825–4830.
- Moore RY, Halaris AE (1975) Hippocampal innervations by serotonin neurons of the midbrain raphe in the rat. *J Comp Neurol* 164:171–183.
- Paul ED, Hale MW, Lukkes JL, Valentine MJ, Sarchet DM, Lowry CA (2011) Repeated social defeat increases reactive emotional coping behavior and alters functional responses in serotonergic neurons in the rat dorsal raphe nucleus. *Physiol Behav* 104:272–282.
- Paxinos G, Watson C (2007) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 6th ed. San Diego: Elsevier Academic Press.
- Phillipson OT (1979) Afferent projections to the ventral tegmental area of Tsai and interfascicular nucleus: a horseradish peroxidase study in the rat. *J Comp Neurol* 187:117–143.
- Roche M, Commons KG, Peoples A, Valentino RJ (2003) Circuitry underlying regulation of the serotonergic system by swim stress. *J Neurosci* 23:970–977.
- Rossi F, Maione S, Berrino L (1994) Periaqueductal gray area and cardiovascular function. *Pharmacol Res* 29:27–36.
- Schutz MTB, Aguiar JC, Graeff FG (1985) Anti-aversive role of serotonin in the dorsal periaqueductal grey matter. *Psychopharmacol* 85:340–345.
- Silveira MC, Zangrossi H, De Barros Viana M, Silveira R, Graeff FG (2001) Differential expression of Fos protein in the rat brain induced by performance of avoidance or escape in the elevated T-maze. *Behav Brain Res* 126:13–21.
- Sperling R, Commons KG (2011) Shifting topographic activation and 5-HT1A receptor-mediated inhibition of dorsal raphe serotonin neurons produced by nicotine exposure and withdrawal. *Eur J Neurosci* 33:1866–1875.
- Staub DR, Evans AK, Lowry CA (2006) Evidence supporting a role for corticotrophin-releasing factor type 2 (CRF2) receptors in the regulation of subpopulations of serotonergic neurons. *Brain Res* 1070:77–89.
- Teixeira RC, Zangrossi H, Graeff FG (2000) Behavioral effects of acute and chronic imipramine in the elevated T-maze model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 65:571–576.
- Treit D, Menard J, Royan C (1993) Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 44:463–469.
- Vasudeva RK, Lin RC, Simpson KL, Waterhouse BD (2011) Functional organization of the dorsal raphe efferent system with special consideration of nitroergic cell groups. *J Chem Neuroanat* 41:281–293.
- Vertes RPA (1991) PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 313:643–668.
- Vicente MA, Zangrossi H (2011) Serotonin-2C receptors in the basolateral nucleus of the amygdala mediate the anxiogenic effect of acute imipramine and fluoxetine administration. *Int J Neuropsychopharmacol* 14:1–12.
- Zangrossi Jr H, Graeff Jr FG (1997) Behavioral validation of the elevated T-maze, a new animal model of anxiety. *Brain Res Bull* 44:1–5.
- Zanoveli JM, Nogueira RL, Zangrossi Jr H (2005) Chronic imipramine treatment sensitizes 5-HT1A and 5-HT2A receptors in the dorsal periaqueductal gray matter: evidence from the elevated T-maze test of anxiety. *Behav Pharmacol* 16:543–552.

(Accepted 25 September 2012)
(Available online xxxx)