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

Heloísa Helena Vilela Costa

**Envolvimento de diferentes sub-regiões do núcleo dorsal da
rafe no mecanismo de ação antipânico de fármacos
antidepressivos**

Ribeirão Preto
2017

HELOÍSA HELENA VILELA COSTA

**Envolvimento de diferentes sub-regiões do núcleo dorsal da
rafe no mecanismo de ação antipânico de fármacos
antidepressivos**

Tese de doutorado apresentada
a 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 Júnior

**Ribeirão Preto
2017**

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

Ficha Catalográfica

Vilela-Costa, Heloísa Helena

Envolvimento de diferentes sub-regiões do núcleo dorsal da rafe no mecanismo de ação antipânico de fármacos antidepressivos. Ribeirão Preto, 2017.

119 p.

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

Orientador: Zangrossi Júnior, Hélio.

1. Fluoxetina. 2. Imipramina. 3. Pânico.
4. Núcleo dorsal da rafe. 5. Receptor 5-HT_{1A}

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Vilela-Costa, Heloísa Helena

Título: Envolvimento de diferentes sub-regiões do núcleo dorsal da rafe no mecanismo de ação antipânico de fármacos antidepressivos

Tese de doutorado apresentada a 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 Júnior

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. Hélio Zangrossi Júnior

Instituição: FMRP-USP

Assinatura: _____

Prof. Dr.

Instituição:

Assinatura: _____

Prof. Dr.

Instituição:

Assinatura: _____

Prof. Dr.

Instituição:

Assinatura: _____

Prof. Dr.

Instituição:

Assinatura: _____

Dedico esta tese ao meu noivo Murilo pela paciência, companheirismo, apoio ao longo do período de realização desse trabalho e pelo amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Hélio Zangrossi Júnior, pela oportunidade, confiança e orientação.

Aos professores que ajudaram a compor a banca examinadora: Dr. Norberto C. Coimbra, Dr. Norberto G. Cairasco, Dra. Rúbia M. M. W. de Oliveira e Dr. Ricardo L. N. de Souza, obrigada por aceitarem participar da discussão deste trabalho.

Aos professores do departamento de farmacologia da FMRP que contribuíram para minha formação acadêmico-científica.

Ao Afonso Paulo Padovan, pelo suporte técnico e companheirismo.

À Gislaine P. M. Marques, Waldik Ramon, Sonia M. Stefanelli e Fátima H. Petean pela disponibilidade, atenção e paciência.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

Aos meus supervisores da Alemanha, Olívia e Stefan, pela confiança e oportunidade incrível de compartilhar ciência.

Aos amigos do laboratório da Alemanha pela receptividade, amizade e por preencherem o vazio nos momentos de saudade de casa. A Alemanha é um encanto!

Aos amigos do laboratório no Brasil. Obrigada pela convivência no trabalho e pelos momentos de descontração, além das ajudas nos experimentos:

Ao Ailton pelos ensinamentos e produtivas discussões científicas.

À Thati pelos conselhos e por me fazer enxergar a ciência de um jeito diferente.

Ao Roger pela alegria e leveza mesmo durante momentos difíceis.

À Rosaninha por ser um exemplo de pureza e pelo carinho que sempre teve comigo.

À Daiane pela serenidade que serve de exemplo para nós.

Por fim, aos meus amigos mais próximos e amados: Ana, Alana e Léo.

Obrigada pelas conversas intermináveis, desabafos e risadas. Vocês alegraram e espero que continuem alegrando meus dias. Vocês fazem parte da minha vida. São pessoas muito especiais pra mim.

Aos amigos da pós-graduação, pelos bate-papos nos corredores me mostrando que estávamos todos no mesmo barco.

Aos amigos da vida por vibrarem comigo em cada etapa e entenderem meus momentos ausência.

À minha família pelo apoio e por acreditarem e torcerem sempre por mim. Vó, mãe, pai, Pedro e Paulo – faço tudo por vocês, amo vocês!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Labirinto T fechado e labirinto em T elevado.

Figura 2. Fotomicrografia (magnificação 10x) ilustrando secção coronal do NDR de um animal tratado com fluoxetina e submetido à tarefa de fuga no labirinto em T elevado.

Figura 3. Fotomicrografia (magnificação 10x) ilustrando secções coronais do NDR processadas pelo método imunoistoquímico para detecção da proteína Fos e TPH.

Figura 4. Genotipagem - PCR. Gel de eletroforese representativo com sequências de DNA representadas como bandas, comparadas ao padrão de peso molecular.

Figura 5. *Set-up* utilizado para as análises eletrofisiológicas.

Figura 6. Visualização da região do NDR e neurônios serotonérgicos registrados.

Figura 7. Fotomicrografia representativa de um neurônio serotonérgico registrado localizado nas asas laterais do DR.

Figura 8. Esquema representativo dos protocolos realizados com as drogas utilizadas para o desafio das secções encefálicas.

Figura 9. Ilustração do potencial de ação e indicação das propriedades ativas intrínsecas da membrana avaliadas.

Figura 10. Efeito do tratamento i.p. com veículo ou fluoxetina aguda e cronicamente (21 dias) sobre o comportamento de ratos submetidos à tarefa de fuga no labirinto em T elevado e ao labirinto em T fechado.

Figura 11. Efeito do tratamento i.p. com veículo ou fluoxetina aguda e cronicamente (21 dias) sobre o comportamento de ratos submetidos à tarefa de fuga no labirinto em T elevado e ao labirinto em T fechado (LTF). Soma das latências.

Figura 12. Média $\pm$ EPM do número total de células Fos imunorreativas (Fos-IR) quantificadas em diferentes sub-regiões do NDR de ratos submetidos ao labirinto em T fechado ou à tarefa de fuga no labirinto em T elevado de animais tratados com veículo ou fluoxetina aguda e cronicamente.

Figura 13. Média $\pm$ EPM do número total de duplas marcações - células Fos e TPH imunorreativas (Fos+TPH-IR) - quantificadas em diferentes sub-regiões do NDR de ratos submetidos ao labirinto em T fechado ou à tarefa de fuga no labirinto em T elevado de animais tratados com veículo ou fluoxetina aguda e cronicamente.

Figura 14. Efeito do tratamento i.p. com veículo ou imipramina aguda e cronicamente (21 dias) sobre o comportamento de ratos submetidos à tarefa de fuga no labirinto em T elevado e ao labirinto em T fechado (LTF).

Figura 15. Efeito do tratamento i.p. com veículo ou imipramina aguda e cronicamente (21 dias) sobre o comportamento de ratos submetidos à tarefa de fuga no labirinto em T elevado e ao labirinto em T fechado (LTF). Soma das latências.

Figura 16. Média $\pm$ EPM do número total de células Fos imunorreativas (Fos-IR) quantificadas em diferentes sub-regiões do NDR de ratos submetidos ao labirinto em T

fechado ou à tarefa de fuga no labirinto em T elevado de animais tratados com veículo ou imipramina aguda e cronicamente.

Figura 17. Média $\pm$ EPM do número total de duplas marcações - células Fos e TPH imunorreativas (Fos+TPH-IR) - quantificadas em diferentes sub-regiões do NDR de ratos submetidos ao labirinto em T fechado ou à tarefa de fuga no labirinto em T elevado de animais tratados com veículo ou imipramina aguda e cronicamente.

Figura 18. Efeito do tratamento i.p. com veículo ou imipramina aguda e cronicamente (21 dias) sobre o comportamento de ratos submetidos à tarefa de esquiva inibitória no labirinto em T elevado e ao labirinto em T fechado (LTF).

Figura 19. Média $\pm$ EPM do número total de células Fos imunorreativas (Fos-IR) quantificadas em diferentes sub-regiões do NDR de ratos submetidos ao labirinto em T fechado ou à tarefa de esquiva inibitória no labirinto em T elevado de animais tratados com veículo ou imipramina aguda e cronicamente.

Figura 20. Média $\pm$ EPM do número total de duplas marcações - células Fos e TPH imunorreativas (Fos+TPH-IR) - quantificadas em diferentes sub-regiões do NDR de ratos submetidos ao labirinto em T fechado ou à tarefa de esquiva inibitória no labirinto em T elevado de animais tratados com veículo ou imipramina aguda e cronicamente.

Figura 21. Efeitos do tratamento com veículo ou fluoxetina aguda ou cronicamente sobre as propriedades passivas da membrana.

Figura 22. Taxa de disparo dos neurônios serotoninérgicos registrados nas asas laterais do NDR de animais tratados sistemicamente com veículo ou fluoxetina aguda e cronicamente. Atividade espontânea (0pA) e desafio das secções encefálicas com 8-OH-DPAT e WAY-100635

Figura 23. Taxa de disparo dos neurônios serotoninérgicos registrados nas asas laterais do NDR de animais tratados sistemicamente com veículo ou fluoxetina aguda e cronicamente. Atividade espontânea (0pA) e desafio das secções encefálicas com ML297.

Figura 24. Corrente induzida a -110mV na condição basal e após desafio com bloqueadores de canais de cálcio e sódio, Cd+TTX, em grupos tratados com veículo ou fluoxetina aguda e cronicamente.

RESUMO

Vilela-Costa, Heloísa Helena. **Envolvimento de diferentes sub-regiões do núcleo dorsal da rafe no mecanismo de ação antipânico de fármacos antidepressivos**. 2017. 128 f. Tese de doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto, 2017.

Diversas evidências indicam que o núcleo dorsal da rafe (NDR), principal fonte de inervação serotoninérgica para estruturas límbicas, é uma estrutura heterogênea composta por populações de neurônios serotoninérgicos anatômica e funcionalmente distintas, as quais têm sido diferentemente implicadas na fisiopatologia dos transtornos de ansiedade, como o transtorno do pânico. Fármacos antidepressivos são a primeira escolha para o tratamento de tais transtornos e o atraso para a manifestação dos efeitos terapêuticos desses fármacos tem sido, consistentemente, associado a alterações na neurotransmissão serotoninérgica. Entretanto, ainda é desconhecido se estas alterações podem ser heterogêneas entre as diferentes sub-regiões do NDR e é este o foco de investigação do presente estudo. Inicialmente, foi investigado o perfil de ativação neuronal das diferentes sub-regiões do NDR, através da avaliação da expressão de proteína Fos, em ratos submetidos à tarefa de fuga no modelo do labirinto em T elevado, após administração aguda ou crônica com a fluoxetina ou a imipramina. Nestes mesmos animais, foram também avaliados o número de células triptofano hidroxilase positivas. Para fins comparativos, o efeito do tratamento com a imipramina em animais submetidos à esquivas inibitórias também foi avaliado. A análise imunoistoquímica indicou que a tarefa de fuga promoveu um aumento na expressão da proteína Fos em neurônios não-serotoninérgicos localizados na sub-região das asas laterais do NDR. Efeito este que não foi observado em animais tratados cronicamente com a fluoxetina e a imipramina. Além disso, o tratamento prolongado com a fluoxetina, mas não com a imipramina, foi capaz de aumentar a ativação de neurônios serotoninérgicos nesta mesma sub-região. Diferente do que foi observado na tarefa de fuga, a tarefa de esquivas inibitórias promoveu um aumento na ativação de neurônios serotoninérgicos nas sub-regiões DRC, DRD e DRV. Perfil que não foi observado nos grupos aguda e cronicamente tratados com imipramina. Além disso, somente o tratamento prolongado com a imipramina promoveu uma diminuição no recrutamento de neurônios não-serotoninérgicos em diversas sub-regiões do NDR. Diante do resultado imunoistoquímico observado no experimento com a fluoxetina, avaliamos a participação dos autorreceptores 5-HT_{1A} das asas laterais no efeito observado. Através da técnica *whole-cell patch clamp*, em uma linhagem de camundongos transgênicos que apresenta neurônios serotoninérgicos fluorescentes, foi avaliada a responsividade destes receptores após o tratamento com a fluoxetina. Os resultados indicam que os animais tratados cronicamente com fluoxetina apresentam aumento na excitabilidade basal com diminuída sensibilidade ao agonista de receptores 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT. Assim, é possível sugerir que o efeito antipânico da fluoxetina administrada cronicamente parece estar relacionado com uma redução na

ativação de neurônios não-serotonérgicos e um aumento no recrutamento de neurônios serotonérgicos localizados nas asas laterais, sendo que esta última pode ser explicada pela dessensibilização dos autorreceptores 5-HT_{1A}.

Com relação à imipramina, é possível sugerir que o efeito panicolítico promovido pelo tratamento prolongado pode ser devido à diminuição no recrutamento de neurônios não-serotonérgicos das asas laterais. Já para o efeito ansiolítico, tanto a diminuição no recrutamento de neurônios não-serotonérgicos em diferentes sub-regiões do NDR, quanto a diminuição na ativação de neurônios serotonérgicos no DRC, DRD e DRV parecem estar envolvidas.

Palavras-chave: Antidepressivo. Pânico. Núcleo dorsal da rafe. Receptor 5-HT_{1A}

ABSTRACT

Vilela-Costa, Heloísa Helena. **Involvement of different subregions of the dorsal raphe nucleus in the anti-panic action mechanism of antidepressant drugs.** 2017. 128 f. PhD thesis (doctor degree) – School of Medicine of Ribeirão Preto – University of São Paulo – Ribeirão Preto, 2017.

A wealth of evidence indicates that the dorsal raphe nucleus (DR) is a heterogeneous structure, composed of anatomically and functionally distinct populations of serotonergic neurons, which have been differently implicated in the pathophysiology of anxiety, such as panic disorder. Antidepressant drugs are the first choice in treatment of anxiety disorders, and the delay for the therapeutic effect have consistently been associated with changes in serotonergic neurotransmission within the DR. However, it is unknown whether these alterations can be heterogeneous among the different subregions of the DR, and this is the focus of investigation of the present study. First, it was investigated the profile of neuronal activation of different subregions of the DR – by using the evaluation of Fos protein expression of rats exposed to the escape task in the elevated T-maze test, after acute or chronic administration of fluoxetine or imipramine. In the same animals, it was also investigated the number of positive triptophan hydroxylase cells. For comparative reasons, it was evaluated the behavioral and immunohistochemical effects of imipramine treatment on inhibitory avoidance acquisition in the elevated T-maze, a response associated with anxiety. The results of the immunohistochemical analysis indicated that animals exposed to escape behavior exhibited higher expression of Fos protein in non-serotonergic neurons in the DR lateral wings. This effect was not observed in fluoxetine or imipramine chronically treated animals. Moreover, chronic treatment with fluoxetine, but not imipramine, was able to increase the activation of serotonergic neurons on this subregion. On the other hand, the inhibitory avoidance task promoted an increase in the activation of serotonergic neurons in the sub-regions DRC, DRD, and DRV. This profile was not observed after acute or chronic treatment with imipramine. Additionally, only the long-term treatment with imipramine showed a decrease in the activation of non-serotonergic neurons in different subregions of the DR. Based on the results obtained with fluoxetine experiment, we evaluated the role of the 5-HT_{1A} autoreceptors located in the lateral wings. For this, we used the whole-cell patch clamp technique in a transgenic mouse line, which exhibit fluorescence in serotonergic neurons. The results indicate that the animals treated chronically with fluoxetine presented an increase in the basal excitability, with lower responsivity to the 5-HT_{1A} agonist – 8-OH-DPAT. Altogether, the results suggest that the anti-panic effect caused by chronic fluoxetine treatment is associated with a reduction in the activation of non-serotonergic neurons, and an increase in the recruitment of non-serotonergic neurons in lateral wings. This last observation seems to be related to a 5-HT_{1A} autoreceptor desensitization in the lateral wings. Regarding imipramine, this

panicolytic effect caused by chronic administration of this drug seems to be related to a decreased activation of the non-serotonergic neurons in the lateral wings. Finally, the anxiolytic effect, of imipramine may be associated to a decrease in the recruitment of non-serotonergic neurons in different DR subregions, allied with a decreased activation of serotonergic neurons in the DRC, DRD and DRV.

Key words: Antidepressant. Panic. Dorsal raphe nucleus. 5-HT_{1A} receptor.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
1.1 Ansiedade	7
1.2 Comportamentos defensivos	8
1.3 Serotonina e comportamentos defensivos	12
1.4 Tratamento farmacológico dos transtornos de ansiedade	14
1.5 Núcleo dorsal da rafe	18
1.6 Receptores 5-HT1A	22
2. OBJETIVO GERAL	27
2.1 Objetivos específicos	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
<i>Estudos imunoistoquímicos</i>	28
3.1 Animais	28
3.2 Drogas	28
3.3 Aparatos	29
3.4 Procedimentos	30
<i>Grupos experimentais</i>	30
<i>Avaliação comportamental</i>	31
<i>Perfusão</i>	32
<i>Histologia</i>	33
<i>Imunoistoquímica para proteína Fos e triptofano hidroxilase</i>	33
<i>Análise e quantificação</i>	35
3.5 Análise estatística	39
<i>Estudos eletrofisiológicos</i>	40
3.6 Animais	40
3.7 Drogas	40
3.8 Genotipagem	41
3.9 Procedimentos	43
<i>Grupos experimentais</i>	43
<i>Preparação do tecido</i>	44
<i>Identificação da região das asas laterais do NDR e</i> <i>visualização dos neurônios serotoninérgicos (YFP positivos)</i>	45
<i>Whole-cell patch-clamp</i>	49

<i>Protocolos experimentais</i>	51
<i>Registros eletrofisiológicos</i>	51
3.10 Análise estatística	53
4. RESULTADOS	55
4.1 Estudos imunoistoquímicos	55
<i>Efeito do tratamento com fluoxetina sobre a resposta de fuga e sobre o perfil de ativação neuronal no NDR</i>	55
<i>Efeito do tratamento com imipramina sobre a resposta de fuga e sobre o perfil de ativação neuronal no NDR</i>	63
<i>Efeito do tratamento com fluoxetina sobre a resposta de esquivas inibitórias sobre o perfil de ativação neuronal no NDR</i>	71
4.2 Estudos eletrofisiológicos	77
<i>Efeito do tratamento com fluoxetina sobre as propriedades passivas da membrana na medida basal</i>	77
<i>Efeito do tratamento com fluoxetina sobre as propriedades do potencial de ação na medida basal</i>	78
<i>Efeito do tratamento com fluoxetina sobre a taxa de disparo - Envolvimento dos autorreceptores 5-HT_{1A}</i>	80
5. DISCUSSÃO	83
6. CONCLUSÕES	103
ANEXO I	104
ANEXO II	105
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107

1. INTRODUÇÃO

1.1 Ansiedade

A ansiedade é um estado emocional caracterizado por alterações comportamentais, fisiológicas e cognitivas, que resultam em uma experiência desconfortável. Embora seja normalmente vivenciada e favoreça o bom desempenho do indivíduo em tarefas cognitivas e motoras, pode apresentar-se de maneira constante e exacerbada, interferindo na execução de tarefas cotidianas e, neste caso, é considerada patológica (Barlow, 1988; Graeff, 2004).

Com o objetivo de tornar mais clara a classificação e auxiliar no diagnóstico da ansiedade patológica, alguns critérios, baseados na sintomatologia apresentada, foram adotados pela Associação de Psiquiatria Americana (APA). De acordo com o Manual de Diagnóstico e Estatística dos Distúrbios Mentais (DSM V; Apa, 2013), os transtornos de ansiedade são classificados em: transtorno de ansiedade de separação, mutismo seletivo, fobia social, transtorno do pânico, ataques de pânico específico, agorafobia, transtorno de ansiedade generalizada (TAG), transtorno de ansiedade induzido por substâncias ou medicamentos, transtornos de ansiedade devido à condição médica, transtorno de ansiedade com outras especificações e transtorno de ansiedade não especificado.

Dentre os transtornos citados, o transtorno do pânico (TP) é o de particular interesse para o presente trabalho. O TP é um transtorno de ansiedade caracterizado pela recorrência de ataques de pânico inesperados e recorrentes. Os ataques de pânico consistem em curtos períodos de intenso medo e

desconforto, seguidos por quatro ou mais sintomas físicos, dentre eles: a falta de ar, a taquicardia, tonturas e o medo de morrer (Apa, 2013). Estima-se que a prevalência de TP na população norte-americana seja de 6,5% ao longo da vida (Kessler et al., 2012), e um estudo realizado na cidade de São Paulo mostra que, em um ano, 1,1% da população é acometida pelo TP, sendo que 56,6% desses pacientes apresentam a patologia com nível de elevada severidade (Andrade et al., 2012). Trata-se de uma patologia crônica, muitas vezes incapacitante e observa-se que os pacientes geralmente procuram vários atendimentos clínicos até que o diagnóstico de TP seja feito, e em função destes fatores, o TP está associado a elevados custos econômicos (Salum et al., 2009). É importante destacar que, no Brasil, os transtornos mentais de uma forma geral mantêm-se como a terceira principal causa de concessão de benefício auxílio-doença pelo sistema previdenciário (Silva-Junior e Fischer, 2014).

A fisiopatologia e mecanismo de ação de fármacos utilizados no tratamento do TP ainda não estão totalmente elucidados, e grande parte do conhecimento atual é derivado de observações experimentais empregando animais de laboratório

1.2 Comportamentos defensivos

A correlação entre as emoções humanas e as respostas emitidas por animais tem sido feita com base na proposta evolutiva de Charles Darwin, publicada em seu livro *The Expression of Emotions in Man and Animals* (1872). Neste livro, Darwin descreve o comportamento emocional sob um paradigma biológico e prepara o cenário para estudos sistemáticos e comparativos de

comportamentos animais. Sob esta perspectiva evolutiva, os transtornos de ansiedade teriam suas raízes nos comportamentos defensivos dos animais expressos frente a situações ou estímulos que representam ameaça ou perigo (Graeff, 2008).

Um exemplo dessa abordagem é o trabalho realizado pelo grupo liderado pelo casal Robert e Caroline Blanchard (Blanchard et al., 1986), através da observação experimental de diferentes estratégias defensivas desempenhadas por roedores selvagens ou criados em laboratório em resposta a diferentes tipos de estímulos ameaçadores. Com base nos estudos desse grupo, surge o conceito de níveis de defesa, o qual é fundamental para estabelecer a relação entre a resposta defensiva exibida pelos animais e os transtornos de ansiedade em humanos.

Mais especificamente, os pesquisadores classificaram as respostas defensivas desempenhadas pelos animais de acordo com o nível de ameaça ao qual eram submetidos, determinado pela presença ou ausência do predador e pela distância que se encontram da presa. O primeiro nível, representado por uma ameaça potencial, ou seja, pela incerteza da existência do perigo, gera a resposta de exploração cautelosa voltada para a avaliação de risco. No segundo nível, denominado de ameaça distal, o qual ocorre quando o perigo é real, mas o predador se apresenta a certa distância da presa, o animal pode ficar tenso e imóvel com o intuito de não ser detectado pelo predador ou tentar escapar da situação expressando a resposta de fuga. Por fim, no terceiro nível, quando o predador está muito próximo ou até em contato com a presa, caracterizando uma ameaça proximal, ocorrem tentativas explosivas de fuga ou respostas de agressão defensiva (Blanchard et al., 1986; 1993).

A extrapolação dos comportamentos observados em roedores para os exibidos por seres humanos é complicada, devido à influência cultural exercida sobre a conduta do homem na sociedade. Entretanto, estudos têm identificado semelhanças nas estratégias de defesa adotadas por humanos, além de similares estruturas encefálicas recrutadas em determinadas situações aversivas, quando comparados com roedores (Shuhama et al., 2007). Por exemplo, foram realizados estudos com voluntários utilizando-se cenários imaginários compostos por diferentes situações ameaçadoras, diante das quais dever-se-ia escolher uma resposta defensiva adequada. Assim como nos estudos em roedores, diferentes respostas defensivas foram escolhidas dependendo das características das ameaças, como, por exemplo, fuga em situações de ameaça real e intensa (Blanchard et al., 2001; Shuhama et al., 2008).

Adicionalmente, um estudo realizado por Mobbs e colaboradores (2007) utilizando realidade virtual, juntamente com análise por imagem através de ressonância magnética funcional, indicou que as estruturas encefálicas de defesa ativadas nos voluntários são semelhantes às recrutadas em roedores, sendo influenciadas pela distância em que o predador se encontra. Quando a ameaça localizava-se distante, o córtex pré-frontal e amígdala lateral foram as regiões ativadas. Conforme o predador se aproximava, a substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPD) foi a estrutura de destaque recrutada, havendo, inclusive, uma correlação positiva entre a ativação da SCPD e a sensação de medo descrita pelos voluntários.

Os resultados descritos dão suporte à descrição de que o substrato neural envolvido nos níveis de defesa seria distinto. Acredita-se que o padrão

de resposta exibido quando a ameaça é potencial e distante envolveria a ativação de estruturas prosencefálicas, como por exemplo, o complexo amigdalóide, o sistema septo-hipocampal e o córtex pré-frontal, as quais estariam envolvidas com respostas relacionadas à ansiedade (Gray e McNaughton, 2000; McNaughton e Corr, 2004). Por outro lado, a expressão do comportamento de fuga parece estar diretamente relacionada com a ativação de estruturas periventriculares, como a SCPD e hipotálamo medial, que estaria relacionada com o pânico (Fernandez de Molina e Hunsperger, 1959; Nashold et al., 1969; Graeff, 2002; McNaughton e Corr, 2004).

Além da ativação de diversos substratos neurais específicos, vários neurotransmissores têm sido implicados na modulação dos comportamentos defensivos, como por exemplo: o ácido gama-aminobutírico (GABA), o glutamato, o óxido nítrico, a colecistocinina, o fator liberador de corticotrofina (CRF) e a serotonina (5-HT) (Graeff, 1994, 2002; Zangrossi et al., 2001; Carobrez et al., 2001; de Oliveira et al., 2001; Molchanov e Guimarães, 2002). Contudo, a extensa utilização de drogas que interferem com a neurotransmissão serotoninérgica no tratamento de transtornos de ansiedade tem impulsionado a investigação a respeito do envolvimento desse neurotransmissor na elaboração de respostas defensivas relacionadas à ansiedade e ao pânico (Kahn et al., 1986; Graeff, 1994; 2004; Argyropoulos et al., 2000; Gray e McNaghton, 2000; Zangrossi et al., 2001; Baldwin et al., 2005; para revisão ver Graeff e Zangrossi, 2010).

1.3 Serotonina e comportamentos defensivos

A 5-HT é uma indolamina sintetizada a partir da hidroxilação do aminoácido essencial L-triptofano pela enzima triptofano hidroxilase, 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 e Hensler, 1999). A síntese da 5-HT é limitada às células que contêm a enzima triptofano hidroxilase e, no sistema nervoso central, é encontrada em sete núcleos específicos, localizados no tronco cerebral, denominados de núcleos da rafe.

As primeiras evidências de que a serotonina teria papel na regulação de respostas defensivas foram obtidas a partir de estudos conduzidos em modelos animais que envolvem conflito. Nesses modelos o comportamento operante do animal é, ao mesmo tempo, mantido pela apresentação de uma recompensa e suprimido pela apresentação de estímulos aversivos, por exemplo, choques elétricos (Geller e Seftel, 1960).

Nos modelos de conflito foi demonstrado que intervenções que resultavam em redução da neurotransmissão serotoninérgica eram capazes de aumentar a expressão de respostas punidas, indicando que a serotonina possuía um papel ansiogênico (Robichaud e Sledge, 1969; Geller e Blum, 1970; Graeff e Schoenfeld, 1970; Wise et al., 1972). Por outro lado, em outro modelo utilizado para o estudo de comportamentos defensivos expressos por animais, a estimulação elétrica da SCPD, a serotonina possuía efeito anti-aversivo, uma vez que tratamentos farmacológicos que reduzem a neurotransmissão

serotonérgica promoviam a facilitação da resposta de fuga (Schenberg e Graeff, 1978; Kiser et al., 1978; Kiser e Lebovitz, 1975)

Tais evidências conflitantes obtidas em modelos animais, somado a estudos experimentais realizados em humanos direcionando para observações semelhantes (Guimarães et al., 1997), levaram os pesquisadores Deakin e Graeff (1991) a propor qual seria, enfim, o papel da 5-HT na ansiedade. Os pesquisadores levaram em consideração as observações de que ameaças proximais e distais evocam diferentes respostas defensivas comportamentais, as quais seriam mediadas por diferentes componentes de um sistema cerebral básico de aversão e que esse sistema é modulado de maneira diferente pela 5-HT. Diante disso, foi proposto 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.

De acordo com Deakin e Graeff (1991), haveria duas vias serotonérgicas distintas, originadas do núcleo dorsal da rafe (NDR, ver maiores considerações sobre este núcleo abaixo), que participam da regulação de respostas de defesa frente a estímulos aversivos. Mais especificamente, diante de estímulos que sinalizavam ameaça potencial, uma ativação do NDR aumentaria os níveis de ansiedade devido ao acréscimo na liberação de 5-HT em áreas prosencefálicas como o complexo amigdalóide e o córtex cerebral. Por outro lado, o aumento na liberação de 5-HT em uma área periventricular específica, a SCPD, prejudicaria a expressão da resposta de fuga desencadeada por ameaças reais ou proximais.

Além disto, esta construção teórica, conhecida como o papel dual de serotonina na ansiedade foi estendida para abranger a ansiedade patológica, levando os autores a propor que disfunções destas vias estariam envolvidas na

neurobiologia do transtorno de ansiedade e pânico (Deakin e Graeff, 1991; para revisão ver Graeff e Zangrossi, 2010; Deakin, 2013).

1.4 Tratamento farmacológico dos transtornos de ansiedade

No início dos anos 60, os fármacos benzodiazepínicos foram introduzidos na terapêutica, apresentando um grande avanço no tratamento de transtornos de ansiedade (Nemeroff, 2003; López-Muñoz et al., 2011). Esses fármacos potencializam as ações do neurotransmissor inibitório GABA, ao interagirem com o sítio benzodiazepínico localizado no complexo receptor GABA_A, aumentando a frequência de abertura dos canais de cloreto mediada pelo GABA (Rang et al., 2016). Embora eficazes, os fármacos benzodiazepínicos apresentam restrições de uso como: desenvolvimento de síndrome de abstinência, elevado potencial de abuso e desencadeamento de tolerância se administrados continuamente (López-Muñoz et al., 2011).

Diante destas restrições, surge a busca por novos ansiolíticos desprovidos dos efeitos indesejáveis dos benzodiazepínicos, porém com eficácia clínica comparável. Nesse cenário, o reconhecimento das propriedades ansiolíticas dos fármacos antidepressivos (ADs) representou um avanço no tratamento dos diferentes transtornos de ansiedade, abrindo caminho para novas abordagens farmacológicas.

Uma das classes de antidepressivos utilizadas no tratamento da ansiedade é a dos ADs tricíclicos, que tem como protótipo, a imipramina. Originalmente proposta como um antipsicótico, a imipramina foi capaz de promover melhora significativa no humor de pacientes diagnosticados com

psicose depressiva, após algumas semanas de tratamento, levantando a possibilidade de que a imipramina poderia ter um efeito terapêutico antidepressivo (para revisão, ver López-Muñoz e Álamo, 2009).

Além disso, a imipramina se mostrou eficaz em diminuir crises agudas de ansiedade em uma amostra de pacientes que apresentavam os denominados “ataques de ansiedade” (Klein e Fink, 1962), posteriormente categorizados como ataques de pânico. Estudos subsequentes mostraram que a imipramina também era efetiva no tratamento do transtorno de ansiedade generalizada (Kahn et al., 1986; Allgulander e Sheehan, 2002).

O mecanismo de ação comum aos ADs tricíclicos é o bloqueio da recaptura de monoaminas, principalmente noradrenalina e serotonina. Entretanto, os ADs tricíclicos podem interferir em outros sistemas de neurotransmissão que não se correlacionam necessariamente com seu efeito terapêutico e, geralmente, tais ações “secundárias” são responsáveis pelos diversos efeitos colaterais dessa classe de fármacos (Hamon e Blier, 2013).

Assim, na tentativa de se desenvolver fármacos mais eficazes e com menos efeitos colaterais, na década de 80, foi introduzida no mercado a fluoxetina, cujo mecanismo de ação principal é a inibição seletiva da receptação de serotonina.

Atualmente, a primeira escolha para o tratamento farmacológico do TAG e do TP recai sobre esta classe de fármacos – os inibidores seletivos da receptação de serotonina (ISRS), tais como a fluoxetina, sertralina e o escitalopram (Baldwin et al., 2014). Apesar de apresentarem eficácia clínica semelhante aos ADs tricíclicos, os ISRS são preferíveis por apresentarem maior

tolerabilidade com relação aos efeitos colaterais (Anderson, 2000; Cipriani et al., 2014).

Ainda que vastamente utilizados, os ISRS, de uma maneira geral, não são destituídos de problemas relevantes. Por exemplo, pode haver um período transitório de agravamento do quadro clínico do paciente no início do tratamento e o efeito terapêutico destes fármacos somente é observado após administração prolongada e contínua (Johnson et al., 2005). Estes fatores quando conjugados podem acarretar em uma diminuição da adesão dos pacientes ao tratamento com ISRS (Griebel e Holmes, 2013). É digno de nota que este fenômeno também ocorre em relação a outras classes de ADs, como a dos ADs tricíclicos.

Assim sendo, diversos trabalhos na literatura têm sido realizados no intuito de se entender os mecanismos neurobiológicos acionados pelos ADs ao longo do tempo e que, como consequência, levariam ao desencadeamento de seus efeitos terapêuticos. Sugere-se que são requeridas adaptações neurais de longo prazo e diversas alterações plásticas têm sido relacionadas ao mecanismo de ação desses fármacos (para uma revisão do tema ver Miller e Hen, 2015).

Entre as proposições elaboradas na tentativa de justificar o efeito terapêutico tardio dos ADs destaca-se a elaborada pelos pesquisadores Pierre Blier e Claude de Montigny (1994), que é baseada em estudos de eletrofisiologia e tem como pano de fundo o efeito dos ISRS na depressão. No cerne desta teoria estão os receptores serotoninérgicos do subtipo 1A (5-HT_{1A}) presentes no NDR, citado anteriormente, é a principal fonte de inervação serotoninérgica para áreas límbicas envolvidas no processamento emocional (ver mais detalhes sobre essa área no tópico 1.5).

Os receptores 5-HT_{1A} no NDR, como também em outros núcleos da rafe, como o núcleo mediano, estão localizados nos corpos celulares e dendritos dos neurônios serotoninérgicos e funcionam como autorreceptores (Pazos e Palacios, 1985; Zhou et al., 1998; Riad et al., 2000). A ativação destes receptores, seja pela 5-HT, ou por agonistas preferenciais, como o 8-OH-DPAT, leva a hiperpolarização da membrana celular e a uma inibição do disparo dos neurônios serotoninérgicos. Isto, em uma última análise, acarreta uma diminuição na liberação de 5-HT em áreas de inervação (Gartside et al., 1995; Parsons et al., 2001).

Baseados em uma série de evidências experimentais, Blier e Montigny propuseram que o efeito antidepressivo dos ISRS ocorre quando se atinge um aumento crítico na concentração de serotonina em áreas envolvidas com o processamento afetivo, particularmente o hipocampo e o córtex pré-frontal. Os estudos realizados por esses pesquisadores e por outros laboratórios (para uma revisão mais extensa ver Blier e El Mansari, 2013) mostram que no início do tratamento, há um aumento da disponibilidade sináptica de 5-HT no NDR, decorrente do efeito primário dos ISRS, que é o de inibir o funcionamento do transportador de 5-HT na membrana citoplasmática. Esse neurotransmissor ao se ligar aos receptores 5-HT_{1A} causa uma diminuição na taxa de disparo dos neurônios serotoninérgicos e uma consequente inibição da liberação deste neurotransmissor nas áreas pós-sinápticas em questão. Estes estudos mostram ainda que, com o tratamento prolongado com os ISRS, esses receptores 5-HT_{1A} são dessensibilizados e os neurônios serotoninérgicos recuperam sua taxa de disparo normal, aumentando a liberação de 5-HT nos terminais do NDR (Scorza et al., 2011; Guilloux et al., 2011; Guiard et al., 2012). Desta forma, seria em

decorrência destas alterações tardias nos receptores 5-HT_{1A} que se observaria o efeito antidepressivo dos ISRS.

Ainda que permaneça bastante influente na área de estudo, muitos questionamentos têm sido feitos quanto à generalidade e a extensão desta proposta. Estes questionamentos decorrem do melhor entendimento, adquirido ao longo dos últimos anos, sobre o funcionamento destes receptores 5-HT_{1A}, assim como da área em que eles se localizam, o NDR.

1.5 Núcleo Dorsal da Rafe

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

Uma série de evidências mostra que o NDR não é uma estrutura anatômica ou funcionalmente homogênea, como se fazia crer nas propostas originais de Deakin e Graeff (1991), com relação ao papel dual da serotonina, e de Blier e Montigny (1994), na tentativa de explicar o mecanismo de ação tardio de fármacos antidepressivos. Sabe-se hoje que o NDR é um agregado de diferentes sub-populações 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 foram obtidas por Steinbusch (1981) que, através de análises por imunoistoquímica, relata que o NDR é formado por corpos celulares serotoninérgicos organizados em 5 grupamentos distintos, a saber: dorsal (DRD), ventral (DRV), lateral, caudal (DRC) e interfascicular (DRI). A existência de similar divisão anatômica foi posteriormente corroborada por Abrams e colaboradores (2004) em estudos em ratos e camundongos. Os autores reforçam ainda que, além das 5 sub-regiões do NDR definidas originalmente por Steinbusch (1981), 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).

Além disso, estudos apontam que diversos neurônios, além dos serotoninérgicos, encontram-se localizados no NDR (Descarries et al., 1982; Köhler e Steinbusch 1982). Células contendo dopamina, glutamato, ácido gama aminobutírico (GABA), óxido nítrico (NO) e vários neuropeptídeos também se encontram no NDR e estão distribuídas de forma distinta nas diferentes sub-regiões (Commons et al., 2003; Day et al., 2004; Abrams et al., 2004; Calizo et al., 2011; Hale et al., 2012; Vasudeva e Waterhouse, 2014).

Em termos funcionais, trabalhos em roedores também mostram o envolvimento diferencial destas sub-regiões na modulação de respostas comportamentais defensivas associadas à depressão, à ansiedade, e de particular interesse para o presente estudo, ao pânico. Muitos destes trabalhos fazem uso da técnica de imunoistoquímica ou imunofluorescência para detecção de proteína Fos (um marcador indireto da atividade neuronal), conjugada com a marcação da enzima triptofano hidroxilase (para a identificação de neurônios serotoninérgicos).

Por exemplo, no que diz respeito à depressão, ratos expostos ao nado forçado, um modelo associado a esta condição patológica, apresentam uma ativação de neurônios serotoninérgicos somente nas sub-regiões caudal e interfascicular do NDR (Commons, 2008).

Já a administração sistêmica de drogas que aumentam a ansiedade em humanos, como a cafeína e ioimbina, é capaz de promover um aumento na ativação de neurônios serotoninérgicos restritos, principalmente, à região dorsal do NDR de ratos (Abrams et al., 2005).

Com relação ao pânico, Johnson e colaboradores observaram que a administração sistêmica de lactato em ratos (Johnson et al., 2008) ou a exposição desses animais a concentrações elevadas de CO₂ (Johnson et al., 2005), promovem um aumento na ativação de neurônios serotoninérgicos localizados na porção lateral do NDR, também denominada de asas laterais. O lactato, assim como o CO₂ são capazes de desencadear ataques de pânico em voluntários sadios e, mais acentuadamente, em pacientes com TP (Johnson et al., 2014; Leibold et al., 2016). Mais recentemente, utilizando o modelo do labirinto em T-elevado (LTE), Spiacchi e colaboradores (2012) reforçam os achados quanto ao envolvimento das asas laterais na modulação de respostas defensivas associadas ao pânico.

Este modelo experimental, derivado do labirinto em cruz elevado (Handley e Mithani, 1984; Pellow et al., 1985), permite mensurar, em um mesmo animal, duas respostas diferentes, a esquivas inibitória e a fuga. O aparato experimental é formado por três braços de iguais dimensões, dispostos em forma de T e elevados em relação ao solo. Um dos braços é circundado por paredes e disposto perpendicularmente aos dois outros braços desprovidos de paredes.

Para a verificação do comportamento de esquiva inibitória, o animal é colocado na extremidade do braço fechado e o tempo latência de saída do animal deste braço é registrado por três vezes consecutivas, com intervalos de trinta segundos entre cada uma delas. A situação gerada durante a tarefa de esquiva se caracteriza pelo conflito entre o impulso exploratório e o medo inato que os animais apresentam por espaços abertos. Para avaliação do comportamento de fuga, o animal é colocado na extremidade de um dos braços abertos por três vezes consecutivas, e cronometra-se o tempo necessário para que o animal saia, com as quatro patas, deste braço.

Diversos estudos foram realizados com o objetivo de validar farmacologicamente este modelo (para revisão ver Graeff e Zangrossi, 2014) e os resultados obtidos 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).

Para a validação farmacológica do LTE foram utilizadas drogas prescritas para o tratamento dos transtornos de ansiedade generalizada e do pânico, as quais compreendem, basicamente, o grupo dos benzodiazepínicos e o dos antidepressivos. Resumidamente, resultados mostraram que drogas que apresentam eficácia clínica no TAG, como diazepam, midazolam, buspirona e o tratamento prolongado com imipramina, prejudicam a aquisição da resposta de esquiva inibitória (Graeff et al., 1993; 1998; Viana et al., 1994; Teixeira et al., 2000; Poltronieri et al., 2003; Zanoveli et al., 2005). Por outro lado, drogas usadas no tratamento do TP, como o alprazolam e a administração crônica com

os antidepressivos imipramina e fluoxetina, prejudicam a resposta de fuga (Sant'Ana et al., 2016; Teixeira et al., 2000; Poltronieri et al., 2003).

Os autores mostram que a tarefa de fuga expressa pelos animais nesse modelo é capaz de aumentar a expressão de proteína Fos em neurônios não-serotonérgicos localizados nas asas laterais do NDR. Já a resposta de esquiva inibitória, associada à ansiedade, recruta neurônios serotonérgicos primariamente distribuídos na sub-região dorsal do NDR (Spiacci et al., 2012).

Diante da observação de que grupos de neurônios serotonérgicos do NDR emitem projeções topográfica e funcionalmente organizadas, o grupo liderado pelo pesquisador Christopher Lowry propõe um refinamento da teoria proposta originalmente por Deakin e Graeff (1991) sobre o papel das vias serotoninérgicas na modulação de comportamentos diante de estímulos aversivos. A proposta sugere que neurônios serotonérgicos localizados nas porções dorsal e caudal do NDR projetam-se para regiões prosencefálicas envolvidas na regulação de comportamentos envolvendo conflito/ansiedade. Já os neurônios encontrados nas asas laterais, estariam envolvidos no controle de estruturas mesencefálicas envolvidas, mais especificamente a SCPD, na evocação de reações de fuga (para revisão ver Paul e Lowry, 2013). Por fim, os autores postulam que disfunções nessas duas vias de projeção oriundas do NDR contribuem na fisiopatologia do TAG e TP, respectivamente.

1.6 Receptores 5-HT1A

Com relação aos receptores 5-HT1A, embora não tenha sido um ponto abordado na teoria proposta por Blier e Montigny, evidências recentes indicam

que estes receptores presentes no NDR também se encontram de maneira sub-regionalmente organizada.

Os receptores 5-HT_{1A} são divididos em duas classes de acordo a sua localização. Os denominados autorreceptores encontram-se expressos no soma e dendritos de neurônios serotoninérgicos localizados nos núcleos da rafe (Pazos e Palacios, 1985; Chalmers e Watson, 1991; Pompeiano et al., 1992; Zhou et al., 1998; Riad et al., 2000), cuja ativação suprime o disparo de neurônios serotoninérgicos, levando a redução da liberação de serotonina (Sprouse e Aghajanian, 1987; Parsons et al., 2001; Richer et al., 2002). Por outro lado, os heterorreceptores estão localizados em neurônios não-serotoninérgicos, como nos dendritos e soma de neurônios glutamatérgicos piramidais e nos terminais dos axônios de neurônios GABAérgicos e colinérgicos (Freund et al., 1990; Halasy et al., 1992; Cassel e Jeltsch, 1995; Azmitia et al., 1996; Riad et al., 2000). Dentre as estruturas encefálicas onde são encontrados os heterorreceptores 5-HT_{1A} estão o hipocampo, córtex frontal, septo lateral, amígdala, colículo superior, hipotálamo e substancia cinzenta periaquedutal (Hamon et al., 1990; Beck et al., 1992; Santana et al., 2004; Palchaudhuri e Flugge, 2005).

Entretanto, tem sido observado que os receptores 5-HT_{1A} localizados no NDR não se encontram somente em neurônios serotoninérgicos na forma de autorreceptor, como postulado inicialmente, mas também podem estar localizados em neurônios não-serotoninérgicos (heterorreceptores) nesta região (Kirby et al., 2003; Beck et al., 2004; Calizo et al., 2011). Mais especificamente, estudos eletrofisiológicos demonstram que a ativação destes receptores localizados na sub-região dorsal do NDR controla seletivamente a atividade de neurônios serotoninérgicos. Já em outras sub-regiões, como as asas laterais e

porção ventral, a estimulação dos receptores 5-HT_{1A} leva a uma hiperpolarização tanto de neurônios serotoninérgicos, quanto de neurônios não-serotoninérgicos (Calizo et al., 2011).

Além disso, tem sido mostrado que a retroalimentação negativa promovida pelos autorreceptores pode influenciar certos subgrupos de neurônios serotoninérgicos em detrimento de outros, dependendo do estado comportamental do animal (Commons, 2008; Sperling e Commons, 2011). Mais especificamente, Commons (2008) observou que a administração sistêmica de um antagonista de receptores 5-HT_{1A}, o WAY-100635, por si só promoveu um aumento na ativação de neurônios serotoninérgicos localizados restritamente nas asas laterais do NDR. Já em ratos que receberam injeção de WAY-100635 e foram expostos ao nado forçado, houve uma ativação de neurônios serotoninérgicos localizados nas sub-regiões dorsal e ventral, além de um recrutamento ainda maior de neurônios das asas laterais do NDR. Tais achados revelam que o efeito do bloqueio dos receptores 5-HT_{1A}, promovendo uma desinibição, é topograficamente organizado e depende do estado comportamental do animal.

Dentro deste quadro, o presente estudo se propôs a avaliar se fármacos antidepressivos, utilizados no tratamento do transtorno do pânico, poderiam impactar o funcionamento do NDR de uma maneira regionalmente diferente e qual seria o papel dos receptores 5-HT_{1A} nesse processo. Inicialmente, procuramos avaliar o efeito do tratamento agudo e crônico com a fluoxetina ou com a imipramina no recrutamento de neurônios serotoninérgicos e não-serotoninérgicos localizados em diferentes sub-regiões do NDR de ratos expostos à tarefa de fuga no modelo do labirinto em T elevado. Para tanto, após os testes comportamentais, os encéfalos dos animais foram removidos e processados

através da técnica de imunistoquímica para a detecção da proteína Fos e da enzima triptofano hidroxilase. Para fins comparativos, investigamos também o efeito do tratamento agudo e crônico com imipramina em animais submetidos somente à tarefa de esquiva inibitória no labirinto em T elevado.

Nossa predição com relação a esta primeira etapa é que somente o tratamento crônico com os antidepressivos, o qual promove efeito antipânico, seja capaz de alterar o padrão de ativação neuronal nas diferentes sub-regiões do NDR. Conforme previamente descrito por Spiacci e colaboradores (2012), a expressão da resposta de fuga no labirinto em T elevado deverá recrutar neurônios não-serotonérgicos das asas laterais no grupo de animais tratados com veículo. A nossa hipótese é que somente o tratamento crônico com os ADs seria capaz de reduzir tal ativação, além de aumentar o recrutamento de neurônios serotonérgicos desta sub-região do NDR.

Diante dos resultados expressivos observados após o tratamento com a fluoxetina, principalmente no tocante à sub-região das asas laterais do NDR, cuja análise imunistoquímica indicou aumento do recrutamento de neurônios serotonérgicos, na sequência, propusemos investigar a responsividade dos autorreceptores 5-HT_{1A} localizados especificamente nesta sub-região, após tratamento agudo e crônico com a fluoxetina.

Nossa hipótese em relação a esta etapa é que somente o tratamento prolongado com a fluoxetina promoveria uma dessensibilização dos receptores 5-HT_{1A} expressos em neurônios serotonérgicos na sub-região das asas laterais do NDR, o que promoveria um aumento na taxa de disparo destes neurônios e, em última análise, levaria à elevação dos níveis de 5-HT nas áreas de projeção, como a SCPD, e, assim, o efeito panicolítico seria justificado.

A proposta consistiu em avaliar a responsividade dos receptores 5-HT1A expressos exclusivamente em neurônios serotoninérgicos das asas laterais. Para tal, os experimentos foram conduzidos utilizando-se uma linhagem transgênica de camundongos, ePet-YFP, os quais expressam um indicador fluorescente em neurônios serotoninérgicos. A estratégia para o desenvolvimento desta linhagem de camundongos baseia-se na expressão do gene ETS Pet-1 específica e exclusivamente em neurônios serotoninérgicos (Scott et al., 2005). Portanto, a utilização desta linhagem de animais permite a identificação e direcionamento das análises para os neurônios serotoninérgicos localizados nas asas laterais do NDR.

Diante disso, foi estabelecida uma colaboração do nosso grupo de pesquisa com o grupo alemão liderado pelo pesquisador Prof. Dr. Stefan Herlitze, que nos ofereceu todo o suporte para a realização de experimentos de *patch-clamp* utilizando-se a linhagem de animais supracitada.

A realização da segunda etapa deste trabalho foi desenvolvida durante o período de um ano de doutorado sanduíche na Universidade de Ruhr-Bochum na Alemanha, sob co-orientação da pesquisadora Dra. Olivia Masseck. Mais especificamente, o objetivo desta etapa consistiu, através de análises eletrofisiológicas, na verificação da responsividade dos autorreceptores 5-HT1A localizados nas asas laterais do NDR após tratamento agudo e crônico com fluoxetina.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar o impacto do tratamento com fármacos antidepressivos, mais especificamente, a fluoxetina e a imipramina, sobre o perfil de ativação neuronal em diferentes sub-regiões do NDR de ratos submetidos à tarefa de fuga no labirinto em T elevado e investigação do papel dos receptores 5-HT_{1A} nesse processo.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Avaliar o efeito do tratamento agudo e crônico com a fluoxetina ou a imipramina sobre o perfil de ativação neuronal em diferentes sub-regiões do NDR de ratos submetidos à tarefa de fuga no labirinto em T elevado, através da marcação imunoistoquímica de proteína Fos e da enzima triptofano hidroxilase. Para fins comparativos, também será avaliado o perfil de ativação neuronal de animais tratados com a imipramina aguda e cronicamente e submetidos à tarefa de esquiva inibitória no teste do labirinto em T elevado;
- ❖ Avaliar a responsividade dos autorreceptores 5HT_{1A} localizados nas asas laterais do NDR de camundongos transgênicos ePet-YFP, submetidos ao tratamento agudo e crônico com fluoxetina, através da técnica de *whole-cell patch clamp*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Estudos imunoistoquímicos

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar provenientes do biotério Central da Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto, pesando em média 170 g, no primeiro dia de tratamento farmacológico. Os animais permaneceram durante todo o experimento no biotério do Laboratório de Farmacologia do Comportamento, onde foram alojados (quatro animais por caixa) em caixas de polipropileno (38 x 32 x 18 cm), forradas com serragem, tendo livre acesso à água e comida. O biotério foi mantido em temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ \text{C}$) e ciclo claro-escuro de 12 horas (período iluminado das 07:00 às 19:00 h). Todos os procedimentos experimentais adotados nesta etapa do trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em pesquisa da Universidade de São Paulo (protocolo nº 034/2013, Anexo I).

3.2 Drogas

Cloridrato de imipramina (Sigma, EUA) e fluoxetina (EMS, Brasil). A imipramina foi dissolvida em salina estéril e a fluoxetina em uma solução de salina estéril contendo 2% de Tween-80.

3.3 Aparatos

Foram utilizados o labirinto em T elevado (figura 1A) e o labirinto em T fechado (figura 1B).

O labirinto em T elevado é um aparelho de madeira composto de três braços de iguais dimensões (50 x 12 cm). Um dos braços é fechado por paredes laterais medindo 40 cm de altura e 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.

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

Figura 1. Labirinto T fechado (A) e labirinto em T elevado (B).

3.4 Procedimentos

Grupos experimentais

Quatro grupos independentes de animais foram testados para avaliação do efeito da fluoxetina (experimento 1) ou imipramina (experimento 2) em animais submetidos à tarefa de fuga, e o efeito da imipramina em animais submetidos à tarefa de esquiva inibitória (experimento 3). Nos experimentos 1 e 2, um grupo recebeu, por via intraperitoneal, solução de veículo por 21 dias e, trinta minutos após a última injeção, foi exposto ao labirinto em T fechado. O segundo grupo passou pelo mesmo tratamento, porém foi submetido à tarefa de fuga no modelo do labirinto em T elevado. Já o terceiro grupo (grupo tratamento agudo) recebeu injeções diárias de solução veículo por vinte dias e no dia do teste recebeu uma injeção de fluoxetina (10 mg/kg; experimento 1) ou imipramina (15 mg/kg; experimento 2), trinta minutos antes de serem submetidos à tarefa de fuga no labirinto em T elevado. O quarto grupo (grupo crônico) foi injetado com fluoxetina (10 mg/kg; experimento 1) ou imipramina (15 mg/kg; experimento 2) por 21 dias, sendo a última administração feita trinta minutos antes da exposição dos animais à tarefa de fuga no labirinto em T elevado. As doses escolhidas foram baseadas em estudos anteriores mostrando o efeito anti-fuga do tratamento crônico com a imipramina e fluoxetina no labirinto em T elevado (Teixeira et al., 2000; Poltronieri et al., 2003).

Avaliação comportamental

Todos os animais foram manuseados pelo experimentador uma vez ao dia, durante 5 minutos por dois dias antes do teste. Após cada sessão de manuseio, os animais foram colocados por 5 minutos em uma caixa de acrílico de 24 x 18 x 35 cm com serragem no assoalho. Esta mesma caixa foi posteriormente utilizada como auxiliar na execução do teste. A sala de realização da habituação e posteriormente o teste foi mantida em luminosidade de 40 lux e ruído de fundo constante produzido por um exaustor de ar.

Vinte e quatro horas antes do teste, todos os animais foram pré-expostos por 30 minutos a um dos braços abertos do LTE. Cada animal foi colocado individualmente em um dos braços abertos, que permaneceu isolado dos demais braços por uma parede de madeira. Este procedimento foi realizado devido à observação de que a exposição prévia a um dos braços abertos potencializa a expressão do comportamento de fuga, reduzindo reações comportamentais à novidade (Teixeira et al., 2000).

No dia do teste, os animais foram submetidos aos testes comportamentais trinta minutos após a última injeção sistêmica. Para a avaliação da resposta fuga (experimentos 1 e 2), cada animal foi colocado na extremidade do mesmo braço aberto ao qual foi anteriormente pré-exposto e o tempo de latência para saída deste braço, com as quatro patas, foi cronometrado em 6 tentativas consecutivas, com intervalo de 30 segundos entre elas. Já para a tomada da resposta de esquiva inibitória (experimento 3), cada animal foi colocado na extremidade distal do braço fechado do aparato e o tempo de latência para saída deste braço foi cronometrado em 6 tentativas consecutivas, com intervalo de 30

segundos entre elas. Durante os intervalos, os animais foram mantidos na caixa de acrílico utilizada no procedimento de habituação. Nos experimentos 1, 2 e 3, os animais submetidos ao labirinto em T fechado foram colocados na extremidade distal de um dos braços fechados do aparato e foi verificada a latência para o animal sair com as quatro patas deste braço, também em 6 tentativas consecutivas.

Ao final do teste de cada animal, o aparato experimental foi limpo com etanol 20%.

Imediatamente após a tomada da última latência de fuga ou de esquivas inibitória, todos os animais foram levados de volta ao biotério do laboratório, acomodados em sua caixa viveiro, à qual já estavam previamente habituados.

Perfusão

Duas horas após o término dos testes, os animais foram anestesiados com 2,2,2 tribromoetanol (Sigma-Aldrich) a 2,5% (10mL/kg, i.p.) e submetidos à perfusão intracardíaca com solução salina tamponada (PBS 0,01 M; pH 7,4, 1000 mL/kg), 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 mantida a um fluxo de 22 mL/minuto.

Após a perfusão, os encéfalos foram rápida e cuidadosamente removidos e fixados por 2 horas em solução de paraformaldeído 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

congelados em isopentano (mantido em gelo seco) e estocados em freezer (-20°C) até serem processados.

Histologia

Os encéfalos foram levados a um criostato (Leica CM1850), onde secções coronais de 40 µm de espessura foram realizadas. As secções contendo o NDR foram coletadas e armazenadas em solução de PBS.

Imunoistoquímica para proteína Fos e triptofano hidroxilase

As reações de imunoistoquímica para marcação da proteína Fos e da enzima triptofano hidroxilase (TPH) foram realizadas utilizando a técnica *free-floating* conduzida em um agitador orbital.

Inicialmente, foi realizada a técnica imunoistoquímica para detecção da proteína Fos, conforme descrito a seguir. As secções foram lavadas três vezes em solução de salina tamponada com fosfato (PBS 0,01M, pH 7,4), permaneceram imersas em solução de peróxido de hidrogênio 1% em PBS por 10 minutos e foram lavadas quatro 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, 1:900, Santa Cruz Biotechnology, sc-52) diluído em solução de PBST (PBS 0,01M, BSA 0,3% e triton x-100 0,2%). Após a incubação com o anticorpo primário, as

secções foram lavadas quatro vezes em PBS e incubadas por duas horas com anticorpo secundário biotinilado, anti-IgG de coelho (1:900, Vector, BA-1000). As secções foram então lavadas quatro vezes em PBS e incubadas por duas horas com complexo avidina-biotina-peroxidase (1:900, reagente ABC Elite, Vector). 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%, por 10 minutos.

Após os ensaios imunoistoquímicos para proteína Fos, as secções foram lavadas quatro vezes em PBS, seguida pela marcação imunoistoquímica para detecção da enzima TPH, conforme descrito a seguir. Inicialmente, os tecidos foram incubados *overnight* com o anticorpo primário anti-TPH (IgG de ovelha, 1:1200, Millipore, AB1541) diluído em solução de PBST. Após a incubação com o anticorpo primário, as secções foram lavadas quatro vezes em PBS e incubadas por duas horas com anticorpo secundário biotinilado, anti-IgG de ovelha (1:1200, Vector, BA-6000). As secções foram então lavadas quatro vezes em PBS e incubadas por duas horas com complexo avidina-biotina-peroxidase (1:1200, reagente ABC Elite, Vector). Por fim, a reação imunoistoquímica foi revelada com solução de PBS contendo 3,3-diaminobenzidina 0,02% e peróxido de hidrogênio 0,0015%, e as secções foram, posteriormente, lavadas quatro vezes em PBS.

As secções coronais foram montadas em lâmina, que passou por um processo de desidratação, diafanização e foram cobertas com lamínula usando-se Permount® (Fisher Scientific).

Análise e quantificação

As reações imunoistoquímicas foram visualizadas com o auxílio de microscópio óptico (Olympus DX50). O NDR foi fotografado e analisado através do software Image Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics). Os neurônios Fos-imunorreativos (Fos-IR) puderam ser identificados pela presença de pigmentação preta restrita ao núcleo neuronal, enquanto que os neurônios TPH-imunorreativos (TPH-IR) foram identificados pela presença de pigmentação marrom-alaranjada restrita ao citoplasma neuronal (figura 2).

Figura 2. Fotomicrografia (magnificação 10x) ilustrando secção coronal do NDR de um animal tratado com fluoxetina e submetido à tarefa de fuga no labirinto em T elevado. A secção foi processada pelo método imunoistoquímico para detecção da proteína Fos e TPH. Ampliação utilizada para identificação das marcações (magnificação 20x); seta azul: TPH-IR; seta amarela: Fos-IR; seta vermelha: dupla marcação Fos+TPH-IR.

No NDR foram mensurados o número total de células Fos-IR, o número total de neurônios TPH-IR e o número total de duplas-marcações Fos+TPH-IR em diferentes sub-regiões, em 4 diferentes níveis ao longo do eixo rostro-caudal, de acordo com Spiacci, et al. (2012). As sub-regiões avaliadas foram (figura 3): no nível rostral (-6,84 à -7,08 mm do bregma) foi analisada a sub-região dorsal (DRD). Nos níveis médio-rostral (-7,20 à -7,80 mm do bregma) e médio-caudal (-7,92 à -8,28 mm do bregma) as sub-regiões DRD, ventral (DRV) e asas laterais. Ao nível caudal (-8,52 à -9,00mm do bregma) foram analisadas as sub-regiões caudal (DRC) e interfascicular (DRI).

Figura 3. Fotomicrografia (magnificação 10x) ilustrando secções coronais do NDR processadas pelo método imunoistoquímico para detecção da proteína Fos e TPH. (A) NDR nível rostral. (B) NDR nível médio-rostral. (C) NDR nível médio-caudal. (D) NDR nível caudal. As linhas tracejadas delimitam as subdivisões do DR que foram analisadas, tendo como referência o atlas de Paxinos e 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 ventrolateral da substância cinzenta periaquedutal. Aq: aqueduto cerebral; DRD: sub-região dorsal; DRC: sub-região caudal; DRV: sub-região ventral; DRI: sub-região interfascicular.

Fonte: adaptada de Spiacci et al., 2012.

3.5 Análise estatística

Os dados comportamentais obtidos no LTE foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas tendo as tentativas como medidas repetidas e o tratamento como fator independente. Quando apropriado, foi realizado o teste *post hoc* de Tukey. As comparações entre os grupos que receberam injeções de veículo e foram submetidos ao LTE e ao LTF foram realizadas pelo teste *t Student*.

As comparações entre o número total de células Fos-IR, TPH-IR ou de neurônios Fos+TPH-IR observados após os diferentes tratamentos farmacológicos foram feitas pela ANOVA de uma via para cada uma das diferentes sub-regiões do NDR analisadas. Quando apropriado, foi realizado o teste *post hoc* de Tukey.

Estudos eletrofisiológicos

3.6 Animais

Foram utilizados camundongos transgênicos ePet-YFP (Scott et al., 2005), oriundos do biotério do Departamento de Zoologia Geral e Neurobiologia da Universidade de Ruhr Bochum – Alemanha, sob responsabilidade do professor Stefan Herlitze. Os animais, com 3-4 semanas de vida no início do tratamento, foram alojados (cinco animais por caixa) em caixas de polipropileno (31 x 18 x 12 cm), forradas com serragem, tendo livre acesso à água e comida. O biotério foi mantido em temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ \text{C}$) e ciclo claro-escuro de 12 horas (período iluminado das 06:00 às 18:00 h), com água e comida *ad libitum*.

3.7 Drogas

Fluoxetina (Sigma-Aldrich) dissolvida em salina estéril contendo 2% de Tween 80. Picrotoxina (antagonista do receptor GABA_A, Sigma-Aldrich), fenilefrina (agonista do receptor α_1 adrenérgico, Sigma-Aldrich), 8-OH-DPAT (agonista do receptor 5-HT_{1A}, Tocris), WAY-100635 (antagonista do receptor 5-HT_{1A}, Tocris), todos solubilizados em água milliQ.

3.8 Genotipagem

A genotipagem dos animais transgênicos foi realizada através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Somente os animais positivos para os genes de interesse, ePet e YFP, foram tratados e utilizados nos experimentos para análise eletrofisiológica.

Logo após o desmame, as amostras do material genético foram coletadas com um pequeno corte na extremidade das caudas dos animais. As amostras foram colocadas em um tubo e digeridas em solução contendo 300µL do tampão de lise (NaCl 200 mM, Na₂EDTA 3mM, SDS 0,2%, Tris base 100mM) e 20µL de proteinase K 10mg/mL em um termomixer (600 rpm) *overnight* a 55°C. Posteriormente, os tubos foram mantidos por 10 minutos a 99°C para inativação da proteinase e esta amostra lisada foi armazenada a 4°C para posterior realização da reação de PCR.

A amostra lisada foi centrifugada por 1 minuto (13000 rpm) e diluída em água para PCR (1:10). Para a reação de PCR, 0,5µL da amostra diluída foi colocado em uma reação contendo 19µL de água para PCR, 5µL da solução contendo uma enzima polimerase (Red load Taq Master, Promega) e 0,25µL de cada *primer*. Foram utilizados *primers* para detecção das sequências ePet (AGT CGG GGA GGT AGA AAA AGA C) e YFP (TTC GGG CAT GGC GGA CTT G). As reações de PCR foram realizadas em termociclador (Eppendorf) de acordo com protocolo previamente padronizado como segue:

- ✓ Ativação da polimerase: 94°C por 2 minutos
- ✓ 34 ciclos: 94°C por 30 segundos
61°C por 30 segundos
72°C por 40 segundos
- ✓ Extensão final: 72°C por 5 minutos

Ao final da reação, os produtos oriundos da reação de PCR foram separados de acordo com seu peso molecular por eletroforese em gel de agarose. Soluções de agarose 1,7% em tampão tris-acetato (TAE: 2M Tris, 250mM Na-acetate, 50mM EDTA pH 8; pH 7,8) foram aquecidas em aparelho micro-ondas até completa solubilização do tampão e, em seguida, foi adicionado brometo de etídio para uma concentração final de 200ng/mL. Os géis foram moldados em bandejas horizontais e as amostras de DNA obtidas após reação de PCR passaram pelo processo de eletroforese por 30 minutos a 130V. Um controle positivo, negativo e uma alíquota do padrão de peso molecular também foram submetidos à eletroforese. Ao final da corrida de eletroforese, as bandas foram visualizadas utilizando-se luz ultravioleta e fotografadas por uma câmera digital. Os produtos de PCR de interesse (correspondentes aos *primers* ePet-YFP) possuem 600 pb (figura 4).

Figura 4. Genotipagem - PCR. Gel de eletroforese representativo com sequências de DNA representadas como bandas, comparadas ao padrão de peso molecular. As bandas observadas nos animais testados representam sequência de DNA positivo para ePet-YFP. O controle positivo contém o DNA de um animal previamente identificado e o controle negativo não contém qualquer amostra de DNA.

3.9 Procedimentos

Grupos experimentais

Três grupos independentes de animais foram tratados para posterior análise eletrofisiológica. Um grupo recebeu, por via intraperitoneal, solução de veículo por 21 dias (grupo controle). O segundo grupo recebeu injeções diárias de solução veículo por vinte dias e no dia do teste recebeu uma injeção de fluoxetina (10 mg/kg; grupo agudo). O terceiro grupo (grupo crônico) foi injetado com fluoxetina (10 mg/kg) por 21 dias. Em todos os grupos, a última

administração foi feita sessenta minutos antes do sacrifício para a coleta do encéfalo. A dose utilizada foi baseada em estudos prévios (Bahi et al., 2014; Santarelli et al., 2003; Griebel et al., 1995).

Preparação do tecido

Uma hora após a última administração sistêmica, os animais foram colocados em uma câmara com isoflurano (CP Pharma) e, depois de anestesiados, foram sacrificados por decapitação. O tronco encefálico foi cuidadosamente exposto, rapidamente removido e imerso em uma solução gelada (solução de corte: NaCl 87mM, sacarose 75mM, KCl 2,5mM, CaCl₂ 0,5mM, MgCl₂ 7mM, NaH₂PO₄ 1,25mM, NaHCO₃ 25mM, glicose 20mM) continuamente borbulhada com mistura carbogênica (95% O₂ + 5% CO₂) para oxigenação e manutenção do pH em 7,4, a fim de causar o menor dano possível ao tecido. Posteriormente, o tronco encefálico foi fixado com cola adesiva para tecido (Histoacryl) em uma placa metálica e, em um Vibratomo (VT1000S, Leica), foi posicionado e imerso novamente em solução de corte nas mesmas condições. Na sequência foram obtidas secções coronais de 200 µm de espessura, contendo o NDR, na velocidade de 0,3 - 0,5mm/s e frequência de 7Hz.

As secções obtidas foram incubadas durante 30 minutos em solução de corte a 37°C. Posteriormente, foram transferidas para uma solução de fluido cerebrospinal artificial (aCSF: NaCl 124mM, KCl 3mM, 2,5mM de CaCl₂, 1,2mM de MgSO₄, 1,23mM de NaH₂PO₄, 26mM de NaHCO₃, 10mM de glicose) também

continuamente borbulhada com mistura carbogênica, onde permaneceram por 30 minutos a 37°C e, finalmente, foram mantidas a temperatura ambiente em aCSF contendo fenilefrina 6µM e picrotoxina 100µM até serem transferidas para a câmara de registro.

Para a realização das análises, as secções foram cuidadosamente transferidas para uma câmara de registro continuamente perfundida com a mesma solução de aCSF, com o auxílio de uma bomba peristáltica (Minipuls3, Gilson) a um fluxo constante de 5mL/min. Os registros foram realizados a temperatura de 32°C, mantida por meio de um controlador de temperatura.

Identificação da região das asas laterais do NDR e visualização dos neurônios serotoninérgicos (YFP positivos)

As secções transferidas para a câmara de registro, uma por vez, foram imobilizadas por meio de uma rede de fios de nylon montada sobre uma armação de platina de forma que a disposição dos fios não tocasse a região de interesse. Os neurônios foram visualizados por intermédio de um microscópio invertido (BX51WI, Olympus) equipado com lâmpada fluorescente, acoplado a uma câmera, a qual se conectava a dois monitores de vídeo (o sistema pode ser visualizado na figura 5).

Figura 5. *Set-up* utilizado para as análises eletrofisiológicas. A) Microscópio. B) Câmara de registro. C) Monitores para visualização do tecido e controle/observação dos registros eletrofisiológicos.

A identificação da região das asas laterais do NDR nas secções, foi feita por meio de uma objetiva com aumento de 5 vezes, sob luz fluorescente para identificação das células YFP-positivas, representando os neurônios serotonérgicos, e tendo como referência o aqueduto de Sylvius (figura 6).

Figura 6. Visualização da região do NDR e neurônios serotonérgicos registrados. A) Fotomicrografia do NDR (magnificação 5x) sob luz fluorescente. B) Imagem retirada do atlas Paxinos e Watson, 2007, representativa do plano apresentado. C) Fotomicrografia do NDR (magnificação 40x) e visualização dos neurônios serotonérgicos sob luz fluorescente para detecção de YFP à esquerda e, após registro, para detecção de Alexa 594 à direita.

Uma vez localizada a região de interesse, com auxílio de uma objetiva com aumento de 40 vezes, os neurônios serotoninérgicos foram identificados e alguns selecionados para o registro eletrofisiológico. Para confirmar se o neurônio registrado, de fato, era o que apresentava fluorescência (YFP-positivo), ao final do registro, tais neurônios foram preenchidos com solução contendo o corante Alexa 594 e visualizados sob luz de fluorescência (figura 6C e 7).

Para a confirmação da localização dos neurônios serotoninérgicos registrados, após as análises, as secções foram removidas da câmara de registro e transferidas para um recipiente contendo paraformaldeído 6% em PBS, onde foram mantidos *overnight*. Posteriormente, as fatias foram lavadas com PBS e colocadas em uma solução crioprotetora de sacarose 30% em PBS por 3 dias. As secções foram então novamente seccionadas (30µm) em criostato e os novos cortes foram montados em lâmina (*Superfrost*, ThermoScientific) coberta com lamínula usando-se Roti-Mount FluorCare (Roth). Por fim, as novas secções foram visualizadas em Microscópio confocal (Leica) para mais uma confirmação da localização dos neurônios registrados e se, de fato, eram neurônios serotoninérgicos (figura 7), observando-se as células YFP-positiva (neurônio serotoninérgico) e Alexa-594-positivo (neurônio registrado).

Figura 7. Fotomicrografia representativa de um neurônio serotonérgico registrado localizado nas asas laterais do DR. Amarelo: neurônio YFP-positivo. Vermelho: neurônio preenchido com Alexa-594, após o registro eletrofisiológico. Magnificação 20x.

Whole-cell patch-clamp

Para a realização dos registros eletrofisiológicos, foram utilizadas micropipetas feitas com capilares de vidro de borossilicato (Harvard Apparatus), confeccionadas em estirador vertical de capilares de vidro (Vertical-Puller, Firma Heka), com pontas de 1-2 μ m de diâmetro. As pipetas foram preenchidas com solução contendo 125mM de gluconato de potássio, 4mM de NaCl, 2mM de MgCl₂, 10mM de HEPES, 0,2mM de EGTA, 4mM de Mg-ATP, 0,4mM de Na-GTP, Tris-fosfocreatina 10mM, pH 7,3 e osmolaridade final de 280 mOsm. Como mencionado, a fim de identificar os neurônios registrados, o corante AlexaFluor 594 hidrazida 125 μ g/mL foi adicionado à esta solução interna. A resistência final das pipetas, quando preenchidas com esta solução, manteve-se entre 6-8 mega Ω , sendo esta considerada uma resistência ideal para a realização do experimento.

A pipeta, uma vez preenchida com a solução, foi fixada ao eletrodo (EPC10 Probe, HEKA) montado em um micromanipulador (PatchStar Micromanipulator, Scientifica) e conectado a um amplificador (Double patch clamp EP 10 usb, HEKA), cuja conexão ao computador (iMac, Apple) foi feita via interface analógico/digital. O software Patch Master (HEKA) foi utilizado para a aquisição dos dados, os quais foram filtrados a 3 kHz e digitalizados a 50 kHz e, posteriormente, a análise *off-line* foi feita com auxílio do software Igor Pro 6.0 (Wavemetrics).

Enquanto a pipeta de registro era aproximada do neurônio de interesse, aplicava-se uma pressão positiva constante para se remover possíveis resíduos de tecido que pudessem impedir o contato entre a pipeta e o corpo celular do neurônio. Ao contato da ponta da pipeta com a membrana do neurônio, a pressão positiva foi subitamente interrompida para se obter um selo de alta resistência (Giga Ω) e estabelecimento da configuração *cell-attached*. Após o estabelecimento desta configuração, uma discreta aplicação de pressão negativa foi realizada a fim de se romper a membrana na área delimitada pelo selo e ter acesso ao compartimento intracelular na chamada configuração *whole-cell*, a qual se caracteriza pelo aparecimento de correntes capacitivas da membrana. Os registros foram iniciados somente após um período de estabilização de 3 minutos após a obtenção da configuração *whole-cell*, necessários para a diálise entre a solução interna da pipeta e o meio interno da célula.

Protocolos experimentais

A figura 8 ilustra o protocolo experimental realizado. Inicialmente, após o estabelecimento da configuração *whole-cell* e decorridos 3 minutos de perfusão com solução carbogênica de aCSF, foram registradas as condições basais. Posteriormente, as secções foram desafiadas com diferentes drogas para avaliação da responsividade dos receptores 5-HT_{1A}. Ao final dos 3 minutos de desafio com cada droga, os registros foram realizados. Por fim, para o *washout* da droga, as secções foram perfundidas novamente com WAY-100635 e, novamente, com solução carbogênica de aCSF e os registros pós-desafios foram realizados.

Figura 8. Esquema representativo do protocolo realizado para o desafio das secções encefálicas.

Registros eletrofisiológicos

Primeiramente procedemos com a análise das propriedades passivas intrínsecas da membrana dos neurônios registrados. Na condição experimental inicial, o registro eletrofisiológico foi realizado no modo *current clamp*, sem que houvesse injeção de corrente, para determinação do potencial de membrana em

repouso (V_m) e a capacitância da membrana (C_m) registrados pelo software utilizado. Posteriormente, o potencial foi fixado em -60mV.

Após o desafio com cada uma das soluções utilizadas para perfusão das secções em todos os protocolos (figura 8), foram realizados registros em *voltage* e *current clamp* como descrito a seguir.

A resistência da membrana (R_m) foi avaliada no modo *voltage clamp* por meio da aplicação de um pulso hiperpolarizante de -10mV durante 500ms. Após a medição da variação de corrente mediante este pulso, a R_m foi calculada com base na lei de Ohm: $R_m = V_h / i_h$; onde V_h corresponde ao pulso hiperpolarizante aplicado (-10mV) e i_h consiste na variação de corrente registrada após tal pulso.

Posteriormente, agora em configuração *current clamp* foi feita uma curva de injeção de corrente (de -100 até +150pA, com incrementos de 10 em 10pA e durante 500ms em cada corrente fixada) e uma avaliação da atividade espontânea dos neurônios (0pA, durante 60 segundos) através da análise da taxa de disparo.

Como mencionado, as análises de variação e de corrente e voltagem registradas, foram realizadas ao fim dos experimentos com auxílio do software Igor Pro 6.0 (Wavemetrics).

As propriedades ativas intrínsecas da membrana dos neurônios serotoninérgicos foram avaliadas nos disparos apresentados na medida basal, para comparação entre os grupos tratados com veículo e fluoxetina aguda e crônica. A análise dos potenciais de ação (PA) foi realizada nos últimos 30 segundos de registro da atividade espontânea, através do software MatLab7 programado pelo colaborador Dr. Wolfgang Kruse. As propriedades avaliadas

foram (figura 9): limiar de disparo, amplitude do PA, largura do PA na metade da amplitude, amplitude e duração da hiperpolarização posterior ao PA rápida (rAHP) e lenta (IAHP).

Figura 9. Ilustração do potencial de ação e indicação das propriedades ativas intrínsecas da membrana avaliadas. PA=potencial de ação; rAHP=hiperpolarização posterior ao PA rápida; IAHP= hiperpolarização posterior ao PA lenta.

3.10 Análise estatística

A análise de variância (ANOVA) de uma via foi utilizada para comparação entre os grupos submetidos aos diferentes tratamentos sistêmicos (fator independente) para a avaliação das propriedades passivas da membrana, parâmetros do potencial de ação e frequência de disparo. ANOVA de medidas repetidas foi usada para análise da taxa de disparo após o desafio das secções

encefálicas com diferentes drogas, tendo os tratamentos sistêmicos como fator independente e as drogas utilizadas para o desafio como medida repetida. Quando apropriado, foi utilizado o post hoc de Dunnet ou Sidak para os fatores independentes e medidas repetidas, respectivamente.

4. RESULTADOS

Estudos imunoistoquímicos

Efeito do tratamento com fluoxetina sobre a resposta de fuga e sobre o perfil de ativação neuronal no NDR

Como pode ser visto na figura 10, as latências de saída do braço aberto do labirinto em T elevado (tarefa de fuga) e labirinto em T fechado (tarefa controle) são diferentes quando os se comparam somente os animais injetados com solução veículo [fator tratamento: $F(1,17)=22,2$; $p<0,05$, fator tentativa: $F(5,85)=2,5$; $p<0,05$, interação entre a tentativa e a tarefa comportamental: $F(5,85)=1,2$; NS]. A análise de *post hoc*, usada para a comparação entre os dois grupos em cada uma das tentativas, mostra que o grupo submetido à tarefa de fuga apresentou diminuição na latência de saída do braço na fuga 4 [$t(17)=4,1$; $p<0,05$], fuga 5 [$t(17)=4,2$; $p<0,05$] e fuga 6 [$t(17)=3,2$; $p<0,05$].

Comparando-se os 3 grupos submetidos à tarefa de fuga no labirinto em T elevado, a ANOVA de medidas repetidas mostrou o efeito do tratamento [$F(1,24)=8,0$; $p<0,05$]. Houve ainda, diferença entre os grupos no fator tentativa [$F(5,120)=8,5$; $p<0,05$] e interação entre a tentativa e o tratamento [$F(5,120)=3,4$; $p<0,05$]. O teste *post hoc* de Tukey aponta que, na fuga 1, os animais do grupo fluoxetina aguda tiveram latências de fuga maiores do que o grupo controle. Já o grupo tratado com fluoxetina crônica apresentou aumento nas latências de fuga quando comparado tanto com o grupo tratado com veículo, quanto com o grupo tratado com fluoxetina aguda, nas fugas 4, 5 e 6 (figura 10).

Figura 10. Efeito do tratamento i.p. com veículo (Veíc) ou fluoxetina (FLX; 10mg/kg) aguda e cronicamente (21 dias) sobre o comportamento de ratos submetidos à tarefa de fuga no labirinto em T elevado e ao labirinto em T fechado (LTF). Os valores estão representados pela média $\pm$ EPM ($n=8-10$). # $p<0,05$ quando comparado com o grupo T fechado - Veíc; * $p<0,05$ quando comparado com o grupo Fuga - Veíc; + $p<0,05$ quando comparado com o grupo Fuga - FLX aguda.

Na figura 11 está representada a soma das latências registradas nas seis tentativas realizadas. O teste *t de Student* mostra que os grupos tratados com veículo e submetidos ao labirinto em T fechado e à tarefa de fuga no labirinto em T elevado são diferentes [$t(17)=4,8$; $p<0,05$].

Quando são comparados apenas os grupos submetidos à tarefa de fuga, a ANOVA de uma via mostra o efeito do tratamento [$F(2,26)=8,0$; $p<0,05$] e, o teste de *post hoc* de Tukey, revela que somente o grupo tratado com fluoxetina crônica apresenta aumento na latência de saída do braço aberto quando comparado com o grupo tratado com veículo.

Figura 11. Efeito do tratamento i.p. com veículo (Veíc) ou fluoxetina (FLX; 10mg/kg) aguda e cronicamente (21 dias) sobre o comportamento de ratos submetidos à tarefa de fuga no labirinto em T elevado e ao labirinto em T fechado (LTF). Os valores estão representados pela média $\pm$ EPM da soma das latências cronometradas em 6 tentativas (n=8-10). #p<0,05 quando comparado com o grupo T fechado - Veíc; *p<0,05 quando comparado com o grupo Fuga - Veíc.

Todas as contagens de células TPH-IR realizadas neste e nos demais experimentos podem ser vistas no Apêndice II, onde pode ser observado que não houve diferenças significativas nestes valores após os tratamentos farmacológicos realizados nos diferentes experimentos.

A figura 12 mostra que houve diferenças significativas no número total de células Fos-IR entre os grupos tratados com veículo e submetidos ao teste do labirinto em T fechado ou à tarefa de fuga nas asas laterais do NDR tanto no plano médio-caudal [$t(17)=3,2$; $p<0,05$], como no plano médio-rostral [$t(17)=2,8$; $p<0,05$]. Não foram observadas alterações significativas nesse parâmetro em nenhuma outra sub-região do NDR.

A análise estatística do número total de células Fos-IR dos grupos submetidos à tarefa de fuga no labirinto em T elevado, mostrou haver diferenças significativas nas asas laterais do NDR, nos planos médio-caudal [$F(2,27)=6,0$; $p<0,05$] e médio-rostral [$F(2,27)=4,8$; $p<0,05$], e no DRD, também no plano médio-rostral [$F(2,27)=4,4$; $p<0,05$]. A análise *post hoc* revelou que o grupo tratado com fluoxetina cronicamente apresentou diminuição no número de células Fos-IR nas asas laterais do NDR no plano médio-caudal, quando comparado com o grupo de animais tratados com veículo, no DRD no plano médio-rostral, quando comparado com o grupo tratado agudamente com fluoxetina, e nas asas laterais no plano médio-rostral, quando comparado com ambos os grupos, tratados com veículo e com fluoxetina agudamente (figura 12).

Figura 12. Média $\pm$ EPM do número total de células Fos imunorreativas (Fos-IR) quantificadas em diferentes sub-regiões do NDR de ratos submetidos ao labirinto em T fechado ou à tarefa de fuga no labirinto em T elevado de animais tratados com veículo ou fluoxetina (10mg/kg) aguda e cronicamente (n=8-10). #p<0,05 quando comparado com o grupo T fechado - Veic; *p<0,05 quando comparado com o grupo Fuga - Veic; +p<0,05 quando comparado com o grupo Fuga - FLX aguda.

A figura 13 mostra que não houve diferenças significativas no número total de duplas marcações (células TPH+Fos-IR) entre os grupos tratados com veículo e submetidos ao teste do labirinto em T fechado ou à tarefa de fuga em nenhuma das sub-regiões analisadas.

A análise estatística do número total de células TPH+Fos-IR dos grupos submetidos à tarefa de fuga no labirinto em T elevado mostrou haver diferenças significativas nas asas laterais nos planos médio-caudal [$F(2,27)=4,0$; $p<0,05$] e médio-rostral [$F(2,27)=6,6$; $p<0,05$]. O teste *post hoc* indicou que o grupo tratado com fluoxetina cronicamente apresentou aumento no número de neurônios TPH+Fos-IR nas asas laterais do NDR no plano médio-caudal, quando comparado com o grupo de animais tratados com veículo, e no plano médio-rostral, quando comparado com os demais grupos (figura 13). As demais sub-regiões não foram representadas, pois não houve duplas marcações identificadas.

Figura 13. Média $\pm$ EPM do número total de duplas marcações - células Fos e TPH imunorreativas (Fos+TPH-IR) - quantificadas em diferentes sub-regiões do NDR de ratos submetidos ao labirinto em T fechado ou à tarefa de fuga no labirinto em T elevado de animais tratados com veículo ou fluoxetina (10mg/kg) aguda e cronicamente (n=8-10). #p<0,05 quando comparado com o grupo T fechado - Veíc; *p<0,05 quando comparado com o grupo Fuga - Veíc. Veíc: veículo; FLX: fluoxetina. +p<0,05 quando comparado com o grupo Fuga - FLX aguda.

Efeito do tratamento com imipramina sobre a resposta de fuga e sobre o perfil de ativação neuronal no NDR

A figura 14 mostra a diferença entre os grupos de animais tratados com veículo e submetidos ao labirinto em T elevado e à tarefa de fuga no labirinto em T elevado [$F(1,17)=5,6$; $p<0,05$]. Além do fator tratamento, houve diferença no fator tentativa [$F(5,85)=3,9$; $p<0,05$], mas não na interação entre a tentativa e a tarefa comportamental [$F(5,85)=0,6$; NS]. A análise de *post hoc*, usada para a comparação entre os dois grupos em cada uma das tentativas, mostra que o grupo submetido à tarefa de fuga apresentou diminuição na latência de saída do braço na fuga 3 [$t(16)=2,4$; $p<0,05$], fuga 5 [$t(16)=2,6$; $p<0,05$] e fuga 6 [$t(16)=2,8$; $p<0,05$].

Comparando-se os 3 grupos submetidos à tarefa de fuga no labirinto em T elevado, a ANOVA de medidas repetidas mostrou o efeito do tratamento [$F(1,26)=7,3$; $p<0,05$], das tentativas [$F(5,130)=7,9$; $p<0,05$], mas não da interação entre as tentativas e o tratamento [$F(10,130)=0,7$; NS]. O teste *post hoc* de Tukey aponta que, na fuga 4, o grupo de animais tratados com imipramina crônica tiveram latências de fuga maiores do que o grupo tratado com imipramina aguda. Já nas fugas 2, 5 e 6 o grupo tratado com imipramina crônica apresentou aumento nas latências de fuga quando comparado tanto com o grupo tratado com imipramina aguda, quanto com o grupo tratado com veículo (figura 14).

Figura 14. Efeito do tratamento i.p. com veículo (Veíc) ou imipramina (IMI; 15mg/kg) aguda e cronicamente (21 dias) sobre o comportamento de ratos submetidos à tarefa de fuga no labirinto em T elevado e ao labirinto em T fechado (LTF). Os valores estão representados pela média $\pm$ EPM ($n=7-11$). # $p<0,05$ quando comparado com o grupo T fechado - Veíc; * $p<0,05$ quando comparado com o grupo Fuga - Veíc; + $p<0,05$ quando comparado com o grupo Fuga - IMI aguda.

Na figura 15 está representada a soma das latências registradas nas seis tentativas realizadas. O teste *t de Student* mostra que os grupos tratados com veículo e submetidos ao labirinto em T fechado ou à tarefa de fuga no labirinto em T elevado, são diferentes [$t(16)=2,5$; $p<0,05$]. Quando são comparados apenas os grupos submetidos à tarefa de fuga, a ANOVA de uma via mostra efeito do tratamento [$F(2,28)=7,3$; $p<0,05$] e, o teste de *post hoc* de Tukey, revela que o grupo tratado com imipramina crônica é diferente tanto do grupo de animais tratados com veículo, quanto do grupo tratado com imipramina agudamente.

Figura 15. Efeito do tratamento i.p. com veículo (Veíc) ou imipramina (IMI; 15mg/kg) aguda e cronicamente (21 dias) sobre o comportamento de ratos submetidos à tarefa de fuga no labirinto em T elevado e ao labirinto em T fechado (LTF). Os valores estão representados pela média $\pm$ EPM da soma das latências cronometradas em 6 tentativas (n=7-11). #p<0,05 quando comparado com o grupo T fechado - Veíc; *p<0,05 quando comparado com o grupo Fuga - Veíc; +p<0,05 quando comparado com o grupo Fuga - IMI aguda.

A figura 16 mostra que houve diferenças significativas no número total de células Fos-IR entre os grupos tratados com veículo e submetidos ao teste do labirinto em T fechado ou à tarefa de fuga nas asas laterais tanto no plano médio-caudal [$t(16)=2,2$; $p<0,05$], como no plano médio-rostral [$t(16)=2,3$; $p<0,05$]. Não foram observadas alterações significativas nesse parâmetro em nenhuma outra sub-região do NDR.

A análise estatística do número total de células Fos-IR dos grupos submetidos à tarefa de fuga no labirinto em T elevado, mostrou haver diferenças significativas nas asas laterais em um plano médio-caudal [$F(2,28)=4,5$; $p<0,05$] e em um plano médio-rostral [$F(2,28)=5,9$; $p<0,05$]. A análise de *post hoc* revelou que o grupo tratado com imipramina cronicamente apresentou diminuição no número de células Fos-IR nas asas laterais do NDR no plano médio-caudal, quando comparado com o grupo de animais tratados com imipramina agudamente, e nas asas laterais no plano médio-rostral, quando comparado com ambos os grupos, tratados com veículo e com imipramina agudamente (figura 16).

Figura 16. Média $\pm$ EPM do número total de células Fos imunorreativas (Fos-IR) quantificadas em diferentes sub-regiões do NDR de ratos submetidos ao labirinto em T fechado ou à tarefa de fuga no labirinto em T elevado de animais tratados com veículo ou imipramina (15mg/kg) aguda e cronicamente (n=7-11). [#]p<0,05 quando comparado com o grupo T fechado - Veic; *p<0,05 quando comparado com o grupo Fuga - Veic; ⁺p<0,05 quando comparado com o grupo Fuga - IMI aguda.

A figura 17 mostra que não houve diferenças significativas no número total de células TPH+Fos-IR entre os grupos tratados com veículo e submetidos ao teste do labirinto em T fechado ou à tarefa de fuga em nenhuma das sub-regiões analisadas.

No mesmo sentido, a análise estatística do número total de células TPH+Fos-IR dos grupos submetidos à tarefa de fuga no labirinto em T elevado, não apontou diferenças significativas em nenhuma das sub-regiões analisadas (figura 17). As demais sub-regiões não foram representadas, pois não houve duplas marcações identificadas.

Figura 17. Média $\pm$ EPM do número total de duplas marcações - células Fos e TPH imunorreativas (Fos+TPH-IR) - quantificadas em diferentes sub-regiões do NDR de ratos submetidos ao labirinto em T fechado ou à tarefa de fuga no labirinto em T elevado de animais tratados com veículo ou imipramina (15mg/kg) aguda e cronicamente (n=7-11). Veíc: veículo; IMI: imipramina.

Efeito do tratamento com imipramina sobre a resposta de esquivas inibitória e sobre o perfil de ativação neuronal no NDR

A figura 18 mostra a diferença entre os grupos de animais tratados com veículo e submetidos a diferentes tarefas comportamentais, a saber, o labirinto em T fechado e à tarefa de esquivas inibitórias no labirinto em T elevado [$F(1,9)=16,6$; $p<0,05$]. Além do fator tratamento, houve diferença no fator tentativa [$F(5,45)=9,8$; $p<0,05$] e interação entre a tentativa e a tarefa comportamental [$F(5,45)=8,8$; $p<0,05$]. A análise de *post hoc*, usada para a comparação entre os dois grupos em cada uma das tentativas, mostra que o grupo submetido à tarefa de esquivas inibitórias apresentou aumento na latência de saída do braço na esquiva 1 [$t(9)=4,6$; $p<0,05$], esquiva 3 [$t(9)=4,3$; $p<0,05$], esquiva 5 [$t(9)=5,6$; $p<0,05$] e esquiva 6 [$t(9)=4,4$; $p<0,05$].

Comparando-se os 3 grupos submetidos à tarefa de esquivas inibitórias no labirinto em T elevado, a ANOVA de medidas repetidas mostrou os efeitos do tratamento [$F(1,15)=4,6$; $p<0,05$], das tentativas [$F(5,75)=17,1$; $p<0,05$] e interação entre a tentativa e o tratamento [$F(10,75)=3,5$; $p<0,05$]. O teste *post hoc* de Tukey aponta que o grupo tratado com imipramina crônica apresentou prejuízo na aquisição da esquivas inibitórias quando comparado com o grupo de animais tratados com veículo nas esquivas 3, 4 e 5 (figura 18).

Figura 18. Efeito do tratamento i.p. com veículo (Veíc) ou imipramina (IMI; 15mg/kg) aguda e cronicamente (21 dias) sobre o comportamento de ratos submetidos à tarefa de esquiva inibitória no labirinto em T elevado e ao labirinto em T fechado (LTF). Os valores estão representados pela média $\pm$ EPM ($n=7-11$). # $p<0,05$ quando comparado com o grupo T fechado - Veíc; * $p<0,05$ quando comparado com o grupo Esquiva - Veíc.

A figura 19 mostra que houve diferenças significativas no número total de células Fos-IR entre os grupos tratados com veículo e submetidos ao teste do labirinto em T fechado ou à tarefa de esquiiva inibitória no DRC [$t(9)=5,0$; $p<0,05$] e, em um plano médio-caudal, no DRD [$t(9)=2,9$; $p<0,05$].

A análise estatística do número total de células Fos-IR dos grupos submetidos à tarefa de esquiiva inibitória no labirinto em T elevado, mostrou haver diferenças significativas no DRC [$F(2,17)=9,8$; $p<0,05$], em um plano médio-caudal, no DRV [$F(2,17)=4,4$; $p<0,05$], DRD [$F(2,17)=9,6$; $p<0,05$] e asas laterais do NDR [$F(2,17)=5,7$; $p<0,05$], em um plano médio-rostral, no DRD [$F(2,17)=6,4$; $p<0,05$] e asas laterais do NDR [$F(2,17)=6,5$; $p<0,05$] e, em um plano rostral, no DRD [$F(2,17)=9,7$; $p<0,05$]. A análise de *post hoc* revelou que o grupo tratado com imipramina cronicamente apresentou diminuição no número de células Fos-IR no DRC, quando comparado com os grupos tratados com veículo e imipramina agudamente. Quando comparado com o grupo veículo, o grupo tratado com imipramina cronicamente foi capaz de diminuir o número de células Fos-IR em um plano médio-caudal no DRV, DRD e asas laterais do NDR, e em um plano médio-rostral no DRD e nas asas laterais do NDR. Além disso, o grupo tratado com veículo apresenta maior número de células Fos-IR no DRD em um plano rostral quando comparado com ambos os grupos tratados com imipramina (figura 19).

Figura 19. Média $\pm$ EPM do número total de células Fos imunorreativas (Fos-IR) quantificadas em diferentes sub-regiões do NDR de ratos submetidos ao labirinto em T fechado ou à tarefa de esquiva inibitória no labirinto em T elevado de animais tratados com veículo ou imipramina (15mg/kg) aguda e cronicamente (n=5-6). #p<0,05 quando comparado com o grupo T fechado - Veic; *p<0,05 quando comparado com o grupo Esquiva - Veic; *p<0,05 quando comparado com o grupo Esquiva - IMI aguda.

A figura 20 mostra que houve diferenças significativas no número total de células TPH+Fos-IR entre os grupos tratados com veículo e submetidos ao teste do labirinto em T fechado ou à tarefa de esquiva inibitória nas sub-regiões DRC [$t(9)=4,4$; $p<0,05$] e, em um plano médio-caudal, no DRV [$t(9)=5,0$; $p<0,05$] e no DRD [$t(9)=5,2$; $p<0,05$]. Não foram observadas alterações significativas nesse parâmetro em nenhuma outra sub-região do NDR.

A análise estatística do número total de células TPH+Fos-IR dos grupos submetidos à tarefa de esquiva inibitória no labirinto em T elevado, mostrou haver diferenças significativas no DRC [$F(2,17)=16,5$; $p<0,05$] e, em um plano médio-caudal, no DRV [$F(2,17)=31,1$; $p<0,05$] e DRD [$F(2,17)=27,7$; $p<0,05$]. A análise *post hoc* revelou que o grupo tratado com veículo apresenta maior número de neurônios TPH+Fos-IR no DRC e nas sub-regiões DRV e DRD no plano médio-caudal, quando comparado com ambos os grupos tratados com imipramina (figura 20). As demais sub-regiões não foram representadas, pois não houve duplas marcações identificadas.

Figura 20. Média $\pm$ EPM do número total de duplas marcações - células Fos e TPH imunorreativas (Fos+TPH-IR) - quantificadas em diferentes sub-regiões do NDR de ratos submetidos ao labirinto em T fechado ou à tarefa de esquiva inibitória no labirinto em T elevado de animais tratados com veículo ou imipramina (15mg/kg) aguda e cronicamente (n=5-6). [#]p<0,05 quando comparado com o grupo T fechado - Veíc; ^{*}p<0,05 quando comparado com o grupo Fuga - Veíc. Veíc: veículo; IMI: imipramina; ^{*}p<0,05 quando comparado com o grupo Esquiva - IMI aguda.

Estudos Eletrofisiológicos:

Efeito do tratamento com fluoxetina sobre as propriedades passivas da membrana na medida basal

O efeito da administração de fluoxetina nas propriedades passivas da membrana de neurônios serotoninérgicos localizados nas asas laterais do DR pode ser observado na figura 21. A ANOVA de uma via mostrou que há diferenças significativas entre os grupos testados quanto a resistência da membrana (R_m) [$F(2,30)=10,6$; $p<0,05$] (figura 21A). Os resultados obtidos quanto ao potencial de repouso da (V_m) [$F(2,30)=2,9$; $p=0,06$] (figura 21B) e capacitância da membrana (C_m) [$F(2,30) = 3,0$; $p=0,06$] (figura 21C) foram marginais à significância estatística. O teste de post-hoc mostrou que o tratamento crônico foi capaz de aumentar a resistência da membrana quando comparado tanto com o grupo tratado com veículo quanto com fluoxetina agudamente.

Figura 21. Efeitos do tratamento com veículo ou fluoxetina (FLX; 10mg/kg) aguda ou cronicamente sobre as propriedades passivas da membrana: A) Resistência da membrana (Rm), calculada através da aplicação de um pulso de voltagem hiperpolarizante (um incremento de -10mV ao Vm); B) Potencial de repouso da membrana (Vm); C) Capacitância da membrana (Cm). Os dados são expressos como média $\pm$ EPM. *p<0,05 quando comparado com o grupo veículo. *p<0,05 quando comparado com o grupo FLX aguda. (n=9-11)

Efeito do tratamento com fluoxetina sobre as propriedades do potencial de ação na medida basal

As propriedades do potencial de ação (PA) dos neurônios registrados (figura 4), em uma condição basal estão representadas na Tabela 1. A ANOVA de uma via mostra efeitos significativos dos tratamentos para os seguintes parâmetros: limiar de disparo [$F_{2,53}=3,4$; $p<0,05$], amplitude do PA [$F_{2,53}=6,2$; $p<0,05$], tempo de elevação [$F_{2,53}=6,7$; $p<0,05$], amplitude e duração da hiperpolarização posterior ao PA rápida [rAHP: $F_{2,18}=4,2$; $p<0,05$; $F_{2,18}=3,5$; $p<0,05$, respectivamente] e lenta [IAHP: $F_{2,53}=11,3$; $p<0,05$; $F_{2,53}=8,9$; $p<0,05$, respectivamente] e referência do PA [$F_{2,53}=5,7$; $p<0,05$]. Não houve diferença significativa entre os grupos na largura do PA [$F_{2,53}=0,4$; NS] e no tempo de

decaimento [$F_{2,53}=1,6$; NS]. O teste de post-hoc mostrou que o grupo tratado com fluoxetina cronicamente é diferente do grupo de animais tratados com veículo na amplitude do PA, tempo de elevação, amplitude e duração da rAHP. Na amplitude e duração da IAHP o grupo tratado com veículo apresentou diferença significativa comparado com os grupos de animais tratados aguda e cronicamente com fluoxetina. Já na referência do PA, o grupo tratado cronicamente com fluoxetina é diferente tanto do grupo veículo, quanto do grupo tratado com fluoxetina agudamente.

Tabela 1. Parâmetros do potencial de ação

	Veículo			FLX aguda			FLX crônica		
	Média	EPM	n	Média	EPM	n	Média	EPM	n
Limiar de disparo (V)	-1,51	0,05	18	-1,54	0,04	16	-1,16	0,16	20
Amplitude do PA (V)	4,51	0,09	18	4,36	0,10	16	4,03*	0,10	20
Largura do PA (ms)	1,59	0,12	18	1,47	0,08	16	1,48	0,06	20
Tempo de elevação (ms)	0,28	0,01	18	0,33	0,01	16	0,37*	0,01	20
Tempo de decaimento (ms)	1,57	0,14	18	1,36	0,10	16	1,31	0,07	20
Amplitude rAHP (V)	3,75	0,76	6	1,32	1,11	6	0,30*	0,68	7
Duração rAHP (ms)	0,44	0,42	6	2,89	1,39	6	4,99*	1,44	7
Amplitude IAHP (V)	-0,77	0,02	18	-0,68*	0,02	16	-0,61*	0,02	20
Duração IAHP (ms)	42,88	2,44	18	31,22*	3,15	16	26,12*	3,10	20
Referência do PA	-2,29	0,05	18	-2,22	0,04	16	-1,78**	0,17	20

* $p<0,05$ comparado com o grupo veículo; ** $p<0,05$ comparado com o grupo FLX aguda.

PA=potencial de ação; rAHP=hiperpolarização posterior ao PA rápida; IAHP=hiperpolarização posterior ao PA lenta.

Efeito do tratamento com fluoxetina sobre a taxa de disparo e envolvimento dos autoreceptores 5HT1A

A análise da atividade espontânea [$F(2,30)=3,9$; $p<0,05$] (figura 22A, B) e da injeção de corrente [$F(1,28)=6,4$; $p<0,05$] (figura 22C, D) na condição basal demonstrou efeito do tratamento sistêmico. O teste de *post hoc* mostrou que o grupo tratado com veículo é diferente, somente, do grupo tratado cronicamente com fluoxetina.

Quando desafiados com uma droga agonista de receptores 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT, a análise de medidas repetidas revelou um efeito significativo do fator droga [$F(3,84)=39,0$; $p<0,05$], tratamento sistêmico [$F(2,28)=11,3$; $p<0,05$] e interação tratamento x droga [$F(6,84)=4,1$; $p<0,05$] (figura 22A). O teste de *post hoc* mostrou que o grupo tratado com fluoxetina cronicamente é diferente do grupo de animais tratados com veículo na medida basal e final (pós). Já quando desafiadas com 8-OH-DPAT e WAY-100635 as secções pertencentes ao grupo tratado com fluoxetina crônica apresentou diferença na taxa de disparo quando comparada tanto com o grupo controle, quanto com o grupo de animais tratados com fluoxetina agudamente.

A Figura 22A também mostra que a droga utilizada para desafiar as secções altera a taxa de disparo nos grupos controle [$F(3,27)=28,9$; $p<0,05$] e agudo [$F(3,33)=18,6$; $p<0,05$], mas não foi capaz de alterar a taxa de disparo em animais tratados cronicamente com fluoxetina [$F(3,24)=2,7$; NS] (figura 22A). A análise *post hoc* mostra que, no grupo controle, comparando-se com a medida basal, o desafio com o 8-OH-DPAT e o WAY-100635 foi capaz de alterar a taxa de disparo, a qual é recuperada no pós. Já no grupo tratado com fluoxetina

agudamente, a medida basal apresentou diferença significativa somente quando comparada com os registros realizados após o desafio com o 8-OH-DPAT.

Figura 22. Taxa de disparo dos neurônios serotoninérgicos registrados nas asas laterais do NDR de animais tratados sistemicamente com veículo ou fluoxetina aguda e cronicamente. A) Atividade espontânea (0pA) e desafio das secções encefálicas com 8-OH-DPAT e WAY-100635. B) Exemplo de traços da atividade espontânea basal. C) Injeção de corrente durante a medida basal. As correntes foram incrementadas de -100pA até +150pA em intervalos de 10pA. PA = potencial de ação. Dados expressos como média $\pm$ EPM ($n=9-12$). * $p<0,05$ quando comparado com o grupo veículo; + $p<0,05$ quando comparado com o grupo agudo; # $p<0,05$ quando comparado com seu respectivo basal.

5. DISCUSSÃO

A primeira etapa desse trabalho teve por objetivo analisar o perfil de ativação neuronal nas diferentes sub-regiões do NDR de ratos submetidos à tarefa de fuga no labirinto em T elevado após o tratamento agudo e crônico com a fluoxetina ou a imipramina. Para efeitos comparativos, também foi avaliado o perfil de ativação destas mesmas sub-regiões do NDR após tratamento agudo e crônico com a imipramina em ratos submetidos à tarefa de esquiva inibitória no labirinto em T elevado.

Conforme previamente descrito por Poltronieri e colaboradores (2003) e confirmado em estudos posteriores (Zanoveli et al., 2007; 2010; Vicente et al., 2014), nossos resultados mostram que a administração sistêmica aguda com fluoxetina na dose de 10mg/kg não foi capaz de alterar a resposta de fuga, enquanto que o tratamento prolongado por 21 dias com esse fármaco aumentou a latência de saída do braço aberto do aparato, indicando a ocorrência de efeito do tipo panicolítico. Corroborando ainda estudos prévios (Teixeira et al., 2000; Vicente et al., 2014), o mesmo perfil de resposta foi obtido com as administrações aguda e crônica de imipramina (15 mg/kg).

Desta forma, os resultados obtidos neste modelo experimental guardam correspondências com evidências obtidas na clínica mostrando que a administração, por longo período, de antidepressivos promove a melhora nos quadros de pânico (Kahn et al., 1986; Stahl et al., 2003; Baldwin et al., 2014).

Com relação à expressão da proteína Fos, marcador indireto de ativação neuronal, observamos tanto no experimento com a fluoxetina, como no com a imipramina, que os animais do grupo tratado com veículo e submetidos à tarefa

de fuga apresentaram um aumento significativo no número de células Fos-IR localizadas nas asas laterais do NDR, quando comparados com o grupo submetido ao labirinto em T fechado. Não houve qualquer alteração no número de neurônios serotonérgicos que são ativados (Fos+TPH-IR) pela tarefa de fuga, seja nas asas laterais ou em qualquer outra sub-região do NDR.

Tais achados corroboram com um trabalho prévio de nosso grupo de pesquisa com animais que não receberam administração prévia de drogas. Mais especificamente, Spiacci e colaboradores (2012) mostram, a ativação de neurônios não-serotonérgicos das asas laterais do NDR em animais submetidos à tarefa de fuga no labirinto em T elevado. Cabe ressaltar que no estudo de Spiacci e colaboradores também foi observado um moderado, porém significativo, aumento na expressão de neurônios Fos-IR no DRD, o qual também pode ser observado em nosso estudo com a fluoxetina, ainda que não se tenha evidenciado significância estatística. No entanto, tal alteração não foi observada no estudo com a imipramina, sugerindo que a alteração de ativação no DRD não seja significativamente expressiva.

Com base nos resultados obtidos por nós, não é possível determinar o fenótipo dos neurônios não-serotonérgicos que são recrutados nas asas laterais pela tarefa de fuga no labirinto em T elevado. Contudo, estudos imunoistoquímicos mostram que a sub-região das asas laterais é particularmente rica em neurônios GABAérgicos (Calizo et al., 2011) e essas células parecem ser ativadas durante a resposta de fuga (Roche et al., 2003). Mais especificamente, um estudo realizado por Roche e colaboradores (2003) mostrou que submeter ratos ao nado em um tanque com água, situação que evoca comportamentos ativos de defesa semelhantes à fuga, promove um

aumento na expressão da proteína Fos em neurônios GABAérgicos, mas não-serotonérgicos ou glutamatérgicos, localizados nas asas laterais do NDR. Há evidências de que o nível extracelular de 5-HT em regiões encefálicas relacionadas ao estresse, invadidas pelas asas laterais, mostra-se diminuído após o estresse agudo promovido pelo nado (Kirby et al., 1995; Kirby e Lucki, 1997). Assim, foi proposto que a expressão de comportamentos defensivos ativos, durante o teste, culmina no recrutamento de interneurônios GABAérgicos nas asas laterais, os quais inibiriam os neurônios serotonérgicos nesta sub-região e, em última análise, haveria diminuição na liberação de 5HT nas regiões de projeção.

Nesse sentido, uma região encefálica que recebe projeções do NDR e poderia estar envolvida na hipótese testada por Roche e colaboradores (2003) é a SCPD. Evidências neuroanatômicas e eletrofisiológicas apontam conexões entre o NDR e a SCPD (Stezhka e Lovick, 1997; Beitz, 1982; para revisão sobre conexões do NDR, ver Hale e Lowry, 2011), uma região que tem sido consistentemente associada à gênese/regulação do comportamento de fuga (Paul et al., 2014; Graeff, 2002; 2003; 2017; Schenberg, 2010). Além disso, diversos estudos tem mostrado que a facilitação da neurotransmissão serotonérgica na SCPD promove um claro efeito anti-pânico observados no modelo do labirinto em T elevado e pela estimulação elétrica/química da mesma região mesencefálica (Beckett e Marsden, 1997; Schutz et al., 1985; Zanoveli et al., 2005; para revisão, ver Graeff e Zangrossi, 2010).

Ainda com relação aos neurônios não-serotonérgicos recrutados nas asas laterais, tem sido demonstrado que, além de neurônios GABAérgicos, populações de células com diferentes características neuroquímicas também

são encontradas nesta sub-região do NDR, como o glutamato e o NO (Commons et al., 2003; Okere e Waterhouse, 2006; Vasudeva et al., 2011), havendo também a possibilidade de que a exposição à tarefa de fuga no labirinto em T-elevado possa ter ativado algumas dessas células. Reforçando a possível participação destes diferentes sistemas de neurotransmissão, tem sido postulado que a ativação de neurônios nitrérgicos localizados nas asas laterais do NDR poderia levar à inibição dos neurônios serotoninérgicos ali presentes (Vasudeva et al., 2011). Já com relação à neurotransmissão glutamatérgica, foi demonstrado que a microinjeção intra-asas laterais de ácido caínico, um agonista glutamatérgico, promove robusta reação de fuga em animais colocados em uma arena circular e facilita a expressão da resposta de fuga no labirinto em T-elevado (Spiacci et al., 2015). Matthiensen e colaboradores (2017) mostram que a reação de fuga induzida pela administração de ácido caínico nas asas laterais é acompanhada pela expressão de células Fos-IRs na SCPD e em uma outra área consistentemente associada à fisiopatologia do transtorno do pânico, o hipotálamo dorsomedial (Johnson et al., 2010; Molosh et al., 2010).

Diante das evidências que ressaltam a importância destes neurônios para o desencadeamento da resposta de fuga, como também para o mecanismo de ação de drogas panicolíticas (como discutido abaixo), estudos para identificação neuroquímica destas células nos parecem pertinentes para esta área de pesquisa.

Com relação ao tratamento farmacológico, nossos resultados mostram que o aumento na ativação de neurônios não-serotoninérgicos das asas laterais, promovido pela tarefa de fuga, não foi alterado nos grupos de animais que receberam injeções agudas tanto de fluoxetina como de imipramina, porém, foi

bloqueado nos grupos de animais tratados cronicamente com esses dois ADs. De maneira interessante, a administração crônica de fluoxetina, mas não de imipramina, também inibiu o aumento, ainda que não significativo, no número de células Fos-IR recrutadas no DRD pela tarefa de fuga.

Desta forma, o tratamento crônico com estes dois ADs tanto inibe a expressão da resposta de fuga, como inibe a ativação de neurônios não-serotonérgicos das asas laterais que são recrutados por esta tarefa.

No que diz respeito ao efeito destes dois ADs sobre o recrutamento de neurônios serotonérgicos, perfis diferentes foram obtidos após a administração de fluoxetina e de imipramina e serão discutidos separadamente para cada classe de droga.

Nossos resultados mostram que o tratamento prolongado com a fluoxetina foi capaz de aumentar significativamente o número de neurônios Fos-TRP-IR presentes nas asas laterais do NDR.

O grupo de pesquisa liderado pelo americano Christopher Lowry tem proposto que neurônios serotonérgicos oriundos especificamente das asas laterais do NDR emitiriam projeções para a SCPD, formando o chamado trato periventricular, que é proposto pelos pesquisadores Deakin e Graeff (1991) na teoria do papel dual da 5-HT na ansiedade (ver introdução). A ativação desta via resultaria na inibição da expressão do comportamento de fuga (para revisão ver Paul e Lowry, 2013).

Foi demonstrado que estímulos capazes de provocar ataques de pânico, como a administração sistêmica de lactato em ratos (Johnson et al., 2008), ou a exposição desses animais a concentrações elevadas de CO₂ (Johnson et al.,

2005), promovem um aumento na ativação de neurônios serotoninérgicos localizados nas asas laterais do NDR, sem provocar alterações comportamentais. Com base nestes resultados, os autores sugerem que tais estímulos panicogênicos ao ativarem neurônios serotoninérgicos nas asas laterais do NDR causariam um aumento na liberação de 5-HT na SCPD (Johnson et al., 2005; 2014).

Diante disso, nos trabalhos de Johnson e colaboradores (2005; 2008), a ineficácia dos estímulos panicogênicos (injeção de lactato e exposição ao CO₂) em gerar comportamentos de fuga, seria justificada pelo aumento na ativação dos neurônios 5-HT das asas laterais do NDR, o que promoveria um aumento na liberação de 5-HT na SCPD.

Portanto, o efeito do tipo panicolítico observado após o tratamento crônico, mas não agudo, com fluoxetina poderia ser explicado pela ativação de neurônios serotoninérgicos localizados nas asas laterais, que em última análise, promoveria um aumento na liberação de serotonina na SCPD, inibindo a expressão do comportamento de fuga. Isto também estaria de acordo com um estudo de microdiálise in vivo mostrando que o tratamento crônico, mas não agudo, com a fluoxetina, na mesma dose por nós empregada, aumenta a liberação de 5-HT na SCPD (Zanoveli et al., 2010).

Em consonância com o envolvimento da uma via serotoninérgica que conecta as asas laterais à SCPD na inibição de comportamentos associados ao pânico, trabalho recente realizado pelo nosso grupo de pesquisa mostra que a administração do antagonista de receptores 5-HT_{1A}, WAY-100635, nas asas laterais inibe a expressão do comportamento de fuga em ratos submetidos ao labirinto em T elevado, efeito do tipo panicolítico. Por outro lado, a administração

local de 8-OH-DPAT promove efeito oposto (Spiacci et al., 2015). O efeito do WAY-100635 e do 8-OH-DPAT pode ser atribuído à desinibição e inibição, respectivamente, dos neurônios serotoninérgicos localizados nessa sub-região.

Ainda que sem distinguir sub-regiões do NDR, Pobbe e Zangrossi (2005) mostraram que o efeito do tipo panicolítico observado após administração intra-NDR de WAY-100635 foi bloqueado pela injeção prévia na SCPD de antagonistas 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A}. No mesmo sentido, resultados ainda mais recentes mostram que o efeito anti-fuga promovido pela microinjeção de WAY-100635 nas asas laterais é bloqueado pela administração da mesma droga na SCPD (Melina Matthiesen e Hélio Zangrossi Jr., dados não publicados), dando ainda mais sustentação à hipótese levantada acima.

. Diante da observação que neurônios serotoninérgicos das asas laterais foram recrutados pelo tratamento crônico com a fluoxetina, focamos nossa atenção para o papel que receptores 5-HT_{1A} podem desempenhar para a ocorrência deste fenômeno. Nossa hipótese é que a dessensibilização dos autorreceptores 5-HT_{1A} desempenhe um papel crucial no perfil de ativação neuronal observado.

Diversos trabalhos têm mostrado que no início do tratamento, o efeito dos ISRS em aumentar a disponibilidade sináptica de 5-HT nas áreas de projeção é observado, porém intensidade insuficiente para o desencadeamento do efeito terapêutico. Este fenômeno é explicado pelo aumento na concentração de 5-HT também nos núcleos da rafe, como o NDR, em decorrência ao tratamento com os ISRS. No NDR, a 5-HT se liga aos autorreceptores inibitórios 5-HT_{1A}, causando uma diminuição na taxa de disparo de neurônios serotoninérgicos e a

consequente inibição da liberação deste neurotransmissor para as áreas de projeção (para revisão ver Blier e El Mansari, 2013).

Um estudo utilizando imunomarcacão com ouro mostrou que o tratamento agudo com a fluoxetina promove uma dessensibilização rápida e reversível dos receptores 5-HT_{1A} (Riad et al., 2001; 2004), a qual não parece ser suficiente para promover efeito antidepressivo. Contudo, tem sido observado que com o tratamento prolongado com ISRS, os receptores 5-HT_{1A} são dessensibilizados e os neurônios serotoninérgicos recuperam sua taxa de disparo normal (Blier e Montigny, 1994). Inclusive, foi demonstrado que uma redução de 30% na expressão dos autorreceptores 5-HT_{1A} permite que o efeito terapêutico dos ISRS administrados cronicamente seja observado em animais hiporresponsivos ao tratamento (Richardson-Jones et al., 2010).

A fim de testar a hipótese de que somente o tratamento prolongado com a fluoxetina promoveria uma dessensibilização dos receptores 5-HT_{1A} expressos em neurônios serotoninérgicos na sub-região das asas laterais, realizamos os experimentos de eletrofisiologia, cujo resultados são discutidos abaixo.

A proposta consistiu em avaliar a responsividade dos receptores 5-HT_{1A} expressos exclusivamente em neurônios serotoninérgicos das asas laterais. No entanto, logo na formulação desta proposta de estudo, nos deparamos com algumas limitações metodológicas. Estudos prévios realizaram a caracterização eletrofisiológica dos neurônios serotoninérgicos localizados no NDR, utilizada por muitos para identificação destes neurônios (Aghajanian e Lakoski, 1984; Aghajanian e Vandermaelen, 1982; Vandermaelen e Aghajanian, 1983). Entretanto, um número crescente de evidências indicam que estas diferenças

eletrofisiológicas não são claras o suficiente para esta classificação, uma vez que algumas propriedades se sobrepõem (Kirby et al., 2003; Beck et al., 2004; Calizo et al., 2011).

Além disso, outra forma comumente utilizada para identificação dos neurônios serotoninérgicos baseia-se na observação de uma dada resposta, seja ela eletrofisiológica ou neuroquímica, como a liberação de 5-HT em áreas de inervação, à estimulação dos receptores 5-HT_{1A} pela utilização de agentes farmacológicos. Contudo, foi detectada a presença destes receptores também em neurônios não-serotoninérgicos localizados no NDR. Assim, o desafio com tais drogas não é indicado para a identificação de neurônios presumidamente serotoninérgicos (Kirby et al., 2003; Beck et al., 2004; Calizo et al., 2011).

Na busca da superação de tais limitações, identificamos na literatura uma linhagem transgênica de camundongos, ePet-YFP, que expressam um indicador fluorescente em neurônios serotoninérgicos. A estratégia para o desenvolvimento desta linhagem de camundongos baseia-se na observação de que o gene ETS Pet-1 é expresso específica e exclusivamente em neurônios serotoninérgicos (Scott et al., 2005). Portanto, a utilização desta linhagem de animais permite a identificação e direcionamento das análises para os neurônios serotoninérgicos localizados nas asas laterais do NDR.

Os resultados obtidos pela investigação das propriedades passivas dos neurônios alvo mostram que o tratamento crônico, mas não agudo, com fluoxetina aumentam a resistência da membrana e a frequência de disparo, avaliadas durante o registro basal. Além disso, o tratamento prolongado com a fluoxetina também altera parâmetros relacionados ao potencial de ação, a saber, o limiar de disparo, a amplitude do potencial de ação, o tempo de elevação e a

duração e a amplitude da hiperpolarização posterior ao potencial de ação. Estes resultados sugerem que o tratamento prolongado com a fluoxetina aumenta a excitabilidade basal dos neurônios serotoninérgicos localizados nas asas laterais do NDR.

Nesse sentido, Czachura e colaboradores (2000), observando o disparo de neurônios do NDR através de registro extracelular, mostraram que a administração aguda de fluoxetina (10mg/kg) não altera a taxa de disparo avaliada 6, 12 ou 24 horas após a administração. Tal resultado corrobora com o encontrado por nós após o tratamento agudo com a droga, uma vez que realizamos o registro eletrofisiológico uma hora após a administração i.p. de fluoxetina e alterações no disparo não foram igualmente evidenciadas. Neste mesmo estudo citado, foi demonstrado que a injeção de fluoxetina por 3 dias promove uma inibição na taxa de disparo, a qual é recuperada após 21 dias de tratamento (Czachura et al., 2000). Traçando um paralelo com nossos resultados, mostramos que nas asas laterais há um aumento na taxa de disparo após o tratamento prolongado com a fluoxetina. A diferença observada entre os trabalhos pode ser devido ao fato de que os registros eletrofisiológicos realizados em nosso estudo foram restritos aos neurônios serotoninérgicos localizados nas asas laterais.

Quando as secções foram desafiadas com o 8-OH-DPAT, observamos que os neurônios pertencentes aos grupos controle e agudo apresentaram uma diminuição na taxa de disparo, cujo efeito foi revertido após *washout* da droga. Adicionalmente, os neurônios registrados pertencentes ao grupo tratado cronicamente com fluoxetina não se apresentaram sensíveis ao desafio com 8-OH-DPAT. Embora nenhum estudo tenha sido realizado de forma a distinguir

sub-regiões do NDR, a literatura com relação à dessensibilização dos receptores 5-HT_{1A} no NDR após tratamento prolongado com ISRS é vasta.

Particularmente com relação ao tratamento prolongado com fluoxetina, tal fenômeno tem sido observado em estudos no NDR que utilizam de registros eletrofisiológicos extracelulares (Le Poul et al., 2000; Mochizuki et al., 2002; Castro et al., 2003) e de *whole-cell* (Cornelisse et al., 2007). Como observado aqui, nestes estudos a diminuição na taxa de disparo promovida pelo desafio com 8-OH-DPAT é atenuada nos grupos de animais tratados cronicamente com a fluoxetina. Além disso, a diminuição na liberação de serotonina no hipocampo promovida pelo tratamento com 8-OH-DPAT, mensurada pela técnica de microdiálise, também se mostra atenuada pela administração prolongada de fluoxetina (Kreiss et al., 1995; Rossi et al., 2008).

A diminuição da responsividade dos receptores 5-HT_{1A} pode ser atribuída à ausência na expressão ou à falha no acoplamento à proteína G, prejudicando a sinalização intracelular. Estudos têm demonstrado que o tratamento prolongado com fluoxetina não altera a densidade dos receptores expressos na membrana plasmática de neurônios presentes no NDR, utilizando as técnicas de *binding* (Le Poul et al., 2000; Hervás et al., 2001; Hensler et al., 2002) e imunomarcação com ouro (Descarries, Riad, 2012). Por outro lado, a fim de avaliar possíveis alterações na regulação do receptor 5-HT_{1A}, considerando sua interação com a proteína G, estudos de autorradiografia mostraram que o tratamento crônico não só com fluoxetina (Hensler et al., 2002; Castro et al., 2003), mas também com escitalopram (Rossi et al., 2008b), diminui os níveis de [³⁵S]GTPγS, estimulado pela ativação de receptores 5-HT_{1A} no NDR. Estes resultados sugerem que a dessensibilização destes receptores ocorra em âmbito da proteína G.

Entretanto, não são todos os fármacos ISRS que apresentam tal mecanismo. Utilizando-se o experimento supracitado de autorradiografia com [³⁵S]GTP γ S, foi demonstrado que o tratamento prolongado com sertralina (Rossi et al., 2008) e citalopram (Rossi et al., 2008b) não promove qualquer alteração no NDR. No mesmo sentido, fármacos representantes de outras classes de antidepressivos, como a imipramina (Shen et al., 2001), amitriptilina e venlafaxina (Rossi et al., 2006), também não evidenciam alterações.

De maneira diferente ao que observamos no experimento com a fluoxetina, o tratamento crônico com imipramina não aumentou o número total de neurônios duplamente marcados (Fos+TPH-IR) quantificados nas asas laterais do NDR, ou mesmo em qualquer outra sub-região analisada.

Apesar da semelhança no perfil de ativação neuronal entre os tratamentos agudo e crônico com imipramina no que diz respeito à ativação de neurônios serotoninérgicos, a análise comportamental realizada aponta efeito do tipo panicolítico somente em animais tratados cronicamente com imipramina. Desta forma, alterações na neurotransmissão serotoninérgica a nível pré-sináptico não parecem ser necessárias para a ocorrência do efeito panicolítico deste antidepressivo tricíclico.

Mochizuki e colaboradores (2002) mostram que, mediante o desafio com 8-OH-DPAT, não observa-se alterações na taxa de disparo de neurônios serotoninérgicos do NDR ou na liberação de 5HT no hipocampo, em grupos de animais que receberam administração de veículo ou tratamento prolongado como a imipramina. Isto também ocorre com outras drogas antidepressivas como o também composto tricíclico desipramina (Kreiss et al., 1995). Estas

observações são compatíveis com evidências da literatura mostrando que o tratamento crônico com antidepressivos tricíclicos não promove alterações na atividade de neurônios 5-HT a nível pré-sináptico, mas sim favorece a neurotransmissão serotoninérgica em áreas de inervação do NDR (Montigny e Aghajanian, 1978; Gallager e Bunney, 1979; Blier e Montigny, 1980; Chaput et al., 1991; Hensler, 2002). É assim concebível que estas alterações pós-sinápticas sejam subjacentes ao efeito panicolítico aqui evidenciado após o tratamento prolongado com imipramina.

Nesse sentido, estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa, que abordam alterações pós-sinápticas promovidas pelo tratamento crônico com imipramina, mostram uma sensibilização dos receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} localizados na SCPD (Zanoveli et al., 2005; Jacob et al., 2002) e HDM (Bortoli et al., 2013). Mais especificamente, ratos tratados com imipramina por 21 dias receberam microinjeções de agonistas 5-HT_{1A} (8-OH-DPAT) ou 5-HT_{2A} (DOI) intra-SCPD ou intra-HDM e foram testados nos modelos do labirinto em T elevado (Zanoveli et al., 2005; Nascimento et al., 2014), da estimulação elétrica da SCPD (Jacob et al., 2002) ou da estimulação elétrica do HDM (Bortoli et al., 2013). Os autores observaram que a inibição do comportamento de fuga observado após microinjeção dos agonistas citados foi significativamente maior no grupo de animais tratados previamente com imipramina crônica. Portanto, o tratamento crônico com imipramina parece sensibilizar ambos os receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} localizados na SCPD e no HDM, os quais estariam envolvidos no efeito antipânico deste fármaco.

É importante ressaltar que a facilitação na neurotransmissão serotoninérgica após o tratamento crônico com antidepressivos tricíclicos também

é observada em outras regiões encefálicas, como o hipocampo. Tal alteração tem sido associada ao efeito antidepressivo promovido pelo tratamento prolongado com essa classe de (Montigny e Aghajanian, 1978; Gallager e Bunney, 1979; Chaput et al., 1991; Hensler, 2002).

É ainda digno de nota que alterações pós-sinápticas em áreas criticamente associadas ao pânico também são observadas após tratamento prolongado com a fluoxetina. Por exemplo, Zanolini e colaboradores (2007) mostram que o efeito anti-fuga no labirinto em T-elevado causado pela administração intra-SCPD de 8-OH-DPAT está aumentado em ratos tratados cronicamente com a fluoxetina. Este resultado sugere que a administração crônica com a fluoxetina, assim como com a imipramina, favorece a neurotransmissão mediada por receptores 5-HT_{1A} localizados na SCPD.

Ademais, resultados recentes obtidos mostram, através da técnica de *western blot*, que o tratamento prolongado com a imipramina, mas não com a fluoxetina, nas mesmas doses utilizadas no presente trabalho, foi capaz de aumentar a densidade de receptores 5-HT_{1A} na SCPD (Vilela-Costa et al., dados não publicados). Estes resultados sugerem que as alterações pós-sinápticas induzidas pelo tratamento crônico com a fluoxetina na SCPD resultem de alterações nas vias de sinalização intracelular decorrentes da ativação do receptor 5-HT_{1A} nesta área.

Dando respaldo a esta ideia, estudos na literatura investigando os receptores 5-HT_{1A} em outras regiões encefálicas, como no hipocampo, mostram que o tratamento crônico com imipramina aumenta a densidade de tais receptores (Klimeck et al., 1994; Maj et al., 1996; Moreau et al., 2001). Por outro lado, tal resultado não é observado após o tratamento com fluoxetina (Welner et

al., 1989; Klimeck et al., 1994; Hensler, 2002; Hanoum et al., 2004). Portanto, o efeito da fluoxetina em sensibilizar os receptores 5-HT_{1A} parece não estar relacionado à alteração na densidade dos receptores, mas tem sido atribuído à capacidade de ativar a proteína G (Shen et al., 2002; Castro et al., 2003).

Quando analisamos o efeito do tratamento com imipramina em animais submetidos à tarefa de esquiva inibitória no labirinto em T elevado, observamos que somente o tratamento prolongado prejudicou a aquisição da esquiva inibitória, indicativo de efeito do tipo ansiolítico. Este mesmo efeito foi igualmente observado em estudos prévios com o labirinto em T elevado (Teixeira et al., 2000; Zanoveli et al., 2005; Vicente et al., 2014).

Os resultados imunoistoquímicos obtidos mostram que o grupo de animais tratados com veículo e submetidos à tarefa de esquiva inibitória apresentou um maior número de células Fos-IR no DRD e no DRC, quando comparado ao grupo controle submetido ao labirinto em T fechado. Já com relação à dupla marcação, foi observado um maior recrutamento de neurônios serotoninérgicos nas sub-regiões DRC, DRD e DRV nos animais submetidos à tarefa de esquiva. É importante destacar que, diferente da tarefa de esquiva, a tarefa de fuga não promoveu qualquer alteração no número de células Fos+TPH-IR em qualquer uma das sub-regiões do NDR analisadas.

O recrutamento de neurônios serotoninérgicos tanto do DRD quanto do DRC pela tarefa de esquiva inibitória está de acordo com evidências da literatura que apontam que os neurônios destas sub-regiões são ativados por diferentes situações ou estímulos ansiogênicos. Por exemplo, Abrams e colaboradores (2005) mostram que a administração sistêmica de drogas ansiogênicas, como a

cafeína, o mCPP (agonista não seletivo de receptores 5-HT_{2C}) e o FG-7142 (agonista inverso de receptores benzodiazepínicos), induzem a expressão da proteína Fos preferencialmente em neurônios TPH-IR localizados no DRD e DRC. Vale ressaltar também que efeitos semelhantes foram observados em animais submetidos ao modelo de derrota social (Gardner et al., 2005), à exposição a choques elétricos inescapáveis nas patas (Grahn et al., 1999), assim como após a administração intra-cerebroventricular de CRF (Staub et al., 2006).

No mesmo sentido, nosso grupo de pesquisa mostrou que estas mesmas sub-regiões do NDR são recrutadas pelo comportamento de esquiva inibitória evocado no modelo do labirinto em T elevado (Spiacci et al., 2012). Usando animais que não receberam qualquer administração prévia de drogas, Spiacci e colaboradores (2012) mostram que neurônios serotoninérgicos localizados no nível médio e caudal do NDR, mais precisamente nas sub-regiões DRD e DRC, são recrutados durante a aquisição do comportamento de esquiva inibitória.

A observação de que a resposta de esquiva recruta neurônios serotoninérgicos predominantemente no DRD e DRC corrobora ainda a hipótese de Lowry e colaboradores (2005) quanto ao papel das diferentes sub-regiões do NDR na ansiedade e no pânico. Em uma revisão recente e mais aprofundada (Paul e Lowry, 2013), estes pesquisadores propõem que o DRD e DRC são as fontes de projeções serotoninérgicas que inervam estruturas límbicas relacionadas com a gênese/regulação de reações defensivas a ameaças potenciais, como o núcleo basolateral da amígdala (BLA). Tais projeções formariam o trato prosencefálico proposto por Deakin e Graeff (1991), que postularam que a liberação de serotonina em estruturas como o BLA promoveria efeito do tipo ansiogênico. Estudo posterior realizado por Vicente e Zangrossi (2012)

corroborar tal pressuposto ao mostrar que a injeção intra-BLA de serotonina facilita a aquisição da resposta de esquiva inibitória no labirinto em T elevado.

Com relação aos efeitos causados pelo tratamento com a imipramina, nossos resultados mostram que a administração crônica da droga foi capaz de diminuir o número de células Fos-IR, indiscriminadamente, em todas as sub-regiões analisadas, com exceção do DRI. Foi observado também que tanto a administração aguda como crônica deste fármaco reduziram o número de neurônios serotoninérgicos do DRC, DRV e DRD que foram recrutados pela tarefa de esquiva.

Assim, com base na proposta de Lowry e colaboradores quanto à importância destas sub-regiões para o desencadeamento da ansiedade, nossos resultados indicam que esta diminuição no número de neurônios serotoninérgicos recrutados pode ser importante, ainda que não suficiente para a observação do efeito ansiolítico causado pela administração crônica de imipramina.

A observação de que tanto o tratamento agudo como crônico com a imipramina causam o mesmo efeito sobre estes neurônios serotoninérgicos lança luz sobre a ação desta droga nos receptores 5-HT_{1A} pré-sinápticos localizados no NDR. Conforme mencionado anteriormente, diferente do que ocorre com os ISRS, o tratamento crônico com os antidepressivos tricíclicos não é capaz de promover uma dessensibilização dos autorreceptores 5-HT_{1A} (Blier e Montigny, 1980; Mochizuki et al., 2002).

Assim, o menor número de neurônios serotoninérgicos ativados após o tratamento agudo e crônico com imipramina pode ser justificado pelo aumento na disponibilidade extracelular de serotonina no NDR. No NDR, a serotonina se liga aos autorreceptores inibitórios 5-HT_{1A} causando uma diminuição na taxa de

disparo de neurônios serotoninérgicos (para revisão ver Blier e El Mansari, 2013). Tal fenômeno justificaria os resultados semelhantes obtidos com relação ao tratamento agudo e prolongado com imipramina em animais submetidos à tarefa de esquiva inibitória no labirinto em T elevado.

De forma semelhante ao observado no experimento que avaliou a resposta de fuga de animais tratados com imipramina, apesar de não haver diferenças no perfil de ativação de neurônios serotoninérgicos comparando-se os grupos de tratamento agudo e crônico, somente o tratamento crônico com imipramina foi capaz de promover efeito ansiolítico na análise comportamental. Este resultado estaria associado, conforme discutido anteriormente, a alterações pós-sinápticas promovidas pelo tratamento prolongado, mas não agudo com imipramina.

Como exemplo, o trabalho realizado por Vicente e colaboradores (2014) aponta alterações pós-sinápticas no BLA mediante o tratamento prolongado com a imipramina. Utilizando o teste do labirinto em T elevado e o teste de transição claro-escuro, os autores mostram que o efeito do tipo ansiogênico promovido pela microinjeção intra-BLA de um agonista de receptores 5-HT_{2C}, o MK-212, foi abolido no grupo de animais tratados crônica, mas não agudamente, com a imipramina. Cabe ressaltar, que os mesmos autores mostram que o efeito do MK-212 é semelhante ao observado após a administração de 5-HT nesta mesma área encefálica, indicando que receptores 5-HT_{2C} medeiam os efeitos ansiogênicos observados com o agonista endógeno. Desta forma, os resultados de Vicente e colaboradores (2014) indicam que o efeito ansiolítico da imipramina é correlacionado com uma dessensibilização funcional de receptores 5-HT_{2C} no BLA. Concomitante a esta alteração plástica sobre este subtipo de receptores,

os autores mostram ainda que o efeito ansiolítico promovido pela administração prolongada com imipramina foi bloqueado pela microinjeção prévia no BLA do antagonista de receptores 5HT1A, o WAY-100635. Este último achado indica que os receptores 5-HT1A do BLA passam a ser recrutados após o tratamento crônico com a imipramina, levando ao efeito ansiolítico observado.

É importante ressaltar que o BLA não parece ser a única estrutura implicada no efeito ansiolítico dos ADs. Dados recentemente obtidos em nosso laboratório apontam também para a participação do hipocampo ventral. Mais precisamente, Sant'Ana (2017) mostram que a administração nesta área de WAY-100635 também foi capaz de inibir o efeito ansiolítico promovido pela administração crônica de fluoxetina em ratos submetidos ao modelo da transição claro-escuro. Além disso, resultados parciais, obtidos pela técnica da western blot, mostram que o tratamento prolongado com esse AD é capaz de reduzir a densidade dos receptores 5-HT1A no HV (Ana Beatriz Sant'Ana, Heloisa Vilela e Hélio Zangrossi Jr, dados não publicados).

Diante dos resultados obtidos e apresentados na presente tese, podemos inferir que o efeito panicolítico promovido pelo tratamento crônico com fluoxetina está associado à diminuição na ativação de neurônios não-serotonérgicos e um aumento no recrutamento de neurônios serotonérgicos localizados nas asas laterais do NDR, sendo que esta última pode estar relacionada à dessensibilização dos autorreceptores 5-HT1A. Somado também a alterações pós-sinápticas promovidas pelo tratamento com esse fármaco.

Já o efeito panicolítico observado após tratamento prolongado com imipramina, não parece ser decorrente de alterações na atividade de neurônios

serotonérgicos localizados no NDR. Podemos sugerir que a redução no recrutamento de neurônios não-serotonérgicos nas asas laterais, além de alterações pós-sinápticas, em estruturas como a SCPD e HDM, estariam mediando tais efeitos.

Por fim, o aumento na ativação de neurônios serotonérgicos no DRC, DRD e DRV, promovido pela tarefa de esquiva, é bloqueado após o tratamento com imipramina, seja administrada aguda ou cronicamente. Assim sendo, é concebível que a resposta ansiolítica promovida pelo tratamento crônico com esta droga seja subjacente tanto à diminuição na ativação de neurônios não-serotonérgicos nas diversas sub-regiões do NDR, quanto a alterações pós-sinápticas, como as promovidas no BLA e hipocampo ventral.

6. CONCLUSÕES

- O efeito panicolítico promovido pelo tratamento crônico com fluoxetina está associado à diminuição na ativação de neurônios não-serotonérgicos e um aumento no recrutamento de neurônios serotonérgicos localizados nas asas laterais do NDR, sendo que esta última alteração parece estar relacionada à dessensibilização dos autorreceptores 5-HT_{1A}.
- O efeito panicolítico observado após tratamento prolongado com imipramina não parece ser decorrente de alterações nos neurônios serotonérgicos localizados no NDR. Com relação a possíveis alterações no NDR, podemos sugerir que a redução no recrutamento de neurônios não-serotonérgicos nas asas laterais estariam mediando tais efeitos.
- O efeito ansiolítico promovido pelo tratamento crônico com imipramina parece estar associado tanto à diminuição no recrutamento de neurônios serotonérgicos no DRC, DRD e DRV, quanto à ativação de neurônios não-serotonérgicos nas diversas sub-regiões do NDR.

ANEXO I

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Comissão de Ética em Experimentação Animal

3602-3301

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 034/2013, sobre o projeto intitulado "*Efeito da administração de fluoxetina e imipramina sobre a neurotransmissão serotoninérgica de diferentes sub-regiões do núcleo dorsal da rafe e da substância cinzenta periaquedutal dorsal de ratos expostos ao modelo do labirinto em T elevado.*", sob a responsabilidade do **Professor Doutor Helio Zangrossi Junior** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 06 de maio de 2013.

We certify that the protocol nº 034/2013, entitled "*Effect of administration of fluoxetine and imipramine on serotonergic neurotransmission in different subregions of the dorsal raphe nucleus and dorsal periaqueductal gray of rats exposed to model elevated T maze*", is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the School of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo in 05/06/2013.

Ribeirão Preto, 06 de maio de 2013.

Prof. Dr. Omero Benedicto Poli-Neto
Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal FMRP-USP

ANEXO II

Conforme pode ser visto na Tabela 1 e 2, a análise estatística mostra que os grupos testados não diferiram quanto ao número total de neurônios TPH-IR nas diferentes sub-regiões analisadas.

Tabela 1. Média $\pm$ EPM do número total de neurônios TPH-IR presentes nas diferentes sub-regiões do NDR.

Nível rostro-caudal (mm do bregma)	Sub-região	TPH-IR / mm ²			
		T fechado-Veíc (n=10)	Fuga-Veíc (n=9)	Fuga-FLX aguda (n=8)	Fuga-FLX crônica (n=10)
-6,84 a -7,08	DRD	360 $\pm$ 7	339 $\pm$ 10	307 $\pm$ 21	317 $\pm$ 11
-7,20 a -7,80	DRD	434 $\pm$ 27	413 $\pm$ 14	378 $\pm$ 15	401 $\pm$ 9
	DRV	501 $\pm$ 37	489 $\pm$ 26	458 $\pm$ 29	447 $\pm$ 18
	Asas laterais	212 $\pm$ 12	214 $\pm$ 7	201 $\pm$ 5	198 $\pm$ 5
-7,92 a -8,28	DRD	474 $\pm$ 47	435 $\pm$ 15	413 $\pm$ 14	424 $\pm$ 16
	DRV	354 $\pm$ 38	332 $\pm$ 16	333 $\pm$ 18	313 $\pm$ 10
	Asas laterais	201 $\pm$ 15	181 $\pm$ 10	181 $\pm$ 18	188 $\pm$ 8
-8,52 a -9,00	DRC	420 $\pm$ 7	427 $\pm$ 17	376 $\pm$ 16	403 $\pm$ 22
	DRI	557 $\pm$ 18	553 $\pm$ 16	507 $\pm$ 18	504 $\pm$ 21

Tabela 2. Média $\pm$ EPM do número total de neurônios TPH-IR presentes nas diferentes sub-regiões do NDR.

Nível rostro-caudal (mm do bregma)	Sub-região	TPH-IR / mm ²			
		T fechado-Veíc (n=7)	Fuga-Veíc (n=11)	Fuga-IMI aguda (n=11)	Fuga-IMI crônica (n=7)
-6,84 a -7,08	DRD	246 $\pm$ 8	262 $\pm$ 10	247 $\pm$ 8	254 $\pm$ 9
-7,20 a -7,80	DRD	330 $\pm$ 17	321 $\pm$ 11	319 $\pm$ 11	322 $\pm$ 7
	DRV	413 $\pm$ 9	388 $\pm$ 9	370 $\pm$ 12	369 $\pm$ 8
	Asas laterais	156 $\pm$ 1	158 $\pm$ 6	155 $\pm$ 6	158 $\pm$ 4
-7,92 a -8,28	DRD	352 $\pm$ 30	332 $\pm$ 9	289 $\pm$ 21	317 $\pm$ 5
	DRV	308 $\pm$ 11	303 $\pm$ 13	271 $\pm$ 10	263 $\pm$ 17
	Asas laterais	178 $\pm$ 6	175 $\pm$ 5	175 $\pm$ 6	162 $\pm$ 9
-8,52 a -9,00	DRC	349 $\pm$ 15	322 $\pm$ 6	337 $\pm$ 9	314 $\pm$ 9
	DRI	438 $\pm$ 14	447 $\pm$ 17	442 $\pm$ 14	474 $\pm$ 25

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrams JK, Johnson PL, Hay-Schmidt A, et al. Serotonergic systems associated with arousal and vigilance behaviors following administration of anxiogenic drugs. *Neuroscience*. 133(4):983-997. 2005.
- Abrams JK, Johnson PL, Hollis JH, et al. Anatomic and functional topography of the dorsal raphe nucleus. *Ann N Y Acad Sci*. 1018:46-57. 2004.
- Aghajanian GK, Lakoski JM. Hyperpolarization of serotonergic neurons by serotonin and LSD: studies in brain slices showing increased K⁺ conductance. *Brain Res*. 305(1):181-185. 1984.
- Aghajanian GK, Vandermaelen CP. Intracellular identification of central noradrenergic and serotonergic neurons by a new double labeling procedure. *J Neurosci*. 2(12):1786-1792. 1982.
- Allgulander C, Sheehan DV. Generalized anxiety disorder: raising the expectations of treatment. *Psychopharmacol Bull*. 2:68-68. 2002.
- Anderson IM. Selective serotonin reuptake inhibitors versus tricyclic antidepressants: a meta-analysis of efficacy and tolerability. *J Affect Disord*. 58(1):19-36. 2000.
- Andrade LH, Wang YP, Andreoni S, et al. Mental disorders in megacities: findings from the São Paulo megacity mental health survey, Brazil. *PLoS One*. 7(2):e31879. 2012.
- Andrade R, Nicoll RA. Pharmacologically distinct actions of serotonin on single pyramidal neurones of the rat hippocampus recorded in vitro. *J Physiol*. 394:99-124. 1987.
- Apa - American Psychiatry Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 5th ed., Washington DC: APA Press, text revision. 2013.
- Araneda R, Andrade R. 5-Hydroxytryptamine₂ and 5-hydroxytryptamine 1A receptors mediate opposing responses on membrane excitability in rat association cortex. *Neuroscience*. 40(2): 399-412. 1991.
- Argyropoulos SV, Sandford JJ, Nutt DJ. The psychobiology of anxiolytic drug. Part2: Pharmacological treatments of anxiety. *Pharmacology Therapy*, 88(3):213-227. 2000.
- Azmitia EC, Gannon PJ, Kheck NM, et al. Cellular localization of the 5-HT_{1A} receptor in primate brain neurons and glial cells. *Neuropsychopharmacology*. 14(1):35-46. 1996.
- Azmitia EC, Segal M. An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *J Comp Neurol*. 179(3):641-667. 1978.
- Bahi A, Schwed JS, Walter M, et al. Anxiolytic and antidepressant-like activities of the novel and potent non-imidazole histamine H₃ receptor antagonist ST-1283. *Drug Des Devel Ther*. 8:627-637. 2014.
- Baldwin DS, Anderson IM, Nutt DJ, et al. Evidence-based guidelines for the pharmacological treatment of anxiety disorders: recommendations from the British Association for Psychopharmacology. *J Psychopharmacol*. 19(6):567-596. 2005.

Baldwin DS, Anderson IM, Nutt DJ, et al. Evidence-based pharmacological treatment of anxiety disorders, post-traumatic stress disorder and obsessive-compulsive disorder: a revision of the 2005 guidelines from the British Association for Psychopharmacology. *J Psychopharmacol*. 28(5):403-439. 2014.

Barlow DH. Anxiety and its disorders. New York: The Guilford Press. 1988.

Beck SG, Choi KC, List TJ. Comparison of 5-hydroxytryptamine_{1A}-mediated hyperpolarization in CA1 and CA3 hippocampal pyramidal cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 263(1):350-359. 1992.

Beck SG, Pan YZ, Akanwa AC, et al. Median and dorsal raphe neurons are not electrophysiologically identical. *J Neurophysiol*. 91(2):994-1005. 2004.

Beckett S, Marsden CA. The effect of central and systemic injection of the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OHDPAT and the 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY100635 on periaqueductal grey-induced defence behaviour. *J Psychopharmacol*. 11(1):35-40. 1997.

Beitz AJ. The sites of origin brain stem neurotensin and serotonin projections to the rodent nucleus raphe magnus. *J Neurosci*. 2(7):829-842. 1982.

Blanchard RJ, Flannelly KJ, Blanchard DC. Defensive behavior of laboratory and wild *rattus norvegicus*. *J Comp Psychol*. 100:101-107. 1986.

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

Blanchard, DC, Griebel G, Blanchard RJ. Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Neurosci Biobehav Rev*. 25(3): 205-218. 2001.

Blier P, de Montigny C. Current advances and trend in the treatment of depression. *Trends Pharmacol Sci*. 15(7): 220-226. 1994.

Blier P, de Montigny C. Effect of chronic tricyclic antidepressant treatment on the serotonergic autoreceptor: a microiontophoretic study in the rat. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 314(2):123-128. 1980.

Blier P, El Mansari M. Serotonin and beyond: therapeutics for major depression. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 368(1615):20120536. 2013.

Bortoli VC, Yamashita PS, Zangrossi H Jr. 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptor control of a panic-like defensive response in the rat dorsomedial hypothalamic nucleus. *J Psychopharmacol*. 27(12):1116-1123. 2013.

Calizo LH, Akanwa A, Ma X, et al. Raphe serotonin neurons are not homogenous: electrophysiological, morphological and neurochemical evidence. *Neuropharmacology*. 61(3):524-543. 2011.

Carobrez AP, Teixeira KV, Graeff FG. Modulation of defensive behavior by periaqueductal gray NMDA/glycine-B receptor. *Neurosci Biobehav Rev*. 25(7-8):697-709. 2001.

- Cassel JC, Jeltsch H. Serotonergic modulation of cholinergic function in the central nervous system: cognitive implications. *Neuroscience*. 69(1):1-41. 1995.
- Castro M, Diaz A, del Olmo E, et al. Chronic fluoxetine induces opposite changes in G protein coupling at pre and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors in rat brain. *Neuropharmacology*. 44(1):93-101. 2003.
- Chalmers DT, Watson SJ. Comparative anatomical distribution of 5-HT_{1A} receptor mRNA and 5-HT_{1A} binding in rat brain--a combined in situ hybridisation/in vitro receptor autoradiographic study. *Brain Res*. 561(1):51-60. 1991.
- Chaput Y, de Montigny C, Blier P. Presynaptic and postsynaptic modifications of the serotonin system by long-term administration of antidepressant treatments. An in vivo electrophysiologic study in the rat. *Neuropsychopharmacology*. 5(4):219-229. 1991.
- Cipriani A, Brambilla P, Furukawa T, et al. Fluoxetine versus other types of pharmacotherapy for depression. *Cochrane Database Syst Rev*. 4:CD004185. 2005.
- Clark CT, Weissbach H, Udenfriend S. 5-Hydroxytryptophan decarboxylase: preparation and properties. *J Biol Chem*. 210(1):139-148. 1954.
- Colino A, Halliwell JV. Differential modulation of three separate K-conductances in hippocampal CA1 neurons by serotonin. *Nature*. 328(6125):73-77. 1987.
- Commons KG, Connolly KR, Valentino RJ. A neurochemically distinct dorsal raphe- limbic circuit with a potential role in affective disorders. *Neuropsychopharmacology*. 28(2):206-215. 2003.
- Commons KG. Evidence for topographically organized endogenous 5-HT_{1A} receptor-dependent feedback inhibition of the ascending serotonin system. *Eur J Neurosci*. 27(10):2611-2618. 2008.
- Cooper DM, Londos C. GTP-dependent stimulation and inhibition of adenylate cyclase. *Horiz Biochem Biophys*. 6:309-333. 1982.
- Cornelisse LN, Van der Harst JE, Lodder JC, et al. Reduced 5-HT_{1A}- and GABAB receptor function in dorsal raphe neurons upon chronic fluoxetine treatment of socially stressed rats. *J Neurophysiol*. 98(1):196-204. 2007.
- Czachura JF, Rasmussen K. Effects of acute and chronic administration of fluoxetine on the activity of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus of the rat. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 362(3):266-275. 2000.
- Dahlström A, Fuxe K. Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia*, 20(7):398-999, 1964.
- Darwin CA. A expressão das emoções nos homens e nos animais. Tradução de Garcia LSL, Companhia das letras, São Paulo, 2000.
- Day HE, Greenwood BN, Hammack SE, et al. 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. *J Comp Neurol*. 474(3):364-378. 2004.
- de Montigny C, Aghajanian GK. Tricyclic antidepressants: long-term treatment increases responsivity of rat forebrain neurons to serotonin. *Science*. 202(4374):1303-1306. 1978.

De Oliveira RM, Del Bel EA, Guimarães FS. Effects of excitatory amino acids and nitric oxide on flight behavior elicited from the dorsolateral periaqueductal gray. *Neurosci Biobehav Rev.* 25(7-8):679-685. 2001.

Deakin J. The origins of '5-HT and mechanisms of defence' by Deakin and Graeff: a personal perspective. *J Psychopharmacol.* 27(12):1084-1089. 2013.

Deakin JWF, Graeff FG. 5-HT and mechanisms of defense. *J Psychopharmacol.* 5: 305-315, 1991.

Descarries L, Riad M. Effects of the antidepressant fluoxetine on the subcellular localization of 5-HT_{1A} receptors and SERT. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 367(1601):2416-2425. 2012.

Descarries L, Watkins KC, Garcia S, et al. The serotonin neurons in nucleus raphe dorsalis of adult rat: a light and electron microscope radioautographic study. *J Comp Neurol.* 207(3):239-254. 1982.

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

Frazer A, Hensler JG. Serotonin. In: Siegel, G. J.; Agranoff, B. W.; Albers, R. W. Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. 6th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven. 1999.

Freund TF, Gulyás AI, Acsády L, et al. Serotonergic control of the hippocampus via local inhibitory interneurons. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87(21):8501-8505. 1990.

Gallager DW, Bunney WE Jr. Failure of chronic lithium treatment to block tricyclic antidepressant-induced 5-HT supersensitivity. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 307(2):129-133. 1979.

Gardner KL, Thirivikraman KV, Lightman SL, et al. Early life experience alters behavior during social defeat: focus on serotonergic systems. *Neuroscience.* 136(1):181-191. 2005.

Gartside SE, Umbers V, Hajós M, et al. Interaction between a selective 5-HT_{1A} receptor antagonist and an SSRI in vivo: effects on 5-HT cell firing and extracellular 5-HT. *Br J Pharmacol.* 115(6):1064-1070. 1995.

Geller I, Blum K. The effects of 5-HTP on para-Chlorophenylalanine (p-CPA) attenuation of "conflict" behavior. *Eur J Pharmacol.* 9(3):319-24. 1970.

Geller I, Seifter J. The effects of meprobamate, barbiturates, d-amphetamine and promazine on experimentally induced conflict in the rat. *Psychopharmacol.* 1:482-492. 1960.

Graeff FG, Del-Ben CM. Neurobiology of panic disorder: from animal models to brain neuroimaging. *Neurosci Biobehav Rev.* 32(7):1326-1335. 2008.

Graeff FG, Netto CF, Zangrossi H Jr. The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. *Neurosci Biobehav Rev.* 23(2):237-246. 1998.

Graeff FG, Schoenfeld RI. Tryptaminergic mechanisms in punished and nonpunished behavior. *J Pharmacol Exp Ther.* 173(2):277-283. 1970.

- Graeff FG, Viana MB, Tomaz C. The elevated T maze, a new experimental model of anxiety and memory: effect of diazepam. *Braz J Med Biol Res.* 26(1):67-70. 1993.
- Graeff FG, Zangrossi H Jr. The dual role of serotonin in defense and the mode of action of antidepressants on generalized anxiety and panic disorders. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem.* 10(3):207-217. 2010.
- Graeff FG. On serotonin and experimental anxiety. *Psychopharmacology (Berl).* 163(3-4):467-476. 2002.
- Graeff FG. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. *Neurosci Biobehav Rev.* 28(3):239-259. 2004.
- Graeff FG. Serotonina, matéria cinzenta periaquedutal e transtorno do pânico. *Rev. Bras. Psiquiatr.* 25(2):42-45. 2003 .
- Graeff FG. Translational approach to the pathophysiology of panic disorder: Focus on serotonin and endogenous opioids. *Neurosci Biobehav Rev.* 76(Pt A):48-55. 2017.
- Grahn RE, Will MJ, Hammack SE, et al. Activation of serotonin-immunoreactive cells in the dorsal raphe nucleus in rats exposed to an uncontrollable stressor. *Brain Res.* 826(1):35-43. 1999.
- Gray J, McNaughton N. The Neuropsychology of anxiety. 2^a ed. Oxford: Oxford University Press, 2000.
- Griebel G, Blanchard DC, Agnes RS, et al. Differential modulation of antipredator defensive behavior in Swiss-Webster mice following acute or chronic administration of imipramine and fluoxetine. *Psychopharmacology (Berl).* 120(1):57-66. 1995.
- Griebel G, Holmes A. 50 years of hurdles and hope in anxiolytic drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 12(9):667-687. 2013.
- Guiard BP, Mansari ME, Murphy DL, et al. Altered response to the selective serotonin reuptake inhibitor escitalopram in mice heterozygous for the serotonin transporter: an electrophysiological and neurochemical study. *Int J Neuropsychopharmacol.* 15(3):349-361. 2012.
- Guilloux JP, David DJ, Xia L, et al. Characterization of 5-HT(1A/1B)-/- mice: an animal model sensitive to anxiolytic treatments. *Neuropharmacology.* 61(3):478-488. 2011.
- Guimarães FS, Hetem LAB. Ansiedade induzida experimentalmente em humanos. In: Graeff FG, Hetem LAB (eds). Ansiedade e transtornos de ansiedade. Rio de Janeiro, Editora Científica Nacional, Cap.5, p 121-151. 1997.
- Halasy K, Miettinen R, Szabot E, et al. GABAergic Interneurons are the Major Postsynaptic Targets of Median Raphe Afferents in the Rat Dentate Gyrus. *Eur J Neurosci.* 4 (2):144-153. 1992.
- Hale MW, Lowry CA. Functional topography of midbrain and pontine serotonergic systems: implications for synaptic regulation of serotonergic circuits. *Psychopharmacology (Berl).* 213(2-3):243-264. 2011.
- Hale MW, Shekhar A, Lowry CA. Stress-related serotonergic systems: implications for symptomatology of anxiety and affective disorders. *Cell Mol Neurobiol.* 32(5):695-708. 2012.

Hamon M, Blier P. Monoamine neurocircuitry in depression and strategies for new treatments. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 45:54-63. 2013.

Hamon M, Gozlan H, el Mestikawy S, et al. The central 5-HT_{1A} receptors: pharmacological, biochemical, functional, and regulatory properties. *Ann N Y Acad Sci*. 600:114-129. 1990.

Handley SL, Mithani S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 327(1):1-5. 1984.

Hanoun N, Mocaër E, Boyer PA, et al. Differential effects of the novel antidepressant agomelatine (S 20098) versus fluoxetine on 5-HT_{1A} receptors in the rat brain. *Neuropharmacology*. 47(4):515-526. 2004.

Hervás I, Vilaró MT, Romero L, et al. Desensitization of 5-HT_{1A} autoreceptors by a low chronic fluoxetine dose: effect of the concurrent administration of WAY-100635. *Neuropsychopharmacology*. 24(1):11-20. 2001.

Jacob CA, Cabral AH, Almeida LP, et al. Chronic imipramine enhances 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors-mediated inhibition of panic-like behavior in the rat dorsal periaqueductal gray. *Pharmacol Biochem Behav*. 72(4):761-766. 2002.

Joh TH, Shikimi T, Pickel VM, et al. Brain tryptophan hydroxylase: purification of, production of antibodies to, and cellular and ultrastructural localization in serotonergic neurons of rat midbrain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 72(9):3575-3579. 1975.

Johnson P, Lowry C, Truitt W, et al. 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(6):642-52. 2008.

Johnson PL, Federici LM, Shekhar A. Etiology, triggers and neurochemical circuits associated with unexpected, expected, and laboratory-induced panic attacks. *Neurosci Biobehav Rev*. 46 Pt 3:429-454. 2014.

Johnson PL, Hollis JH, Moratalla R, et al. Acute hypercarbic gas exposure reveals functionally distinct subpopulations of serotonergic neurons in rats. *J Psychopharmacol*. 19(4):327-341. 2005.

Kessler RC, Petukhova M, Sampson NA, et al. Twelve-month and lifetime prevalence and lifetime morbid risk of anxiety and mood disorders in the United States. *Int J Methods Psychiatr Res*. 21(3): 169-84. 2012.

Kirby LG, Allen AR, Lucki I. Regional differences in the effects of forced swimming on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid. *Brain Res*. 682(1-2):189-196. 1995.

Kirby LG, Lucki I. 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(2):967-976. 1997.

Kirby LG, Parnar L, Valentino RJ, et al. Distinguishing characteristics of serotonin and nonserotonin-containing cells in the dorsal raphe nucleus: electrophysiological and immunohistochemical studies. *Neurosci*. 116: 669-683. 2003.

- Kiser RS, Lebovitz RM, German DC. Anatomic and pharmacologic differences between two types of aversive midbrain stimulation. *Brain Res.* 155(2):331-342. 1978.
- Kiser RS, Lebovitz RM. Monoaminergic mechanisms in aversive brain stimulation. *Physiol Behav.* 15(1):47-53. 1975.
- Klein DF, Fink M. Psychiatric reaction patterns to imipramine. *Am J Psychiatry.* 119:432-438. 1962.
- Klimek V, Zak-Knapik J, Mackowiak M. Effects of repeated treatment with fluoxetine and citalopram, 5-HT uptake inhibitors, on 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors in the rat brain. *J Psychiatry Neurosci.* 19(1):63-67. 1994.
- Köhler C, Steinbusch H. Identification of serotonin and non-serotonin-containing neurons of the mid-brain raphe projecting to the entorhinal area and the hippocampal formation. A combined immunohistochemical and fluorescent retrograde tracing study in the rat brain. *Neuroscience.* 7(4):951-975. 1982.
- Kreiss DS, Lucki I. Effects of acute and repeated administration of antidepressant drugs on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine measured in vivo. *J Pharmacol Exp Ther.* 274(2):866-876. 1995.
- Le Poul E, Boni C, Hanoun N, et al. Differential adaptation of brain 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors and 5-HT transporter in rats treated chronically with fluoxetine. *Neuropharmacology.* 39(1):110-122. 2000.
- Leibold NK, van den Hove DL, Viechtbauer W, et al. CO₂ exposure as translational cross-species experimental model for panic. *Transl Psychiatry.* 6(9):e885. 2016.
- Lipman RS, Covi L, Rickels K, et al. Imipramine and chlordiazepoxide in depressive and anxiety disorders. I. Efficacy in depressed outpatients. *Arch Gen Psychiatry.* 43(1):68-77. 1986.
- López-Muñoz F, Alamo C, García-García P. The discovery of chlordiazepoxide and the clinical introduction of benzodiazepines: half a century of anxiolytic drugs. *J Anxiety Disord.* 25(4):554-62. 2011.
- López-Muñoz F, Alamo C. Monoaminergic neurotransmission: the history of the discovery of antidepressants from 1950s until today. *Curr Pharm Des.* 15(14):1563-1586. 2009.
- Lowry CA, Johnson PL, Hay-Schmidt A, et al. Modulation of anxiety circuits by serotonergic systems. *Stress.* 8(4):233-246. 2005.
- Maj J, Bijak M, Dziedzicka-Wasylewska M, et al. The effects of paroxetine given repeatedly on the 5-HT receptor subpopulations in the rat brain. *Psychopharmacology (Berl).* 127(1):73-82. 1996.
- Manahan-Vaughan D, Anwyl R, Rowan MJ. Adaptive changes in 5-HT_{1A} receptor-mediated hippocampal inhibition in the alert rat produced by repeated 8-OH-DPAT treatment. *Br J Pharmacol.* 112(4):1083-1088. 1994.
- Matthiesen M, Spicci AJr, Zangrossi HJr. Effects of chemical stimulation of the lateral wings of the dorsal raphe nucleus on panic-like behaviors and Fos protein expression in rats. *Behav Brain Res.* 326:103-111, 2017.

- McNaughton N, Corr PJ. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. *Neurosci Biobehav Rev.* 28(3):285-305. 2004.
- Miller BR, Hen R. The current state of the neurogenic theory of depression and anxiety. *Curr Opin Neurobiol.* 30:51-58. 2015.
- Mobbs D, Petrovic P, Marchant JL, et al. When fear is near: threat imminence elicits prefrontal-periaqueductal gray shifts in humans. *Science.* 317(5841):1079-1083. 2007.
- Mochizuki D, Hokonohara T, Kawasaki K, et al. Repeated administration of milnacipran induces rapid desensitization of somatodendritic 5-HT_{1A} autoreceptors but not postsynaptic 5-HT_{1A} receptors. *J Psychopharmacol.* 16(3):253-260. 2002.
- Molchanov ML, Guimarães FS. Anxiolytic-like effects of AP7 injected into the dorsolateral or ventrolateral columns of the periaqueductal gray of rats. *Psychopharmacology (Berl).* 160(1):30-38. 2002.
- Molosh AI, Johnson PL, Fitz SD, et al. Changes in central sodium and not osmolarity or lactate induce panic-like responses in a model of panic disorder. *Neuropsychopharmacology.* 35(6):1333-1347. 2010.
- Moreau X, Jeanningros R, Mazzola-Pomietto P. Chronic effects of triiodothyronine in combination with imipramine on 5-HT transporter, 5-HT(1A) and 5-HT(2A) receptors in adult rat brain. *Neuropsychopharmacology.* 24(6):652-662. 2001.
- Nascimento JO, Kikuchi LS, de Bortoli VC, et al. Dorsomedial hypothalamus serotonin 1A receptors mediate a panic-related response in the elevated T-maze. *Brain Res Bull.* 109:39-45. 2014.
- Nashold BS Jr, Wilson WP, Slaughter DG. Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. *J Neurosurg.* 30(1):14-24. 1969.
- Nemeroff CB. Anxiolytics: past, present, and future agents. *J Clin Psychiatry.* 64 Suppl 3:3-6. 2003.
- Okere CO, Waterhouse BD. Activity-dependent heterogeneous populations of nitric oxide synthase neurons in the rat dorsal raphe nucleus. *Brain Res.* 1086(1):117-132. 2006.
- Palchoudhuri M, Flügge G. 5-HT_{1A} receptor expression in pyramidal neurons of cortical and limbic brain regions. *Cell Tissue Res.* 321(2):159-172. 2005.
- Parsons LH, Kerr TM, Tecott LH. 5-HT(1A) receptor mutant mice exhibit enhanced tonic, stress-induced and fluoxetine-induced serotonergic neurotransmission. *J Neurochem.* 77(2):607-617. 2001.
- Paul ED, Johnson PL, Shekhar A, et al. The Deakin/Graeff hypothesis: focus on serotonergic inhibition of panic. *Neurosci Biobehav Rev.* 46 Pt 3:379-396. 2014.
- Paul ED, Lowry CA. Functional topography of serotonergic systems supports the Deakin/Graeff hypothesis of anxiety and affective disorders. *J Psychopharm* 27(12):1090-1106. 2013
- Paul ED, Lowry CA. Functional topography of serotonergic systems supports the Deakin/Graeff hypothesis of anxiety and affective disorders. *J Psychopharmacol.* 27(12):1090-1106. 2013.

- Paxinos G, Watson C). The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, Sixth Edition Spiral-bound (6ed). Academic Press. 456pp. 2006.
- Pazos A, Palacios JM. Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. I. Serotonin-1 receptors. *Brain Res.* 346(2):205-230. 1985.
- Pellow S, Chopin P, File SE, et al. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods.* 14(3):149-167. 1985.
- Pobbe RL, Zangrossi H Jr. 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 (Berl)*. 183(3):314-21. 2005.
- Polter AM, Li X. 5-HT1A receptor-regulated signal transduction pathways in brain. *Cell Signal.* 22(10):1406-1412. 2010.
- Poltronieri SC, Zangrossi H Jr, de Barros Viana M. Antipanic-like effect of serotonin reuptake inhibitors in the elevated T-maze. *Behav Brain Res.* 147 (1-2):185-192, 2003.
- Pompeiano M, Palacios JM, Mengod G. Distribution and cellular localization of mRNA coding for 5-HT1A receptor in the rat brain: correlation with receptor binding. *J Neurosci.* 12(2):440-453. 1992.
- Rang HP, Dale MM, Ritter JM, et al. Rang e Dale: Farmacología. 8ed. Elsevier/Medicina Nacionais. 784pp. 2016.
- Riad M, Garcia S, Watkins KC et al. Somatodendritic localization of 5-HT1A and preterminal axonal localization of 5-HT1B serotonin receptors in adult rat brain. *J Comp Neurol.* 417(2):181-194. 2000.
- Riad M, Zimmer L, Rbah L, et al. Acute treatment with the antidepressant fluoxetine internalizes 5-HT1A autoreceptors and reduces the in vivo binding of the PET radioligand [18F]MPPF in the nucleus raphe dorsalis of rat. *J Neurosci.* 24(23):5420-5426. 2004.
- Richardson-Jones JW, Craige CP, Guiard BP, et al. 5-HT1A autoreceptor levels determine vulnerability to stress and response to antidepressants. *Neuron.* 65(1):40-52. 2010.
- Richer M, Hen R, Blier P. Modification of serotonin neuron properties in mice lacking 5-HT1A receptors. *Eur J Pharmacol.* 435(2-3):195-203. 2002.
- Robichaud RC, Sledge KL. The effects of p-chlorophenylalanine on experimentally induced conflict in the rat. *Life Sci.* 8(17):965-969. 1969.
- Roche M, Commons KG, Peoples A, et al. Circuitry underlying regulation of the serotonergic system by swim stress. *J Neurosci.* 23(3):970-977. 2003.
- Rossi DV, Burke TF, Hensler JG. Differential regulation of serotonin-1A receptor-stimulated [35S]GTP gamma S binding in the dorsal raphe nucleus by citalopram and escitalopram. *Eur J Pharmacol.* 583(1):103-107. 2008b.
- Rossi DV, Burke TF, McCasland M, et al. Serotonin-1A receptor function in the dorsal raphe nucleus following chronic administration of the selective serotonin reuptake inhibitor sertraline. *J Neurochem.* 105(4):1091-1099. 2008a.

- Rossi DV, Valdez M, Gould GG, et al. Chronic administration of venlafaxine fails to attenuate 5-HT_{1A} receptor function at the level of receptor-G protein interaction. *Int J Neuropsychopharmacol*. 9(4):393-406. 2006.
- Sakai N, Tanaka C. Inhibitory modulation of long-term potentiation via the 5-HT_{1A} receptor in slices of the rat hippocampal dentate gyrus. *Brain Res*. 613(2):326-330. 1993.
- Salum GA, Blaya C, Manfro GG. Transtorno do pânico. *Rev Psiquiatr RS*. 31(2):86-94. 2009.
- Sant'Ana AB, Weffort LF, de Oliveira Sergio T, et al. Panic-modulating effects of alprazolam, moclobemide and sumatriptan in the rat elevated T-maze. *Behav Brain Res*. 315:115-122. 2016.
- Santana N, Bortolozzi A, Serrats J, et al. Expression of serotonin_{1A} and serotonin_{2A} receptors in pyramidal and GABAergic neurons of the rat prefrontal cortex. *Cereb Cortex*. 14(10):1100-1109. 2004.
- Santarelli L, Saxe M, Gross C, et al. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science*. 301(5634):805-809. 2003.
- Schenberg LC, Graeff FG. Role of the periaqueductal gray substance in the antianxiety action of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav*. 9(3):287-295. 1978.
- Schenberg LC. Towards a translational model of panic attack. *Psychol Neurosci*. 3(1):9-37. 2010.
- Schütz MT, de Aguiar JC, Graeff FG. Anti-aversive role of serotonin in the dorsal periaqueductal grey matter. *Psychopharmacology (Berl)*. 85(3):340-345. 1985.
- Scorza MC, Lladó-Pelfort L, Oller S, et al. Preclinical and clinical characterization of the selective 5-HT_{1A} receptor antagonist DU-125530 for antidepressant treatment. *Br J Pharmacol*. 167(5):1021-1034. 2012.
- Scott MM, Wylie CJ, Lerch JK, et al. A genetic approach to access serotonin neurons for in vivo and in vitro studies. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102(45):16472-16477. 2005.
- Shen C, Li H, Meller E. Repeated treatment with antidepressants differentially alters 5-HT_{1A} agonist-stimulated [³⁵S]GTP gamma S binding in rat brain regions. *Neuropharmacology*. 42(8):1031-1038. 2002.
- Shuhama R, Del-Ben CM, Loureiro SR, et al. Animal defense strategies and anxiety disorders. *An Acad Bras Cienc*. 79(1):97-109. 2007.
- Shuhama R, Del-Ben CM, Loureiro SR, et al. Defensive responses to threat scenarios in Brazilians reproduce the pattern of Hawaiian Americans and non-human mammals. *Braz J Med Biol Res*. 41(4):324-332. 2008.
- Silva-Junior JS, Fischer FM. Adoecimento mental incapacitante: benefícios previdenciários no Brasil entre 2008-2011. *Rev Saúde Pública*. 48(1): 186-190. 2014.
- Sperling R, Commons KG. Shifting topographic activation and 5-HT_{1A} receptor-mediated inhibition of dorsal raphe serotonin neurons produced by nicotine exposure and withdrawal. *Eur J Neurosci*. 33(10):1866-1875. 2011.

- Spiacchi A Jr, Pobbe RLH, Matthiesen M, et al. 5-HT_{1A} receptors of the rat dorsal raphe lateral wings and dorsomedial subnuclei differentially control anxiety- and panic-related defensive responses. *Neuropharmacology*. 107:471-479. 2016.
- Spiacchi AJr, Coimbra NC, Zangrossi H Jr. Differential involvement of dorsal raphe subnuclei in the regulation of anxiety- and panic-related defensive behaviors. *Neurosci* 227:350-60. 2012.
- Sprouse JS, Aghajanian GK. Electrophysiological responses of serotonergic dorsal raphe neurons to 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} agonists. *Synapse*. 1(1):3-9. 1987.
- Stahl SM, Gergel I, Li D. Escitalopram in the treatment of panic disorder: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Clin Psychiatry*, 64(11):1322-1327. 2003.
- Staub DR, Evans AK, Lowry CA. Evidence supporting a role for corticotropin-releasing factor type 2 (CRF₂) receptors in the regulation of subpopulations of serotonergic neurons. *Brain Res*. 1070(1):77-89. 2006.
- Steinbusch HW, Verhofstad AA, Joosten HW. 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. 1978.
- Steinbusch HW. Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals. *Neuroscience*. 6(4):557-618. 1981.
- Stezhka VV, Lovick TA. Projections from dorsal raphe nucleus to the periaqueductal grey matter: studies in slices of rat midbrain maintained in vitro. *Neurosci Lett*. 230(1):57-60. 1997.
- Teixeira RC, Zangrossi H, Graeff FG. Behavioral effects of acute and chronic imipramine in the elevated T-maze model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav*. 65:571-576. 2000.
- Vandermaelen CP, Aghajanian GK. Electrophysiological and pharmacological characterization of serotonergic dorsal raphe neurons recorded extracellularly and intracellularly in rat brain slices. *Brain Res*. 289(1-2):109-119. 1983.
- Vasudeva RK, Lin RC, Simpson KL, et al. Functional organization of the dorsal raphe efferent system with special consideration of nitrgergic cell groups. *J Chem Neuroanat*. 41(4):281-293. 2011.
- Vasudeva RK, Waterhouse BD. Cellular profile of the dorsal raphe lateral wing sub-region: relationship to the lateral dorsal tegmental nucleus. *J Chem Neuroanat*. 57-58:15-23. 2014.
- Vertes RP. A PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat. *J Comp Neurol*. 313(4):643-668. 1991.
- Viana MB, Tomaz C, Graeff FG. The elevated T-maze: a new animal model of anxiety and memory. *Pharmacol Biochem Behav*, 3:549-554, 1994.
- Vicente MA, Zangrossi H Jr. Involvement of 5-HT_{2C} and 5-HT_{1A} receptors of the basolateral nucleus of the amygdala in the anxiolytic effect of chronic antidepressant treatment. *Neuropharmacology*. 79:127-135. 2014.

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

Welner SA, De Montigny C, Desroches J, et al. Autoradiographic quantification of serotonin1A receptors in rat brain following antidepressant drug treatment. *Synapse*. 4(4):347-352. 1989.

Wise CD, Berger BD, Stein L. Benzodiazepines: anxiety-reducing activity by reduction of serotonin turnover in the brain. *Science*. 177(4044):180-183. 1972.

Zangrossi H Jr, Viana MB, Zanoveli J, et al. Serotonergic regulation of inhibitory avoidance and one-way escape in the rat elevated T-maze. *Neurosci Biobehav Rev*. 25(7-8):637-645. 2001.

Zanoveli JM, Nogueira RL, Zangrossi H Jr. 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(7):543-552, 2005.

Zanoveli JM, Nogueira RL, Zangrossi H Jr. Enhanced reactivity of 5-HT1A receptors in the rat dorsal periaqueductal gray matter after chronic treatment with fluoxetine and sertraline: evidence from the elevated T-maze. *Neuropharmacology*. 52(4):1188-1195. 2007.

Zanoveli JM, Pobbe RL, de Bortoli VC, et al. Facilitation of 5-HT1A-mediated neurotransmission in dorsal periaqueductal grey matter accounts for the panicolytic-like effect of chronic fluoxetine. *Int J Neuropsychopharmacol*. 13(8):1079-1088. 2010.

Zhou FC, Tao-Cheng JH, Segu L, et al. Serotonin transporters are located on the axons beyond the synaptic junctions: anatomical and functional evidence. *Brain Res*. 805(1-2):241-254. 1998.