UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Fernando Figueiredo Mecca

Efeitos do antidepressivo escitalopram na atividade eletrofisiológica córtico-amigdalar durante o modelo triádico do desamparo aprendido em ratos *Wistar*

Ribeirão Preto 2019

FERNANDO FIGUEIREDO MECCA

Efeitos do antidepressivo escitalopram na atividade eletrofisiológica córtico-amigdalar durante o modelo triádico do desamparo aprendido em ratos *Wistar*

Versão Original

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Medicina (Neurologia)

Orientador: Prof. Dr. João Pereira Leite

Ribeirão Preto 2019 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.

Mecca, Fernando Figueiredo

Efeitos do antidepressivo escitalopram na atividade eletrofisiológica córtico-amigdalar durante o modelo triádico do desamparo aprendido em ratos *Wistar* / Fernando Figueiredo Mecca – Ribeirão Preto, 2019.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de concentração: Neurologia.

Orientador: João Pereira Leite

1. Depressão. 2. Modelos animais. 3. Desamparo aprendido. 4. Antidepressivos. 5. Eletrofisiologia. 6. Córtex pré-frontal. 7. Amígdala. 8. Atividade unitária. 9. Potencial local de campo. Nome: MECCA, Fernando Figueiredo

Título: Efeitos do antidepressivo escitalopram na atividade eletrofisiológica córticoamigdalar durante o modelo triádico do desamparo aprendido em ratos *Wistar*

	Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.
Aprovado em:	
	Banca Examinadora
Prof(a). Dr(a)	
Instituição:	
Julgamento:	
Prof(a). Dr(a)	
Instituição:	
Julgamento:	
Prof(a). Dr(a)	
Instituição:	

Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

Ao Prof. Dr. João Pereira Leite, pela oportunidade que me foi dada dentro do laboratório, pela confiança e por estar sempre disponível quando preciso.

Ao coorientador informal deste trabalho, Matheus Teixeira Rossignoli, que muito além de ter sido essencial para a existência e realização do trabalho, me motivou a entrar para o campo das neurociências, e tem sido um grande amigo em todo este percurso.

Aos colegas de laboratório Rafael Naime Ruggiero e Danilo Benette Marques, que auxiliaram desde a definição do projeto até análises de dados, enriquecendo não só o trabalho em si, mas a minha formação acadêmica.

A todos colegas de convivência do Laboratório de Investigação em Epilepsia: Isabela, Leonardo, Tamiris, Rafael, Fernanda, José Eduardo, José Luiz, Raquel, Ana, Benedito e Bruno, pelo clima de cooperação e de bom humor, além das eventuais contribuições seja ao cuidar de um animal em um dia que eu não poderia, ou ao sugerir melhoras em meu trabalho e apresentações.

A Renato Meireles, técnico do departamento, pelas dicas para resolver problemas técnicos e pela ajuda na captura de imagens de microscopia.

Às técnicas Renata Scandiuzzi e Daniela Cristina Borges Ribeiro, pela prontidão e agilidade em ajudar sempre que possível, pelo auxílio nos cortes histológicos e pelas preparações histológicas.

À secretária do programa de pós-gradução em Neurologia, Luci Rose Nassif Menezes, pela paciência em responder minhas dúvidas diversas vezes, mantendo a simpatia, e pela eficiência em seu trabalho.

Aos meus pais, Gláucya e Pedro, meu irmão Lucas, e meus avós Cecília, Pedro e Dalci, pois eu não poderia desejar uma família melhor, que sempre me apoiou, me ajudou a levantar das quedas e vibrou junto de mim em minhas conquistas.

À minha esposa, Monique, por me fazer todo dia uma pessoa melhor, e por ser compreensiva com meus horários estranhos e compromissos em horários que deveriam ser livres para disfrutarmos juntos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos que permitiu-me usar mais estes anos em minha formação.

RESUMO

MECCA, Fernando Figueiredo. **Efeitos do antidepressivo escitalopram na atividade eletrofisiológica córtico-amigdalar durante o modelo triádico do desamparo aprendido em ratos Wistar**. 2019. 57 p Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

A depressão é o transtorno psiquiátrico mais comum no mundo; estima-se que até 2020, cerca de 20% da população mundial terá sido afetada por ela. Esta condição é caracterizada por sintomas comportamentais e fisiológicos, que em estágios graves pode levar ao suicídio. Apesar de sua prevalência e gravidade, os tratamentos com antidepressivos não são eficazes, com remissão completa em apenas 30% dos casos. Tanto a neurobiologia da depressão quanto os efeitos dos antidepressivos ainda não foram totalmente compreendidos, o que dificulta mudar tal situação. Dados clínicos indicam que alterações no funcionamento de estruturas límbico-corticais, como córtex pré-frontal (CPF) e amígdala (AMI), submetidos a modulação seretoninérgica, poderiam explicar parte dos efeitos dos antidepressivos, bem como prever o sucesso do tratamento com antidepressivos. De maneira similar, no modelo experimental do desamparo aprendido, a comunicação córtico-amigdalar é fundamental na manifestação do comportamento desamparado e o tratamento com antidepressivos é capaz de reverter tais déficits comportamentais. Entretanto, um dos mais eficientes antidepressivos da atualidade – o ISRS escitalopram – foi pouco explorado neste modelo experimental. O modelo em si é bastante estudado em termos de farmacologia e neuroquímica, mas ainda muito pouco explorado em termos de neuroprocessamento e dados eletrofisiológicos. No presente trabalho, registros eletrofisiológicos no córtex pré-frontal e na amígdala durante a indução do desamparo aprendido, foram analisados para se avaliar os efeitos do escitalopram. Ratos Wistar machos adultos receberam implantes crônicos de multieletrodos no CPF e AMI, e tratados por 7 dias com duas injeções diárias de escitalopram (10 mg/mL) ou veículo. Após isso, os animais foram submetidos ao modelo triádico do desamparo aprendido, onde recebiam choques escapáveis (CE) ou inescapáveis (CI) associados a um estímulo condicionado (EC), ou nenhum choque (SC); os animais tratados com escitalopram foram submetidos a choques inescapáveis (CI-T). No dia seguinte, um teste de fuga dupla foi utilizado para avaliar a indução do desamparo. Registros eletrofisiológicos foram feitos durante ambos os dias de experimento comportamental. O escitalopram previne a indução do desamparo, conforme indicado pela proporção de animais desamparados em cada grupo (CE 30%; SC 40%; CI-T 40%; CI 75%). Os animais CE, CI e CI-T tiveram maior modulação da atividade unitária no CPF após EC do que SC (H = 27,294; DF = 3, Kruskal-Wallis; p < 0,05). Também no CPF, os grupos CE e CI-T apresentaram uma maior perturbação média das oscilações teta do que os CI e SC [F (3; 27) = 1,872; ANOVA uma via; p < 0,05], e CI-T teve uma perturbação média em gama na AMI maior do que CI e SC [F (3; 22) = 4,212; ANOVA de uma via; p < 0,05]. Nossos resultados não só possibilitaram a validação do modelo do desamparo aprendido como preditor de eficácia de antidepressivos ISRS, como também mostram o escitalopram induzindo alterações eletrofisiológicas similares ao choque escapável, culminando no comportamento resistente ao desamparo aprendido.

Palavras-chave: Depressão. Eletrofisiologia. Desamparo aprendido. Estresse. Antidepressivos. Córtex pré-frontal. Amígdala basolateral. Atividade unitária. Potencial local de campo.

ABSTRACT

MECCA, Fernando Figueiredo. Effects of antidepressant escitalopram on the cortic-amigdalar electrophysiological activity during the triadic model of learned helplessness in *Wistar* rats. 2019. 57 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Depression is the most common psychiatric disorder worldwide; it is estimated that until 2020, roughly 20% of the world population will have been affected by depression. This condition is characterized by behavioural and physiological symptoms, that in severe cases may lead to suicide. Despite its prevalence and severity, treatments with antidepressants are not efficient, and only 30% of the cases reach complete remission. The neurobiology of both depression and antidepressant effects are still not completely comprehended, which hampers changing such situation. Clinical data has shown that alteration in the functioning of limbic-cortical structures, such as the prefrontal cortex (PFC) and amygdala (AMY), submitted to serotoninergic modulation, may explain part of antidepressant's effects. Likewise, in the experimental model of learned helplessness, cortico-amygdalar communication is fundamental to the expression of helpless behaviour, and treatment with antidepressants is able to reverse such behavioural deficits. However, one of the most efficient antidepressants nowadays – the SSRI escitalopram – is still underexplored in this experimental model. Learned helplessness per se is well studied in pharmacological and neurochemical ways, but it is still underexplored in terms of neuroprocessing and electrophysiological data. In the present study, electrophysiological recordings, during induction of learned helplessness, were analysed in order to evaluate the effects of escitalopram on the electrophysiological activity of prefrontal cortex and amygdala in the model. Adult male Wistar rats received chronical implants of multielectrodes into the PFC and AMY, and were treated for 7 days with two injection per day with either escitalopram (10 mg/mL) or vehicle. After that, animals were submitted to the triadic learned helplessness model, in which they received escapable (ES) or inescapable (IS) shock, associated to a conditioned stimulus (CS) or no shock (NS); animals treated with escitalopram received inescapable shock (IS-T). On the following day, a two crossings shuttlebox test was used in order to verify the induction of helplessness. Electrophysiological data was recorded during both behavioural experiments. Escitalopram prevented the induction of helplessness, as shown by the proportions of helpless animals (ES 30%; NS 40%; IS-T 40%; IS 75%). ES, IS and IS-T animals had a higher modulation of unitary activity in the PFC after CS than NS (H = 27,294; DF = 3, Kruskal-Wallis; p < 0.05). Also in the PFC, ES and IS-T had a higher average perturbation of theta oscillations than IS and NS [F (3; 27) = 1,872; one-way ANOVA; p < 0.05], and IS-T had a higher average perturbation in gamma than IS and NS [F (3; 22) = 4,212; one-way ANOVA; p < 0,05]. Our results validate the learned helplessness model as predictive of SSRI antidepressant efficiency, and show that escitalopram causes electrophysiological alterations similar to escapable shock, culminating in helplessness resistant behaviour.

Keywords: Depression. Electrophysiology.. Learned helplessness. Stress. Antidepressants. Prefrontal cortex. Basolateral amygdala. Single unit activity. Local field potential.

Sumário

1.Introdução	12
1.1 Depressão e Antidepressivos	12
1.2 Neurobiologia da depressão e dos efeitos de antidepressivos	13
1.3 Modelos animais: o Desamparo Aprendido	15
1.4. Neurobiologia do desamparo aprendido e efeitos dos antidepressivos	18
1.4.1. Neurofisiologia do CPFm	19
1.4.2. Neurofisiologia do AMG	20
1.4.3. Neurofisiologia do CPFm-AMG	21
2. Justificativa	24
3. Objetivos	
3.1.Objetivos gerais	24
3.2. Objetivos específicos	25
4. Materiais e métodos	26
4.1. Desenho experimental	26
4.2.Animais	26
4.3. Preparação dos multieletrodos	26
4.4. Cirurgia estereotáxica para implante de eletrodos	27
4.5. Tratamento com escitalopram	27
4.6. Protocolo comportamental e adaptação do aparato	27
4.7. Obtenção dos dados eletrofisiológicos	29
4.8. Pré-processamento	30
4.8.1. Épocas de interesse	30
4.8.2. Unidades de disparo	30
4.8.3. Potenciais locais de campo	31
4.8.4. Classificação de períodos com movimento	31
4.9. Análise de dados	32
4.9.1. Unidades de disparo	33
4.9.2. Potenciais locais de campo	33
4.9.3. Análise estatística	34
4.10. Histologia	34
5. Resultados	35
5.1. Comportamento	35
5.2 Confirmação histológica da posição dos eletrodos	39

5.3. Atividade unitária	40
5.4. Atividade oscilatória	43
6. Discussão	47
6.1. Comportamento	47
Referências	50

1 1.Introdução

2 <u>1.1 Depressão e antidepressivos</u>

A depressão é a principal causa de incapacitação no mundo, atingindo cerca 300 milhões de pessoas no mundo em 2015, e sendo responsável por 7,5% dos anos perdidos por incapacitação no mundo (World Health Organization, 2017). No Brasil, 11,2 milhões de pessoas com mais de 18 anos de idade foram diagnosticadas com depressão, o que equivale a 7,6 % da população nessa faixa etária (IBGE, 2014). Em casos graves, a depressão pode levar ao suicídio, causa de aproximadamente 800.000 mortes por ano no mundo (World Health Organization, 2017).

10 Segundo o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-IV; APA, 11 2002), a depressão é diagnosticada quando um indivíduo apresenta, por mais de 2 semanas, 12 ao menos 5 dos seguintes sintomas: humor entristecido; falta de interesse; aumento ou 13 redução do peso e apetite; problemas de sono; problemas psicomotores; fadiga; sensação de 14 não ter valor; baixa capacidade de concentração e decisão; e pensamentos suicidas. As causas 15 da depressão ainda não são plenamente conhecidas, mas o estresse - e, particularmente, a 16 falta de controle sobre eventos estressantes – parece ser um fator importante no 17 desenvolvimento desta condição (Clark and Beck, 2010; Maier and Seligman, 2016). Apesar 18 da alta prevalência da depressão e das suas consequências graves, os progressos na 19 compreensão e na eficácia dos efeitos dos antidepressivos têm sido insatisfatórios. 20 Atualmente os antidepressivos mais receitados são os inibidores seletivos de recaptação de 21 serotonina (ISRS), que bloqueiam os canais recaptadores de serotonina, aumentando a 22 concentração deste neurotransmissor na fenda sináptica (Tanti and Belzung, 2010; Andrews 23 et al., 2015). Contudo, os tratamentos atuais para depressão contam com remissão completa 24 do transtorno em apenas 30 % dos casos (McIntyre and O'Donovan, 2004), e até 64 % dos 25 pacientes apresenta a reincidência de um segundo episódio nos meses seguintes ao 26 tratamento (Solomon et al., 2000). Um ISRS tem se destacado, entretanto: o escitalopram. 27 Segundo revisão de Eiji Kirino (2012), este antidepressivo recente mostra resultados em até 28 duas semanas de tratamento, e tem resultados melhores ou iguais aos outros fármacos 29 comercializados, com até 76% dos pacientes respondendo ao tratamento, efeitos colaterais

30 menos intensos do que outros antidepressivos, bem como efeitos adversos da
 31 descontinuidade, entre outros benefícios.

Apesar disso, os efeitos dos ISRS, e em específico do escitalopram, sobre a neurobiologia da depressão ainda são bastante desconhecidos (Andrews et al., 2015). Neste sentido, a necessidade de estudos relacionados à compreensão das bases neurobiológicas da depressão e dos efeitos dos antidepressivos é imperativa, possibilitando importantes avanços no tratamento do transtorno (Ménard et al., 2016).

37

38 <u>1.2 Neurobiologia da depressão e dos efeitos de antidepressivos</u>

39 A fim de compreender melhor as bases neurais da depressão e da ação dos 40 antidepressivos, assim como desenvolver novas formas de diagnóstico, diversos estudos têm 41 usado técnicas de imageamento não-invasivas para entender como diferentes regiões do 42 encéfalo se comportam em pessoas acometidas pela depressão (Pryce et al., 2011). Em 43 pacientes depressivos foi possível observar a lateralização da atividade amigdalar através do 44 imageamento por ressonância magnética funcional (fMRI). Nesses pacientes, em situações de 45 antecipação de estímulos aversivos, aumentou-se o sinal BOLD (do inglês, blood oxygen level 46 dependent contrast) da amígdala (AMI) no hemisfério direito (Strigo et al., 2008). O mesmo 47 estudo mostrou ainda que, durante um estímulo aversivo, pessoas com depressão, em 48 comparação com indivíduos saudáveis, tinham um menor sinal BOLD em estruturas corticais, 49 como o córtex pré-frontal (CPF). Contudo, essas respostas córtico-amigdalares parecem ser 50 moduladas por vias serotoninérgicas. Em indivíduos saudáveis, a análise do fMRI associada a 51 emissão de pósitrons (PET) mostrou que a diminuição da disponibilidade do receptor 52 serotoninérgico 5-HT_{1A} no núcleo dorsal da rafe (NDR) é negativamente correlacionada ao 53 sinal BOLD da AMI durante a exposição ao medo (Selvaraj et al., 2015). Além disso, nesse 54 mesmo estudo a disponibilidade de 5-HT_{1A} no NDR é positivamente correlacionada com a 55 conectividade entre AMI e estruturas do CPF (Selvaraj et al., 2015). Por sua vez, tanto 56 tratamentos farmacológicos com ISRS, quanto a terapia cognitivo-comportamental obtiveram 57 sucesso em reverter as alterações no sinal BOLD da AMI e do CPF durante o processamento 58 emocional (Jaworska et al., 2015). De forma similar, An e colaboradores (2017) utilizaram fMRI 59 e mostraram que pacientes com depressão apresentam alterações na conectividade funcional 60 de diversas áreas do cérebro, como o CPF medial e a AMI basolateral. Os autores relatam,

61 ainda, que o uso de escitalopram foi capaz de reverter tais alterações. Já foi demonstrado, 62 também com o uso de fMRI, que a conectividade entre AMI e CPF pode ser um preditor da 63 eficiência do escitalopram: pacientes com depressão que não responderam ao tratamento 64 tinham, antes do tratamento, uma maior conectividade entre essas áreas do que aqueles 65 pacientes que responderam ao tratamento, bem como do que indivíduos saudáveis (Vai et al., 66 2016). Além disso, resultados de fMRI analisando a atividade destas áreas em pessoas com 67 redução de serotonina (5-HT) por dieta sem triptofano (um precursor da 5-HT) mostram que 68 a 5-HT pode estar relacionada com os dados acima: tanto a AMI guanto o CPF de indivíduos 69 em dieta sem triptofano apresentam maior atividade frente a estímulos aversivos do que 70 indivíduos com alimentação balanceada (Robinson et al., 2013). Este mesmo trabalho mostra, 71 ainda, uma maior conectividade entre estas duas áreas nos indivíduos com restrição de 72 triptofano. De forma similar, indivíduos com depressão tiveram maior ativação da AMI em 73 antecipação de estímulo aversivo, e maior ativação do CPF ao se confrontar com tal estímulo, 74 do que indivíduos saudáveis (Rosenblau et al., 2012). Esta hiperatividade, tanto da AMI quanto 75 do CPF, foi reduzida após tratamento com o escitalopram (Rosenblau et al., 2012). Nesse 76 sentido, Price e Drevets (2012) postulam que a depressão pode ser o resultado de alterações 77 na circuitaria envolvendo o CPF e AMI, sendo que esta última apresentaria uma atividade 78 aumentada associada à hipofunção do CPF, o que resultaria nas alterações comportamentais 79 deste distúrbio. Entretanto, levando-se em conta os recentes dados referentes a 80 antidepressivos ISRS, pode-se supor que as alterações presentes na comunicação entre AMI e 81 CPF em indivíduos com depressão seja restaurada pela modulação serotoninérgica.

82 Uma outra maneira de se estudar a atividade neuronal em pacientes é através de 83 eletroencefalograma (EEG), registrando oscilações elétricas emergentes da interação de 84 grandes populações neuronais que correspondem ao processamento de informação 85 (Noachtar and Rémi, 2009; Fingelkurts and Fingelkurts, 2014). Nesse sentido, Alexander e 86 Andrew Fingelkurts caracterizam a depressão como uma síndrome marcada pela 87 hiperatividade límbica e hipoatividade do CPF, contemplando a visão moderna de que 88 anormalidades na conectividade funcional de diferentes sistemas do encéfalo, e não apenas 89 disfunções predominantemente neuroquímicas, estejam relacionadas a transtornos 90 psiquiátricos (Fingelkurts and Fingelkurts, 2014). Foi demonstrado, utilizando EEG, que 91 indivíduos com depressão têm maior coerência geral em delta (0,5 – 4 Hz), teta (4 – 8 Hz), alfa

92 (8 – 12 Hz) e beta (12 – 20 Hz) do que indivíduos saudáveis (Leuchter et al., 2012). Os autores 93 enfatizam que estes resultados apontam para uma diminuição na seletividade de conexões 94 durante o repouso em pacientes com depressão (Leuchter et al., 2012). Nos estudos de EEG 95 em pacientes com depressão, alterações na oscilações teta (4 - 8 Hz) no CPF sugerem não só 96 sua relação com sintomas da depressão, como também são capazes de predizer a resposta ao 97 tratamento com antidepressivos ISRS (Fingelkurts and Fingelkurts, 2014; Koo et al., 2017). Em 98 outro experimento utilizando EEG, pacientes responsivos ao tratamento crônico com 99 antidepressivos diversos, incluindo escitalopram, apresentaram menor potência relativa em 100 teta (4 – 8 Hz) no CPF em comparação aos não responsivos, tanto antes do início do 101 tratamento, quanto uma semana depois (losifescu et al., 2009). De forma semelhante, Lee e 102 colaboradores (2011) utilizaram EEG para mostrar que quanto maior a conectividade fronto-103 temporal, em termos de delta e teta (respectivamente, 1 – 4 Hz e 4 – 8 Hz), maior a resistência 104 ao tratamento com antidepressivos (ISRS diversos, 34% dos quais utilizaram escitalopram). 105 Além disso, pacientes submetidos ao antidepressivo escitalopram, que aumentavam a 106 cordância em teta (4 – 8 Hz) no CPF no primeiro dia do tratamento, apresentavam melhorias 107 nos sintomas após 1 semana (Bares et al., 2014).

Apesar de todos esses achados em humanos, há uma série de limitações experimentais em se estudar o processamento neural do CPF e AMI na depressão, assim como a sua resposta a antidepressivos. Em especial, não podemos estudar o processamento neural durante o evento de aquisição da depressão em humanos. Contudo, modelos experimentais, quando escolhidos de maneira apropriada, correspondem a uma ferramenta valiosa que possibilita uma maior precisão espacial e temporal na aquisição de dados neurofisiológicos.

114

115 <u>1.3 Modelos animais: o desamparo aprendido</u>

Diferentes modelos animais têm sido utilizados para o estudo da depressão. Entretanto, muitos deles se concentram na validade preditiva do modelo – isto é, em quanto o animal responde a medicamentos antidepressivos, o que permite supor que é possível testar novos medicamentos com este método (Abelaira et al., 2013). Podem ser citados o nado forçado e a suspensão pela cauda como dois modelos animais que são essencialmente utilizados pela sua validade preditiva (Castagné et al., 2011). Por outro lado, outros dois critérios de interesse em modelos animais são a validade de face e a de constructo, respectivamente se referindo à

123 similaridade do comportamento animal com o de um humano acometido por depressão, e a 124 semelhança fisiológica do modelo com pacientes em depressão (Vollmayr and Gass, 2013). O 125 desamparo aprendido (DA) é proposto como um dos poucos modelos que consegue suprir 126 estes três critérios (Abelaira et al., 2013; Vollmayr and Gass, 2013): animais desamparados 127 apresentam sintomas de depressão como anedonia e alterações no sono REM (Sanchis-segura 128 et al., 2005; Sanford et al., 2010); Sherman e colaboradores mostraram que antidepressivos 129 reduzem os comportamentos característicos do DA em ratos, enquanto outras drogas 130 psicoativas não são capazes de trazer o mesmo resultado, evidenciando a validade preditiva 131 do modelo (Sherman et al., 1982); e por fim, o DA corresponde ao único modelo que permite 132 examinar o impacto da incontrolabilidade sobre estresse no desenvolvimento da depressão 133 (Vollmayr and Gass, 2013; Maier and Seligman, 2016). Este é um importante fator levando-se 134 em conta a teoria cognitiva da depressão, que propõe que este distúrbio se desenvolve 135 comportamentalmente a partir da incapacidade do sujeito de controlar emoções negativas 136 (Clark and Beck, 2010). A relação do DA com a depressão em humanos foi estudada por 137 Seligman com diversos colaboradores, notando que pessoas com depressão respondiam a 138 diversas tarefas de forma similar a pessoas sem depressão, mas não quando submetidas ao 139 DA (Maier and Seligman, 2016). Sujeitos saudáveis submetidos a estresses incontroláveis, 140 assim como sujeitos com depressão não submetidos a estresse, apresentaram menor sucesso 141 do que sujeitos saudáveis não submetidos a estresse em tarefas como solução de anagramas 142 (Klein et al., 1976), shuttlebox (Klein and Seligman, 1976), e combinações de cartas (Miller and 143 Seligman, 1976).

144 Na base da concepção do DA está a distinção de três grupos experimentais, o que é 145 conhecido como modelo triádico, e pelo menos duas fases experimentais. O uso destes três 146 grupos é essencial para que seja possível avaliar o efeito da controlabilidade sobre o estresse, 147 e não do estresse *per se* (Maier and Seligman, 2016). Muitos são os trabalhos que se propõem 148 a estudar o DA mas não fazem uso do modelo triádico, e portanto não deveriam usar este 149 nome (Maier and Watkins, 2005). Os três grupos diferem na primeira fase experimental: os 150 animais (normalmente ratos ou camundongos) de um grupo recebem um estímulo aversivo 151 (por exemplo, um choque escapável nas patas), o qual pode ser interrompido pelo 152 cumprimento de uma dada tarefa (por exemplo, pular através de uma barreira). Os animais 153 do segundo grupo devem ser pareados com os do primeiro, de modo a receber o mesmo

154 estímulo aversivo, de mesma intensidade e duração que estes; entretanto, o cumprimento ou 155 não da tarefa não vai influenciar no tempo de exposição ao estímulo aversivo (por exemplo, 156 um choque inescapável nas patas). Desta maneira, a única diferença entre estes dois grupos 157 é a controlabilidade do estímulo aversivo. Por fim, o terceiro grupo (sem choque) deve ser 158 submetido aos mesmos procedimentos, mas sem receber estímulo aversivo (Maier and 159 Seligman, 2016). Os animais que são expostos ao choque inescapável (CI) apresentam uma 160 série de respostas comportamentais distintas do grupo submetido ao choque escapável (CE), 161 a citar: aumento da imobilidade do nado forçado (Weiss et al., 1981), resposta exacerbada e 162 prolongada no medo condicionado (Baratta et al., 2007), redução da atividade motora na 163 presença de um estímulo (Maier et al., 1990; Baratta et al., 2007; Rau and Fanselow, 2009), redução da interação social (Short and Maier, 1993; Christianson et al., 2008, 2009), 164 165 diminuição de agressão (Maier et al., 1972) e redução do consumo de alimentos (Maier and 166 Watkins, 2005).

167 A grande maioria dos estudos adequados sobre DA, utilizando o modelo triádico, foi 168 desenvolvida pelos grupos de pesquisa de Martin Seligman ou Steven Maier, autores que 169 juntos desenvolveram o modelo do desamparo aprendido (Seligman and Maier, 1967). Em 170 uma recente revisão, estes autores resumem o que já se conhece sobre DA e a circuitaria 171 neural responsável por detectar (in)controlabilidade e desencadear os efeitos do DA (Maier 172 and Seligman, 2016). Um dos pontos mais notáveis desta revisão é a discussão de que, apesar 173 do nome e do que era imaginado quando se propôs o desamparo aprendido, o que realmente 174 é aprendido neste modelo é a controlabilidade do estímulo aversivo, de forma que o 175 comportamento desamparado seria resultado de uma incapacidade de aprender a 176 controlabilidade. As próximas seções deste capítulo, portanto, tratam do que já se conhece 177 sobre a neurobiologia deste modelo animal, pautadas principalmente nos trabalhos dos 178 grupos de Maier e Seligman. Como são escassos os trabalhos investigando o DA sob a 179 perspectiva da eletrofisiologia, outros modelos experimentais de estresse incontrolável 180 também são explorados a fim de estabelecer uma base de comparação para com as 181 investigações do presente trabalho.

183 <u>1.4. Neurobiologia do desamparo aprendido e efeitos dos antidepressivos</u>

184 De acordo com Maier e Seligman, a modulação serotoninérgica é fundamental para o 185 processamento das informações referentes a controlabilidade do estresse (Grahn et al., 1999; 186 Maier and Seligman, 2016). Se um estímulo aversivo é controlável, o CPF (ou, especificamente, 187 o córtex pré-frontal medial – CPFm) deve ser capaz de detectar tal controlabilidade, e então 188 inibir o NDR, um importante núcleo serotoninérgico. Com a inibição do NDR, ocorre 189 consequentemente a inibição de suas projeções serotoninérgicas para outras regiões 190 responsáveis por respostas comportamentais típicas do DA, como a amígdala. A região pré-191 límbica do CPFm envia projeções para o NDR, que fazem sinapses com interneurônios 192 GABAérgicos inibitórios neste núcleo (Berretta et al., 2005). Caso não haja a detecção de 193 controlabilidade do estímulo aversivo, o NDR não é inibido e então reenvia os sinais que 194 obteve para a amigdala basolateral (onde potencializa comportamentos de medo e 195 ansiedade), substância cinzenta periaquedutal (onde inibe comportamentos de fuga), entre 196 outras áreas, por vias serotoninérgicas. Uma ativação intensa e/ou recorrente destes 197 neurônios serotoninérgicos causa uma sensibilização, resultando em passividade e elevada 198 ansiedade – em outras palavras, causando o quadro característico de DA (Maier and Seligman, 199 2016).

200 Várias partes deste circuito foram testadas em diferentes experimentos. A necessidade 201 de atividade do NDR para o comportamento desamparado dos animais que recebem CI foi 202 demonstrada com lesões do NDR, após as quais animais submetidos a CI não apresentavam 203 os déficits comportamentais característicos (Maier et al., 1993). Resultados semelhantes 204 foram obtidos inibindo farmacologicamente os neurônios serotoninérgios do NDR pela 205 microinjeção de 8-OH-DPAT, um agonista de receptores 5-HT_{1A} (Maier et al., 1995), bem como 206 pela inibição com a microinjeção, também no NDR, de clorodiazepóxido, um benzodiazepínico 207 (Maier et al., 1994). Ainda, Christianson e colaboradores (2010) inibiram os receptores 5-HT_{2C} 208 da AMI de animais submetidos a estresse incontrolável, impedindo os comportamentos 209 típicos do desamparo aprendido; por outro lado, a ativação destes mesmos receptores em 210 animais submetidos a estresse controlável levou a desenvolvimento de tais comportamentos. 211 Utilizando marcações imuno-histoquímicas, foi demonstrado que animais submetidos a CI e 212 CE tinham número similar de neurônios no NDR produzindo C-fos – um marcador de atividade 213 neuronal – entre 2 e 3 horas depois dos choques; entretanto, no grupo CI havia uma maior

porcentagem de neurônios serotoninérgicos entre eles (Grahn et al., 1999). Os autores
destacam que tal diferença foi notada particularmente no NDR medial e caudal, que têm
projeções para a AMI e a substância cinzenta periaquedutal.

Embora muitas dessas hipóteses tenham confirmação psicofarmacológica, ainda não se sabe que tipo de processamento neural se dá nessas estruturas sob os efeitos de antidepressivos ISRS, sendo que abordagens eletrofisiológicas são ainda subutilizadas para se entender o DA.

221 <u>1.4.1. Neurofisiologia do CPF</u>

222 Em nosso laboratório, Marques (2016) mostrou pela primeira vez que a modulação da 223 potência de ondas teta (4 - 8 Hz) no CPF corresponde a um importante marcador 224 eletrofisiológico na controlabilidade do estresse. Nos animais do grupo CE, o estímulo 225 condicionado ao choque desencadeia o aumento da potência de teta; já nos animais CI, tal 226 estímulo evoca a diminuição da potência teta (Marques, 2016). Por sua vez, a modulação em 227 teta no CPF se correlaciona positivamente com o comportamento resiliente no teste da 228 esquiva. Essa modulação do teta diante de estímulos aversivos pode ainda ser vista em outras 229 tarefas comportamentais. No medo condicionado o freezing é associado a diminuição de teta 230 (8 -12 Hz) no CPF após o estímulo condicionado, enquanto os períodos de não-freezing são 231 associados ao aumento de teta (Courtin et al., 2014). Esta atividade em teta no CPF está 232 intimamente ligada a atividade de neurônios piramidais, sendo estes regulados por 233 interneurônios parvalbumínicos, de forma que a desinibição dos interneuônios possibilita a 234 sincronização em teta (Courtin et al., 2014). Já no DA, a relação entre o teta no CPF e a sua 235 atividade neuronal unitária ainda não está clara. Enquanto Marques (2016) não encontrou 236 diferenças no disparo unitário entre os grupos CE e CI, estudos in vitro apresentaram 237 resultados distintos. Varela et al. (2012) observaram que após a indução do DA a excitabilidade 238 de neurônios do CPF é maior nos ratos submetidos ao CE. Em contrapartida, Wang et al. 239 (2014), submetendo os animais apenas ao CI, encontraram que ocorre um aumento da 240 atividade de neurônios desta área.

O CPF é a área responsável por detectar a controlabilidade de um estímulo estressante, conforme mostram evidências comportamentais e neuroquímicas (Amat et al., 2005). Estes autores demonstraram que o efluxo de 5-HT a partir do NDR é menor em ratos submetidos a CE, em comparação com CI. Além disso, a inibição do CPF por injeção local de muscimol (um

245 agonista de receptores GABA_A) durante o choque escapável fez com que ratos CE 246 apresentassem efluxo de 5-HT do NDR igual ao de ratos CI, além de desenvolverem desamparo 247 aprendido, como ocorre em CI (Amat et al., 2005). O uso de muscimol no CPF durante a 248 segunda exposição ao choque tem efeitos semelhantes (Amat et al., 2006). Em contrapartida, 249 a ativação do CPF em ratos CI via aplicação de picrotoxina (um bloqueador de canais de cloro 250 de receptores GABA_A) foi suficiente para que a produção de 5-HT no NDR fosse igual a de ratos 251 CE, bem como para que os animais não demonstrassem comportamentos de desamparo, 252 assim como os CE (Amat et al., 2008). Evidenciando que essa sinalização se dá por uma 253 comunicação direta entre CPF e NDR, com o uso de marcador retrógrado e marcadores para 254 c-fos, foi demonstrado que neurônios do CPF que inervam o NDR são ativados em animais CE, 255 tanto durante o choque, quanto em reexposições a choques (Baratta et al., 2010). 256 Adicionalmente, essa ativação da via CPF-NDR parece ser fundamental para a inibição de 257 outros comportamentos associados a respostas de antidepressivos. Em uma série de 258 experimentos utilizando o teste de nado forçado seguido de estimulação optogenética, 259 verificou-se que o aumento na freguência de disparos de neurônios excitatórios do CPF que 260 inervam o NDR leva ao aumento do comportamento de fuga, efeito similar ao de 261 antidepressivos em roedores (Warden et al., 2012).

262

263 <u>1.4.2. Neurofisiologia da AMI</u>

264 Sabe-se que lesões no NDR são capazes de inibir tanto o medo condicionado quanto o 265 efeito de desamparo aprendido em animais submetidos a choques inescapáveis, enquanto 266 lesões na AMI inibem apenas o medo condicionado, mas não alteram os resultados de testes 267 de fuga de animais submetidos a tais estímulos aversivos incontroláveis (Maier et al., 1993). 268 Este trabalho, entretanto, não utilizou um modelo triádico, de forma que não conclui se os 269 resultados observados são decorrentes da incontrolabilidade do choque ou de algum outro 270 fator associado a este estímulo. Se por um lado este exemplo indica que a AMI não está 271 relacionada à passividade apresentada por animais após CI, outros casos mostram que a 272 ativação de receptores 5-HT_{2C} na AMI contribui para a expressão de déficit em escapes do 273 grupo CI (Strong et al., 2011). Além disso, o NDR se comunica mais intensamente com a AMI 274 de animais CI em testes de exploração social, e os autores apontam os altos níveis de 5-HT na

AMI como responsáveis pelo aumento de comportamentos ligados a ansiedade nesses
animais (Christianson et al., 2010).

277 Em um estudo utilizando camundongos 5-HTTOE, com expressão aumentada de 5-HTT, 278 foi demonstrado que estes animais recrutam menos interneurônios secretores de 279 parvalbumina da AMI durante o aprendizado de um medo condicionado do que animais 280 selvagens (Bocchio et al., 2015). Este mesmo estudo demonstrou, ex vivo, que a indução 281 artificial de uma oscilação teta (5-12 Hz) na AMI gera uma redução de disparos de neurônios 282 principais, mas esta redução é mais branda nos camundongos 5-HTTOE do que nos selvagens, 283 resultando em maior atividade de neurônios principais nos animais 5-HTTOE do que 284 selvagens. Assim como neste trabalho, Barkus et al. (2014) relatam que camundongos 5-285 HTTOE têm aprendizado de medo reduzido em comparação com animais selvagens. Além 286 disso, foi relatado que, durante a apresentação de estímulo condicionado, ocorriam mudanças 287 de oscilações delta (1 - 4 Hz) para teta (5 - 10 Hz) na AMI, sendo estas reduzidas em animais 288 5-HTTOE, especialmente em termos de potência em teta entre 7 e 10 Hz (Barkus et al., 2014). 289 Por fim, neste mesmo trabalho, foi notado que em animais controle, mas não nos 5-HTTOE, 290 houve uma forte correlação entre potência em teta e a amplitude de respostas 291 hemodinâmicas na AMI, medidas por técnica análoga a fMRI.

292 Utilizando um protocolo de DA, foi verificado que ratos submetidos a CI têm exploração 293 social reduzida, em comparação com ratos CE; tal fenômeno comportamental foi 294 acompanhado de um aumento de 5-HT na AMI durante o teste de exploração social 295 (Christianson et al., 2010). Estas diferenças foram eliminadas pela administração de 8-OH-296 DPAT, um agonista de receptores 5-HT_{1A} ratos CI. Amat et al. (2016) observaram um aumento 297 de serotonina na AMI em ratos submetidos a CI, de modo que a aplicação de cetamina como 298 antidepressivo 2 horas, 1 semana ou 2 semanas antes do protocolo de CI evita tanto as 299 alterações comportamentais desse tipo de estresse, quanto o aumento de 5-HT na AMI.

É importante notar, também, que há projeções inibitórias do CPF para a AMI (Berretta
 et al., 2005), de modo que a é possível detecção de controle no CPF seja transmitida à AMI
 diretamente, sem intermédio do NDR.

303

304 <u>1.4.3. Neurofisiologia do CPF-AMI</u>

305 Utilizando camundongos geneticamente modificados para apresentar deficiência na 306 produção de serotonina, observou-se que os animais com deficiência em 5-HT apresentam 307 maior coerência em oscilações delta (2 - 4 Hz) e beta (15 - 30 Hz) entre CPF e AMI, comparado 308 com animais selvagens (Dzirasa et al., 2013). Estes autores enfatizam que esta diferença 309 também foi notável comparando apenas as épocas em que os animais de ambos os grupos 310 estavam imóveis, demonstrando que tal coerência não é meramente relacionada com a falta 311 de movimento. Além disso, o uso do ISRS fluoxetina diminuiu essa coerência entre o CPF e 312 AMI nos camundongos geneticamente modificados, sem alterar a coerência dos selvagens 313 (Dzirasa et al., 2013).

314 Outras evidências nesta direção foram encontradas por Herry e Mons (2004), que 315 observaram que há menor expressão de IEGs (do inglês imediate early genes) no CPF e AMI 316 de animais que têm menor capacidade de aprender e recuperar uma extinção de medo 317 condicionado, comparado com animais que obtiveram sucesso no aprendizado e recuperação 318 da extinção. Estes autores também verificaram modificações do tipo LTD (do inglês, Long Term 319 Depression) no CPF de animais que resistiram à extinção de medo condicionado, e afirmam 320 que estes podem ser componentes importantes na obstrução do aprendizado de extinção 321 (Herry and Mons, 2004). Este trabalho, por fim, também encontrou LTP (do inglês, Long Term 322 Potentiation) no CPF de animais com sucesso na extinção do medo, e hipotetizam que o LTP 323 no CPF, na presença do estímulo condicionado, inibiria a AMI. Esta hipótese faz sentido dentro 324 do circuito descrito por Maier e Seligman (Maier, 2015; Maier and Seligman, 2016) para o DA, 325 desde que se entenda que o NDR pode agir como uma ponte de comunicação entre o CPF e a 326 AMI. Em consonância com estes achados, testes optogenéticos in vitro mostraram que a 327 extinção de medo condicionado é acompanhada por queda na eficácia de sinapses excitatórias 328 da via CPF-AMI (Cho et al., 2013).

Também utilizando medo condicionado, verificou-se que oscilações de 4 Hz, síncronas entre CPF (onde se iniciam) e AMI, ocorrem imediatamente antes do comportamento de congelamento (*freezing*) (Karalis et al., 2016). Durante estas oscilações, os autores notam, aumenta a sincronização em fase de neurônios principais e interneurônios do CPF com a AMI. A fim de verificar a causalidade deste evento, estes mesmos autores induziram, via optogenética, oscilações de 4 Hz no CPF, o que levou a comportamento persistente de medo, além de sincronização dos disparos desta área com os da AMI (Karalis et al., 2016). O mesmo

não foi observado estimulando a AMI ou o córtex motor por optogenética. Além disso, ratos que receberam estimulação de 4 Hz no CPF mostraram mais medo contextual ao contexto onde receberam essa estimulação, do que ratos controle (Karalis et al., 2016). Resultados semelhantes foram encontrados no modelo do estresse crônico por derrota social, onde a exposição ao estresse levou à sincronização do CPF com AMI nas oscilações entre 2 e 7 Hz, sendo que estas se iniciavam no CPF (Kumar et al., 2014).

Em um trabalho com camundongos com redução na expressão de 5-HTT, mostrou-se que estes têm deficiência na evocação de extinção de medo, bem como um aumento de sincronia em teta (4-8 Hz) entre AMI e CPF durante o aprendizado de extinção (Narayanan et al., 2011).

Correlações-cruzadas de teta entre CPF, AMI e hipocampo aumentam durante a evocação de medo aprendido, e diminuem durante o aprendizado de extinção deste medo, em camundongos (Lesting et al., 2011). Além disso, ao estimular AMI e o hipocampo em frequência teta em fase com a inerente do animal, há uma facilitação do medo aprendido; de forma oposta, ao estimular em fase oposta, há facilitação do aprendizado de extinção (Lesting et al., 2011).

352 O aumento de 5-HT na AMI de ratos CI foi notado por Dolzani e colaboradores (2016). 353 Estes autores silenciaram, via optogenética, a habênula lateral, e verificaram que com isto 354 bloquearam tal aumento de 5-HT, bem como os comportamentos relacionados a ansiedade 355 normalmente ocorrentes nos ratos CI. Análises imunocitoquímicas indicam que essa 356 comunicação da habênula lateral com a AMI acontece por intermédio do NDR (Dolzani et al., 357 2016). Estes dados deixam evidente que o CPF não atua como uma única chave que permite 358 ou não a atuação do NDR sobre a AMI; sinais vindos de outras áreas, como a habênula lateral, 359 para o NDR podem facilitar ou dificultar a ação deste sobre seus alvos.

Estudos farmacológicos sobre como diferentes áreas encefálicas respondem ao DA são abundantes, mas não são capazes de responder a todas as questões envolvidas neste modelo. A fim de entender melhor como AMI e CPF se comunicam durante e após a aquisição do DA, a investigação eletrofisiológica é uma excelente ferramenta. Conforme notam Benchenane e colaboradores (2010), a comunicação seletiva entre diferentes áreas do cérebro é um componente crucial da cognição, e esta comunicação pode ser analisada através de diversas técnicas eletrofisiológicas. Entretanto, este tipo de investigação continua largamente 367 subutilizado, especialmente o registro em livre-movimento em combinação com o protocolo
368 de DA. O processo de aquisição do comportamento desamparado ainda é pouco conhecido, e
369 a eletrofisiologia destes fenômenos é um campo de estudos ainda bastante inexplorado
370 (Marques, 2016).

371

372 **2. Justificativa**

373 O modelo do desamparo aprendido se mostra promissor tanto para o entendimento da 374 etiologia da depressão, quanto como modelo preditivo da eficiência de antidepressivos. 375 Entretanto, ainda há poucos estudos sobre as alterações eletrofisiológicas que dão origem aos 376 fenômenos comportamentais observados, bem como os efeitos de antidepressivos na 377 eletrofisiologia destes animais. Embora muitos trabalhos publicados em revistas de renome 378 afirmem utilizar este modelo, em uma cuidadosa revisão bibliográfica verificamos que a 379 grande maioria destes estudos não se utilizou de um modelo triádico e, portanto, seus 380 resultados não são conclusivos quanto ao impacto da controlabilidade do estresse nos dados 381 coletados; mais ainda, não existe nenhum trabalho anterior estudando a eletrofisiologia do 382 modelo sob o efeito do antidepressivo escitalopram. Por outro lado, sabemos que o CPF e a 383 AMI são áreas importantes para os fenômenos comportamentais observados com o 384 desamparo aprendido, potencialmente tendo papel chave no desenvolvimento de tais 385 fenômenos. Desta forma, a importância do presente projeto está em elucidar como o 386 escitalopram afeta a atividade eletrofisiológica destas duas áreas cerebrais, durante a indução 387 do desamparo aprendido. Nossa hipótese é de que o escitalopram leva a alterações 388 eletrofisiológicas semelhantes ao choque escapável, proporcionando um controle do córtex 389 pré-frontal sobre a amígdala, inibindo os comportamentos do desamparo aprendido.

390

391 3. Objetivos

392 <u>3.1. Objetivos gerais</u>

393 O objetivo deste projeto é descrever a atividade oscilatória através dos potenciais locais 394 de campo (PLC) e a atividade unitária do CPF e da AMI, evocados durante a presença de 395 estímulo condicionado do desamparo aprendido, em animais tratados com o antidepressivo 396 escitalopram, e comparar com animais não tratados. Dessa forma pretende-se analisar as 397 possíveis semelhanças e diferenças entre os marcadores eletrofisiológicos da controlabilidade
398 do estresse e dos efeitos antidepressivos do escitalopram.

399

400 <u>3.2. Objetivos específicos</u>

401 I. Caracterizar as alterações eletrofisiológicas no CPF e AMI evocadas por estímulos
 402 condicionados ao estresse controlável ou incontrolável.

403 II. Caracterizar as alterações após o tratamento com o escitalopram nas atividades
 404 eletrofisiológicas no CPF e AMG evocadas por estímulos condicionados ao estresse controlável
 405 ou incontrolável.

406 III. Comparar os resultados destes tratamentos a fim de compreender qual o efeito do
 407 escitalopram sobre as alterações comportamentais e eletrofisiológicas causadas pelo
 408 desamparo aprendido.

409

411 **4. Materiais e métodos**

412 <u>4.1. Desenho experimental</u>

Os experimentos descritos neste trabalho podem ser divididos em quatro etapas: 1)
preparação dos multieletrodos e cirurgia de implante dos mesmos; 2) tratamento com salina
ou escitalopram (grupo CI-T); 3) registro do primeiro dia e divisão dos animais nos grupos CI,
CE e SC; e 4) registro do segundo dia. Todas estas etapas estão descritas com mais detalhes
nas seções abaixo.

418

419 <u>4.2. Animais</u>

420 Foram utilizados 104 ratos Wistar machos, pesando entre 270 e 370 g, provenientes do 421 Biotério Central da Universidade de São Paulo – USP/RP. Os animais foram alojados em grupos 422 de até quatro indivíduos em caixas de polipropileno (40 x 33 x 18 cm) contendo raspas de 423 madeira (maravalha) no assoalho. Havia livre acesso a comida e. As caixas eram alojadas em 424 biotério com ciclo de 12 h de claro por 12 h de escuro, com as luzes acendendo 425 automaticamente às 07 h 00 min, e com temperatura controlada em 25 (\pm 2) °C. Os protocolos 426 experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da 427 Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (CEUA – FMRP – USP, Protocolo nº166/2016).

428

429 <u>4.3. Preparação dos multieletrodos</u>

430 As matrizes de eletrodos utilizadas para os registros eletrofisiológicos eram semi-431 manufaturadas. Em um conector (Omnetics, modelo A12623-001, USA), eram soldados 8 fios 432 de tungstênio de 50 µm de diâmetro, revestidos por teflon (California Fine Wires, USA). 433 Depois, estes fios eram passados por dentro de uma cânula de 0,6 mm de diâmetro e 434 aproximadamente 1 cm de comprimento, de modo a ficarem próximos uns dos outros. Era 435 soldado também um fio de prata, passando por fora da cânula, que mais tarde seria soldado 436 ao parafuso de referência no crânio do animal. No conector que seria implantado no CPF, um 437 dos fios de tungstênio era substituído por outro, de 60 μm de diâmetro (California Fine Wires, 438 USA), também passando por fora da cânula, que mais tarde seria implantado na musculatura 439 do pescoço do animal, funcionando como um eletromiograma. O conjunto de conector, fios e 440 cânula era então recoberto por acrílico odontológico, de modo a manter as partes estáveis, 441 mas mantendo livres pelo menos metade da cânula, e as pontas de todos os fios. Além disso,

442 um microparafuso de 1,2 mm de diâmetro era soldado a um fio de prata, sendo usado depois
443 como o parafuso de referência no crânio do rato.

444

445 <u>4.4. Cirurgia estereotáxica para implante de eletrodos</u>

446 A fim de implantar os eletrodos, os ratos foram anestesiados com injeção sistêmica de 447 cetamina (100 mg/Kg i.p. em NaCl 0,15 M) e xilazina (10 mg/Kg i.p em NaCl 0,15 M), e o grau 448 de anestesia era verificado por pinçamento de cauda. Realizava-se, então, a tricotomia do 449 escalpo e a fixação do crânio em estereotáxico (KOPF, KOPF instruments; EUA). Em seguida, 450 era feita a assepsia do escalpo com iodo 15 % em álcool 70° e água oxigenada 10 volumes, e 451 a administração de anestesia local subcutânea (lidocaína a 2 % em NaCl 0,15 M) na região da 452 incisão. Utilizando o bregma como referência médio-lateral e ântero-posterior, eram feitas 453 duas craniotomias, de modo a atingir o CPF (AP: + 2,7 mm; ML: ± 0,3 mm; DV: - 2,8 mm) e a 454 AMI (AP: - 2,6 mm; ML: ± 5,1 mm; DV: - 6,2 mm). Além destas, cinco craniotomias eram feitas, 455 quatro ao longo do crânio para a inserção de microparafusos que auxiliam na fixação do 456 capacete, e uma acima do cerebelo onde se fixava o microparafuso com fio de prata, que serve 457 tanto como terra quanto como referência durante os registros eletrofisiológicos. Foram 458 implantadas matrizes de 7 e 8 eletrodos, respectivamente no CPFm e AMG. Por fim, após o 459 posicionamento dos eletrodos, realizava-se a fixação dos mesmos com acrílico odontológico, 460 a fim de manter o conjunto mecanicamente estável e fixo sobre o crânio. Os animais então 461 repousavam por 3 dias antes da próxima etapa do experimento.

462

463 <u>4.5. Tratamento com escitalopram</u>

Quatro dias após a cirurgia, iniciavam-se os tratamentos com escitalopram para os animais do grupo tratado (CI-T), ou de salina para os outros grupos. Todos os animais receberam duas injeções por dia (às 8:00h e às 18:00h) de 1 mL/Kg; os animais do grupo CI-T recebiam tal volume com 10 mg/mL de escitalopram diluído em salina; todos os outros receberam apenas salina. Este protocolo durava 7 dias, totalizando 14 injeções em cada animal, sendo que a última delas era aplicada na noite anterior ao dia de indução do desamparo aprendido.

471 <u>4.6. Protocolo comportamental e adaptação do aparato</u>

472 O protocolo comportamental para a indução e verificação do desamparo aprendido foi 473 planejado a partir das premissas e critérios consolidados na literatura (Maier and Seligman, 474 2016a), assim como dados preliminares obtidos pelo nosso laboratório (Margues, 2016; 475 Rossignoli, 2018). Para a realização do protocolo, foi utilizado o aparato da Esquiva Ativa 476 (Insight) adaptado para que o registro eletrofisiológico ocorresse concomitantemente a tarefa 477 comportamental. O aparato tem 54 cm de comprimento x 30,7 cm de altura x 34 cm de 478 largura, parede frontal de acrílico transparente, e paredes laterais e do fundo cinzas e lisas. 479 No aparato há duas fileiras de sensores infravermelhos capazes de detectar o movimento do 480 rato, assim como dois pontos luminosos de LED para emissão do estímulo luminoso e um alto-481 falante para emissão do estímulo sonoro. O assoalho gradeadado do aparato, capaz de 482 distribuir o choque ao longo do aparato, foi dividido ao meio por uma barreira de 1,5 cm de 483 altura.

484 Todos os experimentos comportamentais foram conduzidos durante o período claro, 485 em dois dias consecutivos, com 24 h de intervalo entre as duas sessões. Para a geração do 486 modelo triádico do desamparo aprendido (Maier and Seligman, 2016a), no dia 1 (d1) os 487 animais foram aleatoriamente distribuídos em três grupos: choque escapável (CE), choque 488 inescapável (CI) e sem choque (SC). Adicionalmente, um quarto grupo foi gerado, o qual 489 recebeu o tratamento prévio com o escitalopram e foi submetido ao choque inescapável (CI-490 T). No d1, a caixa da Esquiva ativa era mantida com suas paredes cinzas e aromatizada com 491 leve odor de baunilha. O rato era então posicionado na caixa da Esquiva Ativa e conectado ao 492 sistema de registro eletrofisiológico. Os animas eram registrados por 30 min antes de iniciar 493 o protocolo comportamental. Os ratos recebiam um estímulo luminoso durante 10 s, após os 494 quais iniciava-se um choque de 0,6 mA por até 10 s (para os grupos CE, CI e CI-T), tempo 495 durante o qual o estímulo luminoso continuava ativo. Os ratos do grupo CE podiam 496 interromper o choque ao deslocar-se de uma metade à outra da caixa (fuga simples). Os ratos 497 Cl e Cl-T, por outro lado, não tinham controle sobre a duração do choque, que era idêntico ao 498 sofrido por um rato CE, de modo que pares CE/CI recebessem os mesmos tempos de choque. 499 No caso dos animais do grupo CI-T, os tempos dos choques foram pareados a tempo de 500 choque do grupo CI. Os ratos do grupo SC não sofreram o choque, de modo que seu estímulo

luminoso durava 10 s. Durante uma sessão, este ciclo se repetia 100 vezes. Entre as sessões,
a caixa era cuidadosamente limpa com etanol 70% seguido por água.

503 No dia 2 (d2), placas acrílicas de 2 mm de espessura, com padrões de listras, eram 504 colocadas por dentro da caixa de Esquiva Ativa, recobrindo todas as suas paredes de padrão 505 liso cinza. O ambiente também era aromatizado com um leve odor de limão. Neste dia, os 506 ratos dos quatro grupos (CE, CI, CI-T, SC) foram submetidos ao mesmo protocolo. De forma 507 semelhante ao 1d, o animal era posicionado na caixa de Esquiva Ativa, verificava-se o sinal 508 eletrofisiológico e uma pré-seleção de unidades e disparos era realizada, seguida por 30 min 509 de registro de linha de base. Iniciando a sessão comportamental, os 5 primeiros ciclos eram 510 idênticos aos do grupo CE do d1, com a diferença de que o estímulo luminoso que antecedia 511 o choque foi substituído por um estímulo sonoro (75 dB). Nos próximos 25 ciclos, mantinha-512 se este protocolo, porém o choque apenas cessava se o rato atravessasse duas vezes a barreira 513 na caixa (fuga dupla). Entre as sessões, a caixa e as placas acrílicas eram cuidadosamente 514 limpas com álcool 70 % seguido por água.

515

516 4.7. Obtenção dos dados eletrofisiológicos

517 A obtenção dos dados eletrofisiológicos dos animais foi feita simultaneamente com os 518 protocolos comportamentais descritos no item anterior. Antes de serem posicionados na 519 caixa de Esquiva Ativa, os ratos foram habituados com a sala experimental e com a 520 manipulação do experimentador. A seguir, foi feita a conexão dos eletrodos na cabeça do rato 521 ao head-stage, um pequeno circuito impresso (HST/8050, Plexon, EUA) que regula a 522 impedância dos eletrodos e diminui possíveis interferências causadas pelo movimento dos 523 cabos de registro. Com o rato na caixa de Esquiva Ativa, realizava-se a conexão do head-stage 524 com um cabo que, por sua vez, se liga a um comutador giratório no teto da caixa (Plexon 525 Standard Commutator, Plexon Inc.). Este comutador se conecta a um sistema de relés que 526 desliga este circuito quando o choque é aplicado nos animais, evitando que o circuito funcione 527 como um aterramento ao choque. Depois, o sinal chegava a um pré-amplificador analógico 528 (PBX, Plexon Inc., USA), onde foi amplificado em 1000 vezes e duplicado, sendo uma cópia enviada para a aquisição dos PLC, e outra para aquisição dos disparos unitários. Para a 529 530 obtenção dos PLCs, o sinal foi filtrado e apenas registrou-se oscilações ente 0,7 e 300 Hz, e 531 depois foi digitalizado a uma taxa de 1 kHz. Um processador de sinais, o MAP (Multi-channel 532 Acquisition Processor, Plexon, EUA), recebia as bandas de alta frequência, que seriam 533 utilizadas para aquisição dos disparos unitários, sendo digitalizadas a uma taxa de 40 kHz. O 534 MAP também permitia registrar os eventos de estímulos condicionados (luz ou som) e 535 choques, além de permitir a saída de sinal para um osciloscópio (TBS1000, Textronix) e um 536 monitor de áudio (modelo 3300, A-M Systems), utilizados para a identificação e pré-seleção 537 de possíveis unidades de disparo. O software SortClient (Plexon, Inc) foi utilizado para 538 acompanhar os registros dos eventos, PLCs e disparos unitários ao longo do experimento. 539 Também foi utilizado o software Refs (Plexon, Inc) para controlar qual dos eletrodos seria 540 utilizado como referência de seus vizinhos, para o CPF e para a AMI. Foi utilizado também o 541 software LabChart 7.2, que permitia o registro dos PLCs sincronizadamente com a aquisição 542 de vídeo, possibilitando a filmagem do comportamento para posteriores verificações.

543

544 <u>4.8. Pré-processamento</u>

545 <u>4.8.1. Épocas de interesse</u>

546 Embora tenha sido feito o registro eletrofisiológico dos animais durante todo o 547 protocolo comportamental, escolhemos observar e analisar as respostas eletrofisiológicas ao 548 EC que era seguido de choque não no grupo SC, mas nos grupos CE, CI e CI-T. Portanto, 549 definimos como épocas de interesse alguns segundos antes do EC (pré-EC) e depois dele (pós-550 EC); mais especificamente, para a análise dos disparos unitários foram considerados 10 s antes 551 e 10 s depois do EC, subdividindo o sinal em blocos (ou *bins*) de 0,1 s. Para as análises de PLCs, 552 foram utilizados os 12 s em torno do EC (6 s pré-EC, e 6 s pós-EC). Uma rotina semi-553 automatizada no programa MATLAB 2015b (Matrix Laboratory, MathWorks Inc), elaborada 554 por Rossignoli (Rossignoli, 2018) foi utilizada para eliminar ciclos onde o movimento do animal 555 tinha potencial de causar ruídos no sinal elétrico registrado que poderiam interferir na 556 interpretação dos nossos resultados (mais detalhes na sessão 5.8.4.).

557

558 <u>4.8.2. Unidades de disparo</u>

559 Utilizando o software *Offline Sorte v6* (Plexon, Inc), cada canal registrado foi analisado 560 individualmente a fim de delimitar prováveis disparos unitários. Este software permite usar 561 diversos parâmetros, manipulados ao longo dos eixos X, Y e Z, para que o usuário separe 562 oscilações elétricas que podem ser disparos neuronais de ruídos no sinal. Estes parâmetros

563 incluem os tamanhos de pico e vale da onda elétrica, sua duração no tempo, além de análises 564 de componentes principais (PCAs) das ondas, parâmetro este o mais usado durante a 565 delimitação das unidades de disparo. No PCA, cada onda é convertida em um ponto em um 566 gráfico de dispersão, com sua posição representando o score da onda para suas principais 567 caraterísticas – e.g. componentes principais. Desta forma, pontos que se dispõe aglomerados 568 no gráfico de dispersão representam ondas com características semelhantes. Os aglomerados 569 que representam a atividade de uma unidade neural, de forma geral, se dispõem em formatos 570 elípticos, enquanto ruídos no sinal se dispersam ou formam aglomerados com formas mal 571 definidas, e são descartados pelo usuário. A manipulação de três diferentes PCAs ao mesmo 572 tempo nos eixos X, Y e Z, além da observação de histogramas mostrando o número de disparos 573 de cada tipo de onda do aglomerado, permitem a seleção de conjuntos de ondas que 574 representem uma atividade fisiológica real.

575

576 <u>4.8.3. Potenciais locais de campo</u>

577 Todo o pré-processamento dos PLCs foi realizado no MATLAB 2015b (Matrix Laboratory, 578 MathWorks Inc). As épocas de interesse foram isoladas do restante do registro, separando-se 579 os períodos pré-EC e pós-EC. Uma rotina específica foi utilizada para filtrar cada sinal em 0,5 580 Hz, e sessões com a presença de sinal 1 mV maior ou menor do que a média do sinal foram 581 desconsideradas por serem demasiadamente ruidosas. Neste processo foram utilizadas 582 rotinas prontas dos pacotes *Chronux* e *EEGLAB*.

583

584 <u>4.8.4. Classificação de períodos com movimento</u>

585 Conforme mencionado anteriormente, a classificação de períodos com movimento foi 586 feita com a mesma rotina utilizada por Rossignoli em seu trabalho de doutorado, desenvolvido 587 também no Laboratório de Investigação em Epilepsia (Rossignoli, 2018). Resumidamente, foi 588 criada uma rotina em MATLAB que filtrava os sinais de PLCs em bandas delta (0,8 – 4 Hz) e 589 teta (4 – 10 Hz), e o sinal dos miogramas entre 150 e 500 Hz. A transformada de Hilbert foi 590 utilizada para obter o envelope destes sinais filtrados, e um gráfico de dispersão foi criado 591 utilizando os valores da razão teta/delta e do miograma a cada 1 s de registro. A análise de 592 clusters K-means foi utilizada para detectar aglomerados de pontos representando períodos

- 593 com muito movimento, pouco movimento, ou movimento nenhum: quanto maiores os valros
- 594 de delta/teta e do sinal do miograma, maior o movimento do animal no período.

595 <u>4.9. Análise de dados</u>

596 <u>4.9.1. Unidades de disparo</u>

597 Conforme descrito na seção 3.8.2, a atividade neuronal foi dividida em *bins* de 0,1 s cada. 598 Utilizando o MATLAB, foi analisada a modulação dos disparos causada pelo EC. Para isso, 599 foram calculados os números de disparo em cada *bin* de cada unidade, no período pós-EC. EM 600 seguida, foi feito o z-score destes números em relação ao período pré-EC. Finalmente, foram 601 feitas as médias de todas as sessões de cada unidade.

Em seguida, cada unidade foi categorizada como modulando positivamente, modulando
negativamente, ou não modulando após EC. Foi utilizado um teste t bicaudal pareado com
correção de Bonferroni (p < 0,05/correção de Bonferroni) entre os períodos pré-EC e pós-EC
para realizar tal categorização.

606

607 <u>4.9.2. Potenciais locais de campo</u>

Ainda utilizando o MATLAB, foram delimitadas bandas de frequência com intervalos bem estabelecidas na literatura de EEG: delta (1 – 4 Hz), teta (5 – 10 Hz), e gama (30 – 50 Hz) (Tort et al., 2010; Padilla-Coreano et al., 2016). Também foi utilizado um intervalo de 10 a 30 Hz, abrangendo tanto alfa quanto beta, tendo em vista que a banda alfa dos humanos pode não existir com a mesma função em roedores, de modo que seria pertinente entender tal intervalo de frequências como uma extensão de beta nestes animais (Knyazev, 2007).

614 A apresentação da densidade espectral de potência (PSD, do inglês Power Spectral 615 Density) comparada entre os períodos pré-EC e pós-EC foram feitos pelo método de Welch: 616 são utilizadas janelas sobrepostas nas quais o domínio do tempo é analisado, e calcula-se o o 617 periodograma para cada segmento utilizando a transformada rápida de Fourier (FFT, do inglês 618 Fast Fourier Transform); o resultado da FFT tem sua magnitude elevada ao quadrado e são 619 então promediados os periodogramas individuais, de modo que em cada período são 620 reduzidos a variação e o ruído individual da potência média. Para esta análise, foi utilizada a 621 função pwelch, incorporada no software MATLAB, com janelamento de Hammig com 1000 622 pontos e 50% de sobreposição. Foram utilizados 1024 pontos para a FFT.

A fim de detectar mudanças efêmeras no espectro de potência, permitindo-nos analisar
 a perturbação espectral de potência relacionada ao EC, foi utilizada a função *newtimef* do
 pacote *EEGLAB* no MATLAB. Utilizando a transformação por ondaleta de Morlet, foram

calculados os espectrogramas (tempo x frequência x potência) médios do CPF e da AMI de
cada animal. As potências foram normalizadas em diferenças logarítmicas (dB) utilizando
como linha de base os 10 s pré-EC. Calculou-se então as médias das potências de cada banda
por animal, e enfim foram feitas as médias de perturbação das potências de cada banda, para
cada grupo experimental.

631

632 <u>4.9.3. Análise estatística</u>

633 Os dados comportamentais e eletrofisiológicos foram submetidos ao teste de Lilliefors
634 para a verificação do tipo de distribuição das variáveis.

635 Nas análises de comportamento, para distribuições normais, foi utilizado o teste ANOVA 636 de uma via ou ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido de comparações *post-hoc* 637 de Tukey, ou teste T de Student pareado bicaudal. Para variáveis sem distribuição normal, foi 638 utilizado o teste Kruskal-Wallis com *post-hoc* de Dunn, bem como a ANOVA de Friedman com 639 medidas repetidas, seguida de post-hoc de Tukey. Para a classificação dos animais em 640 desamparados ou não desamparados foi utilizado o método de Ward para agrupamentos 641 hierárquicos. Por fim, para comparar diferentes proporções entre os grupos foi utilizado o 642 teste do qui-quadrado. A significância estatística foi baseada no valor de $p \le 0,05$.

Para a análise das unidades de disparo, foi utilizado o teste exato de Fisher ao comparar proporções de unidades modulando positivamente, negativamente ou não modulando, entre os grupos. Para comparar as médias dos z-scores e |z-scores| de disparos pós-EC, foi utilizado o teste de Kruskal-Walis, seguido de *post-hoc* de Tukey. A significância estatística foi novamente baseada em p \leq 0,05.

Ao analisar os PLCs, o teste T de Student pareado bicaudal foi utilizado para comparar os valores de potência relativa pré-EC e pós-EC de cada grupo. A ANOVA de duas vias com medias repetidas e *post-hoc* de Newman-Keuls foi utilizada para comparar as perturbações médias de potência entre os grupos ao longo do período de 12 s em torno do EC (6 s pré-EC e 6 s pós-EC), e as médias dos 6 s pós-EC foram comparadas por ANOVA de uma via e *post-hoc* de Newman-Keuls.

- 654
- 655
- 656

657

658 <u>4.10. Histologia</u>

659 Logo após o término do protocolo comportamental, os animais foram sacrificados por 660 asfixia em CO₂, após a qual foi feita a marcação de seus cérebros por lesão eletrolítica. Em 661 seguida, foram removidos os cérebros, armazenados em solução de paraformaldeído 4% 662 gelado por 3 dias. Depois, a solução era substituída por sacarose 30% por mais 3 dias. Os 663 cérebros foram então congelados em isopentano e armazenados em freezer -40 °C. 664 Finalmente, foram feitos cortes no criostato das áreas de interesse (CPF e AMI) para a 665 confirmação do posicionamento dos eletrodos. A coloração por cresil-violeta foi utilizada para facilitar a identificação das diferentes estruturas do cérebro e permitir uma melhor localização 666 667 da lesão eletrolítica.

668

669 **5. Resultados**

670 <u>5.1. Comportamento</u>

671 Inicialmente foi analisada a latência de fuga do grupo CE ao longo do primeiro dia (1d) 672 do protocolo experimental do desamparo aprendido, dividindo os 100 ciclos em blocos de 10. 673 Nesta análise foi possível observar que após um rápido decaimento da média da latência de 674 fuga já nos primeiros blocos, a latência de fuga se manteve baixa ao longo do experimento, 675 sendo significativamente diferente do primeiro bloco em relação a todos os outros, exceto os 676 blocos 2 e 4 (χ^2 = 77,302; DF = 10; ANOVA MR de Friedman; p > 0,05; *post hoc* de Tukey; p < 677 0,05). Quando comparados os valores das latências no início da tarefa com os valores dos 678 últimos blocos, a maioria dos animais diminui a latência média de fuga (t = 4,59; DF = 26; T de 679 Student pareado; p < 0,001), chegando à média de latência de 2,46 s ± 0,48 s; indicando o 680 aprendizado dos animais do grupo CE (Fig. 1-A).

No segundo dia do protocolo, tanto em sua média de latência de fuga (H = 13,831; DF =
3; teste de Kruskal-Wallis; p < 0,05; *post hoc* de Dunn; p < 0,05), quanto em número de falhas
(H = 13,020; DF = 3; teste de Kruskal-Wallis; p < 0,05; *post* hoc de Dunn; p < 0,05), os animais
do grupo CI tiveram números significativamente superiores aos do grupo SC e CE (Fig. 1-B e 1C, respectivamente). O grupo CI-T não apresentou diferenças com nenhum outro grupo.

686 Contudo, em todos os dados comportamentais foi possível observar uma grande 687 heterogeneidade em cada grupo. Dessa forma, com o intuito de classificar em cada grupo 688 quais seriam os animais que de fato ficaram desamparados, e assim identificar de maneira 689 mais específica os possíveis correlatos entre parâmetros eletrofisiológicos e comportamentais 690 utilizamos o método de Ward para uma análise de agrupamento hierárquico, de acordo com 691 o desempenho dos animais no d2. A figura 1-D mostra o dendrograma gerado a partir desta 692 análise, utilizando as latências médias de fuga e número de falhas no teste de cada animal 693 para o seu agrupamento. Os dois grandes agrupamentos identificados foram nomeados como 694 desamparados e não-desamparados (d = 134,2). Os animais do grupo classificado como 695 desamparados apresentaram médias maiores que 8,1 s e número de falhas maior que 20, 696 enguanto que os animais não-desamparados apresentaram médias menores que 8,03 s e 697 número de falhas menor que 20, como indicado na Fig. 1-E. A partir desta classificação foi 698 possível observar a proporção de animais desamparados e não desamparados em cada grupo 699 (Fig. 1-F).

700 Enquanto nos grupos SC, CE, CI-T a maioria dos animais foram classificados como não 701 desamparados (60% n = 18/30; 70,37% n = 19/27; e 60% n = 15/25; respectivamente), no 702 grupo CI a maioria dos animais foi classificada como desamparados (75% n = 18/24). De 703 maneira específica, a tabela 1 mostra a proporção de animais de cada grupo experimental 704 considerados desamparados e o teste de qui-quadrado entre estas proporções, indicando que 705 apenas o grupo CI é significativamente diferente de todos os outros em sua proporção de 706 animais desamparados. Além disso, é importante destacar a ausência de diferenças na 707 proporção de animais desamparados entre os grupos SC, CE, CI-T (p > 0,05), indicando a 708 prevenção do desamparado aprendido pelo tratamento com o escitalopram. A partir desta 709 classificação comportamental, prosseguimos as análises utilizando apenas animais não-710 desamparados dos grupos SC, CE e CI-T, e os animais desamparados do grupo CI.

711 Realizamos, então, novas análises comportamentais, levando em conta a seleção 712 descrita acima. Com isto, foi possível observar, em todos os parâmetros comportamentais 713 utilizados, o efeito preventivo do escitalopram sobre os prejuízos comportamentais 714 decorrentes do choque inescapável. Analisando as médias de latências de cada grupo em 715 blocos de 5 ciclos, pode-se observar que as latências no primeiro bloco foram 716 significativamente mais baixas do que em todos os outros [F(5; 330) = 42,478, ANOVA MR 717 duas vias; p < 0,05; Bloco 1 vs. 2, 1 vs. 3, 1 vs. 4, 1 vs. 5 e 1 vs. 6, Teste Tukey; p < 0,05], 718 resultado que indica que a tarefa de fuga dupla é consideravelmente mais difícil do que a fuga

719	simples. Nota-se também que a latência de fuga média ao longo de todo o teste da esquiva é
720	maior apenas no grupo CI em comparação aos outros grupos [F (3; 330) = 30,037; ANOVA duas
721	vias MR; p < 0,05; Cl vs. SC, Cl vs. ES, Cl vs. Cl-T; <i>post hoc</i> de Tukey; p < 0,05]. Por sua vez os
722	grupos SC, CE e CI-T não são diferentes entre si ao longo de todo o teste (p > 0,05), com
723	exceção do último bloco no qual o grupo CI-T apresenta uma média de latência maior em
724	relação ao grupo SC [F (15; 330) = 1,738, ANOVA MR duas vias; p < 0,05; Bloco 6 CI vs. Bloco 6
725	SC; post hoc de Tukey; p < 0,05] (Figura 1-G). Em relação a latência média de todo o teste,
726	apenas o grupo CI é diferente de todos os grupos (H = 40,133; DF = 3, teste de Kruskal-Wallis;
727	p < 0,05; Dunn, p < 0,05, Fig. 1-H). Este resultado se repete comparando a média dos números
728	de falhas entre os grupos (H = 40,849, DF = 3, teste de Kruskal-Wallis; p < 0,001; figura 1-I).



731 Figura 1 - Escitalopram previne a indução do desamparo aprendido. A) Média das curvas de 732 aprendizado dos animais CE, no d1, ao longo de blocos de 10 ciclos. A miniatura mostra os tempos de 733 latência de fuga para cada animal nos blocos 1 e 10. B) Média das latências de fuga no d2 nos grupos 734 SC (n = 30), CE (n = 27), CI (n = 24) e CI-T (n = 25). C) Média do número de falhas no d2. D) Dendrograma 735 indicando a classificação hierárquica dos animais entre desamparados e não desamparados. A barra à 736 direita indica o respectivo grupo de tratamento de cada animal. E) Gráfico de dispersão mostrando a 737 distribuição de todos animais em relação a sua latência e número de falhas médios. A região circulada 738 indica os animais classificados como desamparados. F) Proporção de animais desamparados em cada 739 grupo de tratamento. G) Latência média no d2 com os animais selecionados dos grupos SC (n = 18), CE 740 (n = 19), Cl (n = 18) e Cl-T (n = 15). H) Médias das latências no d2 para os animais selecionados de cada 741 grupo de tratamento. I) Média do número de falhas no d2 para os animais selecionados de cada grupo. 742 O traco azul indica os blocos com média diferente do bloco 1 (p < 0.05). * indica p < 0.05. ** indica p <743 0,05 na comparação do bloco 1 com todos os outros. O traço vermelho indica os blocos onde CI tem 744 latência média diferente de todos os outros grupos (p < 0,05). O traço verde indica o bloco onde CI 745 teve latência média diferente de todos os outros, e CI-T teve latência média diferente de SC (p < 0,05). 746

747

748 Tabela 1 – Proporção de animais desamparados em cada grupo experimental

	-	Valor de χ^2 <i>versus</i> grupos			
Grupo	%	SC	CE	CI	CI-T
	Desamparados				
SC	40	-	0,6710	6,6150	0
CE	29,63	0,6710	-	10,4659	0,6168
CI	75 *	6,6150	10,4659	-	6,1250
CI-T	40	0	0,6168	6,1250	-

749Proporções de animais desamparados e comparações por Qui-quadrado de Pearson entre as750proporções. * Indica que o grupo CI tem proporção diferente de todos os outros grupos (p < 0,05).</td>

751

752 <u>5.2 Confirmação histológica da posição dos eletrodos</u>

As lâminas coradas com cresil-violeta foram verificadas em microscópio para verificação das posições de lesões eletrolíticas feitas com os mesmos eletrodos utilizados para registro eletrofisiológico, permitindo assim conferir se o registro foi feito nas áreas de interesse. A figura 2 apresenta um diagrama com as posições de todos os eletrodos considerados como dentro da área de interesse, bem como imagens ilustrando as lesões observadas no CPF e AMI.



Figura 2 - Verificação histológica de posicionamento dos eletrodos. A) representação do
 posicionamento dos feixes de eletrodos no eixo antero-posterior; B) Posicionamento dos eletrodos no
 CPF e na AMI. Cada ponto azul representa a lesão eletrolítica encontrada no tecido de um animal. C)
 Exemplos de lesões observadas no CPF e AMI, respectivamente.

765

759

766 <u>5.3. Atividade unitária</u>

767Foram obtidas 117 unidades de disparo no CPF (SC n = 27; CE n = 45; CI n = 38 e CI-T n768= 7) e 58 na AMI (SC n = 10; CE n = 19; CI n = 24 e CI-T n = 5) para as análises do 1d. A atividade

769 unitária foi analisada utilizando o z-score do número de disparos da unidade em cada bin

(bloco de 0,1 s) nos 10 s após o estímulo condicionado (EC), em comparação com os 10 s antes
do EC. Diagramas representando tais padrões de disparo unitário no CPF e AMI estão
dispostos nas figuras 3-A e 4-A, respectivamente.

773 No CPF, a proporção de unidades sem modulação a partir do EC foi maior nos animais 774 SC do que nos grupos CE e CI (SC n = 24/27; CE n = 24/45; CI n = 20/38; CI-T n = 4/7; p< 0,05; 775 Teste exato de Fisher; figura 3-B). Mais detalhadamente, a proporção de unidades moduladas 776 positivamente (ou seja, com aumento do número de disparos após o EC) foi menor em SC do 777 que em CE (SC n = 3/27; CE n =16/45; p < 0,05; Teste exato de Fisher; figura 3-B), e a proporção 778 de unidades moduladas negativamente foi menor em SC do que em CI (SC n = 0/27; CI n = 779 6/38; p < 0,05; Teste exato de Fisher; figura 3-B). As médias do |z-score| de cada unidade nos 780 10 s pós-EC foram comparadas, mostrando que o grupo SC teve menos modulação dos 781 disparos do que todos os outros grupos (H = 27,294; DF = 3, teste de Kruskal-Wallis; p < 0,05; 782 Dunn, p < 0,05; figura 3-C). Foram avaliadas também as médias do z-score líquido, mas não 783 houve diferença significativa entre os grupos (p > 0,05; figura 3-D).

Na AMI, as proporções de unidades moduladas, tanto positivamente quanto
negativamente e somadas ambas somadas, não foram significativamente diferentes entre os
grupos (p > 0,05; figura 4-B). Também não houve diferença significativa nas médias do |zscore | ou z-score líquido (p > 0,05, figuras 4-C e 4-D).



789 Figura 3 – No CPF, a proporção de unidades de disparo que modulam positivamente é maior no 790 grupo CE, enquanto no grupo CI a proporção de unidades que modulam negativamente é maior. A) 791 modulação de cada unidade de disparo 10 s após o EC, em comparação com sua atividade pré-EC. B) 792 Proporções das unidades registradas que não têm modulação da taxa de disparos (esq.), que 793 aumentam a taxa de disparos (centro), e que reduzem a taxa de disparos (dir.). C) Média e erro-padrão 794 dos |z-scores| dos disparos unitários de cada grupo, ao longo do tempo (esq.) e médias do período 795 pós-EC (dir.). D) Média e erro-padrão dos z-scores dos disparos unitários de cada grupo, ao longo do 796 tempo (esq.) e médias do período pós-EC (dir.). Os traços pretos indicam diferença significativa em 797 relação ao grupo SC (p < 0,05).

798



Figura 4 - Na AMI, não houve diferenças significativas entre as modulações de disparos unitários. A)
modulação de cada unidade de disparo 10 s após o EC, em comparação com sua atividade pré-EC. B)
Proporções das unidades registradas que não têm modulação da taxa de disparos (esq.), que
aumentam a taxa de disparos (centro), e que reduzem a taxa de disparos (dir.). C) Média e erro-padrão
dos |z-scores| dos disparos unitários de cada grupo, ao longo do tempo (esq.) e médias do período
pós-EC (dir.). D) Média e erro-padrão dos z-scores dos disparos unitários de cada grupo, ao longo do
tempo (esq.) e médias do período pós-EC (dir.).

807

799

808 <u>5.4. Atividade oscilatória</u>

809 As densidades espectrais de potência (PSDs) médias de cada grupo no CPF permitem 810 observar que há um efeito do estresse, tanto controlável quanto incontrolável, sobre os PSDs 811 pós-EC: todos os grupos com exceção do SC têm curvas diferentes para o PSD pré-EC e pós-EC 812 (fig. 5-A). Os espectrogramas permitem visualizar ainda melhor o aumento de teta no período 813 pós-EC dos grupos CE e CI-T, efeito ausente nos outros grupos (fig. 5-B). De fato, conforme 814 apresentado nos gráficos de perturbação média relacionada a estímulo (fig. 5-C a F), a 815 perturbação média pós-EC das oscilações em teta foi diferente entre os grupos CE e CI-T, em 816 comparação com SC e CI, nos tempos 1 e de 3 a 6 [F (33; 297) = 2,56; ANOVA MR duas vias, p 817 < 0,05; CE vs. CI, CE vs. SC, CI-T vs. CI e CI-T vs. SC nos tempos 1, e 3-6 s; post hoc de Newman-818 Keuls; p < 0,05] (fig. 5-D). As médias das potências em teta pós-EC também foram diferentes 819 entre os grupos CE e CI-T, em comparação com SC e CI [F (3; 27) = 1,872; ANOVA uma via; p 820 < 0,05; post hoc de Newman-Keuls; p < 0,05]. Também na banda de frequências alfa-beta 821 houve um efeito de interação grupo x tempo, com SC sendo diferente dos grupos CE e CI no 822 tempo 1 s, CI diferente de SC e CI-T no tempo 2 s, e CI diferente de todos os outros grupos nos 823 tempos 3-6 s [F (33; 297) = 2,47; ANOVA MR duas vias; p < 0,05; CE vs. CI no tempo 1 s, CI vs. 824 SC e Cl vs. Cl-T no tempo 2 s, e Cl vs. SC, CE e Cl-T nos tempos 3-6 s; post hoc de Newman-825 Keuls; p < 0,05] (fig. 5-E). No entanto, não houve diferença significativa entre as médias de 826 EPRS em alfa-beta. Também não houve diferenças significativas entre os grupos nas bandas 827 delta e gama do CPF.

828 As mesmas análises foram feitas com os LFPs da AMI. Os PSDs dessa área novamente 829 mostram que todos os grupos, exceto SC, tiveram notáveis diferenças nas densidades de 830 potência entre pré-EC e pós-EC (fig. 6-A). Os espectrogramas reforçam tais diferenças, em 831 especial nas áreas de alfa-beta e em gama (fig. 6-B). A análise dos perturbação média de 832 potência relacionada à estímulo aponta efeitos de interação grupo x tempo, com SC tendo 833 maior potência relativa do que todos os outros grupos no tempo 1 s, e CI tendo uma potência 834 menor que SC no tempo 3 s [F (33; 242) = 1,501; ANOVA MR duas vias; p < 0,05; SC vs. CE, CI e CI-T no tempo 1 s; CI vs. SC no tempo 3 s; post hoc de Newman-Keuls; p < 0,05] (fig. 6-E). 835 836 Também foi observado um efeito de interação grupo x tempo na banda gama, com uma 837 potência maior em CI-T do que SC e CI nos tempos 3-6 s, ES maior que CI no tempo 4 s, CI-T 838 maior que CE nos tempos 5-6 s, e CE maior que SC no tempo 6 s [F (33; 242) = 2,747; ANOVA 839 MR duas vias; p < 0,05; CI-T vs. SC e CI nos tempos 3-6 s; CI-T vs. CE nos tempos 5-6 s; CE vs. 840 CI no tempo 4 s; e CE vs. SC no tempo 6 s; *post hoc* de Newman-Keuls; p < 0,05]. Analisando 841 as médias dos 6 s pós-EC, observamos também que CI-T teve uma média de perturbação em 842 gama maior do que os CI e SC [F (3; 22) = 4,212; ANOVA de uma via; p < 0,05; post hoc de 843 Newman-Keuls, p < 0,05]



844

845 Figura 5 -Há um aumento da potência em teta no CPF após o EC nos grupos CE e CI-T. A) PSD do CPF 846 pré-EC e pós-EC de cada grupo. B) Espectrogramas do CPF de cada grupo; notar aumento da potência 847 em teta nos grupos CE e CI-T. C a F) Perturbação média relacionada a estímulo e erro-padrão para 848 diferentes bandas de frequência ao longo do tempo (esq.) e média dos 6 s pós-EC (dir.). O traço azul 849 indica diferença significativa de CE com SC e CI (p < 0,05); traço verde indica diferença significativa de 850 CI-T com SC e CI (p < 0,05); traço preto indica diferença de SC com CE e CI (p < 0,05); traço laranja indica 851 diferença de CI com SC e CI-T (p < 0,05); traço vermelho indica diferença de CI com todos os grupos (p 852 < 0,05); * indica diferença contra grupos CE e CI-T (p < 0,05).

- 853
- 854



Figura 6 – Na AMI, há um aumento de potência em gama no grupo CI-T. A) PSD da AMI pré-EC e pós-EC de cada grupo. B) Espectrogramas da AMI de cada grupo; notar redução de alfa-beta nos grupos CI, CE e CI-T, e aumento de gama no grupo CI-T. C a F) Perturbação média relacionada a estímulo e erro-padrão para diferentes bandas de frequência ao longo do tempo (esq.) e média dos 6 s pós-EC (dir.). O traço preto indica SC diferente de todos os outros grupos (p < 0,05); traço vermelho indica CI diferente de SC (p < 0.05); traço amarelo indica CI-T diferente de SC e CI (p < 0.05); traço laranja indica CI diferente de CE (p < 0.05); traço verde indica CI-T diferente de todos os grupos (p < 0.05); traço azul indica CE diferente de SC (p < 0,05); * indica diferença em relação ao grupo CI-T (p < 0,05).

868 **6.** Discussão

869 <u>6.1. Comportamento</u>

870 As primeiras análises dos resultados comportamentais foram particularmente 871 importantes para a validação do protocolo comportamental escolhido. No grupo CE, a análise 872 da latência de fuga durante o choque escapável no primeiro dia corresponde a um importante 873 indicador do aprendizado do animal, como indicado nos nossos dados através da redução da 874 latência de fuga e sua manutenção ao longo do teste. Nesse sentido, alguns autores sugerem 875 que a diminuição da latência ao longo do experimento do dia 1 poderia representar a 876 transformação de uma contingência acidental para uma contingência aprendida (Hunziker et 877 al., 2016). Além disso, como já apontado pelas premissas clássicas do desamparo aprendido 878 (Maier and Seligman, 2016a), apenas os nossos animais submetidos previamente ao choque 879 inescapável apresentaram alterações comportamentais no teste da esquiva, indicando o 880 efeito da controlabilidade do estresse e não o estresse per se no aumento da média da latência 881 de fuga e no número de falhas. Nestas primeiras análises não foi possível observar o efeito do 882 tratamento prévio com o escitalopram, porém, quando se avalia o efeito de fármacos no 883 desamparo aprendido é comum a utilização de classificação comportamentais, já que a 884 heterogeneidade de respostas comportamentais é relativamente alta no desamparo 885 aprendido (e.g. Belujon and Grace, 2014; Wang et al., 2014).

886 Com o intuito de estabelecer uma classificação comportamental cujos os 887 agrupamentos fossem estabelecidos de forma objetiva, escolhemos o agrupamento 888 hierárquico pelo método de Ward. Este método tem como vantagem o fato de gerar sempre 889 o mesmo resultado, ao contrário de métodos de natureza estocástica como o k-means ou k-890 medoids, que pode retornar agrupamentos diferentes em cada repetição. Além disso, o 891 método resultou em uma taxa de aproveitamento tão alta quanto a de trabalhos anteriores 892 (e.g. Belujon and Grace, 2014). Entretanto, é importante ressaltar que o trabalho de Belujon 893 e Grace, entre outros, utiliza um critério arbitrário para classificar os seus animais como 894 "desamparados" (40% ou mais de falhas, e 8 s ou mais de latência), enquanto o nosso critério 895 se baseou em uma análise estatística mais objetiva que levou em conta as especificidades dos 896 nossos resultados.

897 Se, por um lado, a latência média e o número de falhas do grupo CI-T não deixaram 898 claro o efeito do escitalopram, a classificação dos animais em desamparados ou não899 desamparados evidencia o efeito protetor deste fármaco sobre o desamparo aprendido. Os 900 grupos SC, CE e CI-T não só apresentaram mais indivíduos não-desamparados, como a proporção de indivíduos não-desamparados nos grupos SC e CI-T, para o nosso espanto, foi 901 902 exatamente a mesma. Os nossos dados apontam que 60% dos animais CI-T não ficaram 903 desamparados, em contrapartida ao grupo Cl no gual 75% dos animais ficaram desamparados. 904 De maneira semelhante, outros testes não-triádicos do desamparo aprendido não só são 905 sensíveis ao pré-tratamento com escitalopram, como 50% dos animais tratados reduzem o 906 número de falhas no teste da esquiva (Benatti et al., 2014, 2018). Curiosamente, de maneira 907 convergente aos nosso dados, na depressão a eficácia clínica do escitalopram e de outros 908 tratamentos com inibidores da receptação de serotonina também é avaliada em cerca de 60-909 80% (Kennedy et al., 2006; Kirino, 2012; Vai et al., 2016).

910 De modo geral, a prevenção de comportamentos do tipo-depressivo pelo tratamento 911 com escitalopram já era esperado, tendo em vista que vários outros ISRS já se mostraram 912 eficientes em prevenir ou reverter os déficits comportamentais causados pelo desamparo 913 aprendido, como o citalopram (Massol et al., 1989; Martin et al., 1990; Martin and Puech, 914 1991), a fluvoxamina (Massol et al., 1989; Martin and Puech, 1991) e a fluoxetina (Massol et 915 al., 1989; Ferguson et al., 2000; Malberg and Duman, 2003; Chen et al., 2006; Valentine et al., 916 2008; Reinés et al., 2008; Bessa et al., 2009; Padilla et al., 2011; Fernández Macedo et al., 917 2013; Ampuero et al., 2015; Roy et al., 2018). Por sua vez, o escitalopram vem se mostrando 918 ainda mais eficiente quando comparado a outros antidepressivos ISRS, tanto em estudos 919 clínicos quanto experimentais (Sánchez et al., 2003; Kennedy et al., 2006). Apesar destes 920 indícios na literatura, os efeitos do escitalopram no modelo triádico do desamparo aprendido 921 foram analisados pela primeira vez no presente trabalho.

922 Em conjunto, além dos resultados positivos com o escitalopram, os nossos resultados 923 comportamentais apontam ainda outras implicações quanto a validade do desamparo 924 aprendido como um modelo experimental da depressão e a acurácia da análise do desamparo 925 aprendido, propriamente dita. As respostas comportamentais observadas após o tratamento 926 com escitalopram sugerem a validade preditiva do modelo utilizado, ou seja, a capacidade 927 deste modelo de apresentar uma correlação positiva entre o efeito clínico com as alterações 928 comportamentais na tarefa (Graeff e Guimarães, 2012). A validade preditiva em modelos 929 experimentais de depressão corresponde a um critério de validação indispensável, já que as

930 validações de face ou de constructo são em geral inconsistentes e heterogêneas nos modelos 931 de depressão (Graeff e Guimarães, 2012). Além disso, a sensibilidade da tarefa ao tratamento 932 com o escitalopram indica, ainda, um importante fator relacionado à acurácia do desamparo 933 aprendido: a trans-situacionalidade. Outros estudos já mostraram a capacidade do 934 desamparo aprendido de produzir comportamentos análogos à depressão em contextos 935 diferentes daquele no qual o desamparo foi induzido (Williams and Maier, 1977), e esta 936 característica do modelo estava presente já em suas primeiras descrições (Maier et al., 1969 937 apud Maier and Watkins, 2005); nós incluímos a mudança do contexto (padrão de cores na 938 parede, odor na caixa de esquiva e tipo do estímulo condicionado) a fim de atingir essa mesma 939 premissa. Já se demonstrou que essa trans-situacionalidade é sensível à sinalização 940 serotoninérgica: o bloqueio farmacológico da atividade serotoninérgia, antes ou depois de 941 choques inescapáveis, impediu o comportamento desamparado apenas nos animais 942 submetidos a estes choques em contextos diferentes daquele do teste comportamental, e não 943 nos animais que tiveram ambas etapas no mesmo contexto (Maier et al., 1995 apud Maier 944 and Watkins, 2005). Dessa forma, os nossos resultados sugerem que a ocorrência da trans-945 situacionalidade no nosso modelo, já que o mesmo foi sensível a ação de um ISRS. O aspecto cognitivo do modelo utilizado também pode ser acessado, em específico pela observação do 946 947 aumento da dificuldade do teste da esquiva com a fuga dupla, de forma que a latência média 948 após os primeiros 5 ciclos do teste aumenta em todos os grupos. Este resultado sugere que a 949 tarefa de fuga simples, presente no primeiro bloco, é mais simples do que a fuga dupla, 950 necessária nos outros ciclos. O uso de uma tarefa relativamente complexa no teste do 951 desamparo aprendido é importante para evitar que animais sejam enquadrados como não-952 desamparados não por terem desenvolvido uma resposta adequada à tarefa proposta, mas 953 sim por acidentalmente cumprir suas condições (Maier and Seligman, 2016a). Por fim, de 954 modo geral, os cuidados tomados na elaboração deste modelo de desamparo aprendido, 955 possibilitaram não só o cumprimento das prerrogativas teóricas do desamparo aprendido, 956 como também a sua validação pelo tratamento com o escitalopram.

957 **REFERÊNCIAS**

- 958 Abelaira HM, Réus GZ, Quevedo J (2013) Animal models as tools to study the
- 959 pathophysiology of depression. Rev Bras Psiquiatr 35 Suppl 2:S112-20 Available at:
- 960 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24271223.
- Amat J, Baratta M V, Paul E, Bland ST, Watkins LR, Maier SF (2005) Medial prefrontal cortex
 determines how stressor controllability affects behavior and dorsal raphe nucleus. Nat
 Neurosci 8:365–371.
- Amat J, Dolzani SD, Tilden S, Christianson JP, Kubala KH, Bartholomay K, Sperr K, Ciancio N,
 Watkins LR, Maier SF (2016) Previous Ketamine Produces an Enduring Blockade of
- 966 Neurochemical and Behavioral Effects of Uncontrollable Stress. J Neurosci 36:153–161
- 967 Available at: http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.3114-15.2016.
- 968 Amat J, Paul E, Watkins LRLR, Maier SFSF (2008) Activation of the Ventral Medial Prefrontal
- 969 Cortex During an Uncontrolable Stressor Reproduces Both the Immediate and Long-
- 970 Term Protective Effects. Neuroscience 154:1178–1186 Available at:
- 971 http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T0F-4S9P5VX-
- 972 1/2/cd79f0648afdcbe31259709bf9e310b2.
- 973 Amat J, Paul E, Zarza C, Watkins LR, Maier SF (2006) Previous Experience with Behavioral
- 974 Control over Stress Blocks the Behavioral and Dorsal Raphe Nucleus Activating Effects of
- 975 Later Uncontrollable Stress: Role of the Ventral Medial Prefrontal Cortex. J Neurosci
- 976 26:13264–13272 Available at:
- 977 http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.3630-06.2006.
- 978 Ampuero E, Luarte A, Santibañez M, Varas-Godoy M, Toledo J, Diaz-Veliz G, Cavada G, Javier
- 979 Rubio F, Wyneken U (2015) Two chronic stress models based on movement restriction
- 980 in rats respond selectively to antidepressant drugs: Aldolase C as a potential biomarker.
 981 Int J Neuropsychopharmacol 18:1–9.
- An J, Wang L, Li K, Zeng Y, Su Y, Jin Z, Yu X, Si T (2017) Differential effects of antidepressant
 treatment on long-range and short-range functional connectivity strength in patients
 with major depressive disorder. Sci Rep 7:1–9.
- Andrews PW, Bharwani A, Lee KR, Fox M, Thomson JA (2015) Is serotonin an upper or a
- downer? The evolution of the serotonergic system and its role in depression and the
 antidepressant response. Neurosci Biobehav Rev 51:164–188 Available at:

988 http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.01.018.

APA. Manual Diagnostico E Estatistico De Transtornos. 4° Edição. Porto Alegre: Artmed,
2002.

Baratta M V., Christianson JP, Gomez DM, Zarza CM, Amat J, Masini C V., Watkins LR, Maier
 SF (2007) Controllable versus uncontrollable stressors bi-directionally modulate

conditioned but not innate fear. Neuroscience 146:1495–1503.

- Baratta M V, Zarza CM, Gomez DM, Campeau S, Watkins LR, Maier SF (2010) Selective
- 995 activation of dorsal raphe nucleus-projecting neurons in the ventral medial prefrontal

996 cortex by controllable stress. Eur J Neurosci 30:1111–1116 Available at:

997 http://doi.wiley.com/10.1111/j.1460-9568.2009.06867.x.

Bares M, Novak T, Kopecek M, Brunovsky M, Stopkova P, Höschl C (2014) The effectiveness

- 999 of prefrontal theta cordance and early reduction of depressive symptoms in the 1000 prediction of antidepressant treatment outcome in patients with resistant depression:
- 1001 analysis of naturalistic data. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci 265:73–82.
- 1002 Barkus C, Line SJ, Huber A, Capitao L, Lima J, Jennings K, Lowry J, Sharp T, Bannerman DM,
- 1003 Mchugh SB (2014) Variation in serotonin transporter expression modulates fear-evoked
- 1004 hemodynamic responses and theta-frequency neuronal oscillations in the amygdala.
- 1005 Biol Psychiatry 75:901–908 Available at:
- 1006 http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2013.09.003.
- 1007 Belujon P, Grace AA (2014) Restoring mood balance in depression: Ketamine reverses deficit
- 1008 in dopamine-dependent synaptic plasticity. Biol Psychiatry 76:927–936 Available at:

1009 http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.04.014.

- 1010 Benatti C, Alboni S, Blom JMC, Gandolfi F, Mendlewicz J, Brunello N, Tascedda F (2014)
- 1011 Behavioural and transcriptional effects of escitalopram in the chronic escape deficit
- 1012 model of depression. Behav Brain Res 272:121–130 Available at:
- 1013 http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2014.06.040.
- 1014 Benatti C, Alboni S, Blom JMC, Mendlewicz J, Tascedda F, Brunello N (2018) Molecular
- 1015 changes associated with escitalopram response in a stress-based model of depression.
- 1016 Psychoneuroendocrinology 87:74–82 Available at:
- 1017 http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2017.10.011.
- 1018 Benchenane K, Peyrache A, Khamassi M, Tierney PL, Gioanni Y, Battaglia FP, Wiener SI (2010)

- 1019 Coherent Theta Oscillations and Reorganization of Spike Timing in the Hippocampal-
- 1020 Prefrontal Network upon Learning. Neuron 66:921–936 Available at:
- 1021 http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2010.05.013.
- 1022 Berretta S, Pantazopoulos H, Caldera M, Pantazopoulos P, Paré D (2005) Infralimbic cortex
- 1023 activation increases c-Fos expression in intercalated neurons of the amygdala.
- 1024 Neuroscience 132:943–953.
- 1025 Bessa JM, Ferreira D, Melo I, Marques F, Cerqueira JJ, Palha JA, Almeida OFX, Sousa N (2009)
- 1026 The mood-improving actions of antidepressants do not depend on neurogenesis but are
- associated with neuronal remodeling. Mol Psychiatry 14:764–773 Available at:
- 1028 http://dx.doi.org/10.1038/mp.2008.119.
- 1029 Bocchio M, Fucsina G, Oikonomidis L, McHugh SB, Bannerman DM, Sharp T, Capogna M
- 1030 (2015) Increased serotonin transporter expression reduces fear and recruitment of
- 1031 parvalbumin interneurons of the amygdala. Neuropsychopharmacology 40:3015–30261032 Available at:
- 1033 http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4864439&tool=pmcentrez
 1034 &rendertype=abstract.
- Castagné V, Moser P, Roux S, Porsolt RD (2011) Rodent Models of Depression: Forced Swim
 and Tail Suspension Behavioral Despair Tests in Rats and Mice. In: Current Protocols in
- 1037 Neuroscience, pp 1–14. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. Available at:
- 1038 http://doi.wiley.com/10.1002/0471142301.ns0810as55.
- Chen H, Pandey GN, Dwivedi Y (2006) Hippocampal cell proliferation regulation by repeated
 stress and antidepressants. Neuroreport 17:863–867.
- 1041 Cho JH, Deisseroth K, Bolshakov VY (2013) Synaptic encoding of fear extinction in mPFC-
- 1042 amygdala circuits. Neuron 80:1491–1507 Available at:
- 1043 http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2013.09.025.
- 1044 Christianson JP, Paul ED, Irani M, Thompson BM, Kubala KH, Yirmiya R, Watkins LR, Maier SF
- 1045 (2008) The role of prior stressor controllability and the dorsal raphé nucleus in sucrose
- 1046 preference and social exploration. Behav Brain Res 193:87–93 Available at:
- 1047 https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166432808002374.
- 1048 Christianson JP, Ragole T, Amat J, Greenwood BN, Strong P V., Paul ED, Fleshner M, Watkins
- 1049 LR, Maier SF (2010) 5-Hydroxytryptamine 2C Receptors in the Basolateral Amygdala Are

1050 Involved in the Expression of Anxiety After Uncontrollable Traumatic Stress. Biol

1051 Psychiatry 67:339–345 Available at:

- 1052 http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006322309010907.
- Christianson JP, Thompson BM, Watkins LR, Maier SF (2009) Medial prefrontal cortical
 activation modulates the impact of controllable and uncontrollable stressor exposure
- 1055 on a social exploration test of anxiety in the rat. Stress 12:445–450.
- 1056 Clark DA, Beck AT (2010) Cognitive theory and therapy of anxiety and depression:
- 1057 Convergence with neurobiological findings. Trends Cogn Sci 14:418–424 Available at:
 1058 http://dx.doi.org/10.1016/j.tics.2010.06.007.
- 1059 Courtin J, Chaudun F, Rozeske RR, Karalis N, Gonzalez-Campo C, Wurtz H, Abdi A, Baufreton
- 1060J, Bienvenu TCM, Herry C (2014) Prefrontal parvalbumin interneurons shape neuronal1061activity to drive fear expression. Nature 505:92–96 Available at:
- 1062 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24256726%5Cnhttp://www.nature.com/doifind
 1063 er/10.1038/nature12755.
- 1064 Dolzani SD, Baratta M V, Amat J, Watkins LR, Maier SF, Agster KL, Saddoris MP (2016)
- 1065 Activation of a Habenulo Raphe Circuit Is Critical for the Behavioral and
- 1066 Neurochemical Consequences of Uncontrollable Stress in the Male Rat. 3:1–17.
- 1067 Dzirasa K, Kumar S, Sachs BD, Caron MG, Nicolelis MAL (2013) Cortical-Amygdalar Circuit
- 1068 Dysfunction in a Genetic Mouse Model of Serotonin Deficiency. J Neurosci 33:4505–
- 1069 4513 Available at: http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.4891-
- 1070 12.2013.
- 1071 Ferguson SM, Brodkin JD, Lloyd GK, Menzaghi F (2000) Antidepressant-like effects of the 1072 subtype-selective nicotinic acetylcholine receptor agonist, SIB-1508Y, in the learned
- 1073 helplessness rat model of depression. Psychopharmacology (Berl) 152:295–303.
- 1074 Fernández Macedo GV, Cladouchos ML, Sifonios L, Cassanelli PM, Wikinski S (2013) Effects of
- 1075 fluoxetine on CRF and CRF1 expression in rats exposed to the learned helplessness 1076 paradigm. Psychopharmacology (Berl) 225:647–659.
- 1077 Fingelkurts A a., Fingelkurts A a. (2014a) Altered Structure of Dynamic Electroencephalogram
- 1078 Oscillatory Pattern in Major Depression. Biol Psychiatry:1–11 Available at:
- 1079 http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006322314009950.
- 1080 Fingelkurts AA, Fingelkurts AA (2014b) Altered structure of dynamic electroencephalogram

1081 oscillatory pattern in major depression. Biol Psychiatry 77:1050–1060 Available at:
 1082 http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.12.011.

1083 Grahn RE, Will MJ, Hammack SE, Maswood S, McQueen MB, Watkins LR, Maier SF (1999)

1084Activation of serotonin-immunoreactive cells in the dorsal raphe nucleus in rats1085exposed to an uncontrollable stressor. Brain Res 826:35–43.

1086 Graeff FG, Guimarães FS. Fundamentos da Psicofarmacologia. 2. ed. São Paulo: Editora
1087 Atheneu, 2012.

Herry C, Mons N (2004) Resistance to extinction is associated with impaired immediate early
 gene induction in medial prefrontal cortex and amygdala. Eur J Neurosci 20:781–790.

1090 Hunziker MHL, Manfré FN, Yamada MT (2016) Reforçamento positivo da variabilidade e da

1091 repetição imuniza contra o desamparo aprendido. Rev Bras Anal Comport 2:53–66

1092 Available at: http://www.periodicos.ufpa.br/index.php/rebac/article/view/802.

1093 IBGE (2014) Pesquisa Nacional de Saúde 2013: percepção do estado de saúde, estilos de vida
 1094 e doenças crônicas. Available at:

1095 http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv91110.pdf.

1096 Iosifescu D V., Greenwald S, Devlin P, Mischoulon D, Denninger JW, Alpert JE, Fava M (2009)

1097 Frontal EEG predictors of treatment outcome in major depressive disorder. Eur

1098 Neuropsychopharmacol 19:772–777 Available at:

1099 http://dx.doi.org/10.1016/j.euroneuro.2009.06.001.

1100 Jaworska N, Yang X-R, Knott V, MacQueen G (2015) A review of fMRI studies during visual

1101 emotive processing in major depressive disorder. World J Biol Psychiatry 16:448–471

1102 Available at: http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/15622975.2014.885659.

1103 Karalis N, Dejean C, Chaudun F, Khoder S, Rozeske RR, Wurtz H, Bagur S, Benchenane K,

1104 Sirota A, Courtin J, Herry C (2016) 4-Hz oscillations synchronize prefrontal-amygdala

1105 circuits during fear behavior. Nat Neurosci 19:605–612 Available at:

1106 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26878674.

1107 Kennedy SH, Andersen HF, Lam RW (2006) Efficacy of escitalopram in the treatment of major

1108 depressive disorder compared with conventional selective serotonin reuptake inhibitors

and venlafaxine XR: a meta-analysis. J Psychiatry Neurosci 31:122–131 Available at:

1110 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16575428.

1111 Kirino E (2012) Escitalopram for the management of major depressive disorder: A review of

- its efficacy, safety, and patient acceptability. Patient Prefer Adherence 6:853–861.
- Klein DC, Fencil-morse E, Seligman MEP (1976) Learned Helplessness, Depression, and the
 Attribution of Failure. J Pers Soc Psychol 33:508–516.
- Klein DC, Seligman MEP (1976) Reversal of Performance Deficits and Perceptual Deficits in
 Learned Helplessness and Depression. J Abnorm Psychol 85:11–26.
- 1117 Knyazev GG (2007) Motivation, emotion, and their inhibitory control mirrored in brain
 1118 oscillations. Neurosci Biobehav Rev 31:377–395.
- Koo PC, Thome J, Berger C, Foley P, Hoeppner J (2017) Current source density analysis of
 resting state EEG in depression: a review. J Neural Transm 124:109–118.
- 1121 Kumar S, Hultman R, Hughes D, Michel N, Katz BM, Dzirasa K (2014) Prefrontal cortex
- 1122 reactivity underlies trait vulnerability to chronic social defeat stress. Nat Commun
- 1123 5:316–324 Available at: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ncomms5537.
- Lee T-W, Wu Y-T, Yu YW-Y, Chen M-C, Chen T-J (2011) The implication of functional
- 1125 connectivity strength in predicting treatment response of major depressive disorder: A
- 1126 resting EEG study. Psychiatry Res Neuroimaging 194:372–377 Available at:
- 1127 http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925492711000758.
- 1128 Lesting J, Narayanan RT, Kluge C, Sangha S, Seidenbecher T, Pape HC (2011) Patterns of
- coupled theta activity in amygdala-hippocampal-prefrontal cortical circuits during fearextinction. PLoS One 6.
- 1131 Leuchter AF, Cook IA, Hunter AM, Cai C, Horvath S (2012) Resting-state quantitative
- electroencephalography reveals increased neurophysiologic connectivity in depression.PLoS One 7.
- 1134Maier SF (2015) Behavioral control blunts reactions to contemporaneous and future adverse1135events: Medial prefrontal cortex plasticity and a corticostriatal network. Neurobiol
- 1136 Stress 1:12–22 Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.ynstr.2014.09.003.
- Maier SF, Anderson C, Lieberman DA (1972) Influence of control of shock on subsequent
 shock-elicited aggression. J Comp Physiol Psychol 81:94–100.
- 1139 Maier SF, Grahn RE, Kalman BA, Sutton LC, Wiertelak EP, Watkins LR (1993) The role of the
- 1140 amygdala and dorsal raphe nucleus in mediating the behavioral consequences of
- 1141 inescapable shock. Behav Neurosci 107:377–388 Available at:
- 1142 papers2://publication/uuid/EB2D919A-95FB-4468-BB2B-051C83BE93C5.

- 1143 Maier SF, Grahn RE, Watkins LR (1995) 8-OH-DPAT microinjected in the region of the dorsal
- 1144 raphe nucleus blocks and reverses the enhancement of fear conditioning and
- 1145 interference with escape produced by exposure to inescapable shock. Behav Neurosci1146 109:404–412.
- 1147 Maier SF, Kalman BA, Grahn RE (1994) Chlordiazepoxide microinjected into the region of the
- 1148 dorsal raphe nucleus eliminates the interference with escape responding produced by
- 1149 inescapable shock whether administered before inescapable shock or escape testing.
- 1150 Behav Neurosci 108:121–130 Available at:
- 1151 http://doi.apa.org/getdoi.cfm?doi=10.1037/0735-7044.108.1.121.
- Maier SF, Seligman MEP (2016a) Learned helplessness at fifty: Insights from neuroscience.
 Psychol Rev 123:349–367 Available at:
- 1154 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27337390.
- 1155 Maier SF, Seligman MEP (2016b) Learned helplessness at fifty: Insights from neuroscience.
- 1156Psychol Rev 123:349–367 Available at:
- 1157 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27337390.
- 1158 Maier SF, Silbert LH, Woodmansee WW, Desan PH (1990) Adinazolam both prevents and
- 1159 reverses the long-term reduction of daily activity produced by inescapable shock.
- 1160 Pharmacol Biochem Behav 36:767–773.
- 1161 Maier SF, Watkins LR (2005) Stressor controllability and learned helplessness: The roles of
- 1162 the dorsal raphe nucleus, serotonin, and corticotropin-releasing factor. Neurosci1163 Biobehav Rev 29:829–841.
- 1164 Malberg JE, Duman RS (2003) Cell proliferation in adult hippocampus is decreased by
- 1165 inescapable stress: Reversal by fluoxetine treatment. Neuropsychopharmacology1166 28:1562–1571.
- 1167 Marques DB (2016) Influência da controlabilidade sobre o estresse na atividade
- 1168 eletrofisiológica do córtex pré-frontal medial e hipocampo dorsal em ratos: possíveis
- 1169 indicadores de resiliência e desamparo aprendidos.
- 1170 Martin P, Puech AJ (1991) Is there a relationship between 5-HT1B receptors and the
- 1171 mechanisms of action of antidepressant drugs in the learned helplessness paradigm in
- 1172 rats? Eur J Pharmacol 192:193–196.
- 1173 Martin P, Soubrié P, Puech AJ (1990) Reversal of helpless behavior by serotonin uptake

- 1174 blockers in rats. Psychopharmacology (Berl) 101:403–407 Available at:
- 1175 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2362957.
- Massol J, Martin P, Puech AJ (1989) Antidepressant effects of tricyclic antidepressants and
 selective serotonin-uptake blockers in diabetic rats. Diabetes 38:1161–1164.
- McIntyre RS, O'Donovan C (2004) The Human Cost of Not Achieving Full Remission in
 Depression. Can J Psychiatry 49:10–16.
- Ménard C, Pfau ML, Hodes GE, Russo SJ (2016) Immune and Neuroendocrine Mechanisms of
 Stress Vulnerability and Resilience. :1–19.
- 1182 Miller WR, Seligman MEP (1976) LEARNED HELPLESSNESS , DEPRESSION AND THE
- 1183 PERCEPTION OF REINFORCEMENT *. Behav Res Ther 14:7–17.
- 1184 Narayanan V, Heiming RS, Jansen F, Lesting J, Sachser N, Pape HC, Seidenbecher T (2011)
- Social defeat: Impact on fear extinction and Amygdala-prefrontal cortical thetasynchrony in 5-HTT deficient mice. PLoS One 6.
- 1187 Noachtar S, Rémi J (2009) The role of EEG in epilepsy: A critical review. Epilepsy Behav
 1188 15:22–33 Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.yebeh.2009.02.035.
- 1189 Padilla-Coreano N, Bolkan SS, Pierce GM, Blackman DR, Hardin WD, Garcia-Garcia AL,
- 1190 Spellman TJ, Gordon JA (2016) Direct Ventral Hippocampal-Prefrontal Input Is Required
- 1191 for Anxiety-Related Neural Activity and Behavior. Neuron 89:857–866 Available at:
- 1192 http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2016.01.011.
- 1193 Padilla E, Shumake J, Barrett DW, Sheridan EC, Gonzalez-Lima F (2011) Mesolimbic effects of
- 1194 the antidepressant fluoxetine in Holtzman rats, a genetic strain with increased
- 1195 vulnerability to stress. Brain Res 1387:71–84 Available at:
- 1196 http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006899311004367.
- Price JL, Drevets WC (2012) Neural circuits underlying the pathophysiology of mood
 disorders. Trends Cogn Sci 16:61–71.
- 1199 Pryce CR, Azzinnari D, Spinelli S, Seifritz E, Tegethoff M, Meinlschmidt G (2011) Helplessness:
- 1200 A systematic translational review of theory and evidence for its relevance to
- 1201 understanding and treating depression. Pharmacol Ther 132:242–267.
- Rau V, Fanselow MS (2009) Exposure to a stressor produces a long lasting enhancement of
 fear learning in rats. Stress 12:125–133.
- 1204 Reinés A, Cereseto M, Ferrero A, Sifonios L, Podestá MF, Wikinski S (2008) Maintenance

- 1205 treatment with fluoxetine is necessary to sustain normal levels of synaptic markers in
- 1206 an experimental model of depression: Correlation with behavioral response.
- 1207 Neuropsychopharmacology 33:1896–1908.
- 1208 Robinson OJ, Overstreet C, Allen PS, Letkiewicz A, Vytal K, Pine DS, Grillon C (2013) The role
- 1209 of serotonin in the neurocircuitry of negative affective bias: Serotonergic modulation of
- 1210 the dorsal medial prefrontal-amygdala 'aversive amplification' circuit. Neuroimage
- 1211 78:217–223 Available at:
- 1212 http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1053811913003303.
- 1213 Rosenblau G, Sterzer P, Stoy M, Park S, Friedel E, Heinz A, Pilhatsch M, Bauer M, Ströhle A
- 1214 (2012) Functional neuroanatomy of emotion processing in major depressive disorder is
- 1215 altered after successful antidepressant therapy. J Psychopharmacol 26:1424–1433
- 1216 Available at: http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0269881112450779.
- Rossignoli MT (2018) Estudo da atividade eletrofisiológica córtico-amigdalar durante o
 modelo triádico do desamparo aprendido em ratos.
- 1219 Roy B, Wang Q, Dwivedi Y (2018) Long non-coding RNA-associated transcriptomic changes in
- 1220 resiliency or susceptibility to depression and response to antidepressant treatment. Int
- 1221 J Neuropsychopharmacol Available at: https://academic.oup.com/ijnp/advance-
- 1222 article/doi/10.1093/ijnp/pyy010/4829942.
- 1223 Sánchez C, Gruca P, Bien E, Papp M (2003) R-citalopram counteracts the effect of
- escitalopram in a rat conditioned fear stress model of anxiety. Pharmacol BiochemBehav 75:903–907.
- Sanchis-segura C, Spanagel R, Henn FA, Vollmayr B (2005) Reduced sensitivity to sucrose in
 rats bred for helplessness : a study using the matching law. Behav Pharmacol 16:267–
 270.
- 1229 Sanford LD, Yang L, Wellman LL, Liu X, Tang X (2010) Differential Effects of Controllable and
- 1230 Uncontrollable Footshock Stress on Sleep in Mice. Sleep 33:621–630 Available at:
- 1231 http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L358
- 1232 743065%0Ahttp://www.journalsleep.org/ViewAbstract.aspx?pid=27784 LK -
- 1233 http://sfx.library.uu.nl/utrecht?sid=EMBASE&issn=01618105&id=doi:&atitle=Differenti
- al+effects+of+controllab.
- 1235 Seligman ME, Maier SF (1967) Failure to escape traumatic shock. J Exp Psychol 47:1–9.

- Sherman AD, Sacquitne JL, Petty F (1982) Specificity of the Learned Helplessness Model of
 Depression. Pharmacol Biochem Behav 16:449–454.
- Short KR, Maier SF (1993) Stressor Controllability, Social Interaction, and Benzodiazepine
 Systems. Pharmacol Biochem Behav 45:827–835.
- 1240 Solomon DA, Keller MB, Leon AC, Mueller TI, Lavori PW, Shea MT, Coryell W, Warshaw M,
- 1241 Turvey C, Maser JD, Endicott J (2000) Multiple recurrences of major depressive
 1242 disorder. Am J Psychiatry 157:229–233.
- Strigo IA, Simmons AN, Matthews SC, Craig ADB, Paulus MP (2008) Association of major
 depressive disorder with altered functional brain response during anticipation and
- 1245 processing of heat pain. Arch Gen Psychiatry 65:1275–1284 Available at:
- 1246 http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2702160&tool=pmcentrez
 1247 & &rendertype=abstract.
- 1248 Strong P V., Christianson JP, Loughridge AB, Amat J, Maier SF, Fleshner M, Greenwood BN
- 1249 (2011) 5-hydroxytryptamine 2C receptors in the dorsal striatum mediate stress-induced
- 1250 interference with negatively reinforced instrumental escape behavior. Neuroscience
- 1251 197:132–144 Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.09.041.
- Tanti A, Belzung C (2010) Open questions in current models of antidepressant action. Br J
 Pharmacol 159:1187–1200.
- 1254 Tort ABL, Komorowski R, Eichenbaum H, Kopell N (2010) Measuring phase-amplitude
- 1255 coupling between neuronal oscillations of different frequencies. J Neurophysiol1256 104:1195–1210.
- 1257 Vai B, Bulgarelli C, Godlewska BR, Cowen PJ, Benedetti F, Harmer CJ (2016) Fronto-limbic
- 1258 effective connectivity as possible predictor of antidepressant response to SSRI
- administration. Eur Neuropsychopharmacol 26:2000–2010 Available at:
- 1260 http://dx.doi.org/10.1016/j.euroneuro.2016.09.640.
- 1261 Valentine G, Dow A, Banasr M, Pittman B, Duman R (2008) Differential effects of chronic
- 1262 antidepressant treatment on shuttle box escape deficits induced by uncontrollable
- 1263 stress. Psychopharmacology (Berl) 200:585–596 Available at:
- 1264 http://link.springer.com/10.1007/s00213-008-1239-z.
- 1265 Varela J a., Wang J, Christianson JP, Maier SF, Cooper DC (2012) Control over Stress, But Not
- 1266 Stress Per Se Increases Prefrontal Cortical Pyramidal Neuron Excitability. J Neurosci

1267 **32:12848–12853**.

- Vollmayr B, Gass P (2013) Learned helplessness: Unique features and translational value of a
 cognitive depression model. Cell Tissue Res 354:171–178.
- Wang M, Perova Z, Arenkiel BR, Li B (2014) Synaptic modifications in the medial prefrontal
 cortex in susceptibility and resilience to stress. J Neurosci 34:7485–7492 Available at:
 http://www.jneurosci.org/content/34/22/7485.
- 1273 Warden MR, Selimbeyoglu A, Mirzabekov JJ, Lo M, Thompson KR, Kim S-Y, Adhikari A, Tye
- 1274 KM, Frank LM, Deisseroth K (2012) A prefrontal cortex-brainstem neuronal projection
- that controls response to behavioural challenge. Nature 492:428–432 Available at:
 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23160494.
- 1277 Weiss JAYM, Goodman PA, Charry JM, Bailey WH, Losito G, Corrigan S (1981) BEHAVIORAL
- 1278 DEPRESSION PRODUCED BY AN UNCONTROLLABLE STRESSOR : RELATIONSHIP TO
- 1279 NOREPINEPHRINE , DOPAMINE , AND SEROTONIN LEVELS IN VARIOUS REGIONS OF RAT
- BRAIN Depression of active behavior has been reported to occur in animals following
 exposure to highl. 3:167–205.
- Williams JL, Maier SF (1977) Transituational immunization and therapy of learned
 helplessness in the rat. J Exp Psychol Anim Behav Process 3:240–252.
- 1284 World Health Organization (2017) World Health Organization Report Depression and Other
- 1285 Common Mental Disorders: Global Health Estimates. World Heal Organ:1–24 Available
- 1286 at: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254610/WHO-MSD-MER-2017.2-
- 1287 eng.pdf;jsessionid=4FF29DAD6B4F47CAD1E699440E15D059?sequence=1%0Ahttp://ap
- 1288 ps.who.int/iris/bitstream/10665/254610/1/WHO-MSD-MER-2017.2-eng.pdf.