

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE PSICOLOGIA**

**FERNANDA AUGUSTINI PEZZATO**

**Efeitos comportamentais da lesão eletrolítica da  
região do núcleo mediano da rafe como modelo  
experimental de mania no rato e no camundongo**

São Paulo  
2014

**FERNANDA AUGUSTINI PEZZATO**

**Efeitos comportamentais da lesão eletrolítica da região do núcleo mediano da rafe como modelo experimental de mania no rato e no camundongo**

**(Versão corrigida)**

Tese apresentada ao Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Psicologia.

Área de concentração: Psicologia Experimental.

Orientadora: Profa. Dra. Miriam Garcia Mijares

Co-orientador: Prof. Titular Katsumasa Hoshino

São Paulo  
2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na publicação  
Biblioteca Dante Moreira Leite  
Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo

Pezzato, Fernanda Augustini .

Efeitos comportamentais da lesão eletrolítica da região do núcleo mediano da rafe como modelo experimental de mania no rato e no camundongo / Fernanda Augustini Pezzato; orientadora Miriam Garcia Mijares. -- São Paulo, 2014.

148 f.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Psicologia. Área de Concentração: Psicologia Experimental) – Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

1. Núcleo mediano da rafe 2. Lesão eletrolítica 3. Modelos animais 4. Mania I. Título.

BF181

Nome: Pezzato, Fernanda Augustini

Título: Efeitos comportamentais da lesão eletrolítica da região do núcleo mediano da rafe como modelo experimental de mania no rato e no camundongo

Tese apresentada ao Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Psicologia

Aprovado em:

Banca Examinadora:

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_

**Instituição:** \_\_\_\_\_ **Assinatura:** \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_

**Instituição:** \_\_\_\_\_ **Assinatura:** \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_

**Instituição:** \_\_\_\_\_ **Assinatura:** \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_

**Instituição:** \_\_\_\_\_ **Assinatura:** \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_

**Instituição:** \_\_\_\_\_ **Assinatura:** \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_

**Instituição:** \_\_\_\_\_ **Assinatura:** \_\_\_\_\_

Ao querido professor, mestre e amigo Katsumasa Hoshino.  
Pelo incentivo, apoio, dedicação e entusiasmo que tornaram este trabalho  
possível e estimulante.

“O segredo da genialidade é conservar o espírito de criança até a velhice, o que  
significa nunca perder o entusiasmo.”

Aldous Huxley

## AGRADECIMENTOS

Tive o grande privilégio de encontrar muitas pessoas admiráveis e cooperativas ao longo do processo de formação chamado Doutorado. É difícil encontrar palavras para agradecer, já que não é possível descrever ou mensurar tudo o que me ensinaram tecnicamente e principalmente pelos exemplos de dedicação à ciência e de valores humanos.

Inicialmente agradeço muito ao Katsumasa Hoshino. Obrigada pela iniciação científica permeada por entusiasmadas hipóteses e experimentos. Não tenho dúvidas do quanto estas experiências iniciais permaneceram no meu prazer atual em fazer ciência. Obrigada pelos tantos conhecimentos, exemplos e *feedbacks* que construíam meu repertório profissional. Obrigada pelo grande incentivo em relação ao doutorado e à carreira acadêmica! E mais uma vez obrigada pelo apoio constante, preocupação, carinho, amizade e pelo grande exemplo como cientista.

Miriam, agradeço muito pela confiança inicial e por todo o apoio ao longo destes anos. Mais que uma orientadora científica, você teve um papel fundamental ao compreender minhas dúvidas, angústias, ansiedades e principalmente ao incentivar meu percurso de forma tão carinhosa. Nunca vou me esquecer das nossas conversas terapêuticas e do seu exemplo como pesquisadora crítica, competente e sensível às contingências.

Ao Professor José de Anchieta de Castro e Horta Júnior agradeço imensamente pela recepção, treinamento técnico, pelo grande exemplo de cuidado metodológico e especialmente pela demonstração de ética profissional. Obrigada também pela paciência em ensinar uma psicóloga a manusear uma pipeta, ordenar cortes histológicos, termos técnicos da anatomia, etc. Você não imagina quão assustadores foram os momentos iniciais, mas como o processo de aprendizagem foi se tornando possível e agradável pela convivência diária com você e seus alunos. Obrigada também pela qualidade de tudo o que aprendi com vocês. Não tenho dúvidas quanto ao alto padrão do seu laboratório e de toda a sua equipe!

I also have to thank the professor Todd D. Gould for being so enthusiastic and welcoming since the first e-mail. Thanks for receiving me as part of your team and providing all the conditions for the development of an important part of my thesis in your laboratory. I also would like to thank you for being always very careful and meticulous with the experimental design, data collection, analysis and report. During all the time you were very available for monitoring every detail of my work and discussing all the questions that emerged with lots of patience and professionalism.

À querida Monica Andersen, agradeço por me receber tão bem em seu laboratório desde a iniciação científica. Obrigada pelas oportunidades de aprendizagem, pelo modelo de dedicação e qualidade de toda a sua equipe. Obrigada também pelo carinho, pelo encontro em Baltimore, pelos livros doados à biblioteca e pelo grande exemplo profissional.

Aos professores da Unesp/Bauru: Kester Carrara, Maria Regina Cavalcante, Tuga, Alessandra Lopes, Ana Verdu, Alessandra Silva, Jair Lopes Jr, José Roberto Bosqueiro. Obrigada pela confiança nas aprovações dos diversos concursos para professora substituta, pelo incentivo e pela fundamental colaboração para viabilidade de parte desta pesquisa realizada no Campus da Unesp em Bauru. Agradeço também aos funcionários do Departamento de Psicologia desta universidade Berenice, Keila, Maria e Guilherme – pela torcida e pela fundamental e competente ajuda no provimento de condições práticas de trabalho. Agradeço ainda a todos que foram meus alunos, pela ótima recepção, pela relação construída, pelos *feedbacks* e por tudo o que me ensinaram. Em especial agradeço aos alunos que participaram das atividades de pesquisa no laboratório, contribuindo diretamente com esta tese: Diego, Stephanie, Natália, Celina, Drielly, André, Cláudia, Bruna e Nyanne.

Agradeço aos meus colegas da USP Fernanda Galesi, Ana Torres, Victor Mangabeira e Rachel Ripardo. Vocês foram fundamentais para que eu me sentisse “em casa”, me ajudaram com as burocracias, me incentivaram e tornaram muito mais agradáveis minhas idas à São Paulo.

Obrigada à equipe da Monica, tão presentes durante meu período na Unifesp: Tati, Camila, Fran, Paulinha, Marina, Flávia, Vanessa, Gabriel, Dunga e Gabriela. Vocês me ensinaram muito e foram muito queridos. Agradeço também pela amizade, pelos momentos de lazer e pelo exemplo de dedicação. Admiro muito cada um de vocês.

Agradeço também, e muito, os alunos do prof. Anchieta da Unesp Botucatu: Nicole, André, Marina, Carla e Rian. Como já mencionei, vocês me ensinaram muito e tornaram a rotina de laboratório muito agradável. Obrigada pela paciência e pela competência! Obrigada também pelos cafés, pelas bolachinhas demoníacas e principalmente pelas muitas risadas.

Mariana e Giovana, vocês foram minha família nos Estados Unidos e com certeza se tornaram eternas e inesquecíveis grandes amigas. Não consigo imaginar os meses de EUA sem todo o carinho, os desabafos, os passeios e as cervejas/vinhos. Mari, obrigada por ser tão familiar desde o primeiro fim de semana, pelo *spray* de pimenta, por me levar tomar vacina, por me esperar para ir ao zoológico e pela viagem à Philadelphia, por nos defender dos perigos, confiar segredos, pela festa de despedida, e por ser sempre tão simpática e alegre! Foi muito triste me despedir, mas com certeza teremos muitos outros encontros. Gi, nossa

identificação foi instantânea! Você foi muito importante e continua sendo muito especial. Obrigada pela companhia incondicional, pelas marmitas divididas, pelos almoços nos fins de semana em que eu trabalhava, pelas descobertas partilhadas, saudades desabafadas, por vibrar pelas minhas conquistas como se fossem suas, enfim... por ser tão amiga!

I am grateful for everybody from Gould's Lab: Chantelle Terrilion, Fiori Vollrath-Smith, Robert Smith, Adem Can, Michal Arad and Shambu Bhat for being so welcoming and for all contributions for my research and personal adaptation. Special thanks to Chantelle and Fiori for being so sweet, for every nice lunch we had together, for the dinner in D.C. and all that you taught me about English and the American culture. Bobby thanks for helping me with simple things that were scaring (like talking on the phone in English), for being so funny and for my birthday lunch. Adem thanks for picking me up at the airport, for introducing a little bit of Baltimore and for helping me in the lab. Michal thanks for everything you taught me, for the advices and for being so nice in my farewell party. I also want to thank Leo Tonelli, Sarah, Doug Frost and Malcom for all the relevant cooperation.

Aos meus pais e minha irmã (Vado, Cida e Amanda), agradeço pelo amor incondicional, por torcerem e vibrarem com cada conquista e pelo apoio nos momentos difíceis! Obrigada por cuidarem tão bem da Trufa e proporcionarem todas as condições físicas e emocionais para que eu me desenvolvesse pessoal e profissionalmente. Pai, obrigada por cada carona à rodoviária, pelos beijos antes de dormir, pelos conselhos, pelo carinho imenso e por ser meu maior e constante exemplo a ser seguido. Mãe, obrigada pelo maior amor do mundo, pelo exemplo de mulher forte e pela felicidade quando estou por perto. Me sinto muito querida e admirada e levo esse sentimento por toda a vida! Bá, obrigada por ser minha primeira e melhor amiga, por cuidar de mim e querer tanto o meu bem! Amo muito vocês!

Ao meu eterno amor Rodrigo Scarpari Carraro por ter me ajudado de tantas formas nestes últimos anos! Pela colaboração no laboratório, por passar a madrugada alinhando meus gráficos, por me esperar com jantares deliciosos quando eu dava aula a noite, por entender que eu vivia sem fins de semana, pelo apoio imprescindível e incondicional enquanto eu estava longe, pela admiração permanente, pelo carinho e respeito imensos, pelas conversas infundáveis e teorias sobre tudo, por ouvir a leitura desta tese. Enfim, por ter me mostrado um amor raro, enorme, muito especial e imperdível! Você torna minha vida muito melhor.

Agradeço ainda aos meus amigos e parceiros profissionais Alessandra Salina Brandão, Natália Orti e Florêncio M. Costa Jr pelo que aprendi com vocês no projeto de extensão na Unesp, nas JACs e em todos os momentos de debates de ideias. Obrigada também por todo



carinho e amizade que considero tanto. Admiro muito vocês e tenho grande orgulho de fazer parte da nossa equipe.

Laiza, obrigada pela companhia, conversas e amizade. Obrigada pela atenção quando eu passava os dias sozinha no laboratório mas te encontrava a noite alegre e cheia de novidades no apartamento em que morávamos!

Por fim agradeço as amigas sempre especiais Josiane Campos e Paula Lima. A relação com vocês é sem dúvida um grande presente. Agradeço a vocês não apenas pelo apoio e torcida nestes anos de doutorado, mas pelo grande carinho que permite que eu afirme que vocês sempre estiveram e estarão ao meu lado.

Obrigada ao CNPq e à Capes pelo apoio financeiro que permitiu a realização desta pesquisa e meu desenvolvimento como cientista.

## RESUMO

Pezzato, F.A. (2014). Efeitos comportamentais da lesão eletrolítica da região do núcleo mediano da rafe como modelo experimental de mania no rato e no camundongo. Tese de Doutorado, Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Déficits na regulação serotoninérgica dos circuitos catecolaminérgicos tem sido propostos como um mecanismo relacionado à etiologia dos transtornos de humor. Projeções do núcleo mediano da rafe (MnR) modulam a atividade dopaminérgica no prosencéfalo e são também parte de um sistema de inibição/desinibição comportamental que se assemelha às variações nos níveis de atividade apresentados durante os polos do transtorno bipolar. O objetivo do presente estudo foi avaliar se as alterações comportamentais induzidas pela inativação do MnR podem ser um modelo animal para estudo da mania humana. No Capítulo I, o procedimento de lesão eletrolítica do MnR foi realizado em ratos *Wistar* machos, tendo como controles os grupos lesão fictícia e intacto. Os resultados confirmaram a capacidade desta manipulação experimental em reproduzir hiperatividade e estereotipia crônicas, aumento na frequência de respostas positivamente reforçadas por solução de sacarose e padrão comportamental de dominância social. Ainda, foi demonstrada a potencialidade do tratamento crônico com lítio em reduzir a hiperatividade. No Capítulo II foram realizadas lesões eletrolíticas do MnR em camundongos C57BL/6J machos, tendo novamente como controles os grupos lesão fictícia e intacto. Os resultados demonstraram desenvolvimento de hiperatividade, estereotipia e maior frequência de exposição a situações aversivas/“de risco” nos testes do labirinto em cruz elevado e do claro/escuro. O tratamento crônico com lítio atenuou ou reverteu parte destas alterações comportamentais. Análises do tecido encefálico demonstraram níveis terapêuticos equivalentes de LiCl em todos os grupos submetidos ao tratamento e a histologia confirmou o sítio de lesão. O conjunto dos dados obtidos sugere a adequação do modelo proposto pelo atendimento aos critérios de validade de face e preditiva – apresentando como vantagens a mimetização de diversos sintomas do transtorno e a cronicidade destes. Ainda, a reprodutibilidade dos efeitos da lesão em diferentes espécies sugere a existência de homologia evolutiva, acrescentando fundamentos à validade de constructo hipotetizada. Por fim, destaca-se que este modelo de mania parece ser heurístico pela possibilidade de contribuir para a investigação dos mecanismos de ação do lítio e para a compreensão das relações de oposição entre os sistemas neurotransmissores excitatórios e inibitórios como parte da neurobiologia dos transtornos de humor.

**Palavras-chave:** núcleo mediano da rafe, lesão eletrolítica, modelos animais, mania.

## ABSTRACT

Pezzato, F.A. (2014). Behavioral effects of the electrolytic lesion in the region of the median raphe nucleus as an experimental model of mania in the rat and in the mouse. Tese de Doutorado, Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Deficits in serotonergic regulation of catecholaminergic circuits have been proposed as a mechanism related to the etiology of mood disorders. Projections from the median raphe nucleus (MnR) modulate the dopaminergic activity in the forebrain and are also part of a behavioral disinhibition/inhibition system that resembles the variations in activity levels shown during the poles of bipolar disorder. The aim of the present study was to evaluate if the behavioral effects induced by the inactivation of the MnR can be considered an animal model for studying the human mania. In Chapter I, the MnR electrolytic lesion was performed in male *Wistar* rats, having as control groups sham operated and intact animals. The results confirmed the capacity of this experimental manipulation to reproduce chronic hyperactivity and stereotypy, increased response frequency positively reinforced by sucrose solution and a social dominant behavioral pattern. Furthermore, it was shown the potentiality of the lithium treatment in reducing the hyperactivity. In Chapter II MnR electrolytic lesions were performed in C57BL/6J mice, having as control groups sham operated and intact animals. The results demonstrated the development of hyperactivity, stereotypy and increased frequency of exposure to aversive situations/"risk taking" in the elevated plus maze and light/dark box tests. Chronic treatment with lithium attenuated or reversed some of these behavioral alterations. Encephalic tissue analysis showed equivalent lithium therapeutic levels in all treated groups and the histology confirmed the lesion site. The set of data obtained suggests the suitability of the proposed model for attending criteria for face and predictive validities – presenting advantages such as the mimicking of several disorder symptoms and the chronicity of them. Also, the reproducibility of the effects of the lesion in different species suggests the existence of evolutionary homology and adds basis to the construct validity hypothesized. Finally, it is emphasized that this model of mania seems to be heuristic by the possibility to contribute to the investigation of lithium mechanisms of action and for understanding the opposite relations between excitatory and inhibitory neurotransmitter systems as part of the neurobiology of mood disorders.

**Keywords:** median raphe nucleus, electrolytic lesion, animal models, mania.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Aferências para o núcleo mediano da rafe (MnR), com base na revisão de literatura e dados experimentais de Behzadi et al. (1990).....	25
<b>Figura 2.</b> Projeções eferentes do núcleo mediano da rafe (MnR), baseado em dados de Vertes, Fortin e Crane (1999).....	26
<b>Figura 3.</b> Equipamentos utilizados para realização das cirurgias para lesão eletrolítica do MnR.....	40
<b>Figura 4.</b> Representação da plataforma <i>Endless Maze</i> .....	43
<b>Figura 5.</b> Equipamento utilizado para mensuração automatizada da atividade locomotora.....	43
<b>Figura 6.</b> Fotografias de um animal sendo submetido ao teste do <i>Endless Maze</i> .....	44
<b>Figura 7.</b> Atividade locomotora de ratos no <i>Endless Maze</i> .....	46
<b>Figura 8.</b> <i>Head dipping</i> de ratos no <i>Endless Maze</i> .....	47
<b>Figura 9.</b> Atividade locomotora na Caixa de Atividade Automatizada.....	48
<b>Figura 10.</b> Correlação entre as medidas de atividade locomotora.....	49
<b>Figura 11.</b> Alterações na atividade locomotora induzidas por diferentes procedimentos de lesão do MnR em ratos, extraída de Asin e Fibiger (1983).....	51
<b>Figura 12.</b> Efeito do lítio sobre a atividade locomotora de ratos submetidos à lesão do MnR.....	55
<b>Figura 13.</b> Equipamento utilizado para as medidas comportamentais no Experimento 3.....	61
<b>Figura 14.</b> Taxa de respostas nas barra ativa em Razão Fixa (FR2) e inativa ao longo dos dias.....	63
<b>Figura 15.</b> Média das taxas de respostas nas barra ativa em Razão Fixa (FR2) e inativa.....	64
<b>Figura 16.</b> <i>Break Points</i> em Razão Progressiva em dias consecutivos e médias dos valores dos <i>Break Points</i> obtidos nos três dias de teste .....	64
<b>Figura 17.</b> Acompanhamento do peso dos animais dos grupos intacto (I), lesão fictícia (LF) e lesão real do MnR (LR) no decorrer das sessões operantes realizadas no experimento III.....	65
<b>Figura 18.</b> Exemplificação das condições ambientais dispostas no teste do Intruso/Residente e de algumas das categorias analisadas.....	71

<b>Figura 19.</b> Categorias comportamentais de interação social como residente.....	71
<b>Figura 20.</b> Categorias comportamentais de interação social como intruso.....	73
<b>Figura 21.</b> Mapeamento da lesão eletrolítica na região do núcleo mediano da rafe.....	81
<b>Figura 22.</b> Diagrama da distribuição rostrocaudal das lesões eletrolíticas nos ratos.....	82
<b>Figura 23:</b> Fotografia do modelo de aparelho estereotáxico e dos acessórios utilizados para realização das cirurgias .....	87
<b>Figura 24.</b> Fotografias do lesionador manufaturado para realização das lesões eletrolíticas.....	88
<b>Figura 25.</b> Linha do tempo representativa da ordem e espaçamento temporal dos procedimentos cirúrgicos, tratamentos e testes comportamentais.....	90
<b>Figura 26.</b> Exemplificação do equipamento e <i>software</i> de análise de vídeos utilizados no teste do Campo Aberto.....	91
<b>Figura 27.</b> Exemplificação do equipamento e software de análise de vídeos utilizados no teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) .....	93
<b>Figura 28.</b> Exemplificação dos equipamentos utilizados no teste do Claro/Escuro.....	94
<b>Figura 29.</b> Exemplificação do procedimento de mensuração da área da lesão pelo <i>software</i> ImageJ.....	97
<b>Figura 30.</b> Efeito do lítio sobre a atividade locomotora de camundongos submetidos a lesão eletrolítica do MnR.....	99
<b>Figura 31.</b> Efeito da lesão do MnR e do tratamento crônico com lítio sobre o desempenho de camundongos no teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE).....	100
<b>Figura 32.</b> Efeito da lesão do MnR e do tratamento crônico com lítio sobre o desempenho no teste da caixa Claro/Escuro.....	102
<b>Figura 33.</b> Efeito do tratamento crônico com lítio sobre a preferência pela solução de sacarina.....	103
<b>Figura 34.</b> Concentração média ( $\pm$ EPM) de lítio (mmol/kg) obtida na análise do tecido encefálico extraído dos animais dos diferentes grupos (LR, LF e I) tratados com ração controle ou com acréscimo de LiCl.....	103
<b>Figura 35.</b> Diagrama da distribuição rostrocaudal das lesões eletrolíticas nos camundongos.....	104
<b>Figura 36.</b> Mapeamento da lesão eletrolítica na região do núcleo mediano da rafe.....	105

<b>Figura 37.</b> Área média ( $\pm$ EPM) da gliose indicativa de destruição do tecido encefálico dos animais submetidos à lesão eletrolítica do MnR tratados com ração controle e com LiCl.....	106
<b>Figura 38.</b> Diagrama de Venn sobre a distinção e intersecção de alterações de comportamentos em modelos animais para esquizofrenia, mania e TDAH, adaptado da publicação de Yen et al. (2013).....	118

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Designação anatômica dos grupos de células serotoninérgicas nos núcleos da rafe e na formação reticular do tronco encefálico e sua correspondente classificação “B” de acordo com Dahlstron e Fuxe (1964) – adaptado de Tork (1990).....	23
<b>Tabela 2.</b> Síntese dos de comportamentos esperados para atribuição de validade de face em modelos animais do transtorno maníaco (Einat, 2006; Lyon, 1991) e descrições de pesquisas que avaliaram a ocorrência de manifestações correspondentes em animais submetidos à inativação do MnR.....	31
<b>Tabela 3.</b> Definição das categorias comportamentais quantificadas no <i>Endless Maze</i> ....	44
<b>Tabela 4.</b> Parâmetros adicionais avaliados no teste da Caixa de Atividade Automatizada.....	49
<b>Tabela 5.</b> Definição das categorias comportamentais utilizadas no teste do Intruso/Residente.....	70
<b>Tabela 6.</b> Definições das categorias utilizadas para análise etológica no teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE).....	93
<b>Tabela 7.</b> Composição final dos grupos experimentais considerada nas análises comportamentais, morfométricas e dos níveis de LiCl.....	98
<b>Tabela 8.</b> Frequência de respostas emitidas pelos camundongos das diferentes combinações entre grupos e tratamentos no teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE).....	101

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<i>Contexto e gênese da hipótese.....</i>	17
<i>Transtorno bipolar (TB).....</i>	18
<i>Modelos animais de psicopatologias.....</i>	20
<i>Modelos animais do transtorno bipolar – episódio maníaco.....</i>	21
<i>O Núcleo Mediano da Rafe (MnR): aspectos anatômicos, morfológicos e neurofisiológicos.....</i>	23
<i>O Núcleo Mediano da Rafe (MnR): aspectos funcionais.....</i>	27
<i>A resistência ao estresse crônico mediada pela via MnR-hipocampal e o desenvolvimento dos transtornos de humor.....</i>	29
<i>A inativação do MnR como modelo animal de mania.....</i>	30
<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>34</b>
<b>OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>37</b>
<b>CAPÍTULO I .....</b>	<b>38</b>
<b>AVALIAÇÃO DOS EFEITOS COMPORTAMENTAIS DA LESÃO ELETROLÍTICA DA REGIÃO DO NÚCLEO MEDIANO DA RAFE COMO MANIFESTAÇÕES MANÍACAS EM RATOS</b>	
<b>MÉTODOS GERAIS.....</b>	<b>39</b>
<b>EXPERIMENTO 1</b>	
AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE HIPERATIVIDADE LOCOMOTORA E ESTEREOTIPIA DECORRENTES DA LESÃO ELETROLÍTICA DA REGIÃO DO MnR EM RATOS.....	42
<b>OBJETIVO ESPECÍFICO.....</b>	<b>42</b>
<b>MÉTODO.....</b>	<b>42</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>46</b>
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>50</b>
<b>EXPERIMENTO 2</b>	
EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM LÍTIO SOBRE A HIPERATIVIDADE LOCOMOTORA INDUZIDA PELA LESÃO ELETROLÍTICA DA REGIÃO DO MnR.....	53
<b>OBJETIVO ESPECÍFICO.....</b>	<b>53</b>
<b>MÉTODO.....</b>	<b>53</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>55</b>
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>57</b>
<b>EXPERIMENTO 3</b>	
AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL DOS EFEITOS DA LESÃO ELETROLÍTICA DA REGIÃO DO MnR SOBRE O VALOR REFORÇADOR DOS ESTÍMULOS.....	60
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>60</b>



<b>MÉTODO.....</b>	<b>60</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>63</b>
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>66</b>
<b>EXPERIMENTO 4</b>	
<b>AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA LESÃO ELETROLÍTICA DA REGIÃO DO MnR SOBRE COMPORTAMENTOS DE DOMINÂNCIA E SUBMISSÃO EM RATOS.....</b>	<b>69</b>
<b>OBJETIVO ESPECÍFICO.....</b>	<b>69</b>
<b>MÉTODO.....</b>	<b>69</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>72</b>
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>74</b>
<b>ANÁLISE HISTOLÓGICA.....</b>	<b>77</b>
<b>OBJETIVO ESPECÍFICO.....</b>	<b>77</b>
<b>MÉTODO.....</b>	<b>77</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>80</b>
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>83</b>
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>85</b>
<b>EFEITO DO LÍTIO SOBRE A DESINIBIÇÃO COMPORTAMENTAL INDUZIDA PELA LESÃO ELETROLÍTICA DA REGIÃO DO NÚCLEO MEDIANO DA RAFE EM CAMUNDONGOS</b>	
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>86</b>
<b>MÉTODO.....</b>	<b>86</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>98</b>
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>107</b>
<b>DISCUSSÃO GERAL.....</b>	<b>116</b>
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>121</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>122</b>
<b>Apêndice A. Comparação individualizada da frequência de respostas de exposição abdome ao oponente obtida na condição de residente no Experimento 3.....</b>	<b>140</b>
<b>Apêndice B. Tabela descritiva das coordenadas de localização, extensão e estruturas abrangidas pelas lesões eletrolíticas histologicamente avaliadas no Capítulo I.....</b>	<b>141</b>
<b>Apêndice C. Revisão de fotos e representações sobre a extensão de lesões eletrolíticas no MnR em ratos.....</b>	<b>143</b>
<b>Apêndice D. Tabela descritiva das coordenadas de localização, extensão e estruturas parcialmente abrangidas pelas lesões eletrolíticas histologicamente avaliadas no Capítulo II.....</b>	<b>145</b>

<b>Anexo A.</b> Documento de aprovação dos procedimentos utilizados no Capítulo I pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Universidade Estadual Paulista (Unesp/Bauru).....	<b>147</b>
<b>Anexo B.</b> Documento de inclusão do procedimento de lesão eletrolítica do MnR em camundongos no protocolo experimental aprovado pela IACUC (Institutional Animal Care and Use Committee) da University of Maryland School of Medicine/Baltimore.....	<b>148</b>

## INTRODUÇÃO

### *Contexto e gênese da hipótese*

Diversas pesquisas realizadas nos últimos anos no Laboratório de Neurobiologia da UNESP/Bauru por Hoshino e colaboradores (Hoshino & Sugizaki, 1986; Hoshino, Uga, & de Paula, 2004; Pezzato, de Paula, Bosqueiro, & Hoshino, 2003; Pezzato & Hoshino, 2004, 2005) exploraram os efeitos da lesão eletrolítica do núcleo mediano da rafe (MnR). Inicialmente as pesquisas foram focadas na hiperatividade locomotora e nos comportamentos estereotipados e repetitivos de conferência e limpeza desencadeados pela lesão, sendo aventados como manifestações compulsivas presentes em quadros de ansiedade (Hoshino et al., 2004). Entretanto, observações de que tais comportamentos aumentavam de frequência em situações aversivas incondicionadas como a plataforma elevada, mas que também ocorriam espontaneamente acima da média observada nos animais controles em condições normais nas gaiolas-viveiro incitaram novas investigações. Como consequência, outras pesquisas no mesmo laboratório demonstraram que ratos submetidos à lesão eletrolítica da região do MnR não desenvolvem anedonia no decorrer da privação de sono (Pezzato et al., 2003), ingerem altas quantidades de solução de sacarose comparativamente aos controles com lesão fictícia em condições basais (Pezzato et al., 2003) e emitem maior frequência de respostas de pressão à barra para obter acesso à solução açucarada (Pezzato & Hoshino, 2004).

Estes resultados, somados aos dados descritos em diversas publicações feitas por diferentes grupos de pesquisa nos últimos 40 anos sobre os efeitos da lesão do MnR em animais de laboratório (Albinsson, Andersson, Andersson, Vega-Matuszczyk, & Larsson, 1996; Andrade, 1997; Andrade & Graeff, 2001; Arpa & De Andres, 1993; Asin, Wirtshafter, & Fibiger, 1985; Asin, Wirtshafter, & Kent, 1979a, 1980; File, Hyde, & MacLeod, 1979; Jacobs, Wise, & Taylor, 1974; Kostowski, Giacalone, Garattini, & Valzelli, 1968; Le, Harding, Juzysch, Fletcher, & Shaham, 2002; Wirtshafter & Asin, 1983; Wogar, Bradshaw, & Szabadi, 1991) permitiram identificar inúmeras semelhanças entre o quadro comportamental induzido pela lesão do MnR e o conjunto de comportamentos esperados para atribuição de validade de face em modelos animais do episódio maníaco do transtorno bipolar (Einat, 2006; Lyon, 1991). A avaliação da literatura especializada mostra, como veremos a seguir, que existem vários dados que dão embasamento à hipótese do envolvimento do núcleo mediano da rafe na neurofisiologia da mania e justificam a proposição do objetivo do presente trabalho.

### *Transtorno bipolar (TB)*

O transtorno bipolar (TB) é classificado como um transtorno de humor caracterizado por episódios de depressão maior, mania, hipomania ou misto, separados por períodos de eutímia (humor normal) (Kaplan, Sadock, & Grebb, 1997). O Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-IV) subdivide o TB em duas manifestações: Tipo I – oscilações entre episódios maníacos e depressivos ou apenas por episódios maníacos e Tipo II – oscilações entre episódios depressivos maiores e episódios de hipomania (American Psychiatric Association [APA], 1994). Os episódios depressivos envolvem sintomas de perda de energia e interesse, sentimentos de culpa, dificuldades de concentração, perda de apetite e pensamentos sobre morte e suicídio; enquanto os episódios maníacos envolvem expansividade, fuga de idéias, sono diminuído, autoestima elevada e idéias grandiosas. A hipomania é definida como episódios de sintomas maníacos que não reúnem todos os critérios diagnósticos para mania devido à menor intensidade dos sintomas ou período limitado de incidência (Kaplan et al., 1997).

A Organização Mundial da Saúde considera o TB como a sexta doença mais incapacitante, sendo a terceira entre as doenças mentais – atrás apenas da depressão unipolar e da esquizofrenia (Murray & Lopez, 1997). Acreditava-se que o TB atingia pouco mais de 1% da população geral, entretanto reavaliações mais recentes têm promovido evidências de uma prevalência superior a 5% se incluídos todos os níveis de mania envolvidos no espectro (Akiskal et al., 2000; Judd & Akiskal, 2003). Índices similares parecem ocorrer na população brasileira, já que uma reanálise de dados do Estudo de Área de Captação Epidemiológica de São Paulo sugere que a prevalência do TB atinge níveis superiores a 8% se incluídos os níveis subsindrômico e de sintomas maníacos do espectro (Moreno & Andrade, 2005). De acordo com revisão realizada por Costa (2008), além do impacto significativo na qualidade de vida dos pacientes, o TB causa grande ônus para a sociedade em geral. O alto custo da doença deve-se ao fato de o TB estar frequentemente associado a comorbidades psiquiátricas e físicas, ao alto risco de suicídio, aos prejuízos sociais e profissionais e ao baixo índice de adesão ao tratamento (Costa, 2008; Scott & Pope, 2002)

O substrato biológico do TB ainda permanece pouco esclarecido, apesar da grande quantidade e diversidade de esforços empreendidos. Pesquisas recentes vêm descrevendo o envolvimento de fatores neurobiológicos estruturais, intracelulares e intercelulares na fisiopatologia do TB – entretanto ainda sabe-se pouco sobre as associações entre tais achados e as alterações comportamentais e neurovegetativas (Kapczinski, Frey, & Zannatto, 2004; Machado-Vieira, Bressan, Frey, & Costa, 2005; Schloesser, Martinowich, & Manji, 2012).

Estes fatores envolvem reduções volumétricas na amígdala e hipocampo, alterações em sistemas de segundo-mensageiros, em vias de transcrição de sinal, na regulação da expressão gênica e na neurotransmissão de aminas biogênicas – em especial serotonina e noradrenalina (Kapczinski et al., 2004; Machado-Vieira et al., 2005; Schloesser et al., 2012; Young, Warsh, Kish, Shannak & Hornykeiwicz, 1994). Destaca-se também a proposição de que déficits na regulação serotoninérgica de circuitos catecolaminérgicos seriam um possível mecanismo relacionado à etiologia dos transtornos de humor (Di Giovanni, Di Matteo, Pierucci, & Esposito, 2008; Prange, Wilson, Lynn, Alltop, & Stikeleather, 1974). Esta proposição é consistente com achados clínicos de alterações volumétricas e funcionais dos neurônios da rafe em pacientes acometidos pelo transtorno bipolar (Matthews & Harrison, 2012; Sullivan et al., 2009).

No que se refere aos tratamentos farmacológicos disponíveis, o medicamento de primeira escolha para o tratamento do TB é o estabilizador de humor carbonato de lítio (APA, 1994; World Health Organization [WHO], 2009). O lítio é capaz de reduzir sintomas maníacos, bem como prevenir ciclagens entre mania e depressão (Lyon, 1991; Muller-Oerlinghausen, Berghofer, & Bauer, 2002). Apesar de ser extensivamente utilizado na clínica, questões significativas acerca de seu mecanismo de ação permanecem incompreendidas. De acordo com a revisão de Schloesser, Martinowich & Manji (2011), o lítio exerce efeito sobre muitos sistemas de neurotransmissores possivelmente por meio de interferência nas bombas de sódio e potássio presentes nas membranas celulares – dentre eles os sistemas monoaminérgico (serotoninérgico, dopaminérgico e noradrenérgico), colinérgico e gabaérgico. O lítio exerce também efeito potencializador da transmissão sináptica em neurônios hipocámpais da região CA1 – o que envolveria receptores glutamatérgicos. Os autores apontam ainda a ação do lítio sobre cascatas de sinalização intracelulares e os seus efeitos neurotrófico, neuroprotetor e estimulador de neurogênese.

Sabe-se também que o lítio exerce diversas ações bioquímicas relacionadas à liberação cálcio-dependente de noradrenalina e dopamina, ao bloqueio de síntese de fosfatidilinositol e modificação de respostas mediadas pelo sistema adenilatociclase e AMPc (Gorenstein & Scavone, 1999). Adicionalmente, propriedades antidepressivas do lítio somadas a dados de pesquisas (Bourin, Hascoet, Colombel, Redrobe, & Baker, 1996; Scheuch et al., 2010; Subhash, Vinod, & Srinivas, 1999) fornecem indícios da relevância do sistema serotoninérgico central na eficácia desta droga.

Entretanto, o lítio não tem eficiência completa e universal, mostrando-se ineficaz enquanto monoterapia na redução de sintomas maníacos em cerca de 25% a 30% dos

pacientes (Stokes, Shamoian, Stoll & Patton, 1971; Storosum et al., 2007). Outros pontos negativos do tratamento com lítio referem-se aos seus diversos efeitos colaterais e riscos de intoxicação e morte (WHO, 2009). Devido a estes problemas, outros fármacos têm sido utilizados para o tratamento dos sintomas do TB, a exemplo da carbamazepina, do ácido valpróico e de antipsicóticos atípicos – que podem necessitar de associação com benzodiazepínicos (APA, 1994; Moreno, Moreno & Ratzke, 2005). Contudo, tais medicações mostram-se ainda menos eficazes que o lítio no tratamento da mania aguda e na prevenção de novas ciclagens de humor e também produzem efeitos adversos (Moreno et al., 2005; WHO, 2009).

Conclui-se que apesar da alta prevalência e gravidade do TB, ainda sabe-se pouco acerca de sua neurobiologia e que muitos esforços ainda são necessários para o desenvolvimento de tratamentos seguros e eficazes (Gould & Einat, 2007). Este avanço depende, ainda que em parte, da criação e estabelecimento de condições experimentais que reproduzam em animais de laboratório aspectos deste fenômeno psicopatológico (Cryan & Slattery, 2007; Gould & Manji, 2004). Estas condições são denominadas de modelos animais ou paradigmas experimentais.

#### *Modelos animais de psicopatologias*

Desde 1865, quando Claude Bernard deu início à utilização de animais para estudo e transposição à fisiologia humana, modelos animais têm sido desenvolvidos para investigação das causas, mecanismos e tratamentos das mais variadas doenças humanas (Fagundes & Taha, 2004). Considera-se que os “modelos animais de doenças humanas” possuem importância incalculável na ciência, tendo contribuído para avanços em diversas áreas da saúde – a exemplo do desenvolvimento de vacinas, procedimentos cirúrgicos e tratamentos farmacológicos. Tal estratégia de produção de conhecimentos é também especialmente útil para estudo das psicopatologias, uma vez que no laboratório é possível reproduzir alterações comportamentais e desenvolver procedimentos capazes de mimetizar em animais quadros semelhantes aos distúrbios ou transtornos mentais humanos. Em princípio, supõe-se que o controle e a manipulação de variáveis ambientais e orgânicas – só possíveis num estudo experimental – podem auxiliar na identificação das causas dessas psicopatologias e no teste de diferentes procedimentos terapêuticos e profiláticos (Willner, 1991).

Atualmente, o uso de modelos animais na pesquisa dos problemas psicopatológicos tem sido intenso e objeto de várias revisões (Korff & Harvey, 2006; Le-Niculescu, Patel, & Niculescu, 2010; Lipska, 2004; Maia & Frank, 2011; Touma, 2011). Os Psicólogos, pela sua

tradicional formação em pesquisa experimental, têm contribuído para o desenvolvimento e melhor conhecimento dos modelos animais por meio da criação e utilização de métodos para medidas dos comportamentos e de seus determinantes – incluindo os que são emitidos nos diferentes transtornos psicopatológicos, além daqueles manifestos espontaneamente ou induzidos em outras espécies.

Dentre as possibilidades de utilização de medidas comportamentais para elucidação das variáveis relacionadas às psicopatologias humanas em animais de laboratório, destacam-se três classes de modelos: de simulação, de triagem de drogas e os bioensaios comportamentais (Willner, 1991). Estes atendem aos interesses de diferentes áreas de conhecimento interseccionadas – psicologia, farmacologia e neurociências – e visam, respectivamente: a compreensão dos processos psicológicos, a descoberta de novos fármacos psicoativos e a análise do funcionamento de regiões específicas do sistema nervoso central (Willner, 1991).

O desenvolvimento e a validação de modelos animais de psicopatologias são baseados em critérios descritos por Willner (1991). Estes critérios são denominados validades e se dividem com base na possibilidade do modelo em reproduzir características de face, preditiva e de constructo em relação ao fenômeno estudado. A validade de face refere-se à similaridade fenomenológica entre o modelo e o transtorno mental humano; a validade preditiva refere-se à habilidade do modelo animal responder a medicações apropriadas e a validade de constructo refere-se a quanto o modelo é capaz de avaliar o que se propõe considerando condições de homologia entre as espécies e permitindo aos pesquisadores a identificação de hipóteses explicativas tanto para o modelo animal quanto para o transtorno humano (Willner, 1991).

#### *Modelos animais do transtorno bipolar – episódio maníaco*

O número reduzido de modelos animais para o TB disponíveis é um fator limitante para o processo de compreensão da neurobiologia desta psicopatologia (Gould & Einat, 2007). A grande dificuldade no desenvolvimento de modelos animais para o TB reside em reproduzir a ciclagem entre os episódios depressivos e maníacos. Uma vez que os modelos de depressão maior já são disponíveis, ocorrem mais tentativas de desenvolver condições experimentais válidas para mimetização do episódio maníaco, denominadas como modelos animais de mania (Goodwin & Jamison, 2007). Os modelos existentes para a mania, segundo a revisão realizada por Einat (2006), são: a) avaliação dos efeitos de estabilizadores de humor sobre a atividade espontânea do animal; b) sintomas maníacos induzidos por psicoestimulantes e c) sintomas maníacos desencadeados pela privação de sono.

O modelo da administração dos estabilizadores de humor sobre a atividade espontânea enfrenta como principal problema a necessidade de administração de altas doses dos fármacos, o que amplia a margem de confusão dos resultados devida aos possíveis efeitos tóxicos (O'Donnell & Gould, 2007). Parecem mais promissoras as induções de sintomas maníacos por psicoestimulantes e pela privação de sono, que têm sido consideradas válidas por produzirem uma série de sintomas que lhes conferem validade de face para o quadro maníaco (Goodwin & Jamison, 2007). Os sintomas produzidos pela indução por psicoestimulantes envolvem: hiperatividade, maior sensibilidade aos estímulos, alerta, insônia e alterações nos padrões de sono (Einat, 2006; Goodwin & Jamison, 2007; Gould & Einat, 2007). No caso da privação de sono, Gessa, Pani, Fadda e Fratta (1995) descrevem que ratos privados de sono por 72h passam a exibir uma variedade de comportamentos semelhantes à mania que incluem: insônia, hiperatividade, irritabilidade, comportamento agressivo e hipersexualidade. Além disso, tanto a hiperatividade induzida por psicoestimulantes quanto pela privação de sono são sensíveis ao tratamento com lítio (Armani et al., 2012; Frey et al., 2006; Gessa, Pani, Fadda, & Fratta, 1995; Gould, O'Donnell, Picchini, & Manji, 2007). Entretanto, cabe ressaltar como limitações destes dois modelos a incapacidade de satisfação de todos os critérios de semelhança sintomatológica e o efeito temporário do quadro maníaco induzido (Malkesman, Austin, Chen, & Manji, 2009). A indução maníaca por psicoestimulantes, por exemplo, falha em reproduzir aumento de apetite, sendo bem conhecidos os seus efeitos anorexígenos (Lyon, 1991). Em relação ao efeito passageiro do quadro induzido por estimulantes ou pela privação de sono, destaca-se que em ambos os modelos os sintomas deixam de ocorrer passado o efeito da droga ou após um curto período de sono dos animais (Gessa et al., 1995) – permitindo a avaliação farmacológica do potencial preventivo e do efeito agudo, mas impedindo a investigação do efeito de tratamentos continuados.

Outros modelos animais considerados válidos para o TB provêm de estratégias bastante distintas. O primeiro baseia-se na manifestação natural de comportamentos de dominância e submissão em roedores para identificação de similaridades sintomatológicas e valor preditivo em relação aos transtornos maníaco e depressivo (Malatynska & Knapp, 2005; Malatynska, Pinhasov, Crooke, Smith-Swintosky, & Brenneman, 2007). Em geral, dois animais co-específicos são submetidos a condições de competição (ex. alimento) onde se definem relações de dominância e submissão – relações estas sensíveis ao tratamento com drogas anti-maníacas (que reduzem comportamentos de dominância) e antidepressivas (que reduzem comportamentos de submissão) (Malatynska & Knapp, 2005; Malatynska et al.,



2007). O segundo modelo baseia-se na administração intracerebroventricular de oubaína (derivado esteroide com propriedade de inibir a ATPase sódio-potássio). Este procedimento demonstrou diminuir a atividade da bomba de sódio em ratos – condição encontrada em pacientes humanos acometidos por mania ou depressão bipolar – induzindo hiperatividade locomotora reversível por administração de lítio, carbamazepina e haloperidol (El-Mallakh, Harrison, Li, Changaris & Levy, 1995; Herman, Houglund & El-Mallakh, 2007). Este modelo, entretanto, também produz efeitos passageiros (cerca de uma semana) e não foi avaliado quanto a outros sintomas maníacos em ratos, necessitando de mais investigações.

*O núcleo mediano da rafe (MnR): aspectos anatômicos, morfológicos e neurofisiológicos*

**Tabela 1:** Designação anatômica dos grupos de células serotoninérgicas nos núcleos da rafe e na formação reticular do tronco encefálico e sua correspondente classificação “B” de acordo com Dahlstron e Fuxe (1964) – adaptado de Tork (1990).

<b>GRUPO DE NEURÔNIOS SEROTONINÉRGICOS</b>	<b>CLASSIFICAÇÃO “B”</b>
Núcleo Pálido da Rafe	B1
Núcleo Obscuro da Rafe	B2
Núcleo Obscuro da Rafe, parte dorsolateral	B4
Núcleo Magno da Rafe	B3
Medula Rostral Ventrolateral	B3
Núcleo Reticular Paragigantocelular Lateral	B3
Medula Caudal Ventrolateral	B1
Núcleo Mediano da Rafe, parte caudal	B5
Núcleo Mediano da Rafe, parte rostral	B8
Núcleo Dorsal da Rafe, parte caudal	B6
Núcleo Dorsal da Rafe, parte rostral	B7
Núcleo Caudal Linear	B8
Núcleo Pontis Oral	B8/B9
Região Supra-lemniscal	B9

O núcleo mediano da rafe (MnR) é uma estrutura que contém corpos celulares de neurônios que fazem neurotransmissão por 5 hidroxitriptamina (serotonina, 5-HT) e Ácido Gama-Aminobutírico (GABA) (Beck, Pan, Akanwa, & Kirby, 2004; Liu & Ikemoto, 2007). As células serotoninérgicas do MnR são organizadas em duas regiões: central e paramediana

(Tork, 1990) descritas por Paxinos e Watson (2007) como núcleos mediano e paramediano da rafe. A região central é composta por grande quantidade de pequenas células com dendritos curtos e em sua maioria alinhadas no plano médio-sagital; já os neurônios da região paramediana são pouco organizados e não apresentam qualquer tipo de orientação (Tork, 1990). Com base na descrição anatômica realizada por Dahlström e Fuxe (1964, citado por Tork, 1990) – representada na Tabela 1 – o MnR recebe a classificação de agrupamentos serotoninérgicos B5 e B8 e juntamente com o núcleo dorsal da rafe, com o núcleo caudal linear e com o núcleo pontino oralis compõe o sistema serotoninérgico rostral (Tork, 1990).

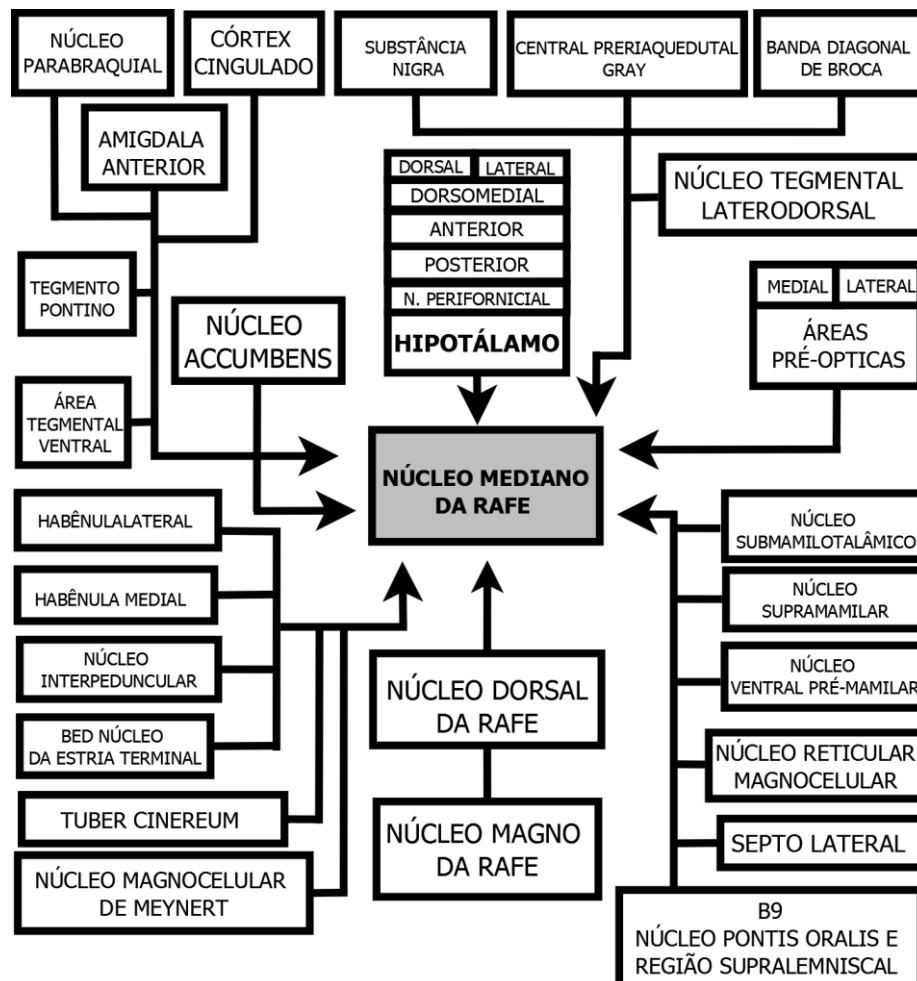
Entretanto, apesar da grande ênfase dada aos neurônios serotoninérgicos, estima-se que 15% dos neurônios do MnR sejam gabaérgicos e o GABA conhecidamente coexiste com a serotonina em muitos neurônios (Köhler & Steinbusch, 1982). Além de participarem da neurotransmissão eferente, a serotonina e o GABA exercem efeito modulador sobre a atividade do próprio MnR por meio de autoreceptores 5-HT<sub>1A</sub> e GABA<sub>A/B</sub> (Kreiss & Lucki, 1994; Tao & Auerbach, 2003). A atividade do MnR também é sensível à ação da noradrenalina (NE) e do glutamato – a primeira exercendo modulação na liberação de 5-HT por adrenoceptores  $\alpha_1$  e  $\alpha_{2A}$  (Hopwood & Stamford, 2001), e o segundo por meio de receptores N-metil D-Aspartato (NMDA) (Tao & Auerbach, 2003).

Ainda como parte de um complexo sistema de interrelações, o MnR parece exercer modulação da atividade de projeções de neurônios dopaminérgicos ao procérebro, uma vez que sua inativação por meio de lesão eletrolítica ou infusão do agonista do receptor GABA<sub>A</sub> muscimol produz aumento da utilização de dopamina no núcleo accumbens (Herve et al., 1981; Nishikawa, Fage, & Scatton, 1986; Wirtshafter, Klitenick, & Asin, 1988) e no estriado e redução da atividade dopaminérgica no córtex pré-frontal (Nishikawa, Fage & Scatton, 1986). Adicionalmente, a lesão eletrolítica do MnR produz permanente decréscimo dos níveis de 5-HT (córtex 31%; hipotálamo 58%; estriado 29% e hipocampo 82%) e do ácido hidroxindoleacético (5-HIAA) (Jacobs et al., 1974) e aumento agudo dos níveis do metabólito de noradrenalina sulfato de 3-metoxi-4-hidroxi fenil etilenoglicol (MOPEGSO<sub>4</sub>) no córtex e hipocampo (Kostowski, Cxlonkowski, Markowdka, & Markiewicz, 1975).

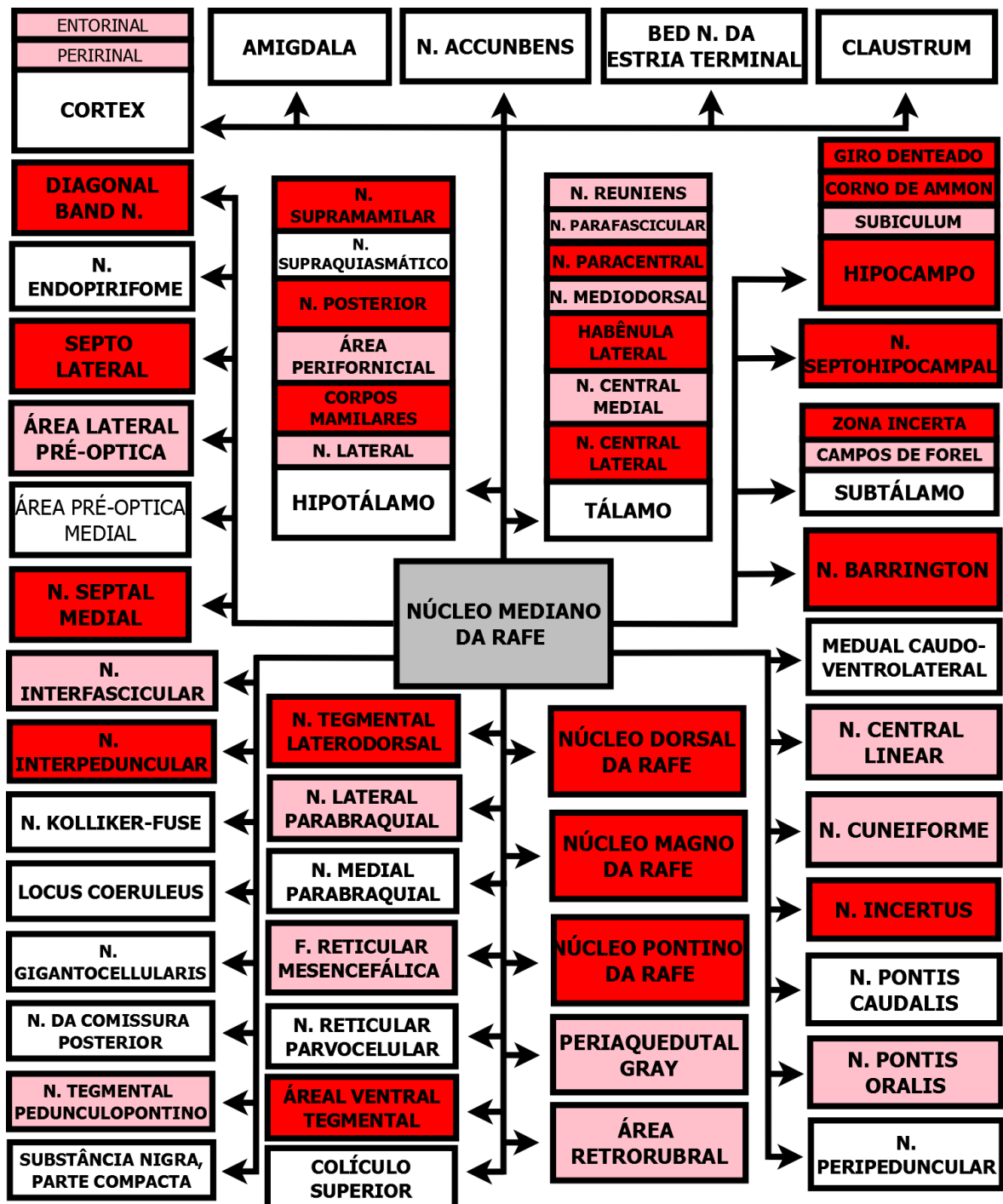
O possível papel modulador do MnR sobre a atividade do sistema excitatório dopaminérgico é também descrito como hipótese do “cabo de guerra” – ou seja, da existência de oposição funcional entre projeções serotoninérgicas e não serotoninérgicas de neurônios dos núcleos mediano e dorsal da rafe (DRN) e o sistema dopaminérgico mesolímbico (Ikemoto, 2010; Liu & Ikemoto, 2007; Vollrath-Smith, Shin, & Ikemoto, 2012). Esta hipótese vem sendo proposta a algumas décadas com ênfase nas projeções serotoninérgicas do MnR

(Giambalvo & Snodgrass, 1978; Nicolaou, Garcia-Munoz, Arbuthnott, & Eccleston, 1979) e adquiriam evidências da participação gabaérgica a partir da demonstração de que alguns efeitos comportamentais da inativação deste núcleo por agonistas dos receptores GABA<sub>A</sub> e GABA<sub>B</sub> (muscimol e baclofen) são bloqueados pelo pré-tratamento com SCH 23390, um antagonista do receptor de dopamina (Liu & Ikemoto, 2007; Vollrath-Smith et al., 2012).

É relevante ainda descrever que o MnR recebe aferentes de um grande número de regiões do prosencéfalo e do hipotálamo (Behzadi, Kalen, Parvopassu, & Wiklund, 1990), como pode ser visualizado na Figura 1. Dentre essas vias aferentes, as predominantes no controle das projeções serotoninérgicas e não serotoninérgicas ascendentes originadas no MnR parecem ser oriundas da ação de aminoácidos excitatórios na habênula lateral e o núcleo interpeduncular (Behzadi et al., 1990).



**Figura 1:** Aferências recebidas pelo núcleo mediano da rafe (MnR), com base na revisão de literatura e dados experimentais de Behzadi et al. (1990). Regiões aferentes investigadas em ratos por meio de técnicas de marcação neuroanatômicas e transmissão seletiva retrógrada.



**Figura 2:** Projeções eferentes do núcleo mediano da rafe (MnR), baseado em dados de Vertes, Fortin e Crane (1999). Regiões eferentes investigadas em ratos por meio de técnicas de marcação neuroanatômicas anterógradas. Cores representam a densidade de marcações identificadas em cada estrutura representada: branco (+), rosa (++) e vermelho (+++).

No que se refere às projeções eferentes, o MnR – juntamente com o núcleo dorsal da rafe (DRN) – dá origem à maioria das vias ascendentes de serotonina às áreas límbicas do cérebro, que controlam comportamentos emocionais (Beck et al., 2004; Paul & Lowry, 2013). A descrição completa das projeções eferentes do MnR pode ser visualizada na Figura 2, construída com base em dados de Vertes, Fortin e Crane (1999). Bem como a grande quantidade de regiões com aferências ao MnR, são inúmeras as regiões que recebem projeções desta estrutura – localizadas principalmente nas regiões mediais do tronco encefálico, prosencéfalo e algumas regiões corticais (Vertes et al., 1999). Merece destaque a projeção do MnR ao hipocampo (Deakin & Graeff, 1991) que exerce importantes funções comportamentais descritas a seguir.

#### *O Núcleo Mediano da Rafe (MnR): aspectos funcionais*

Dentre as primeiras pesquisas que investigaram a funcionalidade do MnR, destacam-se as que descreveram que sua inativação por lesão eletrolítica produzia aumento da atividade locomotora e da reatividade a alterações ambientais (Jacobs & Cohen, 1976; Jacobs et al., 1974; Srebro & Lorens, 1975). Uma publicação seguinte demonstrou também que a estimulação elétrica do MnR por meio da implantação de eletrodos em ratos produzia inibição comportamental (supressão da emissão de respostas positivamente reforçadas) e que proporcionalmente à intensidade dos estímulos aplicados, a estimulação também gerava defecação, micção, agachamento, piloereção e batimento dos dentes (Graeff & Silveira Filho, 1978). Graeff e Silveira Filho (1978) apontaram ainda que este conjunto de reações seria semelhante às respostas emocionais eliciadas em situações de exposição a estímulos aversivos (p.e. estímulos sinalizadores da apresentação de choques elétricos, sinais de dominância de um co-específico ou introdução de novos objetos). Com base nestes resultados, originou-se uma série de pesquisas nas quais os núcleos mediano e dorsal da rafe – juntamente com todo o sistema serotoninérgico central – foram estudados na busca da compreensão dos sistemas de inibição e desinibição comportamental (Graeff, Quintero, & Gray, 1980; Gray, 1982, 1987).

A desinibição comportamental induzida pela inativação do MnR é interpretada por alguns pesquisadores como resultante da diminuição dos níveis de ansiedade (Andrade & Graeff, 2001; Andrade, Macedo, Zangrossi, & Graeff, 2004; Andrade, Nakamuta, Avanzi, & Graeff, 2005; Andrade, Silva, Silva, & Graeff, 1999). Tal interpretação foi realizada com base no padrão comportamental observado nos animais MnR lesionados nos testes do labirinto em cruz elevado (LCE) ou labirinto em T (variação do labirinto em cruz com dois braços abertos e apenas um fechado), uma vez que estes apresentam maior número de entradas e de tempo de

permanência nos braços abertos em comparação aos animais controles falso operados, bem como menor frequência de comportamentos de avaliação de risco, como por exemplo o esticar-se (Andrade & Graeff, 2001; Andrade et al., 2004).

Indícios fisiológicos contradizem a interpretação deste suposto “efeito ansiolítico” induzido pela lesão do MnR – o que traz à tona o problema da inferência de um estado emocional em animais expostos a condições experimentais com baixas validades de face e constructo com relação ao fenômeno estudado (Green & Hodges, 1991). Hoshino e Sugizaki (1986), por exemplo, demonstraram que lesões eletrolíticas do MnR induzem a formação de úlceras gástricas em ratos privados de comida e que as feridas produzidas se localizam na parte granular do estômago, assim como úlceras desenvolvidas pela exposição a eventos aversivos. A indução de úlceras foi replicada por outras pesquisas em ratos submetidos à restrição física – nas quais também se constatou que sob efeito deste modelo de indução de estresse, a lesão do MnR induz maior supressão do sistema imunológico, maiores índices de corticosterona e de perda de peso em comparação aos animais controles falso operados (Andrade et al., 1999; Graeff, Guimaraes, De Andrade, & Deakin, 1996). Por fim, diversas pesquisas descreveram o papel do MnR no controle da atividade de ondas teta no hipocampo (Graeff et al., 1980; Hsiao, Jou, Yi, & Chang, 2012; Jackson, Dickson, & Bland, 2008; Kitchigina, Kudina, Kuttyreva, & Vinogradova, 1999), demonstrando que a inativação deste núcleo desinibe a ocorrência destas ondas, promovendo constante atividade teta (Kinney, Kocsis, & Vertes, 1994, 1995; Vertes, Kinney, Kocsis, & Fortin, 1994). Com base nestes dados, o MnR exerceria o papel de *pacemaker*, dessincronizando a atividade hipocampal e inibindo a atividade teta – onda eletroencefalográfica que em ratos está fortemente associada ao sono REM, ao alerta diante de estímulos aversivos, à atividade locomotora, à atenção e à memória. Uma vez que todas as classes de drogas ansiolíticas (barbitúricos, benzodiazepínicos, agonistas de receptores 5HT<sub>1A</sub>, inibidores seletivos da recaptação de serotonina) produzem como efeito comum a redução da atividade teta no hipocampo (McNaughton, Kocsis, & Hajos, 2007), conclui-se que o padrão eletroencefalográfico observado em animais submetidos à inativação do MnR é oposto ao resultante da ação de drogas consideradas redutoras dos níveis de ansiedade.

Em resumo, os dados da literatura aqui discutidos permitem afirmar que: a) a estimulação do MnR elicia respostas emocionais semelhantes às emitidas diante de estimulação aversiva, acompanhada de supressão comportamental e b) a inativação deste núcleo produz um quadro de hiper-reatividade fisiológica à estimulação aversiva (ao

“estresse”), acompanhado de desinibição comportamental geral. Ou seja, o MnR parece exercer função reguladora da responsividade do organismo diante de eventos aversivos.

Esta constatação está de acordo com a hipótese elaborada por Deakin e Graeff (1991), segundo a qual as projeções a receptores 5-HT<sub>1A</sub> hipocampais originadas do MnR teriam importante função na resistência ao estresse crônico, modulando respostas desencadeadas por eventos aversivos continuados. Nota-se que nesta perspectiva, a participação do MnR na “adaptação ao estresse crônico” poderia envolver tanto a supressão quanto a desinibição comportamental – que podem ser adaptativas de acordo com o contexto (natureza do estímulo, intensidade, duração, etc.) e com a funcionalidade de tais padrões de atividade nas histórias filo e ontogenética do organismo.

Esta modulação desinibição/inibição comportamental se assemelha às variações dos níveis de atividade nos polos do TB mania/depressão, que por sua vez também são desencadeados pela exposição à estimulação aversiva (Brietzke, Mansur, Soczynska, Powell, & McIntyre, 2012; Cohen, Hammen, Henry, & Daley, 2004; Frank, Swartz, & Kupfer, 2000; Hammen & Gitlin, 1997; Malkoff-Schwartz et al., 1998). Uma vez que não se sabe explicar e modelos animais não conseguem reproduzir o mecanismo controlador do direcionamento da ciclagem, destaca-se a relevância da investigação da participação deste papel regulador dos níveis de atividade exercido pelo MnR na neurobiologia do TB.

*A resistência ao “estresse” crônico mediado pela via MnR-hipocampal e o desenvolvimento dos transtornos de humor*

Conforme anteriormente mencionado, o núcleo mediano da rafe dá origem a projeções ao sistema límbico e estaria envolvido na tolerância e enfrentamento de estimulação aversiva continuada (Beck et al., 2004; Paul & Lowry, 2013). Alguns autores apontam que “falhas” neste sistema de resistência resultariam no desenvolvimento da depressão (Deakin, 1998; Graeff et al., 1996). De fato, a exposição a eventos estressores costuma ser descrita em pesquisas clínicas sobre depressão e presente em modelos experimentais desta psicopatologia – a exemplo do desamparo aprendido, do nado forçado e do estresse crônico moderado (Joca, Padovan, & Guimarães, 2003; Malkoff-Schwartz et al., 1998; Willner, 1997). Além disso, foi demonstrado que a exposição a diferentes tipos de estresse (isolamento social, choques na cauda, som inescapável, manipulação, injeção de solução salina e nado forçado) produz ativação do MnR acompanhada de inibição comportamental (Adell, Casanovas, & Artigas, 1997; Briones-Aranda, Rocha, & Picazo, 2005; Corley, Phan, Daugherty, & Boadle-Biber, 2002; Daugherty, Corley, Phan, & Boadle-Biber, 2001; dos Santos, de Andrade, & Graeff,

2010). Neste sentido, pode-se considerar que a supressão comportamental em testes como o LCE e nado forçado está relacionada à ativação da via MnR-hipocampal, bem como a inativação desta via é capaz de produzir efeitos desinibitórios também interpretados como anti-depressivos (Almeida, Trovo, Tokumoto, Pereira, & Padovan, 2013; Andrade, Sergio, Broiz, & Avanzi, 2007; Joca et al., 2003; Pereira, 2010; Tokumoto, 2010).

Pesquisas recentes têm interpretado este mesmo tipo de desinibição (p.e. diminuição do tempo de imobilidade nos testes do nado forçado e suspensão pela cauda, aumento da exploração dos braços abertos do labirinto em cruz elevado e hiperatividade locomotora) como um padrão de enfrentamento ativo da condição aversiva e de exposição ao “risco” – exposição à condição aversiva (Kromer et al., 2005; Yen et al., 2013). Este padrão ativo, junto às demais alterações comportamentais observadas e valor preditivo de drogas específicas, se assemelha ao episódio maníaco do transtorno bipolar.

#### *A inativação do MnR como modelo animal de mania*

A revisão de literatura permitiu a identificação de semelhanças sintomatológicas entre os efeitos da inativação do MnR em animais de laboratório e grande parte do conjunto de comportamentos esperados para atribuição de validade de face ao episódio maníaco em condições experimentais, os quais podem ser visualizados na Tabela 2. Em síntese, a inativação desta estrutura por diferentes procedimentos induz: a) hiperatividade (Albinsson et al., 1996; Jacobs et al., 1974); b) estereotipia (Hoshino et al., 2004); c) facilitação no comportamento sexual (Albinsson et al., 1996); d) agressividade e desrespeito à hierarquia social (File et al., 1979); e) impulsividade (Fletcher, 1995; Le et al., 2002) e exposição ao “risco” (Andrade & Graeff, 2001; Andrade et al., 1999); f) alterações na aprendizagem e controle de estímulos (Asin et al., 1979a, 1980; Wirtshafter & Asin, 1983); g) aumento no valor reforçador dos estímulos incondicionados e condicionados (Fletcher, Korth, & Chambers, 1999; Vollrath-Smith et al., 2012; Wogar et al., 1991); h) irritabilidade (Kostowski et al., 1968) e i) diminuição do tempo total de sono (Arpa & De Andres, 1993; Arpa, Padrino, Rodriguez-Albarino, & de Andres, 1998).

Quanto ao valor preditivo, os agentes efetivos em reverter ou atenuar a hiperatividade induzida pela inativação do MnR em ratos são o precursor de serotonina L-5-HTP (doses <200mg/kg), os bloqueadores de receptores dopaminérgicos haloperidol e clorpromazina, o inibidor da biosíntese de catecolaminas alfa-metil-p-tirosina e o degradador de monoaminas tetrabenazina (Yamamoto & Ueki, 1978). O haloperidol também se mostrou eficaz em reduzir



**Tabela 2.** Síntese dos de comportamentos esperados para atribuição de validade de face em modelos animais de mania (Einat, 2006; Lyon, 1991) e descrições de pesquisas que avaliaram a ocorrência de manifestações correspondentes em animais submetidos à inativação do MnR.

<b>MODELOS ANIMAIS DE MANIA</b>	<b>PROCEDIMENTO DE INATIVAÇÃO DO MnR</b>	<b>ESPÉCIE</b>	<b>EFEITOS COMPORTAMENTAIS DA INATIVAÇÃO DO MnR</b>
Hiperatividade locomotora	- lesão eletrolítica  -lesão por ácido ibotênico (neurotoxina não específica)  - inibição por muscimol (agonista GABA <sub>A</sub> R)  -inibição por baclofen (agonista GABA <sub>B</sub> R)	- rato	- aumento significativo da atividade locomotora (Albinsson et al., 1996; Asin & Fibiger, 1983; Jacobs et al., 1974; Wirtshafter, Klitenick, & Asin, 1987; Wirtshafter, Stratford, & Pitzer, 1993)
	- 5, 7 - dihidroxitriptamina (DHT) (neurotoxina específica para neurônios 5HT)	- camundongo	- desenvolvimento de hiperatividade locomotora na linha de base e induzida por fenciclidina (Martin & van den Buuse, 2008)
Estereotipia	- lesão eletrolítica	- rato	- aumento na frequência de comportamentos estereotipados de conferência e limpeza (Hoshino et al., 2004; Leite & Hoshino, 2002)
	-p-cloroanfetamina (PCA) e 5,7-DHT (neurotoxinas específicas para neurônios 5HT)	- rato	- aumento na frequência de giros contralaterais ao sítio de injeção (rotações) (Costall & Naylor, 1974; Giambalvo & Snodgrass, 1978)
Facilitação de respostas sexuais	- lesão eletrolítica	- rato	- efeitos facilitadores no comportamento de machos durante a interação sexual: decréscimo do número de penetrações até a ejaculação, menor latência de ejaculação e intervalo pós-ejaculação (Albinsson et al., 1996)
“Ego inflado” (não submissão à hierarquia social) e agressividade	- lesão por 5,7-DHT	- rato	- no teste do intruso os ratos lesionados se submetem menos ao intruso e apresentam maior frequência de comportamentos ofensivos e de dominância em comparação aos controles (File et al., 1979)
	- lesão eletrolítica	- rato	- aumento na frequência de respostas agonísticas (Andrade, 1997)

Impulsividade	- lesão eletrolítica	- rato	- exposição aumentada ao “risco”, expressa pelo aumento do tempo de permanência nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (Andrade & Graeff, 2001)
	- lesão por 8-Hidroxi-2-(di-n-propilamino)tetralina (8-OH-DPAT) (agonista 5HT <sub>1A</sub> R)	-rato	- facilitação na reinstalação de respostas por álcool (Le et al., 2002)
	- lesão por 5,7 DHT	-rato	- diminuição no ponto de indiferença na escolha por reforçadores imediatos em detrimento de reforçadores atrasados de maior magnitude (Wogar, Bradshaw, & Szabadi, 1993) - em esquema de reforçamento de taxas baixas (DRL 20s) a lesão produziu aumento na frequência de respostas, diminuição do número de reforços obtidos e diminuição no intervalo entre respostas (Fletcher, 1995)
Déficits cognitivos	- lesão eletrolítica	- rato	- prejuízo severo na aquisição da resposta em tarefa de alternada de escolha (Asin et al., 1979a); prejuízo profundo na aquisição e manutenção em teste de labirinto radial (Wirtshafter & Asin, 1983); prejuízos na aquisição no labirinto de escolha livre (Asin et al., 1985); déficit na inibição latente (Asin et al., 1980)
	- inibição por NMDA e por 8-OH-DPAT	-rato	- ausência de <i>freezing</i> diante de estímulo aversivo condicionado ao contexto (Lima, 2002)
Humor elevado (aumento da frequência de comportamentos positivamente reforçados e/ou aumento do valor reforçador dos estímulos)	- lesão eletrolítica	- rato	- em condições normais nas gaiolas-viveiro, ingerem maiores quantidades de solução de sacarose comparativamente aos controles com lesão fictícia (Pezzato et al., 2003) e emitem maior frequência de respostas de pressão à barra para obter acesso à solução de sacarose (Pezzato & Hoshino, 2004)
	- lesão por 5,7 DHT	- rato	- aumento no valor reforçador da sacarose, sem afetar a capacidade de resposta dos animais (Wogar et al., 1991) - aumento na frequência de respostas conseqüenciadas por estímulo reforçador condicionado à água e à solução de sacarose (Fletcher et al., 1999)

	- inibição por muscimol e baclofen	- rato	-aumento na frequência de pressões à barra consequenciadas pela produção de um <i>flash</i> de luz incondicionado (Vollrath-Smith et al., 2012) - hiperfagia e aumento no consumo de solução de sacarose (Fletcher, 1994; Klitenick & Wirtshafter, 1988; Wirtshafter, Davis, & Stratford, 2011; Wirtshafter et al., 1993)
	- injeção de NMDA	- rato	- hiperfagia e aumento no consumo de solução da sacarose (Wirtshafter & Trifunovic, 1988)
Insônia e alteração do ritmo circadiano	- diatermocoagulação	- gato	- produz quadro de insônia, havendo correlação entre o volume de tecido cortical destruído e o aumento no tempo de vigília (Arpa & De Andres, 1993; Arpa et al., 1998)
	- lesão por 5,7-DHT	- hamster	-alteração do efeito da luz sobre o ritmo circadiano (Muscat, Tischler, & Morin, 2005)
Irritabilidade	- lesão eletrolítica	- rato	- hiper-reatividade ao toque e à manipulação (Kostowski et al., 1968)

a indução do comportamento alimentar e a frequência de rotações decorrentes desta mesma lesão (Fletcher, 1991; Giambalvo & Snodgrass, 1978). A anfetamina, no entanto, produz efeito intensificador da hiperatividade (Asin & Fibiger, 1983; Geyer, Puerto, Menkes, Segal, & Mandell, 1976). Não foi encontrado qualquer estudo que avaliasse o efeito do lítio sobre as alterações comportamentais decorrentes da inativação do MnR, apesar da conhecida ação deste fármaco sobre o sistema serotoninérgico, de seus efeitos protetores sobre uma das principais estruturas de projeção serotoninérgica do MnR (hipocampo) e sobre os sistemas excitatórios que sofrem desequilíbrio em decorrência da lesão desta estrutura (dopaminérgico e noradrenérgico) (Gorenstein & Scavone, 1999; Kiseleva & Samsonova, 1976; Maes, Calabrese, Jayathilake, & Meltzer, 1997; Perez-Cruet, Tagliamonte, Tagliamonte, & Gessa, 1971; Scheuch et al., 2010; Schloesser et al., 2012; Umberkoman & Joseph, 1975).

## JUSTIFICATIVA

Apesar de pesquisas listadas na Tabela 2 terem descrito grande parte das alterações de comportamento correspondentes ao quadro de mania em animais experimentais, é de suma importância considerar a heterogeneidade dos procedimentos experimentais adotados, principalmente quanto ao método da inativação do MnR. Como pode ser observado na segunda coluna dessa tabela, os estudos listados utilizaram-se de procedimentos de lesão eletrolítica, lesão por diatermocoagulação, lesões neurotóxicas específicas e não específicas, inibição da atividade neuronal pela estimulação de auto-receptores inibitórios (serotoninérgicos ou gabaérgicos) ou injeção de NMDA. Esta diversidade metodológica torna-se ainda mais crítica no que se refere à possibilidade de generalização dos resultados observados quando constatada a existência de diferenças entre os efeitos comportamentais induzidos por estes procedimentos acima listados. Em especial, destaca-se que alguns destes efeitos (p.e. hiperatividade de maior intensidade, estereotípias, exposição aumentada ao risco e déficits de aprendizagem) decorrem exclusivamente da inativação deste núcleo por lesão eletrolítica, o que sugere que estes podem resultar da destruição de outras estruturas além dos neurônios serotoninérgicos (p.e. fibras de passagem, neurônios gabaérgicos), da destruição combinada de diferentes grupos neuronais ou de neurônios de regiões adjacentes (Asin & Fibiger, 1983; Asin et al., 1985; Liu & Ikemoto, 2007; Wirtshafter et al., 1987; Wirtshafter, Montana, & Asin, 1986). Tendo em vista tal fato, torna-se relevante a demonstração de que um mesmo tipo de manipulação experimental é responsável pelos diversos efeitos comportamentais similares às manifestações da mania, incluindo sua resposta a fármacos utilizados no tratamento deste transtorno.

Mais especificamente, destaca-se a carência de estudos que tenham investigado adequadamente se além da hiperatividade, outros sintomas que caracterizam a mania humana, tais como o humor elevado e ego inflado (APA, 1994) – que em animais de laboratório teriam como correspondentes o aumento na atividade direcionada a consequências apetitivas/prazerosas ou aumento do valor reforçador dos estímulos e não submissão à hierarquia socialmente imposta (Einat, 2006; Lyon, 1991; Yen et al., 2013) – também podem ser induzidos pelo procedimento de lesão eletrolítica do MnR. Ainda que Pezzato e colaboradores (Pezzato et al., 2003; Pezzato & Hoshino, 2004) tenham demonstrado em estudos preliminares que a lesão eletrolítica do MnR é capaz de induzir maior consumo de solução açucarada na gaiola-viveiro ou em reforçamento contínuo em comparação aos animais controles, características do procedimento (p.e. a disponibilização de uma única barra

nas sessões de medida operante) impedem o descarte da possibilidade de que as alterações observadas decorram simplesmente dos maiores níveis de atividade induzidos pelo procedimento. No que se refere ao padrão de hierarquização social, apesar de File et al. (1979) terem demonstrado que a lesão química (5-7 dihidroxitriptamina) do MnR produziu um perfil de menor frequência de submissão e maior frequência de comportamentos de dominância em comparação animais controles em ratos da linhagem *Hooded* no teste do intruso/residente, não foram feitas pesquisas sistemáticas sobre a ocorrência deste padrão em animais submetidos à lesão eletrolítica ou em outras linhagens de ratos.

Pode ainda ser visualizado na Tabela 2 que a grande maioria dos estudos acerca dos efeitos da lesão do MnR foi realizada em ratos. O uso quase que exclusivo de uma única espécie limita a possibilidade de generalizações – fator fundamental à suposição de homologia interespecífica que justifica a utilização de modelos animais para o estudo de patologias humanas. Merece destaque o fato de que apesar da vasta utilização do camundongo em pesquisas médicas, até o momento um único estudo investigou o efeito da inativação do MnR nesta espécie (Martin & van den Buuse, 2008). Este investigou o efeito de lesões neurotóxicas pela injeção de 5,7 DHT no MnR de camundongos isogênicos (C57BL/6J). Como efeito da lesão, os animais apresentaram desenvolvimento de hiperatividade locomotora na linha de base e induzida por fenciclidina – além de ausência de alterações na inibição pelo pré-pulso. Estes dados exemplificam a impossibilidade de generalização de dados mesmo entre duas espécies de roedores, uma vez que permitiram a identificação de diferenças em comparação aos resultados anteriores descritos em pesquisas com ratos – espécie em que a lesão do MnR por 5,7, DHT não produz alteração significativa na atividade locomotora e gera diminuição da inibição pelo pré-pulso (Asin & Fibiger, 1983; Kusljic, Brosda, & van den Buuse, 2006; Kusljic, Copolov, & van den Buuse, 2003).

Outros exemplos que sugerem a possibilidade de diferenças entre o funcionamento do sistema serotoninérgico nestas espécies são as pesquisas de Canto-de-Souza, et al. (2002) e Nunes-de-Souza, et al. (2011). Estes autores investigaram os efeitos comportamentais da ativação do MnR pela injeção do antagonista do receptor serotoninérgico (5HT<sub>1A</sub>) WAY-100635 em camundongos *Swiss-Webster* – que produz a desinibição do disparo neuronal pelo bloqueio de autoreceptores inibitórios. Na primeira publicação os pesquisadores relataram que a desinibição do MnR aumentou significativamente a exploração dos braços abertos e diminuiu a frequência de avaliação de risco (esticar) no LCE, efeito oposto ao esperado em comparação a resultados provenientes de pesquisas com ratos (Canto-de-Souza, Nunes-de-Souza, & Rodgers, 2002). Em uma segunda publicação, os pesquisadores demonstraram que

tal efeito comportamental é bloqueado pelo pré-tratamento com um antagonista dos receptores 5HT<sub>2a/2c</sub> (ketanserina) na matéria cinzenta periaquedual (PAG) – sugerindo o papel diferencial dos receptores localizados nesta estrutura sobre o desempenho no teste do labirinto em cruz elevado em camundongos (Nunes-de-Souza, Nunes-de-Souza, Rodgers, & Canto-de-Souza, 2011).

Com base nestes argumentos fica evidente a necessidade da investigação acerca da ocorrência das alterações comportamentais correspondentes aos sintomas da mania humana como resultantes de um único procedimento experimental de inativação do MnR e em diferentes espécies de animais de laboratório. Destaca-se também a relevância do estudo da cronicidade dos efeitos comportamentais induzidos pelo procedimento adotado, fornecendo subsídios para a investigação da validade preditiva do modelo por administração de tratamento farmacológico continuado.

## **OBJETIVO GERAL**

Avaliar se as alterações comportamentais induzidas pela lesão eletrolítica do MnR no rato e no camundongo podem ser consideradas um modelo animal para estudo do episódio maníaco do transtorno bipolar humano. Neste sentido, os experimentos foram delineados para:

- a) Testar a validade de face do modelo proposto pela avaliação da reprodutibilidade, da cronicidade e da similaridade entre o conjunto de alterações comportamentais induzidas pela lesão eletrolítica do MnR e comportamentos correspondentes à mania em ratos e camundongos;
- b) Testar o valor preditivo do modelo pela avaliação do efeito do tratamento crônico com lítio sobre as alterações comportamentais induzidas pela lesão eletrolítica do MnR em ratos e camundongos.

A metodologia utilizada e os resultados obtidos estão descritos nesta tese em dois capítulos. O primeiro descreve uma sequência de testes comportamentais realizada em ratos na Unesp/Bauru – adotando procedimento cirúrgico e condições de alojamento padrões do Laboratório de Neurobiologia da instituição. O segundo descreve os procedimentos, testes comportamentais e resultados obtidos durante o estágio no exterior realizado na University of Maryland (EUA).

# **CAPÍTULO I**

**Avaliação dos efeitos comportamentais da lesão eletrolítica da região do Núcleo Mediano da Rafe (MnR) como manifestações maníacas em ratos**



## MÉTODOS GERAIS

### A. Compromisso Ético

O presente estudo foi iniciado mediante a aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), Campus Bauru (Protocolo nº6171/46/01/11- Anexo A) e sua execução obedeceu rigorosamente às recomendações do CONCEA.

### B. Animais

Foram utilizados 174 ratos *Wistar* machos, provenientes do Biotério Central da Unesp, com 45 dias de vida. Durante o período de adaptação ao biotério, os animais foram alojados em grupos de cinco em caixas de poliuretano semi-transparentes forradas com maravalha trocadas a cada 48h, em ciclos claro/escuro de 12h (luz das 7 às 19h), temperatura constante a 25-26°C e água e alimentação comercial *ad libitum*. Ao atingirem 90 dias e peso médio de 350g, foram iniciados os procedimentos experimentais.

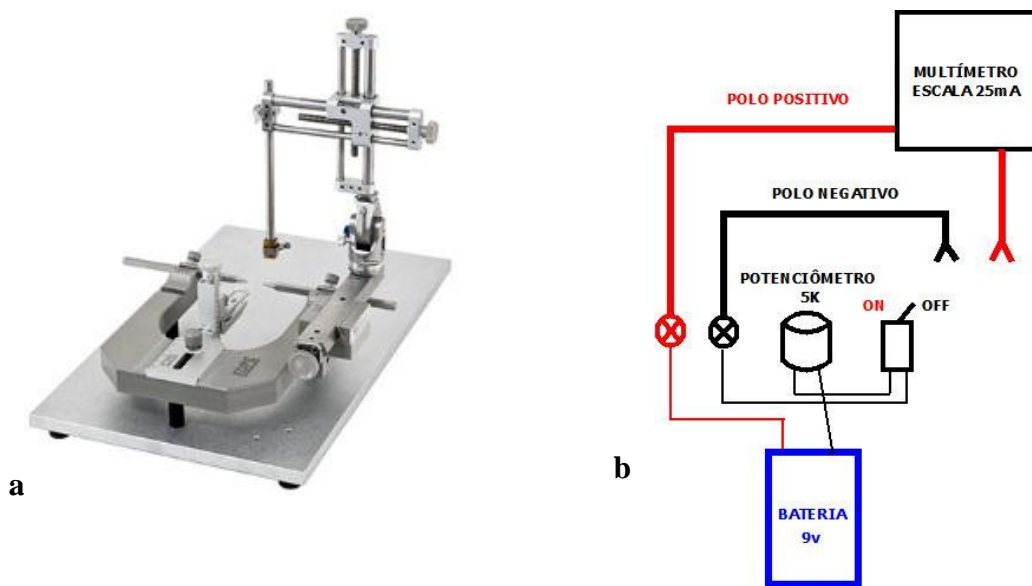
Após as cirurgias estereotáxicas os animais foram alojados individualmente e água e comida comercial permaneceram *ad libitum*, exceto quando mencionado. Os animais não submetidos ao procedimento cirúrgico foram mantidos nas mesmas condições, incluindo o alojamento individual.

### C. Lesão Eletrolítica do MnR

*Equipamentos:* aparelho estereotáxico para pequenos animais David-Kopff – modelo 900 (Tujunga, CA, EUA, Figura 3 a), eletrodo de eletrocoagulação de fio de níquel-cromo (0,12mm de diâmetro) e lesionador eletrônico manufaturado (Figura 3 b). O circuito era alimentado por uma bateria comercial de 9V, acionado por uma chave liga/desliga e controlado por um potenciômetro (5K). A mensuração da corrente era realizada por um multímetro analógico comercial em escala 25mA.

*Fármacos:* Cloridrato de ketamina (Dopalen<sup>®</sup>/Vetbrands), xilazina (Anasedan<sup>®</sup>/Vetbrands), Xilocaína<sup>®</sup> com vasoconstritor (ASTRA Química e Farmacêutica Ltda) e pentabiótico veterinário (Fort Dodge).

*Procedimento cirúrgico:* foi realizado o procedimento descrito por Hoshino et al. (2004). Os animais foram anestesiados com ketamina (i.p. 75mg/kg) e sedados com xilazina (i.m.1mg/kg). Após a perda do reflexo óculo-palpebral, anestésico local (xilocaína 2%, com vasoconstritor) foi injetado subcutaneamente na região da cirurgia. Os animais foram presos



**Figura 3.** Equipamentos utilizados para realização das cirurgias para lesão eletrolítica do MnR. a) fotografia do modelo de aparelho utilizado para realização das cirurgias (David-Kopff – modelo 900), extraída no endereço eletrônico <http://www.kopfinstruments.com> e b) diagrama de representação do circuito elétrico do lesionador manufaturado para eletrocoagulação do tecido nervoso.

ao aparelho estereotáxico e a calota craniana exposta. O eletrodo isolado eletricamente em sua extensão, exceto o milímetro (mm) final, foi inserido por duas vezes com um ângulo de 30 graus no plano ântero-posterior através de uma trepanação no osso interparietal, usando-se as seguintes coordenadas do atlas estereotáxico de Paxinos e Watson (2007): AP=1,6 e 2,5; LR=0,0 e H=1,6mm – tomando-se a referência auricular. No momento das duas inserções uma corrente DC de 4 mA por 15 segundos foi aplicada para a eletrocoagulação nos animais experimentais (grupo LR), enquanto nos animais controles (grupo LF), o eletrodo foi inserido próximo ao núcleo (H=2,6mm) e retirado sem aplicação da corrente eletrocoagulante. Os animais foram suturados, a assepsia cuidada, tratados com pentabiótico veterinário (dose única i.m. 0,2ml/kg) e mantidos individualmente em gaiolas-moradia. Os testes foram iniciados após período mínimo de recuperação de 7 dias.

#### D. Critério de Inclusão

Inúmeros dados da literatura demonstram indubitável consistência entre a lesão eletrolítica da região do MnR e o fenômeno da hiperatividade locomotora em experimentos realizados em ratos (Asin & Fibiger, 1983; Geyer et al., 1976; Jacobs & Cohen, 1976; Jacobs et al., 1974; Kohler & Lorens, 1978; Lorens, Guldberg, Hole, Kohler, & Srebro, 1976;

Wirtshafter et al., 1986). Assim, foi estabelecido como critério de inclusão no grupo experimental com lesão real (LR) o nível de atividade locomotora indicativo do desenvolvimento de hiperatividade – sendo este superior a 30 metros (m) em 15 minutos (min) de avaliação na caixa de atividade automatizada. Os animais operados que não desenvolveram hiperatividade foram descartados do estudo.

#### **E. Período das Avaliações, Habituação e Limpeza dos Equipamentos**

As avaliações comportamentais foram realizadas no período diurno (entre 9 e 18h). Em todos os procedimentos de avaliação comportamental descritos nos estudos desta pesquisa os animais foram levados em suas gaiolas-moradia à sala de experimentação com 5 min de antecedência. Todos os equipamentos foram limpos com álcool 70% após o teste de cada animal, impedindo a permanência de odores.

#### **F. Análises Estatísticas**

Todas as análises foram realizadas pelo *software* STATISTICA 7 da StatSoft (Tulsa, OK, EUA), sendo adotado o nível de significância de  $p < 0,05$ .

## EXPERIMENTO 1

### **Avaliação da cronicidade da hiperatividade locomotora e da estereotipia decorrentes da lesão eletrolítica da região do MnR em ratos**

#### **OBJETIVO ESPECÍFICO**

O primeiro objetivo proposto refere-se a avaliar a persistência temporal da hiperatividade locomotora e do aumento na frequência de respostas de mergulhar a cabeça (*head dipping*) nos animais submetidos à lesão eletrolítica da região do MnR em dois diferentes testes comportamentais – a *Endless Maze* e Campo Aberto, bem como comparar a correspondência entre estas duas estratégias de avaliação. A primeira estratégia foi desenvolvida no laboratório de Neurobiologia da Unesp/Bauru pelo Prof. Dr. Katsumasa Hoshino e colaboradores (Hoshino et al., 2004) e oferece como vantagem a possibilidade de mensuração da frequência de respostas de locomoção e de *head dippings*, enquanto a segunda permite a mensuração automatizada da atividade locomotora e maior fidedignidade dos dados.

#### **MÉTODO**

##### **A. Animais**

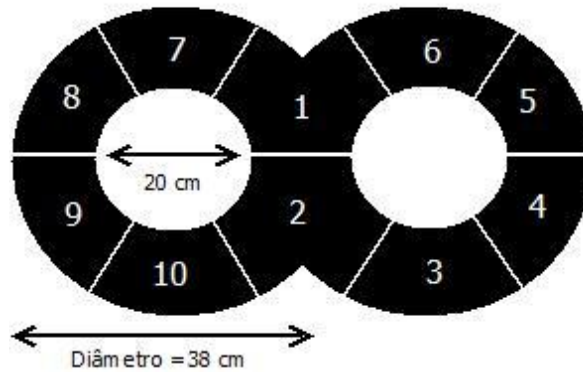
Foram utilizados 46 ratos, distribuídos em 3 grupos: lesão real (LR, n=24), lesão fictícia (LF, n=10) e intacto (I, n=12).

##### **B. Equipamentos**

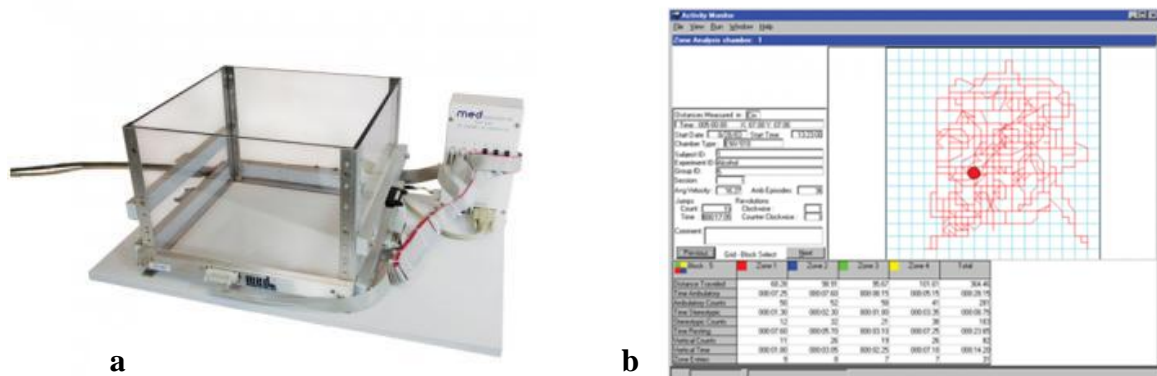
a) duas plataformas denominadas *Endless Maze* (Hoshino et al., 2004), em forma de 8 composta por duas circunferências de 38 centímetros (cm) de diâmetro interseccionadas (Figura 4), elevadas a 1m do chão por 4 pernas cilíndricas de metal de 2 cm de diâmetro. O percurso da plataforma é dividido em 10 segmentos de 18 x 9 x 9cm numerados, que permitem descrever a posição e a locomoção do animal.

b) Duas Caixas de Atividade de Campo Aberto (ENV-515) em policarbonato acrílico transparente, de medidas 42,5 x 42,5 x 30,5cm (Med- Associates, Georgia,VT, EUA, Figura 5). O controle das sessões experimentais e o registro dos dados foram feitos através de um computador IBM conectado às interfaces das caixas. A medida da locomoção e de outros parâmetros, como levantar-se, é feita neste aparelho através de uma rede de fotocélulas (16 x

16 x 16), dispostas paralelamente e espaçadas por 2,5cm, que emitem feixes infravermelhos e cuja interrupção gera um pulso para contagem (48 Channel IR Controller for Open Field Activity).



**Figura 4.** Representação da plataforma *Endless Maze*. O equipamento foi construído em madeira e coberto por tinta preta, tendo os quadrantes (18 x 9 x 9cm) delimitados e numerados em tinta branca. O diâmetro dos círculos interseccionados era de 38cm e o diâmetro da abertura interna de 20 cm. Ainda compuseram o equipamento 4 pernas cilíndricas de metal de 2cm de diâmetro, que o elevavam a 1m do chão.



**Figura 5.** Equipamento utilizado para mensuração automatizada da atividade locomotora. a) exemplificação da caixa de atividade (Med-Associates, ENV-515) e b) representação gráfica da atividade locomotora realizada pelo software no teste do Campo Aberto. Fotografias retiradas do endereço eletrônico: <http://www.med-associates.com/products-page/activity/open-field-activity-accessories>

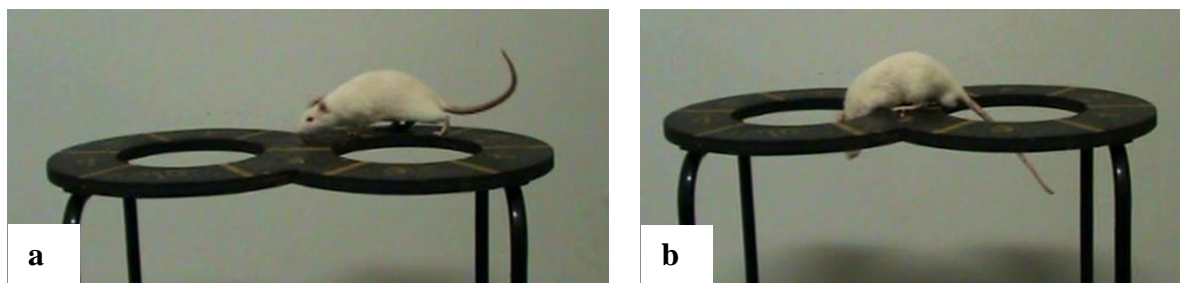
### C. Procedimentos

Cada animal foi submetido a 2 sessões de 10 minutos no *Endless Maze*, 7 e 14 dias após as cirurgias (Dia 7 e Dia 14, respectivamente). Os ratos dos três grupos foram individualmente colocados no marco 1 (central) da plataforma e a locomoção para os demais segmentos (ex: 1,2,3,2,1,10,9, etc; Figura 6 a) e as frequências das respostas de limpeza (*grooming*) e mergulhar a cabeça (*head dipping*, Figura 6 b) foram manualmente registradas. A definição destas categorias comportamentais pode ser observada na Tabela 3.

**Tabela 3.** Definição das categorias comportamentais quantificadas no *Endless Maze*.

<b>Categoria</b>	<b>Definição</b>
<b>Locomoção</b>	- movimentações do animal que representem mudança completa de quadrante, ou seja: que o animal introduza os membros anteriores e posteriores em outro segmento numericamente demarcado do equipamento.
<b>Grooming</b>	- lambar as patas dianteiras e passá-las no pelo ou lambar diretamente o pelo, começando pelo focinho, se deslocando para as orelhas e possivelmente pelo resto do corpo.
<b>Head dip</b>	- animal olhar para baixo de uma das bordas do equipamento, de forma que toda a cabeça fique posicionada abaixo do nível do <i>Endless Maze</i> .

Para evitar dados contaminados pela dor de possíveis lesões ocasionadas pelos pulos ou quedas repetidas da plataforma, foi estabelecido o limite de quadro episódios, que se atingido, resultava em devolução do animal à gaiola-moradia e exclusão da amostra.



**Figura 6.** Fotografias de um animal sendo submetido ao teste do *Endless Maze*. a) exemplificação do animal se deslocando sobre o equipamento e b) exemplificação do comportamento de mergulhar a cabeça (*head dipping*).

Nos mesmos dias (dia 7 e dia 14), os animais foram avaliados por 15min na Caixa de Atividade Automatizada. Neste teste foram registrados automaticamente, minuto a minuto, os parâmetros: locomoção total (em metros), tempo despendido no centro da caixa (70% da área central) e a frequência de verticalizações. A ordem de exposição dos animais aos 2 testes foi determinada por sorteio, sendo estes realizados com 4h de intervalo.

#### **D. Análise dos dados**

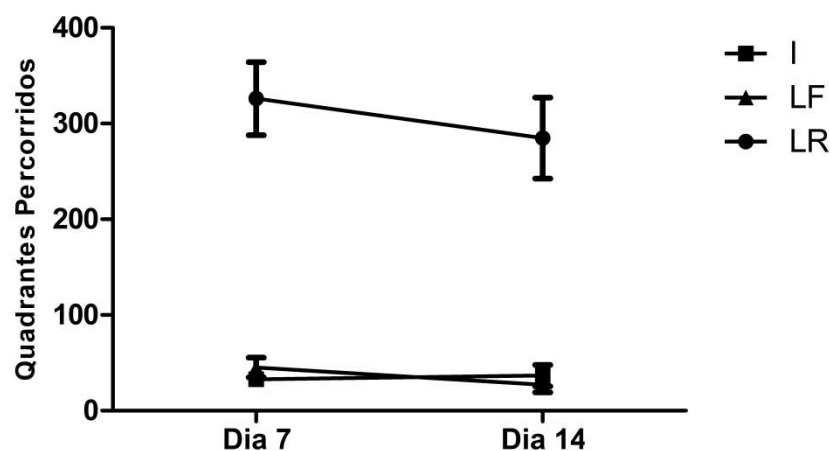
Os parâmetros avaliados por cada um dos dois testes comportamentais (*Endless Maze* e Caixa de Atividade) nos grupos LR, LF e I foram analisados por ANOVAs de medidas repetidas com um fator intra-grupo (medidas do dia 7 e do dia 14) e um fator entre grupos de três níveis (grupos LR, LF e I). Os efeitos estatisticamente significativos foram analisados pelo teste *post-hoc* de Bonferroni – pelo método de combinação de somas residuais de quadrados entre-intra.

Para avaliar a correspondência entre as avaliações da atividade locomotora dos dois testes comportamentais foi realizado o teste de correlação de *Pearson (Product Moment Correlation Distribution)* – entre os dados obtidos em ambos os testes no dia 14 de todos os animais avaliados (LR+LF+I).

## RESULTADOS

### Teste A: *Endless Maze*

Dentre os animais submetidos à lesão eletrolítica do MnR, 4 não desenvolveram hiperatividade locomotora e foram excluídos da amostra, resultando na seguinte composição final dos grupos: LR, n=20; LF, n=10 e I, n=12. Dos 20 animais do grupo LR que desenvolveram hiperatividade, 7 (35%) apresentaram ao menos 4 episódios de queda do *Endless Maze* no dia 7 e foram excluídos da análise deste teste. Dentre os demais animais deste grupo avaliados no mesmo dia (n=13), 7 apresentaram ao menos um episódio de queda. Dentre os animais dos grupos LF e I, 2 animais do grupo LF (20%) e 4 animais do grupo I (33%) caíram ao menos 1 vez da plataforma, mas nenhum apresentou mais de 2 episódios de queda. No dia 14 nenhum animal dos 3 grupos caiu mais de 3 vezes da plataforma, mas 7 (35%) animais do grupo LR, 1 (10%) do grupo LF e 2 (16,67%) do grupo I apresentaram ao menos um episódio de queda.



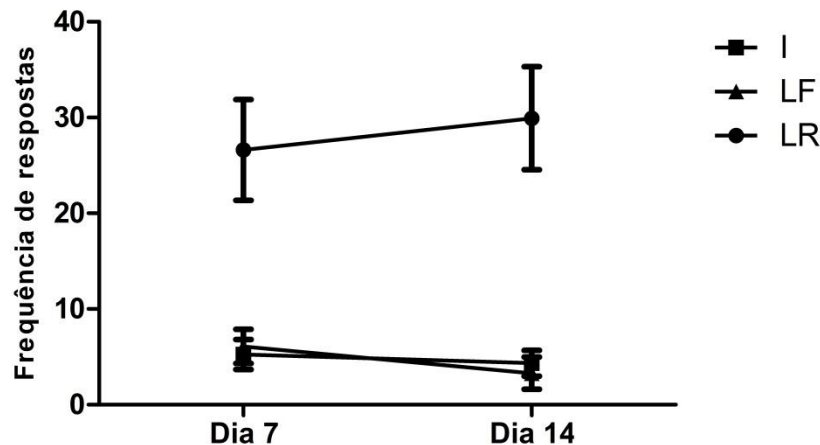
**Figura 7.** Atividade locomotora de ratos no *Endless Maze*. Médias ( $\pm$ EPM) da atividade locomotora (quadrantes percorridos) dos grupos submetidos à lesão do MnR (LR) e seus controles com lesão fictícia (LF) e intactos (I) nas avaliações no sétimo (dia 7) e décimo quarto (dia 14) dias após as cirurgias.

A ANOVA demonstrou diferença significativa no parâmetro locomoção mensurado pelo *Endless Maze* entre os grupos ( $F(2,32)=44,77$ ;  $p<0,001$ ), mas não acusou diferença entre os dias, nem efeito de interação entre os fatores grupo e a medida repetida. Portanto, não houve efeito significativo do tempo sobre a atividade locomotora. A Figura 7 mostra as médias da atividade locomotora expressa em quantidade de quadrantes percorridos pelos



grupos LR, LF e I nos dias 7 e 14. É possível observar que a atividade locomotora é acentuadamente maior no grupo LR em relação aos demais grupos. O teste *post-hoc* Bonferroni acusou diferenças estatisticamente significativas entre o grupo LR e os grupos controles LF e I ( $p < 0,001$ ).

Conforme ilustrado na Figura 8, a frequência do parâmetro *head dipping* também se manteve estável ao longo do tempo. A ANOVA demonstrou diferença significativa entre grupos ( $F(2,32)=17,49$ ;  $p < 0,001$ ), mas não acusou efeito do tempo ou interação entre os fatores grupo e medida repetida. O teste *post-hoc* acusou frequência significativamente maior de *head dippings* no grupo LR em comparação às observadas nos grupos LF e I (Bonferroni,  $p < 0,001$ ).

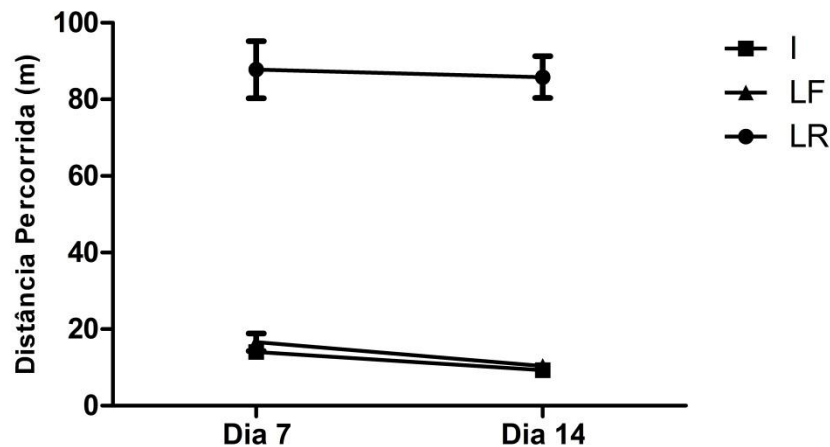


**Figura 8.** *Head dippings* de ratos no *Endless Maze*. Médias ( $\pm$ EPM) da frequência de respostas de mergulhar a cabeça emitidas pelos animais dos grupos submetidos à lesão do MnR (LR), à lesão fictícia (LF) e intactos (I) nas avaliações no sétimo (dia 7) e décimo quarto (dia 14) dias após as cirurgias.

Por fim, a ANOVA da frequência de respostas de limpeza (*grooming*) não indicou diferenças significativas entre os grupos, efeito do tempo ou interação entre os fatores grupo e medidas repetidas.

### Teste B: Caixa de Atividade Automatizada

A ANOVA mostrou diferença significativa no parâmetro locomoção entre os grupos ( $F(2,37)=77,99; p<0,001$ ), mas não acusou efeito do tempo (dias 7 e 14), nem da interação do tempo com os grupos. Assim como no *Endless Maze*, conforme pode ser visualizado na Figura 9, o teste da Caixa de Atividade demonstrou a atividade acentuadamente maior dos animais do grupo LR em comparação aos grupos LF e I. O teste de *post-hoc* Bonferroni acusou diferenças estatisticamente significativas entre o grupo LR e os grupos controles LF e I ( $p<0,001$ ).



**Figura 9.** Atividade locomotora na Caixa de Atividade Automatizada. Médias ( $\pm$ EPM) dos grupos de ratos submetidos à lesão do MnR (LR) e seus controles submetidos à lesão fictícia (LF) e intactos (I) nas sessões ao sétimo (Dia 7) e décimo quarto (Dia 14) dias após as cirurgias.

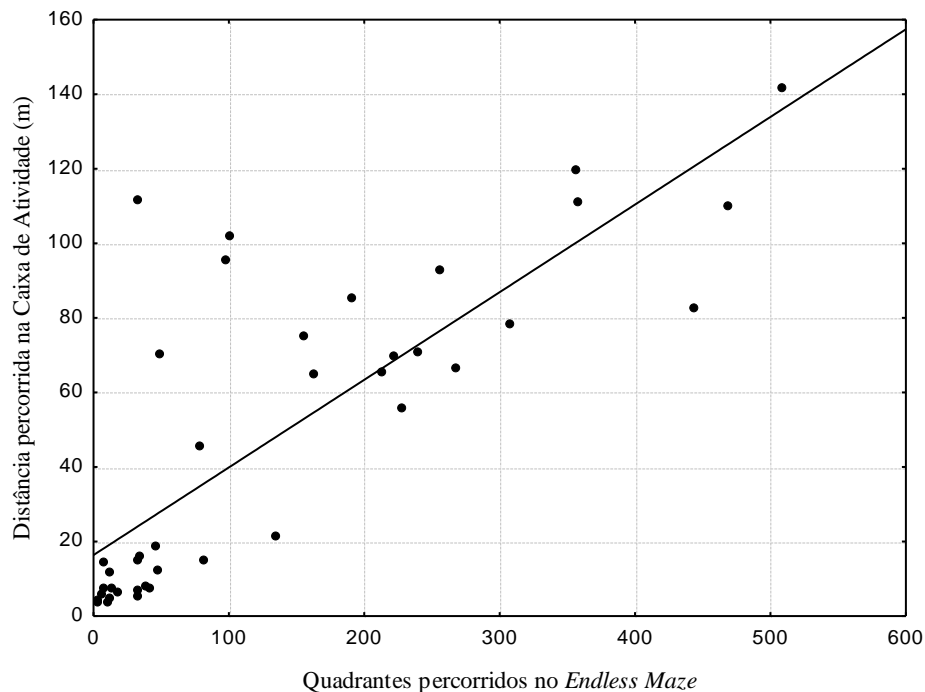
Os dados referentes aos demais parâmetros avaliados neste teste podem ser visualizados na Tabela 4. A ANOVA do parâmetro quantidade de verticalizações não acusou qualquer diferença entre os grupos, tempo ou interação entre fatores, apesar de ter sido levemente menor no grupo LR em relação aos demais na primeira avaliação (dia 7). A ANOVA do parâmetro tempo despendido no centro da caixa acusou diferença significativa entre grupos ( $F(2,37)=4,75; p<0,05$ ), mas ausência de efeito do tempo ou de interação entre os parâmetros grupo e medidas repetidas. A análise *post-hoc* acusou diferença significativa entre o tempo despendido no centro pelo grupo LR em comparação ao grupo intacto (LR x I: Bonferroni,  $p<0,05$ ) e ausência de diferença entre os demais contrastes.

**Tabela 4.** Parâmetros adicionais avaliados no teste da Caixa de Atividade Automatizada. Médias e erro-padrão das médias dos grupos submetidos à lesão eletrolítica do MnR (LR), à lesão fictícia (LF) e intactos (I) aos 7 e 14 dias após a realização das cirurgias.

Grupos	Dia 7			Dia 14		
	LR	LF	I	LR	LF	I
<b>Verticalizações</b>	28,05	42,22	38,00	34,00	30,56	31,27
Média±EPM	±3,40	±5,08	±4,59	±4,42	±6,58	±5,95
<b>Tempo no centro (s)</b>	374,67	315,16	224,76	381,77	229,49	293,47
Média±EPM	±29,24	±43,58	±39,42	±33,61	±50,10	±45,32

### Teste de correlação entre as avaliações dos testes A e B

Foi encontrada uma correlação positiva e significativa entre os dados das avaliações da atividade locomotora no *Endless Maze* e da Caixa de Atividade Automatizada (*Open Field*) realizadas no dia 14 (Pearson:  $r=0.80$ ;  $p<0.05$ ). O diagrama de dispersão mostrado na Figura 10 representa a relação entre os valores obtidos por cada animal nos dois testes.



**Figura 10.** Correlação entre as medidas de atividade locomotora. Dados apresentados em diagrama de dispersão dos valores obtidos nos testes de avaliação da atividade locomotora no *Endless Maze* e na Caixa de Atividade Automatizada dos três grupos (LR+LF+I) aos 14 dias de recuperação pós-cirúrgica. O teste de Pearson revelou correlação positiva e significativa ( $r=0,80$ ;  $p<0,05$ ).

## DISCUSSÃO

Os dados obtidos demonstram que a hiperatividade locomotora e o aumento na frequência de comportamentos de mergulhar a cabeça (*head dipping*) decorrentes da lesão eletrolítica da região do MnR são fenômenos crônicos. Além disso, ficou evidente a facilidade de reprodução destes em laboratório, sendo a lesão um procedimento barato e estas alterações comportamentais facilmente observáveis e mensuráveis. Os dados demonstraram ainda forte correlação entre as avaliações de atividade locomotora dos dois testes utilizados, o que demonstra a validade da medida comportamental realizada no equipamento desenvolvido no laboratório de Neurobiologia da Unesp/Bauru (*Endless Maze*) e permite a comparação dos resultados dos estudos que utilizaram ou se utilizarão futuramente destas duas diferentes ferramentas de mensuração.

Deve-se considerar que a inativação do MnR por procedimentos diversos produz diferentes alterações sobre os índices de locomoção, conforme pode ser visualizado na Figura 11 – extraída do artigo publicado por Asin e Fibiger (1983). A figura ilustra a comparação das alterações na atividade locomotora induzidas por diferentes procedimentos em grupos de ratos: a) lesão eletrolítica (*electrolytic*); b) lesão neurotóxica específica para neurônios serotoninérgicos (5,7 dihidroxitriptamina/DHT), c) lesão neurotóxica não específica por ácido ibotênico (*ibotenic*) e d) respectivos grupos controles submetidos à lesão fictícia (*control*), injeção dos veículos das neurotoxinas ascorbato (*ascorbate*) ou tampão fosfato (*phos. buff.*). Nota-se que o efeito da lesão eletrolítica sobre a atividade locomotora é superior ao induzido pela lesão neurotóxica não específica – o que sugere que a maior intensidade da hiperatividade induzida por esta estratégia de lesão pode decorrer da somatória do efeito da inativação de diferentes porções do MnR, de diferentes grupos neuronais e possivelmente da destruição de estruturas adicionais como fibras de passagem ou neurônios de regiões adjacentes.

A exarcebação adicional da atividade locomotora decorrente do procedimento de lesão eletrolítica do MnR, juntamente com outros efeitos comportamentais induzidos exclusivamente as por este tipo de procedimento – como déficits de aprendizagem (Asin et al., 1985), alteração na frequências de exposição ao risco e estereotipia (Andrade & Graeff, 2001; Hoshino et al., 2004) – justificam a escolha pela inativação por eletrocoagulação não específica da região estudada nesta pesquisa. A investigação da ocorrência do conjunto de efeitos comportamentais decorrentes de um único procedimento experimental pode ser considerada como ponto de partida necessário à comparação com quadro maníaco humano –

o estabelecimento da validade de face justificaria então a identificação de diferentes mecanismos responsáveis por efeitos específicos.

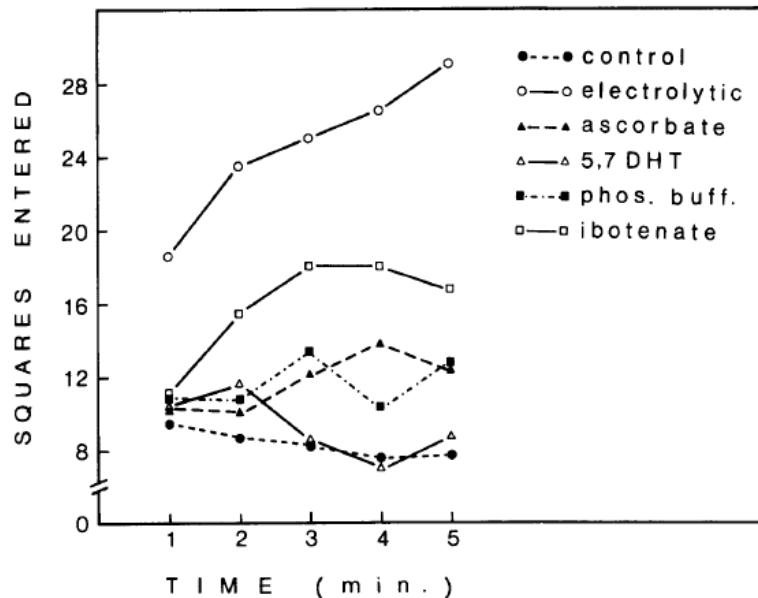


Fig. 3. Mean number of squares entered by each group of rats for each minute of a 5 min open field activity test.

**Figura 11.** Alterações na atividade locomotora induzidas por diferentes procedimentos de lesão do MnR em ratos, extraída de Asin e Fibiger (1983). Os eixos correspondem à quantidade de quadrantes percorridos (Y) e o decorrer do tempo da sessão de avaliação no campo aberto em intervalos de cinco minutos (X). Os símbolos interligados por linhas no gráfico representam o desempenho dos animais submetidos às seguintes condições experimentais: a) lesão eletrolítica (*electrolytic*); b) lesão neurotóxica específica para neurônios serotoninérgicos (5,7 dihidroxitriptamina/DHT), c) lesão neurotóxica não específica por ácido ibotênico (*ibotenic*) e d) nos grupos controles submetidos à lesão fictícia (control), injeção de ascorbato (*ascorbate*) ou injeção de tampão fosfato (*phos. buff.*).

A permanência da hiperatividade locomotora do grupo LR ao longo do tempo (dias 7 e 14) pode ser considerada indicadora da cronicidade dos efeitos da lesão, o que sugere a possibilidade do seu uso para avaliar os efeitos de tratamentos farmacológicos e comportamentais continuados – o que torna a hipótese da correspondência com o quadro maníaco relevante, se considerados os comportamentos passageiros observados em grande parte dos modelos de mania desenvolvidos até o momento. A constatação da cronicidade dos efeitos da lesão do MnR também sugere adicional argumento à validade de face ao episódio maníaco e vantagem em relação a outros modelos existentes por atender ao critério diagnóstico de persistência temporal mínima de uma semana de ocorrência dos sintomas (APA, 1994).

No que se refere ao *head dipping*, o aumento na frequência desta categoria topográfica de respostas também induzida pelo procedimento de lesão eletrolítica do MnR corrobora os achados de Hoshino et al. (2004). Além do aumento na frequência do responder, é ainda possível classificar o *head dipping* como um padrão estereotipado com base em suas características observadas: padrão repetitivo, sem função aparente e com constância topográfica (O'Donnell & Gould, 2007). Sendo assim, os dados sugerem que a lesão eletrolítica do MnR é capaz de induzir estereotipia em ratos, sendo este um segundo padrão de comportamento constituinte do quadro maníaco esperado em animais de laboratório.

O registro de maior tempo de permanência na área delimitada como centro da Caixa de Atividade pelos animais LR em relação aos intactos (I) pode ser indicativo de maior duração de exposição à condição aversiva (exposição ao “risco”). Entretanto, a ausência de diferença em relação ao grupo LF traz a necessidade de investigações adicionais. A delimitação da área central (70%) também pode ter interferido nos resultados obtidos, o que sugere a necessidade da comparação entre diferentes percentuais de delimitação que excluam a possibilidade de passagem ou permanência acidental do animal em parte da área considerada “central” do quadrilátero em virtude do percurso na proximidade das arestas do equipamento.

Por fim, ausência de diferenças entre os grupos controles submetidos à lesão fictícia e intactos em todos os parâmetros avaliados demonstra que o procedimento cirúrgico *per se* não produziu qualquer alteração de comportamento. Pode-se afirmar, portanto, que a hiperatividade locomotora e a alta frequência de comportamentos estereotipados (*head dipping*) observados nos animais do grupo LR decorreu da eletrocoagulação produzida a partir da inserção do eletrodo e passagem da corrente nas coordenadas indicativas da localização do MnR.

## **EXPERIMENTO 2**

### **Efeito do tratamento crônico com lítio sobre a hiperatividade locomotora induzida pela lesão eletrolítica da região do MnR**

#### **OBJETIVO ESPECÍFICO**

O objetivo deste experimento é avaliar o efeito do lítio sobre a hiperatividade locomotora induzida pela lesão da região do MnR.

#### **MÉTODOS**

##### **A. Animais**

Foram utilizados 44 ratos, distribuídos em 2 grupos, sendo os animais de um dos grupos submetidos à lesão eletrolítica da região do MnR (grupo LR, n=27) e o restante dos animais submetido à lesão fictícia, constituindo o grupo controle (grupo LF, n=17). A ausência de diferenças significativas entre a atividade locomotora dos grupos controles submetidos à lesão fictícia (LF) e intacto (I) no Experimento 1 isentou a necessidade deste segundo grupo controle no presente experimento.

##### **B. Equipamento**

Duas Caixas de Atividade de Campo Aberto (ENV-515) em policarbonato acrílico transparente, de medidas 42,5 x 42,5 x 30,5cm (Med- Associates, Georgia,VT, EUA). O controle das sessões experimentais e o registro dos dados foram feitos através de um computador IBM conectado às interfaces das caixas.

##### **C. Fármaco**

Carbonato de Lítio (Carbolitium®/Eurofarma).

##### **D. Procedimentos**

1) Teste 1- linha de base (LB): os animais foram transferidos gentilmente para a caixa de medida da atividade e a locomoção espontânea computada por 15 minutos contínuos, sendo a ordem dos animais testados estabelecida aleatoriamente por sorteio.

2) Tratamento com carbonato de lítio ou solução salina: aproximadamente metade dos animais do grupo LR e do grupo LF foram tratados por 10 dias com carbonato de lítio

( $\text{Li}_2\text{CO}_3$ ; 47,5mg/Kg/dia, referente a 1,29mEq/kg) diluído em solução salina (0,9%) acidificada para neutralização do pH (ajustado para 7,4 pela adição de HCl) (Armani, 2010; Armani et.al, 2012). O tratamento com este fármaco foi dividido em duas doses diárias, administradas intraperitonealmente em intervalos de 12 horas (9h e 21h). O restante dos animais dos dois grupos foi tratado com administração intraperitoneal de volumes correspondentes de solução salina nos mesmos horários.

3) Teste 2 – Pós-teste (PT): no décimo dia de tratamento a atividade locomotora foi reavaliada, seguindo o mesmo procedimento do Teste 1 (LB). Neste dia, os animais receberam os tratamentos e foram testados após intervalo padronizado de tempo (Armani, 2010; Armani et al., 2012) de duas horas após a última injeção.

### **E. Análise dos dados**

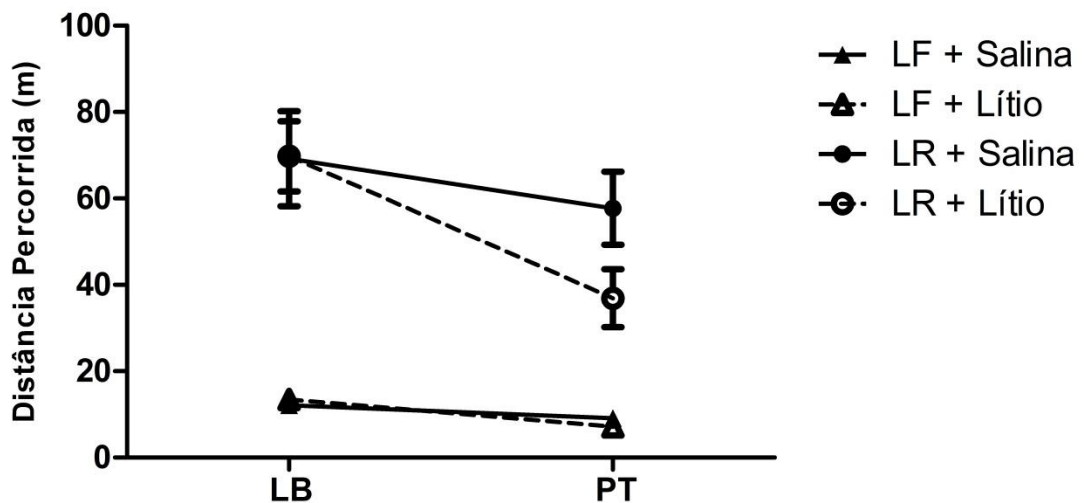
A atividade locomotora dos grupos foi avaliada por uma ANOVA fatorial de medidas repetidas – tendo como variáveis independentes os fatores grupo (LR e LF) e tratamento (salina ou lítio) e como variáveis dependentes as medidas repetidas (avaliação inicial e pós-teste). Os efeitos estatisticamente significativos foram analisados pelo teste *post-hoc* de Bonferroni.



## RESULTADOS

Dentre os animais submetidos ao procedimento de lesão eletrolítica do MnR, 6 não desenvolveram hiperatividade locomotora e foram excluídos da amostra, resultando na seguinte composição dos grupos: LF+Salina, n=8; LF+Lítio, n=9; LR+Salina, n=11 e LR+Lítio, n=10.

A Figura 12 mostra as médias da atividade locomotora dos grupos LR e LF tratados com carbonato de lítio e solução salina, tanto nas condições de linha de base (LB) como no pós teste seguido à administração crônica do carbonato de lítio (PT). A ANOVA fatorial de medidas repetidas da atividade locomotora acusou efeito do grupo (LR x LF) ( $F(1,34)=56,49$ ;  $p<0,001$ ), efeito do tempo ( $F(1,34)=20,28$ ;  $p<0,001$ ), interação entre tempo e grupo ( $F(1,34)=8,60$ ;  $p<0,01$ ), interação entre tempo e tratamento ( $F(1,34)=4,28$ ;  $p<0,05$ ) e ausência de interação entre os fatores tempo, grupo e tratamento. Logo, assume-se que houve diferença significativa nos níveis de atividade locomotora entre os grupos e que houve alteração da distância percorrida no decorrer do tempo (LB x PT) em função do grupo (LR x LF) e do tratamento (salina x lítio), mas que o efeito do tratamento não foi específico em relação a determinado grupo.



**Figura 12.** Efeito do lítio sobre a atividade locomotora de ratos submetidos à lesão do MnR. Os valores representam as médias ( $\pm$ EPM) da atividade locomotora (distância percorrida em metros) dos grupos tratados com lítio (LR-Lítio e LF-Lítio) ou com salina (LR-Salina LF-Salina) nas sessões de linha de base (LB) e décimo dia de tratamento, o pós-teste (PT).

Assim, como pode ser visualizado na Figura 12, as médias da atividade locomotora foram maiores nos grupos com lesão do MnR do que nos grupos com lesão fictícia (LR x LF:

Bonferroni,  $p < 0,001$ ). Observa-se também que os animais do grupo LR tratados tanto com lítio quanto com salina sofreram diminuição da atividade locomotora (grupo LR, comparação entre BL x PT: Bonferroni,  $p < 0,001$ ), e que houve efeito adicional porém não específico do tratamento com lítio sobre o grupo LR (animais LR e LF tratados com lítio, BL x PT: Bonferroni,  $p < 0,001$ ).

## DISCUSSÃO

O aumento significativo da atividade locomotora constatada nos animais submetidos à lesão do MnR é um fenômeno consistentemente demonstrado, tendo sido utilizado como critério de inclusão na amostra (De Paula, Uga, & Hoshino, 2000; Jacobs et al., 1974; Wirtshafter et al., 1986). O resultado principal obtido no presente estudo mostra que o aumento da atividade locomotora induzido pela lesão do MnR sofreu redução adicional após administração crônica de lítio em comparação ao grupo de animais lesionados tratado com salina. Este dado permite constatar o potencial valor preditivo da inativação do MnR como modelo animal de mania, o que adicionaria evidência à suposição de que a lesão induz hiperatividade de mesma natureza que as induzidas em outros modelos experimentais aceitos deste transtorno (Einat, 2006; Flaisher-Grinberg & Einat, 2010; Gessa et al., 1995).

A falta de interação estatisticamente significativa entre os fatores grupo, medidas repetidas e efeito do tratamento, quando considerada isoladamente, indica ineficácia terapêutica do lítio em reverter ou atenuar especificamente os efeitos da lesão do MnR e ameaça a afirmação de valor preditivo do modelo experimental em questão. Este dado, por ser fundamental para a conclusão do presente trabalho, precisa ser analisado com cuidado, uma vez que é contraditório aos mostrados pela literatura. Primeiro, é preciso considerar que a falta de significância estatística na análise em questão mostra decorrer, ao menos parcialmente, do abaixamento da média do grupo LR tratado com salina, como se pode constatar na comparação com o valor da sua linha de base. Este fato pode ser atribuído à adaptação do organismo à lesão, efeito descrito por Jacobs et al. (1974), ou à habituação à novidade da situação na re-exposição dos animais ao teste, fenômeno que é bastante conhecido. Embora tais fatores também tenham afetado os animais do grupo LR tratados com lítio, uma redução adicional devida à ação do fármaco é inegável. Segundo, a magnitude do efeito do lítio sobre a atividade do grupo LR+Lítio pode ter sido reduzida por questões relacionadas à eficácia inerentes ao tratamento utilizado. Isto porque o tratamento com lítio não tem eficiência completa e universal, mostrando-se ineficaz, enquanto monoterapia na redução de sintomas maníacos, em cerca de 25% a 30% dos pacientes (Stokes et al., 1971; Storosum et al., 2007). Esta limitação terapêutica é, justamente, o propósito para a procura de modelos animais que possam auxiliar na busca de novos tratamentos mais eficazes. Estes dados de eficácia também se aplicam ao contexto experimental, já que a própria literatura registra a obtenção de êxito relativamente baixo ou mesmo contraditório quanto à eficácia do

lítio em reduzir a hiperatividade induzida em ratos e camundongos com o uso de psicoestimulantes, conforme evidenciado na revisão de O'Donnell e Gould (2007).

Adicionalmente, duas categorias de problemas referentes ao tratamento por lítio descritas na literatura se encaixam no rol das interpretações aventadas para explicar a ausência de especificidade de ação do fármaco observada: a) a variabilidade do efeito do lítio inter-sujeitos, visível na magnitude dos erros-padrão e b) a adequação da dose de lítio administrada no experimento. No que se refere à variabilidade inter-sujeitos, deve-se considerar que a metabolização do lítio é diversificada, podendo a mesma dosagem resultar em diferentes valores séricos, denominados litemias. Esta diversidade de efeitos entre sujeitos, espécies e linhagens de roedores, juntamente com a instabilidade de doses utilizadas – que variam a cada pesquisa – também são apontadas na revisão realizada por O'Donnell e Gould (2007) como responsáveis pelas inconsistências nos resultados de tratamento crônico com lítio em animais de laboratório. Estudos sugerem que doses séricas terapêuticas de lítio em roedores para administração intraperitoneal ou subcutânea diferem da dosagem humana (entre 0,5 e 1,2 mEq/kg), sendo obtidas com doses entre 1,5 e 3 mEq/kg para camundongos e entre 0,8 a 1,3 mEq/Kg para ratos (Blount et al., 2010; O'Donnell & Gould, 2007). Considerando esta estreita janela terapêutica do lítio e a variabilidade de metabolização do íon, doses padronizadas por peso podem resultar tanto em efeito nulo, quanto terapêutico ou tóxico em diferentes animais de uma mesma linhagem (O'Donnell & Gould, 2007). Logo, apesar de a dose de lítio utilizada no tratamento dos animais da presente pesquisa ter sido de 1,29mEq/kg por dia, estando dentro da suposta janela terapêutica sugerida para ratos, esta pode ter sido inadequada se considerada a generalidade dos estudos anteriores que impedem que em ratos se conheçam as diferenças entre as diversas linhagens. Esta dificuldade de controle experimental pode ter resultado na ineficácia ou eficácia reduzida da dose utilizada em alguns animais. O risco de intoxicação também é um importante fator a ser considerado, podendo se tornar crítico quando o parâmetro avaliado é a atividade locomotora, uma vez que resulta em sonolência e letargia (Kaplan et al., 1997) – podendo acusar valores falso-positivos em relação à eficácia da droga e comprometer a especificidade do efeito observado.

O pouco conhecimento acerca dos mecanismos de ação do lítio reduz as possibilidades de previsão dos efeitos da administração crônica em animais submetidos à inativação do MnR. Além da ação do lítio sobre os sistemas noradrenérgico e dopaminérgico, as propriedades antidepressivas do lítio somadas a dados de pesquisas (Bourin et al., 1996; Scheuch et al., 2010; Subhash et al., 1999) fornecem indícios do envolvimento do sistema serotoninérgico central, do qual o MnR faz parte, na eficácia desta droga. Scheuch et al. (2010),

por exemplo, investigaram os efeitos do cloreto de lítio (LiCl, 1mM) na neurotransmissão serotoninérgica proveniente dos núcleos da rafe em ratos. Os tratamentos agudos e os prolongados (8h e 14 dias) resultaram respectivamente em 20% e 23% de aumento na liberação de 5-HT, mas não influenciaram na absorção ou na recaptação deste neurotransmissor. Os resultados demonstraram também que o lítio pode modificar a expressão gênica de triptofano hidroxilase 2 (TPH2) – enzima limitante de biossíntese de 5HT – resultando em 45% de redução de TPH2mRNA e 31% de redução dos níveis protéicos de TPH2. Logo, se o efeito do lítio está ao menos parcialmente relacionado ao aumento de disponibilidade de 5-HT nos núcleos da rafe, é possível admitir que parte de sua ação fica excluída nos animais lesionados no MnR. Em tal caso, a ação do lítio que se expressa com a intermediação da neurotransmissão dopaminérgica e/ou noradrenérgica (Gorenstein & Scavone, 1999) pode ser a responsável pela redução observada no presente experimento. Esta possibilidade é fortalecida pelos dados anteriores que demonstram a efetividade de drogas que agem sobre tais sistemas (bloqueadores de receptores dopaminérgicos e inibidor da biossíntese de catecolaminas) na redução da hiperatividade locomotora induzida pela lesão eletrolítica do MnR (Haloperidol, Clorpromazina e Alfa-metil-p-tirosina) (Yamamoto & Ueki, 1978) ou da reversão dos efeitos da inativação do MnR pela estimulação de autoreceptores gabaérgicos pelo antagonista dopaminérgico SCH 23390 (Liu & Ikemoto, 2007; Vollrath-Smith et al., 2012).

Com base nestas considerações é possível concluir que o tratamento crônico com lítio demonstrou ser potencialmente eficaz em reduzir a hiperatividade locomotora induzida pela lesão eletrolítica do MnR. Entretanto, dificuldades relacionadas à utilização deste íon em condições experimentais (possibilidade de efeito tóxico, diversidade de metabolização intersujeitos, dificuldade de estabelecimento de dosagem terapêutica para diferentes espécies e linhagens de roedores) sugerem a necessidade de investigações adicionais acrescidas de maior controle experimental (ex. utilização de linhagem previamente avaliada quanto aos valores terapêuticos não tóxicos e mensuração de níveis séricos e/ou encefálicos de lítio).

## EXPERIMENTO 3

### **Avaliação comportamental dos efeitos da lesão eletrolítica da região do MnR sobre o responder positivamente reforçado e sobre o valor reforçador dos estímulos**

#### **OBJETIVO ESPECÍFICO**

Avaliar os efeitos da lesão eletrolítica da região no MnR em ratos sobre a taxa de respostas emitidas em um esquema simples de reforçamento positivo e sobre o desempenho em esquema de razão progressiva, utilizando um delineamento experimental que permite uma medida de controle do efeito da hiperatividade locomotora decorrente da lesão.

#### **MÉTODO**

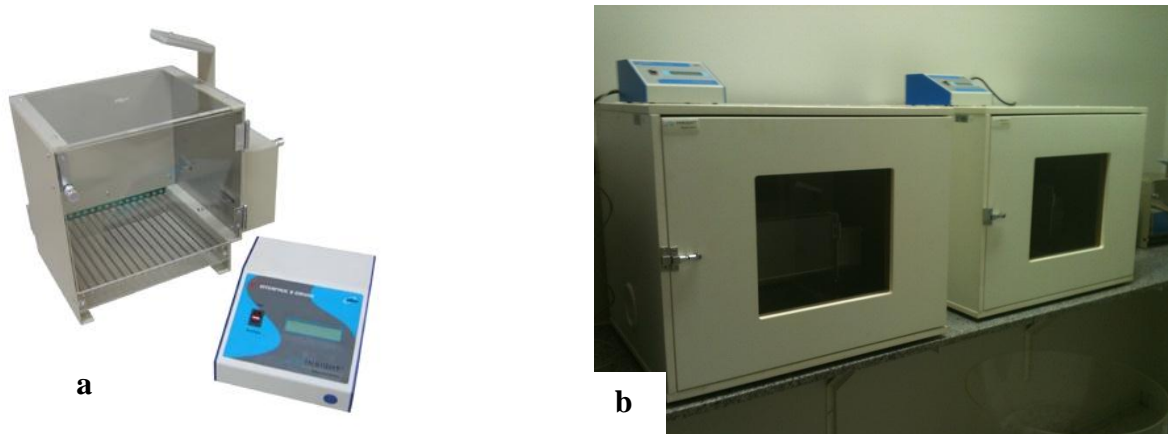
##### **A. Animais**

Foram utilizados 32 ratos, distribuídos em 3 grupos: dos animais submetidos à lesão eletrolítica da região do MnR (LR, n=12), dos animais submetido à lesão fictícia (LF, n=10) e controle intacto isento de qualquer cirurgia (I, n=10). A realização do experimento foi dividida em 3 blocos de 10 animais, sempre compostos por representantes dos 3 grupos. Nas fases de adaptação ao laboratório e recuperação pós cirúrgica água e ração comercial foram disponibilizadas *ad libitum*. Na fase de treino e de administração auto-regulada os animais foram submetidos à restrição alimentar – sendo a ração comercial disponibilizada diariamente por um período limitado de 30min (15min após as sessões). Durante a restrição alimentar a água continuou sendo livremente disponibilizada.

##### **B. Equipamentos**

Duas caixas de condicionamento operante de 2 barras de fabricação Insight (Ribeirão Preto, SP, Brasil) – modelo EP102 (Figura 13) – de dimensões 340 x 205 x 325 mm (altura x largura x comprimento). Na parte direita, cada caixa possuía duas barras (barra da direita e barra da esquerda) de 4 x 0,5cm, distantes 8cm e a 8cm de altura do chão. Ao chão, no centro das barras encontrava-se o bebedouro. Três centímetros acima de cada barra havia uma luz de estímulo. O reforçador foi administrado por meio do bebedouro, de capacidade de 0,01ml. As caixas foram isoladas acusticamente por meio de 2 *boxes* de isolamento Insight – modelo

EP121 – com ventilador para exaustão e circulação de ar interno e porta frontal com janela de vidro, para visualização do interior. O funcionamento do equipamento e registro das respostas foi feito por um computador, conectado à interface por cabos USB e programa de condicionamento operante Refor II modelo EP162 (Insight, Ribeirão Preto, SP, Brasil).



**Figura 13.** Equipamento utilizado para as medidas comportamentais no Experimento 3. a) Exemplificação da caixa de condicionamento operante (Insight, modelo EP102). Fotografia retirada do endereço eletrônico: <http://insightltda.com.br/> b) Instalação dos equipamentos no laboratório, onde as caixas de condicionamento foram isoladas acusticamente por meio de duas caixas (*boxes* de isolamento Insight, modelo EP121).

### C. Procedimentos

1- Treino: os animais foram submetidos à restrição alimentar e, ao segundo dia, deu-se início ao procedimento de modelagem da resposta de pressão à barra. Nestas sessões a consequência oferecida foi solução de água com sacarose a 5%. As sessões tiveram duração variável entre 30 e 180min, sendo encerradas após a emissão de 300 respostas de pressão à barra ativa (direita) ou 15min de inatividade após aprendizagem, indicativa de saciação. Nestas sessões de treino e nas demais fases, pressões na barra inativa (esquerda) não tiveram consequências programadas.

2 – Reforçamento contínuo (CRF – dias 1 a 3): para estabilização do responder, os animais foram submetidos a 3 sessões em CRF em dias consecutivos, com 60min de duração. Nestas, cada resposta de pressão à barra ativa (direita) era seguida da ativação da luz acima desta por 1s para sinalizar de forma imediata a apresentação do reforço e da ativação do bebedouro, que disponibilizava acesso a uma gota da solução de água com sacarose a 10%.

3- Razão Fixa 2 (FR2 – dias 4 a 7): após as sessões em CRF os animais foram submetidos a sessões em FR2 por quatro dias consecutivos. Estas sessões também tiveram

duração fixa de 60min, mas era exigida a emissão de duas respostas na barra ativa (direita) para ativação da luz acima do bebedouro, que disponibilizava solução de água com sacarose a 10%. Foram registradas as respostas na barra ativa (direita) e inativa (esquerda).

4- Razão Progressiva (PR – dias 8 a 10): nesta fase o número de respostas exigidas para ativação da luz  $S^D$  e disponibilização da solução de água com sacarose a 10% por meio do bebedouro aumentou progressivamente em valor fixo (4 respostas) (Hodos, 1961). Ou seja, exigiu-se que cada animal emitisse 2,6,10,14,18,22,26,30,34,38,42,46,50,54,58,62,... $\alpha$  respostas na barra ativa (direita) para a disponibilização do reforço. Todas as sessões foram realizadas no mesmo horário, por 3 dias consecutivos. A sessão era encerrada após 5min de inatividade ou quanto atingido o tempo máximo de 120min. As respostas emitidas nas duas barras foram computadas.

#### **D. Análise dos dados**

As frequências de respostas emitidas nas barras ativa (direita) e inativa (esquerda) nas sessões em FR2 foram contabilizadas em termos de taxa de respostas (número total de respostas dividido pelo tempo total das sessões). As médias das taxas de respostas em cada uma das barras nos 4 dias de coleta foram separadamente analisadas por ANOVAs com um fator entre grupos de três níveis (grupos LR, LF e I).

Nas sessões em PR foi considerado como índice do valor reforçador do estímulo (solução de sacarose), a última razão completada antes de 5min de inatividade ou como última razão completada no tempo máximo da sessão, também denominado *Break Point* ou ponto de corte (BP) (Hodos, 1961; Mobini, Chiang, Ho, Bradshaw, & Szabadi, 2000). A média dos BPs de cada animal nos 3 dias de coleta também foi analisada por uma ANOVA com um fator entre grupos de três níveis (grupos LR, LF e I).

Em todas as análises os efeitos estatisticamente significativos foram analisados pelo teste *post-hoc* de Bonferroni.

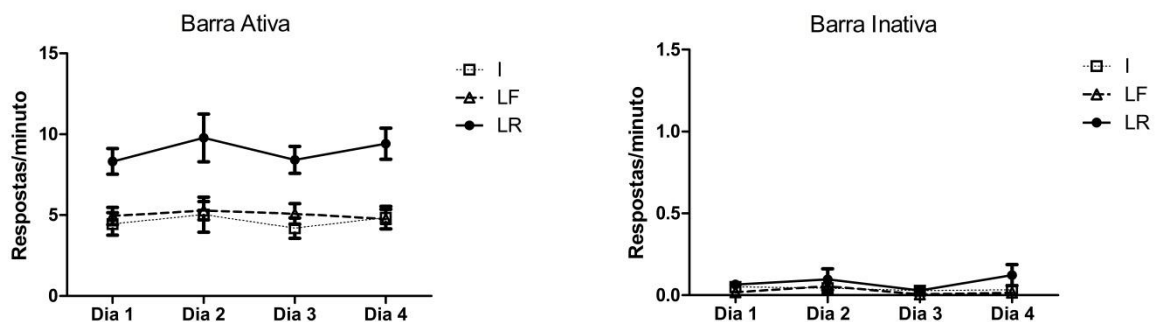


## RESULTADOS

Dentre os animais submetidos ao procedimento de lesão eletrolítica do MnR, dois não desenvolveram hiperatividade locomotora e foram excluídos da amostra, resultando na seguinte composição dos grupos: I, n=10; LF, n=10 e LR, n=10.

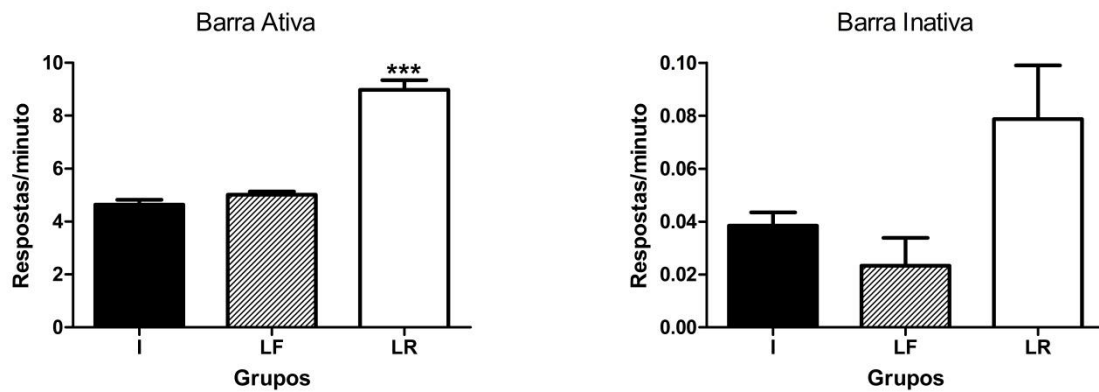
### A. Taxa de respostas em Razão Fixa 2 (FR2)

As taxas de respostas dia-a-dia emitidas pelos animais dos três grupos nas barras ativa e inativa podem ser observadas nos gráfico na Figura 14. Nota-se que a taxa de respostas do grupo LR na barra ativa foi superior a dos demais grupos nos diferentes dias de avaliação. A análise das médias das taxas de respostas de todos os dias na barra ativa demonstrou diferença estatisticamente significativa entre grupos ( $F(2, 27)=11,80, p<0,001$ ) – conforme pode ser observado na Figura 15.



**Figura 14.** Taxa de respostas nas barras ativa em Razão Fixa (FR2) e inativa ao longo dos dias. Os valores representam as médias diárias ( $\pm$ EPM) das taxas de respostas de ratos submetidos à lesão eletrolítica do MnR (LR) e dos grupos controles submetidos à lesão fictícia (LF) e íntegros (I) em quatro dias consecutivos de avaliação.

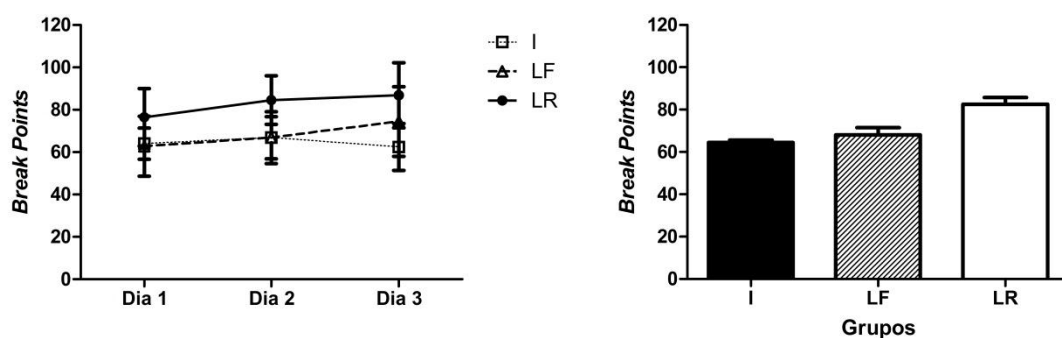
A taxa de respostas na barra inativa (direita) foi próxima a zero em todas as sessões desta fase. Nota-se a partir da visualização da Figura 15, que a comparação das médias das taxas de respostas nos quatro dias não revelou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ( $F(2, 27)=2,49, p=0,10$ ), apesar de ser ligeiramente maior nos animais do grupo LR.



**Figura 15.** Média das taxas de respostas nas barras ativa em Razão Fixa (FR2) e inativa. Médias ( $\pm$ EPM) das taxas de respostas dos quatro dias de avaliação de ratos submetidos à lesão do MnR (LR) e dos grupos controles submetidos à lesão fictícia (LF) e intactos (I). \*\*\* $p < 0.001$  para diferenças da atividade dos grupos LR em relação aos grupos LF e I.

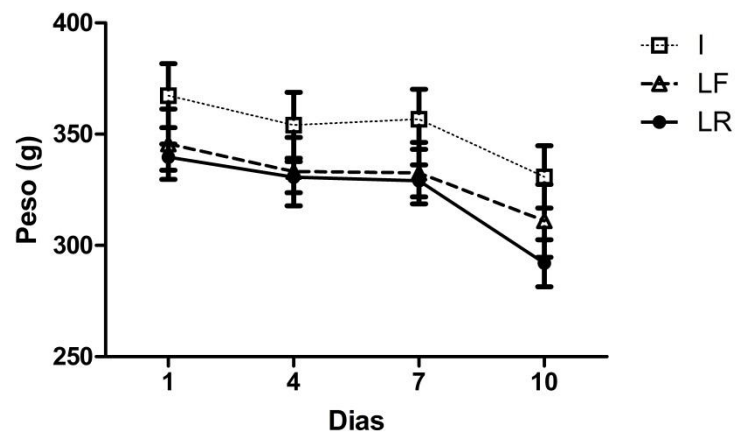
### B. Avaliação do valor reforçador da solução de sacarose (10%)

As médias dos valores dos *Break Points* atingidos pelos três grupos em cada uma das três sessões consecutivas realizadas em Razão Progressiva (PR) podem ser visualizadas na Figura 16. A análise das médias dos *Break Points* de todos os dias não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre grupos, apesar dos maiores valores alcançados pelo grupo LR ( $F(2, 27) = 0,772$ ,  $p = 0,496$ ). A comparação entre as médias dos *Break Points* também se encontra na Figura 16.



**Figura 16.** *Break Points* em Razão Progressiva em dias consecutivos e médias dos valores dos *Break Points* obtidos nos três dias de teste. Médias ( $\pm$ EPM) da última razão completada antes de cinco minutos de inatividade do animal ou última razão completada na sessão dos grupos submetidos à lesão real do núcleo mediano da rafe (LR), à lesão fictícia (LF) e intacto (I).

Os dados de acompanhamento do peso dos animais ao longo do experimento podem ser visualizados na Figura 17. Nesta é possível visualizar que os grupos de animais submetidos ao procedimento cirúrgico (real ou fictício) apresentam menores valores de peso inicial. Nota-se também que os três grupos sofreram alterações equivalentes e sem diferenças significativas (entre-grupos) no peso no decorrer dos dias de treino e teste: sofreram perda de peso inicial nos primeiros dias de restrição alimentar e sessões em CRF (dias 1 a 3), seguida por manutenção do peso no decorrer dos dias em que ocorreram as sessões em FR2 (dias 4 a 7) e perda acentuada de peso no decorrer dos dias em que foram realizadas as sessões em PR (dias 8 a 10).



**Figura 17.** Acompanhamento do peso dos animais dos grupos intacto (I), lesão fictícia (LF) e lesão real do MnR (LR) no decorrer das sessões operantes realizadas no experimento 3. Valores expressos em média ( $\pm$ EPM) do peso em gramas (g) nos dias em que foram realizadas as sessões em reforçamento contínuo/CRF (dias 1 a 3), em razão fixa/FR2 (dias 4 a 7) e em razão progressiva/PR (dias 8 a 10).

A perda de peso nesta última etapa em que foram realizadas as sessões em PR merece destaque, uma vez que cinco animais (I=3 e LR=2) apresentaram perda de peso superior a 15% e outros dois animais do grupo LR apresentaram perda superior a 20% em relação ao peso inicial. Este segundo percentual de emagrecimento (20%) foi acompanhado de sinais de adoecimento dos animais (letargia e postura curvada) e justificaram a finalização do experimento ao terceiro dia de sessões em PR.

## DISCUSSÃO

Os resultados aqui descritos são consistentes com publicações anteriores acerca do aumento no consumo de sacarose em ratos submetidos a diferentes procedimentos de inativação do MnR (Pezzato et al., 2003; Wirtshafter et al., 2011; Wogar et al., 1991). Os dados obtidos nas sessões em que o reforçador foi disponibilizado contingentemente à emissão de respostas em razão fixa (FR2) demonstram que a lesão eletrolítica da região do MnR aumentou a taxa de respostas positivamente reforçadas por solução de sacarose (10%) – demonstrando o efeito deste método de lesão sobre o consumo e sobre a emissão de respostas conseqüenciadas por esta solução. O aumento na frequência de respostas positivamente reforçadas é também compatível com publicações recentes que sugerem o envolvimento de neurônios deste núcleo (via receptores GABA<sub>A</sub> e GABA<sub>B</sub>) na modulação do circuito de recompensa dopaminérgico (Liu & Ikemoto, 2007; Vollrath-Smith et al., 2012).

Uma hipótese explicativa da maior taxa de respostas de pressão à barra emitida pelos animais do grupo LR seria de tal alteração apenas refletir o aumento da frequência geral de respostas decorrentes da lesão do MnR. Este problema esteve presente em pesquisas anteriores quando o consumo de sacarose foi avaliado na gaiola viveiro ou em condições de condicionamento operante em que apenas uma barra era disponibilizada (Pezzato et al., 2003; Pezzato & Hoshino, 2004) – justificando a necessidade da continuidade de investigações utilizando-se de estratégias de controle experimental do efeito da hiperatividade. Neste sentido, o delineamento utilizado no presente experimento (disponibilização de duas barras: ativa e inativa) permite constatar que os valores próximos a zero e a ausência de diferenças significativas entre grupos no que se refere à taxa de pressões à barra inativa permitem afirmar que a maior frequência de respostas emitidas pelos animais com lesão real na barra ativa ocorre sob controle das conseqüências produzidas (acesso à solução de sacarose), e não é simplesmente decorrente do aumento geral da atividade dos animais.

Outra explicação alternativa seria de o maior consumo de solução açucarada decorrer da maior necessidade energética devido à hiperatividade locomotora presente nos animais do grupo LR. Contudo, a manutenção do peso em todos os grupos no decorrer dos dias 3 a 7 (em que foram realizadas as sessões em FR2) permite afirmar que os animais dos três grupos estavam submetidos a condições equivalentes de restrição energética, a despeito de diferenças na demanda. Logo, a estratégia de restrição alimentar utilizada no experimento somada ao consumo da solução de sacarose durante as sessões parece ter sido adequada para manutenção de condições semelhantes no que se refere à necessidade de obtenção de alimento/açúcar.

Outra evidência que nega esta explicação é a capacidade da inativação do MnR produzir aumento da frequência de respostas operantes mesmo quando o estímulo reforçador utilizado independe de privação energética, como é o caso do estímulo de luz incondicionado utilizado por Vollrath-Smith et al. (2012) ou condicionado utilizado por Fletcher et al. (1999).

Em resumo, a maior frequência de respostas de pressão à barra ativa para obtenção de solução de sacarose (10%) emitida pelos animais do grupo LR, em comparação aos controles – juntamente com dados de pesquisas anteriores – pode ser interpretado como uma relevante similaridade comportamental entre os efeitos da lesão eletrolítica do MnR e o sintoma do quadro maníaco esperado em animais de laboratório, descrito por Einat (2006), de aumento na frequência de comportamentos “direcionados” a estímulos apetitivos (comportamentos “hedônicos”).

A ausência de diferenças significativas nos *Break Points* entre os grupos nas sessões em Razão Progressiva parecem contrários aos dados obtidos no esquema simples. Considerado isoladamente, indicaria que a lesão não produziu alteração no valor reforçador da solução de sacarose, fato contraditório à afirmação de correspondência com o sintoma de humor elevado do quadro maníaco humano segundo a proposta de Lyon (1991). Entretanto, este ponto deve ser avaliado com cuidado, uma vez que a ausência de diferenças significativas entre grupos pode ter decorrido da debilitação dos animais durante os dias do teste em PR – fato explicitado pela marcante perda de peso que pode ser observada na Figura 17 (dias 8 a 10) e que permite considerar a inadequação de parte do procedimento utilizado no presente experimento e compromete a possibilidade de interpretação dos dados. Além disso, a interrupção do experimento em decorrência da excessiva perda de peso também impossibilitou a estabilização do padrão de respostas necessária à qualidade das medidas comportamentais.

Considerando-se que o esquema de razão progressiva envolve um componente temporal – a medida que a disponibilização do reforço é contingente à emissão de quantidades progressivas de respostas, o que gradualmente também aumenta o tempo de espera entre a disponibilização do próximo reforço – as explicações acima mencionadas se aplicam igualmente a este experimento. Pode-se afirmar, portanto, que mesmo que o valor reforçador da solução de sacarose disponibilizada em curtos intervalos temporais (suficientes para emissão de duas respostas) no esquema de FR2 estivesse aumentado, o gradual aumento da lacuna temporal entre a disponibilização do reforço embutido no esquema de razão progressiva pode ter diminuído a efetividade do reforço para os animais lesionados – resultando em ausência nas diferenças entre os *Break Points* em comparação aos grupos

controles. Além de pertinente, esta explicação confere maior suporte à interpretação de os efeitos da lesão do MnR corresponderem ao quadro maníaco em animais de laboratório, já que a impulsividade também é sintoma desta psicopatologia e manifestação esperada em seus modelos animais (Lyon, 1991).

## EXPERIMENTO 4

### **Avaliação dos efeitos da lesão eletrolítica da região do MnR sobre comportamentos de dominância e submissão em ratos**

#### **OBJETIVO ESPECÍFICO**

Avaliar o padrão de estabelecimento de hierarquia social em ratos *Wistar* submetidos à lesão eletrolítica do MnR.

#### **MÉTODO**

##### **A. Animais**

Foram utilizados 52 ratos *Wistar* machos adultos. Destes, 26 foram os animais experimentais, distribuídos em três grupos: grupo dos animais submetidos à lesão eletrolítica da região do MnR (LR, n=12), grupo dos animais submetido à lesão fictícia (LF, n=7) e grupo controle intacto (I n= 7). Os demais animais (n=26) constituiram os pares utilizados para no teste de interação social.

##### **B. Equipamento**

Gaiolas-viveiro de poliuretano semi-transparentes, extensores de 10 cm feitos do mesmo material – permitindo maior mobilidade e posturas verticais dos animais. Câmera de vídeo digital Panasonic modelo SDR-H80PU-K, resolução de 0,8 Mega Pixels (dimensões 53 x 67 x 107 mm) com tripé. Lâmpadas fluorescentes de luz vermelha.

##### **C. Procedimento**

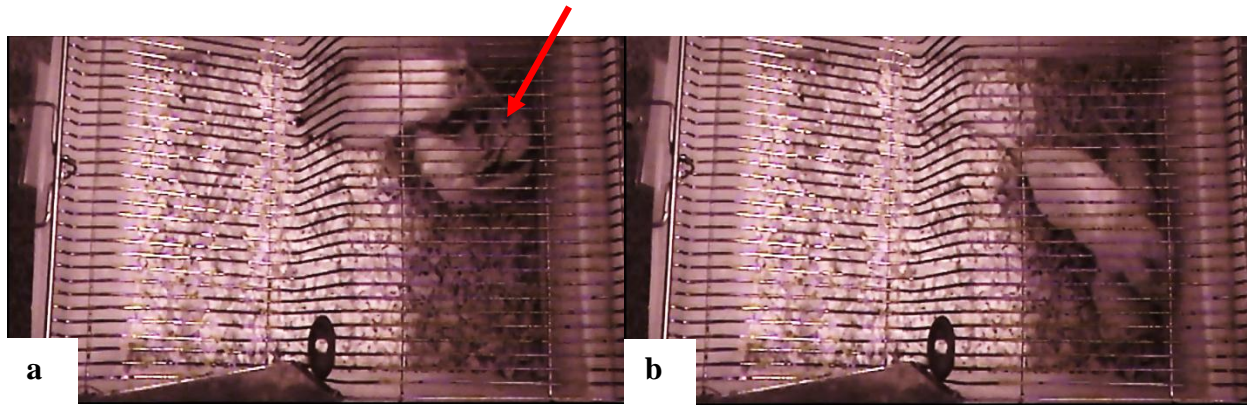
Foi utilizado o teste do Intruso/Residente conforme descrição de File et al. (1979) – sendo o mesmo animal inicialmente avaliado como residente e posteriormente como intruso. As dúades para o teste foram compostas por animais de mesma linhagem e de pesos equivalentes (máximo de 5% de diferença entre sujeitos) marcados no dorso por tinta preta para diferenciação. No período de sete dias anteriores ao teste os animais foram alojados individualmente e a troca da maravalha foi suspensa. Ao final deste período o animal designado como intruso era introduzido na gaiola-moradia do animal designado como residente. Os testes foram realizados sob condição de penumbra e na ausência do pesquisador, sendo as interações filmadas por 10 minutos. Os vídeos foram analisados de acordo com

categorias descritas por File et al. (1979), complementadas pela análise descritiva de interações agonísticas realizada por Peron (1989). As categorias estão descritas na Tabela 5 e parcialmente exemplificadas na Figura 18.

**Tabela 5.** Definição das categorias comportamentais utilizadas no teste do Intruso/Residente.

<b>Categoria</b>	<b>Definição</b>
<b>1) Luta</b>	Atos e posturas decorrentes de interações agressivas de ataque: perseguir, pular sobre o outro, montar pelas costas, chutar, boxear o outro ou o ar, luta (rabo em S) (File, 1979; Peron 1989).
<b>2) Dominância</b>	Ficar em cima/sobre o outro animal enquanto este encontra-se com abdome exposto (File, 1979; Peron 1989).
<b>3) Ofensivos</b>	Itens intimidativos executados por um animal direcionado às proximidades ou mesmo em contato com o oponente, mostrando disposição e habilidade para lutar. Estes comportamentos seriam de: cercar o oponente (andar em círculos em torno do outro animal, rastejando sob o outro ou se colocando entre o outro animal e a caixa) e postura lateral (que corresponde à postura de intimidação direcionada lateralmente ao outro animal, demonstrando disposição de atacar) (File, 1979; Peron 1989).
<b>4) Submissão</b>	Comportamentos e posturas em que o animal expõe seu abdome para o oponente, permanecendo totalmente imobilizado ou mostrando alguns movimentos discretos e congelamento – quando o animal permanece paralizado sobre as patas traseiras em postura catatônica ou cataléptica (File, 1979; Peron 1989).
<b>5) Fuga</b>	Comportamento defensivo composto por atos que induzem o animal a um afastamento gradativo ou súbito das proximidades do oponente (ex: recuar, empurrar, se afastar) (Peron 1989).
<b>6) Social</b>	Cheirar o outro em diversas regiões (genital, anal, corpo, focinho, etc); lambar e morder o outro ( <i>grooming</i> ) e receber <i>grooming</i> (Peron 1989).





**Figura 18.** Exemplificação das condições ambientais dispostas no teste do Intruso/Residente e de algumas das categorias analisadas. a) um animal experimental e seu par (marcado no dorso por tinta preta, conforme indicação pela seta) em interação social (cheirar o outro); b) o animal experimental apresenta postura de dominância (ficar sobre o outro), enquanto o par exhibe comportamento de submissão (abdome exposto).

#### D. Análise dos dados

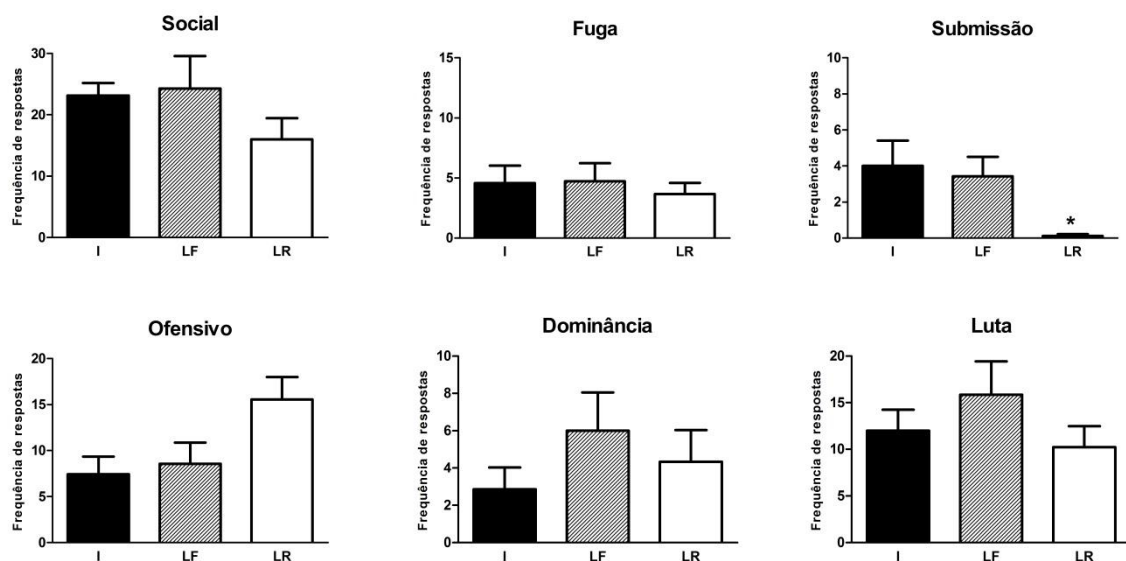
Os vídeos foram categorizados por meio do *software* EthoLog (Ottoni, 2000). Para estabelecimento da medida de concordância entre dois intervalos de observação (confiabilidade intra-observador) na atribuição das categorias, um percentual dos vídeos (5 vídeos de 46 = 10,87%) foi duplamente analisado. As diferentes categorizações dos mesmos vídeos foram submetidas à medida estatística de concordância  $\tau$  (tau) de Kendall. O coeficiente de Kendall obtido foi de 0,816 ( $p < 0.05$ ), sugerindo alta concordância entre observações e confiabilidade da categorização adotada.

As frequências de respostas em cada categoria nas duas condições (intruso e residente) foram analisadas por ANOVAs com um fator entre grupos de três níveis (LR, LF e I). Os efeitos estatisticamente significativos foram analisados pelo teste *post-hoc* de Bonferroni.

## RESULTADOS

Dentre os animais submetidos ao procedimento de lesão eletrolítica do MnR, 3 não desenvolveram hiperatividade locomotora e foram excluídos da amostra, resultando na seguinte composição dos grupos: I, n=7; LF, n=7 e LR, n=9.

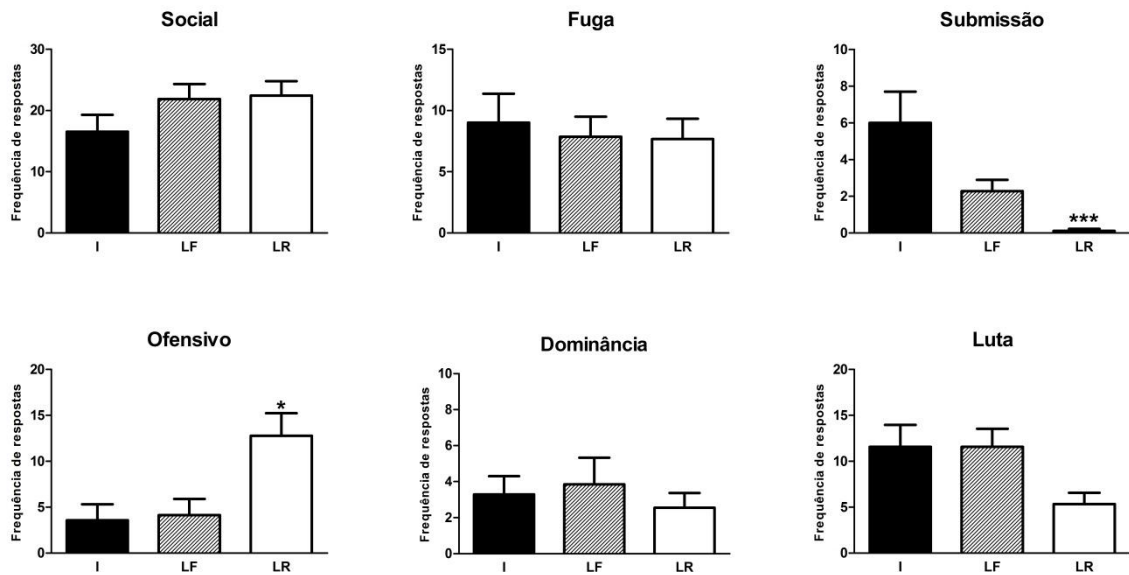
As avaliações quantitativas por categorias da interação das duplas nas condições de residente e intruso podem ser observadas nas Figuras 19 e 20. Na condição de residente (Figura 19), as ANOVAs acusaram ausência de efeito do grupo para as categorias: social, fuga, dominância e luta. As médias de respostas nas categorias submissão ( $F(2,20)=5,37$ ;  $p<0,05$ ) e ofensivo ( $F(2,20)=3,96$ ;  $p<0,05$ ) acusaram o efeito do fator grupo, mas o teste *post-hoc* identificou diferença significativa entre o grupo LR e grupos LF e I apenas para a categoria submissão (LR x LF e I: Bonferroni;  $p<0,05$ ).



**Figura 19.** Categorias comportamentais de interação social como residente. Médias ( $\pm$ EPM) da frequência de respostas emitidas pelos animais dos grupos lesão real (LR), lesão fictícia (LF) e intacto (I) em cada uma das categorias na condição de residente. \* indica diferença significativa entre a frequência de respostas emitidas pelo grupo LR em relação aos grupos LF e I (Bonferroni,  $p<0,05$ ).

Na condição de intruso (Figura 20), as ANOVAs também não acusaram diferenças significativas entre grupos nas condições: social, fuga, dominância e lutas. Apenas nas categorias submissão ( $F(2,20)=9,93$ ;  $p<0,01$ ) e ofensivo ( $F(2,20)=6,37$ ,  $p<0,01$ ) foram observados efeito do fator grupo. A frequência de respostas de submissão foi significativamente menor no grupo LR em relação ao grupo I (Bonferroni;  $p<0,001$ ), mas não

em relação ao grupo LF e a frequência de respostas ofensivas foi significativamente maior nos animais LR em relação a ambos os grupos controles (LR x LF e I: Bonferroni,  $p < 0,05$ ).



**Figura 20.** Categorias comportamentais de interação social como intruso. Médias ( $\pm$ EPM) da frequência de respostas emitidas pelos animais dos grupos lesão real (LR), lesão fictícia (LF) e controle intacto (I) em cada uma das categorias na condição de intruso. \*\*\* indica diferença significativa entre o grupo LR em relação ao grupo I (Bonferroni;  $p < 0,001$ ) e \* indica diferença significativa entre o grupo LR em relação aos grupos LF e I (Bonferroni;  $p < 0,05$ )

## DISCUSSÃO

Assim como o procedimento de lesão neurotóxica específica (5,7-DHT) do MnR realizado por File et al. (1979) em ratos da linhagem *Hooded*, a lesão eletrolítica realizada neste experimento foi capaz de produzir alterações nos padrões de comportamento para estabelecimento de hierarquia social em ratos *Wistar*. Na condição de residente, a inativação do MnR resultou em diminuição da frequência de emissão da categoria “submissão”, que compreendia comportamentos e posturas em que o animal expõe seu abdome para o oponente e congelamento. Na condição de intruso a redução da capacidade de submissão se manteve, mas complementarmente ocorreu o aumento na frequência de comportamentos ofensivos.

A frequência de respostas na categoria de submissão poderia ser decorrente da alteração na “capacidade” de congelamento (*freezing*), efeito comportamental da lesão do MnR descrito anteriormente (Avanzi, Silva, Macedo, & Brandao, 2003; Lima, 2002). Lima (2002) demonstrou que a injeção de NMDA e 8-OH-DPAT no MnR em ratos reduziu a valores nulos a frequência de congelamento diante de estímulo contextual (luz) pareado ao choque no pós teste 48h após a sessão de treino. Entretanto a inativação do MnR não alterou a frequência da emissão de congelamentos quando o estímulo pareado ao choque foi de natureza sonora. Esta diferença entre efeitos de diferentes estímulos aversivos condicionados sobre as respostas de congelamento dos animais sugere que a lesão não suprime a capacidade de permanecer imóvel diante do perigo. Dados de outra pesquisa sobre o papel do MnR na aprendizagem contextual indicam que o efeito da lesão desta estrutura sobre as respostas de congelamento é tempo dependente, não exercendo qualquer efeito sobre respostas dos animais quando estes são submetidos a condições de aprendizagem imediatas, sendo os estímulos sinalizadores do choque de qualquer natureza (Melik, Babar-Melik, Ozgunen, & Binokay, 2000).

Outro argumento que inviabiliza a suposição da alteração na capacidade de eliciação de respostas de congelamento (*freezing*) ser responsável pela diminuição na postura de submissão dos animais MnR lesionados decorre da análise individualizada da frequência de respostas de exposição do abdome ao oponente, também reduzida nos animais LR (Apêndice A). Assim, a condição aversiva imediata presente no teste do intruso/residente, somada à constatação de que a exposição do abdome ao oponente também sofreu redução no presente experimento sugerem que a capacidade geral de submissão parece estar alterada nos ratos submetidos à lesão do MnR. O aumento da frequência de comportamentos ofensivos na condição de intruso compõe o quadro de evidências de que esta lesão parece interferir

consistentemente nos comportamentos de hierarquização social. Apesar da diferença topográfica em relação aos dados de File et al. (1979), que constatou aumento da frequência de comportamentos de ataque e ficar sobre o outro animal (dominância), o aumento da frequência de comportamentos ofensivos também é indicativo da postura de dominância. Tal diferença pode decorrer da natureza das lesões, da linhagem dos animais ou ainda das reações à dominância emitidas pelo animal oponente – esta última variável referente ao padrão de interação da díade.

Deve-se considerar ainda a possibilidade de a maior frequência de comportamentos ofensivos decorrer do comprovado efeito do estresse produzido pelo isolamento social (Guidotti et al., 2001; Matsumoto, Pinna, Puia, Guidotti, & Costa, 2005). Apesar de os animais dos três grupos terem sido expostos às mesmas condições de isolamento pré-teste, é pertinente conjecturar que os comportamentos de hostilidade podem, ao menos em parte, decorrer da maior sensibilidade ao estresse crônico nos animais com o MnR lesionado (Andrade & Graeff, 2001). Esta possibilidade, entretanto, não descaracteriza as alterações no padrão de hierarquização social decorrentes da lesão, mas descreve que condições estressantes permanentes podem tornar as respostas ofensivas mais prováveis ou intensas.

Em conclusão, pode-se qualificar o padrão de dominância social induzido pela lesão do MnR identificado neste experimento como correspondente ao esperado para identificação de validade de face ao padrão social ativo (“auto-estima inflada”) observado em pacientes humanos em mania. A constatação desta similaridade é uma importante evidência da adequação da hipótese do envolvimento do MnR na neurobiologia dos transtornos de humor, uma vez que comportamentos de dominância e submissão em roedores são considerados válidos modelos de mania e depressão (Malatynska & Knapp, 2005; Malatynska et al., 2007). Também merece destaque a ausência de diferenças significativas entre grupos quando a categoria analisada foi referente aos comportamentos sociais (cheirar o outro em diversas regiões, fazer e receber grooming). A constatação de que a lesão eletrolítica do MnR não produz como efeito a redução da frequência de respostas de interação social, ao menos no contexto estudado, auxilia a diferenciação entre o quadro experimental da mania e de outros transtornos como a esquizofrenia – já que modelos animais de esquizofrenia devem apresentar como característica central a diminuição da frequência de contatos sociais, juntamente com sintomas comuns ao quadro maníaco como hiperatividade, aumento da agressividade e excitação e prejuízos cognitivos (Yen et al., 2013).

Destacando a relevância dos dados obtidos no presente experimento para avaliação da pertinência da hipótese dos efeitos da lesão do MnR corresponderem a um modelo

experimental de mania, é importante considerar que mais do que indicadores de validade de face ao quadro maníaco ou padrão suficiente para a validação de um modelo animal de mania, os comportamentos de dominância social são considerados a base da explicação filogenética dos padrões comportamentais presentes nos transtornos de humor sob o enfoque da psicologia evolucionista. De acordo com Dalgalarrondo (2011), a submissão e dominação são elementos intrínsecos das espécies sociais animais com sistemas de hierarquias, nos quais a flexibilidade hierárquica evita lutas fatais. Para este e outros autores (Gardner, 1982; Hendrie & Pickles, 2009) ascender e descender socialmente corresponderiam aos comportamentos eufórico, característico da mania, e depreciativo, característico da depressão – ou característicos dos animais “alfas”(dominantes) e “ômeegas” (submissos). Desta forma, padrões semelhantes aos depressivos inibiriam a conduta de ameaça do animal e preveniriam riscos graves de lesão ou morte (Dalgalarrondo, 2011; Hendrie & Pickles, 2009; Nesse & Williams, 1997). Por outro lado, padrões semelhantes ao quadro de mania representariam o extremo de estratégias comportamentais de dominação e de competição desafiante (Dalgalarrondo, 2011; Gardner, 1982). Neste caso, a assimetria de status social entre o indivíduo e o grupo ocorreria de forma oposta à depressão: o comportamento do paciente maníaco é constantemente desafiador, arrogante e irritável, acompanhado de avaliações distorcidas com relação a possibilidades de sucesso em confrontos (Dalgalarrondo, 2011).

## ANÁLISE HISTOLÓGICA

### OBJETIVO ESPECÍFICO

Localizar e descrever as estruturas abrangidas pelo procedimento experimental de lesão eletrolítica do MnR utilizado nos experimentos descritos no Capítulo I.

### MÉTODO

#### A. Sujeitos

Após a realização dos testes comportamentais realizados nos estudos descritos, uma amostra dos animais com lesão real (n=10) e com lesão fictícia (n=1) foi selecionada para comparação e mapeamento histológico da lesão realizada.

#### B. Procedimentos

##### Etapa 1: perfusão

*Equipamento:* bomba de perfusão (Milan<sup>®</sup>, modelo 626).

*Soluções:* a) fixador, composto por 1500ml de H<sub>2</sub>O, 40g de paraformaldeído (CH<sub>2</sub>On), solução de hidróxido de sódio (NaOH, 10N/±10 gotas), 150ml de tampão fosfato (*Phosphate Buffer/PB* 0,4M), 5ml de Glutaraldeído a 25%; b) soro ringer, composto por 4,25g de cloreto de sódio (NaCl, PM 58,44), 0,125g de cloreto de potássio (KCl, PM 74,56), 0,10g de bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>, PM 84,01), 1ml de Heparina a 1% e 500ml de H<sub>2</sub>O destilada.

*Fármaco:* hidrato de cloral (10%)

*Procedimentos:* Os animais foram sedados com hidrato de cloral 10% injetado intraperitonealmente (1ml/300g de peso corporal). Após perda do reflexo óculo-palpebral deu-se início ao procedimento cirúrgico, iniciado por pequena incisão sob o processo xifóide – estendida até o pescoço para retirada da pele – e posterior corte dos músculos da parede ventrolateral do abdome, afastamento do fígado e exposição do diafragma. Realizada a perfuração do diafragma e corte das costelas, posicionou-se o gradil costal cranialmente com auxílio de uma pinça hemostática. O coração foi então preso por uma pinça hemostática na altura dos septos átrio-ventriculares e fez-se uma incisão no ápice do coração (ventrículo esquerdo), introduzindo cuidadosamente a cânula pela incisão no ventrículo até sua visualização no começo da artéria aorta. Fixou-se a cânula dentro do coração com a pinça

hemostática e realizou-se o tracionamento e corte da aurícula direita. Na sequência a bomba de perfusão foi ligada e o soro infundido em fluxo de 30ml/min até o clareamento das mucosas e do fígado. Após limpeza do leito vascular iniciou-se a passagem do fixador por aproximadamente 30 minutos – seguida da decapitação do animal de ombro a ombro.

#### Etapa 2: remoção do encéfalo e crioproteção do tecido nervoso

Para a extração do cérebro utilizou-se um osteótomo com o qual a pele, os músculos da cabeça, ossos, dura máter e foice do cérebro foram removidos nesta sequência. Após rompimento do arco zigomático e afastamento dos ossos temporais, fez-se um corte no nível do bulbo olfatório e levantou-se o encéfalo, expondo o nervo trigêmeo que foi cortado – afastando o encéfalo e removendo-o da cavidade craniana. O encéfalo foi então colocado em uma matriz, cortado na altura desejada e transpassado internamente com uma agulha no sentido caudorostral ao lado direito – para permitir a identificação do antímero dos cortes na microtomia. A crioproteção foi realizada por meio da imerção do encéfalo em solução de sacarose ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ , PM 342,3) a 30% em tampão fosfato (0,1 M/pH 7,4) a 4°C durante 48h.

#### Etapa 3: microtomia dos encéfalos congelados

*Equipamentos:* Micrótopo (LeicaSM 2010R) e plataforma refrigerante “freezing stage” (Psysitemp BFS-30 MP).

*Procedimentos:* Após remoção das meninges os encéfalos seccionados foram colocados no micrótopo em base de sacarose a -20°C com a face rostral voltada para a base e a face ventral voltada para a lâmina. O aparelho foi então resfriado à temperatura de -40°C e após congelamento do encéfalo deu-se início à realização dos cortes de 30 micrômetros de espessura. Cada corte era disposto por um pincel em cinco fracos com solução de PB 0,1M – estabelecendo-se a distância de 150 micrômetros entre os cortes em cada frasco.

#### Etapa 4: coloração com NISSL e fixação da lamínula

Após a montagem de cortes histológicos em lâminas de vidro para microscopia, deu-se início à técnica de Nissl para coloração do tecido analisado. Neste as lâminas foram mergulhadas em recipientes na seguinte ordem: 1min em álcool 95% I e II, 1min em álcool 100% I, II e III, 3min em xilol I, II e I, 1min em álcool 100% III, II e I, 1min em álcool 95%



II e I, 1min em álcool 70%, 1min em álcool 50%, 1min em tionina. Na sequência 10 mergulhos em H<sub>2</sub>O destilada e 30 segundos em álcool 95% I e II. Após a coloração, as lâminas foram recobertas por lamínulas de vidro, fixadas às lâminas por Permount<sup>®</sup>.

*Etapa 5: análise das lâminas*

*Equipamento:* Microscópio Óptico (Scope.A1, Carl Zeiss – LLC/EUA) e câmera (AxioCam Mrc Zeiss– LLC/EUA)

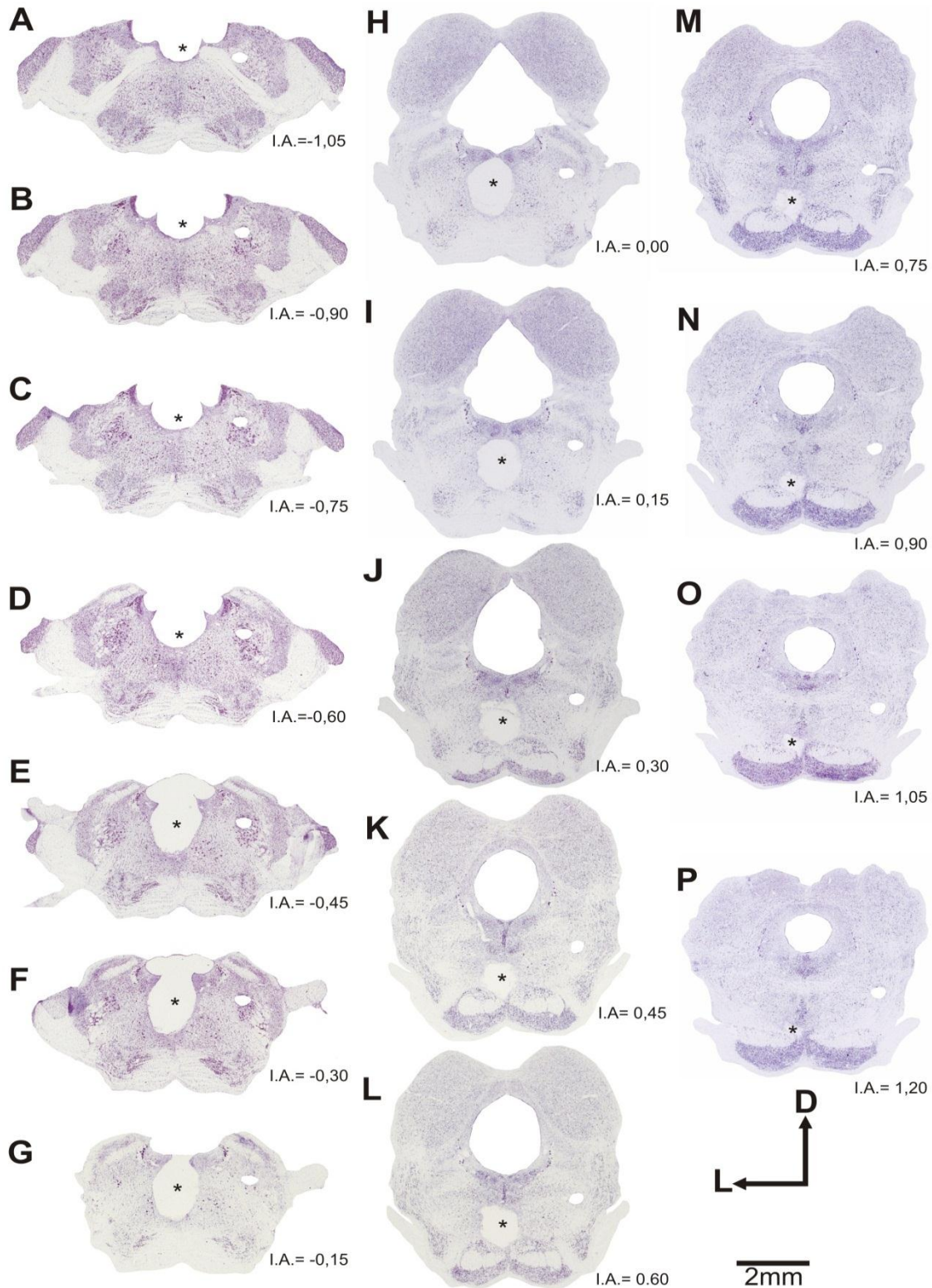
*Procedimentos:* A análise das lâminas foi feita com ajuda do microscópio óptico. A área da lesão em cada caso foi identificada por comparação dos cortes histológicos com o Atlas Estereotáxico (Paxinos & Watson, 2007). As estruturas abrangidas pela lesão eletrolítica foram listadas, bem como o posicionamento rostro-caudal, lateral e dorso-ventral do tecido destruído. Ao final da análise descritiva um caso típico foi selecionado e fotografado para exemplificação.

## RESULTADOS

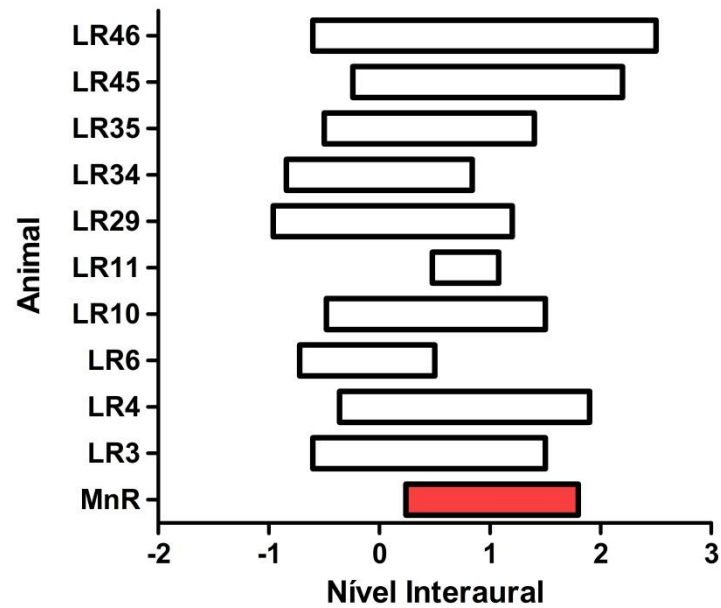
A Figura 21 representa uma prancha com fotomicrografias de um caso típico da lesão eletrolítica realizada nos experimentos. Nota-se que a lesão se estendeu para toda a região próxima ao MnR, destruindo tecido de outros núcleos e estruturas (vide Apêndice B). Em especial, destaca-se que em 9 dos 10 casos analisados a abrangência da lesão envolveu a porção caudal do núcleo dorsal da rafe, e em todos os casos a lesão englobou o núcleo paramediano da rafe (PMnR).

A análise microscópica dos cortes permitiu também, por comparação com o Atlas Estereotático do cérebro do rato (Paxinos & Watson, 2007) e com as lâminas do animal do grupo LF, avaliar a porção do MnR abrangida pela lesão. Destaca-se que em 3 dos 10 casos analisados todo o MnR foi destruído, em seis casos a lesão foi parcial (porção dorsal ou porção caudal) e em um caso a lateralidade da lesão comprometeu a destruição da região central do MnR – abrangendo apenas unilateralmente a subdivisão paramediana do núcleo (PMnR). Não foi observado qualquer indício de destruição de tecido encefálico no caso do animal submetido à lesão fictícia, confirmando que assim como indicam os dados comportamentais, nos animais deste grupo a região do MnR permaneceu intacta.

A Figura 22 destaca a distribuição rostrocaudal das lesões em cada um dos 10 casos analisados em comparação com a extensão anteroposterior do MnR descrita pelo Atlas Estereotático (Paxinos & Watson, 2007). É possível observar que esta extensão foi variável em relação aos casos, bem como houve variação dos níveis interaurais de início e término das lesões.



**Figura 21.** Mapeamento da lesão eletrolítica na região do núcleo mediano da rafe. Fotomicrografias de cortes histológicos coronais do tronco encefálico de um animal do grupo lesão real, corados pelo método de Nissl e organizados de caudal (A, I.A.= -1,05) para rostral (P, I.A.= 1,20). O asterisco indica a região lesionada. O intervalo entre os cortes é de 150 $\mu$ m e a barra de calibração é válida para todas as imagens. Abreviatura: I.A., nível interaural.



**Figura 22.** Diagrama da distribuição rostrocaudal das lesões eletrolíticas nos ratos. Dados de animais do grupo lesão real (LR) tendo como referência o Atlas Estereotáxico do encéfalo do rato (Paxinos & Watson, 2007). As barras horizontais representam a extensão rostrocaudal das lesões eletrolíticas entre os níveis I.A. -2,0 a +3,0. A barra em vermelho indica a extensão do núcleo mediano da rafe (MnR). Abreviatura: I.A., nível interaural.

## DISCUSSÃO

Os parâmetros do procedimento de lesão eletrolítica utilizado nos experimentos do Capítulo I (eletrodo, tempo de passagem da corrente, posição de inserção) foram definidos com base nos estudos anteriores realizados por Hoshino e colaboradores (Hoshino & Sugizaki, 1986; Hoshino et al., 2004; Leite, Hoshino, & De Paula, 2004; Pezzato & Hoshino, 2004, 2005). Ao longo de diversos anos tais parâmetros se mostraram efetivos na indução da hiperatividade locomotora e outras alterações comportamentais que incitaram a hipótese da correspondência do quadro decorrente deste procedimento com a mania. A análise histológica de uma amostra dos animais utilizados nos experimentos confirmou a destruição completa ou parcial do MnR – o que confirma a efetividade do procedimento utilizado e justifica que os resultados comportamentais estejam de acordo com o esperado com base em dados anteriores da literatura.

Contudo, a análise da área de abrangência da lesão demonstrou a destruição de inúmeras outras estruturas listadas no Apêndice B – o que traz o problema da impossibilidade da afirmação de os efeitos comportamentais observados decorrerem apenas da inativação da região específica do MnR. Este problema da abrangência da área eletrocoagulada parece ser comum a parte das pesquisas que se utilizam de lesões eletrolíticas, em especial das publicações das décadas de 70 e 80 (revisão de fotos vide Apêndice C) – que compõem parcela significativa dos dados acerca dos efeitos comportamentais da inativação do MnR (Levine, Rosenwasser, Yanovski, & Adler, 1986; Wirtshafter et al., 1987; Yamamoto & Ueki, 1977).

Outro problema refere-se à inconsistência das lesões realizadas, que pode ser identificada com base na variabilidade na distribuição rostro-caudal e lateralidade da região total e do MnR destruídos nos diferentes casos analisados. Tal variação pode ter contribuído na amplitude dos desvios da média observados nos experimentos, já que a inativação de diferentes porções do MnR parece produzir variações em efeitos bioquímicos e comportamentais – conforme dados de Wirtshafter, Montana e Asin (1986). Estes autores demonstram diferenças e efeito somatório de cortes efetuados nas regiões antero-ventral e caudal do MnR, sendo estes nulo e significativo no campo aberto e parco e nulo nos níveis prosencefálicos de serotonina, respectivamente.

Apesar das constatações da extensão adicional e da variabilidade da área da lesão não invalidarem a possibilidade de indução de um conjunto de comportamentos semelhantes à mania por meio de um mesmo procedimento experimental, estas trazem a necessidade do

refinamento da área lesionada. A possibilidade da realização de lesões restritas à região do MnR permitiria a investigação dos efeitos da destruição específica desta estrutura e assim compreensão do papel do sistema inibitório do qual este núcleo faz parte na neurobiologia dos comportamentos semelhantes ao quadro maníaco em animais de laboratório.

A variabilidade da extensão das lesões ao redor do MnR constatada na análise histológica indica ser um ponto vulnerável e limitante quando se propõe o uso do modelo para a investigação dos mecanismos responsáveis pela mania e, por extensão, ao transtorno bipolar. Existem duas possibilidades para superação desta limitação. A primeira é a repetição das observações em ratos submetidos a lesões menores, fato que implica em avaliar isoladamente os efeitos das lesões promovidas por diferentes intensidades de corrente para eletrocoagulação do núcleo, a duração da passagem desta corrente e a extensão das áreas ativas do eletrodo. A segunda alternativa é determinar os efeitos de lesões menores em animais de outras espécies, abordagem que parece vantajosa por garantir a possibilidade de transposição de dados de um grupo de animais a outro, fato crucial para as pesquisas translacionais.

## **CAPÍTULO II**

**Efeito do lítio sobre a desinibição comportamental induzida pela lesão eletrolítica da região do Núcleo Mediano da Rafe (MnR) em camundongos**

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- a) Testar se algumas das alterações comportamentais esperadas em modelos animais de mania (hiperatividade locomotora, estereotipia, exposição aumentada a condições aversivas e aumento na frequência de respostas conseqüenciadas por reforçadores positivos) são induzidas pela lesão eletrolítica do núcleo mediano da rafe (MnR) em camundongos;
- b) Testar se o tratamento crônico com uma droga antimaníaca, o lítio, é capaz de atenuar ou reverter as alterações comportamentais induzidas pela lesão eletrolítica do MnR em camundongos investigadas com base no objetivo anterior.

## **MÉTODOS**

### **A. Compromisso ético**

O presente estudo foi iniciado mediante a aprovação do projeto pelo *Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)* da *University of Maryland Baltimore School Of Medicine* - protocolo #0410006 (Anexo B). Sua execução obedeceu rigorosamente às recomendações do *NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*.

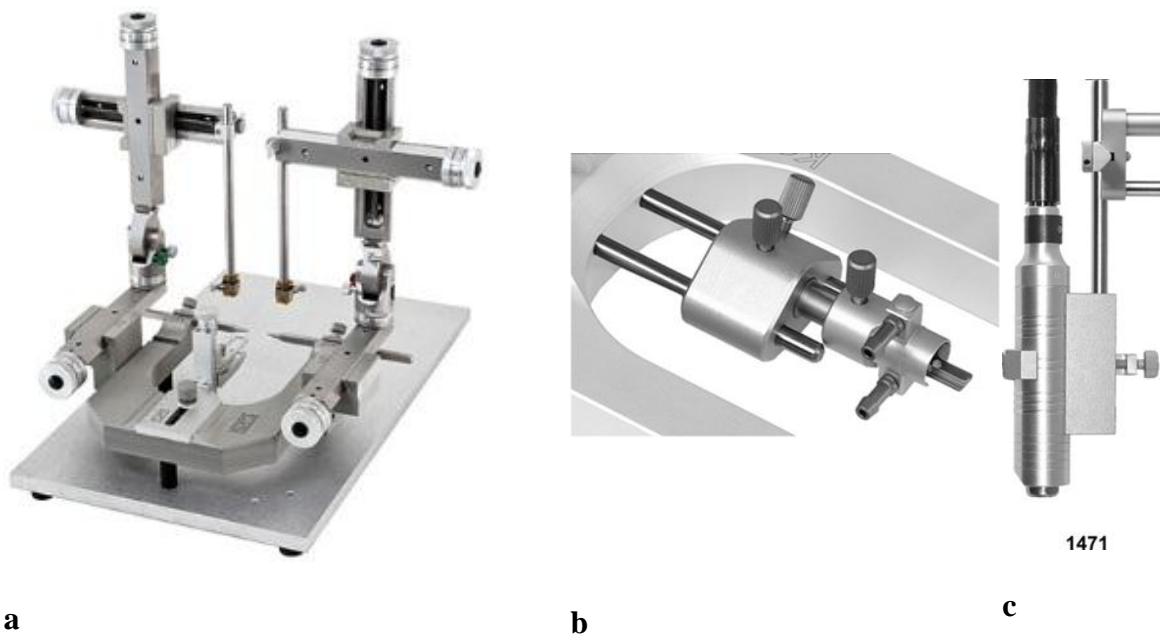
### **B. Animais**

Foram utilizados 84 camundongos isogênicos C57BL/6J machos, provenientes do *The Jackson Laboratories* (Bar Harbor, Maine), com 11 semanas de vida. Esta linhagem foi escolhida devido às respostas robustas no que se refere à responsividade ao tratamento com lítio em diversos testes comportamentais em pesquisas que investigaram o modelo de mania induzida por psicoestimulantes (Can et al., 2011; Can, Piantadosi, & Gould, 2013; Gould et al., 2007; O'Brien et al., 2004). Durante o período de adaptação ao biotério (48h), foram alojados em grupos de quatro a cinco animais em caixas de policarbonato forradas com sabugo de milho desidratado inseridas em estantes com sistema de circulação e filtragem de ar, em ciclos claro/escuro de 12h (luz das 7:00 às 19:00 h), temperatura constante a 21°C  $\pm$ 1 e água e alimentação comercial *ad libitum*. Após aclimatação, os animais de cada gaiola-viveiro foram designados aleatoriamente às três condições experimentais: lesão eletrolítica do MnR (grupo LR, n=35); lesão fictícia (grupo LF, n=25) e intactos sem manipulação cirúrgica (grupo I, n=24).



### C. Cirurgia de lesão eletrolítica do MnR

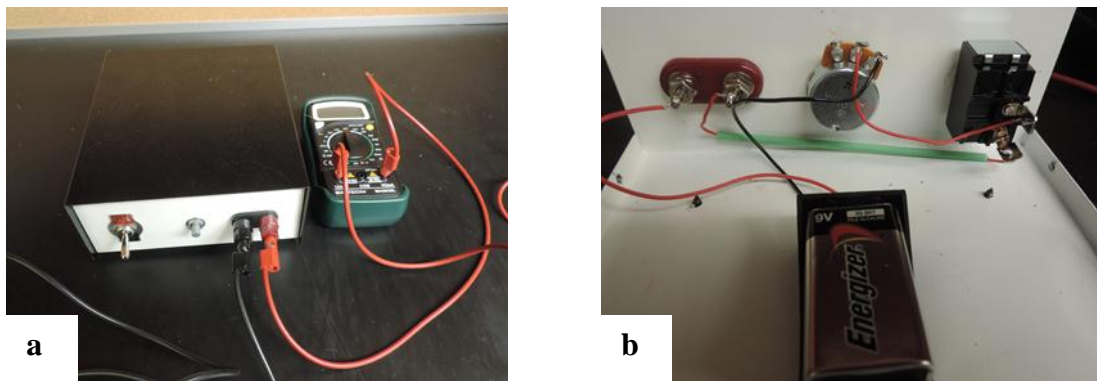
**Equipamentos:** aparelho estereotáxico ultra-preciso para pequenos animais David-Kopff – modelo 962 (Tujunga, CA, EUA, Figura 23); eletrodo de eletrocoagulação de aço inoxidável (isolado eletricamente exceto o diâmetro da ponta, de dimensões 2.5mm de comprimento x 0.20mm de diâmetro/AM Systems, Sequim, WA, EUA), dispositivo de aquecimento (ATC-1000, WPI) conjugado a um termômetro retal, furadeira estereotáxica David-Kopff - modelo 1471 (Figura 23 c) e lesionador eletrônico manufaturado (Figura 24). A corrente produzida pelo lesionador era alimentada por uma bateria comercial de 9V, acionada por uma chave liga/desliga e tinha a precisão controlada por um potenciômetro (5K $\Omega$ ). A mensuração da corrente era realizada por um multímetro digital comercial em escala 2,5mA.



**Figura 23.** Fotografias do modelo de aparelho estereotáxico e dos acessórios utilizados para realização das cirurgias. a) Estereotáxico para pequenos animais de ultra-precisão (David-Kopff – modelo 962); b) máscara para manutenção da anestesia inalarória e c) furadeira estereotáxica (David-Kopff- modelo 1471). Fotografias extraídas no endereço eletrônico <http://www.kopfinstruments.com>.

**Fármacos:** isoflurano USP (Forane<sup>®</sup>, Baxter), analgésico e anti-inflamatório injetável para pequenos animais (*Carprofen*, Rimadyl<sup>®</sup>, Pfizer), pomada oftálmica (*Puralube*<sup>®</sup>, Vet Ointment, Dechra), pomada antibiótica (*Triple Antibiotic Ointment by Actavis*<sup>®</sup>).

**Preparação pré-cirúrgica:** A anestesia foi induzida por  $O_2 + 4\%$  de isoflurano em fluxo de 1L/min, distribuído por meio de um vaporizador de precisão ligado a um um filtro de carvão para eliminar os resíduos de gás. O animal era introduzido em uma câmara de indução pelo período de 2 a 4min. Após adormecimento o percentual de isoflurano era reduzido a 2-3% e a partir do posicionamento do animal no aparelho estereotáxico era dispensado por uma máscara facial (Figura 23 b) conjugada ao equipamento cirúrgico. O tempo total de manutenção dos animais sob efeito anestésico foi padronizado em 60min para controle experimental de possíveis efeitos do anestésico sobre o comportamento. Durante toda a cirurgia o camundongo permanecia posicionado sobre um dispositivo de aquecimento (ATC-1000, WPI) atrelado a um termômetro retal para manter a termoregulação ( $\sim 36^\circ C$ ). Após perda dos movimentos, do reflexo ocular e da ausência de resposta à preensão da cauda por pinça dava-se continuidade aos procedimentos: tricotomia da cabeça, aplicação de pomada oftálmica estéril para prevenir ressecamento dos olhos e limpeza da região cirúrgica por gaze embebida em álcool 70%. Ao final dos cuidados pré-cirúrgicos os animais recebiam uma dose do analgésico Carprofen (0,5mg/Kg) diluído em salina estéril – administrado subcutaneamente.



**Figura 24.** Fotografias do lesionador manufaturado para realização das lesões eletrolíticas. a) fotografia da porção externa no lesionador acoplado ao multímetro digital e b) fotografia da porção interna do lesionador, onde pode ser visto o circuito alimentado pela bateria de 9V.

**Procedimentos cirúrgicos:** Após a anestesia e a preparação cirúrgica descrita acima, uma única incisão era feita por bisturi na linha média do crânio, após injeção de lidocaína 2%. O tecido conjuntivo era então removido por espátula, seguido de lavagem com solução salina e água oxigenada. As coordenadas dorso-ventrais (DV) do *Bregma* e do *Lambda* eram checadas para garantia do posicionamento paralelo do crânio em relação ao plano estereotáxico. Adotou-se como critério de precisão a diferença máxima de 0,05mm entre as

coordenadas DV destas suturas – que podia ser corrigida alinhando-se a cabeça no aparelho estereotáxico pelo suporte mandibular. Em seguida eram conferidas as coordenadas de posicionamento da ponta do eletrodo no *Bregma* a 0 e a 20° de torção unilateral direita do braço do esterotáxico (medidas antero-posterior, linha média e dorso-ventral). Uma furadeira atrelada ao braço oposto do aparelho estereotáxico (Figura 23 c) era então posicionada de acordo com as coordenadas cirúrgicas finais antero-posterior e lateral. Após trepanação do crânio pela furadeira, o eletrodo de aço inoxidável isolado eletricamente exceto o diâmetro da ponta era inserido através do crânio até as coordenadas cirúrgicas finais calculadas com base no atlas estereotáxico para camundongos: AP= -4,48 posterior ao *Bregma*, LR= 1,64 à direita do *Bregma* e DV=-4,79 ventral ao crânio (Franklin & Paxinos, 2007). Neste momento apenas no grupo lesão real (LR) era aplicada a corrente elétrica de 0,7mA por 10 s para eletrocoagulação, enquanto nos animais do grupo controle LF o eletrodo era inserido até a proximidade do MnR (DV=-3,79) e removido sem aplicação da corrente. A incisão era então suturada e a ferida recebia tratamento com pomada antibiótica veterinária.

**Procedimentos pós-cirúrgicos:** Após a cirurgia os animais foram colocados individualmente em uma caixa limpa e com aquecimento para recuperação. Os animais permaneceram sob observação até que caminhassem normalmente e só então eram removidos ao biotério onde permaneciam em alojamento individual por 48h. Adicionalmente à ração comercial e à água foram disponibilizadas dieta purificada e água em gel. Os animais não submetidos ao procedimento cirúrgico foram mantidos nas mesmas condições, incluindo o alojamento individual. Na manhã seguinte à cirurgia uma segunda dose do analgésico *Carprofen* (0,5mg/Kg) foi administrada nos camundongos operados e todos os animais foram pesados e monitorados quanto aos sinais de dor e estresse. Após o período de recuperação inicial (48h) os animais foram alojados em grupos de quatro ou cinco, de acordo com a formação inicial – havendo animais de todos os grupos experimentais (LR, LF e I) em cada gaiola-viveiro. Decorridos 10 dias de recuperação pós-cirúrgica (48h em isolamento e 8 dias em grupo) foram iniciados o tratamento com lítio (LiCl) e os testes comportamentais.

#### **D. Tratamento com cloreto de lítio (LiCl)**

**Fármaco:** cloreto de lítio (LiCl) adicionado à ração, na concentração de 0,4% (Bioserv, Frenchtown, NJ, EUA).

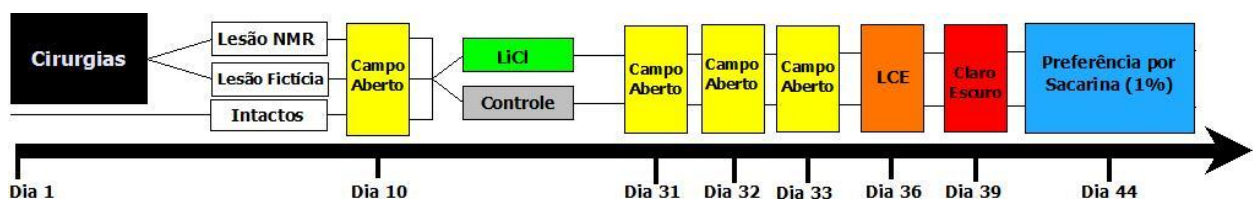
**Procedimento de administração do tratamento:** a ração comercial foi removida e a ração contendo LiCl foi disponibilizada em metade das gaiolas-moradia conforme descrições

anteriores (Can et al., 2011; Kovacsics & Gould, 2010; O'Brien et al., 2004), enquanto a outra metade das gaiolas recebeu ração controle de igual composição, exceto o LiCl. Todos os animais tiveram livre acesso à água *ad libitum* e a uma garrafa adicional com 0,9% de solução salina para aliviar o desbalanceamento iônico produzido pelo lítio.

### E. Testes Comportamentais

**Procedimentos gerais e limpeza dos equipamentos:** As avaliações comportamentais foram realizadas no período matinal (entre 08 e 13h) e foi estabelecido o intervalo mínimo de 48h entre testes. Em todos os procedimentos de avaliação comportamental descritos nos estudos desta pesquisa, os animais foram levados em suas gaiolas-viveiro à sala de experimentação, adjacente ao biotério, e imediatamente intruduzidos no aparato de teste. Ao final de cada teste foram contabilizadas as bolotas fecais e em seguida os equipamentos foram limpos com solução aquosa de *Vimoba Tablets*<sup>®</sup> (dióxido de cloro), evitando a contaminação e a permanência de odores.

O teste do campo aberto foi conduzido uma vez previamente aos tratamentos (dia 10) e após 21 dias de tratamento com LiCl ou ração controle por três dias consecutivos (dias 31, 32 e 33). Os testes do labirinto em cruz elevado, claro/escuro e de preferência por sacarina foram realizados apenas após o tratamento, em seguida às medidas da atividade locomotora no campo aberto. A sequência, repetições e intervalos entre procedimentos estão detalhados na Figura 25.



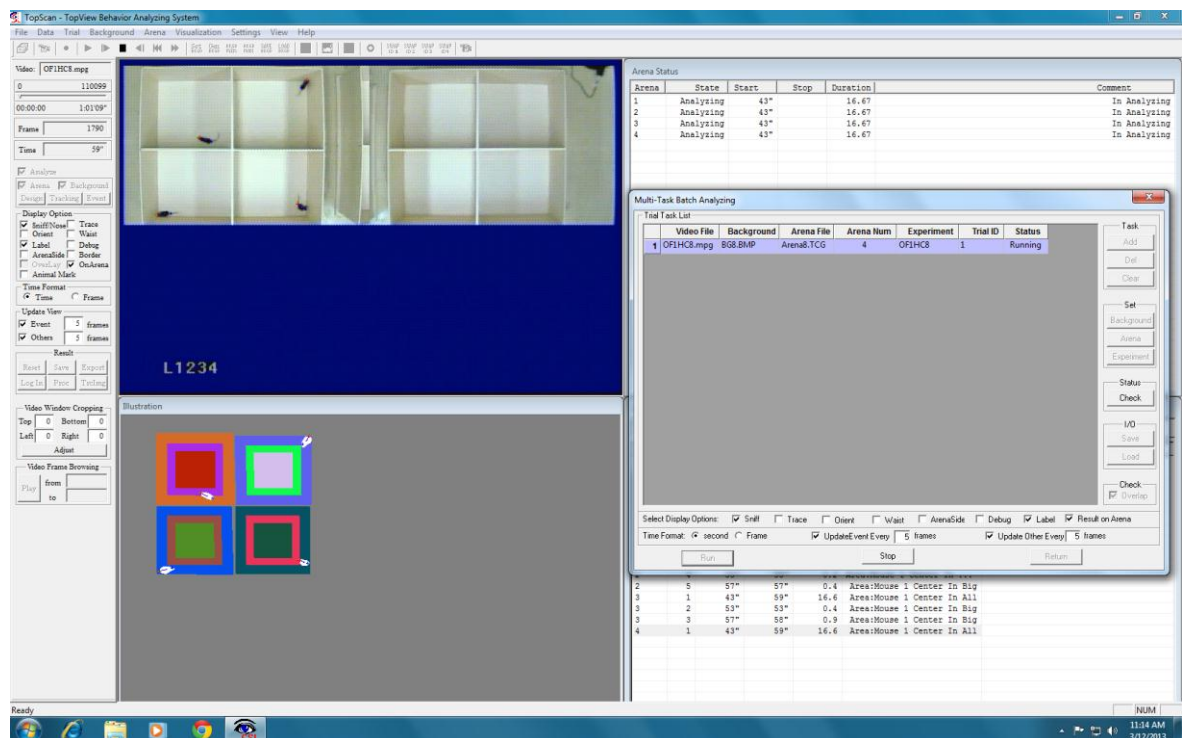
**Figura 25.** Linha do tempo representativa da ordem e espaçamento temporal dos procedimentos cirúrgicos, tratamentos e testes comportamentais. No momento das cirurgias os animais foram aleatoriamente designados aos três grupos experimentais (LR, LF e I). Após dez dias de recuperação foram submetidos ao teste do campo aberto para avaliação do efeito dos procedimentos cirúrgicos sobre a atividade locomotora. Na sequência, foram iniciados os tratamentos com ração com lítio ou controle (LiCl ou C) e os testes comportamentais foram reiniciados após 21 dias. Neste segundo momento foram realizadas três sessões do teste do campo aberto em dias consecutivos e os testes de labirinto em cruz elevado, claro/escuro e preferência por sacarina – intervalados pelo período mínimo de 48h.

## Teste do Campo Aberto

**Equipamento:** oito campos abertos de madeira coberta de fórmica quadrados (49 x 49cm) de cor branca (Figura 26); duas câmeras; sistema de registro de vídeo CaptureStar (CleverSys Inc, Reston, VA, EUA), computador IBM, software de análise de vídeos Top Scan (CleverSys Inc, Reston, VA, EUA).

**Condições ambientais:** iluminação de 30-35 lux.

**Procedimento:** cada animal foi individualmente inserido em um dos oito campos abertos, sendo inicialmente posicionado em um dos cantos. Foram testados de cinco a oito animais simultaneamente (uma ou duas gaiolas-moradia). O teste teve duração total de 30 minutos, durante os quais a experimentadora se ausentava da sala e a atividade dos animais era registrada pelas câmeras e computador.



**Figura 26.** Exemplificação do equipamento e software de análise de vídeos utilizados no teste do Campo Aberto. O equipamento de Campo Aberto em fórmica branca pode ser visualizado acima à esquerda, onde se encontram quatro animais em teste. Abaixo encontra-se a delimitação das áreas subdivididas para análise (centro 70,7% e 50%) e a identificação dos animais pelo *software* (em branco). À direita encontra-se a programação das análises.

**Análise dos dados:** Os registros de vídeo foram analisados pelo *software* TopScan (Figura 26), tendo como referência o centro do corpo dos animais. Foram definidas duas

zonas centrais (grande centro e pequeno centro) correspondentes a 70,7% e 50% da área da arena. Foram contabilizados: a distância total percorrida e o tempo de permanência nos centros grande e pequeno.

**Análise estatística:** os dados foram analisados por uma ANOVA fatorial de medidas repetidas – tendo como fatores os grupos (LR, LF e I) e os tratamentos (controle ou LiCl) e as medidas de quatro repetições (avaliação inicial e os três dias de pós-teste). Uma vez que o pressuposto de esfericidade não foi satisfeito, foi utilizado o método de correção dos graus de liberdade *Greenhouse-Geiser*. Esta e todas as demais análises descritas a seguir foram feitas com uso do software Statistica 7 (Tulsa, OK, EUA), adotando o nível de significância  $p < 0,05$ . Quando indicada a necessidade de análise *post-hoc* foi utilizado o teste de Fisher LSD.

### **Labirinto em Cruz Elevado (LCE)**

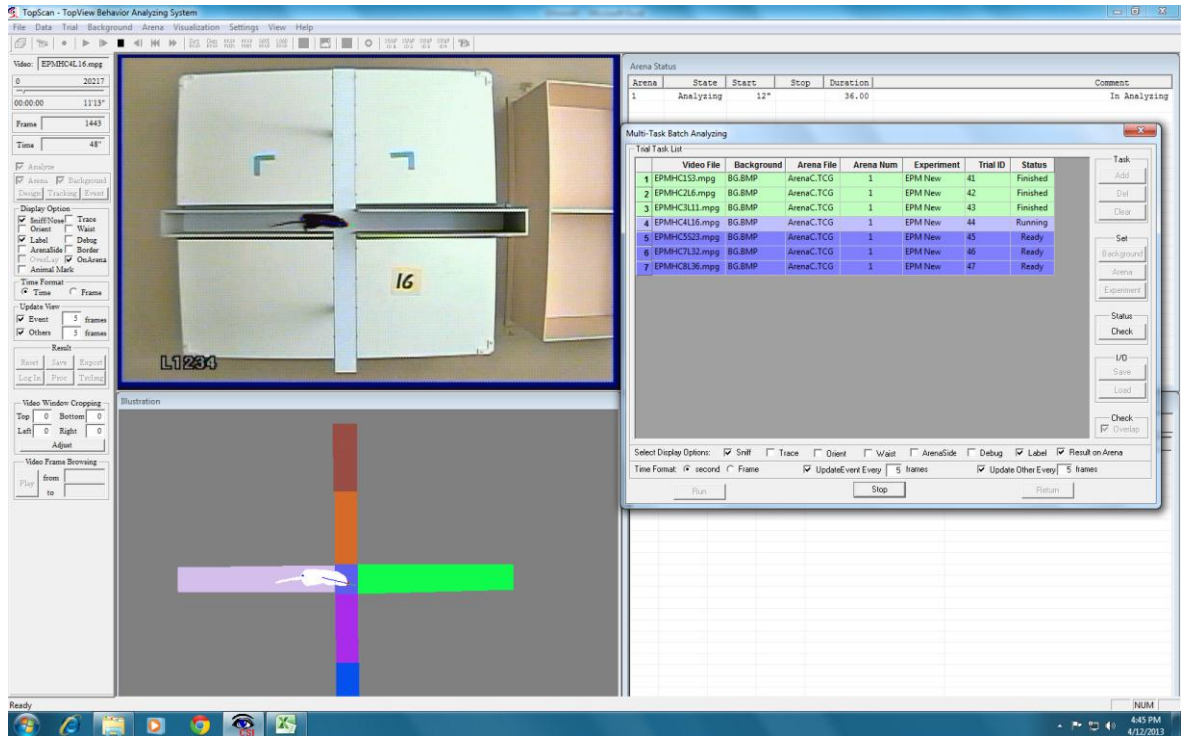
**Equipamento:** labirinto em cruz elevado de madeira revestida de fórmica branca, com as seguintes dimensões: 85cm de diâmetro, centro de 5x 5cm, braços de 40 x 5cm e braços fechados com parede de 16cm de altura (Figura 27); câmera; computador IBM; sistema de registro de vídeo CaptureStar (CleverSys Inc, Reston, VA, EUA) e *software* de análise de vídeos TopScan (CleverSys Inc, Reston, VA, EUA).

**Condições ambientais:** iluminação de 30-35 lux.

**Procedimento:** nos dias 35 ou 36 os animais foram individualmente colocados no centro do equipamento, com a cabeça voltada para um dos braços abertos. A experimentadora permaneceu na sala durante o teste, que foi filmado e teve duração de 10 minutos.

**Análise dos dados:** Os registros de vídeo foram inicialmente analisados por meio do *software* TopScan (Figura 27), tendo como referência a base da cauda dos animais. Foram definidas para análise as seguintes áreas: braços abertos, segunda metade dos braços abertos, braços fechados e centro. Foram contabilizados o número de entradas e o tempo de permanência em cada uma destas áreas.

Após a análise realizada pelo *software* os vídeos foram manualmente analisados para categorização das respostas emitidas ao longo do teste com ajuda do software Etholog (Otoni, 2000). Foram contabilizadas as seguintes categorias: giros sobre o eixo do próprio corpo; mergulhos de cabeça (*head dipping*); limpeza corporal (*grooming*); imobilidade (*freezing*) e esticar (*stretching*). As definições da topografia das respostas classificadas de acordo com estas categorias estão descritas na Tabela 6.



**Figura 27.** Exemplificação do equipamento e software de análise de vídeos utilizados no teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE). O equipamento em fôrmica branca pode ser visualizado acima à esquerda, onde se encontra um animal em teste. Abaixo encontra-se a delimitação das áreas subdivididas para análise (braços abertos, braços fechados e centro) e a identificação do animal pelo *software* (em branco). À direita encontra-se a programação desta e outras análises.

**Tabela 6.** Definições das categorias utilizadas para análise etológica no teste do Labirinto em Cruz elevado (LCE).

<b>Categorias</b>	<b>Definição</b>
<b>Girar</b>	Animal virar em torno do eixo do próprio corpo em 360°.
<b>Head Dip</b>	Animal olhar para baixo de uma das bordas dos braços abertos, de forma que toda a cabeça fique posicionada abaixo do nível dos braços do LCE.
<b>Limpeza</b>	Lamber as patas dianteiras e passá-las no pelo ou lambar diretamente o pelo, começando pelo focinho, se deslocando para as orelhas e possivelmente pelo resto do corpo.
<b>Imobilidade</b>	Ausência de qualquer movimento, exceto pela respiração.
<b>Esticar</b>	Andar para frente com o corpo esticado e o abdome rente ao chão.



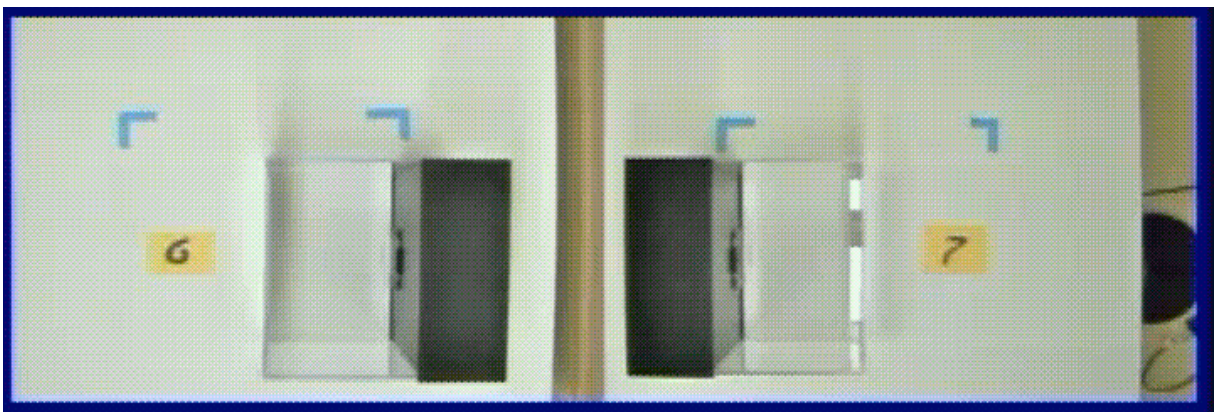
**Análise estatística:** os dados foram separadamente analisados por ANOVAs fatoriais (3x2), tendo como variável dependente cada um dos parâmetros e como fatores os grupos (LR, LF e I) e os tratamentos (LiCl e C).

### **Teste da caixa Claro/Escuro**

**Equipamento:** 2 caixas de acrílico transparentes (35 x 35 x 35cm) divididas em dois compartimentos comunicantes por uma porta guilhotina. Um dos compartimentos era maior (23 x 35 x 35cm) e iluminado (400 lux), enquanto o outro era menor (12 x 35 x 35cm) e escuro (2lux) (Figura 28). Duas câmeras; sistema de registro de vídeo CaptureStar (CleverSys Inc, Reston, VA, EUA), computador IBM e software *Anno Star* (CleverSys Inc, Reston, VA, EUA).

**Procedimento:** no dia 39 cada camundongo foi introduzido individualmente na parte escura da caixa, tendo a porta guilhotina fechada. A porta guilhotina foi então imediatamente removida e a atividade do animal registrada pela câmera atrelada ao computador por 10 minutos, duante os quais a experimentadora permaneceu na sala.

**Análise dos dados:** os registros de vídeo foram manualmente categorizados com ajuda do *software Anno Star* (CleverSys Inc, Reston, VA, EUA). Foram contabilizados o número de transições entre os compartimentos claro e escuro e o tempo de permanência em cada um dos compartimentos.



**Figura 28.** Exemplificação dos equipamentos utilizados no teste do Claro/Escuro. As duas caixas utilizadas podem ser visualizadas acima, bem como as subdivisões dos lados claro em acrílico transparente (23 x 35 x 35cm) e escuro em madeira revestida por tinta preta (12 x 35 x 35cm).



**Análise estatística:** os dados foram analisados por ANOVAs fatoriais, tendo como variável dependente cada um dos parâmetros (número de transições e tempo de permanência em cada lado) e como fatores os grupos (LR, LF e I) e os tratamentos (LiCl e C).

### **Preferência por sacarina**

**Equipamento:** 2 garrafas de água (80ml) inseridas em um suporte adicional com dois dispositivos de acesso aos bebedouros, adicionados a cada gaiola viveiro.

**Procedimento:** os animais foram alojados individualmente pelo período de 72h (dias 44 a 47), tendo acesso às rações de tratamento (com LiCl ou controle) *ad libitum*. Durante este período a solução salina foi removida, sendo oferecido acesso apenas às garrafas contendo duas soluções: água potável e solução de sacarina na concentração de 1%. As garrafas foram posicionadas aleatoriamente, sendo pesadas a cada 24h e tendo então os lados invertidos para evitar o viés da preferência por lugar.

**Análise dos dados:** as diferenças de peso (peso inicial – peso final) das garrafas no terceiro dia de teste foram computadas com base no percentual de consumo da sacarose em relação ao consumo total de líquidos desempenhado por cada animal.

**Análise estatística:** os dados foram analisados por meio de ANOVAs fatoriais, tendo como variável dependente o percentual de preferência pela sacarina e como fatores os grupos (LR, LF e I) e os tratamentos (LiCl e C).

### **F. Eutanásia**

**Equipamentos:** aparato para anestesia por isoflurano (conforme a indução anestésica descrita no procedimento cirúrgico).

**Eutanásia:** 11 dias após a finalização dos testes comportamentais (dia 58) os animais foram eutanasiados. Neste procedimento, cada gaiola-moradia foi levada à sala de procedimentos e os animais foram imediatamente anestesiados por inalação de isoflurano na caixa de indução. Após adormecimento cada camundongo foi imediatamente submetido ao deslocamento cervical e decapitação. O encéfalo foi cuidadosamente removido e dividido nas porções anterior e posterior (seção aproximadamente no nível I.A.1,34mm). A porção anterior foi imediatamente acondicionada em gelo seco para posterior análise dos níveis de lítio. A parte posterior foi inserida em solução de paraformaldeído a 4%.

## G. Análise dos níveis de lítio

**Equipamento:** homogenizador *polytron* (Kinematica AG, Modelo PT-MR 2100, Littau, Switzerland), vortex (Fisher Scientific, EUA), microcentrífuga e espectrofotômetro de chama (Cole-Palmer Modelo 2655-00, Chicago, IL, EUA).

**Procedimento:** foi seguido protocolo anteriormente descrito (Can et al., 2011; Hamburger-Bar, Robert, Newman, & Belmaker, 1986; Kovacsics & Gould, 2010). Neste, após acondicionamento em gelo seco e manutenção em congelamento (-80°C) por período mínimo de 24 h, a parte anterior dos encéfalos foi pesada individualmente em e mantida em temperatura ambiente para descongelamento (60 minutos). Em seguida foram homogenizadas (15 segundos) em três volumes de ácido tricloroacético 0.5M (1mg/3µL). Os tubos foram então agitados por *vortex* por 10 segundos a cada dez minutos por 30 min. Na sequência foram centrifugados por duas vezes em velocidade máxima (4000rpm) por 15 min. O sobrenadante foi removido e inserido em um novo microtubo devidamente identificado que foi novamente agitado por *vortex* imediatamente antes da análise no espectrofotômetro.

O espectrofotômetro foi calibrado a partir da linha de base produzida pela leitura das amostras dos encéfalos homogeneizados dos animais alimentados com ração controle (*blank*). Após calibração foram inseridas no equipamento, uma a uma, as amostras do tecido encefálico homogeneizado dos animais tratados com LiCl. O procedimento foi repetido para confirmação dos valores de LiCl para a amostra de cada animal utilizado no experimento.

**Análise estatística:** a concentração de LiCl (mmol/kg) foi analisada por uma ANOVA fatorial, sendo adotada como variável dependente os níveis de LiCl e como fatores os grupos (LR, LF e I) e os tratamentos (LiCl e controle).

## H. Histologia

**Equipamentos:** criostato (Leica - Modelo 1850); Microscópio Óptico (Scope.A1, Carl Zeiss – LLC, EUA), câmera (AxioCam Mrc Zeiss– LLC, EUA) e software de análise de imagens ImageJ (NIH, EUA).

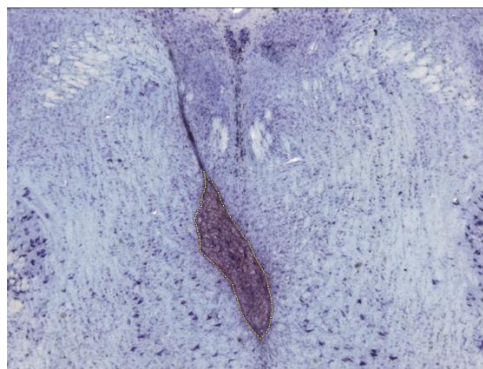
**Procedimentos:** Após 48h de imersão em solução de paraformaldeído 4%, a secção posterior do encéfalo foi inserida em solução de sacarose a 30% e mantida em refrigeração (10°C) pelo período mínimo de 48h, quando iniciou-se o procedimento de cortes (30 µm ) em criostato. Os cortes foram recolhidos em lâminas gelatinizadas (gelatina *Sigma g-2500* e

sulfato de cromo-potássio na razão de 10:1). Na sequência os cortes foram submetidos à coloração pelo método de NISSL, utilizando-se como corante tionina. As lâminas foram então protegidas por lamínulas de vidro coladas por Permount®.

A análise das lâminas foi feita por meio de um microscópio óptico, sendo as áreas lesionadas identificadas por comparação com o Atlas Estereotáxico do cérebro do camundongo (Franklin & Paxinos, 2007). As estruturas lesionadas em cada caso foram listadas, bem como o posicionamento rostro-caudal, lateral e dorso-ventral do tecido destruído. Foram fotografados um caso típico e de todos os casos os cortes histológicos que apresentavam maior área de gliose indicativa de destruição do tecido pela eletrólise.

A mensuração da área da lesão em cada caso foi realizada com o auxílio do *software* ImageJ (National Institute of Health, NIH, EUA). Todas as fotografias foram realizadas com base nos mesmos parâmetros (aumento em lentes objetivas de 5x) e foram analisadas após calibração do *software* a partir da fotografia de uma barra padrão sob as mesmas condições de aumento. A área de gliose foi cuidadosamente contornada e o *software* forneceu os dados da área em destaque (Figura 29). Quando observada interrupção da gliose, as diferentes áreas foram mensuradas e posteriormente somadas para obtenção dos valores finais.

**Análise estatística:** os valores das áreas das lesões dos grupos de animais tratados com razão controle ou com LiCl foram comparados por um teste T de medidas independentes.



**Figura 29.** Exemplificação do procedimento de mensuração da área da lesão pelo software ImageJ. As glioses indicativas de destruição do tecido foram contornadas e tiveram a área total mensurada a partir de calibração por uma barra padrão nas mesmas condições de aumento.

## RESULTADOS

**Mortalidade e exclusão de casos da amostra:** não foi observada perda de peso superior a 20% nos dias seguintes à cirurgia ou sinais de dor ou infecção. Apenas um animal demonstrou sinais de desidratação e após não responder à injeção subcutânea de solução salina estéril (0,9%) foi eutanasiado. Nos dias seguintes ao reagrupamento após a recuperação cirúrgica inicial, 17 camundongos dos três grupos (LR=9, LF=4 e I=4) morreram ou foram eutanasiados devido a feridas provenientes de brigas (em parte por consequência do excesso de feridas que precediam a realização das cirurgias e em parte pela agressividade excessiva de dois animais: LR, n=1 e LF, n=1). Dentre os animais submetidos à lesão real (LR), sete animais foram excluídos da análise devido a erro no posicionamento da lesão (o local da lesão não foi confirmado no procedimento de análise histológica). A composição final dos grupos considerada nas análises comportamentais, morfométricas e dos níveis de LiCl encontram-se na Tabela 7.

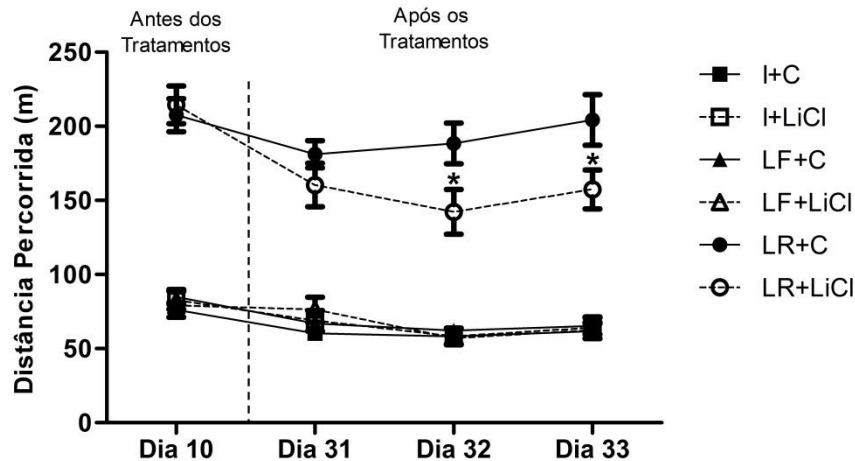
**Tabela 7.** Composição final dos grupos experimentais considerada para as análises comportamentais, morfométricas e dos níveis de LiCl. Todos os grupos tiveram animais excluídos devido à morte ou ferimentos por brigas ou imprecisão do procedimento de lesão do MnR resultando nos números (n) descritos nas diferentes colunas e sub-colunas.

Grupo Experimental		Grupos Controle			
Lesão Real (LR) n=20		Lesão Fictícia (LF) n=21		Intacto (I) n=20	
LiCl n=9	Controle n=11	LiCl n=10	Controle n=11	LiCl n=10	Controle n=10

**Campo aberto (CA):** A ANOVA fatorial de medidas repetidas da atividade locomotora no teste do campo aberto acusou efeito do grupo (LR, LF e I) ( $F(2,55)=163,98$ ;  $p<0,001$ ), efeito do tempo ( $F(2,111)=26,13$ ;  $p<0,001$ ), interação entre tempo e grupo ( $F(4,111)=2,83$ ;  $p<0,05$ ), interação entre tempo e tratamento ( $F(2,111)=4,08$ ;  $p<0,05$ ) e interação entre os fatores tempo, grupo e tratamento ( $F(4,111)=2,72$ ;  $p<0,05$ ). Logo, assume-se a existência de diferenças significativas na atividade locomotora entre os grupos e que houve alteração específica da distância percorrida no decorrer da repetição dos testes como efeito do tratamento.

Os testes *post-hoc* da avaliação pré-tratamentos (Figura 30, dia 10) revelaram diferenças significativas na distância percorrida (m) pelos animais dos grupos submetidos à lesão

eletrolítica do MnR em comparação à dos animais dos grupos controles (LF e I + LiCl e C;  $p < 0,001$ ) e ausência de diferença entre os grupos de animais lesionados subdivididos para os diferentes tratamentos (LR+C x LR+LiCl;  $p = 0,74$ ).

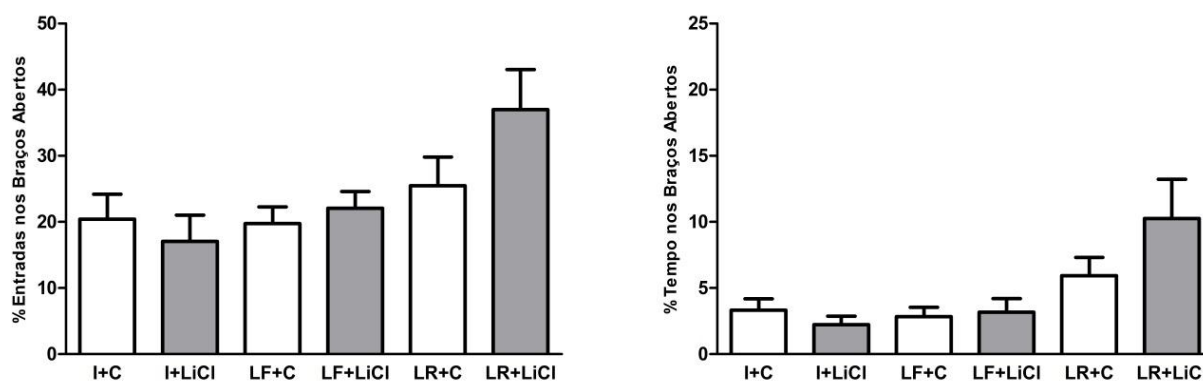


**Figura 30.** Efeito do lítio sobre a atividade locomotora de camundongos submetidos a lesão eletrolítica do MnR. Os valores representam as médias ( $\pm$ EPM) da atividade locomotora (distância percorrida em metros) dos grupos de animais submetidos à lesão eletrolítica do MnR (LR), à lesão fictícia (LF) ou intactos (I) tratados com lítio (LiCl) ou com controle (C). Dados obtidos linha de base (dia 10) e em três avaliações após os tratamentos (dias 31, 32 e 33). \* $p < 0,05$  (Fisher LSD) para diferenças da atividade dos grupos LR+LiCl e LR+C

Como pode ser observado na Figura 30, após o intervalo de 21 dias sob tratamentos crônicos (LiCl ou controle administrados do dia 10 ao dia 31) a atividade dos animais dos grupos MnR lesionados permaneceu significativamente superior à dos animais dos grupos controles (Fisher LSD;  $p < 0,001$ ). Entretanto, observou-se diminuição da atividade locomotora de ambos os grupos submetidos à lesão real (LR+C/ $p < 0,05$ , dia 10 x dias 31 e 32 e LR+LiCl/ $p < 0,001$ , dia 10 x dias 31, 32 e 33) e que estes dois grupos diferiram significativamente no decorrer das repetidas avaliações (LR+C x LR+LiCl/  $p < 0,05$  nos dias 32 e 33) – demonstrando redução adicional da atividade nos animais lesionados tratados com lítio. A análise da atividade dos grupos lesão fictícia e intacto submetidos aos diferentes tratamentos não acusou diferenças entre-grupos controles ou ao longo dos diferentes momentos de realização do teste.

Não foram encontradas interações entre fatores ou efeito dos fatores grupo ou tratamento no que se refere ao tempo despendido nos centros grande ou pequeno, bem como na quantidade de bolotas fecais contabilizadas ao final de cada avaliação.

**Labirinto em cruz elevado (LCE):** as ANOVAs fatoriais dos parâmetros percentual de entradas nos braços abertos e percentual de tempo nos braços abertos acusaram efeito do grupo (LR, LF e I) ( $F(2,55)=5,63$ ;  $p<0,01$  e  $F(2,55)=9,07$ ;  $p<0,001$ ), mas não do tratamento ou da interação entre fatores.



**Figura 31.** Efeito da lesão do MnR e do tratamento crônico com lítio sobre o desempenho de camundongos no teste do labirinto em cruz elevado (LCE). Os valores expressos nas barras representam as médias ( $\pm$ EPM) do percentual de entradas nos braços abertos em relação ao número total de entradas (braços abertos + braços fechados) e do percentual de tempo despendido nos braços abertos em relação ao tempo total do teste dos grupos dos grupos de animais submetidos à lesão eletrolítica do MnR (LR), à lesão fictícia (LF) ou intactos (I) tratados com lítio (LiCl) ou controle (C).

Os dados referentes ao desempenho dos camundongos no teste do LCE podem ser visualizados na Figura 31. Pode-se observar que a lesão do MnR exerceu leve efeito sobre a frequência de entradas nos braços abertos (LR x LF e I: Fisher LSD;  $p<0,05$ ) e sobre o percentual do tempo despendido nesta área do LCE (LR x LF e I: Fisher LSD;  $p<0,001$ ). Apesar da ausência de efeito significativo do tratamento, nota-se que as alterações induzidas pela lesão nos parâmetros avaliados mostraram-se mais pronunciadas nos animais do grupo LR tratados com LiCl.

Os valores dos parâmetros etológicos observados ao longo do teste do LCE estão descritos na Tabela 8. A ANOVA fatorial indicou existência de efeito do grupo ( $F(2,55)=4,44$ ;  $p<0,05$ ), do tratamento ( $F(1,55)=8,16$ ;  $p<0,01$ ) e de interação grupo e tratamento ( $F(2,55)=5,30$ ;  $p<0,01$ ) em relação ao comportamento de girar. A análise *post-hoc* demonstrou que a frequência deste parâmetro está aumentada no grupo de animais LR tratado com controle (LR+C) em comparação aos demais grupos (Fisher LSD,  $p<0,001$ ). Foram encontrados ainda

efeitos do grupo ( $F(2,55)=20,36$ ;  $p<0,001$ ) e do tratamento ( $F(1,55)=18,66$ ;  $p<0,001$ ) sobre a frequência de *head dippings*. Ou seja, tanto a lesão quanto o lítio parecem ter exercido efeito facilitador sobre a emissão das respostas de mergulhar a cabeça (Fisher LSD; LR x LF e I:  $p<0,001$  e LiCl x C:  $p<0,001$ ).

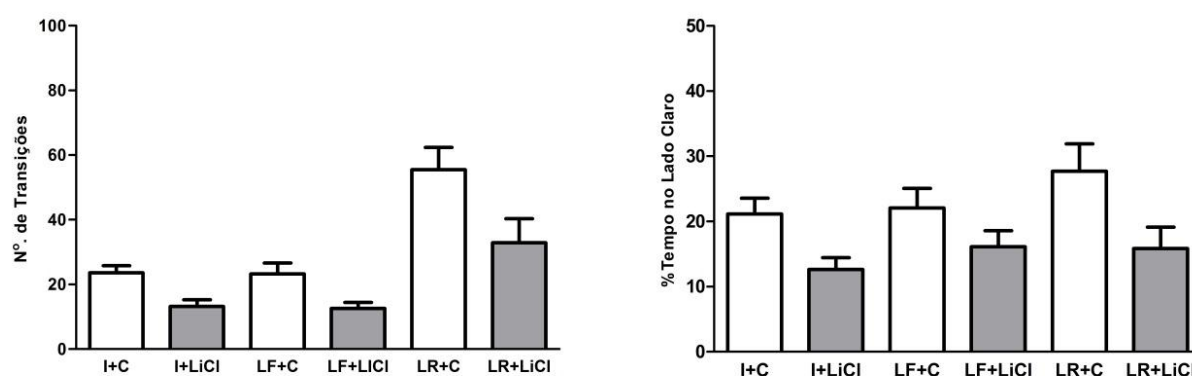
**Tabela 8.** Frequência de respostas emitidas pelos camundongos das diferentes combinações entre grupos e tratamentos no teste do labirinto em cruz elevado (LCE). Média ( $\pm$ EPM) da emissão de respostas categorizadas a partir de análise dos vídeos dos animais no decorrer do teste dos animais submetidos à lesão eletrolítica do MnR (LR), à lesão fictícia (LF) ou intactos (I) tratados com lítio (LiCl) ou com controle (C). \*\*\*  $p<0,001$  em comparação aos grupos I (LiCl e C), LF (LiCl e C) e LR+LiCl (Fisher LSD).

<b>Categorias</b>	<b>I+C</b>	<b>I+LiCl</b>	<b>LF+C</b>	<b>LF+LiCl</b>	<b>LR+C</b>	<b>LR+LiCl</b>
<b>Girar</b>	1,20 $\pm$ 0,55	0,80 $\pm$ 0,55	1,09 $\pm$ 0,52	1,00 $\pm$ 0,55	<b>4,09<math>\pm</math>0,52***</b>	0,78 $\pm$ 0,58
<b>Head Dip</b>	10,10 $\pm$ 2,92	18,30 $\pm$ 2,92	8,36 $\pm$ 2,78	16,30 $\pm$ 2,92	22,00 $\pm$ 2,78	36,56 $\pm$ 3,07
<b>Limpeza</b>	5,70 $\pm$ 0,87	6,00 $\pm$ 0,87	5,55 $\pm$ 0,83	5,00 $\pm$ 0,87	3,73 $\pm$ 0,83	2,67 $\pm$ 0,91
<b>Imobilidade</b>	6,70 $\pm$ 1,57	7,40 $\pm$ 1,57	8,36 $\pm$ 1,49	8,60 $\pm$ 1,57	1,36 $\pm$ 1,49	4,22 $\pm$ 1,65
<b>Esticar</b>	7,20 $\pm$ 1,51	10,20 $\pm$ 1,51	9,36 $\pm$ 1,44	10,70 $\pm$ 1,51	8,36 $\pm$ 1,44	6,00 $\pm$ 1,59
<b>Bolotas Fecais</b>	2,00 $\pm$ 0,70	2,40 $\pm$ 0,70	1,55 $\pm$ 0,67	3,30 $\pm$ 0,70	0,55 $\pm$ 0,67	1,89 $\pm$ 0,74

A análise etológica demonstrou também efeito do grupo sobre os comportamentos limpeza (*grooming*) ( $F(2,55)=5,16$ ;  $p<0,01$ ) e imobilidade (*freezing*) – ambos com frequência reduzida nos animais dos grupos submetidos à lesão real (LR x LF e I: Fisher LSD;  $p<0,05$  e  $p<0,001$ , respectivamente). Por fim, foi observado efeito do tratamento com LiCl aumentando a quantidade de bolotas fecais liberadas pelos animais ( $F(1,55)=4,22$ ;  $p<0,05$ /LiCl x C: Fisher LSD;  $p<0,05$ ) e ausência de qualquer efeito sobre o comportamento de esticar.

**Claro/Escuro:** A análise fatorial do número de transições entre os compartimentos claro e escuro acusou efeito do tratamento ( $F(1,55)=15,16$ ;  $p<0,001$ ) e do grupo ( $F(2,55)=21,31$ ;  $p<0,001$ ), mas não demonstrou existência de interação entre estes fatores. Quando o parâmetro analisado foi o percentual de tempo despendido no lado claro, foi observado efeito apenas do tratamento ( $F(1,55)=12,64$ ;  $p<0,001$ ) e novamente ausência de interação entre fatores.

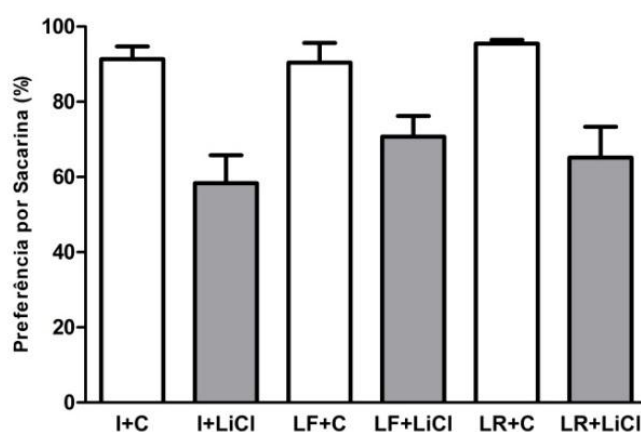
Nota-se na Figura 32 que o número de transições é superior nos grupos de animais submetidos à lesão eletrolítica do MnR em comparação aos grupos controles (LR x LF e I: Fisher LSD;  $p < 0.05$ ), mas que a lesão não surtiu efeito sobre o tempo de permanência no compartimento claro. É também possível observar na Figura 32 o efeito do lítio sobre os parâmetros número de transições (LiCl x C: Fisher LSD;  $p < 0,001$ ) e percentual de tempo no claro (LiCl x C: Fisher LSD;  $p < 0,001$ ), reduzindo em ambos a exposição ao lado claro do equipamento.



**Figura 32.** Efeito da lesão do MnR e do tratamento crônico com lítio sobre o desempenho no teste da caixa Claro/Escuro. Os valores expressos nas barras representam as médias ( $\pm$ EPM) do número de transições entre os compartimentos e do percentual do tempo de permanência no compartimento claro em relação ao tempo total do teste dos grupos de animais submetidos à lesão eletrolítica do MnR (LR), à lesão fictícia (LF) ou intactos (I) tratados com lítio (LiCl) ou com controle (C).

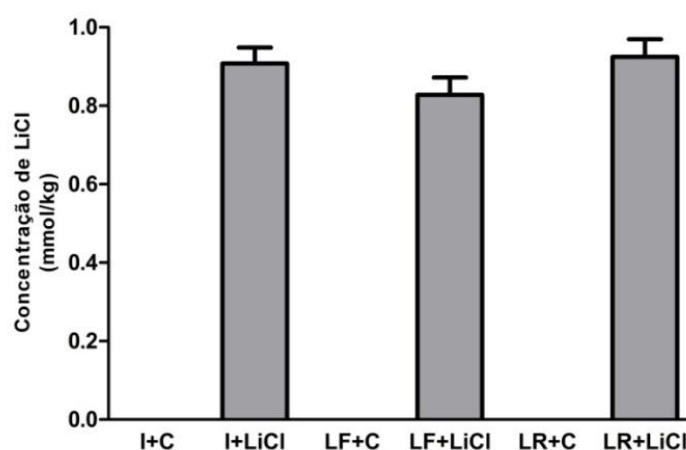
**Preferência por sacarina:** foi observado efeito do tratamento com LiCl sobre a redução na preferência por solução de sacarina (1%) ( $F(1,54)=39,39$ ;  $p < 0,001$ /LiCl x C: Fisher LSD;  $p < 0,001$ ). Não foram observadas diferenças significativas entre grupos submetidos ao mesmo tratamento ou interação entre grupo cirúrgico e tratamento. Estes dados podem ser observados na Figura 33.





**Figura 33.** Efeito do tratamento crônico com lítio sobre a preferência pela solução de sacarina. Os valores expressos nas barras representam as médias ( $\pm$ EPM) do percentual de consumo da solução de sacarina em relação ao consumo total de líquidos (solução de sacarose + água) pelo período de 24h no terceiro dia do teste dos grupos de animais submetidos à lesão eletrolítica do MnR (LR), à lesão fictícia (LF) ou intactos (I) tratados com lítio (LiCl) ou com controle (C).

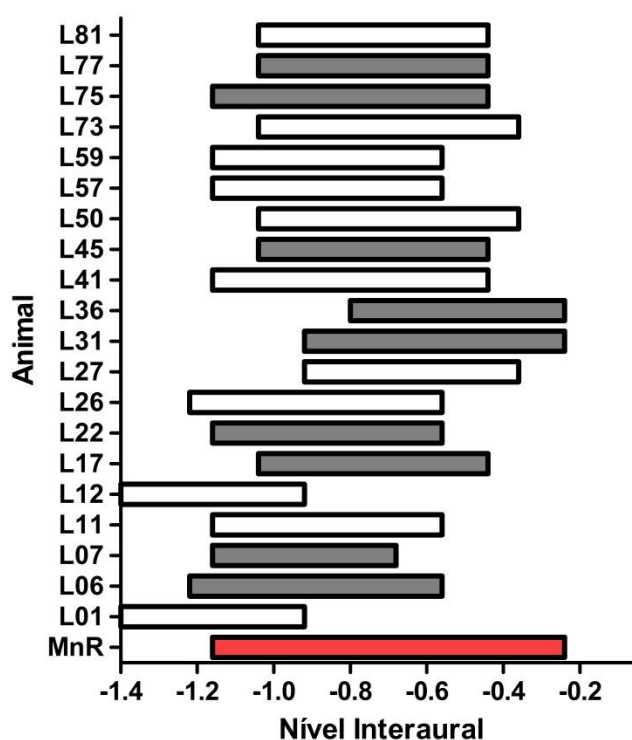
**Análise dos níveis de lítio:** a ANOVA fatorial dos níveis de lítio obtidos por análise das amostras de tecido encefálico dos animais demonstrou claramente efeito do tratamento sobre os valores de concentração (mmol/kg) obtidos ( $F(1,55)=1400,07$ ;  $p<0,001$ ; LiCl x C: Fisher LSD;  $p<0,001$ ). Não foram observados efeitos de grupo (LR, LF e I) ou interação entre estes fatores. Pode-se afirmar portanto que os três grupos tratados com LiCl estavam sob efeito de doses equivalentes do fármaco, como pode ser visualizado na Figura 34.



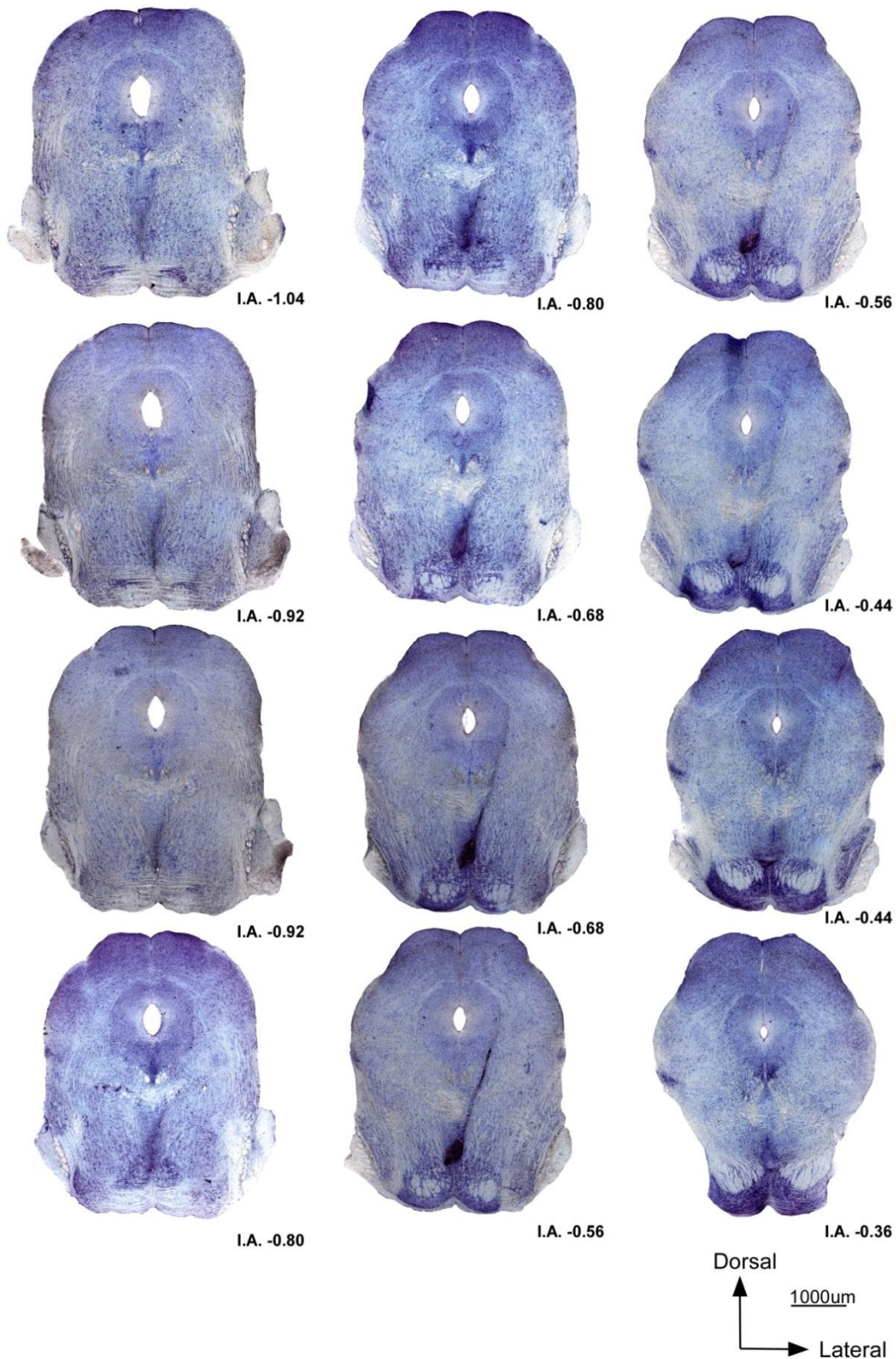
**Figura 34.** Concentração média ( $\pm$ EPM) de lítio (mmol/kg) obtida na análise do tecido encefálico extraído dos animais dos diferentes grupos (LR, LF e I) tratados com ração controle ou com acréscimo de LiCl.

**Análise histológica:** o estudo dos casos das lâminas dos cortes histológicos dos encéfalos dos animais submetidos à lesão eletrolítica do MnR permitiu o mapeamento da área de gliose com base na abrangência de estruturas, da lateralidade, da distribuição rostro-caudal e da área do maior ponto de destruição do tecido nervoso. No que se refere à distribuição rostro-caudal, constatou-se que a gliose abrangeu as porções central e caudal do MnR e se estendeu pela maior parte de sua extensão, com a exceção de dois casos em que apenas a porção caudal do núcleo foi destruída. O diagrama representativo do posicionamento rostro-caudal das lesões em comparação à extensão do MnR encontra-se na Figura 35.

Com relação à abrangência de estruturas e à lateralidade, pode-se constatar que a lesão englobou em todos os casos o MnR em sua porção central e sua subdivisão paramediana (PMnR). Algumas outras estruturas foram apenas parcialmente atingidas pela gliose, em especial o núcleo reticulotegmental da ponte (RtTg) (descrição detalhada vide Apêndice D). Um caso típico das lesões deste experimento pode ser visualizado na Figura 36.

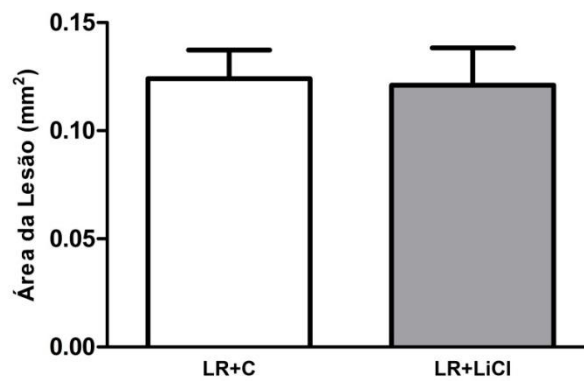


**Figura 35.** Diagrama da distribuição rostrocaudal das lesões eletrolíticas nos camundongos. Dados de animais dos grupos lesão real tendo como referência o Atlas Estereotático do encéfalo do camundongo (Franklin & Paxinos, 2007). As barras horizontais representam a extensão rostrocaudal das lesões eletrolíticas entre os níveis I.A. -1,4 a -0,2. Barras brancas referem-se aos animais do grupo lesão real tratado com controle (LR+C) e as barras cinzas referem-se aos animais lesão real tratados com lítio (LR+LiCl). A barra em vermelho indica a extensão do núcleo mediano da rafe (MnR). Abreviatura: I.A., nível interaural.



**Figura 36.** Mapeamento da lesão eletrolítica na região do núcleo mediano da rafe. Fotomicrografias de cortes histológicos coronais do tronco encefálico de um camundongo do grupo lesão real, corados pelo método de Nissl e organizados de caudal (I.A.= -1,04) para rostral (I.A.= -0,36). O intervalo entre os cortes é de 60µm e a barra de calibração é válida para todas as imagens. Abreviatura: I.A., nível interaural.

Por fim, a análise da área da lesão demonstrou que não existem diferenças significativas entre os grupos LR+C e LR+LiCl no que se refere à maior extensão de gliose selecionada nos cortes histológicos. Pode-se afirmar portanto que não houve diferença entre a dimensão das lesões entre os grupos submetidos aos diferentes tratamentos. A comparação da área média ( $\pm$ EPM) das glioses analisadas nos dois grupos está representada na Figura 37.



**Figura 37.** Área média ( $\pm$ EPM) da gliose indicativa de destruição do tecido encefálico dos animais submetidos à lesão eletrolítica do MnR tratados com ração controle e com LiCl. Os valores foram obtidos pela mensuração da maior área de gliose observada nos cortes histológicos dos animais lesionados em mm<sup>2</sup>.

## DISCUSSÃO

Os resultados descritos neste capítulo demonstram que a lesão eletrolítica da região do MnR em camundongos C57BL/6J produz hiperatividade locomotora, estereotipia, aumento na frequência de exposição a condições aversivas. Estes dados indicam que apesar das diferenças entre as espécies (Canto-de-Souza et al., 2002; Martin & van den Buuse, 2008; Nunes-de-Souza et al., 2011) e dos procedimentos utilizados, foram reproduzidos em camundongos os efeitos da lesão eletrolítica deste núcleo já demonstrados em ratos (Andrade & Graeff, 2001; Asin & Fibiger, 1983; Jacobs & Cohen, 1976). Foi também demonstrado que o tratamento crônico com o estabilizador de humor lítio (LiCl) foi capaz de atenuar ou reverter parte destas alterações comportamentais induzidas pela lesão.

**Campo Aberto:** os resultados demonstram claramente que a lesão eletrolítica da região do MnR produz aumento significativo na distância percorrida por camundongos C57BL/6J no teste do campo aberto. O decréscimo da distância percorrida pelos dois grupos LR no dia 31 em comparação ao dia 10 poderia decorrer da habituação dos animais à condição de teste, entretanto a ausência de qualquer diferença entre os dois momentos de avaliação nos quatro grupos controles (LF e I + C e LiCl) desqualificam esta possibilidade. Uma explicação pertinente seria de adaptação dos organismos dos animais à lesão (Jacobs et al., 1974) – que pode resultar da recuperação do processo inflamatório decorrente da eletrocoagulação e/ou do re-equilíbrio dos sistemas dopaminérgico e noradrenérgico que sofrem efeitos agudos nos primeiros dias após a lesão (Herve et al., 1981; Nishikawa et al., 1986; Wirtshafter et al., 1988).

A especificidade do efeito do lítio sobre o desempenho do grupo LR+LiCl permite algumas constatações. Primeiro, deve-se considerar que o fato de o tratamento com LiCl não ter exercido qualquer efeito sobre a atividade locomotora dos grupos controles LF e I permite descartar a possibilidade de toxicidade na alteração observada no grupo LR+LiCl. Segundo, a especificidade adiciona evidências de que a alteração produzida pela lesão sobre a atividade locomotora é um fenômeno sensível à ação particular do fármaco que em humanos é efetivo no tratamento de pacientes maníacos – o que adiciona evidências ao valor preditivo do modelo proposto.

A complexidade dos efeitos do LiCl sobre o sistema nervoso central impede a identificação um sistema único responsável pela redução da atividade locomotora observada. Em linhas gerais supõe-se que tal efeito pode decorrer tanto de alterações nas neurotransmissões dopaminérgica e noradrenérgica (Allikmets & Nurk, 1981; Berggren,

1988; Dziejzicka-Wasylewska & Wedzony, 1996; Schloesser et al., 2012), quanto na porção intacta dos sistemas serotoninérgico e gabaérgico (Scheuch et al., 2010; Schloesser et al., 2012) ou ainda de efeitos neuroprotetores e neurotróficos (ex. hipocampo) (Schloesser et al., 2012; Wood, Young, Reagan, Chen, & McEwen, 2004). Assim como no Experimento 2 do Capítulo I, deve-se ainda admitir que parte da ação da droga esteve comprometida pela destruição do MnR, o que é especialmente crítico pelo conhecido efeito do LiCl no aumento da disponibilidade de serotonina nos núcleos da rafe (Scheuch et al., 2010) e na atividade gabaérgica (Schloesser et al., 2012) – bem como pelo papel inibitório que o MnR (modulado por receptores serotoninérgicos e gabaérgicos) exerce sobre a atividade do organismo e sobre o sistema dopaminérgico (Graeff & Silveira Filho, 1978; Liu & Ikemoto, 2007; Vollrath-Smith et al., 2012).

A ausência de efeito da lesão do MnR sobre o tempo de permanência no centro e sobre a quantidade de bolotas fecais do campo aberto sugerem que, neste contexto, o procedimento experimental não alterou a exposição ao risco ou o denominado “nível de ansiedade” descrito em ratos (Andrade & Graeff, 2001; Andrade et al., 2004). Esta afirmação, entretanto, merece ser reconsiderada na análise dos dados dos demais testes realizados – discutidos a seguir.

**Labirinto em Cruz Elevado:** dados obtidos no teste do LCE demonstraram leve efeito da lesão eletrolítica do MnR sobre a exploração dos braços abertos (% de entradas e % do tempo). No entanto, fica evidente que tal facilitação é mais notável nos animais do grupo LR+LiCl e menos presente nos animais do grupo LR+C. Esta observação permite considerar: a) a possibilidade da existência de diferenças entre os dados obtidos neste experimento e os resultados descritos como efeitos da lesão eletrolítica do MnR em ratos neste mesmo teste e b) que o lítio não exerceria ação atenuante dos efeitos da lesão como ocorre no campo aberto, chegando até mesmo a ligeiramente facilitar a exploração dos braços abertos do LCE.

Andrade e Graeff (2001), por exemplo, descreveram que a lesão eletrolítica do MnR em ratos produz aumento significativo tanto no percentual de entradas (próximo a 50% em animais lesados x 30% nos controles) quanto no tempo de permanência nos braços abertos (próximo a 60% nos lesados x 15% nos controles) do LCE. Se considerados os valores obtidos pela lesão deste mesmo núcleo nos camundongos do grupo LR+C do presente estudo (próximos a 25% nos lesados x 20% nos controles e próximo a 6% nos lesados x 3% nos controles, respectivamente), é possível especular a existência de diferenças inter-específicas no efeito da lesão eletrolítica do MnR sobre a exploração dos braços abertos. Esta diferença pode decorrer, além das particularidades de cada espécie, de variações em parâmetros

específicos das condições de teste (ingenuidade ou experiência dos animais, condições de luz, alojamento individual ou em grupo, etc). Outra explicação plausível é de a inconsistência entre os resultados refletir a problemática do próprio teste utilizado (LCE) na replicação de dados entre laboratórios (Green & Hodges, 1991). Assim, pode-se afirmar que a lesão eletrolítica do MnR produziu efeito facilitador sobre a exploração dos braços abertos em camundongos, mas que tal facilitação foi menos marcante em comparação aos grupos controles quando comparados aos efeitos “ansiolíticos” da lesão do MnR anteriormente reportados em ratos (Andrade & Graeff, 2001; Andrade et al., 2004).

As aspas adicionadas ao termo ansiolítico decorrem de dois fatores. O primeiro fator refere-se à inadequação do termo, já que Green e Hodges (1991) descrevem que não apenas o labirinto em cruz elevado, mas muitos modelos experimentais que se propõem a avaliar níveis de ansiedade em animais de laboratório (p.e. campo aberto, claro/escuro, interação social, agressividade, esquivas ativa e passiva, sobressalto, etc) teriam baixa validade de face com este fenômeno por envolverem contato direto com estimulação aversiva capaz de desencadear respondentes relacionados à emoção de medo – e não de antecipação do potencial risco de contato com o aversivo presente na ansiedade descrita por humanos. De fato, no teste do labirinto em cruz elevado ratos ou camundongos criados em laboratório são expostos a uma série de estímulos aversivos incondicionados tais como inserção em novo ambiente, luminosidade e altura – capazes de desencadear alterações do responder condizentes com a presença de uma “ameaça definida” (característica do medo) e que independeriam da capacidade da sinalização de um “perigo potencial”. O segundo fator decorre da recente interpretação alternativa de que quando acompanhada de desinibição comportamental, a exploração dos braços abertos pode ser compreendida como um comportamento de exposição ao “risco” ou de enfrentamento ativo da condição aversiva (Yen et al., 2013). Desta maneira, pode-se concluir que o procedimento de lesão eletrolítica de lesão do MnR foi capaz de produzir em camundongos o aumento da exposição ao “risco” no teste do LCE – efeito esperado para composição do quadro maníaco em animais de laboratório (Einat, 2006; Lyon, 1991).

A ausência de efeito do LiCl – ou mesmo o não significativo mas consistente adicional efeito facilitador deste tratamento sobre a exploração dos braços abertos nos animais lesionados em ambos os parâmetros registrados (% de entradas e tempo de permanência) – evidencia sua incapacidade em atenuar os efeitos da lesão do MnR na exposição ao “risco” neste teste, contrariando o efeito preditivo esperado e já obtido nas medidas de atividade locomotora. Tal contrariedade, entretanto, pode decorrer da lacuna do efeito do LiCl sobre

parte do sistema serotoninérgico destruída pela lesão. Isso porque acredita-se que a facilitação da exploração dos braços abertos do LCE estaria relacionada à diminuição da disponibilidade de 5HT no prosencéfalo (Graeff et al., 1996) – a exemplo dos efeitos “ansiolíticos” produzidos pela lesão do MnR neste teste (Andrade & Graeff, 2001). Ao aumentar de forma geral a disponibilidade de serotonina, portanto, o LiCl produziria como efeito aumento no tempo de permanência nos braços fechados – conforme já demonstrado (Kakefuda et al., 2010; Youngs et al., 2006). No entanto, o papel da serotonina na regulação dos comportamentos de inibição/congelamento e luta/fuga não seria simples e linear. Graeff et al. (1996) sugerem a existência de um papel duplo deste neurotransmissor sobre tal regulação: a transmissão serotoninérgica dos núcleos da rafe exerceria efeitos inversos a depender da região eferente, produzindo efeitos inibitórios sobre a amígdala e excitatórios sobre a matéria cinzenta periaquedutal dorsal (DPAG). Dados produzidos pela estimulação do MnR em camundongos confirmam esta suposição, demonstrando que a liberação de 5HT via MnR na matéria cinzenta periaquedutal (PAG) é responsável pelo efeito facilitador do número de entradas e tempo de permanência nos braços abertos do LCE (Canto-de-Souza et al., 2002; Nunes-de-Souza et al., 2011). Assim, o efeito paradoxal exercido pelo LiCl no presente experimento pode decorrer do desequilíbrio produzido pela lesão em sua ação sobre o sistema serotoninérgico – estando esta restrita à porção intacta do MnR e sobre o restante do sistema serotoninérgico, podendo resultar em efeitos diferenciais sobre os terminais pós sinápticos excitatórios (ex. PAG) e inibitórios (ex. amígdala).

A ausência de efeito do lítio na atenuação destas alterações comportamentais decorrentes da lesão no LCE traz também à tona o problema da grande diversidade de resultados obtidos na avaliação do efeito deste íon em diferentes parâmetros comportamentais. Manji e Zarate Jr (2011) descrevem que apenas alguns poucos efeitos do lítio foram consistentemente validados em pesquisas com roedores. De fato, o efeito do lítio é claramente demonstrado apenas na redução do tempo de imobilidade no nado forçado (Bersudsky, Shaldubina, & Belmaker, 2007) e agora quanto à atenuação da hiperatividade locomotora induzida pela lesão do MnR (Pezzato, Novais, Gracia-Mijares, & Hoshino, 2012). Já em pesquisas acerca do seu efeito sobre a atividade espontânea de camundongos e no desempenho em testes de ansiedade, os efeitos são considerados contraditórios (Cappelliez & Moore, 1990; Einat, 2007; Gould et al., 2007; O'Donnell & Gould, 2007).

No que se refere aos parâmetros etológicos, no entanto, a capacidade de reversão dos efeitos da lesão do MnR pelo lítio foi claramente demonstrada quando o comportamento analisado foi o girar. Esta capacidade de indução de giros pela lesão eletrolítica do MnR já



havia sido anteriormente demonstrada em ratos, sendo estes intensificados pela ação de d-*amfetamina* e *apomorfina* e revertidos por *haloperidol* e *metitepina* (Costall & Naylor, 1974; Nicolaou et al., 1979). Estes autores concluem que a ocorrência de giros decorreu de efeitos da lesão sobre o sistema dopaminérgico – o que sugere que o efeito do lítio sobre os giros decorrentes da lesão no presente experimento deve decorrer de sua ação sobre este mesmo sistema. A ocorrência de giros e a ação específica do LiCl sobre este parâmetro nos animais lesados (LR+LiCl) também podem ser considerados consistentes com o quadro experimental de mania. A constância topográfica e sem função aparente dos giros os qualificam como estereotípias, sintoma presente em pacientes maníacos (APA, 1994) – e neste sentido, sua reversão por LiCl contribuiria para a afirmação de validade preditiva do modelo.

Quanto aos demais parâmetros etológicos avaliados no LCE, ficou comprovada capacidade da lesão do MnR em camundongos produzir o aumento na frequência de *head dipping* (mergulhos de cabeça) já observada no Experimento 1 deste estudo e descrita em pesquisas com ratos (Andrade & Graeff, 2001; Hoshino et al., 2004). Esta categoria comportamental, além de estereotipada, também parece constituir um comportamento de avaliação que inclui a exposição ao risco. A emissão de *head dipping* também sofreu efeito facilitador do lítio, fenômeno que pode ser discutido com base nas mesmas hipóteses levantadas para a compreensão do efeito paradoxal deste tratamento sobre a exploração dos braços abertos nos animais MnR lesionados. Ainda, o efeito facilitador do lítio sobre a frequência de *head dips* observado também nos grupos controle sugere a possibilidade de este íon produzir resultados comportamentais diversos quando as condições experimentais envolvem diferentes níveis de aversividade (baixa ou alta exposição ao risco). Com relação aos comportamentos de imobilidade (*freezing*) e limpeza corporal (*grooming*), a diminuição decorrente da lesão pode ser um simples efeito colateral ao aumento da atividade locomotora, uma vez que a emissão de tais respostas estava condicionada ao rebaixamento da atividade dos animais após exploração inicial do ambiente de teste – o que de fato não ocorria nos grupos LR.

**Claro/Escuro:** os dados obtidos nos camundongo no teste do claro-escuro mostram similaridade com os dados obtidos no teste do campo aberto, já que a lesão do MnR também exacerbou a atividade locomotora dos animais – expressa no número de transições – e que o tratamento com lítio a reduziu. Cabe ressaltar, entretanto, que neste contexto a frequência de transições não representou apenas uma medida de atividade, uma vez que esta poderia ter permanecido concentrada no compartimento escuro – a exemplo do que ocorre como o efeito

de agentes psicoestimulantes (anfetaminas) neste teste (Bourin & Hascoet, 2003; Hascoet & Bourin, 1998). Neste sentido, a lesão eletrolítica do MnR parece ter aumentado a probabilidade dos animais se exporem à situação aversiva (“de risco”) – explicável pela diminuição dos mecanismos neurofisiológicos responsáveis pela inibição comportamental em situações de perigo evolutivamente selecionadas (Deakin & Graeff, 1991; Graeff et al., 1996).

A ausência de diferenças no parâmetro percentual de tempo no compartimento claro entre os grupos não invalida a afirmação anterior, mas sugere que a exemplo do que ocorreu no teste do LCE, a lesão eletrolítica do MnR em camundongos parece produzir efeitos mais conservadores em comparação aos observados em ratos – espécie em que ocorre aumento marcante e significativo tanto do número de transições quanto do percentual de permanência no claro (Andrade & Graeff, 2001). Novamente, este tipo de afirmação deve ser considerado com cautela se admitidas possíveis diferenças nas condições de teste (luminosidade, ingenuidade ou experiência prévia dos animais, alojamento individual ou grupal, etc).

Portanto, pode-se constatar que o aumento do número de transições induzido pela lesão do MnR em camundongos consiste em um aumento da exposição à condição aversiva ou de “risco” – alteração comportamental esperada em modelos animais de mania (Einat, 2006; Lyon, 1991) e que tal alteração é reversível pela ação do lítio. A inespecificidade do efeito do LiCl – que foi efetivo em reduzir o número de transições e tempo de permanência no claro em todos os grupos – permite algumas ponderações. A primeira refere-se ao fato de que a eficácia do LiCl em reduzir o número de transições não se deve ao seu efeito sobre a atividade locomotora dos animais, já que este tratamento não exerceu qualquer efeito sobre o desempenho dos animais dos grupos controles no teste do campo aberto. O efeito do LiCl sobre os parâmetros avaliados no teste do claro-escuro, portanto, parece decorrer de sua capacidade em diminuir a frequência e tempo de exposição à condição aversiva presente no lado claro do equipamento. A segunda ponderação refere-se à possibilidade de as condições de alojamento terem exercido efeito estressor sobre todos os animais – tornando também os grupos controles sensíveis à ação protetora do LiCl sobre os efeitos do estresse crônico (Silva et al., 2008; Vasconcellos, Tabajara, Ferrari, Rocha, & Dalmaz, 2003). Isto porque o alojamento em conjunto de animais dos três grupos (LR, LF e I) permite a suposição de que a dinâmica de interação social (ao menos em termos dos efeitos da hiperatividade dos animais LR) deve ter sido alterada. Além disso, é ainda possível supor que alterações nos padrões de estabelecimento de hierarquização social podem ter ocorrido nos animais MnR lesionados (assim como demonstrado em ratos no Experimento 4 do Capítulo I) e afetado a dinâmica dos demais animais controles da mesma gaiola-viviero. Apesar de se tratarem apenas de

suposições, a possibilidade da ação inespecífica do LiCl refletir o efeito de exposição crônica a eventos aversivos de alguma natureza adquire respaldo por dados de uma pesquisa anterior que demonstrou que a administração crônica de lítio reduziu o número de transições no teste do claro/escuro apenas em animais submetidos ao estresse crônico por restrição, mas não exerceu qualquer efeito sobre camundongos C57/BL6J não estressados (Ihne, Fitzgerald, Hefner, & Holmes, 2012). Deve-se considerar ainda a conhecida ação inespecífica do lítio em reduzir a frequência de agressividade e comportamentos exploratórios em roedores (O'Donnell & Gould, 2007) e em reduzir comportamentos agressivos impulsivos e irritabilidade e aumentar o autocontrole em populações não clínicas humanas (Carlson, Rapport, Pataki, & Kelly, 1992; Sheard, Marini, Bridges, & Wagner, 1976) – o que permite considerar que a ausência de especificidade não anula o potencial preditivo do modelo em questão.

**Preferência por sacarina:** os dados relativos à preferência pela solução de sacarina nos camundongos sugerem que a ausência de diferenças marcantes entre os grupos podem resultar do *efeito teto*, isto é, da falta de diferenças pela proximidade ao consumo máximo em todos os grupos. De fato, os percentuais de preferência pela solução de sabor doce atingiram valores entre 90 a 95% nos animais dos grupos controles – valores muito próximos ao teto se considerada a troca diária de posicionamento das garrafas que induzia os animais a provarem, ao menos uma vez, o conteúdo da garrafa de água. Ou seja, se considerado que o volume de consumo de líquidos dos grupos alimentados por ração controle girou em torno da média de 5g/dia, os 5-10% de água consumidos representavam 0,25-0,5g – valores que corresponderiam ao “teste” inicial para identificação do posicionamento das garrafas.

Apesar de o efeito teto ter comprometido a eficácia do teste em avaliar a preferência por solução doce entre os grupos, testes pilotos anteriores no nosso laboratório com animais da mesma linhagem (C57BL/6J) haviam demonstrado que a concentração de sacarina utilizada (1%) era a que produzia menores índices de preferência em comparação às outras concentrações testadas (0,1; 0,25; 0,5 e 2,5% de sacarina). Contudo, apesar de os valores de preferência nos testes pilotos em que foi utilizada a concentração de 1% terem produzido valores entre 80 a 90% de preferência, no teste com os animais experimentais os valores obtidos superaram a expectativa e afetaram a efetividade do experimento. A comparação do consumo em termos de volume pelos grupos mostrou-se uma alternativa igualmente inefetiva, tanto pela manutenção do problema do efeito teto entre os animais tratados com ração

controle quanto pela impossibilidade de comparação destes grupos com os demais alimentados com ração com LiCl devido à polidipsia induzida por este tratamento.

Destaca-se ainda o efeito do LiCl em reduzir a significativamente preferência pela solução de sacarina em todos os grupos (I+LiCl, LF+LiCl e LR+LiCl). Apesar desta capacidade já ter sido anteriormente demonstrada (Flaisher-Grinberg & Einat, 2010; Flaisher-Grinberg, Overgaard, & Einat, 2009), a já mencionada diversidade dos dados acerca do efeito do LiCl em diferentes testes comportamentais – o que inclui testes acerca da sensibilidade ao reforço (O'Donnell & Gould, 2007) – torna relevante os resultados aqui descritos.

**Análise dos níveis de LiCl:** os níveis de lítio obtidos com base na análise do tecido encefálico demonstraram inexistência de quaisquer diferenças entre grupos. O efeito específico do tratamento com LiCl sobre a atividade locomotora e sobre a frequência de giros no grupo LR, portanto, não pode ser explicado por diferenças no consumo ou metabolização deste íon. Ressalta-se ainda que os índices encefálicos de concentração de LiCl obtidos pela análise por espectrofotômetro (0.8-1.0 mmol/Kg) corresponderam aos valores terapêuticos e não tóxicos obtidos em pesquisas anteriores com a mesma linhagem (Can et al., 2011; Gould et al., 2007; Herman, Hougland, & El-Mallakh, 2007; O'Donnell & Gould, 2007), o que comprova que os animais deste experimento estavam sob efeito de níveis adequados do tratamento.

**Análise histológica:** a histologia permitiu identificar que neste experimento a abrangência das lesões foi, em termos proporcionais, reduzida em comparação às realizadas em ratos no Capítulo I. Neste sentido, pode-se afirmar que as lesões eletrolíticas do MnR realizadas em camundongos neste experimento foram precisas, atingindo apenas ocasionalmente e parcialmente estruturas dorso-ventrais próximas – superando os problemas de extensão excessiva da destruição de tecido encefálico que comprometia a qualidade dos dados do Capítulo I. Deve-se considerar ainda a existência de variabilidade na distribuição rostro-caudal das lesões – o que produziu diferenças em relação à porção do MnR destruídas e que podem ter resultado em diferenças/variabilidade nos efeitos comportamentais observados (Wirtshafter et al., 1986). Por fim, a ausência de diferenças significativas quanto à extensão da área de gliose entre os grupos LR+C e LR+LiCl permitem afirmar que as distinção entre os valores entre-grupos nas avaliações pós-tratamento não decorrem de variações quanto à abrangência da destruição de tecido encefálico.

Os resultados obtidos neste Capítulo II indicam que a lesão da área do MnR em camundongos induz um conjunto de alterações comportamentais correspondentes às

esperadas em quadro experimental de mania (hiperatividade locomotora, estereotípias e exposição aumentada às situações de risco). Apesar da possível diferença em termos de magnitude dos efeitos, a equivalência de tais alterações comportamentais às que ocorrem no rato pode ser estabelecida pela correspondência aos dados anteriormente obtidos nesta outra espécie nos mesmos testes comportamentais. A constatação de que esta hiperatividade do camundongo também é reduzida pela administração de lítio, assim como foi vista no rato, confirma a equivalência dos fenômenos nas duas espécies. Além disso, a demonstração de que o lítio também exerce efeito sobre a emissão de estereotípias e sobre a exploração do compartimento claro no teste do claro/escuro adicionam valor preditivo à hipótese em questão. Tendo em vista estas informações, pode-se dizer que o Capítulo II amplia a fundamentação do uso dos animais com lesão eletrolítica do MnR como modelo animal de mania.

## DISCUSSÃO GERAL

Os dados obtidos neste conjunto de experimentos descritos nos Capítulos I e II suportam a proposição dos efeitos da lesão eletrolítica do MnR consistirem um modelo experimental apropriado para o estudo da mania do Transtorno Bipolar. Especificamente, os resultados demonstraram que o procedimento de lesão eletrolítica do MnR induziu alterações comportamentais condizentes com o quadro esperado para atribuição de validade de face ao quadro maníaco em animais de laboratório (Einat, 2006; Lyon, 1991) e para atribuição de validade preditiva pela capacidade de um estabilizador de humor, o lítio, atenuar ou reverter parte destas alterações. Os animais lesionados apresentaram semelhanças sintomatológicas com o episódio de mania que incluem: hiperatividade locomotora, estereotipia, aumento da frequência de respostas positivamente reforçadas, padrão de dominância em interações sociais e aumento na frequência de exposição a situações aversivas evolutivamente estabelecidas (ao “risco”). O tratamento crônico com lítio foi capaz de atenuar a hiperatividade locomotora e de reverter tanto a incidência de estereotípias (girar), quanto a frequência de exposição ao risco expressa pelo número de transições no teste do claro/escuro. Como pontos contraditórios, os experimentos falharam em demonstrar o aumento no valor reforçador dos estímulos pela análise dos *Break Points* em esquema de reforçamento positivo por sacarose em razão progressiva e de demonstrar preferência por solução de sacarina – aparentemente por problemas nos procedimentos empregados. Além disso, o lítio não foi efetivo em reduzir a exposição aos braços abertos do LCE – sugerindo a necessidade da integridade do MnR para efetividade do tratamento no contexto deste teste. Estes dados, entretanto, não invalidam a hipótese, mas indicam a necessidade da continuidade das investigações para avaliação da pertinência das explicações levantadas nas discussões específicas destes pontos de contradição.

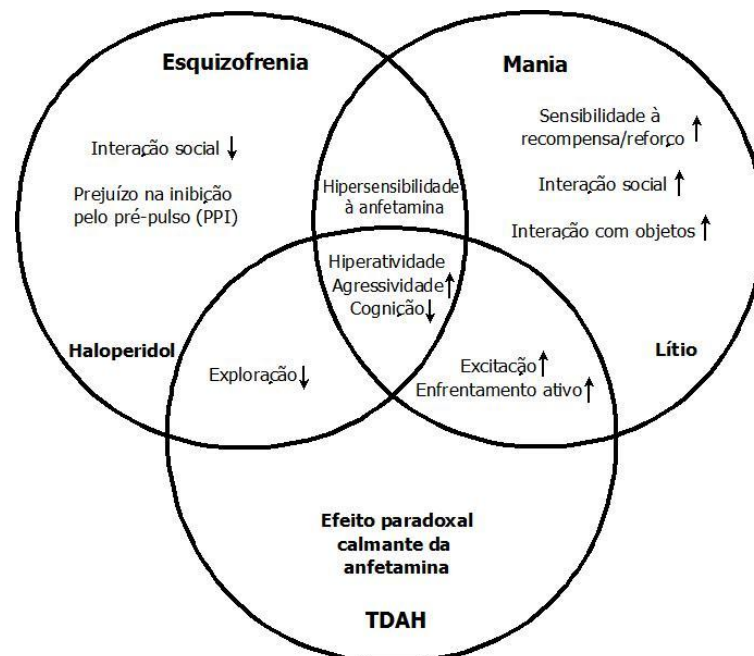
Adicionalmente aos dados já discutidos nos experimentos específicos, vale a pena assinalar que apesar de possíveis diferenças quanto à intensidade das alterações comportamentais observadas (ex. LCE e claro escuro), a reprodutibilidade de um mesmo fenômeno em duas espécies diferentes indica que este é consistente como objeto de estudo por ser baseado em mecanismos biológicos equivalentes. Esta homologia evolutiva é fato que confere aumento à validade da proposição destes animais submetidos à lesão eletrolítica do MnR como modelo animal de mania – já que a similaridade entre diferentes espécies observada é uma das premissas da pesquisa translacional. De fato, o terceiro critério para aceitação de um modelo animal em psicopatologia, denominado de validade de constructo,

depende eminentemente das homologias interespecíficas dos mecanismos envolvidos. Assim, apesar das validades de constructo dos modelos de mania só poderem ser hipotéticas devido à limitação de conhecimentos sobre sua patofisiologia (Einat, 2006), esta constatação adiciona evidências acerca do possível envolvimento do sistema regulador dos níveis de atividade (sistema inibitório/desinibitório), do qual o MnR faz parte, no desenvolvimento do quadro de mania apresentado por alguns pacientes humanos.

É fundamental ressaltar, entretanto, que a constatação de que os efeitos comportamentais da lesão eletrolítica do MnR podem constituir um modelo animal para o estudo da mania não significa afirmar que os animais submetidos à lesão tornam-se maníacos, que apresentam todos os sintomas presentes na psicopatologia humana ou que as alterações de comportamento observadas possuem a mesma causalidade do transtorno humano. De acordo com O'Donnell e Gould (2007) é improvável que um modelo animal de qualquer distúrbio psiquiátrico seja capaz de espelhar simultaneamente a etiologia, a patofisiologia, os sintomas e a resposta a tratamentos característicos da psicopatologia estudada. No entanto, os modelos permitem o estudo controlado de aspectos particulares do transtorno e de seu tratamento – o que ressalta o valor incalculável do desenvolvimento de modelos animais por diversas abordagens (seleção genética, transgenia, indução por psicofármacos, por lesões do SNC, por alteração de condições ambientais, etc). Um argumento que evidencia a importância desta última colocação refere-se à grande heterogeneidade de fenômenos que podem ser classificados sob uma mesma categoria diagnóstica – o que também se aplica ao transtorno bipolar. Isso porque o atual sistema de classificação de doenças psiquiátricas (DSM-V) não se baseia em aspectos neurobiológicos, genéticos ou na resposta a tratamentos – mas apenas em semelhanças sintomatológicas (Charney et al., 2002). Desta forma, a classificação nosológica por sintomas pode agrupar em um mesmo rótulo diferentes condições neurofisiológicas e diferentes mecanismos etiológicos – o que seria responsável pela dificuldade na identificação de condições comuns entre pacientes bipolares, dificultaria a compreensão dos mecanismos envolvidos neste transtorno e conseqüentemente o desenvolvimento de condições experimentais capazes de mimetizar em animais o quadro correspondente ao observado em humanos.

Apesar da heterogeneidade existente dentro de uma mesma classificação diagnóstica e da possibilidade de diferentes diagnósticos compartilharem mecanismos neurofisiológicos comuns, a afirmação da utilidade do estudo dos efeitos da lesão do MnR para a compreensão da patofisiologia da mania requer a identificação da especificidade de correspondência das alterações de comportamento observadas com este transtorno – ou a compreensão do porquê

dos efeitos comportamentais decorrentes da lesão do MnR em roedores serem comparados à mania humana e não a outras psicopatologias. Esta questão se alicerça no fato de a hiperatividade, o aumento dos índices de agressividade e os prejuízos cognitivos também ocorrerem em outros modelos de transtornos psiquiátricos, como o de esquizofrenia e o de transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH). Yen et al. (2013) apontam a possibilidade de distinção entre as alterações de comportamento de cada psicopatologia pela ocorrência conjunta a outras manifestações específicas dos transtornos – conforme pode ser visualizado na Figura 38. Assim, a hiperatividade do TDAH é sabidamente abolida pela administração de psico-estimulantes e se diferencia daquela dos animais MnR lesionados porque, a destes, é aumentada pela administração de anfetamina (Asin & Fibiger, 1983; Geyer et al., 1976). Ainda, a maior frequência de respostas mantidas por reforçamento positivo, a inalteração na frequência de contatos sociais (ex. intruso-residente) e o aumento na frequência de comportamentos de exploração do ambiente (ex. claro-escuro) diferenciam os efeitos da lesão do MnR do modelo experimental de esquizofrenia, confirmando a adequação da proposição de correspondência com o quadro de mania.



**Figura 38.** Diagrama de Venn sobre a distinção e intersecção de alterações de comportamentos em modelos animais para esquizofrenia, mania e TDAH, adaptado da publicação de (Yen et al., 2013).



Ainda quanto à adequação do modelo proposto, cabe ressaltar as vantagens e desvantagens que a lesão eletrolítica do MnR traz. Como vantagens é possível primeiro citar a cronicidade dos efeitos comportamentais avaliados, o que permite a avaliação da efetividade de tratamentos continuados e é uma característica limitante da grande maioria dos modelos de mania existentes até o momento, que reproduzem apenas sintomas correspondentes de forma aguda (Gessa et al., 1995; Gould et al., 2007; Herman et al., 2007; Norton, 1973; O'Donnell & Gould, 2007). Outra importante vantagem refere-se à capacidade de um mesmo procedimento ser eficaz para indução de diversos sintomas do quadro experimental de mania esperado em roedores, uma vez que outros modelos de mania reproduzem somente parcialmente as manifestações deste (Gessa et al., 1995; Gould et al., 2007; Herman et al., 2007; Malkesman et al., 2009; Norton, 1973). Como limitações destacam-se: a) a incapacidade de reprodução da ciclagem entre os polos mania/depressão, que se mantém como grande desafio no estudo experimental do TB; b) a generalidade das alterações produzidas pela inespecificidade do procedimento adotado, que impede a identificação de sistemas específicos participantes da neurobiologia das alterações comportamentais observadas e c) a dificuldade de consistência entre a destruição exata da mesma porção desejada do MnR, acompanhada da ausência de abrangência a outras estruturas próximas.

Por fim, cabe apontar a inovação trazida por esta proposição de modelo de mania induzida pela lesão da região do MnR em roedores. Como dito anteriormente, o MnR intermediado pela neurotransmissão por receptores serotoninérgicos e gabaérgicos, é considerado parte de um sistema geral de inibição. Diferentemente, os modelos de mania existentes, baseados na administração de psicoestimulantes – principalmente anfetaminas – envolvem neurotransmissão dopaminérgica e noradrenérgica (Cappelliez & Moore, 1990; Gorenstein & Scavone, 1999; O'Donnell & Gould, 2007). A constatação de que uma manifestação correspondente à maníaca pode decorrer tanto da ativação dos mecanismos centrais de alerta, como da inativação ou rebaixamento da atividade nos mecanismos inibidores, permite a conceituação de que o equilíbrio entre estes mecanismos é a condição “normal” de vida e que seu desequilíbrio pode resultar na excitação observada na mania, ou em inibição presente em quadros depressivos. Tal conceituação acerca da existência de equilíbrio/desequilíbrio entre os sistemas excitatórios e inibitórios corrobora a teoria do cabo de guerra entre os sistemas dopaminérgico mesolímbico e serotoninérgico/gabaérgico mediado pelos núcleos mediano e dorsal da rafe anteriormente proposta (Daw, Kakade, & Dayan, 2002; Liu & Ikemoto, 2007; Vollrath-Smith et al., 2012). Esta teoria se embasa em estudos que demonstram que respostas comportamentais que eram intensificadas pela

ativação do sistema dopaminérgico poderiam ser ainda mais intensificadas ou suprimidas pela inativação ou ativação, respectivamente, do sistema inibitório composto por estes núcleos da rafe – MnR e DR (Fletcher, 1996; Fletcher & Korth, 1999; Fletcher et al., 1999)

Ainda, a existência de neurônios gabaérgicos no MnR (Kohler & Steinbusch, 1982) e a participação de autoreceptores GABA<sub>A</sub> e GABA<sub>B</sub> (Tao & Auerbach, 2003) na regulação de sua atividade trazem à tona a relevância da compreensão do papel deste neurotransmissor na mediação do equilíbrio entre os sistemas excitatório e inibitório. Tal participação do GABA corroboraria também a hipótese da redução da atividade deste neuromodulador nos transtornos de humor – que complementa a teoria monoaminérgica e propõe que o equilíbrio entre múltiplos sistemas neurotransmissores estaria alterado nestes transtornos (Brambilla, Perez, Barale, Schettini, & Soares, 2003; Fatemi, Folsom, & Thuras, 2011; Luscher, Shen, & Sahir, 2011). Esta suposição é fundamentada com dados de estudos pré-clínicos que tem sugerido que os níveis de GABA podem estar diminuídos em modelos animais de depressão e de estudos clínicos que descreveram baixos níveis plasmáticos de GABA em pacientes acometidos por transtornos de humor (Brambilla et al., 2003; Luscher et al., 2011). Além disso, antidepressivos, estabilizadores de humor, terapia eletroconvulsiva e agonistas gabaérgicos vem se mostrando capazes de reverter comportamentos depressivos em modelos animais e serem efetivos para pacientes uni e bipolares por meio do aumento da atividade gabaérgica no sistema nervoso central (Brambilla et al., 2003; Luscher et al., 2011).

## CONCLUSÕES

1. Os resultados do presente trabalho dão suporte à validade da proposição de que o quadro de manifestações induzidas pela lesão eletrolítica do MnR no rato e no camundongo constitui um modelo animal para o estudo da mania.
2. O modelo proposto produz diversas alterações comportamentais crônicas correspondentes às esperadas para atribuição de validade de face ao episódio maníaco (hiperatividade, estereotipia, aumento na frequência de respostas positivamente reforçadas, padrão de dominância social e exposição aumentada a ambientes aversivos/de “risco”) – o que evidencia vantagens desta proposta em relação à maioria dos modelos desenvolvidos até o momento que reproduzem parcialmente os sintomas deste transtorno e apenas de forma aguda.
3. O efeito do lítio na atenuação ou reversão de parte das alterações comportamentais induzidas pela lesão (hiperatividade, estereotipia e exposição ao “risco”) acrescenta valor preditivo ao modelo baseado na lesão eletrolítica do MnR.
4. A reprodutibilidade das alterações comportamentais em diferentes espécies (rato e camundongo) demonstra a existência de homologia evolutiva – o que fortalece a validade de constructo hipotetizada acerca do envolvimento do sistema inibitório do qual o MnR faz parte na neurobiologia da mania.
5. A adoção do modelo proposto sugere ser heurísticamente profícuo e este fato é sugestivo pela possibilidade de revelar novas hipóteses – como a constatação de que o efeito do lítio no teste do LCE pode sofrer variações em um organismo onde o MnR não encontra-se intacto. Ainda, este modelo pode contribuir futuramente para a elucidação do papel dos mecanismos de equilíbrio/oposição do sistema nervoso central (serotoninérgico e gabaérgico x dopaminérgico e noradrenérgico) na neurobiologia dos transtornos de humor.

## REFERÊNCIAS

- Adell, A., Casanovas, J. M., & Artigas, F. (1997). Comparative study in the rat of the actions of different types of stress on the release of 5-HT in raphe nuclei and forebrain areas. *Neuropharmacology*, *36*(4-5), 735-741.
- Akiskal, H. S., Bourgeois, M. L., Angst, J., Post, R., Moller, H., & Hirschfeld, R. (2000). Re-evaluating the prevalence of and diagnostic composition within the broad clinical spectrum of bipolar disorders. *J Affect Disord*, *59 Suppl 1*, S5-S30.
- Albinsson, A., Andersson, G., Andersson, K., Vega-Matuszczyk, J., & Larsson, K. (1996). The effects of lesions in the mesencephalic raphe systems on male rat sexual behavior and locomotor activity. *Behav Brain Res*, *80*(1-2), 57-63.
- Allikmets, L., & Nurk, A. M. (1981). Effect of chronic administration of lithium chloride on the development of dopamine receptor sensitivity during morphine withdrawal in rats. *Biull Eksp Biol Med*, *92*(11), 571-572.
- Almeida, P., Trovo, M., Tokumoto, A., Pereira, A., & Padovan, C. (2013). Role of serotonin 1A receptors in the median raphe nucleus on the behavioral consequences of forced swim stress. *J Psychopharmacol*, *27*(12), 1134-1140. doi: 10.1177/0269881113508829
- Andrade, T. G. (1997). *Participação do núcleo mediano da rafe na modulação de respostas comportamentais, viscerais, endócrinas e imunológicas, frente a estímulos aversivos*. Doutorado, Universidade de São Paulo, Ribeirão preto.
- Andrade, T. G., & Graeff, F. G. (2001). Effect of electrolytic and neurotoxic lesions of the median raphe nucleus on anxiety and stress. *Pharmacol Biochem Behav*, *70*(1), 1-14.
- Andrade, T. G., Macedo, C. E., Zangrossi, H., Jr., & Graeff, F. G. (2004). Anxiolytic-like effects of median raphe nucleus lesion in the elevated T-maze. *Behav Brain Res*, *153*(1), 55-60. doi: 10.1016/j.bbr.2003.10.036
- Andrade, T. G., Nakamuta, J. S., Avanzi, V., & Graeff, F. G. (2005). Anxiolytic effect of estradiol in the median raphe nucleus mediated by 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *Behav Brain Res*, *163*(1), 18-25. doi: 10.1016/j.bbr.2005.04.015
- Andrade, T. G., Sergio, T. O., Broiz, A. C. G., & Avanzi, V. (2007). The effect of oestradiol benzoate in the median raphe nucleus on the exploratory behaviour in forced swimming test. *Trabajos del Instituto Cajal, Tomo*(LXXXI).
- Andrade, T. G., Silva, A. M., Silva, C. L., & Graeff, F. G. (1999). Effect of electrolytic lesion of the median raphe nucleus on behavioral and physiological measures of stress. *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam*, *49*(4), 279-289.

- Armani, F., Andersen, M. L., Andreatini, R., Frussa-Filho, R., Tufik, S., & Galduroz, J. C. (2012). Successful combined therapy with tamoxifen and lithium in a paradoxical sleep deprivation-induced mania model. *CNS Neurosci Ther*, *18*(2), 119-125. doi: 10.1111/j.1755-5949.2010.00224.x
- Arpa, J., & De Andres, I. (1993). Re-examination of the effects of raphe lesions on the sleep/wakefulness cycle states in cats. *J Sleep Res*, *2*(2), 96-102.
- Arpa, J., Padrino, C., Rodriguez-Albarino, A., & de Andres, I. (1998). Centralis superior raphe, reticularis pontis nuclei, and sleep-wakefulness cycle in cats. *J Sleep Res*, *7*(4), 263-275.
- Asin, K. E., & Fibiger, H. C. (1983). An analysis of neuronal elements within the median nucleus of the raphe that mediate lesion-induced increases in locomotor activity. *Brain Res*, *268*(2), 211-223.
- Asin, K. E., & Wirtshafter, D. (1982). Ingestive behaviors of rats with electrolytic median raphe lesions maintained on a food deprivation schedule. *Physiol Behav*, *28*(1), 89-93.
- Asin, K. E., Wirtshafter, D., & Fibiger, H. C. (1985). Electrolytic, but not 5,7-dihydroxytryptamine, lesions of the nucleus medianus raphe impair acquisition of a radial maze task. *Behav Neural Biol*, *44*(3), 415-424.
- Asin, K. E., Wirtshafter, D., & Kent, E. W. (1979a). Impaired patterned responding in rats with electrolytic median raphe lesions. *Physiol Behav*, *23*(4), 803-806.
- Asin, K. E., Wirtshafter, D., & Kent, E. W. (1979b). Straight alley acquisition and extinction and open field activity following discrete electrolytic lesions of the mesencephalic raphe nuclei. *Behav Neural Biol*, *25*(2), 242-256.
- Asin, K. E., Wirtshafter, D., & Kent, E. W. (1980). The effects of electrolytic median raphe lesions on two measures of latent inhibition. *Behav Neural Biol*, *28*(4), 408-417.
- Association, A. P. (1994). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (4<sup>a</sup> ed.). Washington.
- Avanzi, V., Silva, R. C., Macedo, C. E., & Brandao, M. L. (2003). 5-HT mechanisms of median raphe nucleus in the conditioned freezing caused by light/foot-shock association. *Physiol Behav*, *78*(3), 471-477.
- Beck, S. G., Pan, Y. Z., Akanwa, A. C., & Kirby, L. G. (2004). Median and dorsal raphe neurons are not electrophysiologically identical. *J Neurophysiol*, *91*(2), 994-1005. doi: 10.1152/jn.00744.2003
- Behzadi, G., Kalen, P., Parvopassu, F., & Wiklund, L. (1990). Afferents to the median raphe nucleus of the rat: retrograde cholera toxin and wheat germ conjugated horseradish

peroxidase tracing, and selective D-[3H]aspartate labelling of possible excitatory amino acid inputs. *Neuroscience*, 37(1), 77-100.

- Berggren, U. (1988). The effect of short-term lithium administration on noradrenaline metabolism in the limbic forebrain and hemispheres of rats. *J Neural Transm*, 73(1), 71-75.
- Bersudsky, Y., Shaldubina, A., & Belmaker, R. H. (2007). Lithium's effect in forced-swim test is blood level dependent but not dependent on weight loss. *Behav Pharmacol*, 18(1), 77-80. doi: 10.1097/FBP.0b013e32801416ed
- Blount, M. A., Sim, J. H., Zhou, R., Martin, C. F., Lu, W., Sands, J. M., & Klein, J. D. (2010). Expression of transporters involved in urine concentration recovers differently after cessation of lithium treatment. *Am J Physiol Renal Physiol*, 298(3), F601-608. doi: 10.1152/ajprenal.00424.2009
- Bourin, M., & Hascoet, M. (2003). The mouse light/dark box test. *Eur J Pharmacol*, 463(1-3), 55-65.
- Bourin, M., Hascoet, M., Colombel, M. C., Redrobe, J. P., & Baker, G. B. (1996). Differential effects of clonidine, lithium and quinine in the forced swimming test in mice for antidepressants: possible roles of serotonergic systems. *Eur Neuropsychopharmacol*, 6(3), 231-236.
- Brambilla, P., Perez, J., Barale, F., Schettini, G., & Soares, J. C. (2003). GABAergic dysfunction in mood disorders. *Mol Psychiatry*, 8(8), 721-737, 715. doi: 10.1038/sj.mp.4001362
- Brietzke, E., Mansur, R. B., Soczynska, J., Powell, A. M., & McIntyre, R. S. (2012). A theoretical framework informing research about the role of stress in the pathophysiology of bipolar disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 39(1), 1-8. doi: 10.1016/j.pnpbp.2012.05.004
- Briones-Aranda, A., Rocha, L., & Picazo, O. (2005). Influence of forced swimming stress on 5-HT1A receptors and serotonin levels in mouse brain. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 29(2), 275-281. doi: 10.1016/j.pnpbp.2004.11.011
- Can, A., Blackwell, R. A., Piantadosi, S. C., Dao, D. T., O'Donnell, K. C., & Gould, T. D. (2011). Antidepressant-like responses to lithium in genetically diverse mouse strains. *Genes Brain Behav*, 10(4), 434-443. doi: 10.1111/j.1601-183X.2011.00682.x
- Can, A., Piantadosi, S. C., & Gould, T. D. (2013). Differential antidepressant-like response to lithium treatment between mouse strains: effects of sex, maternal care, and mixed genetic background. *Psychopharmacology (Berl)*, 228(3), 411-418. doi: 10.1007/s00213-013-3045-5

- Canto-de-Souza, A., Nunes-de-Souza, R., & Rodgers, R. J. (2002). Anxiolytic-like effect of way-100635 microinfusions into the median (but not dorsal) raphe nucleus in mice exposed to the plus-maze: influence of prior test experience. *Brain Res*, 928(1-2), 50-59.
- Cappelliez, P., & Moore, E. (1990). Effects of lithium on an amphetamine animal model of bipolar disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 14(3), 347-358.
- Carlson, G. A., Rapport, M. D., Pataki, C. S., & Kelly, K. L. (1992). Lithium in hospitalized children at 4 and 8 weeks: mood, behavior and cognitive effects. *J Child Psychol Psychiatry*, 33(2), 411-425.
- Charney, D. S., Barlow, D. H., Botteron, K. N., Cohen, J. D., Goldman, D., Gur, R. C., . . . Zalcman, S. J. (2002). Neuroscience research agenda to guide development of a pathophysiologically based classification system. In D. J. Kupfer, M. B. First & D. A. Regier (Eds.), *A research agenda for DSMV* (pp. xxiii-307). Washington, D.C.: American Psychiatric Association.
- Cohen, A. N., Hammen, C., Henry, R. M., & Daley, S. E. (2004). Effects of stress and social support on recurrence in bipolar disorder. *J Affect Disord*, 82(1), 143-147. doi: 10.1016/j.jad.2003.10.008
- Corley, K. C., Phan, T. H., Daugherty, W. P., & Boadle-Biber, M. C. (2002). Stress-induced activation of median raphe serotonergic neurons in rats is potentiated by the neurotensin antagonist, SR 48692. *Neurosci Lett*, 319(1), 1-4.
- Costa, A. M. N. (2008). Transtorno afetivo bipolar: carga da doença e custos relacionados. *Rev Psiq Clín*, 35(3), 104-110.
- Costall, B., & Naylor, R. J. (1974). Stereotyped and circling behaviour induced by dopaminergic agonists after lesions of the midbrain raphe nuclei. *Eur J Pharmacol*, 29(2), 206-222.
- Cryan, J. F., & Slattery, D. A. (2007). Animal models of mood disorders: Recent developments. *Curr Opin Psychiatry*, 20(1), 1-7. doi: 10.1097/YCO.0b013e3280117733
- Dalgalarrondo, P. (2011). *Evolução do cérebro: sistema nervosa, psicologia e psicopatologia sob a perspectiva evolucionista*. Porto Alegre: Artmed.
- Daugherty, W. P., Corley, K. C., Phan, T. H., & Boadle-Biber, M. C. (2001). Further studies on the activation of rat median raphe serotonergic neurons by inescapable sound stress. *Brain Res*, 923(1-2), 103-111.
- Daw, N. D., Kakade, S., & Dayan, P. (2002). Opponent interactions between serotonin and dopamine. *Neural Netw*, 15(4-6), 603-616.

- De Paula, H. M., Uga, D. A., & Hoshino, K. (2000). *Hiperatividade locomotora em ratos com lesão do núcleo mediano da rafe: um modelo experimental de compulsão?* . Paper presented at the FESBE, Caxambu.
- Deakin, J. (1998). The role of serotonin in depression and anxiety. *Eur Psychiatry, 13 Suppl 2*, 57s-63s. doi: 10.1016/S0924-9338(98)80015-1
- Deakin, J. F., & Graeff, F. G. (1991). 5-HT and mechanisms of defence. *J Psychopharmacol, 5*(4), 305-315. doi: 10.1177/026988119100500414
- Di Giovanni, G., Di Matteo, V., Pierucci, M., & Esposito, E. (2008). Serotonin-dopamine interaction: electrophysiological evidence. *Prog Brain Res, 172*, 45-71. doi: 10.1016/S0079-6123(08)00903-5
- Disorder, W. G. o. B. (2004). Practice Guidelines for the Treatment of Patients with Bipolar Disorder. In A. P. Association (Ed.), *Compendium* (pp. 525-612). Arlington: American Psychiatric Association.
- dos Santos, L., de Andrade, T. G., & Graeff, F. G. (2010). Social separation and diazepam withdrawal increase anxiety in the elevated plus-maze and serotonin turnover in the median raphe and hippocampus. *J Psychopharmacol, 24*(5), 725-731. doi: 10.1177/0269881109106954
- Dziedzicka-Wasylewska, M., & Wedzony, K. (1996). The effect of prolonged administration of lithium on the level of dopamine D2 receptor mRNA in the rat striatum and nucleus accumbens. *Acta Neurobiol Exp (Wars), 56*(1), 29-34.
- Einat, H. (2006). Modelling facets of mania--new directions related to the notion of endophenotypes. *J Psychopharmacol, 20*(5), 714-722. doi: 10.1177/0269881106060241
- Einat, H. (2007). Different behaviors and different strains: potential new ways to model bipolar disorder. *Neurosci Biobehav Rev, 31*(6), 850-857. doi: 10.1016/j.neubiorev.2006.12.001
- Fagundes, D. J., & Taha, M. O. (2004). Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. *Acta Cirúrgica Brasileira, 19*(1), 59-65.
- Fatemi, S. H., Folsom, T. D., & Thuras, P. D. (2011). Deficits in GABA(B) receptor system in schizophrenia and mood disorders: a postmortem study. *Schizophr Res, 128*(1-3), 37-43. doi: 10.1016/j.schres.2010.12.025
- File, S. E., Hyde, J. R., & MacLeod, N. K. (1979). 5,7-dihydroxytryptamine lesions of dorsal and median raphe nuclei and performance in the social interaction test of anxiety and in a home-cage aggression test. *J Affect Disord, 1*(2), 115-122.



- Flaisher-Grinberg, S., & Einat, H. (2010). Strain-specific battery of tests for domains of mania: effects of valproate, lithium and imipramine. *Front Psychiatry, 1*, 10. doi: 10.3389/fpsy.2010.00010
- Flaisher-Grinberg, S., Overgaard, S., & Einat, H. (2009). Attenuation of high sweet solution preference by mood stabilizers: a possible mouse model for the increased reward-seeking domain of mania. *J Neurosci Methods, 177*(1), 44-50. doi: 10.1016/j.jneumeth.2008.09.018
- Fletcher, P. J. (1991). Dopamine receptor blockade in nucleus accumbens or caudate nucleus differentially affects feeding induced by 8-OH-DPAT injected into dorsal or median raphe. *Brain Res, 552*(2), 181-189.
- Fletcher, P. J. (1994). Effects of 8-OH-DPAT, 5-CT and muscimol on behaviour maintained by a DRL20 schedule of reinforcement, following microinjection into the dorsal or median raphe nuclei. *Behav Pharmacol, 5*(3), 326-336.
- Fletcher, P. J. (1995). Effects of combined or separate 5,7-dihydroxytryptamine lesions of the dorsal and median raphe nuclei on responding maintained by a DRL 20s schedule of food reinforcement. *Brain Res, 675*(1-2), 45-54.
- Fletcher, P. J. (1996). Injection of 5-HT into the nucleus accumbens reduces the effects of d-amphetamine on responding for conditioned reward. *Psychopharmacology (Berl), 126*(1), 62-69.
- Fletcher, P. J., & Korth, K. M. (1999). RU-24969 disrupts d-amphetamine self-administration and responding for conditioned reward via stimulation of 5-HT1B receptors. *Behav Pharmacol, 10*(2), 183-193.
- Fletcher, P. J., Korth, K. M., & Chambers, J. W. (1999). Selective destruction of brain serotonin neurons by 5,7-dihydroxytryptamine increases responding for a conditioned reward. *Psychopharmacology (Berl), 147*(3), 291-299.
- Frank, E., Swartz, H. A., & Kupfer, D. J. (2000). Interpersonal and social rhythm therapy: managing the chaos of bipolar disorder. *Biol Psychiatry, 48*(6), 593-604.
- Franklin, K. B. J., & Paxinos, G. (2007). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. 3th edn. Academic Press, New York* (Third Edition ed.). New York: Academic Press.
- Frey, B. N., Valvassori, S. S., Reus, G. Z., Martins, M. R., Petronilho, F. C., Bardini, K., . . . Quevedo, J. (2006). Effects of lithium and valproate on amphetamine-induced oxidative stress generation in an animal model of mania. *J Psychiatry Neurosci, 31*(5), 326-332.
- Gardner, R., Jr. (1982). Mechanisms in manic-depressive disorder: an evolutionary model. *Arch Gen Psychiatry, 39*(12), 1436-1441.

- Gessa, G. L., Pani, L., Fadda, P., & Fratta, W. (1995). Sleep deprivation in the rat: an animal model of mania. *Eur Neuropsychopharmacol*, 5 Suppl, 89-93.
- Geyer, M. A., Puerto, A., Menkes, D. B., Segal, D. S., & Mandell, A. J. (1976). Behavioral studies following lesions of the mesolimbic and mesostriatal serotonergic pathways. *Brain Res*, 106(2), 257-269.
- Giambalvo, C. T., & Snodgrass, S. R. (1978). Effect of p-chloroamphetamine and 5,7-dihydroxytryptamine on rotation and dopamine turnover. *Brain Res*, 149(2), 453-467.
- Goodwin, F. K., & Jamison, K. R. (2007). *Manic-Depressive Illness: Bipolar Disorders and Recurrent Depression* (2<sup>a</sup> ed ed.). New York: Oxford University Press.
- Gorenstein, C., & Scavone, C. (1999). Avanços em psicofarmacologia - mecanismos de ação de psicofármacos hoje. *Rev Bras Psiquiatr*, 21(1), 64-73.
- Gould, T. D., & Einat, H. (2007). Animal models of bipolar disorder and mood stabilizer efficacy: a critical need for improvement. *Neurosci Biobehav Rev*, 31(6), 825-831. doi: 10.1016/j.neubiorev.2007.05.007
- Gould, T. D., & Manji, H. K. (2004). The molecular medicine revolution and psychiatry: bridging the gap between basic neuroscience research and clinical psychiatry. *J Clin Psychiatry*, 65(5), 598-604.
- Gould, T. D., O'Donnell, K. C., Picchini, A. M., & Manji, H. K. (2007). Strain differences in lithium attenuation of d-amphetamine-induced hyperlocomotion: a mouse model for the genetics of clinical response to lithium. *Neuropsychopharmacology*, 32(6), 1321-1333. doi: 10.1038/sj.npp.1301254
- Graeff, F. G., Guimaraes, F. S., De Andrade, T. G., & Deakin, J. F. (1996). Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. *Pharmacol Biochem Behav*, 54(1), 129-141.
- Graeff, F. G., Quintero, S., & Gray, J. A. (1980). Median raphe stimulation, hippocampal theta rhythm and threat-induced behavioral inhibition. *Physiol Behav*, 25(2), 253-261.
- Graeff, F. G., & Silveira Filho, N. G. (1978). Behavioral inhibition induced by electrical stimulation of the median raphe nucleus of the rat. *Physiol Behav*, 21(4), 477-484.
- Gray, J. A. (1982). *The neuropsychology of anxiety*. Oxford University Press, New York.
- Gray, J. A. (1987). *The psychology of fear and stress*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Green, s., & Hodges, H. (1991). Animal models of anxiety. In P. Willner (Ed.), *Behavioral Models in Psychopharmacology: theoretical, industrial and clinical perspectives* (pp. 21-49). Cambridge: Cambridge University Press.

- Guidotti, A., Dong, E., Matsumoto, K., Pinna, G., Rasmusson, A. M., & Costa, E. (2001). The socially-isolated mouse: a model to study the putative role of allopregnanolone and 5alpha-dihydroprogesterone in psychiatric disorders. *Brain Res Brain Res Rev*, *37*(1-3), 110-115.
- Hamburger-Bar, R., Robert, M., Newman, M., & Belmaker, R. H. (1986). Interstrain correlation between behavioural effects of lithium and effects on cortical cyclic AMP. *Pharmacol Biochem Behav*, *24*(1), 9-13.
- Hammen, C., & Gitlin, M. (1997). Stress reactivity in bipolar patients and its relation to prior history of disorder. *Am J Psychiatry*, *154*(6), 856-857.
- Hascoet, M., & Bourin, M. (1998). A new approach to the light/dark test procedure in mice. *Pharmacol Biochem Behav*, *60*(3), 645-653.
- Hendrie, C. A., & Pickles, A. R. (2009). Depression as an evolutionary adaptation: implications for the development of preclinical models. *Med Hypotheses*, *72*(3), 342-347. doi: 10.1016/j.mehy.2008.09.053
- Herman, L., Houglund, T., & El-Mallakh, R. S. (2007). Mimicking human bipolar ion dysregulation models mania in rats. *Neurosci Biobehav Rev*, *31*(6), 874-881. doi: 10.1016/j.neubiorev.2007.04.001
- Herve, D., Simon, H., Blanc, G., Lemoal, M., Glowinski, J., & Tassin, J. P. (1981). Opposite changes in dopamine utilization in the nucleus accumbens and the frontal cortex after electrolytic lesion of the median raphe in the rat. *Brain Res*, *216*(2), 422-428.
- Hodos, W. (1961). Progressive ratio as a measure of reward strength. *Science*, *134*(3483), 943-944.
- Hopwood, S. E., & Stamford, J. A. (2001). Noradrenergic modulation of serotonin release in rat dorsal and median raphe nuclei via alpha(1) and alpha(2A) adrenoceptors. *Neuropharmacology*, *41*(4), 433-442.
- Hoshino, K., & Sugizaki, M. (1986). Ulcerogenic effect of the lesion of the median raphe nucleus in fasted rats. *Braz J Med Biol Res*, *19*(1), 123-130.
- Hoshino, K., Uga, D. A., & de Paula, H. M. (2004). The compulsive-like aspect of the head dipping emission in rats with chronic electrolytic lesion in the area of the median raphe nucleus. *Braz J Med Biol Res*, *37*(2), 245-250.
- Hsiao, Y. T., Jou, S. B., Yi, P. L., & Chang, F. C. (2012). Activation of GABAergic pathway by hypocretin in the median raphe nucleus (MRN) mediates stress-induced theta rhythm in rats. *Behav Brain Res*, *233*(1), 224-231. doi: 10.1016/j.bbr.2012.05.002
- Ihne, J. L., Fitzgerald, P. J., Hefner, K. R., & Holmes, A. (2012). Pharmacological modulation of stress-induced behavioral changes in the light/dark exploration test in male

C57BL/6J mice. *Neuropharmacology*, 62(1), 464-473. doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.08.045

Ikemoto, S. (2010). Brain reward circuitry beyond the mesolimbic dopamine system: a neurobiological theory. *Neurosci Biobehav Rev*, 35(2), 129-150. doi: 10.1016/j.neubiorev.2010.02.001

Jackson, J., Dickson, C. T., & Bland, B. H. (2008). Median raphe stimulation disrupts hippocampal theta via rapid inhibition and state-dependent phase reset of theta-related neural circuitry. *J Neurophysiol*, 99(6), 3009-3026. doi: 10.1152/jn.00065.2008

Jacobs, B. L., & Cohen, A. (1976). Differential behavioral effects of lesions of the median or dorsal raphe nuclei in rats: open field and pain-elicited aggression. *J Comp Physiol Psychol*, 90(1), 102-108.

Jacobs, B. L., Wise, W. D., & Taylor, K. M. (1974). Differential behavioral and neurochemical effects following lesions of the dorsal or median raphe nuclei in rats. *Brain Res*, 79(3), 353-361.

Joca, S. R. L., Padovan, C. M., & Guimarães, F. S. (2003). Estresse, depressão e hipocampo. *Rev. Bras. Psiquiatr.*, 25 (Suppl II), 46-51. doi: 10.1590/S1516-44462003000600011

Judd, L. L., & Akiskal, H. S. (2003). The prevalence and disability of bipolar spectrum disorders in the US population: re-analysis of the ECA database taking into account subthreshold cases. *J Affect Disord*, 73(1-2), 123-131.

Takefuda, K., Oyagi, A., Ishisaka, M., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Yokota, K., . . . Hara, H. (2010). Diacylglycerol kinase beta knockout mice exhibit lithium-sensitive behavioral abnormalities. *PLoS One*, 5(10), e13447. doi: 10.1371/journal.pone.0013447

Kapczinski, F., Frey, B. N., & Zannatto, V. (2004). [Physiopathology of bipolar disorders: what have changed in the last 10 years?]. *Rev Bras Psiquiatr*, 26 Suppl 3, 17-21. doi: /S1516-44462004000700005

Kaplan, H. I., Sadock, B. J., & Grebb, J. A. (1997). *Compêndio de Psiquiatria: ciências do comportamento e psiquiatria clínica* (D. Batista, Trans. 7ª ed.). Porto Alegre: Artmed.

Kinney, G. G., Kocsis, B., & Vertes, R. P. (1994). Injections of excitatory amino acid antagonists into the median raphe nucleus produce hippocampal theta rhythm in the urethane-anesthetized rat. *Brain Res*, 654(1), 96-104.

Kinney, G. G., Kocsis, B., & Vertes, R. P. (1995). Injections of muscimol into the median raphe nucleus produce hippocampal theta rhythm in the urethane anesthetized rat. *Psychopharmacology (Berl)*, 120(3), 244-248.

- Kiseleva, I. P., & Samsonova, M. L. (1976). [Effect of lithium on the central serotonin- and adrenergic processes after its chronic administration]. *Farmakol Toksikol*, 39(3), 275-280.
- Kitchigina, V. F., Kudina, T. A., Kutyreva, E. V., & Vinogradova, O. S. (1999). Neuronal activity of the septal pacemaker of theta rhythm under the influence of stimulation and blockade of the median raphe nucleus in the awake rabbit. *Neuroscience*, 94(2), 453-463.
- Klitenick, M. A., & Wirtshafter, D. (1988). Comparative studies of the ingestive behaviors produced by microinjections of muscimol into the midbrain raphe nuclei of the ventral tegmental area of the rat. *Life Sci*, 42(7), 775-782.
- Kohler, C., & Lorens, S. A. (1978). Open field activity and avoidance behavior following serotonin depletion: a comparison of the effects of parachlorophenylalanine and electrolytic midbrain raphe lesions. *Pharmacol Biochem Behav*, 8(3), 223-233.
- Kohler, C., & Steinbusch, H. (1982). Identification of serotonin and non-serotonin-containing neurons of the mid-brain raphe projecting to the entorhinal area and the hippocampal formation. A combined immunohistochemical and fluorescent retrograde tracing study in the rat brain. *Neuroscience*, 7(4), 951-975.
- Konno, K., Matsumoto, M., Togashi, H., Yamaguchi, T., Izumi, T., Watanabe, M., . . . Yoshioka, M. (2007). Early postnatal stress affects the serotonergic function in the median raphe nuclei of adult rats. *Brain Res*, 1172, 60-66. doi: 10.1016/j.brainres.2007.05.022
- Korff, S., & Harvey, B. H. (2006). Animal models of obsessive-compulsive disorder: rationale to understanding psychobiology and pharmacology. *Psychiatr Clin North Am*, 29(2), 371-390. doi: 10.1016/j.psc.2006.02.007
- Kostowski, W., Cxlonkowski, A., Markowdka, L., & Markiewicz, L. (1975). Intraspecific aggressiveness after lesions of midbrain raphe nuclei in rats. *Pharmacology*, 13(1), 81-85.
- Kostowski, W., Giacalone, E., Garattini, S., & Valzelli, L. (1968). Studies on behavioural and biochemical changes in rats after lesion of midbrain raphe. *Eur J Pharmacol*, 4(4), 371-376.
- Kovacsics, C. E., & Gould, T. D. (2010). Shock-induced aggression in mice is modified by lithium. *Pharmacol Biochem Behav*, 94(3), 380-386. doi: 10.1016/j.pbb.2009.09.020
- Kreiss, D. S., & Lucki, I. (1994). Differential regulation of serotonin (5-HT) release in the striatum and hippocampus by 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptors of the dorsal and median raphe nuclei. *J Pharmacol Exp Ther*, 269(3), 1268-1279.

- Kromer, S. A., Kessler, M. S., Milfay, D., Birg, I. N., Bunck, M., Czibere, L., . . . Turck, C. W. (2005). Identification of glyoxalase-I as a protein marker in a mouse model of extremes in trait anxiety. *J Neurosci*, *25*(17), 4375-4384. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0115-05.2005
- Kusljic, S., Brosda, J., & van den Buuse, M. (2006). Effects of haloperidol and clozapine on sensorimotor gating deficits induced by 5-hydroxytryptamine depletion in the brain. *Br J Pharmacol*, *147*(7), 800-807. doi: 10.1038/sj.bjp.0706641
- Kusljic, S., Copolov, D. L., & van den Buuse, M. (2003). Differential role of serotonergic projections arising from the dorsal and median raphe nuclei in locomotor hyperactivity and prepulse inhibition. *Neuropsychopharmacology*, *28*(12), 2138-2147. doi: 10.1038/sj.npp.1300277
- Le-Niculescu, H., Patel, S. D., & Niculescu, A. B. (2010). Convergent integration of animal model and human studies of bipolar disorder (manic-depressive illness). *Curr Opin Pharmacol*, *10*(5), 594-600. doi: 10.1016/j.coph.2010.08.008
- Le, A. D., Harding, S., Juzysch, W., Fletcher, P. J., & Shaham, Y. (2002). The role of corticotropin-releasing factor in the median raphe nucleus in relapse to alcohol. *J Neurosci*, *22*(18), 7844-7849.
- Leite, H. T. P., & Hoshino, K. (2002). *Imipramina e comportamento compulsivo induzido pela lesão do núcleo mediano da rafe*. Paper presented at the XIV Congresso de Iniciação Científica da UNESP, Presidente Prudente.
- Leite, H. T. P., Hoshino, K., & De Paula, H. M. (2004). *Comorbidade dos comportamentos repetitivos de ratos com lesão eletrolítica crônica da área do núcleo mediano da rafe*. Paper presented at the XV Congresso de Iniciação Científica da UNESP, Marília.
- Levine, J. D., Rosenwasser, A. M., Yanovski, J. A., & Adler, N. T. (1986). Circadian activity rhythms in rats with midbrain raphe lesions. *Brain Res*, *384*(2), 240-249.
- Lima, V. A. (2002). *O núcleo mediano da rafe no medo condicionado: aspectos comportamentais, autonômicos e motores*. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo.
- Lipska, B. K. (2004). Using animal models to test a neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia. *J Psychiatry Neurosci*, *29*(4), 282-286.
- Liu, Z. H., & Ikemoto, S. (2007). The midbrain raphe nuclei mediate primary reinforcement via GABA(A) receptors. *Eur J Neurosci*, *25*(3), 735-743. doi: 10.1111/j.1460-9568.2007.05319.x
- Lorens, S. A., Guldborg, H. C., Hole, K., Kohler, C., & Srebro, B. (1976). Activity, avoidance learning and regional 5-hydroxytryptamine following intra-brain stem 5,7-

dihydroxytryptamine and electrolytic midbrain raphe lesions in the rat. *Brain Res*, 108(1), 97-113.

- Luscher, B., Shen, Q., & Sahir, N. (2011). The GABAergic deficit hypothesis of major depressive disorder. *Mol Psychiatry*, 16(4), 383-406. doi: 10.1038/mp.2010.120
- Lyon, M. (1991). Animal models of mania and schizophrenia. In P. Willner (Ed.), *Behavioral Models in Psychopharmacology: theoretical, industrial and clinical perspectives* (pp. 253- 310). Cambridge: Cambridge University Press.
- Machado-Vieira, R., Bressan, R. A., Frey, B., & Costa, J. C. (2005). As bases neurobiológicas do transtorno bipolar. *Revista de Psiquiatria Clínica*, 32(1), 28-33.
- Maes, M., Calabrese, J., Jayathilake, K., & Meltzer, H. Y. (1997). Effects of subchronic treatment with valproate on L-5-HTP-induced cortisol responses in mania: evidence for increased central serotonergic neurotransmission. *Psychiatry Res*, 71(2), 67-76.
- Maia, T. V., & Frank, M. J. (2011). From reinforcement learning models to psychiatric and neurological disorders. *Nat Neurosci*, 14(2), 154-162. doi: 10.1038/nn.2723
- Malatynska, E., & Knapp, R. J. (2005). Dominant-submissive behavior as models of mania and depression. *Neurosci Biobehav Rev*, 29(4-5), 715-737. doi: 10.1016/j.neubiorev.2005.03.014
- Malatynska, E., Pinhasov, A., Crooke, J. J., Smith-Swintosky, V. L., & Brenneman, D. E. (2007). Reduction of dominant or submissive behaviors as models for antimanic or antidepressant drug testing: technical considerations. *J Neurosci Methods*, 165(2), 175-182. doi: 10.1016/j.jneumeth.2007.05.035
- Malkesman, O., Austin, D. R., Chen, G., & Manji, H. K. (2009). Reverse translational strategies for developing animal models of bipolar disorder. *Dis Model Mech*, 2(5-6), 238-245. doi: 10.1242/dmm.001628
- Malkoff-Schwartz, S., Frank, E., Anderson, B., Sherrill, J. T., Siegel, L., Patterson, D., & Kupfer, D. J. (1998). Stressful life events and social rhythm disruption in the onset of manic and depressive bipolar episodes: a preliminary investigation. *Arch Gen Psychiatry*, 55(8), 702-707.
- Manji, H. K., & Zarate Jr., C. A. (2011). Behavioral Neurobiology of Bipolar Disorder and its Treatment *Current Topics in Behavioral Neurosciences*
- Martin, S., & van den Buuse, M. (2008). Phencyclidine-induced locomotor hyperactivity is enhanced in mice after stereotaxic brain serotonin depletion. *Behav Brain Res*, 191(2), 289-293. doi: 10.1016/j.bbr.2008.04.002

- Matsumoto, K., Pinna, G., Puia, G., Guidotti, A., & Costa, E. (2005). Social isolation stress-induced aggression in mice: a model to study the pharmacology of neurosteroidogenesis. *Stress*, 8(2), 85-93. doi: 10.1080/10253890500159022
- Matthews, P. R., & Harrison, P. J. (2012). A morphometric, immunohistochemical, and in situ hybridization study of the dorsal raphe nucleus in major depression, bipolar disorder, schizophrenia, and suicide. *J Affect Disord*, 137(1-3), 125-134. doi: 10.1016/j.jad.2011.10.043
- McNaughton, N., Kocsis, B., & Hajos, M. (2007). Elicited hippocampal theta rhythm: a screen for anxiolytic and procognitive drugs through changes in hippocampal function? *Behav Pharmacol*, 18(5-6), 329-346. doi: 10.1097/FBP.0b013e3282ee82e3
- Melik, E., Babar-Melik, E., Ozgunen, T., & Binokay, S. (2000). Median raphe nucleus mediates forming long-term but not short-term contextual fear conditioning in rats. *Behav Brain Res*, 112(1-2), 145-150.
- Mobini, S., Chiang, T. J., Ho, M. Y., Bradshaw, C. M., & Szabadi, E. (2000). Comparison of the effects of clozapine, haloperidol, chlorpromazine and d-amphetamine on performance on a time-constrained progressive ratio schedule and on locomotor behaviour in the rat. *Psychopharmacology (Berl)*, 152(1), 47-54.
- Moreno, D. H., & Andrade, L. H. (2005). The lifetime prevalence, health services utilization and risk of suicide of bipolar spectrum subjects, including subthreshold categories in the Sao Paulo ECA study. *J Affect Disord*, 87(2-3), 231-241. doi: 10.1016/j.jad.2005.04.010
- Moreno, R. A., Moreno, D. H., & Ratzke, R. (Diagnóstico, tratamento e prevenção da mania e da hipomania no transtorno bipolar). 2005. *Revista de Psiquiatria Clínica*, 32(1), 39-48.
- Muller-Oerlinghausen, B., Berghofer, A., & Bauer, M. (2002). Bipolar disorder. *Lancet*, 359(9302), 241-247. doi: 10.1016/S0140-6736(02)07450-0
- Murray, C. J., & Lopez, A. D. (1997). Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet*, 349(9063), 1436-1442. doi: 10.1016/S0140-6736(96)07495-8
- Muscat, L., Tischler, R. C., & Morin, L. P. (2005). Functional analysis of the role of the median raphe as a regulator of hamster circadian system sensitivity to light. *Brain Res*, 1044(1), 59-66. doi: 10.1016/j.brainres.2005.02.083
- Nesse, R. M., & Williams, G. C. (1997). *Por que adoecemos?* (A. B. Rodrigues., Trans.). Rio de Janeiro: Campus.



- Nicolaou, N. M., Garcia-Munoz, M., Arbuthnott, G. W., & Eccleston, D. (1979). Interactions between serotonergic and dopaminergic systems in rat brain demonstrated by small unilateral lesions of the raphe nuclei. *Eur J Pharmacol*, *57*(4), 295-305.
- Nishikawa, T., Fage, D., & Scatton, B. (1986). Evidence for, and nature of, the tonic inhibitory influence of habenulo-interpeduncular pathways upon cerebral dopaminergic transmission in the rat. *Brain Res*, *373*(1-2), 324-336.
- Norton, S. (1973). Amphetamine as a model for hyperactivity in the rat. *Physiol Behav*, *11*(2), 181-186.
- Nunes-de-Souza, V., Nunes-de-Souza, R., Rodgers, R. J., & Canto-de-Souza, A. (2011). Blockade of 5-HT(2) receptors in the periaqueductal grey matter (PAG) abolishes the anxiolytic-like effect of 5-HT(1A) receptor antagonism in the median raphe nucleus in mice. *Behav Brain Res*, *225*(2), 547-553. doi: 10.1016/j.bbr.2011.07.056
- O'Brien, W. T., Harper, A. D., Jove, F., Woodgett, J. R., Maretto, S., Piccolo, S., & Klein, P. S. (2004). Glycogen synthase kinase-3beta haploinsufficiency mimics the behavioral and molecular effects of lithium. *J Neurosci*, *24*(30), 6791-6798. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4753-03.2004
- O'Donnell, K. C., & Gould, T. D. (2007). The behavioral actions of lithium in rodent models: leads to develop novel therapeutics. *Neurosci Biobehav Rev*, *31*(6), 932-962. doi: 10.1016/j.neubiorev.2007.04.002
- Otoni, E. B. (2000). EthoLog 2.2: a tool for the transcription and timing of behavior observation sessions. *Behav Res Methods Instrum Comput*, *32*(3), 446-449.
- Paul, E. D., & Lowry, C. A. (2013). Functional topography of serotonergic systems supports the Deakin/Graeff hypothesis of anxiety and affective disorders. *J Psychopharmacol*, *27*(12), 1090-1106. doi: 10.1177/0269881113490328
- Paxinos, G., & Watson, C. (2007). *The rat brain in stereotaxic coordinates* ( 6<sup>a</sup>. ed ed.). London: Academic Press.
- Pereira, D. H. S. (2010). *Núcleo mediano da rafe e estresse de nado forçado: papel dos receptores de glutamato de tipo NMDA*. Master, Universidade de São Paulo Ribeirão Preto.
- Perez-Cruet, J., Tagliamonte, A., Tagliamonte, P., & Gessa, G. L. (1971). Stimulation of serotonin synthesis by lithium. *J Pharmacol Exp Ther*, *178*(2), 325-330.
- Peron, J. E. (1989). *Análise etológica quantitativa do comportamento social do rato albino (Rattus norvegicus), em colônias experimentais, com o uso do paradigma intruso-residente*. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.

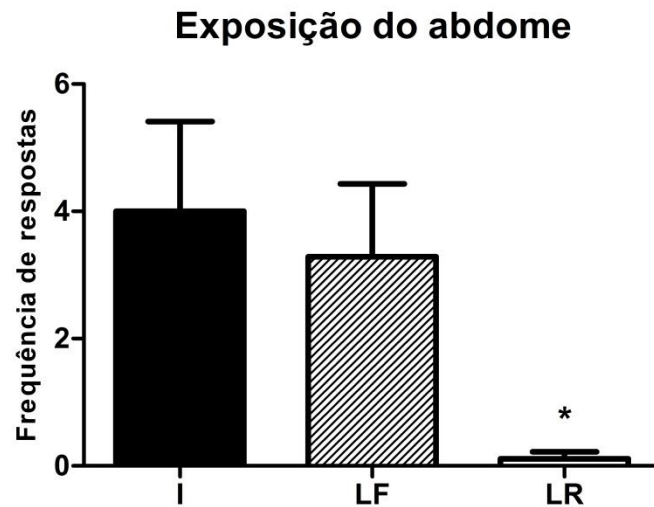
- Pezzato, F. A., de Paula, H. M., Bosqueiro, J. R., & Hoshino, K. (2003). *Ausência de anedonia da privação de sono em ratos compulsivos*. Paper presented at the IX Congresso Brasileiro de sono, Vitória.
- Pezzato, F. A., & Hoshino, K. (2004). *Número de Respostas e Extinção em ratos Com Lesão do Núcleo Mediano da Rafe*. Paper presented at the XIII Encontro da Associação Brasileira de Psicoterapia e Medicina Comportamental e II Congresso Internacional da Association for Behavior Analysis Campinas.
- Pezzato, F. A., & Hoshino, K. (2005). *Uso do Magnésio no tratamento dos transtornos compulsivos: avaliação experimental dos comportamentos compulsivos induzidos pela lesão da região do núcleo mediano da rafe*. Paper presented at the XVI Congresso de Iniciação Científica da UNESP, Bauru.
- Pezzato, F. A., Novais, D. B., Gracia-Mijares, M., & Hoshino, K. (2012). Efeito do lítio sobre a hiperatividade locomotora induzida pela lesão eletrolítica da região do núcleo mediano da rafe em ratos. *Estudos de Psicologia*, 17(1), 121-128. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-294X2012000100015>
- Prange, A. J., Jr., Wilson, I. C., Lynn, C. W., Alltop, L. B., & Stikeleather, R. A. (1974). L-tryptophan in mania. Contribution to a permissive hypothesis of affective disorders. *Arch Gen Psychiatry*, 30(1), 56-62.
- Scheuch, K., Holtje, M., Budde, H., Lautenschlager, M., Heinz, A., Ahnert-Hilger, G., & Priller, J. (2010). Lithium modulates tryptophan hydroxylase 2 gene expression and serotonin release in primary cultures of serotonergic raphe neurons. *Brain Res*, 1307, 14-21. doi: 10.1016/j.brainres.2009.10.027
- Schloesser, R. J., Martinowich, K., & Manji, H. K. (2012). Mood-stabilizing drugs: mechanisms of action. *Trends Neurosci*, 35(1), 36-46. doi: 10.1016/j.tins.2011.11.009
- Scott, J., & Pope, M. (2002). Nonadherence with mood stabilizers: prevalence and predictors. *J Clin Psychiatry*, 63(5), 384-390.
- Sheard, M. H., Marini, J. L., Bridges, C. I., & Wagner, E. (1976). The effect of lithium on impulsive aggressive behavior in man. *Am J Psychiatry*, 133(12), 1409-1413.
- Silva, R., Mesquita, A. R., Bessa, J., Sousa, J. C., Sotiropoulos, I., Leao, P., . . . Sousa, N. (2008). Lithium blocks stress-induced changes in depressive-like behavior and hippocampal cell fate: the role of glycogen-synthase-kinase-3beta. *Neuroscience*, 152(3), 656-669. doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.12.026
- Srebro, B., & Lorens, S. A. (1975). Behavioral effects of selective midbrain raphe lesions in the rat. *Brain Res*, 89(2), 303-325.
- Stokes, P. E., Shamoian, C. A., Stoll, P. M., & Patton, M. J. (1971). Efficacy of lithium as acute treatment of manic-depressive illness. *Lancet*, 1(7713), 1319-1325.

- Storosum, J. G., Wohlfarth, T., Schene, A., Elferink, A., van Zwieten, B. J., & van den Brink, W. (2007). Magnitude of effect of lithium in short-term efficacy studies of moderate to severe manic episode. *Bipolar Disord*, *9*(8), 793-798. doi: 10.1111/j.1399-5618.2007.00445.x
- Subhash, M. N., Vinod, K. Y., & Srinivas, B. N. (1999). Differential effect of lithium on 5-HT1 receptor-linked system in regions of rat brain. *Neurochem Int*, *35*(4), 337-343.
- Sullivan, G. M., Ogden, R. T., Oquendo, M. A., Kumar, J. S., Simpson, N., Huang, Y. Y., . . . Parsey, R. V. (2009). Positron emission tomography quantification of serotonin-1A receptor binding in medication-free bipolar depression. *Biol Psychiatry*, *66*(3), 223-230. doi: 10.1016/j.biopsych.2009.01.028
- Tao, R., & Auerbach, S. B. (2003). Influence of inhibitory and excitatory inputs on serotonin efflux differs in the dorsal and median raphe nuclei. *Brain Res*, *961*(1), 109-120.
- Thompson, R., Ramsay, A., & Yu, J. (1984). A generalized learning deficit in albino rats with early median raphe or pontine reticular formation lesions. *Physiol Behav*, *32*(1), 107-114.
- Tokumoto, A. M. (2010). *Papel dos receptores 5-HT1A do Núcleo Mediano da Rafe de ratos nas consequências comportamentais da exposição ao estresse de nado forçado*. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- Tork, I. (1990). Anatomy of the serotonergic system. *Ann N Y Acad Sci*, *600*, 9-34; discussion 34-35.
- Touma, C. (2011). Stress and affective disorders: animal models elucidating the molecular basis of neuroendocrine-behavior interactions. *Pharmacopsychiatry*, *44 Suppl 1*, S15-26. doi: 10.1055/s-0031-1271702
- Umberkoman, B., & Joseph, T. (1975). Effect of diphenylhydantoin and lithium on whole brain serotonin, sodium and potassium in mice. *Indian J Physiol Pharmacol*, *19*(2), 94-97.
- Vasconcellos, A. P., Tabajara, A. S., Ferrari, C., Rocha, E., & Dalmaz, C. (2003). Effect of chronic stress on spatial memory in rats is attenuated by lithium treatment. *Physiol Behav*, *79*(2), 143-149.
- Vertes, R. P., Fortin, W. J., & Crane, A. M. (1999). Projections of the median raphe nucleus in the rat. *J Comp Neurol*, *407*(4), 555-582.
- Vertes, R. P., Kinney, G. G., Kocsis, B., & Fortin, W. J. (1994). Pharmacological suppression of the median raphe nucleus with serotonin1A agonists, 8-OH-DPAT and buspirone, produces hippocampal theta rhythm in the rat. *Neuroscience*, *60*(2), 441-451.

- Vollrath-Smith, F. R., Shin, R., & Ikemoto, S. (2012). Synergistic interaction between baclofen administration into the median raphe nucleus and inconsequential visual stimuli on investigatory behavior of rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 220(1), 15-25. doi: 10.1007/s00213-011-2450-x
- Willner, P. (1991). Behavioral models in psychopharmacology. In P. Willner (Ed.), *Behavioral Models in Psychopharmacology: theoretical, industrial and clinical perspectives* (pp. 3-18). Cambridge: Cambridge University Press.
- Willner, P. (1997). Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology (Berl)*, 134(4), 319-329.
- Wirtshafter, D., & Asin, K. E. (1983). Impaired radial maze performance in rats with electrolytic median raphe lesions. *Exp Neurol*, 79(2), 412-421.
- Wirtshafter, D., & Asin, K. E. (1986). Discrimination learning and reversal following electrolytic lesions of the median raphe nucleus. *Physiol Behav*, 37(2), 213-219.
- Wirtshafter, D., Davis, J. D., & Stratford, T. R. (2011). Inactivation of the median raphe nucleus increases intake of sucrose solutions: a microstructural analysis. *Behav Neurosci*, 125(4), 529-540. doi: 10.1037/a0024372
- Wirtshafter, D., Klitenick, M. A., & Asin, K. E. (1987). Evidence against serotonin involvement in the hyperactivity produced by injections of muscimol into the median raphe nucleus. *Pharmacol Biochem Behav*, 27(1), 45-52.
- Wirtshafter, D., Klitenick, M. A., & Asin, K. E. (1988). Is dopamine involved in the hyperactivity produced by injections of muscimol into the median raphe nucleus? *Pharmacol Biochem Behav*, 30(3), 577-583.
- Wirtshafter, D., Montana, W., & Asin, K. E. (1986). Behavioral and biochemical studies of the substrates of median raphe lesion induced hyperactivity. *Physiol Behav*, 38(6), 751-759.
- Wirtshafter, D., Stratford, T. R., & Pitzer, M. R. (1993). Studies on the behavioral activation produced by stimulation of GABAB receptors in the median raphe nucleus. *Behav Brain Res*, 59(1-2), 83-93.
- Wirtshafter, D., & Trifunovic, R. (1988). Stimulation of ingestive behaviors following injections of excitatory amino acid antagonists into the median raphe nucleus. *Pharmacol Biochem Behav*, 30(2), 529-533.
- Wogar, M. A., Bradshaw, C. M., & Szabadi, E. (1991). Evidence for an involvement of 5-hydroxytryptaminergic neurones in the maintenance of operant behaviour by positive reinforcement. *Psychopharmacology (Berl)*, 105(1), 119-124.

- Wogar, M. A., Bradshaw, C. M., & Szabadi, E. (1993). Effect of lesions of the ascending 5-hydroxytryptaminergic pathways on choice between delayed reinforcers. *Psychopharmacology (Berl)*, *111*(2), 239-243.
- Wood, G. E., Young, L. T., Reagan, L. P., Chen, B., & McEwen, B. S. (2004). Stress-induced structural remodeling in hippocampus: prevention by lithium treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(11), 3973-3978. doi: 10.1073/pnas.0400208101
- World Health Organization.(2009). Pharmacological treatment of mental disorders in primary health care Retrieved 4-21- 2012 from [http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241547697\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241547697_eng.pdf)
- Yamamoto, T., & Ueki, S. (1977). Characteristics in aggressive behavior induced by midbrain raphe lesions in rats. *Physiol Behav*, *19*(1), 105-110.
- Yamamoto, T., & Ueki, S. (1978). Effects of drugs on hyperactivity and aggression induced by raphe lesions in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, *9*(6), 821-826.
- Yen, Y. C., Anderzhanova, E., Bunck, M., Schuller, J., Landgraf, R., & Wotjak, C. T. (2013). Co-segregation of hyperactivity, active coping styles, and cognitive dysfunction in mice selectively bred for low levels of anxiety. *Front Behav Neurosci*, *7*, 103. doi: 10.3389/fnbeh.2013.00103
- Young, L. T., Warsh, J. J., Kish, S. J., Shannak, K., & Hornykeiwicz, O. (1994). Reduced brain 5-HT and elevated NE turnover and metabolites in bipolar affective disorder. *Biol Psychiatry*, *35*(2), 121-127.
- Youngs, R. M., Chu, M. S., Meloni, E. G., Naydenov, A., Carlezon, W. A., Jr., & Konradi, C. (2006). Lithium administration to preadolescent rats causes long-lasting increases in anxiety-like behavior and has molecular consequences. *J Neurosci*, *26*(22), 6031-6039. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0580-06.2006

**Apêndice A.** Comparação individualizada da frequência de respostas de exposição do abdome ao oponente obtida na condição de residente no Experimento 3.



A ANOVA da comparação do número de emissões da resposta de exposição do abdome ao oponente na condição de residente em relação aos grupos (LR, LF e I) demonstrou a existência de efeito do grupo ( $F(2,20)=4.99$ ;  $p<0.05$ ) e diferença significativa explicitada pelo teste de pós-hoc Bonferroni entre o grupo LR e o grupo I (\* Bonferroni,  $p<0.05$ ) e próxima ao critério de significância na comparação entre o grupo LR e o grupo LF (Bonferroni,  $p=0.08$ ).

**Apêndice B.** Tabela descritiva das coordenadas de localização, extensão e estruturas abrangidas pelas lesões eletrolíticas histologicamente avaliadas no Capítulo I.

<b>Caso</b>	<b>I.A. Início Lesão</b>	<b>I.A. Fim Lesão</b>	<b>Localização ventro/dorsal</b>	<b>Lateralidade</b>	<b>Estruturas abrangidas</b>	<b>MnR</b>
<b>LR3</b>	-0,60mm Lâmina 2 – corte 5	1,50 mm Lâmina 3 – corte 7	-união com Quarto Ventrículo/ Aqueduto até I.A. 1,2mm	Medial	DRC, DTgP, DTgC, CG, VTg, PMnR, DRI, mlf (parte), Rbd, cll, DRV, DRD, xscp (parte)	Metade dorsal
<b>LR4</b>	-0,36mm Lâmina 2 – corte 4	1,90 nmm Lâmina 3 – corte 8	-união com Quarto Ventrículo/ Aqueduto até I.A. 0,9mm	Medial	DRC, DTgP, DTgC, CG, VTg, PMnR, DRI, mlf, Rbd, cll, DMTg, PnR, xscp	Todo
<b>LR6</b>	-0,72mm Lâmina 2 – corte 4	0,50mm Lâmina 3 – corte 8	-união com Quarto Ventrículo/ Aqueduto até I.A. 0,20mm	Direita	DRC, DTgP, DTgC, CGO, CGA, CGB, CG, mlf, DMTg, PnR, ts, PnO, CGPn, DR, LDTg, sph, LDTg, PMnR, Rbd, DRI, DRV	Prevalência caudal
<b>LR10</b>	-0,48mm Lâmina 2 – corte 3	1,50mm Lâmina 3 – corte 13	-união com Quarto Ventrículo/ Aqueduto até I.A. 1,20mm	Medial	DR, PDTg, sph, DRC, DTgP, CGO, CGA, DTgC, mlf, DMTg, PnR, PMnR, CG, LDTg,(parte) VTg, DRD, DRV, DRI, RtTg, Rbd, cll	Prevalência central e caudal.
<b>LR11</b>	-0,48mm Lâmina 2 – corte 7	1,08mm Lâmina 3 – corte 13	-união com quarto ventrículo/ Aqueduto até I.A. 0,48mm	Medial	DRC, DTgP, DTgC, CG, CGA, CGB, mlf, DMTg, PnR, ts, PnO, VTg, RtTgP, sth, DTgP, PMnR, RTg, tth, ml, Pn	Prevalência caudal
<b>LR29</b>	-0,96mm Lâmina 2 – corte 4	1,20mm Lâmina 3 – corte 10	-união com quarto ventrículo/ Aqueduto até I.A. -0,15mm	Medial	DRC, DTgP, DTgC, CG, CGA, CGB, CGO, mlf, ts, PMnR, LDTg, sph, DMTg, PnR, PDTg, RTgL, RtTg, PnC, PnO,	Prevalência ventral
<b>LR34</b>	-0,84mm Lâmina 1 – corte 6	0,84mm Lâmina 3 – corte 11	-união com Quarto Ventrículo/ Aqueduto até I.A. 0,15mm	Direita	CGA, CGB, LDTg, DMTg, mlf, PnO, PMnR,, ts, CGPn, CGG, LC, Bar, PnC, SubCA, SubCD, DTgP	Apenas região paramediana
<b>LR35</b>	-0.50mm Lâmina 2 – corte 5	1.40mm Lâmina 3 – corte 8	-união com Quarto vVentrículo/ Aqueduto até I.A.0,20mm	Medial -levemente para a direita	DRC, CGO, CGA, CGB, PnO, DMTg, PnR, ts, RtTg (dir), LDTg, sph, PnC, mlf, PDTg PMnR	Centro-caudal (a partir de I.A.0,95mm preservado)
<b>LR45</b>	-0,24mm Lâmina 2 – corte 8	2,20mm Lâmina 4 – corte 6	-união com Quarto Ventrículo/ Aqueduto até I.A. 0,48mm	Esquerda	DTgP, DTgC, DRC, mlf, PMnR, VTg, ts, PnO (esq), DMTg, PnR, RTg, CGA, CGB, tth, ml, Pn, lfp, IPA, IPL, IPI	Todo

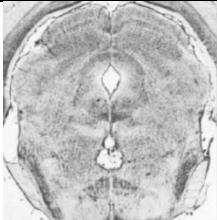
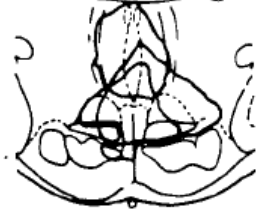
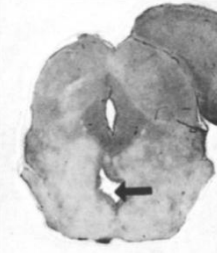

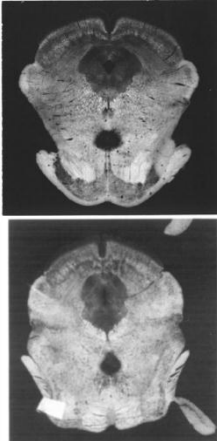
<b>LR46</b>	-0,60mm Lâmina 2- corte 6	2,50mm Lâmina 4 - corte 9	-união com Quarto Ventrículo/ Aqueduto até I.A. 0,50mm	Medial	DRC, ts, VTg, mlf, PMnR, CGO, sph, PDTg, DR, CGA, CGB, PnR, DRV, xscp, Rbd, DRI, IPC, IPA, IPI, IPR, IPC, IPL	Todo
-------------	---------------------------------	---------------------------------	--	--------	--	------

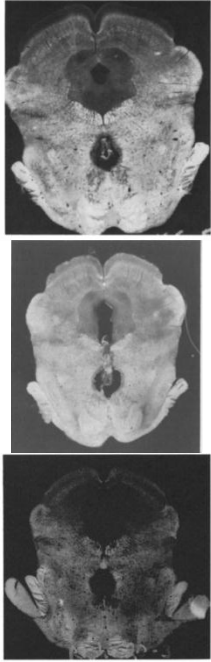
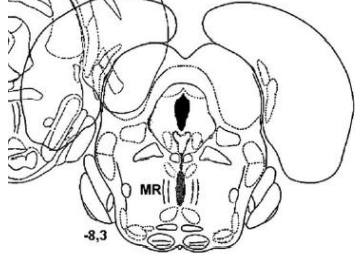
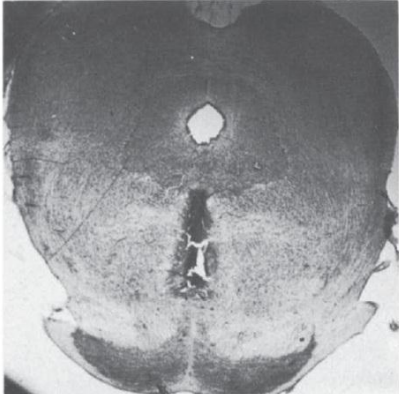
**Legenda de abreviaturas:**

<b>Abreviatura</b>	<b>Nome da estrutura</b>
Bar	Barrington's nucleus
CG	Central Gray
CGA	Central Gray, alpha part
CGB	Central Gray, beta part
CGG	central gray, gamma part
CGO	Central Gray, nucleus O
CGPn	central gray of the pons
cll	commissure of the lateral lemniscus
DMTg	dorsomedial tegmental area
DR	dorsal raphe nucleus
DRC	dorsal raphe nucleus, caudal part
DRD	dorsal raphe nucleus, dorsal part
DRI	dorsal raphe nucleus, interfascicular part
DRV	dorsal raphe nucleus, ventral part
DTgC	dorsal tegmental nucleus, central part
DTgP	dorsal tegmental nucleus, pericentral part
IPA	interpeduncular nucleus, apical subnucleus
IPI	interpeduncular nucleus, intermediate subnucleus
IPL	interpeduncular nucleus, lateral subnucleus
IPR	interpeduncular nucleus, rostral subnucleus
LC	locus coeruleus
LDTg	laterodorsal tegmental nucleus
lfp	longitudinal fasciculus of the pons
ml	medial lemniscus
mlf	medial longitudinal fasciculus
MnR	median raphe nucleus
PDTg	posterodorsal tegmental nucleus
PMnR	paramedian raphe nucleus
Pn	pontine nuclei
PnC	pontine reticular nucleus, caudal part
PnO	pontine reticular nucleus, oral part
PnR	pontine raphe nucleus
Rbd	rhabdoid nucleus
RtTg	reticulotegmental nucleus of the pons
RTtgL	reticulotegmental nucleus of the pons, lateral part
Sph	sphenoid nucleus
SubCA	subcoeruleus nucleus, alpha part
SubCD	subcoeruleus nucleus, dorsal part
ts	tectospinal tract
tth	trigeminothalamic tract
VTg	ventral tegmental nucleus
xscp	decussation of the superior cerebellar peduncle



**Apêndice C.** Revisão de fotos e representações sobre a extensão de lesões eletrolíticas no MnR em ratos.

Referência	Descrição do eletrodo	Descrição da corrente	Fotografia ou representação da lesão
(Herve et al., 1981)	- aço inoxidável 300 µm de diâmetro	“alta frequência”	
(Levine et al., 1986)	- agulha de entomologia de aço inoxidável isolada eletricamente exceto o 1.0mm final	Corrente anodal de 1.0 mA por 45 s	
(Yamamoto & Ueki, 1977)	- agulha de aço inoxidável de 0.4 mm de diâmetro	3 mA por 15 sec	
(Thompson, Ramsay, & Yu, 1984)	- eletrodo de aço inoxidável de 0.5 mm de diâmetro, isolado eletricamente exceto o 1.0 mm final	1.0-1.3 mA por 8-10 s	
(Asin, Wirtshafter, & Kent, 1979b) (Asin et al., 1979a) (Asin et al., 1980)  (Asin & Wirtshafter, 1982)  (Asin et al., 1985)  (Wirtshafter &	- eletrodo de aço inoxidável de 0.23mm de diâmetro, isolado eletricamente exceto o 0.5 mm final	1 mA por 8 s	

<p>Asin, 1986)  (Wirtshafter et al., 1987)</p>			
<p>(Andrade et al., 2004)</p>	<p>- eletrodo bipolar de 0.12 mm de diâmetro, isolado por verniz exceto o 0.5 mm final</p>	<p>3mA por 10s</p>	
<p>(Konno et al., 2007)</p>	<p>- eletrodo bipolar de 0.12 mm de diâmetro, isolado por verniz exceto o 0.5 mm final</p>	<p>300 <math>\mu</math>A por 10 s</p>	<p>Ausência de foto ou representação.</p>
<p>(Costall &amp; Naylor, 1974)</p>	<p>- eletrodo de aço inoxidável de 0.65 mm de diâmetro</p>	<p>1mA por 10s</p>	<p><b>A</b></p> 

**Apêndice D.** Tabela descritiva das coordenadas de localização, extensão e estruturas parcialmente abrangidas pelas lesões eletrolíticas histologicamente avaliadas no Capítulo II.

<b>Caso</b>	<b>I.A. Início Lesão</b>	<b>I.A. Fim Lesão</b>	<b>Localização dorso/ventral</b>	<b>Lateralidade</b>	<b>Estruturas parcialmente abrangidas</b>	<b>MnR Rostro-Caudal</b>
<b>LR 1 +C</b>	-1.40mm	-0.92 mm	Centralizada no MnR	Medial	MnR, PMnR, PnR, RtTg	Porção caudal
<b>LR 6 +LiCl</b>	-1.22mm	-0.56 mm	Centralizada no MnR	Medial	MnR, PMnR, PnC, RtTgP,	Porções central e caudal
<b>LR 7 +LiCl</b>	-1.16mm	-0.68mm	Centralizada no MnR	Medial	MnR, PMnR, VTg	Porções central e caudal
<b>LR 11 +C</b>	-1.16mm	-0.56 mm	Centralizada no MnR	Medial/ Direita	MnR, PMnR, VTg, RtTgP,RtTg	Porções central e caudal
<b>LR 12 +C</b>	-1.40mm	-0.92 mm	Centralizada no MnR	Medial	MnR, PMnR, PnR	Porção caudal
<b>LR 17 +LiCl</b>	-1.04mm	-0.44mm	Centralizada no MnR	Medial/ Direita	MnR, PMnR, VTg	Porções central e caudal
<b>LR 22 +LiCl</b>	-1.16mm	-0.56 mm	Centro-ventral ao NMR	Medial/ Esquerda	MnR, PMnR, RtTgP, RtTg	Porções central e caudal
<b>LR 26 +C</b>	-1.22mm	-0.56mm	Centralizada no MnR	Medial	MnR, PMnR, PnR, RtTgP, RtTg	Porções central e caudal
<b>LR 27 +C</b>	-0.92mm	-0.36mm	Centralizada no MnR	Medial	MnR, PMnR, VTg	Porção central
<b>LR31 +LiCl</b>	-0.92mm	-0.36mm	Centro-ventral ao NMR	Medial	MnR, PMnR, RtTgP, RtTg	Porção central
<b>LR36 +C</b>	-080mm	-0.24mm	Centro-dorsal ao NMR	Medial/ Direita	MnR, PMnR, Atg	Porções central e rostral
<b>LR41 +LiCl</b>	-1.16mm	-0.44mm	Centralizada no MnR	Medial/ Direita	MnR, PMnR, RtTgP	Porções central e caudal
<b>LR45 +C</b>	-1.04mm	-0.44mm	Centralizada no MnR	Medial/ Esquerda	MnR, PMnR, RtTgP	Porção central
<b>LR50 +C</b>	-1.04mm	-0.36mm	Centro-ventral ao NMR	Medial/ Direita	MnR, PMnR, RtTgP, PnO	Porção central
<b>LR57 +C</b>	-1.16mm	-0.56mm	Centralizada no MnR	Medial/ Direita	MnR, PMnR, RtTgP	Porções central e caudal
<b>LR59 +C</b>	-1.16mm	-0.56mm	Centro-ventral ao NMR	Medial/ Direita	MnR, PMnR, RtTg	Porções central e caudal
<b>LR73 +LiCl</b>	-1.04mm	-0.36mm	Centro-ventral ao NMR	Medial	MnR, PMnR, RtTgP, RtTg, PnO	Porção central

<b>LR75 +LiCl</b>	-1.16mm	-0.44mm	Centro-ventral ao NMR	Medial/ Direita	MnR, PMnR, ts	Porções central e caudal
<b>LR77 +C</b>	-1.04mm	-0.44mm	Centralizada no MnR	Medial/ Direita	MnR, PMnR ts, RtTgP	Porção central
<b>LR81 +LiCl</b>	-1.04mm	-0.44mm	Centralizada no MnR	Medial	MnR, PMnR	Porção central

**Legenda de abreviaturas:**

<b>Abreviatura</b>	<b>Nome da estrutura</b>
Atg	anterior tegmental nucleus
MnR	median raphe nucleus
PDTg	posterodorsal tegmental nucleus
PMnR	paramedian raphe nucleus
PnC	pontine reticular nucleus, caudal part
PnO	pontine reticular nucleus, oral part
PnR	pontine raphe nucleus
Rbd	rhabdoid nucleus
RtTg	reticulotegmental nucleus of the pons
RtTgP	reticulotegmental nucleus of the pons, pericentral
ts	tectospinal tract
VTg	ventral tegmental nucleus

**Anexo A:** Documento de aprovação dos procedimentos utilizados no Capítulo I pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Universidade Estadual Paulista (Unesp/Bauru).



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Bauru



O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Universidade Estadual Paulista – UNESP, em sua 63ª Reunião Ordinária realizada no dia 17 de junho de 2011, no Prédio do STI da Faculdade de Ciências - UNESP, Campus de Bauru, às 09h00, após análise do parecer emitido pelo relator **APROVA** o projeto "Avaliação dos efeitos comportamentais da lesão eletrolítica da região do núcleo mediano da rafe como manifestações maníacas em ratos", Processo nº 6171/46/01/11, sob responsabilidade da Professora Doutora Miriam Garcia Mijares.

Bauru (SP), 17 de junho de 2011

**PROF. DR. ARI FERNANDO MAIA**  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Av. Engº Luiz Edmundo Carrijo Coube, 14-01 - Vargem Limpa - Bauru-SP - CEP: 17.033-360  
Fone: (14) 3103-6187 - email: celiaf@fc.unesp.br

**Anexo B.** Documento de inclusão do procedimento de lesão eletrolítica do MnR em camundongos no protocolo experimental aprovado pela IACUC (Institutional Animal Care and Use Committee) da University of Maryland School of Medicine/Baltimore.

UNIVERSITY OF MARYLAND  
SCHOOL OF MEDICINE  
Office of Animal Welfare Assurance

655 W. Baltimore Street  
ERB, Mezzanine Ste. M023  
Baltimore, MD 21201-1559

email: [iacuc@som.umaryland.edu](mailto:iacuc@som.umaryland.edu)  
voice: (410) 706-7859  
Assurance Number: A3200-01

DATE: January 14, 2013

TO: Todd Gould, MD  
Department of Psychiatry  
MSTF, Rm. 934D

FROM: Institutional Animal Care and Use Committee

RE: IACUC PROTOCOL #0410006  
"Behavioral and Biochemical Analysis of Rodent Models of Mood Disorders and Their Treatments"

---

This is to certify that the Institutional Animal Care and Use Committee received your response to their queries and that your response was considered sufficient to grant FULL APPROVAL to your amendment. The designated review approval date for this amendment is January 14, 2013.

This amendment approval does not affect the expiration date of the protocol. Please note that your protocol expiration date remains April 16, 2013.

*If you have any questions, please do not hesitate to contact the Office of Animal Welfare Assurance by email ([iacuc@som.umaryland.edu](mailto:iacuc@som.umaryland.edu)) or by phone (706-7859).*



John B. Sacci, Jr., Ph.D.  
IACUC Chair

\* Amendment date January 11, 2013: Add Survival Surgery to Induce MRN Lesions; Add Experiments; Add 128 C57BL/6