

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

**ENVOLVIMENTO DA NEUROTRANSMISSÃO CRFÉRGICA DAS ASAS  
LATERAIS DO NÚCLEO DORSAL DA RAFÉ NA EXPRESSÃO DE  
COMPORTAMENTOS DEFENSIVOS ASSOCIADOS AO PÂNICO**

**LEONARDO DANIEL MENDES**

**RIBEIRÃO PRETO**

**2017**

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

LEONARDO DANIEL MENDES

**Envolvimento da neurotransmissão CRFérgica das asas laterais do núcleo dorsal da rafe na expressão de comportamentos defensivos associados ao pânico**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do grau de Mestre em Ciências. Área de concentração: Farmacologia.

**Orientador:** Prof. Dr. Hélio Zangrossi Jr.

RIBEIRÃO PRETO

2017

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

### **FICHA CATALOGRÁFICA**

Preparada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo de  
Ribeirão Preto/USP

Mendes, Leonardo Daniel

Envolvimento da neurotransmissão CRFérgica das asas laterais do núcleo dorsal da rafe na expressão de comportamentos defensivos associados ao pânico. Ribeirão Preto, 2017.

65 fs.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Zangrossi Júnior, Hélio.

1. Núcleo dorsal da rafe 2. Asas laterais 3. Pânico 4. Fator liberador de corticotrofina 5. Labirinto em T elevado

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Nome: MENDES, Leonardo Daniel**

**Título: Envolvimento da neurotransmissão crfégica das asas laterais do núcleo dorsal da rafe na expressão de comportamentos defensivos associados ao pânico**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do grau de Mestre em Ciências. Área de concentração: Farmacologia.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/ 2017

### Banca examinadora

Profº. Drº.: Hélio Zangrossi Jr.

Instituição: FMRP – USP

Assinatura: \_\_\_\_\_

Profª. Drª.: Alline Cristina de Campos

Instituição: FMRP -USP

Assinatura: \_\_\_\_\_

Profº. Drº.: Norberto Garcia Cairasco

Instituição: FMRP - USP

Assinatura: \_\_\_\_\_

Profº. Drº.: Ricardo Luiz Nunes de Souza

Instituição: UNESP

Assinatura: \_\_\_\_\_

*DEDICATÓRIA*

---

---

---

---

---

*“Dedico este trabalho aos meus pais, Hailton e Darlene, e a minha irmã Viviane que me guiaram e sei que sempre me guiarão. Dedico também ao meu tio Anilton, que mesmo não estando mais entre nós, se faz presente sempre em meu pensamento e coração.*

*“Eu tenho tido a alegria como um dom, em cada canto eu vejo o lado bom”*

# *AGRADECIMENTOS*

---

---

---

---

A Deus que sempre me amparou e me protegeu em todos os momentos até aqui vividos.

Ao meu pai e à minha mãe, que não mediram esforços emocionais e financeiros para que eu concluísse mais uma etapa de minha vida. Nada disso seria possível sem vocês.

À minha irmã, que foi e sempre será meu porto seguro, que me ensina o que é amor a cada dia. Obrigado por estar sempre comigo e ainda nos dar essa benção chamado Estêvão.

À minha família, seria impossível citar nomes pois todos foram essenciais para a minha jornada.

A Mari, que sem dúvidas eu não estaria aqui hoje se não fosse a convivência diária e paciência que teve comigo, você é parte fundamental deste ciclo, devo muito disso a você.

Aos meus amigos que estiveram comigo em Ribeirão, em especial Fabi, Ju Grell e Kleber e também aos que não estiveram aqui mas todo dia se faziam presença, Fer, Cabris, Caori, Tchela, Elson. Vocês me incentivaram a sempre continuar.

Ao Prof. Dr. Hélio Zangrossi Júnior, pela orientação nestes dois anos e pelos ensinamentos compartilhados.

Aos meus novos amigos, que a cada dia me motivavam a continuar e para mim foram essenciais, Ailton, Alana, Ana, Daiane, Gabriel, Helô. Em especial a Melina que sempre me ajudou nos experimentos e sofreu comigo quando não acertávamos as asas laterais. Aprendi com vocês que rir sempre vai ser o melhor remédio quando tudo dá errado.



A minha querida Alana que nos meus primeiros dias foi quem me recepcionou e me ajudou em tudo. A Ana que com seu jeito doce e meigo de ser me mostrou uma mulher forte e que pode tudo. A Heloísa que desde Alfenas via um modelo de mulher e hoje, mais que nunca, me inspira a cada dia e por fim, ao Ailton, que foi fundamental nas idéias e correções desta dissertação.

Ao apoio técnico do Afonso e por fazer um trabalho de base essencial para que nós pudessemos desenvolver os nossos projetos.

Aos funcionários do Depto. de Farmacologia Ramon, Soninha, Fátima e Gislaine, pelo trabalho burocrático tão eficiente desenvolvido por vocês.

Aos membros da banca, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alline Cristina de Campos, Prof. Dr. Norberto Garcia Cairasco, Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza, pelo tempo dedicado e esforço para estarem acrescentando tanto para mim neste momento tão importante.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Cnpq) e Fundação de Amparo à Pesquisa da Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, meu muito obrigado.

“Você é quem decide o que vai ser eterno em você, no seu coração. Deus dá o dom de eternizar em nós o que vale a pena, e esquecer definitivamente aquilo que não vale”. ( Padre Fábio de Melo)

## RESUMO

Mendes, L. D. **Envolvimento da neurotransmissão CRFérgica das asas laterais do núcleo dorsal da rafe na expressão de comportamentos defensivos associados ao pânico**. 2017. 65 fs. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

O núcleo dorsal da rafe é a principal fonte de projeções serotoninérgicas que inervam áreas límbicas implicadas na modulação de diferentes funções comportamentais e/ou neurovegetativas. Disfunções neste núcleo têm sido associadas à gênese de transtornos psiquiátricos. Estudos recentes apontam para a heterogeneidade morfológica e funcional do NDR, com destaque para evidências que sugerem a participação seletiva da sub-região denominada asas laterais nos mecanismos fisiopatológicos do transtorno de pânico. Dentre os diversos neurotransmissores presentes nas asas laterais, o papel desempenhado pelo fator liberador de corticotrofina (CRF) na modulação dos neurônios serotoninérgicos presentes nesta área tem ganhado amplo destaque. Com base nestas evidências, o objetivo deste trabalho foi o de avaliar o envolvimento da neurotransmissão mediada pelo CRF nas asas laterais de ratos machos Wistar na expressão do comportamento de fuga avaliado no labirinto em T elevado (LTE). Os resultados obtidos mostram que administração local de CRF na dose de 100 ng atenuou a expressão do comportamento de fuga, enquanto que a dose de 0,3 ng facilitou a expressão desse comportamento, sugerindo assim um efeito do tipo panicolítico e panicogênico, respectivamente. A injeção de CRF nas asas laterais não afetou a aquisição da resposta de esquiva inibitória também medida no LTE. Este comportamento defensivo tem sido associado à ansiedade. Além disso, a administração de antalarmina, um antagonista seletivo de CRF1, previamente à dose de 0,3 ng bloqueou o efeito facilitador do CRF sobre a expressão da resposta da fuga, sugerindo então que os receptores de CRF1 estejam envolvidos no efeito panicogênico deste peptídeo. Assim sendo, o efeito do CRF sobre a resposta de fuga no LTE parece ser dependente da dose administrada. Os resultados obtidos, juntamente com dados prévios da literatura, indicam que diferentes subtipos de receptores de CRF sejam recrutados na mediação destes efeitos opostos causados pelo peptídeo.

Palavras-chave: Núcleo dorsal da rafe. Asas laterais. Pânico. Fator liberador de corticotropina. Labirinto em T elevado.

## ABSTRACT

Mendes, L. D. **Involvement of CRF-mediated neurotransmission in the lateral wings of the dorsal raphe nucleus in the expression of defensive behaviors associated with panic** 2017. 65 fs. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

The dorsal raphe nucleus (DRN) is the main source of serotonergic projections that innervate limbic areas involved in the modulation of different behavioral and/or neurovegetative functions. Dysfunctions in this nucleus have been associated with the genesis of psychiatric disorders. Recent studies point to the morphological and functional heterogeneity of NDR. There is evidence to suggest that the sub-region called lateral wings is involved in the physiopathological mechanisms of panic disorder. Among the several neurotransmitters present in the lateral wings, the role played by the corticotrophin releasing factor (CRF) in the modulation of the serotonergic neurons present in this area has raised attention. Based on these evidences, the objective of this work was to evaluate the involvement of CRF-mediated neurotransmission in the lateral wings of male Wistar rats in the expression of the escape behavior evaluated in the elevated T maze test (ETM). The results showed that local administration of CRF at the dose of 100 ng attenuated the expression of escape behavior, whereas the dose of 0.3 ng facilitated the expression of this behavior, thus suggesting a panicolytic- and panicogenic-like effects, respectively. Injection of CRF in the lateral wings did not affect the acquisition of the inhibitory avoidance response, also measured in ETM. This defensive behavior has been associated with anxiety. In addition, the administration of antalarmin, a CRF1 receptor antagonist, prior to the 0.3 ng dose blocked the facilitatory effect of CRF on the expression of the escape response, thus suggesting that CRF1 receptors are involved in the panicogenic effect of this peptide. Thus, the effect of CRF on escape response in the ETM seems to be dose dependent. The results obtained, together with previous literature data, indicate that different subtypes of CRF receptors are recruited in the mediation of these opposite effects caused by the peptide.

**Keywords:** Dorsal raphe nucleus. Lateral wings. Panic. Corticotrophin releasing factor. Elevated T maze

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1. A ansiedade e o Transtorno do Pânico .....	15
1.2. Estudo das reações de defesa em animais.....	16
1.3. Serotonina e o TP .....	18
1.4. Heterogeneidade morfológica e funcional do NDR .....	21
1.5. Fator de liberação de corticotrofina e controle da atividade neuronal do NDR 24	
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	29
2.1. Objetivo geral .....	29
2.2. Objetivos específicos .....	29
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	31
3.1. Animais .....	31
3.2. Drogas.....	31
3.3. Aparatos.....	31
3.3.1. Labirinto em T elevado .....	31
3.3.2. Teste do campo aberto.....	32
3.4. Procedimentos .....	33
3.4.1. Procedimento cirúrgico .....	33
3.4.2. Injeções intra-asas laterais do NDR .....	34
3.4.3. Testes Comportamentais.....	34
3.4.4. Perfusão e histologia .....	36
3.5. <b>Análise estatística</b> .....	36
<b>4. RESULTADOS</b> .....	39
4.1. Análise histológica.....	39
4.2. Experimento 1 .....	39
4.3. Experimento 2 .....	42
4.4. Experimento 3 .....	44
4.5. Experimento 4 .....	46
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	50
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	56
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	58

# *INTRODUÇÃO*

---

---

---

---

---

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. A ansiedade e o Transtorno do Pânico**

A ansiedade é um estado emocional subjetivo de apreensão ou tensão, acompanhado de alterações comportamentais, fisiológicas e cognitivas (GRAEFF, 1999; BRANDÃO, 2001). Embora seja normalmente vivenciada, favorecendo o bom desempenho do indivíduo em tarefas cognitivas e motoras, a ansiedade pode elevar-se para um patamar exacerbado, interferindo na execução de atividades diárias e no convívio social do indivíduo, sendo neste caso considerada patológica (BARLOW, 1988; GRAEFF, 2004).

De acordo com o Manual de Diagnóstico e Estatística das Doenças Mentais (AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION, 2013), na prática clínica, os transtornos de ansiedade são separados em diferentes categorias nosológicas e, dentre elas, encontra-se o transtorno do pânico (TP).

O TP é caracterizado pela recorrência de ataques de pânico inesperados e inexplicáveis, associados a uma intensa preocupação com o surgimento de novos ataques e suas consequências. O ataque de pânico, por sua vez, consiste em um momento de curto período de tempo onde o indivíduo vivencia uma situação de medo intenso e desconforto, com a expressão de pelo menos 4 sintomas característicos, como por exemplo: a taquicardia, a hiperventilação ou dispneia, a sensação de morte eminente, a dormência e o formigamento das mãos (AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION, 2013).

## **1.2. Estudo das reações de defesa em animais**

Pesquisas com animais de laboratório têm contribuído para o entendimento das bases neurobiológicas da ansiedade. Estes estudos têm por base a teoria evolutiva proposta por Charles Darwin, que postula que o homem tendo outros animais como ancestrais compartilharia com estes suas emoções básicas. No que diz respeito à ansiedade e ao medo, a perspectiva evolutiva leva a pensar que tais emoções teriam suas raízes biológicas nas reações defensivas de animais frente a ameaças a sua integridade física ou a sua sobrevivência (PANKSEPP, 1982; GRAEFF, 1999). Dito isto, conclui-se que tanto o medo quanto à ansiedade teriam a função de preparar o organismo para situações de perigo.

As fontes de estímulo de ameaça podem ser várias, entre elas, ambientes desconhecidos, confronto com predador, dentre outros (BLANCHARD; BLANCHARD, 2008; GRAEFF; ZANGROSSI, 2002).

De acordo com análises etológicas frente a esses estímulos de ameaça, os animais podem apresentar diferentes respostas defensivas, tais como: avaliação de risco, esquiva, imobilidade, fuga, ataque defensivo ou submissão (ADAMS, 2006; ADAMS; COX; KAKOLEWSKI, 1979; BLANCHARD; BLANCHARD, 2008; ZANGROSSI; GRAEFF, 2002).

Baseado neste conhecimento, Caroline e Robert Blanchard (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988, 1989, 2008; BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2003) criaram uma classificação de níveis de defesa que leva em conta a estratégia adotada em função da distância do animal à ameaça.

O primeiro nível de defesa é marcado pela exploração cautelosa; o perigo é incerto e/ou a fonte ameaçadora não se encontra mais presente no local. O animal



apresenta tentativas de aproximação seguidas de esquiva da fonte de ameaça, que é denominado de avaliação de risco. Adicionalmente, estudos neurofuncionais apontam que estruturas encefálicas como o complexo amigdalóide e o sistema septo-hipocampal parecem estar envolvidas na evocação de respostas defensivas (GRAEFF, 2004; GRAEFF; ZANGROSSI, 2010). Drogas ansiolíticas são capazes de modificar estes comportamentos (BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2003), sustentando a associação dos comportamentos expressos neste nível com a ansiedade.

Já no segundo nível, quando a presença do predador é real, mas a uma distância segura da presa. O padrão comportamental é caracterizado pela fuga da fonte da ameaça, e em caso da inexistência de rota para fuga, o animal expressa o comportamento de congelamento (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988). Tanto o comportamento de fuga, quanto o congelamento em ambientes fechados que impossibilitam a fuga, são utilizados como índices experimentais de medo (GRAEFF, 1994; SHUHAMA et al., 2007).

O terceiro nível, proximal, ocorre quando o animal está face à fonte de ameaça. Nessa situação, o repertório de comportamentos defensivos é caracterizado por fuga explosiva e/ou ataques defensivos (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988). Estudos utilizando a técnica de estimulação elétrica mostram que o hipotálamo medial e a substância cinzenta periaquedutal (SCP) são estruturas envolvidas na evocação destas respostas defensivas (para revisão ver SCHENBERG, 2010). Este padrão de resposta evidenciado no nível proximal tem sido sistematicamente relacionado aos ataques de pânico nos seres humanos, uma vez que estes comportamentos são sensíveis a drogas que na clínica são eficazes no tratamento do transtorno do pânico (BLANCHARD et al., 1997; GRAEFF, 1994; SCHENBERG, 2010).

### **1.3. Serotonina e o TP**

Embora os mecanismos neurobiológicos envolvidos na fisiopatologia do TP permaneçam desconhecidos, evidências clínicas e pré-clínicas acumuladas nos últimos anos sugerem o envolvimento da neurotransmissão mediada pela serotonina (5-HT).

A observação clínica do efeito ansiolítico/panicolítico proporcionado por drogas que modulam a neurotransmissão serotoninérgica, mais especificamente dos compostos tricíclicos e dos inibidores seletivos da receptação de 5-HT, como por exemplo, a imipramina e fluoxetina, respectivamente (para revisão ver KLEIN, 1987; LÓPEZ-MUÑOZ; ALAMO, 2009), chamaram atenção para importância da serotonina na fisiopatologia da ansiedade (BALDWIN et al., 2005; GRAEFF, 1981, 1990, 1993, 1994, 2006; GRAEFF; ZANGROSSI, 2002, 2010; GRIEBEL, 1995; GUIMARÃES; ZUARDI; HETEM, 2004; ZANGROSSI et al., 2001).

Evidências pré-clínicas obtidas em modelos animais de conflito, nos quais o comportamento operante é simultaneamente mantido por um reforço positivo e suprimido por um estímulo aversivo, apontaram para o papel ansiogênico da 5-HT (GELLER; BLUM, 1970; GRAEFF; SCHOENFELD, 1970; ROBICHAUD; SLEDGE, 1969). Somados a estas evidências, estudos farmacológicos mostraram que a 5-HT promovia um aumento nos níveis de ansiedade devido sua ação em substratos neurais como o complexo amigdalóide (HODGES; GREEN; GLENN, 1987; PETERSEN; SCHEEL-KRUGER, 1984).

Todavia, utilizando o modelo animal de estimulação elétrica da substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPD), caracterizado por induzir a resposta defensiva de fuga, apontava para o papel ansiolítico da 5-HT (KISER; LEOVITZ, 1975; SANFORD KISER; LEOVITZ; GERMAN, 1978; SCHENBERG; GRAEFF,

1978; SCHÜTZ; DE AGUIAR; GRAEFF, 1985)

Diante desta e de outras evidências aparentemente contraditórias sobre o envolvimento da serotonina na mediação de comportamentos defensivos associados à ansiedade e ao pânico (para uma revisão abrangente, ver (GRAEFF, 2002), Deakin e Graeff (1991) propuseram a chamada teoria do papel dual da serotonina na ansiedade.

No cerne desta teoria está o núcleo dorsal da rafe (NDR). Esta estrutura, localizada na porção ventral do mesencéfalo, logo abaixo do aqueduto de Sylvius, é a principal fonte de neurônios serotoninérgicos que inervam estruturas límbicas envolvidas no processamento emocional (AZMITIA; SEGAL, 1978).

Deakin e Graeff propuseram que a ativação de fibras serotoninérgicas oriundas do NDR e que inervam a amígdala (trato prosencefálico) aumentaria a expressão de comportamentos defensivos relacionados à ansiedade. Por outro lado, a estimulação de fibras do NDR que se ligam com a SCPD (trato periventricular) inibiria a expressão de comportamentos relacionados ao pânico, como a fuga (GRAEFF, 2002, 2004).

Para se testar esta teoria foi desenvolvido o labirinto em T elevado (LTE). Este teste permite mensurar, em um mesmo animal, duas respostas diferentes: a esquia inibitória e a fuga (GRAEFF; NETTO; ZANGROSSI, 1998; GRAEFF; VIANA; MORA, 1996; GRAEFF; VIANA; TOMAZ, 1993; VIANA; TOMAZ; GRAEFF, 1994; ZANGROSSI; GRAEFF, 1997).

O aparato experimental é formado por três braços de iguais dimensões, dispostos em forma de T e elevados em relação ao solo. Um dos braços é circundado por paredes e é disposto perpendicularmente aos dois outros braços desprovidos de paredes. Durante o teste, os animais realizam duas tarefas

consecutivas, a esquivas inibitória e a fuga. Em ambas as tarefas, os animais passam por três tentativas. Para verificar o comportamento de esquivas inibitória, o animal é colocado na extremidade do braço fechado e o tempo de saída do animal deste braço é registrado. A cada tentativa o animal permanece por mais tempo dentro deste braço, evidenciando a aprendizagem da esquivas dos braços abertos. A situação gerada durante a tarefa de esquivas se caracteriza pelo conflito entre o impulso exploratório e o medo inato que os animais apresentam por espaços abertos. Após a última tomada da tarefa de esquivas, os animais são colocados na extremidade distal de um dos braços abertos para a realização da tarefa de fuga. Nessa, é registrado o tempo gasto pelo animal para a saída do braço aberto, também por 3 vezes.

A validação farmacológica deste teste (para uma revisão ver ZANGROSSI; GRAEFF, 2014) demonstrou que drogas utilizadas preferencialmente na clínica para o tratamento do transtorno de ansiedade generalizada, como o benzodiazepínico diazepam e o agonista parcial serotoninérgico buspirona, faz com que os animais saiam mais facilmente do braço fechado em direção ao braço aberto, indicando um perfil ansiolítico de ação. No entanto, quando avaliadas no braço aberto do modelo (medida relacionada ao pânico), não produzem alterações. As drogas antidepressivas como a imipramina e a fluoxetina, que são utilizadas no tratamento de pacientes com TP, quando administradas crônica, mas não agudamente, inibem a expressão da resposta de fuga, indicando um efeito do tipo panicolítico (PINHEIRO et al., 2008; TEIXEIRA; ZANGROSSI; GRAEFF, 2000; ZANOVELI; NOGUEIRA; ZANGROSSI, 2005).

Resultados obtidos com o LTE sustentam a proposição de Deakin e Graeff (1991) sobre o papel oposto desempenhado pelo NDR na modulação de

comportamentos defensivos associados à ansiedade e ao pânico. Por exemplo, foi demonstrado que a estimulação de neurônios serotoninérgicos do NDR, através da administração local do agonista glutamatérgico, o ácido caínico ou do agonista inverso de receptores benzodiazepínicos, o FG 7142, favoreceu a aquisição da esquiva inibitória, bem como prejudicou a expressão da fuga (GRAEFF, 1996; GRAEFF et al., 1996; GRAEFF; VIANA; MORA, 1997; POBBE; ZANGROSSI, 2005). Já a lesão neurotóxica do NDR com 5,7-DHT, bem como a inibição farmacológica dos neurônios serotoninérgicos promovida pela administração de muscimol, agonista de receptores GABAA, prejudicou a aquisição da esquiva inibitória, e ao mesmo tempo facilitou a expressão de fuga no LTE (SENA et al., 2003).

#### **1.4. Heterogeneidade morfológica e funcional do NDR**

Evidências obtidas nos últimos anos sugerem que o NDR é uma estrutura encefálica heterogênea, formado por um agregado de diferentes subpopulações de neurônios serotoninérgicos e não serotoninérgicos, que são morfológica e funcionalmente distintos (ABRAMS et al., 2004; CALIZO et al., 2011; HALE; SHEKHAR; LOWRY, 2012).

Numa perspectiva histórica, as primeiras evidências experimentais que sugeriram a heterogeneidade morfológica do NDR foram obtidas através da técnica de imunistoquímica para detecção de neurônios serotoninérgicos. A partir do uso desta abordagem experimental, Steinbusch (1981) mostrou que os neurônios serotoninérgicos neste núcleo estavam divididos em aglomerados distintos, sendo denominados de: dorsal, ventral, laterais (posteriormente também chamados de asas laterais), caudal e interfascicular

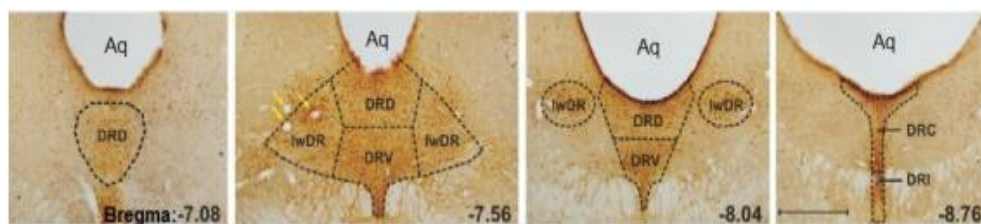


Figura 1. Fotomicrografia ilustrando secções coronais do NDR ao longo do eixo rostrocaudal (Bregma: -7,08 a -8,76) processadas pelo método imunistoquímico para detecção da enzima triptofano hidroxilase. As linhas tracejadas delimitam os sub-núcleos do NDR segundo Paxinos & Watson (2007). Setas amarelas: vasos sanguíneos indicadores do limite entre as asas laterais e a substância cinzenta periaquedutal ventrolateral; Aq: aqueduto cerebral; DRD: sub-região dorsal do NDR; DRV: sub-região ventral do NDR; lwDR: asas laterais do NDR; DRC: sub-região caudal do NDR; DRI: sub-região interfascicular do NDR. Barra de escala: 300 µm. Fonte: adaptado de Spiacci et al., 2012.

Posteriormente, Imai e colaboradores (1986), com auxílio da técnica de duplo neurotraçamento, relataram a existência de uma organização topográfica dos neurônios do NDR ao longo do eixo rostro-caudal, com base nas diferenças entre suas aferências. De acordo com os autores, os neurônios da porção rostral do NDR se projetam mais densamente para os gânglios da base, enquanto que os neurônios da porção caudal se projetam para regiões límbicas.

Nos últimos anos, a proposta de heterogeneidade funcional do NRD tem ganhado destaque através de evidências obtidas com o uso da técnica de imunistoquímica para detecção da proteína *Fos*. Resumidamente, a proteína *Fos* é o produto do gene *c-fos*, um proto-oncogene pertencente a uma família de fatores de transcrição induzíveis, que tem sido utilizada como um marcador indireto de atividade neuronal (DRAGUNOW; FAULL, 1989). Nesse sentido, Abrams e colaboradores (2005) demonstraram que a administração sistêmica de drogas que promovem o aumento nos níveis de ansiedade, como por exemplo, a cafeína, a ioimbina, o mCPP e o FG-7142, induziram a expressão da proteína *Fos* em neurônios imunorreativos para triptofano hidroxilase (enzima essencial para a síntese de serotonina) localizados nas porções dorsal e caudal (DRC) da rafe.

Resultados semelhantes foram observados em animais expostos à condição aversiva, mais especificamente ao teste do campo aberto sob alta intensidade de luz (BOUWKNECHT et al., 2007). Estes dados em conjunto sugerem que o trato prosencefálico formado por projeções serotoninérgicas do NDR, que segundo a Deakin e Graeff (1991) estaria envolvido na modulação da ansiedade, seria oriundo destes subnúcleos do NDR.

Por outro lado, Johnson e colaboradores (2005) sugerem que o trato periventricular seria formado por neurônios serotoninérgicos das asas laterais do NDR. Esta proposta é baseada em resultados obtidos com a exposição de ratos a um ambiente com altas concentrações de dióxido de carbono (JOHNSON et al., 2005). A exposição de ratos a ambientes contendo alta concentração CO<sub>2</sub>, um estímulo que provoca ataques de pânico em pacientes com transtorno de pânico (GRIEZ; LOUSBERG; VAN DEN HOUT, 1987), ativa neurônios serotoninérgicos das asas laterais do NDR (JOHNSON et al., 2005).

Sustentando ainda heterogeneidade funcional do NDR, um estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa mostrou que diferentes situações aversivas recrutam populações neuronais e subnúcleos distintos no NDR. Em ratos submetidos ao teste do LTE, enquanto a tarefa de esquiva inibitória ativa neurônios serotoninérgicos nos subnúcleos dorsal e caudal, a tarefa de fuga recruta neurônios não serotoninérgicos nas asas laterais (SPIACCI; COIMBRA; ZANGROSSI, 2012).

É importante ressaltar que além de células serotoninérgicas, o NDR também é composto por neurônios dopaminérgicos, GABAérgicos, glutamatérgicos, nitrérgicos e, nos neurônios serotoninérgicos, há peptídeos neuroatativos colocalizados, como a substância P, a galanina, a encefalina e o fator liberador de corticotrofina (CRF) (MICHELSEN; SCHMITZ; STEINBUSCH, 2007). De particular interesse para o

presente trabalho, daremos ênfase ao papel do CRF no controle da atividade neuronal do NDR.

### **1.5. Fator de liberação de corticotrofina e controle da atividade neuronal do NDR**

O CRF vem sendo estudado devido a sua importância nas respostas endócrinas, autonômicas e imune ao estresse (DE SOUZA, 1995; DUNN; BERRIDGE, 1990; VALE et al., 1983). Em 1964, Guillemin e colaboradores elucidaram a ação do CRF sobre a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) mostrando que havia presença de fatores hipotalâmicos que aumentavam a taxa de secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela hipófise anterior.

A caracterização da estrutura deste hormônio se deu no ano de 1983, pelo pesquisador Wylie Vale. Foi então demonstrado que o CRF é um peptídeo composto por 41 aminoácidos e que apresenta uma estrutura homóloga a de outros neuropeptídeos, tais como a angiotensina, a sauvagina e a urotensina 1. Em pesquisas ainda sobre este neuropeptídeo, Vaughan e colaboradores (1995) caracterizaram outros compostos que eram homólogos com o CRF, os quais foram denominados de urocortina 1 (UCN1), urocortina 2 (UCN2) e urocortina 3 (UCN3).

Tanto o CRF quanto os homólogos citados acima apresentam como característica comum a afinidade por dois tipos de receptores, denominados CRF1 e CRF2, porém é observado respostas diferentes dependendo de qual receptor é ativado (PERRIN; VALE, 1999). Tratando-se agora das urocortinas, análogas do CRF, a afinidade é diferente pelos receptores. Enquanto o CRF tem afinidade maior ao receptor CRF1, as urocortinas 2 e 3 apresentam maior afinidade ao receptor



CRF2. Já a urocortina 1 apresenta afinidade semelhante por ambos receptores (LEWIS et al., 2001; REYES et al., 2001; VAUGHAN et al., 1995).

A distribuição dos neurônios, assim como também dos receptores, é ampla no sistema nervoso central (CARRASCO; VAN DE KAR, 2003; KALIN; TAKAHASHI; CHEN, 1994; MAKINO et al., 1999). Os receptores de CRF1 encontram-se localizados principalmente em áreas como o lobo anterior da hipófise, hipocampo, núcleo basolateral do complexo amigdalóide, córtex, núcleos da rafe e tronco cerebral (KOROSI et al., 2005, 2007; VAN PETT et al., 2000). Adicionalmente, em 2011, foi demonstrado que há co-localização dos receptores de CRF com fenótipos neuroniais diferentes como, glutamatérgicos, GABAérgicos, dopaminérgicos e serotoninérgicos, em diferentes áreas cerebrais, revelando complexas interações dos receptores de CRF1 com outros neurotransmissores do sistema nervoso central (REFOJO et al., 2011).

Já os receptores de CRF2 apresentam uma distribuição mais restrita, estando presentes principalmente em áreas como o bulbo olfatório, núcleo do leito da estria terminal, núcleo central do complexo amigdalóide, septo lateral, hipotálamo ventromedial e no NDR (BITTENCOURT; SAWCHENKO, 2000; VAN PETT et al., 2000).

Em relação à distribuição do CRF no NDR, evidências imunoistoquímicas demonstram que esta região é densamente innervada por fibras imunorreativas para o CRF, e que a distribuição topográfica destas fibras é heterogênea ao longo do eixo rostro-caudal. Mais precisamente, enquanto no plano rostral estas fibras se aglomeram na região ventromedial, no plano caudal elas se condensam na região das asas laterais (KIRBY; RICE; VALENTINO, 2000; VALENTINO; LIOUTERMAN; VAN BOCKSTAELE, 2001)

Em relação à função do CRF sobre a atividade dos neurônios serotoninérgicos do NDR, esta parece ser complexa. Price e colaboradores (1998) através da microdiálise mostraram que a administração intracerebroventricular de CRF (0,1 ou 0,3µg) reduziu os níveis extracelulares de serotonina em áreas de projeção, como o núcleo estriado. Todavia, a infusão de doses maiores de CRF (3 µg) promoveu o efeito oposto (PRICE, et al., 1998). Ainda neste sentido, Kirby e colaboradores (2000) observaram, analisando as respostas eletrofisiológicas de um único neurônio serotoninérgico do NDR em ratos anestesiados, que o efeito promovido pelo CRF é dependente da dose. Por exemplo, enquanto a infusão no NDR de 30ng de CRF promoveu o aumento significativo na taxa de disparo do neurônio serotoninérgico, a infusão de doses menores 0,3ng promoveu o efeito oposto. Sendo assim, este efeito bifásico promovido pelo CRF sobre a atividade dos neurônios serotoninérgicos do NDR foi observado tanto na técnica de microdiálise como na eletrofisiologia.

Ainda em relação ao papel deste peptídeo no controle da atividade neuronal no NDR, Forster e colaboradores (2006) mostraram que a administração de CRF no porção caudal do DRD aumentou a liberação de serotonina no núcleo central da amígdala, assim como a expressão do comportamento de congelamento.

De grande importância para este trabalho, um estudo imunoistoquímico realizado por Roche e colaboradores (2003) sugere que papel modulatório desempenhado CRF sobre a atividade de neurônios NDR, mais especificamente das asas laterais, seja crucial para a expressão da resposta de fuga. Mais especificamente, estes pesquisadores mostram que quando ratos são colocados em um tanque com água, situação que evoca a expressão de comportamentos ativos de defesa semelhantes à fuga, há um aumento na expressão da proteína FOS em interneurônios GABAérgicos das asas laterais do NDR. Além disto, observou-se que

estes interneuronios GABAérgicos foram co-localizados com receptores CRF1. Assim, os autores propuseram que a exposição à situação aversiva levaria à liberação de CRF nas asas laterais do NDR, o que promoveria a ativação de interneurônios GABAérgicos, e conseqüentemente a inibição de neurônios serotoninérgicos. Esta ideia estaria de acordo com evidências na literatura que mostram que a ativação de neurônios 5-HT no NDR teria o papel de inibir, e não facilitar, a expressão a resposta de fuga (POBBE; ZANGROSSI, 2005; SENA et al., 2003).

Diante deste quadro, o objetivo deste estudo foi o de se testar a proposta de Roche e colaboradores (2013) sob uma perspectiva comportamental, utilizando-se para isto o LTE. Mais especificamente testamos a hipótese de que a administração de CRF nas asas laterais do NDR facilitaria a expressão da resposta de fuga avaliada no LTE, enquanto que não alteraria a resposta de esquiva. Tendo em vista os resultados eletrofisiológicos obtidos por Kirby e colaboradores (2000), mostrando que o efeito do CRF na atividade dos neurônios 5-HT do NDR é dependente da dose, este neuropeptídeo foi testado em duas diferentes faixas de doses, uma considerada baixa (0,3 e 3 ng) e uma alta (10 e 100 ng). Por fim, também avaliamos se uma antagonista de receptores CRF1, a antalarmina, alteraria o efeito sobre a resposta de fuga observado com a administração nas asas laterais de doses baixas do CRF.

## *OBJETIVOS*

---

---

---

---

---

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da injeção de CRF nas asas laterais do NDR na modulação das respostas de esquiva inibitória e de fuga em animais testados no LTE..

### **2.2. Objetivos específicos**

2.2.1. Avaliar o efeito da administração intra-asas laterais de CRF, em doses altas (100 e 10 ng) ou baixas (3 e 0,3 ng ), em ratos submetidos ao LTE.

2.2.2. Avaliar o efeito da administração intra-asas laterais do NDR de antalarmina, um antagonista preferencial dos receptores de CRF1, em ratos submetidos ao LTE.

2.2.3. Avaliar se antalarmina é capaz de bloquear o efeito gerado pela administração de doses baixas de CRF nas asas laterais do NDR em ratos submetidos ao LTE.

# *MATERIAIS E MÉTODOS*

---

---

---

---

---

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Animais**

Ratos Wistar (Universidade de São Paulo, Campus Ribeirão Preto, SP, Brasil) pesando 270-320g, foram acomodados em caixas de Plexiglas (30 x 20 x 35 cm), em grupos de 4. Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas (luz acesas as 7:00), sob temperatura ambiente controlada ( $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ ), com comida e água ad libitum. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (processo no. 196/2015).

#### **3.2. Drogas**

CRF bovino (Sigma, EUA), e antagonista de CRF1 - antalarmina (Sigma, EUA). Ambas foram solubilizadas em solução salina.

#### **3.3. Aparatos**

##### **3.3.1. Labirinto em T elevado**

O LTE é constituído por três braços de madeira de mesmas dimensões, 50 cm de comprimento por 12 cm de largura. Um dos braços é circundado por paredes laterais opacas, de 40 cm de altura, e está disposto perpendicularmente aos outros dois braços, que permanecem abertos. Para evitar a queda dos animais, os braços abertos são circundados por uma proteção transparente de acrílico de 1 cm de altura. O aparato está elevado 50 cm em relação ao solo.



Figura 2: Labirinto em T-Elevado.

### 3.3.2. Teste do campo aberto

O teste do campo aberto foi conduzido em uma arena cilíndrica de acrílico transparente de 25 cm de diâmetro por 35 cm de altura.



Figura 3: Campo aberto



### **3.4. Procedimentos**

#### **3.4.1. Procedimento cirúrgico**

Os animais foram anestesiados com 2,2,2-tribromoetanol 2,5% (10mL/kg, i.p.; Sigma-Aldrich, EUA), associado com anestesia local de lidocaína 2% (Novocol 100, S.S. White-Brasil). Após fixados pelo rochedo temporal e incisivos superiores no estereotáxico, os animais foram submetidos ao procedimento padrão para implantação de uma cânula-guia, objetivando a asa lateral direita do NDR (anteroposterior=7,68mm do bregma; lateral:+1,9mm; ângulo: 14<sup>o</sup>; profundidade: -4,3mm), de acordo com coordenadas estabelecidas por Paxinos e Watson (2007).

Através de um orifício na superfície craniana, perfurado utilizando uma broca, uma cânula guia de aço inoxidável (12 mm de comprimento; com 0,6mm de diâmetro) foi implantada 2mm acima da asa lateral direita. A cânula guia foi fixada utilizando resina de acrílico autopolimerizante e estabilizada por dois parafusos de aço inoxidável. Um mandril foi introduzido no interior da cânula para prevenir possíveis obstruções. Por fim, os animais receberam uma associação antibiótica de amplo espectro (0,2mL/animal, i.m; Pentabiótico, Fontoura-Wyeth- Brasil) para prevenção de possíveis infecções. Além disto, foi administrado um agente analgésico com atividade anti-inflamatória e antipirética, flixinina meglumina (2,5 mg/mL/kg, s.c.; 3 adiministrações, uma a cada 12 horas). O teste foi realizado no período de no mínimo 5 e no máximo 7 dias após a cirurgia.

### **3.4.2. Injeções intra-asas laterais do NDR**

No dia do teste, as injeções na asa lateral direita foram feitas utilizando uma agulha (14 mm de comprimento e 0,18 mm de diâmetro externo), inserida pela cânula guia até atingir o alvo 2 mm abaixo da extremidade da cânula. A agulha foi conectada a uma microseringa (Hamilton 70-1 RN, EUA) de 1  $\mu$ L, sendo injetado 50 nL, através de um tubo de polietileno (PE-10), o qual foi preenchido com água destilada. O deslocamento de uma bolha de ar no polietileno auxiliou na verificação do sucesso da micro-injeção. Ao término da injeção, a agulha permaneceu no local por mais um minuto para evitar refluxo da droga.

### **3.4.3. Testes Comportamentais**

Em todos os experimentos realizados e descritos abaixo, os animais passaram por duas sessões de habituação ao experimentador, começando dois dias antes do teste (5 minutos/dia). Vinte e quatro horas antes do teste, todos os animais foram pré-expostosa um dos braços abertos do LTE por 30 minutos. Para tal, cada animal foi colocado individualmente em um dos braços abertos, que foi separado dos demais braços por uma barreira de madeira. Este procedimento potencializa a expressão da fuga por reduzir respostas comportamentais à novidade, tais como a exploração e a inibição comportamental (TEIXEIRA; ZANGROSSI; GRAEFF, 2000).

No dia do teste, no experimento 1, grupos independentes de animais foram injetados unilateralmente com solução salina (n=11) ou CRF(10 ou 100ng, n=8-11) nas asas laterais.

No experimento 2, os animais receberam unilateralmente doses menores de CRF (0,3 e 3ng, n=7-9) ou solução salina (n=9) nas asas laterais.

Conforme previamente descrito na introdução deste trabalho, as doses

utilizadas nos experimentos 1 e 2 foram baseadas no estudo de Kirby e colaboradores (2000).

No experimento 3, os animais foram administrados unilateralmente com antalarmina, na dose de 50ng (n=9) ou solução salina (n=9) nas asas laterais. A dose utilizada foi baseada em estudo piloto realizado em nosso laboratório.

No experimento 4, os animais receberam a injeção unilateral de antalarmina (50 ng) ou de salina e após 10 minutos uma segunda injeção foi realizada, sendo de 0,3 ng de CRF ou de salina, todas no hemisfério direito das asas laterais. Os grupos formados foram: salina/salina (n=6), salina/CRF (n=6), antalarmina/salina (n=7) e antalarmina/CRF (n=6).

Para todos estes estudos, após a última microinjeção, esperou-se 10 minutos para as análises no LTE e no teste do campo aberto.

No teste do LTE, avaliou-se primeiro o comportamento da esquiva inibitória. Para isso, o animal foi colocado na extremidade distal do braço fechado e a latência de saída, sendo considerada a saída com as quatro patas, desse braço foi cronometrada. A primeira medida é denominada linha de base. A mesma medida foi realizada por mais 2 vezes, sendo o intervalo entre cada uma de 30 segundos (esquiva 1 e esquiva 2). O tempo máximo de permanência do animal neste braço, em cada uma das tentativas foi de trezentos segundos. Passado este tempo, o animal era retirado pelo experimentador para dar continuidade ao teste. Trinta segundos após a tomada da esquiva 2, foi verificada a latência de fuga dos animais de um dos braços abertos do labirinto. Para tal, cada animal foi colocado na extremidade do mesmo braço aberto ao qual foi anteriormente pré-exposto e o tempo de saída deste braço, com as quatro patas, foi cronometrado (fuga 1). A latência de saída deste mesmo braço abertos foi tomada por mais duas vezes (fuga

2 e fuga 3), com intervalos de 30 segundos entre elas. Durante os intervalos de 30 segundos, os animais foram colocados na caixa de acrílico utilizada no procedimento de habituação. Ao final do teste de cada animal, o aparato experimental foi limpo com álcool a 20%.

Imediatamente após a fuga 3, cada animal foi colocado individualmente na arena circular durante 5 minutos, sendo a distância total percorrida registrada por meio do programa AnyMaze (versão 4.96). Este teste foi realizado para se avaliar possíveis efeitos das manipulações farmacológicas sobre a atividade locomotora.

#### **3.4.4. Perfusão e histologia**

Após o término dos testes comportamentais, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral a 5% e foi injetado 50nL de corante azul de Evans a 1%, para que fosse marcado o sítio de injeção. Em seguida, foi realizada a perfusão intracardiaca com solução de salina, seguido de solução de formalina 10%. Após a perfusão, os encéfalos foram retirados e fixados em formol a 10% para posterior análise histológica. Na análise histológica, os encéfalos foram levados ao criostato (Leica CM1850) onde secções coronais de 40 µm foram cortadas e confeccionados laminas para verificação microscópica. Os sítios de injeção foram identificados de acordo com atlas Paxinos e Watson (2007).

#### **3.5. Análise estatística**

Os dados obtidos no LTE foram submetidos a uma Análise de Variância (ANOVA) de medidas repetidas, tendo como fator independente o tratamento e, como medida repetida, as diferentes tentativas efetuadas. Já no experimento com a antalarmina, a ANOVA de medidas repetidas teve como fatores independentes o

pré-tratamento (antalarmina ou veículo) e o tratamento (CRF ou veículo). Os dados da arena circular foram submetidos a ANOVA de uma via. Quando apropriado, foram realizadas comparações múltiplas pelo teste de Duncan.

## *RESULTADOS*

---

---

---

---

## 4. Resultados

### 4.1. Análise histológica

A figura 4 mostra os sítios de microinjeção na asa lateral direita do NDR obtidos nos experimentos realizados no presente estudo.

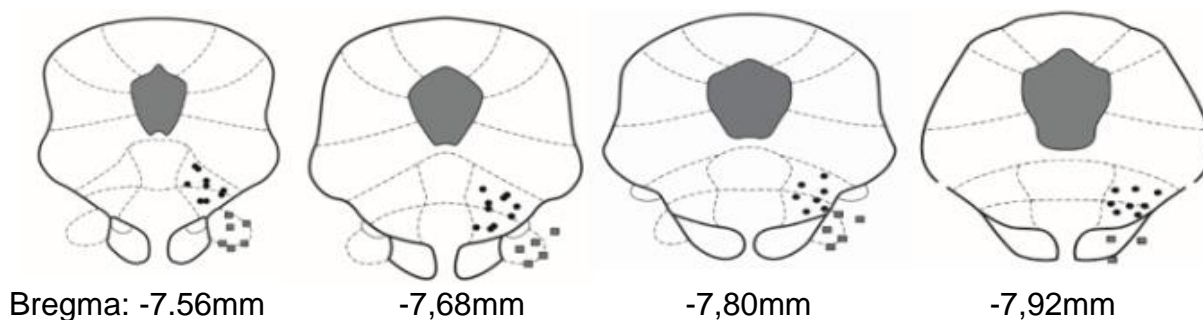


Figura 3: Representação de secções coronais do cérebro de ratos mostrando sítios de injeção dentro (círculos) ou fora (quadrados) da asa lateral direita do NDR (Paxinos & Watson, 2007). Devido à sobreposição, o número de pontos é menor que o número de animais utilizados.

### 4.2. Experimento 1

#### **Efeito da administração de CRF nas doses de 10 e 100 ng na asa lateral direita do NDR.**

A Figura 5 (painel à esquerda) mostra o efeito da administração intra-asa lateral direita de CRF nas doses de 10 e 100 ng

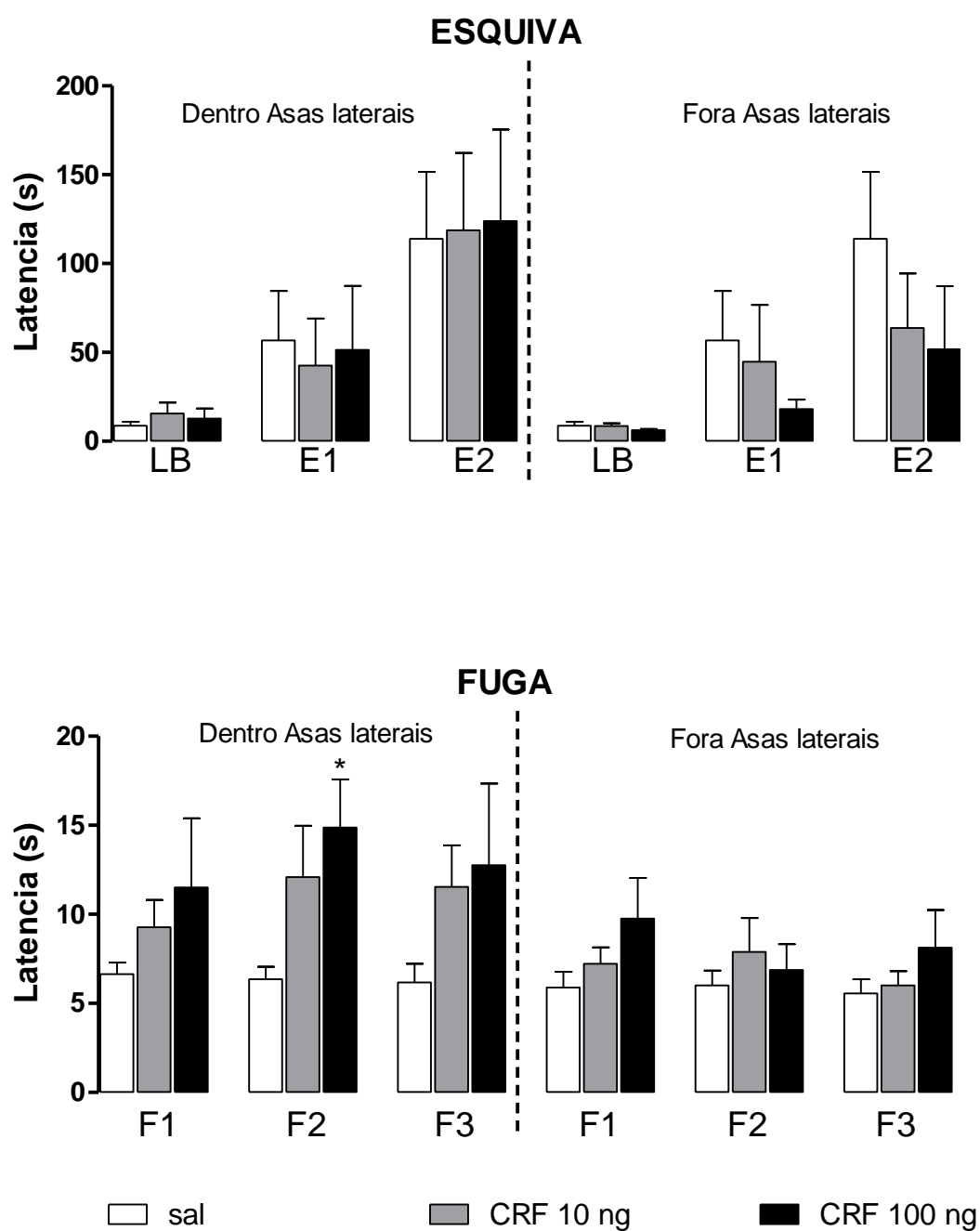
A ANOVA de medidas repetidas mostrou que na esQUIVA não há efeito do tratamento [ $F(2,25)=0,240$ , NS], assim como não houve interação entre tentativa e tratamento [ $F(4,50)=0,321$ , NS]. Somente houve efeito significativo no fator tentativa, indicando a aquisição da resposta de esQUIVA inibitória [ $F(2,50)=33,100$ ,  $p<0,05$ ].

No que diz respeito à resposta de fuga, a ANOVA de medidas repetidas

mostrou que não ocorre o efeito das tentativas [ $F(2,50)=1,408$ ], nem interação tentativa e tratamento [ $F(4,50)=0,765$  porém, ocorre efeito no tratamento [ $F(2,25)=3,772$ ;  $p<0,05$ ]. O teste *post-hoc* de Duncan mostrou que o CRF na dose de 100ng aumentou o tempo de latência de saída do braço aberto na fuga 2, indicando um efeito do tipo panicolítico.

A Figura 5 (painel à direita) mostra que a injeção de CRF fora da asa lateral direita do NDR não causa efeito significativo sobre a resposta de esquiva inibitória ou de fuga no LTE





**Figura 5.** Efeito (média  $\pm$  EPM) da microinjeção de salina ou CRF (10 ng ou 100 ng) dentro (n=9-11) ou fora (n=8-9) da asa lateral direita do NDR sobre a latência de saída do braço fechado (esquiva inibitória) e do braço aberto (fuga) de animais submetidos ao LTE. LB=linha de base; E=esquiva; F=fuga. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo salina, em uma mesma tentativa.

### 4.3. Experimento 2

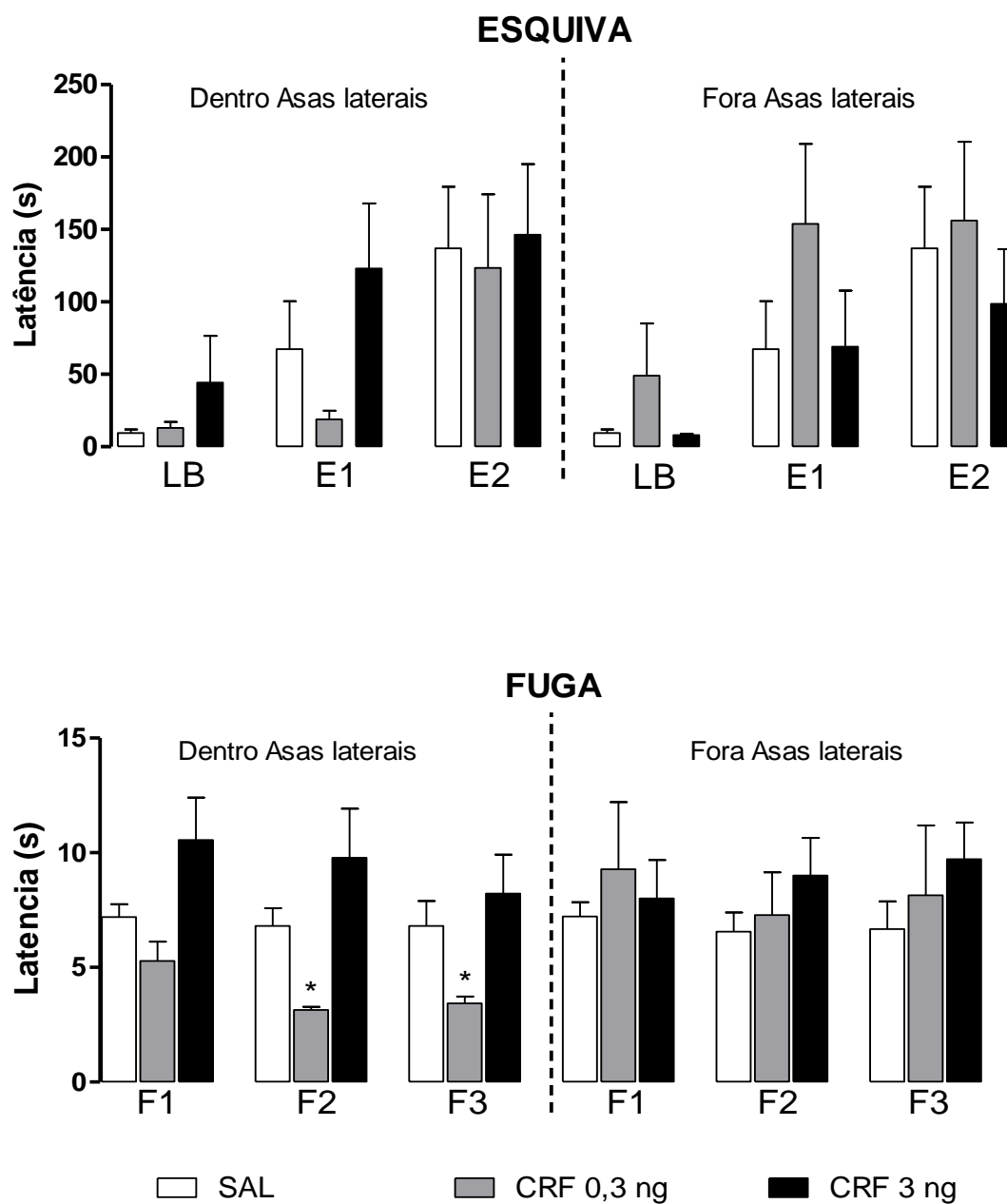
#### **Efeito da administração de CRF nas doses de 0,3 e 3 ng na asa lateral direita do NDR.**

A figura 6 (painel à esquerda) mostra o efeito da administração intra-asa lateral direita do NDR nas doses de 0,3 e 3 ng.

A ANOVA de medidas repetidas mostrou que na esQUIVA inibitória não ocorre efeito do fator tratamento [ $F(2,22)=0,805$ , NS], assim como também não ocorre a interação entre os fatores tentativa e tratamento [ $F(4,44)=1,216$ , NS], porém ocorre aquisição da resposta de esQUIVA inibitória [fator tentativa -  $F(2,44)=25,209$ ,  $p<0,05$ ].

Já em relação à fuga, observa-se efeitos significativos no fator tratamento [ $F(2,22)=9,274$ ,  $p<0,05$ ] e tentativas [ $F(2,44)=4,585$ ,  $p<0,05$ ], sem que haja interação significativa entre estes fatores [ $F(4,44)=0,579$ , NS]. O teste de *post hoc* de Duncan mostrou que nas tentativas 2 e 3, a dose de 0,3ng de CRF causou uma diminuição da latência de fuga, efeito este do tipo panicogênico.

A figura 6 (painel à direita) mostra que a injeção de CRF fora da asa lateral direita do NDR não causa efeito significativo sobre as respostas de esQUIVA inibitória ou de fuga no LTE.



**Figura 6.** Efeito (média  $\pm$  EPM) da microinjeção de salina ou CRF (0,3 ng ou 3 ng) dentro (n=7-9) ou fora da asa lateral direita (n=7-9) sobre a latência de saída do braço fechado (esquiva inibitória) e do braço aberto (fuga) de animais submetidos ao LTE. LB=linha de base; E=esquiva; F=fuga. \*p<0,05 em relação ao grupo salina em uma mesma tentativa.

#### 4.4. Experimento 3

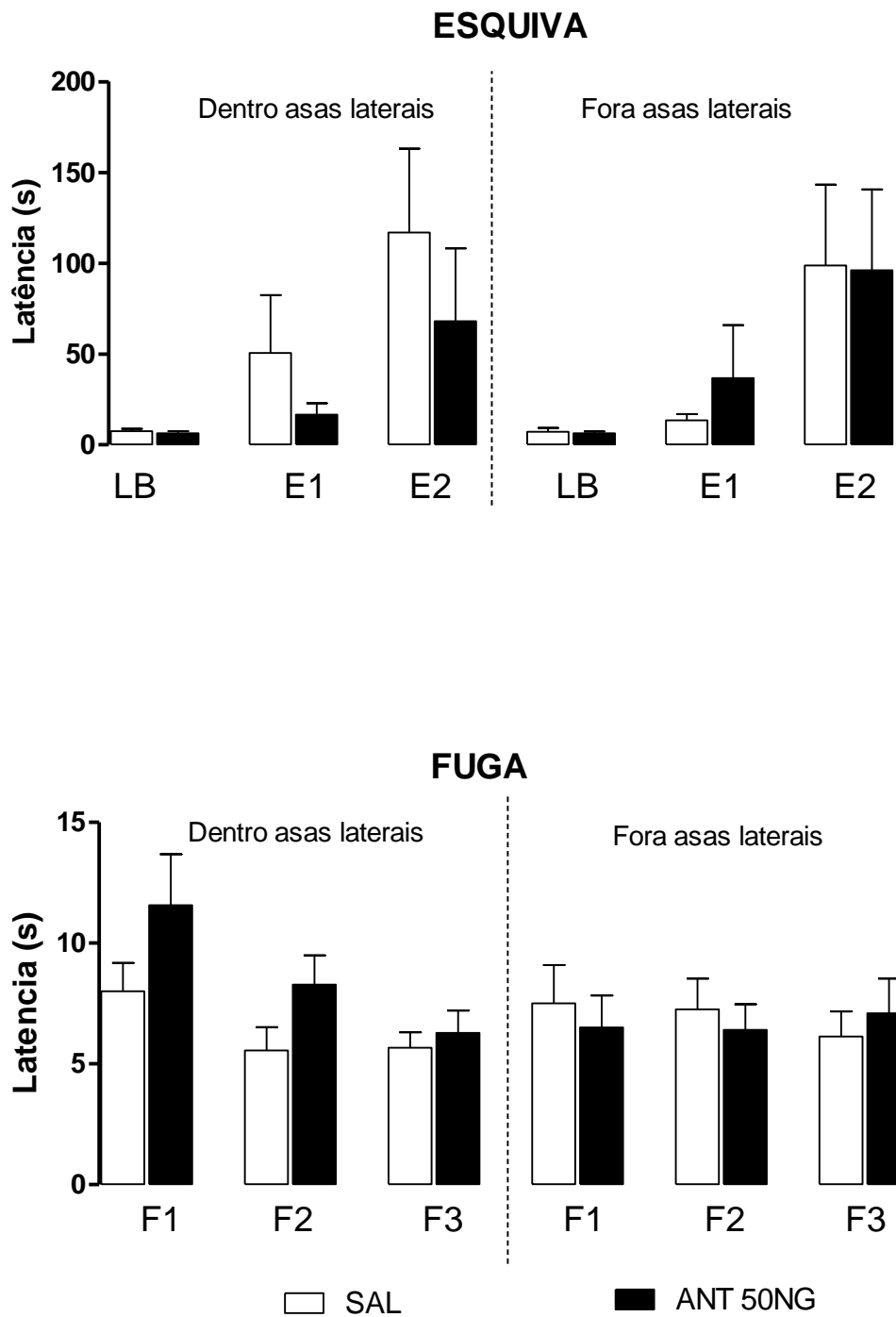
##### Efeito da administração na asa lateral direita de 50 ng de antalarmina

A figura 7 abaixo (painel à esquerda) mostra o efeito da administração intra-asa lateral direita de antalarmina na dose de 50 ng.

A ANOVA de medidas repetidas mostrou que houve aquisição da resposta de esquiva inibitória [ $F(2,28)=4,107$ ,  $p<0,05$ ], porém não ocorreu efeito da interação tentativa x tratamento [ $F(2,28)=0,317$ , NS] e nem do fator tratamento [ $F(1,14)=1,430$ , NS].

Já na tarefa de fuga, a ANOVA de medidas repetidas indicou que há fator tentativa [ $F(2,28)=9,678$ ,  $p<0,05$ ], porém não há interação tentativa x tratamento [ $F(2,28)=1,422$ , NS] e nem fator tratamento [ $F(1,14)=2,919$ , NS].

A figura 7 (painel à direita) também mostra que a injeção de antalarmina fora da asa lateral direita do núcleo dorsal da rafe não causa efeito significativo sobre a resposta de esquiva inibitória ou fuga no LTE.



**Figura 7.** Efeito (média  $\pm$  EPM) da microinjeção de antalarmina (ANT) 50ng dentro (n=7-9) ou fora da asa lateral direita (n=8-10) sobre a latência de saída do braço aberto (esquiva inibitória) e do braço fechado (fuga) de animais submetidos ao LTE.. LB=linha de base; E=esquiva; F=fuga.

#### 4.5. Experimento 4

##### **Efeito da antalarmina sobre a diminuição da latência de fuga causada pelo CRF.**

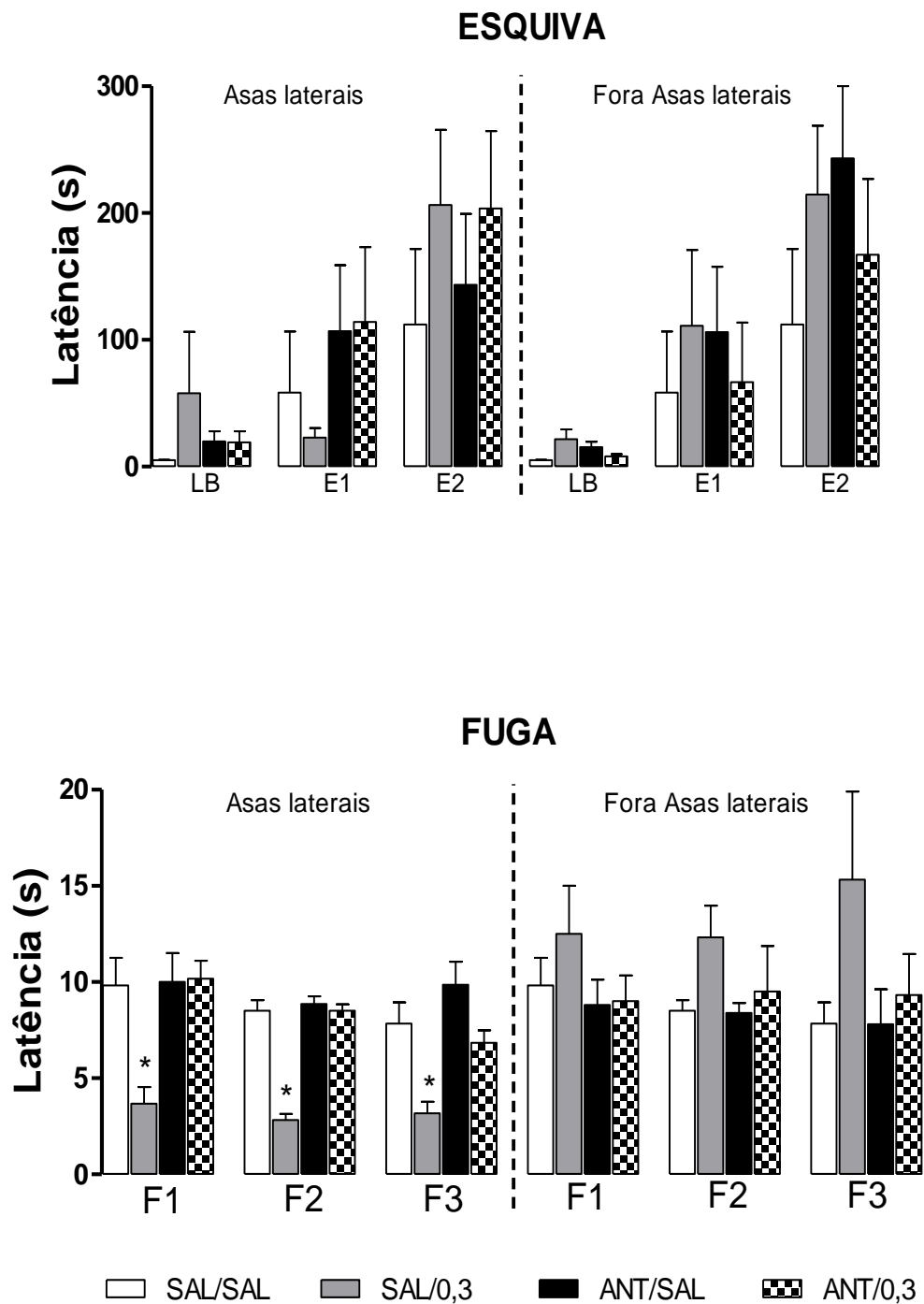
A figura 8 (painel à esquerda) ilustra o efeito da administração prévia da antalarmina à injeção de CRF na dose de 0,3 ng na asa lateral direita do NDR.

Na tarefa de esquiva, a ANOVA de medidas repetidas mostrou que houve aquisição da resposta de esquiva inibitória [fator tentativa-  $F(2,42)=15,208$ ,  $p<0,05$ ], porém não há efeito no fator pré-tratamento [ $F(1,21)=0,485$ , NS], tratamento [ $F(1,21)=0,400$ , NS] nem interação pré-tratamento x tratamento [ $F(1,21)=0,046$ , NS].

Já na tarefa de fuga, não há efeito no fator tentativa [ $F(2,42)=3,427$ , NS], porém há efeito significativo no fator pré-tratamento [ $F(1,21)=23,628$ ,  $p<0,05$ ], no fator tratamento [ $F(1,21)=27,181$ ,  $p<0,05$ ] e também efeito significativo na interação pré-tratamento x tratamento [ $F(1,21)=12,344$ ,  $p<0,05$ ].

O teste post hoc de Duncan mostrou que a antalarmina bloqueio o efeito do tipo panicogênico causado pela administração de de 0,3 ng de CRF na asa lateral direita.

Adicionalmente, a figura 8 (painel à direita) mostra também quando as drogas foram injetadas fora da asa lateral direita, não se observa alterações na duas tarefas comportamentais medidas no LTE.



**Figura 8.** Efeito (média  $\pm$  EPM) do tratamento prévio com a antalarmina (50ng) à microinjeção de CRF 0,3 ng dentro (n=6-7) e fora da asa lateral direita (n=6-7) sobre a latência de saída do braço aberto (esquiva inibitória) e do braço fechado (fuga) de animais submetidos ao LTE. ANT= antalarmina; SAL = salina, LB=linha de base; E=esquiva; F=fuga.

## Efeito dos tratamentos sobre atividade locomotora

Como demonstrado na tabela 1, nenhum dos tratamentos foi capaz de alterar atividade locomotora dos animais durante os 5 minutos na arena circular.

**Tabela 1:** Distância (Média  $\pm$  E.P.M) percorrida por ratos durante período de 5 minutos no teste do campo aberto.

Tratamento (dose ng)	Distância (m)
<b><i>Experimento 1</i></b>	
Salina	1,59 $\pm$ 0,14
CRF (10)	2,10 $\pm$ 0,35
CRF (100 )ng	1,83 $\pm$ 0,45
<b><i>Experimento 2</i></b>	
Salina	1,68 $\pm$ 0,22
CRF (10)	2,02 $\pm$ 0,25
CRF (100)	2,11 $\pm$ 0,33
<b><i>Experimento 3</i></b>	
Salina	2,47 $\pm$ 0,37
antalarmina (50)	2,89 $\pm$ 0,53
<b><i>Experimento 4</i></b>	
Salina/Salina	2,88 $\pm$ 1,33
Salina/CRF	1,46 $\pm$ 0,28
antalarmina/salina	2,02 $\pm$ 0,22
antalarmina/CRF	1,78 $\pm$ 0,24



## *DISCUSSÃO*

---

---

---

---

## 5. DISCUSSÃO

No presente trabalho investigamos os efeitos promovidos pela infusão de CRF nas asas laterais do NDR sobre expressão dos comportamentos defensivos evocados pela exposição ao LTE.

Os dados obtidos mostraram que a injeção local de CRF promoveu um efeito bifásico dose-dependente. Mais precisamente, a maior dose testada (100 ng) prejudicou a expressão do comportamento de fuga, sem alterar a aquisição da resposta de esquiva inibitória, resultado preditivo de efeito panicolítico. Por outro lado, a infusão de uma dose menor de CRF (0,3 ng) promoveu o efeito oposto, ou seja, facilitou a expressão da fuga, também sem alterar a expressão da esquiva, sugerindo um efeito do tipo panicogênico. Além disto, observamos também que a administração prévia nas asas laterais do antagonista de receptores CRF1, a antalarmina, bloqueou o efeito panicogênico promovido pela infusão de CRF (0,3 ng), indicando assim que este efeito é decorrente da ativação dos receptores CRF do tipo 1.

Vale ressaltar que os efeitos observados após a infusão de CRF nas asas laterais parecem ser decorrentes de sua ação específica nesta região, uma vez que os mesmos não foram observados após a administração em áreas circunvizinhas a este subnúcleo. Além disto, os efeitos não parecem ser decorrentes de uma interferência inespecífica das drogas usadas na atividade locomotora dos animais, uma vez que nenhum dos tratamentos alterou a distância percorrida pelos animais no teste da arena circular, realizado imediatamente após o teste do LTE.

É digno de nota que neste estudo, dada a dificuldade de acertos histológicos

na área investigada, optamos por realizar injeções unilaterais (hemisfério direito) nas asas laterais. No entanto, evidências prévias na literatura indicam que a administração unilateral de drogas nesta estrutura é suficiente para alterar as respostas defensivas dos animais. Por exemplo, Spiacci e colaboradores (2016) mostraram que a infusão de ácido caínico nas asas laterais, tanto unilateral como bilateralmente, evoca a resposta fuga nos animais submetidos ao teste de campo aberto. No mesmo trabalho, os pesquisadores mostram que a administração unilateral (hemisfério direito) de 8-OH-DPAT ou WAY-100635, agonista e antagonista de receptores 5-HT<sub>1A</sub>, respectivamente, nas asas laterais alterou, de maneira oposta e seletiva a resposta de fuga no LTE (ver mais detalhes sobre estes resultados abaixo).

O efeito bifásico por nós observado após a infusão de CRF nas asas laterais do NDR estão em acordo com achados da literatura obtidos através de abordagens eletrofisiológicas (KIRBY; RICE; VALENTINO, 2000), comportamentais (HAMMACK, et al., 2002; 2003) e de microdiálise (PRICE, et al., 1998; PRICE; LUCKI, 2001) do NDR. Nestes estudos, no entanto, não se levava em consideração a existência das diferentes sub-regiões do NDR.

Mais especificamente, na abordagem eletrofisiológica, foi feito o registro da atividade de disparo de neurônio serotonérgico quando administrado CRF intra-NDR. Este trabalho pode avaliar a diferença observada na resposta quando diferentes doses foram infundidas, ficando claro que a resposta observada era dependente da dose, uma vez que o disparo serotonérgico sofreu uma inibição na menor dose e uma excitação nas maiores doses (KIRBY; RICE; VALENTINO, 2000). Ainda neste sentido, porém agora pela técnica microdiálise, o mesmo efeito

dual foi demonstrado. Foi feita a administração de CRF tanto i.c.v quanto intra-NDR e dosado a concentração de serotonina em áreas de projeção, como septo lateral. O resultado indica também o efeito bifásico de doses diferentes, altas e baixas, no controle da liberação de serotonina do NDR para áreas de projeção. Por fim, a nível comportamental, através do teste do choque inescapável, Hammack e colaboradores (2002; 2003), mostraram que a ativação dos receptores CRF1 e CRF2, através da administração de doses diferentes, teriam efeito oposto. Enquanto a ativação do receptor CRF2 estaria envolvida na excitação de neurônios serotoninérgicos e com isso na diminuição da latência de fuga, a ativação do receptor CRF1 antes ao teste este efeito não é observado, sendo justificado pela inibição da liberação de neurônios serotoninérgicos (HAMMACK, et al., 2002, 2003).

Embora nossos resultados sejam limitados para a compreensão deste efeito bifásico, é possível especular que este resulte da ação diferencial do CRF sobre os receptores CRF1 e CRF2 localizados em diferentes populações neuronais da asa lateral do NDR.

O principal achado do presente trabalho é que a menor dose de CRF testada (0,3 ng) na asa lateral do NDR promoveu efeito do tipo panicogênico dependente da ativação de receptores CRF1, sem alterar a resposta de esquia inibitória. Este resultado corrobora a proposta de Roche e colaboradores (2003), sugerindo que a ativação de receptores CRF1 das asas laterais do NDR diminuiria indiretamente a atividade de neurônios serotoninérgicos facilitando, conseqüentemente, expressão do comportamento de fuga. Mais precisamente, quando ratos são colocados em um tanque com água, situação que evoca a expressão de comportamentos ativos de defesa semelhantes à fuga, aumenta-se a expressão da proteína FOS em

neurônios GABAérgicos, predominantemente nas asas laterais do NDR, os quais foram colocalizados com receptores CRF1. Além disto, a administração sistêmica de antalarmina, antes da sessão de nado forçado, previne o aumento da expressão da proteína Fos nestes neurônios GABAérgicos (ROCHE, et al., 2003).

De fato, estudos *in vivo* mostraram que a infusão no NDR de baixas doses de CRF (nesta mesma faixa de dose empregada por nós; 0.3 ng), além de inibirem a taxa de disparo de neurônios serotonérgicos (KIRBY; RICE; VALENTINO, 2000), reduzem também os níveis extracelulares de serotonina em regiões de projeção do NDR, como por exemplo o septo lateral (PRICE, et al., 1998; LOWRY, et al., 2000), como mencionado acima. Vale ressaltar também que nosso grupo de pesquisa demonstrou recentemente que a infusão nas asas laterais do NDR do agonista de receptores 5-HT<sub>1A</sub>, o 8-OH-DPAT, facilitou a expressão do comportamento de fuga no LTE (SPIACCI, et al., 2016), assim como o observado com a menor dose de CRF. Evidências apontam que a ativação de receptores 5-HT<sub>1A</sub> no NDR promove a redução nos disparos de neurônios serotonérgicos e reduzem conseqüentemente a liberação de serotonina em áreas de projeção (HAJÓS; HAJÓS-KORCSOK; SHARP, 1999; HJORTH; SHARP, 1991).

Por sua vez, é possível que o efeito panicolítico observado após a administração de CRF (100 ng) resulte da ação estimulatória dos receptores CRF<sub>2</sub> diretamente em neurônios serotonérgicos que se projetam para a SCPD. De fato, tem sido postulado que fibras serotonérgicas oriundas das asas laterais do NDR dão origem ao trato periventricular, o qual, segundo a proposta de Deakin e Graeff (1991) se projeta para a SCPD, onde desempenha um papel inibitório sobre a expressão do comportamento de fuga (para revisão ver PAUL, et al., 2014). Vale

ressaltar que na porção média do NDR, região em que estão as asas laterais, os receptores CRF2 estão colocalizados exclusivamente em neurônios serotoninérgicos (DAY, et al., 2004). Estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que a ativação dos receptores CRF2 do NDR, pela infusão local tanto do agonista preferencial urocortina 2, quanto por doses elevadas de CRF (nesta mesma faixa de dose empregada por nós), além de aumentarem a taxa de disparo de neurônios serotoninérgicos (KIRBY; RICE; VALENTINO, 2000; LOWRY, et al., 2000; PERNAR, et al., 2004), também promovem o aumento nos níveis extracelulares de serotonina em regiões de projeção do NDR, como por exemplo o septo lateral (PRICE, et al., 1998). Curiosamente, o nosso grupo de pesquisa demonstrou recentemente que a infusão nas asas laterais do NDR do antagonista de receptores 5-HT1A, o WAY-100635, prejudicou a expressão do comportamento de fuga no LTE (SPIACCI, et al., 2016), assim como o observado com a maior dose de CRF no presente estudo. O efeito panicolítico observado após a facilitação da neurotransmissão serotoninérgica nas asas laterais foi bloqueado pela administração prévia do antagonista de receptores 5-HT1A, WAY-10635, na SCPD. (MATTHIESEN E ZANGROSSI, dados não publicados).

Em suma, os resultados apresentados sugerem que a ativação de receptores CRF1 nas asas laterais do NDR, promovida por baixas doses de CRF, facilita a expressão da resposta de fuga evocada no LTE. Já em altas doses o CRF promove o efeito oposto. Embora novos experimentos sejam necessários, acredita-se que este último seja resultante da ativação de receptores CRF2.

## *CONCLUSÃO*

---

---

---

---

---

## **6. CONCLUSÃO**

Nossos resultados sugerem que a diminuição da latência de fuga quando administrado a dose de 0,3 ng na asa lateral é devida a ativação do receptor CRF1, uma vez que a resposta foi bloqueada pela administração prévia da antalarmina. Com base em resultados prévios da literatura, sugerimos que o efeito panicolítico da dose de 100 ng resulte da ligação do CRF com o receptor CRF2.



## *REFERÊNCIAS*

---

---

---

---

## 7. REFERÊNCIAS

- ABRAMS, J. K. et al. Anatomic and Functional Topography of the Dorsal Raphe Nucleus. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1018, n. 1, p. 46–57, 2004.
- ABRAMS, J. K., JOHNSON, P. L., HAY-SCHMIDT, A., MIKKELSEN, J. D., SHEKHAR, A., LOWRY, C. A. Serotonergic systems associated with arousal and vigilance behaviors following administration of anxiogenic drugs. **Neuroscience**, v. 133, n. 4, p. 983-997, 2005.
- ADAMS, D. B. Brain mechanisms for offense, defense, and submission. **Behavioral and Brain Sciences**, v. 2, n. 2, p. 201–213, 1979.
- ADAMS, D. B. Brain mechanisms of aggressive behavior: an updated review. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 30, n. 3, p. 304–18, 2006.
- AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-V**. 5ª Ed. Washington: APA, 2013.
- AZMITIA, E. C.; SEGAL, M. An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. **The Journal of comparative neurology**, v. 179, n. 3, p. 641–667, 1978.
- BALDWIN, D. S. et al. Evidence-based guidelines for the pharmacological treatment of anxiety disorders: recommendations from the British Association for Psychopharmacology. **Journal of Psychopharmacology**, v. 19, n. 6, p. 567–596, 2005.
- BARLOW, D. H. **Anxiety and its disorders**. New York: The Guilford Press, 1988.
- BITTENCOURT, J. C.; SAWCHENKO, P. E. Do centrally administered neuropeptides access cognate receptors?: an analysis in the central corticotropin-releasing factor system. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 20, n. 3, p. 1142–56, 2000.
- BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. **Annual review of psychology**, v. 39, n. 1, p. 43-68, 1988.
- BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Defensive behaviors, fear, and anxiety. In: BLANCHARD, R. J. et al. **Handbook of anxiety**. Elsevier Science Publishers, 2008.
- BLANCHARD, D. C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R. J. Conditioning and residual emotionality effects of predator stimuli: some reflections on stress and emotion. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 27, n. 8, p. 1177–1185, 2003.
- BLANCHARD, R. J. et al. Differentiation of anxiolytic and panicolytic drugs by effects on rat and mouse defense test batteries. **Neuroscience and Biobehavioral**

**Reviews**, v. 21, n. 6, p. 783-789, 1997.

BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system. **Journal of Comparative Psychology**, v. 103, n. 1, p. 70–82, 1989.

BOUWKNECHT, J. A. et al. Differential effects of exposure to low-light or high-light open-field on anxiety-related behaviors: Relationship to c-Fos expression in serotonergic and non-serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. **Brain Research Bulletin**, v. 72, n. 1, p. 32–43, 2007.

BRANDÃO, M. L. **Psicofisiologia: as bases fisiológicas do comportamento**. 2a Ed., São Paulo: Atheneu, 2001.

CALIZO, L. H. et al. Raphe serotonin neurons are not homogenous: Electrophysiological, morphological and neurochemical evidence. **Neuropharmacology**, v. 61, n. 3, p. 524–543, 2011.

CARRASCO, G. A.; VAN DE KAR, L. D. Neuroendocrine pharmacology of stress. **European journal of pharmacology**, v. 463, n. 1–3, p. 235–72, 2003.

DAY, H. E. et al. Differential expression of 5HT-1A, alpha 1b adrenergic, CRF-R1, and CRF-R2 receptor mRNA in serotonergic, gamma-aminobutyric acidergic, and catecholaminergic cells of the rat dorsal raphe nucleus. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 424, n. 3, p. 364-378, 2004.

DE SOUZA, E. B. Corticotropin-releasing factor receptors: Physiology, pharmacology, biochemistry and role in central nervous system and immune disorders. **Psychoneuroendocrinology**, v. 20, n. 8, p. 789–819, 1995.

DEAKIN, J. W. F., GRAEFF, F. G. 5-HT and mechanisms of defense. **Journal of Psychopharmacology**, v. 5, p. 305-315, 1991.

DRAGUNOW, M.; FAULL, R. The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 29, n. 3, p. 261–265, 1989.

DUNN, A. J.; BERRIDGE, C. W. Physiological and behavioral responses to corticotropin-releasing factor administration: is CRF a mediator of anxiety or stress responses? **Brain research. Brain research reviews**, v. 15, n. 2, p. 71–100, 1990.

FORSTER, G. L. et al. Corticotropin-releasing factor in the dorsal raphe elicits temporally distinct serotonergic responses in the limbic system in relation to fear behavior. **Neuroscience**, v.141, n. 2, p. 1047-1055, 2006.

GELLER, I.; BLUM, K. The effects of 5-HTP on para-chlorophenylalanine (p-CPA) attenuation of “conflict” behavior. **European Journal of Pharmacology**, v. 9, n. 3, p. 319–324, 1970.

GRAEFF, F. G. Minor tranquilizers and brain defense systems. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 14, n.4, p. 239-265, 1981.

GRAEFF, F. G. Brain defense systems and anxiety. In: Burrows, G. D., Roth, M., Noyes, R. **Handbook of anxiety: The neurobiology of anxiety**. 1aEd., Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1990.

GRAEFF, F. G. Role of 5-HT in defensive behavior and anxiety. **Reviews in the neurosciences**, v. 4, n. 2, p. 181–211, 1993.

GRAEFF, F. G. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 27, n. 4, p. 811–829, 1994.

GRAEFF, F. G. et al. Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 54, n. 1, p. 129-141, 1996.

GRAEFF, F. G. Ansiedade. In: GRAEFF, F. G., BRANDÃO, M. L. **Neurobiologia das doenças mentais**. 5a Ed., São Paulo: Lemos, 1999.

GRAEFF, F. G. On serotonin and experimental anxiety. **Psychopharmacology**, v. 163, n. 3–4, p. 467–476, 2002.

GRAEFF, F. G. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 28, n. 3, p. 239–259, 2004.

GRAEFF, F. G. Anxiety. In: GRAEFF, F. G., BRANDÃO, M. L. **Neurobiology of Mental Disorders**. New York: Nova Science Publishers, 2006, p. 25-56.

GRAEFF, F. G., GUIMARÃES, F. S., DE ANDRADE, T. G., DEAKIN, J. F. Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 54, n. 1, p. 129-141, 1996.

GRAEFF, F. G.; NETTO, C. F.; ZANGROSSI, H. The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 23, n. 2, p. 237–46, 1998.

GRAEFF, F. G.; SCHOENFELD, R. I. Tryptaminergic mechanisms in punished and nonpunished behavior. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 173, n. 2, p. 277–83, 1970.

GRAEFF, F. G.; VIANA, M. B.; MORA, P. O. Opposed regulation by dorsal raphe nucleus 5-HT pathways of two types of fear in the elevated T-maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 53, n. 1, p. 171–177, 1996.

GRAEFF, F. G.; VIANA, M. B.; MORA, P. O. Dual role of 5-HT in defense and anxiety. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 21, n. 6, p. 791-799, 1997.

GRAEFF, F. G.; VIANA, M. B.; TOMAZ, C. The elevated T maze, a new experimental model of anxiety and memory: Effect of diazepam. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 26, n. 1, p. 67–70, 1993.

GRAEFF, F. G., ZANGROSSI, JR. H. Animal models of anxiety disorders. In: D'HAENEN H, DEN BOER JA, WILLNER P. **Biological Psychiatry**. John Wiley Sons: Londres, pp 879-893, 2002.

GRAEFF, F. G.; ZANGROSSI, H. The dual role of serotonin in defense and the mode of action of antidepressants on generalized anxiety and panic disorders. **Central nervous system agents in medicinal chemistry**, v. 10, n. 3, p. 207–17, 2010.

GRIEBEL, G. 5-Hydroxytryptamine-interacting drugs in animal models of anxiety disorders: more than 30 years of research. **Pharmacology & therapeutics**, v. 65, n. 3, p. 319–395, 1995.

GRIEZ, E. J. L.; LOUSBERG, H.; VAN DEN HOUT, M. A. CO<sub>2</sub> vulnerability in panic disorder. **Psychiatry Research**, v. 20, n. 2, p. 87–95, 1987.

GUIMARÃES, F. S., ZUARDI, A. W., HETEM L. A. B. Ansiedade Experimental Humana. In: HETEM, L. A., GRAEFF, F. G. **Transtornos de Ansiedade**. 1aEd., São Paulo: Atheneu, 2004.

GUILLEMIN, R., SAKIZ, E., WARD, D. N. Purification of the hypothalamic factor (TRF) stimulation of the thyrotropic pituitary hormone (TSH) by the counter-current distribution method. **C R Hebd Sances Acad Sci**, v. 29, n. 258, p. 6567-6568, 1964.

HAJÓS, M.; HAJÓS-KORCSOK, R.; SHARP, T. Role of the medial prefrontal cortex in 5-HT<sub>1A</sub> receptor-induced inhibition of 5-HT neuronal activity in the rat. **British Journal of Pharmacology**, v. 126, n. 8, p. 1741-1750, 1999.

HALE, M. W.; SHEKHAR, A.; LOWRY, C. A. Stress-related Serotonergic Systems: Implications for Symptomatology of Anxiety and Affective Disorders. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 32, n. 5, p. 695–708, 2012.

HAMMACK, S. E. et al. The role of corticotropin-releasing hormone in the dorsal raphe nucleus in mediating the behavioral consequences of uncontrollable stress. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 3, p. 1020-1026, 2002.

HAMMACK, S. E. et al. Low doses of corticotropin-releasing hormone injected into the dorsal raphe nucleus block the behavioral consequences of uncontrollable stress. **Behavioural Brain Research**, v. 147, n. 1-2, p. 55-64, 2003.

HJORTH, S.; SHARP, T. Effect of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist 8-OH-DPAT on the release of 5-HT in dorsal and median raphe-innervated rat brain regions as measured by in vivo microdialysis. **Life Science**, v. 48, n. 18, p. 1779-1786, 1991.

HODGES, H.; GREEN, S.; GLENN, B. Evidence that the amygdala is involved in benzodiazepine and serotonergic effects on punished responding but not on discrimination. **Psychopharmacology**, v. 92, n. 4, p. 491–504, 1987.

IMAI, H., STEINDLER, D. A., KITAI, S. T. The organization of divergent axonal projections from the midbrain raphe nuclei in the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 243, n. 3, p. 363-380, 1986.

JOHNSON, P. L. et al. Acute hypercarbic gas exposure reveals functionally distinct subpopulations of serotonergic neurons in rats. **Journal of Psychopharmacology**, v. 19, n. 4, p. 327–341, 2005.

KALIN, N. H.; TAKAHASHI, L. K.; CHEN, F. L. Restraint stress increases corticotropin-releasing hormone mRNA content in the amygdala and paraventricular nucleus. **Brain Research**, v. 656, n. 1, p. 182–186, 1994.

KIRBY, L.; RICE, K. C.; VALENTINO, R. J. Effects of Corticotropin-Releasing Factor on Neuronal Activity in the Serotonergic Dorsal Raphe Nucleus. **Neuropsychopharmacology**, v. 22, n. 2, p. 148–162, 2000.

KISER, R.; LEOVITZ, R. M. Monoaminergic mechanisms in aversive brain stimulation. **Physiology and Behavior**, v. 15, n. 1, p. 47–53, 1975.

KLEIN, D. F. Anxiety reconceptualized. Gleaning from pharmacological dissection--early experience with imipramine and anxiety. **Modern problems of pharmacopsychiatry**, v. 22, p. 1–35, 1987.

KOROSI, A. et al. Chronic ether stress-induced response of urocortin 1 neurons in the Edinger-Westphal nucleus in the mouse. **Brain Research**, v. 1046, n. 1–2, p. 172–179, 2005.

KOROSI, A. et al. Corticotropin-releasing factor, urocortin 1, and their receptors in the mouse spinal cord. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 502, n. 6, p. 973–989, 2007.

LEWIS, K. et al. Identification of urocortin III, an additional member of the corticotropin-releasing factor (CRF) family with high affinity for the CRF2 receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 13, p. 7570–7575, 2001.

LÓPEZ-MUÑOZ, F.; ALAMO, C. Monoaminergic neurotransmission: the history of the discovery of antidepressants from 1950s until today. **Current pharmaceutical design**, v. 15, n. 14, p. 1563–86, 2009.

LOWRY, C. A. et al. Corticotropin-releasing factor increases in vitro firing rates of serotonergic neurons in the rat dorsal raphe nucleus: evidence for activation of a topographically organized mesolimbocortical serotonergic system. **The Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 20, p. 7728–7736, 2000.

MAKINO, S. et al. Psychological stress increased corticotropin-releasing hormone mRNA and content in the central nucleus of the amygdala but not in the hypothalamic paraventricular nucleus in the rat. **Brain Research**, v. 850, n. 1–2, p. 136–143, 1999.

MICHELSSEN, K. A.; SCHMITZ, C.; STEINBUSCH, H. W. M. The dorsal raphe nucleus—From silver stainings to a role in depression. **Brain Research Reviews**, v. 55, n. 2, p. 329–342, 2007.

PAUL, E. D. et al. The Deakin/Graeff hypothesis: focus on serotonergic inhibition of panic. **Neuroscience and Biobehavioral Review**, v. 46, n. 3, p. 379-396, 2014.

PANKSEPP, J. Toward a general psychobiological theory of emotions. **Behavioral and Brain Sciences**, v. 5, n. 3, p. 407-422, 1982.

PAXINOS, G., WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. (6 ed). Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2007.

PERNAR, L. et al. Selective activation of corticotropin-releasing factor-2 receptors on neurochemically identified neurons in the rat dorsal raphe nucleus reveals dual actions. **The Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 6, p. 1305-1311, 2004.

PERRIN, M. H.; VALE, W. W. Corticotropin releasing factor receptors and their ligand family. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 885, p. 312–28, 1999.

PETERSEN, E. N., SCHEEL-KRÜGER, J. Anticonflict effect of 5-HT antagonists by intra amygdaloid injection. In: **14 The International College of Neuropsychopharmacology**. (pp.399). Florence: Italy, 1984.

PINHEIRO, S. N. et al. Anxiolytic and panicolytic effects of escitalopram in the elevated T-maze. **Journal of psychopharmacology (Oxford, England)**, v. 22, n. 2, p. 132–7, 2008.

POBBE, R. L. H.; ZANGROSSI, H. 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptors in the rat dorsal periaqueductal gray mediate the antipanic-like effect induced by the stimulation of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. **Psychopharmacology**, v. 183, n. 3, p. 314–321, 2005.

PRICE, M. L.; LUCKI, L. Regulation of serotonin release in the lateral septum and striatum by corticotropin-releasing factor. **The Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 8, p. 2833-2841, 2001.

PRICE, B.A., M. et al. Effects of Corticotropin-Releasing Factor on Brain Serotonergic Activity. **Neuropsychopharmacology**, v. 18, n. 6, p. 492–502, 1998.

REFOJO, D. et al. Glutamatergic and Dopaminergic Neurons Mediate Anxiogenic and Anxiolytic Effects of CRHR1. **Science**, v. 333, n. 6051, p. 1903–1907, 2011.

REYES, T. M. et al. Urocortin II: a member of the corticotropin-releasing factor (CRF) neuropeptide family that is selectively bound by type 2 CRF receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 5, p. 2843–2848, 2001.

ROBICHAUD, R. C.; SLEDGE, K. L. The effects of p-chlorophenylalanine on experimentally induced conflict in the rat. **Life Sciences**, v. 1;8, n. 17, p. 965–9, 1969.

ROCHE, M., COMMONS, K. G., PEOPLES, A., VALENTINO, R. J. Circuitry

underlying regulation of the serotonergic system by swim stress. **The Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 3, p. 970-977, 2003.

SANFORD KISER, R.; LEOVITZ, R. M.; GERMAN, D. C. Anatomic and pharmacologic differences between two types of aversive midbrain stimulation. **Brain Research**, v. 155, n. 2, p. 331–342, 1978.

SCHENBERG, L. C. Towards a translational model of panic attack. **Psychology & Neuroscience**, v. 3, n. 1, p. 9–37, 2010.

SCHENBERG, L. C.; GRAEFF, F. G. Role of the periaqueductal gray substance in the antianxiety action of benzodiazepines. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 9, n. 3, p. 287–295, 1978.

SCHÜTZ, M. T.; DE AGUIAR, J. C.; GRAEFF, F. G. Anti-aversive role of serotonin in the dorsal periaqueductal grey matter. **Psychopharmacology**, v. 85, n. 3, p. 340–345, 1985.

gui

SENA, L. M. et al. The dorsal raphe nucleus exerts opposed control on generalized anxiety and panic-related defensive responses in rats. **Behavioural brain research**, v. 142, n. 1–2, p. 125–33, 2003.

SHUHAMA, R. et al. Animal defense strategies and anxiety disorders. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 79, n. 1, p. 97–109, 2007.

SPIACCI, A.; COIMBRA, N. C.; ZANGROSSI, H. Differential involvement of dorsal raphe subnuclei in the regulation of anxiety- and panic-related defensive behaviors. **Neuroscience**, v. 227, p. 350–360, 2012.

SPIACCI, A. et al. 5-HT<sub>1A</sub> receptors of the rat dorsal raphe lateral wings and dorsomedial subnuclei differentially control anxiety- and panic-related defensive responses. **Neuropharmacology**, v. 107, p. 471-479, 2016.

STEINBUSCH, H. W. Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals. **Neuroscience**, v. 6, n. 4, p. 557-618, 1981.

TEIXEIRA, R. C.; ZANGROSSI, H.; GRAEFF, F. G. Behavioral effects of acute and chronic imipramine in the elevated T-maze model of anxiety. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 65, n. 4, p. 571–6, 2000.

VALE, W. et al. Chemical and biological characterization of corticotropin releasing factor. **Recent progress in hormone research**, v. 39, p. 245–70, 1983.

VALENTINO, R. J.; LIOUTERMAN, L.; VAN BOCKSTAELE, E. J. Evidence for regional heterogeneity in corticotropin-releasing factor interactions in the dorsal raphe nucleus. **The Journal of comparative neurology**, v. 435, n. 4, p. 450–63, 2001.

VAN PETT, K. et al. Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and



pituitary of rat and mouse. **The Journal of comparative neurology**, v. 428, n. 2, p. 191–212, 2000.

VAUGHAN, J. et al. Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor. **Nature**, v. 378, n. 6554, p. 287–292, 1995.

VIANA, M. B.; TOMAZ, C.; GRAEFF, F. G. The elevated T-maze: A new animal model of anxiety and memory. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 49, n. 3, p. 549–554, 1994.

ZANGROSSI, H. et al. Serotonergic regulation of inhibitory avoidance and one-way escape in the rat elevated T-maze. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 25, n. 7–8, p. 637–45, 2001.

ZANGROSSI, H.; GRAEFF, F. G. Behavioral validation of the elevated T-maze, a new animal model of anxiety. **Brain research bulletin**, v. 44, n. 1, p. 1–5, 1997.

ZANGROSSI, H.; GRAEFF, F. G. Serotonin in anxiety and panic: Contributions of the elevated T-maze. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 46, p. 397–406, 2014.

ZANOVELI, J. M.; NOGUEIRA, R. L.; ZANGROSSI, H. Chronic imipramine treatment sensitizes 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptors in the dorsal periaqueductal gray matter: evidence from the elevated T-maze test of anxiety. **Behavioural pharmacology**, v. 16, n. 7, p. 543–52, 2005.