

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

**Avaliação de respostas defensivas associadas ao  
pânico em ratas: perfil da ativação serotoninérgica no  
núcleo dorsal da rafe e substância cinzenta  
periaquedutal**

MATHEUS FITIPALDI BATISTELA

Ribeirão Preto  
2023

MATHEUS FITIPALDI BATISTELA

**Avaliação de respostas defensivas associadas ao pânico em ratas: perfil da ativação serotoninérgica no núcleo dorsal da rafe e substância cinzenta periaquedutal**

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

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

Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Hélio Zangrossi Júnior

Ribeirão Preto  
2023

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.

Preparada para a Biblioteca Central do Campus Administrativo de Ribeirão Preto / USP

Batistela, Matheus Fitipaldi

Avaliação de respostas defensivas associadas ao pânico em ratas: perfil da ativação serotoninérgica no núcleo dorsal da rafe e substância cinzenta periaquedutal, 2023.

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

Orientador: Zangrossi Júnior, Hélio.

1. Transtorno do Pânico 2. Ciclo Estral 3. Hipóxia 4. Núcleo dorsal da rafe  
5. Substância cinzenta periaquedutal

# FOLHA DE APROVAÇÃO

**Matheus Fitipaldi Batistela**

Avaliação de respostas defensivas associadas ao pânico em ratas: perfil da ativação serotoninérgica no núcleo dorsal da rafe e substância cinzenta periaquedutal

Tese apresentada para a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do título de Doutor em Ciências

Aprovado em:

## **Banca Examinadora**

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

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

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

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

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

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

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

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

*Dedico este trabalho a duas mulheres importantes da minha vida, minha mãe Regina e minha irmã Giovana. Obrigado por toda a força e ressignificação que me deram ao longo desses anos. Eu não desisti! Amo vocês.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, ao universo, à energia, ao meu anjo da guarda. À todas as forças que não me deixaram desistir apesar dos difíceis percalços pelos quais passei.

Ao professor Dr. Hélio Zangrossi Júnior, pela orientação, paciência, troca de experiências, ensinamentos e incentivo, principalmente nessa última etapa tão difícil.

Aos membros da banca examinadora, muito obrigado pela disponibilidade e pela atenção e possibilidade de troca de experiências científicas.

Agradeço à Telma Andrade, minha primeira orientadora, por ter me incentivado nessa caminhada, por me trazer muitos ensinamentos, por me mostrar que a empatia e o carinho devem prevalecer, independentemente de qual a relação existente entre duas pessoas. Você segue me inspirando sempre, obrigado!

Agradeço aos meus colegas de laboratório Heloísa, Jhonatan, Jefferson, Bárbara, Cristian por toda a parceria e contribuição para a realização desse trabalho. Além deles, um agradecimento especial vai para Alana e Paloma, que além de colegas de trabalho, se tornaram irmãs e que nunca me desampararam nos momentos que precisei. Seja pelo cafezinho na Wal, seja pelas trocas de experiências científicas, pelas fofocas, pelos ombros nos choros desesperados, nas risadas sobre uma piada ou outra. A caminhada foi bem mais leve com vocês junto! Eu amo muito vocês!

Ao Afonso Padovan, nosso querido técnico de laboratório e amigo. Obrigado por ter me ajudado tanto nesse processo, seja por questões técnicas ou pelos conselhos e risadas que me proporcionou. Obrigado!

Agradeço à professora Dr<sup>a</sup> Thelma Lovick por contribuir tão ricamente com as suas experiências com fêmeas, um assunto que amo tanto. I would like to thank you for so much experience shared with me, professor Thelma!

Agradeço a agência de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro, sem o qual este trabalho não poderia ter sido realizado.

Aos meus pais, Sydney e Regina, que me deram a vida, lutaram e se esforçaram tanto pra eu estar aqui. Que me incentivaram a continuar, mesmo eu não querendo. Obrigado por todo carinho, paciência e amor que me deram ao longo desses tantos anos. Eu amo vocês.

A minha irmã Giovana, que me acompanhou por todos esses anos, que me deu dois grandes presentes, o Noach e a Manuella, que ressignificaram toda a minha ideia de amor e carinho.

A todas as outras pessoas da minha família que de alguma forma estiveram presentes, seja pessoalmente ou em pensamento, sempre torcendo por mim. Um agradecimento especial à minha sobrinha Isabela, que sempre foi e tem se mostrado uma companheira incrível. Muito obrigado!

A Dida, minha companheira de quatro patas que se foi esse ano, e que por muito tempo foi aquela que ouvia meus lamentos e sofrimentos. Você será pra sempre uma parte minha.

A Brita, que apesar de ter entrado de gaiato em casa, se tornou uma companheira fiel e carinhosa.

Aos meus colegas da Obreiros do Bem: Virginia, Roseli, Leide, Cris, Fátima, Naiani, Jildete, Pedro, Silvana, Paulinho, Roberto, Dani, entre outros que passaram. Vocês fazem os meus dias bem melhores e mais incríveis, cada um do seu jeitinho. Obrigado!

Aos meus educandos da turma cultivar da Obreiros do Bem, obrigado por vocês despertarem em mim um amor que tava bem escondidinho. Vocês foram a esperança que eu precisava ter, e me mostraram que a função da minha vida é ser um educador, um transformador de vidas. Amo vocês!

Ao meu amigo e companheiro Diego Bueno. Tenho tanta coisa pra escrever que em uma tese toda não caberia. Você me mostrou o amor das várias formas que eu buscava. Você me incentivou a continuar e a terminar essa tese, mesmo eu estando insuportavelmente chato com meu drama. Nossa história começou há pouco, mas você me mostrou muito. Obrigado por ser uma pessoa tão incrível e ser um exemplo de ser quem eu quero ser. Eu te amo!

Aos meus amigos de longa data que continuam vivos no meu pensamento: Lia, Bia Kroko, Bia Macu, Ugolavo, Mari, Andressa, Vitor, Adriana, entre tantos outros que não caberiam aqui, vocês fazem parte da minha história, da minha vida. Um agradecimento especial a Andressa e Vitor Dias pela honra e a alegria de ser padrinho de casamento.

A Alana e ao Vitor Berardi, que também tive a honra de ser padrinho de casamento, mas que sempre me ajudaram muito, especialmente quando me infectei com COVID e tive que ficar isolado na virada de ano, me ajudaram demais. Eu amo muito vocês.

Aos professores e colegas de departamento que tiveram uma contribuição gigantesca na minha carreira acadêmica.

A Gislaine P.M. Marques e Waldik Ramon pela atenção, disponibilidade e paciência. Um agradecimento especial à Gi, que sempre muito alegre nos recebia em sua sala e conseguia nos tranquilizar mesmo na loucura da vida pós-graduanda. Obrigado!

A Walkiria, nossa querida Wal, que todo dia estava nos recebendo com muita alegria quando íamos tomar café na cantina. Obrigado!

Por fim, esse agradecimento especial vai para o Matheus Fitipaldi Batistela. Você conseguiu, apesar de toda dificuldade, toda escuridão e tristeza dentro de você, você não desistiu! O mundo agora é seu, só depende de você. Voa, menino!



## RESUMO

Batistela, Matheus Fitipaldi. **Avaliação de respostas defensivas associadas ao pânico em ratas: perfil da ativação serotoninérgica no núcleo dorsal da rafe e substância cinzenta periaquedutal.** 2023. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

O transtorno do pânico (TP) é um transtorno de ansiedade crônico, muitas vezes incapacitante, cuja fisiopatologia não está totalmente elucidada. Sabe-se que as mulheres são mais susceptíveis ao TP do que os homens, e que essa vulnerabilidade é maior durante a fase pré-menstrual do ciclo, nos quais os níveis de progesterona e seu metabólito allopregnanolona (ALLO) caem abruptamente. Estudos na literatura mostram que o antidepressivo fluoxetina (FLX) na dose de 1,75 mg/kg é capaz de agir como um agente esteroideogênico, aumentando os níveis de ALLO. Já a finasterida é capaz de impedir a formação da ALLO, através da inibição da enzima 5 $\alpha$ -redutase. Neste trabalho verificamos o efeito do sexo e do ciclo estral, bem como da administração de FLX e finasterida, no comportamento de fuga, que é associado ao pânico, de ratas e ratos durante a exposição a um estímulo panicogênico, a hipóxia (7% de O<sub>2</sub>). Além disso, investigamos ainda as bases neurais subjacentes aos comportamentos expressos pelas fêmeas nesse modelo experimental, com foco em duas estruturas-chave para o TP, o núcleo dorsal da rafe (NDR) e a substância cinzenta periaquedutal (SCP). Isto foi feito pela análise imunistoquímica de neurônios que expressam a proteína c-Fos, um marcador indireto de ativação neuronal, e da enzima triptofano hidroxilase (TPH), marcador de neurônios serotoninérgicos. Os resultados mostraram que a exposição à hipóxia é capaz de gerar o comportamento de saltos, indicativo da resposta de fuga, em ambos os sexos, sendo maior nas fêmeas. Quando levamos em consideração o ciclo estral, vimos que no diestro, as ratas pulam mais em comparação ao proestro. O tratamento agudo com a FLX na dose de 1,75 mg/kg mas não com a de 10 mg/kg, foi capaz de atenuar o aumento de saltos que ocorre no diestro, o que não foi observado na maior dose. Os resultados imunistológicos mostraram que tanto em machos quanto em fêmeas há um aumento na ativação de neurônios não-serotoninérgicos nas asas laterais (alDR) do NDR, na coluna dorsomedial da

SCP (dmSCP) e, em menor porção, na coluna ventrolateral da SCP (vlSCP). Após a administração de FLX (1,75 mg/kg), há uma diminuição do número de neurônios ativados nessas áreas, o que não ocorre com a maior dose. Por fim, os resultados com a finasterida mostraram um aumento no número de saltos das ratas em proestro, porém não naquelas em diestro. No conjunto, nossos resultados indicam que, no modelo da hipóxia aguda, as fêmeas respondem mais a esse estímulo do que os machos, corroborando evidências que mostram que as mulheres são mais susceptíveis ao TP. Além disso, observamos que esse efeito é ciclo-dependente, sendo mais pronunciado na fase de diestro, similarmente ao que ocorre na tensão pré-menstrual em mulheres. Ademais, nossos dados sustentam a participação da ALLO na regulação do comportamento de fuga desses animais, uma vez que a administração aguda de FLX em dose baixa (como um agente promotor da síntese de ALLO) nas ratas em diestro é capaz de atenuar o comportamento de fuga, enquanto que a administração de finasterida (como um agente bloqueador da síntese de ALLO) na fase de proestro é capaz de aumentar a expressão dessa resposta comportamental. Os dados ainda sugerem que esta regulação se dê através de alterações nas neurotransmissões GABAérgica e glutamatérgica nas alDR e na dmSCP. Por fim, sugerimos que o emprego de FLX em baixas doses de merece atenção como estratégia para o tratamento do TP em mulheres.

**Palavras-chave:** transtorno do pânico, ciclo estral, fluoxetina, finasterida, núcleo dorsal da rafe, substância cinzenta periaquedutal.

## ABSTRACT

Batistela, Matheus Fitipaldi. **Evaluation of defensive responses associated with panic in female rats: profile of serotonergic activation in the dorsal raphe nuclei and periaqueductal gray matter.** 2023. PhD Thesis – School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Panic disorder (PD) is a disabling chronic anxiety disorder, whose pathophysiology is not fully understood. It is known that women are more susceptible to PD than men, and that this vulnerability is greater during the premenstrual phase of the cycle, when levels of progesterone and its metabolite allopregnanolone (ALLO) drop sharply. Studies in the literature show that the antidepressant fluoxetine (FLX) at lower doses acts as a steroidogenic agent, increasing ALLO levels. On the other hand, finasteride prevents the formation of ALLO, through the inhibition of the 5 $\alpha$ -reductase enzyme. In this work, we verified the effect of sex and estrous cycle, as well as the administration of FLX and finasteride, on escape behavior, which is associated with panic, in female rats during exposure to hypoxia challenge (7% O<sub>2</sub>), a panicogenic stimulus. In addition, we investigated the neural basis underlying the behaviors expressed during the respiratory challenge, focusing on two key structures for PD, the dorsal raphe nucleus (DRN) and the periaqueductal gray matter (PAG). This was done by the immunohistochemical analysis of neurons that express the c-Fos protein, an indirect marker of neuronal activation, and the enzyme tryptophan hydroxylase (TPH), a marker of serotonergic neurons. The results showed that exposure to hypoxia generated jumping behavior, indicative of escape response, in both sexes, being greater in females. When we take into account the estrous cycle, we observed that in diestrus, rats jumped more than in proestrus. Acute treatment with FLX at the dose of 1.75 mg/kg, but not 10 mg/kg, attenuated the increase in jumping that occurs in diestrus. In both males and females there is an increase in the activation of non-serotonergic neurons in the lateral wings (lwDR) of the DRN, the dorsomedial column of the PAG (dmPAG) and, to a lesser extent, in the ventrolateral column of the PAG (vlPAG). After administration of FLX (1.75 mg/kg), there was a decrease in the number of activated neurons in these areas,

which did not occur with the highest dose. Finally, the results with finasteride showed an increase in the number of jumps in female rats in proestrus, but not in those in diestrus. Taken together, our results indicate that in the acute hypoxia model females are more responsive than males, corroborating evidence showing that females are more susceptible to TP. Furthermore, we observed that this effect is cycle-dependent, being more pronounced in the diestrus phase. In addition, our data support the participation of ALLO in the regulation of escape behavior, since the acute administration of FLX in low dose (as an agent that promotes the synthesis of ALLO) in diestrus rats, attenuated escape behavior, whereas the administration of finasteride (as an ALLO synthesis blocking agent) in the proestrus phase increased the expression of this behavioral response. Our data also suggest that this regulation may happen through changes in GABAergic and glutamatergic neurotransmissions in aDR and dmSCP. Finally, we suggest that short-term treatment with low doses of FLX deserves attention as a potential therapeutic strategy for the management of PD in women.

**Keywords:** panic disorder, estrous cycle, fluoxetine, finasteride, dorsal raphe nucleus, periaqueductal gray matter.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**3 $\beta$ -HSD** – Enzima 3 $\beta$ -Hidroxi-Esteroide Desidrogenase

**3 $\alpha$ -HSD** – Enzima 3 $\alpha$ -Hidroxi-Esteroide Desidrogenase

**5-HT** – Serotonina

**$\Delta$ 9-THC** –  $\Delta$ 9-Tetrahydrocannabinol

**ALLO** – Alopregnanolona

**BIC** - Bicuculina

**BSA** – Albumina Sérica Bovina

**CBD** – Canabidiol

**CBR1** – Receptor Canabinoide do Tipo 1

**CBR2** – Receptor Canabinoide do Tipo 2

**CO<sub>2</sub>** – Gás Carbônico

**DAB** – Diaminobenzidina

**DI** – Diestro

**dISCP** – Coluna Dorsolateral da Substância Cinzenta Periaquedutal

**dmSCP** – Coluna Dorsomedial da Substância Cinzenta Periaquedutal

**DPP** – Depressão Pós-Parto

**dSCP** – Substância Cinzenta Periaquedutal Dorsal

**DRC** – Subnúcleo Caudal do Núcleo Dorsal da Rafe (*“Dorsal Raphe Caudal”*)

**DRD** – Subnúcleo Dorsal do Núcleo Dorsal da Rafe (*“Dorsal Raphe Dorsal”*)

**DRI** – Subnúcleo Interfascicular do Núcleo Dorsal da Rafe (*“Dorsal Raphe Interfascicular”*)

**DRV** – Subnúcleo Ventral do Núcleo Dorsal da Rafe (*“Dorsal Raphe Ventral”*)

**DSM-V** – Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais: 5ª Edição

**EST** – Estro

**FDA** – *Food and Drug Administration*

**FIN** - Finasterida

**FLX** – Fluoxetina

**FSH** – Hormônio Folículo Estimulante

**GABA** – Ácido Gama-Aminobutírico

**GABA-A** – Receptor do tipo A do Ácido Gama-Aminobutírico

**GnRH** – Hormônio Liberador de Gonadotrofinas

**HOX** – Grupo de Animais Submetidos à Hipóxia

**ISRS** – Inibidor Seletivo de Recaptação de Serotonina

**KCN** – Cianeto de Potássio

**LH** – Hormônio Luteinizante

**ISCP** – Coluna Lateral da Substância Cinzenta Periaquedutal

**LTE** – Labirinto em T Elevado

**aIDR** – Subnúcleo Lateral (Asas Laterais) do Núcleo Dorsal da Rafe

**MET** - Metaestro

**N<sub>2</sub>** – Gás Nitrogênio

**NDR** – Núcleo Dorsal da Rafe

**NOX** – Grupo de Animais Submetidos à Normóxia

**O<sub>2</sub>** – Gás Óxigênio

**OMS** – Organização Mundial da Saúde

**ON** – Óxido Nítrico

**P450<sub>scc</sub>** – Enzima Citocromo-P-450 de Clivagem de Cadeia Lateral

**SCP** – Substância Cinzenta Periaquedutal

**SCP<sub>d</sub>** – Substância Cinzenta Periaquedutal Dorsal

**PBS** – Solução Salina Tamponada com Fosfato

**PREG** – Pregnanolona

**PRO** – Proestro

**TCC** – Terapia Cognitivo-Comportamental

**TDPM** – Transtorno Disfórico Pré-Menstrual

**TP** – Transtorno do Pânico

**TPH** – Enzima Triptofano Hidroxilase

**TPM** – Tensão Pré-Menstrual

**TRP** – Triptofano

**vISCP** – Coluna Ventrolateral da Substância Cinzenta Periaquedutal

# SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	<b>19</b>
1.1 Transtorno do Pânico.....	19
1.2 Fisiopatologia da ansiedade e do TP.....	22
1.2.1 Comportamentos defensivos relacionados à ansiedade e ao TP.....	22
1.2.2 Substratos neurais envolvidos na fisiopatologia do TP.....	26
1.2.2.1 Substância cinzenta periaquedutal.....	27
1.2.2.2 Serotonina, núcleo dorsal da rafe e o TP.....	29
1.3 Diferenças Sexuais no TP.....	34
1.3.1 Questões sociais.....	34
1.3.2 Questões biológicas – ciclo menstrual.....	36
1.3.3 Ciclo estral em roedores.....	41
1.3.4 Diferenças sexuais e efeito do ciclo estral de ratas em testes comportamentais de ansiedade/pânico.....	42
<b>2. Objetivo geral</b> .....	<b>51</b>
2.1 Objetivos específicos.....	51
<b>3. Material e Métodos</b> .....	<b>53</b>
3.1 Animais.....	53
3.2 Esfregaço vaginal.....	53
3.3 Drogas.....	55
3.4 Aparato experimental.....	55
3.5 Protocolo experimental.....	56
3.6 Análise estatística.....	62
<b>4. Resultados</b> .....	<b>65</b>
4.1 <i>Experimento 1: Comparação do comportamento de ratos e de ratas, nas         diferentes fases do ciclo estral, após a exposição ao teste da hipóxia, e         análise do perfil de ativação neuronal através de imunistoquímica de dupla-         marcação para c-Fos e TPH no NDR e na SCP</i> .....	65
4.1.1 Análises comportamentais.....	65
4.1.2 Análises imunoistológicas.....	67
4.2 <i>Experimento 2: Análise do efeito da administração aguda e sistêmica de         FLX no comportamento e no padrão de ativação neural do NDR e da SCP         em ratas em diestro expostas à hipóxia</i> .....	73
4.2.1 Análises comportamentais.....	73
4.2.2 Análises imunoistológicas.....	75



4.3 Experimento 3: Efeitos da administração aguda e sistêmica de finasterida no comportamento de ratas no proestro e diestro submetidas à hipóxia .....	80
<b>5. Discussão .....</b>	<b>83</b>
<b>6. Conclusão .....</b>	<b>96</b>
<b>7. Referências bibliográficas .....</b>	<b>98</b>
<b>8. Anexos .....</b>	<b>130</b>
8.1 Artigo publicado na <i>Journal of Psychopharmacology</i> (Batistela et al., 2021) .....	130
8.2 Artigo publicado na <i>European Journal of Neuroscience</i> (Ferreira-Sgobbi et al., 2021) .....	143

# Introdução

---

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Transtorno do Pânico

A ansiedade é um estado emocional subjetivo caracterizado por alterações cognitivas, fisiológicas e comportamentais. Sabe-se que em níveis adequados, a ansiedade é normal e indispensável para a sobrevivência, garantindo nos indivíduos a motivação para realização de tarefas cotidianas e melhoramento do desempenho individual. Por outro lado, quando manifestada de forma exacerbada, em tempo e/ou intensidade, a ansiedade passa a ser patológica, prejudicando o desempenho do indivíduo e sua relação interpessoal (GRAEFF, 1999).

A Associação Americana de Psiquiatria, com o intuito de auxiliar na caracterização e diagnose, sistematiza os diversos tipos de ansiedade patológica, também chamados de transtornos de ansiedade, de acordo com a sintomatologia. Esses transtornos são descritos no Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, em sua quinta edição (DSM-V; AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013), nas seguintes categorias: transtorno de ansiedade de separação, mutismo seletivo, fobia social, agorafobia, transtorno de ansiedade generalizada, transtorno de ansiedade induzido por substâncias ou medicamentos, transtornos de ansiedade devido à condição médica, transtorno de ansiedade com outras especificações, transtorno de ansiedade não especificado e o transtorno do pânico (TP).

O TP, principal foco do presente trabalho, é uma patologia caracterizada pela ocorrência de ataques de pânico recorrentes e inesperados, que são causa de grande angústia e preocupação para o indivíduo. Esses ataques são descritos como episódios de medo intenso, que vem acompanhados de alterações autonômicas, respiratórias e cognitivas, como: a taquicardia, a sudorese, a falta de ar e o medo de morrer. Ao sofrer um ataque de pânico, o indivíduo pode desenvolver a agorafobia e outros comportamentos de evitação do local ou da situação que desencadeou o ataque (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

As atuais terapêuticas envolvidas no tratamento dos transtornos de ansiedade, incluindo o TP, envolvem duas grandes perspectivas: as terapias psicológicas e as terapias farmacológicas (BANDELOW; MICHAELIS, 2015). Entre as psicoterapias, a terapia cognitivo-comportamental (TCC) é o método mais estudado, no entanto, outras formas, como o relaxamento, a terapia psicodinâmica, a terapia interpessoal e a meditação de atenção plena têm sido investigados (BANDELOW; MICHAELIS, 2015). Já quanto a farmacoterapia, os principais medicamentos utilizados englobam os antidepressivos, principalmente os inibidores seletivos de recaptação de serotonina (ISRS), como a fluoxetina e o escitalopram, além dos benzodiazepínicos de alta potência, como alprazolam e o clonazepam (GRAEFF; ZANGROSSI, 2021) .

Ambas as terapias têm suas vantagens e suas limitações. Algumas diretrizes para o tratamento de transtornos de ansiedade avaliam a psicoterapia como equivalente ou mesmo superior à terapia medicamentosa (BANDELOW; MICHAELIS, 2015). Entretanto, estudos mostram que a maioria dos psicofármacos usados para transtornos de ansiedade tem efeitos maiores e ganhos em tempo mais curto do que as psicoterapias. É válido ressaltar que apesar de um resultado melhor e mais rápido, o uso de medicamentos para o tratamento desses transtornos podem causar dependência, no caso dos benzodiazepínicos, ou efeito de retirada, no caso dos ISRS (BANDELOW et al., 2008).

Em termos epidemiológicos, em 2019, a Organização Mundial da Saúde (OMS) notificou a prevalência dos transtornos de ansiedade em 301 milhões de pessoas ao redor do mundo, sendo o Brasil o país com o maior número de pessoas com esses transtornos, cerca de 9% da população brasileira (INSTITUTE OF HEALTH METRICS AND EVALUATION, 2019; WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2017). Em relação ao TP, um estudo de meta-análise demonstrou que a prevalência de TP ao redor do mundo (levando-se em conta 25 países por todo o globo) é de 1,7%, sendo que em média, o início da patologia se dá aos 32 anos (JONGE et al., 2017). No Brasil, especificamente na cidade de São Paulo, a prevalência do TP ao longo de um ano é de 1,1%, sendo que 56,6% desses indivíduos apresentam a patologia com grande severidade (ANDRADE et al., 2012).

Já se é bem descrito que as mulheres, no geral, são mais susceptíveis aos transtornos de ansiedade do que os homens, sendo a incidência duas vezes maior nelas no que se diz respeito ao transtorno de ansiedade generalizada e ao TP (BANDELOW; MICHAELIS, 2015; CHRISTIANSEN, 2015; DONNER; LOWRY, 2013; EATON, 1995; GUO et al., 2016; MCLEAN et al., 2011; SHEIKH; LESKIN; KLEIN, 2002a). Evidências indicam que uma resposta aumentada a estressores possa contribuir para essa maior incidência. Por exemplo, mulheres tendem a ter mais medo, irritabilidade e menos felicidade imediatamente após passarem por teste de estresse social em comparação aos homens (KELLY et al., 2008). Além disso, já se é descrito que elas tem uma maior sensibilidade à dor em virtude a um estímulo aversivo do que os indivíduos do sexo masculino, e que essa dor subjetiva é extinguida quando realizado o tratamento para ansiedade (GOFFAUX et al., 2011).

Além das questões relacionadas à ansiedade, estudos com estímulos panicogênicos mostram uma maior vulnerabilidade das mulheres. Por exemplo, a administração de lactato de sódio é capaz de gerar ataques de pânico tanto em homens quanto em mulheres, porém uma dose menor do composto é necessária para gerar essa resposta nelas (STRÖHLE, 2000). O mesmo ocorre com a exposição ao CO<sub>2</sub>, no qual respostas autonômicas (aumento da frequência cardíaca, resposta eletrodérmica e tensão no músculo frontal) são observadas em ambos os sexos, entretanto, a experiência subjetiva de medo e pânico é maior nas mulheres (ALTEMUS; SARVAIYA; NEILL EPPERSON, 2014; BUNACIU et al., 2012; KELLY; FORSYTH; KAREKLA, 2006; SHEIKH; LESKIN; KLEIN, 2002b)(ALTEMUS; SARVAIYA; NEILL EPPERSON, 2014; SHEIKH; LESKIN; KLEIN, 2002a). Essas evidências indicam diferenças na forma como um estímulo panicogênico é percebido ou processado no cérebro de homens e mulheres, o que pode implicar na maior susceptibilidade a esse transtorno. Apesar dessas informações serem bastante importantes e relevantes, poucos ainda são os estudos que auxiliem na investigação da neurobiologia envolvida nessa diferença sexual quanto fisiopatologia da ansiedade e do TP.

## **1.2 Fisiopatologia da ansiedade e do TP**

### **1.2.1 Comportamentos defensivos relacionados à ansiedade e ao TP**

O conhecimento existente sobre a fisiopatologia da ansiedade e do pânico tem sido fortemente favorecido por estudos realizados com animais de laboratório, especialmente em roedores.

O estudo das emoções e seus transtornos em humanos e suas correlações com comportamentos de animais têm sido descritas há muito tempo. Charles Darwin, pontua em seu livro “The Expression of Emotions in Man and Animals” (1872) que o comportamento emocional em humanos e em outros mamíferos é preservado durante as gerações como uma garantia de sucesso evolutivo e de sobrevivência, trazendo uma referência biológica consigo. O naturalista Darwin, passou a observar as expressões faciais de mamíferos e as documentou em seu livro, demonstrando uma grande similaridade com as expressões humanas. A partir daí, inicia-se o modelo comparativo e sistemático das emoções humanas com comportamentos animais (CAMPOS; CAMPOS; SANCHES, 2010; DARWIN; EKMAN, 2009).

Pouco mais de 100 anos após os escritos de Darwin, o casal de pesquisadores Robert e Caroline Blanchard realizaram uma série de estudos etológicos de suma importância, relacionando comportamento animal e as emoções com quais estariam relacionados (BLANCHARD; FLANNELLY; BLANCHARD, 1986). Mais especificamente, comportamentos defensivos desempenhados por roedores selvagens ou de laboratório frente à estímulos de ameaça foram analisados nesse trabalho. Ao final dos experimentos, os pesquisadores categorizaram os níveis de defesa encontrados, facilitando assim a nossa atual compreensão da relação entre resposta comportamental defensiva tomada por esses animais com os transtornos relacionados à ansiedade em humanos. De maneira geral, Blanchard e colaboradores (1986) propuseram três níveis de defesa, baseando-se no estímulo aversivo e na distância em que os animais estariam desse estímulo.

O primeiro nível é caracterizado por reações de defesa relacionados a ameaças potenciais, nas quais as pistas ambientais gerariam uma incerteza quanto ao perigo, e então os animais responderiam com comportamentos de esquiva ou de exploração cautelosa e de avaliação de risco. No segundo nível a ameaça é distal, ou seja, o estímulo aversivo/predador está presente no ambiente, porém o animal está a uma distância segura, respondendo a este estímulo de maneira a fugir ou congelar. Já no terceiro nível, a ameaça é proximal, na qual o predador/estímulo aversivo está muito próximo do animal, gerando respostas de fugas explosivas ou ataques defensivos. (BLANCHARD et al., 1993; BLANCHARD; FLANNELLY; BLANCHARD, 1986). Nesse sentido, as respostas comportamentais dos primeiro, segundo e terceiro níveis estariam relacionadas à ansiedade, ao medo e ao pânico, respectivamente.

É importante lembrar que as respostas defensivas observadas pelos pesquisadores são responsáveis por preparar os indivíduos para reagirem não somente a ambiente ou situações conhecidas, mas também frente a situações e/ou ambientes novos que podem, possivelmente, representar perigo à sua sobrevivência. No entanto, quando expressos de maneira disruptiva e frequente a toda nova situação, há grandes problemas em curso, uma vez que outros comportamentos essenciais para a sobrevivência são comprometidos, além do desperdício de energia que é algo muito difícil de se obter na natureza (LOVICK; ZANGROSSI, 2021).

As pesquisas que buscaram associar os níveis de defesa com as respostas comportamentais em animais não pararam apenas nos achados de Blanchard e colaboradores (1986). Pesquisadores têm se utilizado de modelos comportamentais animais para entender melhor as respostas defensivas associadas a estímulos relacionadas a ansiedade e ao TP, bem como a efeitos de fármacos sobre esses comportamentos.

Dentre os modelos clássicos para o estudo da ansiedade, destacam-se o labirinto em cruz elevado (LCE) e o teste do claro/escuro. O LCE é um aparato elevado do solo em formato de cruz com dois braços abertos voltados um para o outro e separados por um quadrado central, e dois braços de mesmas dimensões, mas fechados por paredes. Este modelo comportamental baseia-se

na aversão natural dos roedores por espaços abertos, iluminados e elevados, trabalhando com o conflito entre exploração e aversão a esses locais. Os perfis de comportamento provocado no LCE incluem elementos de neofobia, exploração e conflito entre aproximação/evitação. Já o teste do claro/escuro consiste em uma caixa dividida em dois compartimentos iguais por uma placa de madeira com uma abertura conectando os compartimentos. Um compartimento é pintado de preto e recebe pouca iluminação e o outro é pintado de branco e iluminado. O animal pode circular livremente pela caixa por durante o teste. Da mesma forma que o LCE, o teste do claro/escuro também evoca nos animais o conflito da exploração com a evitação a um lugar aversivo, que seria o compartimento iluminado (KUMAR; BHAT; KUMAR, 2013).

Um modelo desenvolvido mais recentemente é o labirinto em T elevado (LTE), sendo derivado do LCE (para revisão ver ZANGROSSI; GRAEFF, 2014). O LTE consiste em um aparato que contém um braço fechado e dois braços abertos e trabalha com o medo inato que roedores de laboratório têm de locais elevados, iluminados e desprotegidos (braços abertos). O teste é capaz de discriminar dois tipos de comportamentos defensivos: a esquiva inibitória, que está relacionada à ansiedade, e a fuga, relacionada ao pânico. Utilizando-se desse teste, pesquisas farmacológicas mostram que drogas utilizadas clinicamente para a terapêutica de transtorno de ansiedade generalizada inibem a resposta de esquiva inibitória, enquanto que aquelas usadas para o tratamento do TP inibem a resposta de fuga (para revisões ver GRAEFF; ZANGROSSI., 2010; ZANGROSSI; GRAEFF, 2014).

Com relação ao pânico, diversos estudos mostram que a estimulação elétrica da substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd, para detalhes, ver sessão seguinte) em roedores é capaz de gerar o comportamento de fuga, além de respostas autonômicas simpáticas como piloereção, taquicardia e hipertensão arterial (DE OLIVEIRA SERGIO et al., 2020; DEL-BEN; GRAEFF, 2009; JENCK; MOREAU; MARTIN, 1995; SCHENBERG et al., 2001). Nesse teste a utilização de drogas como alprazolam e imipramina é capaz de atenuar a fuga exibida com a estimulação (DE BORTOLI; NOGUEIRA; ZANGROSSI, 2008; JACOB et al., 2002).



Um outro teste utilizado é a exposição a 20% de CO<sub>2</sub> em camundongos e a 7% O<sub>2</sub> em ratos. Alguns trabalhos desenvolvidos com esses estímulos correlacionam alterações autonômicas cardiovasculares, especialmente aumento da frequência cardíaca, e alterações respiratórias, com as respostas de pânico (AMÉNDOLA; RATUSKI; WEARY, 2019; ARIELI, 1990; ARIELI; KEREM; MELAMED, 1988; BORKOWSKI et al., 2011; KINKEAD, 2014; LUCHETTI et al., 2021). Além do correlato autonômico, alguns estudos analisam comportamentos desenvolvidos pelos animais durante os estímulos respiratórios, mostrando um aumento do comportamento de fuga desses animais (FERNANDES et al., 2019; SPIACCI et al., 2015, 2018).

Em humanos, há evidências dos mesmos padrões de resposta comportamental que observadas nos roedores. Nessa perspectiva, o estudo realizado por Shuhama e colaboradores (2008) utilizou questionários que apresentavam cenários imaginários contendo situações aversivas aos entrevistados. Estes deveriam quantificar a magnitude da ameaça, além do tipo de resposta comportamental que seria empregada na situação. Em cenários que descreviam ameaças potenciais, a principal reação de defesa escolhida era a avaliação de risco, semelhantemente ao expresso por roedores nessas situações. Já em cenários que empregavam ameaças proximais, o principal comportamento escolhido pelos sujeitos experimentais foi a fuga (BLANCHARD, 2001; SHUHAMA et al., 2008).

As evidências trazidas pelos trabalhos apresentados foram muito importantes para caracterizar uma relação filogenética entre as respostas comportamentais de outros animais e as emoções humanas. Essa relação sugere também que os substratos neurais das emoções são conservados ao longo da evolução (GRAEFF, 1999).

### **1.2.2 Substratos neurais envolvidos na fisiopatologia do TP**

O conhecimento atual do envolvimento de estruturas cerebrais na regulação do TP baseia-se em evidências clínicas e experimentais, obtidas tanto em seres humanos quanto em animais de laboratório. Quando se conhece o repertório de defesa de uma espécie, é possível explorar o substrato neural subjacente através de diferentes métodos, como a estimulação elétrica, química ou óptica, bem como pelos modernos métodos de análise de imagens funcionais do cérebro e de estimulação/inibição de populações neuronais específicas (GRAEFF; ZANGROSSI, 2021; ZANGROSSI; GRAEFF, 2004).

Dentre os estudos que foram muito importantes na demonstração da participação de estruturas cerebrais nas reações de defesa relacionadas ao pânico, destacam-se os trabalhos pioneiros de Walter Hess, iniciados na década de 1930. Esses estudos mostraram, por exemplo, que a estimulação elétrica do hipotálamo medial do gato provocava uma reação de defesa afetiva, semelhante àquela que o animal apresentava quando confrontado com um predador (GRAEFF; ZANGROSSI, 2021; KRUK, 2014). Avançando no tempo, outros pesquisadores exploraram o cérebro de diversas espécies com estimulação elétrica, delimitando regiões nas quais a estimulação produzia reações de defesa (GRAEFF; ZANGROSSI, 2021).

Com base nos diversos estudos, formulou-se a proposição de um sistema neural que comanda as reações de defesa que nos dias atuais tem se aplicado de maneira satisfatória ao pânico nos animais: o sistema cerebral aversivo. Esse sistema, proposto por Graeff (1981), quando ativado em situações ameaçadoras ou de perigo iminente, gera um aumento expressivo da atividade comportamental dirigida para o ataque e/ou fuga, através da ativação de algumas estruturas cerebrais, tais como o hipotálamo medial, amígdala e, de grande relevância para o presente estudo, a substância cinzenta periaquedutal (SCP; GRAEFF, 1981).

### **1.2.2.1 Substância cinzenta periaquedutal**

A SCP, como já mencionado anteriormente, é uma das estruturas mesencefálicas importantes para evocar o comportamento defensivo de fuga. A SCP está localizada ao redor do aqueduto mesencefálico, sendo dividida funcionalmente em quatro colunas especializadas: dorsomedial (dmSCP), dorsolateral (dlSCP), lateral (lSCP) e ventrolateral (vlSCP; BANDLER; SHIPLEY, 1994; SCHENBERG et al., 2014).

A participação dessa estrutura na mediação de comportamentos defensivos tem sido há muito tempo investigada em animais. Nos anos 50, pesquisadores observaram que a estimulação elétrica do mesencéfalo de gatos era capaz de evocar o comportamento de fuga (DELGADO; ROBERTS; MILLER, 1954), além de outros comportamentos como vocalização e rosnados (SPIEGEL; KLETZKIN; SZEKELY, 1954). Em macacos, o padrão observado após a estimulação da estrutura são movimentos ofensivos e defensivos, vocalização e reações autonômicas como a piloereção (DELGADO, 1955). Da mesma forma, em ratos, a estimulação da região dorsal da SCP provocava comportamentos relacionados ao medo e pânico, caracterizados pela rápida corrida ao redor da câmara, tentativa de fuga, que eram acompanhados de manifestações autonômicas, como piloereção, defecação e micção (SANFORD KISER; LBOVITZ; GERMAN, 1978).

Em conjunto aos achados em animais, na década de 60, os neurocirurgiões que investigavam a estimulação cerebral em estruturas do mesencéfalo como um método para aliviar a dor, relataram que o procedimento frequentemente evocava efeitos colaterais intoleráveis, como sentimentos de terror ou morte iminente, desejo de fuga, palpitação e parada respiratória ou hiperventilação (DEL-BEN; GRAEFF, 2009; LOVICK, 2014). Nesse período, Nashold e colaboradores (1969, 1974), com intuito de estudar a dor crônica em pacientes sem qualquer histórico de doenças psiquiátricas, implantaram eletrodos no mesencéfalo dorsal dessas pessoas para provocar a estimulação da mesma. Muito interessante, quando fora estimulada essa região, os indivíduos relataram sentimentos frequentes de medo, terror e sensação de morte iminente, acompanhados de uma ativação autonômica, resultando em piloereção,

sudorese, aumento do pulso e da frequência respiratória (NASHOLD, 1974; NASHOLD; WILSON; SLAUGHTER, 1969; SCHENBERG et al., 2014). Dessa forma, tornou-se muito clara a semelhança de comportamentos entre animais de laboratório e seres humanos e, de maneira bastante promissora, esses achados foram importantes pois sustentaram a estimulação da parte dorsal da SCP como modelo de estudo de respostas defensivas relacionadas ao pânico em animais.

A relação da SCP com o TP foi sendo desvendada um pouco mais tarde, conforme as técnicas laboratoriais foram sendo aprimoradas. Em 1989, Reiman e colaboradores avaliaram, através de tomografia de emissão de pósitron, o fluxo sanguíneo encefálico após a infusão sistêmica de lactato de sódio, um agente capaz de gerar ataques de pânico (MARGRAF; EHLERS; ROTH, 1986). Vale ressaltar que alterações no fluxo sanguíneo encefálico estão associados a alterações na atividade neuronal local, mais especificamente, a sua ativação (REIMAN, 1989). Os pesquisadores observaram um maior fluxo sanguíneo para a região mesencefálica, tanto em indivíduos com o TP, quanto nos saudáveis após a infusão da droga panicogênica. Ainda mais intrigante, a mesma direção do fluxo sanguíneo foi observada em indivíduos saudáveis que não receberam a infusão, mas que foram submetidos a choques sem aviso prévio, mostrando também a ativação dessa região em uma situação que evoca ansiedade antecipatória (GEORGE; AMELI; KOOB, 2019; REIMAN, 1989). Um outro estudo mostrou que existem níveis mais elevados de captação de glicose no mesencéfalo em pacientes com o TP do que nos controles, evidenciando uma maior atividade desta região nos indivíduos com o transtorno (SAKAI et al., 2005).

De maneira curiosa, não são todas as colunas da SCP que estão envolvidas na mediação de respostas defensivas associadas ao pânico. Mais especificamente, estudos realizados ao longo dos últimos 60 anos mostram que a participação nesse aspecto é da dmSCP e dlSCP, que juntas formam a substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd; GRAEFF, 2002, 2003). Nesse sentido, com o aprimoramento de técnicas para avaliar ativação de regiões encefálicas após estímulos externos, Mobbs e colaboradores realizaram dois estudos, um em 2007 e outro em 2010, utilizando-se da técnica de monitoramento por imagem de ressonância magnética funcional. No primeiro

estudo, com o auxílio de realidade virtual, os pesquisadores expuseram os voluntários a um labirinto no qual um predador virtual poderia se aproximar ou não do indivíduo. Os resultados obtidos mostraram que quando o predador estava distante, estruturas como o córtex pré-frontal e amígdala lateral eram recrutadas. Em oposição, conforme a ameaça se aproximava, a SCPd era ativada (MOBBS et al., 2007). O segundo experimento utilizou uma tarântula como o gatilho ameaçador, que poderia estar próxima ou distante do indivíduo. Como observado antes, ao gerar proximidade entre a aranha e o indivíduo, observava-se o recrutamento da SCPd (MOBBS et al., 2009).

Apesar de clara a relação entre comportamentos defensivos associados ao pânico e a ativação da SCPd, ainda pouco se sabe sobre a neuroquímica envolvida nesta relação. Diversos neurotransmissores têm sido alvos de estudo, dentre eles estão: a serotonina, o ácido gama-aminobutírico (GABA), o glutamato, o óxido nítrico (ON), a colecistocinina e o fator liberador de corticotrofina (CAROBREZ; TEIXEIRA; GRAEFF, 2001; DELTHEIL et al., 2008; GRAEFF, 1994, 2002; GUIMARÃES et al., 1991; ZANGROSSI et al., 2001). Como mencionado previamente, os fármacos mais amplamente utilizados para o tratamento do TP são os antidepressivos, especialmente os inibidores seletivos de recaptação de serotonina (BANDELOW; MICHAELIS; WEDEKIND, 2017). Dessa forma, muitos esforços têm sido direcionados a investigação da ação desse neurotransmissor nas respostas defensivas ao pânico (GRAEFF, 1994; ZANGROSSI; GRAEFF, 2014).

### **1.2.2.2 Serotonina, núcleo dorsal da rafe e o TP**

A serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) é uma monoamina derivada do aminoácido essencial triptofano (TRP), que é adquirido através da alimentação. A conversão do TRP em serotonina ocorre através de duas etapas: na primeira, o TRP é hidroxilado em 5-hidroxitriptofano, através da ação da enzima triptofano hidroxilase (TPH); na segunda etapa a enzima L-aminoácido aromático descarboxilase converte o 5-hidroxitriptofano, através de uma descarboxilação, em 5-HT. De maneira geral, ela é sintetizada periféricamente por células enterocromafins no intestino e centralmente em neurônios serotoninérgicos

encontrados em sete núcleos mesencefálicos, chamados de núcleos da rafe. Mais especificamente, o núcleo dorsal da rafe (NDR) se destaca por ser a principal fonte de inervação serotoninérgica para estruturas límbicas relacionadas com a fisiopatologia dos transtornos de ansiedade, como o TP (AZMITIA; SEGAL, 1978; DAVID; GARDIER, 2016; FOUQUET et al., 2019).

De maneira notável, o NDR não é uma estrutura homogênea. Steinbusch (1981), através de um trabalho utilizando a técnica de imunohistoquímica para detecção de neurônios serotoninérgicos, demonstrou que existem cinco agrupamentos de corpos celulares de neurônios 5-HT no NDR, divididos em: dorsal (DRD), ventral (DRV), lateral (Asas Laterais - alDR), caudal (DRC) e interfascicular (DRI). Vale ressaltar que esses agrupamentos de neurônios serotoninérgicos são morfológica e funcionalmente distintos, além de terem projeções para estruturas distintas (ABRAMS et al., 2005; CALIZO et al., 2011; HALE; SHEKHAR; LOWRY, 2012; REN et al., 2018). Essa concepção iniciou com o estudo de Imai e colaboradores, em 1986, que utilizando a técnica de Golgi e injeções de Horseradish peroxidase para neurotraçamento, encontraram diferenças na organização do eixo rostro-caudal do NDR entre as vias ascendentes de neurônios serotoninérgicos. Segundo os autores, da região rostral saíam vias ascendentes que alcançariam regiões mais relacionadas com a parte motora, como por exemplo, os gânglios da base (caudado, putamen e a substância nigra), enquanto que a região caudal se relacionaria a regiões do sistema límbico (principalmente hipocampo) e o *locus coeruleus*. As vias ascendentes que chegariam na amígdala estariam numa região mais intermediária, tendo sua correlação tanto com o sistema motor, quanto com o sistema límbico (IMAI et al., 1986).

Cabe mencionar que além da grande densidade de corpos celulares de neurônios serotoninérgicos (JOH et al., 1975; STEINBUSCH; VERHOFSTAD; JOOSTEN, 1978), o NDR possui também aqueles não-serotoninérgicos (CALIZO et al., 2011; ROMPRÉ; MILIARESSIS, 1987). Esses estão na proporção de um terço a um décimo em comparação aos serotoninérgicos (CALIZO et al., 2011). Dentre os neurônios não-serotoninérgicos encontrados neste núcleo, destacam-se os dopaminérgicos, GABAérgicos, glutamatérgicos, de ON e peptídeos

transmissores, como a colecistocinina (MICHELSEN; SCHMITZ; STEINBUSCH, 2007).

A realização de estudos que mostraram a ação da 5-HT sobre respostas emocionais e em seus transtornos iniciaram-se nos anos 60 (para revisão ver (FAULKNER; DEAKIN, 2014; PAUL; LOWRY, 2013). Muito curiosamente, os pesquisadores envolvidos nessas pesquisas encontraram situações muito conflitantes a respeito da ação da 5-HT nas diferentes respostas comportamentais. Como exemplo disso, trabalhos que empregaram o paradigma de conflito (por exemplo, a fome do animal sendo pareada com um choque ao pedir comida através do pressionamento de uma alavanca), mostraram que o uso de ferramentas farmacológicas para diminuição da neurotransmissão serotoninérgica era capaz de aumentar o número de comportamentos punidos, indicando assim um efeito pró-aversivo da serotonina (FILE et al., 2004; GELLER; BLUM, 1970; GRAEFF; SCHOENFELD, 1970; ROBICHAUD; SLEDGE, 1969; TYE; EVERITT; IVERSEN, 1977). Em conjunto a esses achados comportamentais, algumas evidências na literatura apontam que a ação pró-aversiva da serotonina seria mediada por estruturas encefálicas como o complexo amigdalóide (HODGES; GREEN; GLENN, 1987; PETERSEN; BRAESTRUP; SCHEEL-KRÜGER, 1985). De maneira oposta, estudos que utilizavam a estimulação elétrica da SCPd mostraram que a diminuição da neurotransmissão serotoninérgica, através de drogas que inibiam sua produção, evocava comportamentos de fuga, levando a conclusão de que a serotonina teria um efeito anti-aversivo (SANFORD KISER; LBOVITZ, 1975; SANFORD KISER; LBOVITZ; GERMAN, 1978; SCHENBERG; GRAEFF, 1978).

As evidências dicotômicas encontradas sobre o papel da serotonina na ansiedade consideravam que ambos os modelos supracitados evocavam nos animais o mesmo estado emocional. Entretanto, os pesquisadores da época perceberam que os modelos comportamentais estariam ligados a diferentes tipos de ansiedade (GRAEFF, 2004). Para chegar a essa conclusão, os estudiosos levaram em conta que os níveis de defesa explanados por Blanchard e colaboradores (1986), especialmente os níveis distal e proximal, evocariam respostas comportamentais distintas que estariam sendo moduladas por diferentes estruturas encefálicas, e que além disso, a serotonina estaria

modulando diferentemente essas respostas. A partir daí, Deakin e Graeff (1991) desenvolveram a teoria de que a serotonina teria um papel dual nas respostas defensivas associadas à ansiedade e ao pânico.

De acordo com a teoria de Deakin e Graeff, duas vias distintas serotoninérgicas estariam partindo do NDR, e seriam responsáveis pela regulação de respostas de defesa frente aos estímulos aversivos de ameaça potencial. A primeira via, chamada de prosencefálica, quando ativada levaria à expressão de respostas comportamentais como as de congelamento, avaliação de risco e esquiva inibitória, aumentando os níveis de ansiedade pela liberação de serotonina para estruturas como o complexo amigdalóide, hipocampo e córtex pré-frontal. Nessas mesmas condições, a chamada segunda via, a periventricular, prejudicaria a expressão de respostas comportamentais de luta ou fuga através da liberação de serotonina para a SCPd (DEAKIN; GRAEFF, 1991; PAUL et al., 2014; PAUL; LOWRY, 2013). É digno de nota que a inibição da resposta de luta/fuga pela via periventricular frente a uma ameaça potencial é de grande importância biológica, uma vez que essa resposta não condiz com a situação apresentada. Sendo assim, a teoria de Deakin e Graeff nos conduz a concepção de que uma disfunção na via periventricular estaria envolvida na gênese do TP (DEAKIN; GRAEFF, 1991; GUILHERME GRAEFF; ZANGROSSI JR., 2010; PAUL et al., 2014; PAUL; LOWRY, 2013).

Tendo como pano de fundo a teoria de Deakin e Graeff, Spiacci e colaboradores (2012), utilizando o LTE, avaliaram o substrato neural envolvido nas diferentes respostas defensivas obtidas no referido teste, especialmente nas duas estruturas-chave: a SCP e o NDR. Dessa maneira, os pesquisadores realizaram o procedimento de imunistoquímica de dupla-marcação: a primeira tinha como alvo a proteína c-Fos (marcador indireto de ativação celular/neuronal) e a segunda para TPH (marcação de neurônios serotoninérgicos). De maneira interessante, os resultados encontrados demonstraram que a esquiva inibitória recrutava neurônios serotoninérgicos nos subnúcleos DRD, DRC e DRI, enquanto que na fuga, a ativação ocorria em neurônios não-serotoninérgicos localizados nas alDR e nas subdivisões dmSCP e dlSCP da SCP (SPIACCI; COIMBRA; ZANGROSSI, 2012). Com relação as alDR, os autores sugerem, com base em evidências prévias da literatura, que os neurônios não-serotoninérgicos ativados



sejam interneurônios GABAérgicos. Essa perspectiva se dá pelo fato de que o recrutamento desses neurônios inibiria a atividade neuronal serotoninérgica nessa área, levando a uma diminuição da liberação de 5-HT na SCP, provocando então o comportamento de fuga nos animais (SPIACCI; COIMBRA; ZANGROSSI, 2012).

Esses resultados contribuem de maneira expressiva e minuciosa com a teoria Deakin/Graeff. Já se tem descrito na literatura que os subnúcleos ativadas em resposta a esquivas inibitórias têm projeções para estruturas relacionadas à ansiedade, como o núcleo basolateral da amígdala (ABRAMS et al., 2005; HALE et al., 2008). Nesse sentido, a via serotoninérgica prosencefálica na proposta de Deakin/Graeff partiria do subnúcleo DRD em direção a estruturas como a amígdala, córtex pré-frontal e hipocampo e estaria relacionada a um aumento na ansiedade. Em contrapartida, para a tarefa de fuga, a via periventricular teria origem nas alDR com inervações para a SCPd, e os neurônios não-serotoninérgicos que foram recrutados, seriam possivelmente GABAérgicos, promoveriam uma inibição da liberação de 5-HT para essa coluna da SCP, favorecendo a expressão da resposta de fuga (MUZERELLE et al., 2016; PAUL et al., 2014; STEZHKA; LOVICK, 1997).

Mais recentemente, Vilela-Costa e colaboradores (2017) demonstraram que a administração crônica de fluoxetina, um inibidor de recaptção de serotonina, que é amplamente utilizado no tratamento do TP em humanos, foi capaz de diminuir a fuga em roedores no LTE e também de alterar o padrão de ativação dos neurônios nas alDR, ou seja, houve uma diminuição no recrutamento de neurônios não-serotoninérgicos e um aumento na ativação de neurônios serotoninérgicos nesse subnúcleo. Dessa forma, a 5-HT passaria a ser então liberada para áreas como a SCPd, onde inibiria respostas relacionadas ao pânico (VILELA-COSTA et al., 2019).

Em suma, vemos que o principal comportamento relacionado ao pânico é a fuga e que esta seria gerada por uma ativação da via periventricular proposta por Deakin e Graeff (1991). Dessa forma, a ativação de neurônios não-serotoninérgicos das alDR reduziria a neurotransmissão serotoninérgica na SCPd, aumentando a expressão deste comportamento relacionado ao TP.

Apesar de muito promissores, a extensa maioria dos trabalhos com animais que possibilitaram o desenvolvimento das teorias acerca do papel da serotonina em comportamentos defensivos relacionados a ansiedade e ao pânico, bem como o substrato neural subjacente a esses comportamentos, foi realizado em animais machos. É importante ressaltar e reiterar que, como as mulheres são mais susceptíveis a esses transtornos, é de extrema importância realizar e aprofundar os estudos com fêmeas, principalmente no que concerne as alterações hormonais experienciadas por elas.

### **1.3 Diferenças Sexuais no TP**

Os estudos sobre as diferenças sexuais existentes na manifestação dos transtornos de ansiedade e do pânico têm sido cada vez mais frequentes (BANGASSER; CUARENTA, 2021; DONNER; LOWRY, 2013; LOVICK, 2014; LOVICK; ZANGROSSI, 2021; SCHOLL et al., 2019). Várias evidências indicam que a ciclicidade hormonal que ocorre durante o período menstrual, especificamente na fase pré-menstrual, pode constituir um possível estressor que contribui para o aparecimento das patologias envolvendo a ansiedade mal adaptativa e do pânico em mulheres vulneráveis a estas (NILLNI et al., 2016; NILLNI; ROHAN; ZVOLENSKY, 2012). Por conta da importância dessa informação para o presente trabalho, os aspectos biológicos e sociais relacionados à essas diferenças serão abordados mais detalhadamente nas próximas seções.

Quando buscamos investigar o âmago das diferenças sexuais existentes na manifestação do TP é necessário considerarmos uma perspectiva multifatorial, levando em conta os aspectos biológicos e culturais, bem como o estilo de vida e a pressão social (RUTTER; CASPI; MOFFITT, 2003).

#### **1.3.1 Questões sociais**

Quando trazemos à tona a questão social, um dos vários aspectos que se destacam são as experiências que caracterizam a história de vida de uma

pessoa. Nesse contexto, um evento traumático que possa ocorrer durante os primeiros anos de vida ou da adolescência de um indivíduo pode gerar consequências em sua vida adulta. É importante destacar que desregulações em sistemas relacionados ao estresse que ocorrem nessas fases da vida podem comprometer o desenvolvimento de estruturas cerebrais que estão relacionadas à mediação de comportamentos afetivos e emocionais (DE BELLIS; SPRATT; HOOPER, 2011). Como exemplo, o abuso sexual infantil é um desses eventos traumáticos, e estudos mostram que a incidência desse evento aversivo é três vezes maior em meninas do que os meninos (AL-FAYEZ; OHAERI; GADO, 2012; BRENNER; BEN-AMITAY, 2015; GOREY; LESLIE, 1997; KLOPPEN et al., 2016). Concomitantemente, outros eventos ocorridos na infância, como o abuso físico, disfunções familiares e negligência, ocorrem em maior porcentagem no caso das meninas (15,2%) comparado aos meninos (9,2%) (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC), 2010).

Na vida adulta, as situações estressantes também podem contribuir para desbalanços em sistemas relacionados à mediação de comportamentos emocionais. Na literatura, autores apontam que a violência, seja física, psicológica ou sexual que as mulheres sofrem é uma enorme ameaça à sua saúde mental (ELLSBERG et al., 1999; HOWARD; TREVILLION; AGNEW-DAVIES, 2010; KUMAR et al., 2005; LUSTYK; WIDMAN; BECKER, 2008; ORAM; KHALIFEH; HOWARD, 2017). Concomitante a essa informação, já é observado que há um aumento no uso de tranquilizantes e antidepressivos pelas mulheres que sofrem os abusos (RUIZ-PÉREZ; PLAZAOLA-CASTAÑO, 2005).

Nesse aspecto, um estudo realizado no Brasil, mais especificamente em São Paulo e Pernambuco, avaliou entre 2009 e 2010, a correlação entre o tipo de violência sofrida por mulheres com a manifestação de transtornos psiquiátricos, através do uso de questionários de autorrelato (SRQ-20). Esses questionários tinham por objetivo analisar, através de sintomas psicossomáticos, a prevalência de transtornos depressivos e de ansiedade. Os resultados observados mostraram que a porcentagem de mulheres que manifestavam os sintomas relacionados a esses transtornos era maior naquelas que sofriam abuso físico (30,6%), psicológico (41,1%), sexual (47,9%) ou todas as formas de abuso (62,9%) em comparação àquelas que não sofriam qualquer tipo de

violência (19,6%) (LUDERMIR et al., 2008). Ademais, outros fatores adversos também reforçam o aumento de transtornos psiquiátricos nas mulheres, como o desemprego, a baixa renda e a evasão escolar cuja incidência é maior nelas do que nos homens (GONÇALVES et al., 2014).

### **1.3.2 Questões biológicas – ciclo menstrual**

Dentre os aspectos biológicos relevantes, diferenças que promovem o sucesso reprodutivo, como é o caso do ciclo menstrual hormonal, podem aumentar a vulnerabilidade das mulheres para transtornos emocionais, incluindo o TP (ALTEMUS; SARVAIYA; NEILL EPPERSON, 2014; PALANZA, 2001).

O ciclo menstrual hormonal é caracterizado por mudanças rítmicas mensais nos níveis de diferentes hormônios sexuais, que em concomitância promovem alterações morfológicas nos ovários e nos demais órgãos sexuais femininos. Esse processo tem início durante a adolescência (entre 11 e 15 anos) e a duração do ciclo menstrual é de aproximadamente 28 dias, variando entre 20 e 45 dias para cada mulher e/ou situação. Esse processo resulta na formação, comumente, de apenas um ovócito, além de preparar o endométrio para o recebimento e implantação do embrião, caso haja a fertilização (GUYTON, 2006).

De maneira geral, o ciclo menstrual é dividido em quatro fases: 01) fase folicular: nessa etapa, o hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH) começam a ser secretados pela hipófise anterior e agem em receptores localizados nos ovócitos imaturos promovendo a maturação e o crescimento de seus folículos. A maturação folicular leva a um aumento na secreção de estrogênio que contribui para um crescimento explosivo do ovócito e dos folículos, além de ser um agente contribuinte para o feedback negativo para a liberação do FSH; 02) ovulação: dois dias antes de ocorrer a ovulação, os níveis de LH crescem de maneira exponencial. Esse hormônio vai ser responsável pela extrusão ovocitária e também vai garantir o início da produção de progesterona pelas células foliculares, bem como causar a diminuição dos níveis de estrogênio; 03) fase lútea: após a extrusão do ovócito, as células

remanescentes se transformam em células luteínicas e o local onde o ovócito liberado estava anteriormente passa a ser chamado de corpo lúteo. As células do corpo lúteo iniciam a produção da progesterona (em maior grau) e do estrogênio (em menor grau), e ambos hormônios acabam gerando efeitos de feedback negativo na hipófise, mantendo baixos os níveis de FSH e LH; 04) fase isquêmica: esses baixos níveis de FSH e LH causam uma degeneração e involução do corpo lúteo, que por consequência, leva a uma queda abrupta nos níveis de estrogênio e, em maior escala, da progesterona. O resultado final dessa fase, caso não haja a fertilização e a implantação do embrião, é o processo de menstruação. A cessação súbita da secreção de estrogênio e progesterona remove o feedback de inibição da hipófise anterior, permitindo que um novo ciclo se inicie (GUYTON, 2006).

De maneira bastante interessante, as mulheres relatam que durante o ciclo menstrual há alterações de humor e irritabilidade, além de aumento de sintomas relacionados à ansiedade e depressão. Mais especificamente, essas alterações ocorrem proeminentemente durante o final da fase lútea ou também chamada de fase pré-menstrual, na qual estima-se que cerca de 48% das mulheres apresentam a síndrome de Tensão Pré-Menstrual (TPM; BLOCH; SCHMIDT; RUBINOW, 1997; CHRISLER; CAPLAN, 2002; FREEMAN, 2003; LOGUE; MOOS, 1986; SATTAR, 2014; SCHMELZER et al., 2015; VICHNIN et al., 2006). Embora apenas uma baixa porcentagem (2 a 8%) das mulheres classifiquem esses sintomas relacionados à TPM como graves ou incapacitantes (HALBREICH, 2003), a maioria delas apresenta algum grau de comprometimento no funcionamento físico, limitações devido a problemas físicos e de saúde mental, dores corporais ou em conexões sociais (BARNARD et al., 2003; SCHMELZER et al., 2015).

Adicionado a isso, uma pequena parcela (cerca de 5%) das mulheres sofrem de sintomas psicológicos extremamente graves durante o período de TPM, como por exemplo, labilidade afetiva acentuada, irritabilidade ou raiva que aumentam os conflitos interpessoais, pensamentos autodepreciativos, ansiedade acentuada com sensação de estar em seu limite, além dos sintomas como inchaços nas mamas, dores articulares ou musculares, ganho de peso (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013), que no conjunto

caracterizam o transtorno disfórico pré-menstrual (TDPM; LOVICK, 2014; O'BRIEN et al., 2011).

Além do aumento dos sintomas psicológicos adversos relacionados à ansiedade e a depressão que ocorrem nesse período do ciclo na TPM e na TDPM, há também um aumento à susceptibilidade ao pânico em mulheres saudáveis que apresentam a TPM, como também naquelas diagnosticadas com o TP (FACCHINETTI et al., 1992; LANDÉN; ERIKSSON, 2003; NILLNI et al., 2016; NILLNI; ROHAN; ZVOLENSKY, 2012; YONKERS; O'BRIEN; ERIKSSON, 2008). Um estudo realizado por Sigmon e colaboradores (2000) em mulheres com e sem o TP, utilizando medidas de autorrelato, revelaram que aquelas com o transtorno exibiam sintomas psicossomáticos mais graves relacionados à sensações corporais, sensibilidade à ansiedade, medo e preocupações relacionadas à doença e que isso era reforçado durante a fase pré-menstrual (SIGMON et al., 2000). Além disso, outras evidências na literatura apontam que mulheres na TPM e aquelas que sofrem do TDPM apresentam uma maior responsividade a substâncias panicogênicas, como por exemplo a colecistocinina 4, o flumazenil e o CO<sub>2</sub> (GORMAN et al., 2001; LE MELLEDO, 1999, 2000).

É importante ressaltar que dentre os hormônios sexuais que flutuam durante o ciclo menstrual, dois deles são de suma importância para o aparecimento dos sintomas relacionados a desordens emocionais durante o período da TPM e da TDPM: o estrogênio e a progesterona (SCHMIDT et al., 2017). Nesse quesito, como ambos hormônios flutuam de maneira concomitante durante o ciclo menstrual, ainda é controversa na literatura a visão sobre qual deles seria o mais crítico para o desenvolvimento desses transtornos (ROCA et al., 2003). Por esse motivo, na sequência, traremos algumas hipóteses que corroboram a ação de cada um dos hormônios supracitados.

Com relação ao estrogênio, os achados em relação ao pânico são escassos, porém mais abrangentes em relação a outros transtornos comórbidos, como a ansiedade e a depressão. De maneira interessante, um dos períodos da vida da mulher que é possível analisar a influência do estrogênio sobre as desordens de humor é a menopausa. Esse período é caracterizado pela queda

dramática dos níveis de estrogênio, que tem sido associada à mudanças na incidência e sintomatologia psicossomática da ansiedade e da depressão (GRACIA; FREEMAN, 2018; WALF; FRYE, 2006). Durante a perimenopausa ocorrem alterações na função ovariana, de modo que os níveis de estrogênio podem ser variáveis. Já no período da pós-menopausa os níveis de estrogênio são os mais baixos possíveis (BURGER et al., 1995; DALY et al., 2003; SANTORO et al., 1996).

Nesse contexto, um estudo longitudinal realizado por Schmidt e colaboradores (2004) monitorou 29 mulheres pré-menopáusicas assintomáticas, ciclando regularmente, por uma média de 5 anos até ficarem amenorreicas por 6 ou mais meses. Durante o final do período da perimenopausa (mais ou menos 24 meses após sua última menstruação), nove das 29 mulheres analisadas, foram diagnosticadas com depressão. Esses dados sugerem que a incidência de depressão em algumas mulheres pode aumentar durante o final da perimenopausa, na qual os níveis de estrogênio estão baixos devido à sua queda abrupta (SCHMIDT; HAQ; RUBINOW, 2004). Em outro estudo transversal, realizado por Almeida e colaboradores (2005) foi observado que os sintomas depressivos, medidos pelos escores do inventário de depressão de Beck, encontrados em mulheres mais velhas e na pós-menopausa foram inversamente proporcionais aos níveis de estrogênio plasmático, ou seja, quanto menor os níveis de estrogênio, maior era o escore no teste empregado (ALMEIDA, 2005).

Além disso, outros trabalhos mostram que não somente a depressão bipolar é mais frequente, mas também o transtorno de ansiedade generalizada é mais incidente em mulheres mais velhas na peri e pós-menopausa (BEBBINGTON et al., 1998; WEISSMAN, 1977; WEISSMAN; OLFSON, 1995; WITTCHEN; HOYER, 2001). Interessantemente, a terapia de reposição de estrogênio tem se mostrado eficaz para a diminuição dos sintomas relacionados à ansiedade e à depressão em mulheres na perimenopausa (COHEN et al., 2003; DE NOVAES SOARES et al., 2001; SCHMIDT et al., 2000; ZHANG et al., 2021).

Não somente é possível ver o efeito benéfico da administração de estrogênio em mulheres no período da menopausa, como também naquelas com

o ciclo menstrual funcional. Como exemplo, a administração crônica de estrogênio transdérmico à pacientes com a TPM grave é capaz de diminuir sintomas negativos como irritabilidade, dificuldade na concentração, mudanças de humor, tensão e sintomas depressivos (SMITH et al., 1995). Além disso, em mulheres com depressão pós-parto (DPP), ou aquelas diagnosticadas com transtorno depressivo maior, a administração de estrogênio é capaz de melhorar os sintomas depressivos e recuperar o afeto exibido por elas (AHOKAS et al., 2001; GREGOIRE et al., 1996; KLAIBER, 1979).

Com relação à progesterona, relatos na literatura apontam que os sintomas da TPM e da TDPM se tornam mais severos durante os 5 dias anteriores à menstruação, à medida que os níveis de progesterona diminuem (BACKSTROM et al., 1983, 2003; NEVATTE et al., 2013). Nesse contexto, um estudo realizado por Ziomkiewicz e colaboradores (2012) correlacionou sintomas relacionados à TPM com o nível sérico de progesterona coletada através da saliva de mulheres saudáveis. De maneira bastante interessante, essas mulheres, que não haviam sido diagnosticadas clinicamente com a TPM, demonstraram um aumento de comportamentos agressivos e irritabilidade, bem como fadiga quando os níveis de progesterona eram os mais baixos durante o final da fase lútea (ZIOMKIEWICZ et al., 2012). Adicionado à isso, outros estudos demonstraram que os níveis baixos de progesterona, mas não de estrogênio em mulheres que sofriam com a TPM gerava um aumento de sintomas relacionados à ansiedade quando comparadas àquelas mulheres que não sofriam com a tensão (BÄCKSTRÖM; CARSTENSEN, 1974; DENNERSTEIN et al., 1984; MUNDAY; BRUSH; TAYLOR, 1981; WANG et al., 1996).

Mais recentemente, Lovick e colaboradores (2017) avaliaram, através da coleta de saliva diária, a concentração absoluta e a cinética dos níveis de progesterona e a relação dessas mudanças para o desenvolvimento de sintomas pré-menstruais durante os últimos 10 dias da fase lútea, em uma população de mulheres brasileiras adultas e saudáveis. Os autores observaram que, nas participantes que desenvolveram sintomas pré-menstruais (sintomas depressivos, aumento de ansiedade e irritabilidade, dificuldade em concentração, anedonia, entre outros), a concentração diária de progesterona na saliva permaneceu estável durante a maior parte da fase lútea antes de



diminuir acentuadamente durante os últimos 3 dias antes do início da menstruação. Em contraste, a concentração de progesterona em mulheres assintomáticas sofreu um declínio gradual nos últimos 8 dias antes da menstruação. Dessa forma, os autores sugerem que os sintomas da TPM surgem não pela baixa concentração de progesterona, mas sim devido à queda abrupta que ocorre nos dias anteriores à menstruação (LOVICK et al., 2017).

Além dos estudos em mulheres, os estudos realizados em animais de laboratório, especialmente ratas, têm auxiliado no progresso do entendimento da influência sexual nas diferenças da manifestação do TP. Como nas mulheres, é válido ressaltar que em roedores comumente utilizados em laboratórios, como ratos e camundongos, o padrão de produção e ciclicidade dos hormônios sexuais supramencionados também ocorre. Esse assunto será abordado com mais abrangência na próxima sessão.

### **1.3.3. Ciclo estral em roedores**

O ciclo hormonal dos roedores é chamado de ciclo estral (ou cio). A rata é um animal mamífero poliétrico que ovula espontaneamente em intervalos de 4 ou 5 dias ao longo de sua vida reprodutiva, exceto durante a gravidez, a pseudogravidez e a lactação (CORA; KOOISTRA; TRAVLOS, 2015; FREEMAN, 2006). Nesse aspecto, e assim como nas mulheres, dois hormônios são produzidos em maior quantidade pelos ovários: o estrogênio e a progesterona, e estes atuam no cérebro para estimular os eventos hormonais que resultam na ovulação e em comportamentos sexuais (BECKER et al., 2005; FREEMAN, 2006).

De maneira similar às mulheres, o ciclo estral é composto também por quatro fases: 01) Proestro: nesta fase, os eventos hormonais, morfológicos e citológicos que ocorrem são similares ao da fase folicular humana, isto é, o estrogênio aumenta dramaticamente, agindo no cérebro para desencadear a liberação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), que induz um aumento de LH da hipófise, levando a ovulação. O nível de progesterona aumenta algumas horas antes da ovulação, contribuindo para o processo; 02)

Estro: após o pico de liberação de LH, nessa etapa ocorre a ovulação, e no caso desses animais, múltiplos ovócitos são liberados. Os níveis de  $17\beta$ -estradiol (estrogênio) começam a cair, enquanto os níveis de progesterona começam a crescer gradualmente, até atingir um platô; 03) Metaestro: equipara-se do início à metade da fase lútea, no qual, não havendo a fecundação do ovócito, os níveis de  $17\beta$ -estradiol se mantem a níveis baixos, enquanto da progesterona ainda continuam em um platô, devido à estimulação das células do corpo lúteo e 04) Diestro: equivale-se ao final da fase lútea e à fase isquêmica, sendo que neste período ocorre uma queda abrupta nos níveis de progesterona, começando assim novamente o ciclo (BECKER et al., 2005; FREEMAN, 2006).

Tendo em vista a similaridade morfológica e hormonal, bem como a diferença na temporalidade dos ciclos menstrual e estral, estudos em ratas têm se mostrado ferramentas importantes e muito mais rápidas para avaliar questões que envolvem o ciclo menstrual. É importante reiterar que estudos que correlacionam os transtornos de ansiedade, incluindo o TP a comportamentos de animais de laboratório, vêm sendo realizados há muito tempo (como já descrito na sessão 1.2) no entanto, e como já mencionado, é digno de nota que a maioria desses trabalhos é realizado em animais machos (HUGHES, 2019; LOVICK; ZANGROSSI, 2021). O motivo para isso é que muitos pesquisadores atribuem um maior viés à pesquisa causada pela variação cíclica dos hormônios durante o ciclo, que acarretaria na constante mudança química no cérebro feminino, uma vez que esses compostos são geralmente lipofílicos, passando facilmente a barreira hematoencefálica. Todavia, deve-se mencionar que os hormônios sexuais também podem impactar no comportamento masculino, embora isso seja invariavelmente negligenciado nos testes com machos (LOVICK; ZANGROSSI, 2021).

#### **1.3.4. Diferenças sexuais e efeito do ciclo estral de ratas em testes comportamentais de ansiedade/pânico**

Diversas revisões recentes na literatura buscam analisar e apontar as diferenças sexuais existentes no comportamento de animais quando testados em modelos que avaliam a ansiedade e o pânico (DONNER; LOWRY, 2013;

KOKRAS; DALLA, 2014; LOVICK; ZANGROSSI, 2021). É importante destacar que os resultados encontrados nesses estudos são bastante conflitantes. Nesse sentido, quando avaliado o comportamento de machos e fêmeas, por exemplo, no modelo do LTE, trabalhos mostram tanto uma similaridade no comportamento de esquiva inibitória entre os sexos (GOUVEIA et al., 2004; ROCINHOLI; LANDEIRA-FERNANDEZ, 2011; SANTOS et al., 2014), quanto um menor comportamento ansioso de fêmeas (SLOTTEN et al., 2006). O mesmo é observado quando os animais são testados no teste do campo aberto, sendo que um estudo não mostra diferenças comportamentais entre ratos e ratas (KNIGHT et al., 2021), enquanto outros mostram uma maior responsividade ao teste pelas fêmeas (BEATTY; FESSLER, 1976; BLIZARD; LIPPMAN; CHEN, 1975; FRICK et al., 1999; FRITZ; AMREIN; WOLFER, 2017; MASUR; SCHUTZ; BOERNGEN, 1980). Quando analisado em um teste de medo – o susto potencializado pelo medo – o mesmo panorama é observado, mostrando nenhuma diferença entre os sexos (DE JONGH et al., 2005; GRESACK et al., 2009; MAREN; DE OCA; FANSELOW, 1994; PETTERSSON; HAGSÄTER; ERIKSSON, 2016) ou uma maior reatividade ao teste pelas fêmeas (KEISER et al., 2017).

É importante mencionar que nesses estudos com resultados conflitantes, as fêmeas são analisadas como um grupo só, ou seja, não são levadas em conta as diferentes fases do ciclo estral. Como já mencionado anteriormente, é de suma importância avaliar esse fator, uma vez que as alterações hormonais que acontecem nas diferentes fases podem estar afetando o desempenho dos animais nos testes comportamentais. Nesse contexto, estudos que buscaram avaliar o efeito das fases do ciclo estral encontraram diferenças bastante interessantes. Pesquisas utilizando o LCE mostram que fêmeas em proestro e estro têm menor ansiedade em comparação a fase de diestro, que seria similar a TPM nas mulheres (D'SOUZA; SADANANDA, 2017; DÍAZ-VÉLIZ; DUSSAUBAT; MORA, 1997; FRYE; PETRALIA; RHODES, 2000; MARCONDES et al., 2001; MOLINA-HERNÁNDEZ et al., 2013; RODRÍGUEZ-LANDA et al., 2014, 2021). Também é observado o mesmo resultado, ou seja, de um maior nível de ansiedade em ratas na fase de diestro em comparação as outras fases do ciclo, no LTE (GOUVEIA et al., 2004), no teste do claro/escuro (KOKRAS et

al., 2012; RODRÍGUEZ-LANDA et al., 2021; ZULUAGA et al., 2005), no teste da vocalização ultrassônica (BROWNING et al., 2017; PENTKOWSKI et al., 2018) e no teste da extinção do medo (CARVALHO et al., 2021; MILAD et al., 2009).

No que diz respeito ao pânico, ainda são escassos os trabalhos mostrando o efeito do sexo e da fase do ciclo sobre comportamentos de roedores de laboratório. Um dos poucos trabalhos que avaliaram essas questões foi o executado por Devall e colaboradores (2015). Utilizando a fuga induzida pela estimulação elétrica da SCPd como índice de pânico, os autores observaram uma resposta muito similar aos trabalhos com testes de ansiedade, eles observaram que o limiar para evocar a fuga nas ratas é menor no diestro em comparação as outras fases do ciclo, indicando e reforçando a ideia de uma susceptibilidade ao pânico nas fêmeas nesse período (DEVALL et al., 2015).

Além desse achado bastante importante, os pesquisadores procuraram avaliar como os hormônios sexuais poderiam estar influenciando na manifestação do comportamento de fuga expresso pelas ratas. Dentre os hormônios importantes, o grupo destacou a progesterona, e particularmente o seu metabólito neuroativo, a allopregnanolona (ALLO). Dando embasamento para essa escolha, estavam trabalhos que mostravam que a queda da ALLO era um fator fundamental para a susceptibilidade das fêmeas à ansiedade e pânico. Por exemplo, Bitran e colaboradores (1995) observaram que a administração de progesterona a ratas ovariectomizadas promovia uma diminuição da ansiedade no LCE. Estes pesquisadores foram além, e tentaram entender se o efeito era de fato da progesterona ou da ALLO. Dessa forma, os autores administraram sistemicamente o RU38486, um antagonista de receptores de progesterona, previamente a administração do hormônio em si. Assim, foi observado que o mesmo comportamento ansiolítico era expresso pelas ratas, o que não ocorria quando se administrava o 4-MA, um inibidor da 5 $\alpha$ -redutase, enzima responsável pela conversão da progesterona em ALLO. Portanto, os autores observaram que o efeito ansiolítico da progesterona neste modelo animal não era do hormônio em si, mas de seu metabólito, a ALLO (BITRAN; SHIEKH; MCLEOD, 1995).

A ALLO é um esteroide produzido em tecidos periféricos e no encéfalo, e como já mencionado, é um produto do metabolismo do hormônio progesterona.

Os passos bioquímicos da conversão da progesterona em ALLO tem como composto precursor inicial o colesterol (Figura 1). Inicialmente, o colesterol é transportado para dentro das mitocôndrias e através da ação da enzima citocromo-P-450 de clivagem de cadeia lateral (P450scc) ele é convertido em pregnanolona (PREG). A PREG no citoplasma passará por diversos processos enzimáticos para a formação dos esteróides sexuais e seus metabólitos. No caso da formação da progesterona e da ALLO as etapas que ocorrem são: primeiramente, a PREG será metabolizada em progesterona através da enzima 3β-hidroxi-esteróide desidrogenase (3β-HSD), que por sua vez será reduzida em 5α-di-hidroprogesterona pela enzima 5α-redutase e esta última é reduzida em ALLO, através da enzima 3α-hidroxi-esteróide desidrogenase (3α-HSD; SCHÜLE; NOTHDURFTER; RUPPRECHT, 2014).

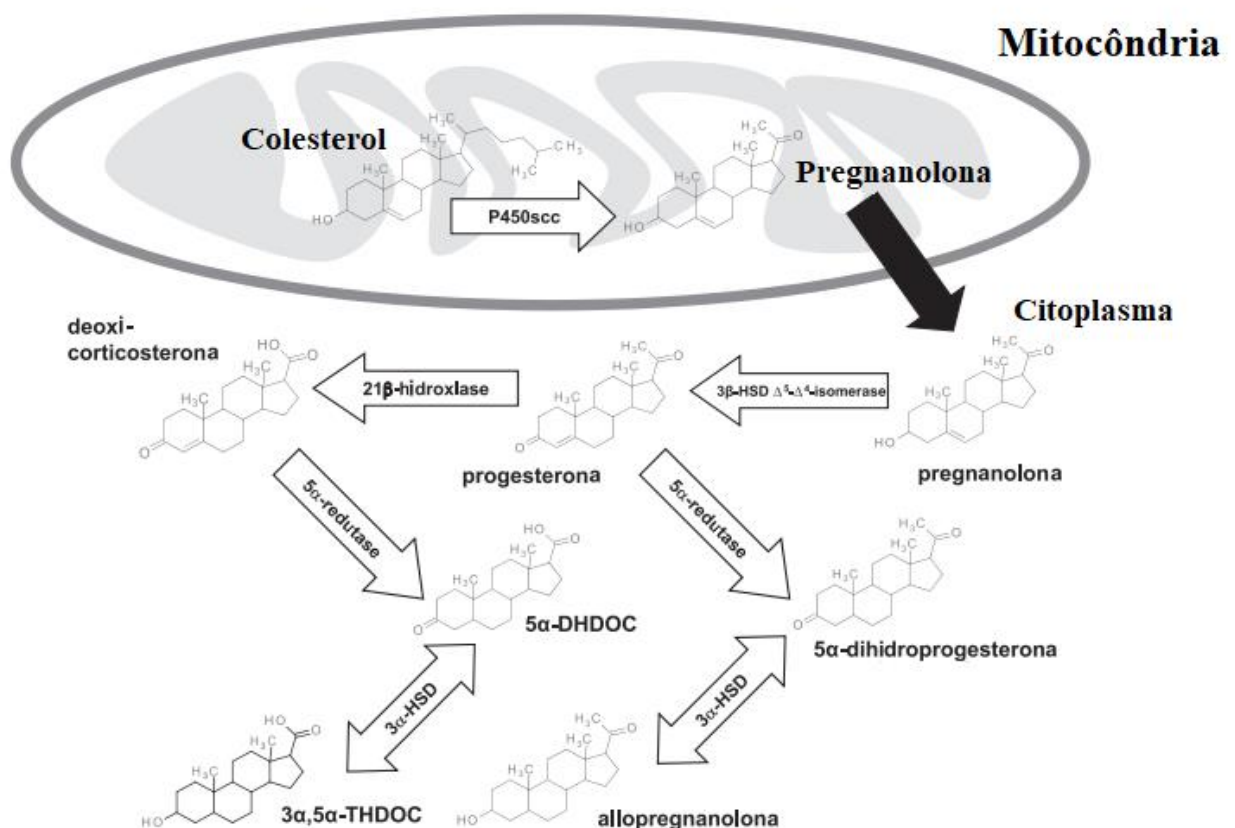


Figura 1: Síntese de neuroesteróides. P450scc = enzima citocromo-P-450 de clivagem de cadeia lateral; HSD = hidroxiesteroide desidrogenase; THDOC = tetrahydrodeoxicorticosterona. Foto retirada e modificada de SCHÜLE; NOTHDURFTER; RUPPRECHT, 2014.

No que concerne a ação da ALLO, é importante ressaltar que os esteroides neuroativos são capazes de agir não somente em vias clássicas esteroidais, ou seja, agindo na transcrição do material genético, mas também alteram a excitabilidade neuronal através da sua relação com outras neurotransmissões, especialmente com a GABAérgica, se ligando a receptores do tipo A (GABA-A) (SCHÜLE; NOTHDURFTER; RUPPRECHT, 2014).

Receptores GABA-A são canais iônicos pentaméricos compostos por duas subunidades  $\alpha$  ( $\alpha 1-6$ ), duas subunidades  $\beta$  ( $\beta 1-3$ ) e uma subunidade adicional ( $\gamma 1-3$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$  ou  $\pi$ ). Cada subunidade é composta por um grande domínio extracelular, um domínio transmembrana formado por quatro hélices que abrangem a membrana, um longo loop intracelular e um C-terminal extracelular curto (OLSEN; SIEGHART, 2008; SIGEL; STEINMANN, 2012). Os neuroesteroides são capazes de se ligar em sítios localizados no domínio transmembrana do receptor GABA-A, podendo agir de maneira modulatória alostérica positiva, ou seja, potenciando o efeito do GABA endógeno no receptor como é o exemplo da ALLO, como também de maneira alostérica negativa, inibindo as correntes GABAérgicas, tendo como exemplos a epialopregnanolona e o sulfato de pregnenolona (LOVICK, 2014; MCEVOY; OSBORNE, 2019; NILLNI; TOUFEXIS; ROHAN, 2011; SUGASAWA et al., 2020).

No trabalho de 2015, Devall e colaboradores utilizaram a fluoxetina em dose baixa como um indutor da neurosteroidogênese, especialmente da ALLO, sem alterar os níveis de 5-HT encefálicos (DEVALL et al., 2015; PINNA; COSTA; GUIDOTTI, 2009; SERRA et al., 2001; UZUNOV et al., 1996). Os autores fizeram a administração da fluoxetina em dois momentos: uma na tarde do metaestro e uma na manhã do diestro, uma hora antes do teste. Esse protocolo foi adotado no sentido de evitar com que ocorresse a queda abrupta da progesterona e da ALLO que ocorre neste período do ciclo. Conforme esperado, a administração de FLX, na dose baixa e no regime utilizado, foi capaz de aumentar o limiar de estimulação da SCPd para evocar o comportamento de fuga nas ratas em diestro, um efeito panicolítico (DEVALL et al., 2015).

Nesse contexto, os dados encontrados vão de encontro à proposta de Lovick (2014), que sugere que o aumento dos comportamentos relacionados aos transtornos psiquiátricos que ocorre na fase pré-menstrual não é devido diretamente à queda abrupta da progesterona e sim à flutuação, mais especificamente, à queda de seu metabólito neuroativo, a ALLO.

Tendo em vista o exposto acima e, já sabendo que são escassos os estudos em animais sobre o impacto das fases do ciclo hormonal de fêmeas em comportamentos relacionados ao pânico, bem como o substrato neural envolvido nessas respostas no sexo feminino, o objetivo geral desse estudo foi verificar a generalidade dos achados de Devall e colaboradores (2015) em um outro teste comportamental, mais naturalístico, que associa a resposta de fuga ao pânico, o teste de exposição à 7% de O<sub>2</sub> (hipóxia). Ademais, como fator inédito, investigar as bases neurais adjacentes aos comportamentos expressos pelas fêmeas nesse modelo experimental. O teste comportamental utilizado foi desenvolvido e validado em nosso laboratório. Em ratos machos, foi observado que a queda lenta e gradual da concentração de O<sub>2</sub> ambiental até 7% é capaz de gerar o comportamento de saltos contra a borda da câmara experimental nesses animais, que é considerado como uma tentativa de fuga do ambiente experimental (FERNANDES et al., 2019; SPIACCI et al., 2015). Além disso, a administração de drogas utilizadas na clínica para o tratamento do TP, como a FLX e o alprazolam, causam uma diminuição da reação de fuga, um efeito panicolítico (SPIACCI et al., 2015).

Buscando avaliar essas questões, no nosso primeiro experimento, comparamos os efeitos da hipóxia entre machos e fêmeas, e, neste último caso, também avaliamos as diferentes fases do ciclo estral. Já no segundo experimento, buscamos analisar o efeito da administração aguda da dose baixa de FLX no comportamento de fêmeas na fase de diestro no mesmo modelo comportamental referido. Não se é bem estabelecido na literatura o mecanismo pelo qual a FLX em dose baixa age como um agente neuroesteroidogênico. No entanto, trabalhos mostram que há aumento nos níveis de ALLO após a

administração aguda dessa droga (DEVALL et al., 2015; FRY et al., 2014; PINNA; COSTA; GUIDOTTI, 2004, 2009).

Após a conclusão das análises comportamentais, os encéfalos desses animais foram utilizados para se avaliar o padrão de ativação neuronal subjacente ao comportamento expresso no teste da hipóxia. Para isso empregamos a técnica de imunistoquímica para dupla-marcação da proteína c-Fos e da TPH. Evidências na literatura mostram que ratos machos quando expostos à fuga do LTE apresentam um aumento nos níveis de neurônios não-serotonérgicos tanto nas alDR quanto na SCPd (SPIACCI; COIMBRA; ZANGROSSI, 2012; VILELA-COSTA et al., 2019).

A hipótese a ser testada é que devido à queda abrupta da ALLO que ocorre no diestro (BUTCHER; COLLINS; FUGO, 1974), as ratas nessa fase do ciclo expostas à hipóxia apresentem um aumento nas tentativas de fuga em comparação as outras fases do ciclo, e que a administração da dose baixa de FLX, que impede a queda natural no nível do esteroide, seja capaz de atenuar o comportamento das ratas nessa fase do ciclo. Somado a isso esperamos que o desafio respiratório induza um maior recrutamento de neurônios não-serotonérgicos das alDR e da SCPd nas ratas em diestro, e que esse recrutamento seja menor após a administração de FLX.

Por fim, no terceiro experimento, avaliamos o efeito comportamental da administração aguda de finasterida em ratas na fase de proestro e diestro, durante a exposição desses animais à hipóxia. A finasterida é um inibidor da 5 $\alpha$ -redutase, enzima-chave que participa da conversão da progesterona em ALLO (SCHÜLE; NOTHDURFTER; RUPPRECHT, 2014). Estudos mostram que a administração de finasterida é capaz de diminuir os níveis de ALLO (DAZZI et al., 2002; RHODES; FRYE, 2001). É válido ressaltar que na fase de proestro, os níveis séricos e encefálicos de ALLO estão em altas concentrações (BUTCHER; COLLINS; FUGO, 1974; DONNER; LOWRY, 2013; FREEMAN, 2006) e estudos que utilizaram a finasterida como agente anti-esteroidogênico em fêmeas nessa fase do ciclo mostraram um efeito ansiogênico no teste do campo aberto e no labirinto em cruz elevado (FRYE; WALF, 2002; SMITH et al., 2006; WALF; SUMIDA; FRYE, 2006). Dessa forma, a hipótese a ser testada é que a



administração aguda de finasterida nas ratas em diestro não seja capaz de alterar o comportamento, mas que em proestro essa droga terá um efeito panicogênico devido à queda nos níveis da ALLO.

# Objetivos

---

## **2. OBJETIVO GERAL**

Analisar a influência do ciclo estral e de fármacos que alteram a síntese de esteróides, mais especificamente, a fluoxetina e a finasterida, no comportamento de fuga de ratas expostas ao desafio respiratório da hipóxia. Nesses mesmos animais, avaliar o perfil de ativação neuronal subjacentes as alterações comportamentais observadas, com foco no NDR e SCP.

### **2.1 Objetivos específicos**

- Comparar o comportamento de ratos e ratas, nas diferentes fases do ciclo estral, durante a exposição ao teste da hipóxia, bem como analisar o perfil de ativação neuronal através de imunoistoquímica de dupla-marcação para c-Fos e TPH no NDR e na SCP.
- Analisar o efeito da administração aguda e sistêmica de FLX (1,75 ou 10 mg/kg) no comportamento e no padrão de ativação neural do NDR e da SCP em ratas em diestro expostas à hipóxia.
- Investigar os efeitos da administração aguda e sistêmica de finasterida (50 mg/kg) no comportamento de ratas no proestro e diestro submetidas à hipóxia.

# Material e Métodos

---

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais**

Foram utilizados ratos e ratas da linhagem *Sprague Dawley*, provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo – Câmpus de Ribeirão Preto, com 8 a 9 semanas de idade no dia dos procedimentos experimentais. Os animais permaneceram no biotério do Laboratório de Farmacologia do Comportamento, onde ficaram alojados em grupos de 5 animais, em caixas de polipropileno (38 x 32x 18 cm), forradas com serragem, tendo livre acesso à água e comida durante todo o procedimento. O biotério foi mantido em condições padrões, com temperatura de  $22\pm 1^{\circ}\text{C}$  e com ciclos de claro-escuro de 12 horas, sendo o período iluminado (intensidade de 60 lux) das 7:00 às 19:00 horas. Os procedimentos experimentais adotados neste estudo foram aprovados pelo comitê de ética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (protocolo número: 189/18). Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais e reduzir o número de animais utilizados.

#### **3.2 Esfregaço vaginal**

Todas as ratas passaram por um procedimento de esfregaço vaginal para a determinação do estágio de seu ciclo estral. O esfregaço vaginal foi coletado pela manhã (08:00-09:00 h), por 5 dias consecutivos antes dos experimentos, sendo que em cada um desses dias, os animais foram manipulados pelo experimentador por 5 minutos, antes do procedimento. Para a coleta do esfregaço vaginal, uma alça de inoculação foi esterilizada em chama, mergulhada em água estéril e, em seguida, inserida suavemente na vagina para coletar as células, que foram então espalhadas em uma lâmina de vidro. Os esfregaços foram corados com um conjunto de coloração Panótico Rápido (Laborclin, Brasil), que consiste em 3 soluções nas quais as lâminas foram mergulhadas na seguinte sequência: 1<sup>a</sup>: triarilmetano a 0,1%, 2<sup>a</sup>: xantenos a 0,1% e 3<sup>a</sup>: tiazinas a 0,1%.

Com base na citologia vaginal, os estágios do ciclo foram classificados como proestro: predominância de células nucleadas epiteliais; estro: predominância de células queratinizadas; metaestro: predominância de leucócitos com núcleos lobulares bem definidos; e diestro: predominância de leucócitos amorfos e desintegrantes (Figura 2; BRACK; LOVICK, 2007; DEVALL et al., 2015). Apenas ratas que apresentavam um ciclo regular foram utilizadas para o presente estudo. Os ratos machos utilizados no experimento 1 foram submetidos individualmente ao procedimento de manipulação e a uma simulação de coleta de esfregaço vaginal, pelo mesmo período de tempo descrito acima para as fêmeas. Esta simulação consistiu em segurar os animais machos da mesma forma que as fêmeas, mas sem qualquer estímulo adicional.

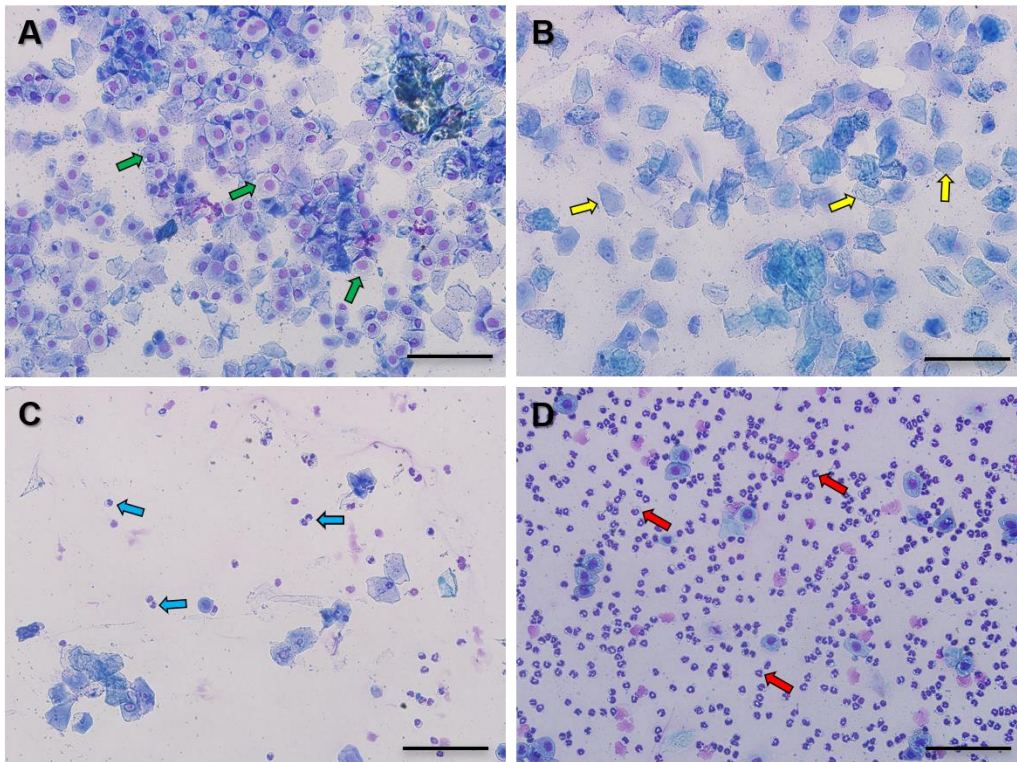


Figura 2: Fotomicrografia ilustrando as quatro fases do ciclo estral (A: Proestro; B: Estro; C: Metaestro; D: Diestro) obtidas pelo esfregaço vaginal e subsequente coloração com panóptico rápido. As flechas verdes representam células nucleadas epiteliais; flechas amarelas representam células queratinizadas; flechas azuis representam leucócitos com núcleos lobulares bem definidos; flechas vermelhas representam leucócitos amorfos e desintegrantes. Barra de escala = 50µm.

### 3.3 Drogas

Foram utilizados o cloridrato de fluoxetina (Cristália, Brasil), que foi diluído em solução salina 0,9% com 2% de Tween 80. Já a finasterida (Zhejiang Xianju Junye Pharmaceutical Industry Co., China) foi diluída solução salina 0,9% com 5% Tween 80.

### 3.4 Aparato experimental

A câmara de exposição à hipóxia (Figura 3) é constituída por uma arena cilíndrica (25 cm de diâmetro) com paredes de acrílico transparente (35 cm de altura), vedada hermeticamente, contendo 2 válvulas. A primeira, localizada na parte superior da câmara, é conectada à uma bomba de ar e um cilindro de nitrogênio (N<sub>2</sub>), enquanto a segunda, localizada na parte

inferior da câmara, é acoplada a um analisador de gás (ML206 Gas Analyzer; AD Instruments, Austrália), que monitora continuamente as concentrações dos gases dentro da câmara. A hipóxia é induzida pela administração de N<sub>2</sub> a uma taxa de fluxo de 4,5 L/min, por aproximadamente 4 minutos. As concentrações de O<sub>2</sub> monitoradas pelo analisador de gás foram exibidas em um software (PowerLab) executando o programa Chart 5 (AD Instruments).

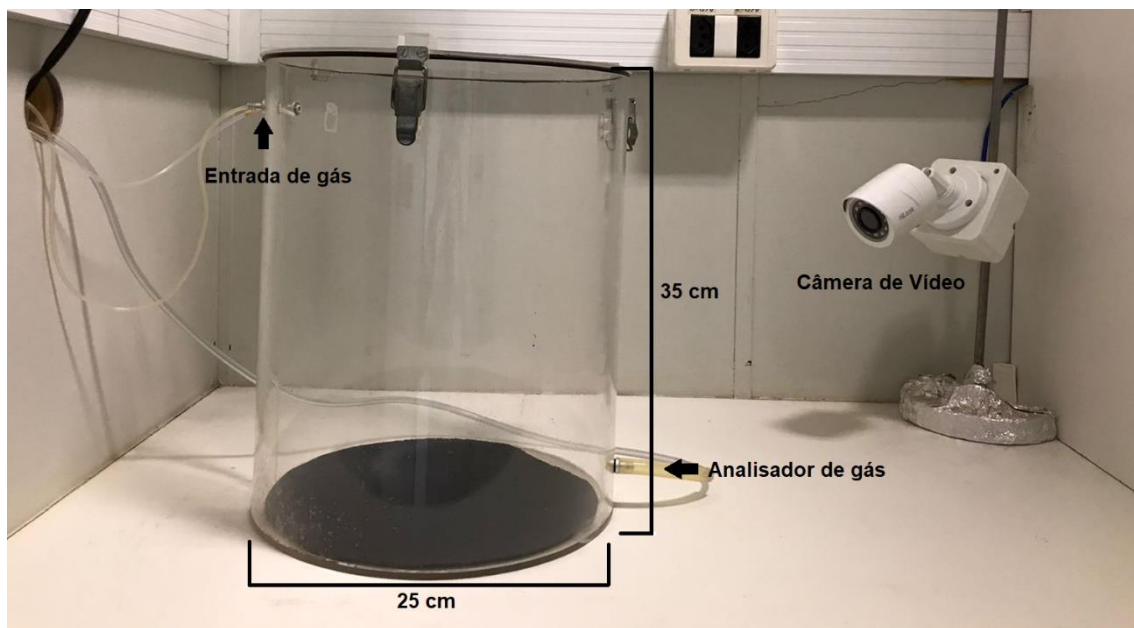


Figura 3: Câmara experimental utilizada na exposição de ratos à hipóxia

### 3.5 Protocolo experimental

Experimento 1: Comparação do comportamento de ratos e de ratas, nas diferentes fases do ciclo estral, após a exposição ao teste da hipóxia, e análise do perfil de ativação neuronal através de imunistoquímica de dupla-marcação para c-Fos e TPH no NDR e na SCP



### Procedimento comportamental

Um dia antes do desafio de hipóxia e 15 minutos após a realização do esfregaço vaginal, ou da simulação feita em machos, cada animal foi colocado individualmente na câmara experimental. Durante esta sessão de habituação, ar ambiente foi liberado na câmara a uma taxa de fluxo de 4,5 L/min por 15 minutos, para familiarizar os animais ao fluxo de gás e ao som do jato de ar e para evitar uma reação neofóbica à exposição subsequente à câmara. Vinte e quatro horas depois, uma nova coleta, ou simulação de esfregaço vaginal, foi realizada no horário regular e, 15 minutos depois, os animais foram colocados novamente na câmara experimental e submetidos ao desafio de hipóxia (grupo HOX), ou expostos ao ar atmosférico (grupo controle normóxia - NOX). Para todos os grupos, o ar ambiente foi liberado na câmara a uma taxa de fluxo de 4,5 L/min durante os primeiros 5 minutos. Para os animais alocados aleatoriamente no grupo HOX, o N<sub>2</sub> foi então liberado na câmara (4,5 L/min) por aproximadamente 4 minutos para atingir gradualmente uma concentração de 7% de O<sub>2</sub>. Neste ponto, a infusão de N<sub>2</sub> foi suspensa e a condição de hipóxia foi mantida por 6 minutos. Para os animais do grupo controle, o ar atmosférico foi liberado, na mesma vazão, pelo restante do período de teste (10 minutos). Os ratos foram então removidos da câmara e devolvidos à sua caixa de origem.

Os seguintes grupos foram formados: machos em normóxia (machos/NOX, n = 5), machos em hipóxia (machos/HOX, n = 13), fêmeas em normóxia (fêmeas/NOX, n = 10) e fêmeas em hipóxia (fêmeas/HOX, n = 38). Este último grupo foi subdividido nos seguintes grupos, de acordo com o estágio do ciclo estral: proestro (PRO/HOX, n = 10), estro (EST/HOX, n = 8), metaestro (MET/HOX, n = 10) e diestro (DI/HOX, n = 10).

O comportamento dos animais foi registrado durante todo o experimento usando uma câmera de vídeo conectada a um gravador de DVD. O número de saltos, considerados como tentativas de fuga, durante o desafio de hipóxia, foi computado manualmente off-line por um experimentador cego para os tratamentos utilizados. A atividade locomotora foi avaliada registrando-se a distância total percorrida nos primeiros 5 minutos do teste, quando os animais

foram expostos ao ar atmosférico. Para esta análise, foi utilizado um sistema de rastreamento de vídeo (ANY-Maze, EUA).

#### Coleta e preparação tecidual

Duas horas após o experimento, os animais foram profundamente anestesiados com uretana (1,25 g/kg; Sigma, EUA) e então perfundidos transcardialmente com solução salina tamponada com fosfato 0,01 M (PBS, pH 7,4), seguido de paraformaldeído a 4% em PBS (pH 7,4) a 4°C. Os cérebros foram imediatamente removidos, pós-fixados por 2 horas na mesma solução fixadora, lavados em PBS e, em seguida, imersos em solução crioprotetora (30% de sacarose em PBS 0,2M, pH 7,4) a 4°C por 5 dias. Em seguida, os cérebros foram rapidamente congelados em isopentano em gelo seco e armazenados a -20°C. Secções coronais seriais de 40 µm de espessura contendo o NDR e a SCP foram cortadas em três sets usando um criostato (Leica Microsystems, Alemanha) e armazenadas em PBS. Apenas um dos três sets foi utilizado para realizar a imunistoquímica.

#### Procedimento imunohistológico

As seções do encéfalo contendo o NDR e SCP foram duplamente imunomarcadas para proteína c-Fos e TPH, usando uma metodologia de imunistoquímica “*free floating*” conduzida em um agitador orbital. O protocolo utilizado foi baseado em estudo anterior em nosso laboratório (VILELA-COSTA et al., 2019). Primeiramente, a coloração para c-Fos foi realizada da seguinte forma: os cortes foram lavados 3 vezes em PBS e a peroxidase endógena foi inativada por imersão em peróxido de hidrogênio a 1% em PBS por 10 minutos, seguido de lavagem em PBS 4 vezes. As seções de tecido foram então incubadas em uma solução bloqueadora de 1% de albumina sérica bovina (BSA) em PBS por 30 minutos e, depois, incubadas durante a noite com um anticorpo policlonal de coelho anti-c-Fos (ABE457, 1:1000; Merck, Alemanha). Após incubação no anti-soro primário, os cortes foram lavados em PBS e, posteriormente, incubados por 2 horas com anticorpo de cabra anti-coelho biotilado (1:1000, Vectastain; Vector Laboratories, EUA). Os cortes de tecido foram então incubados por 2 horas em complexo avidina-biotina (kit Vectastain

ABC, Vector Laboratories). A imunorreatividade de c-Fos foi revelada após a imersão dos cortes em uma solução contendo 0,02% de tetracloridrato de 3,3'-diaminobenzidina (DAB), 0,0015% de peróxido de hidrogênio e 0,05% de sulfato de níquel amônio em PBS por 10 minutos.

Após a conclusão da imunocoloração para c-Fos, as seções de tecido foram lavadas 4 vezes em PBS e processadas para imunocoloração TPH. Para isso, os cortes foram incubados durante a noite com anticorpo policlonal anti-TPH de ovelha (AB1541, 1:1000; Millipore, EUA). Após a incubação no anticorpo primário, os cortes foram lavados em PBS, sequencialmente incubados por 2 horas com anticorpo anti-ovelha biotilado (PK-6106, 1:1200; Vectastain, Vector Laboratories) e lavados 3 vezes com PBS. Os cortes foram então incubados com complexo avidina-biotina (kit Vectastain ABC, Vector Laboratories) por uma hora e lavados 3 vezes em PBS. A imunorreatividade da TPH foi revelada após a imersão dos cortes em uma solução contendo 0,02% de DAB e 0,0015% de peróxido de hidrogênio em PBS por 10 minutos. As seções foram então lavadas 4 vezes em PBS para parar a reação. As seções de tecido foram então montadas em lâminas de vidro revestidas com gelatina, desidratadas em uma série de álcool graduada, clareadas em xilol e cobertas com lamínula usando meio de montagem histológico Permount (Fisher Scientific, Reino Unido).

#### Análises e quantificações

Para os procedimentos de imunistoquímica, os encéfalos marcados foram visualizados em um microscópio (Olympus DX50- Tóquio, Japão) e fotomicrografias representativas foram feitas com uma câmera digital conectada a um computador com o software Image Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, EUA). A imunocoloração c-Fos foi visualizada como produto de reação marrom-preto localizado no núcleo. A imunorreatividade do TPH apresentou-se como produto de imunorreação marrom-alaranjado, localizado no citoplasma e dendritos proximais. Somente aqueles perfis imunorreativos com um limite bem definido e produto de imunorreação estendendo-se até os dendritos proximais foram aceitos para contagem. As contagens de células foram realizadas com ampliação de 200x por um investigador cego aos grupos experimentais. O

número total de células imunorreativas c-Fos (c-Fos-IR), neurônios imunorreativos a TPH (TPH-IR), ou neurônios duplamente imunomarcados c-Fos + TPH (c-Fos + TPH-IR) nas diferentes subregiões do NDR foram analisados em quatro níveis do eixo rostrocaudal (a saber, eixos rostral, médio-rostral, médio-caudal e caudal). Já com relação as colunas da SCP, o número de células c-Fos-IR foi quantificado em três níveis do eixo rostrocaudal (a saber, eixos rostral, médio e rostral). As divisões e coordenadas do NDR e SCP utilizadas neste estudo foram realizados com base em estudos anteriores (SPIACCI; COIMBRA; ZANGROSSI, 2012; VILELA-COSTA et al., 2019; YAMASHITA et al., 2017). Em cada nível, duas a três seções imunomarcadas foram selecionadas para contagem e os resultados obtidos foram calculados em média. Em cada secção, uma área conhecida foi desenhada eletronicamente para delinear os limites dos diferentes subnúcleos do NDR ou SCP, conforme definido no atlas de Paxinos e Watson (2006). O número de células marcadas dentro da área foi contado e a densidade celular (células/mm<sup>2</sup>) calculada.

As amostras do NDR variaram entre -6,84 e -9,00 mm caudal ao bregma. As subdivisões analisadas foram: o DRD no nível rostral (-6,84 a -7,08 mm do bregma), o DRD, DRV e nas alDR no medio-rostral (-7,20 a -7,80 mm do bregma) e médio-caudal (-7,92 a -8,28 mm do bregma), e o DRC e DRI no nível caudal (-8,52 a -9,00 mm do bregma). O número de células nas alDR foi a soma das células contadas nos lados direito e esquerdo deste subnúcleo. Na SCP, o número de células c-Fos-IR foi analisado da seguinte forma: nos níveis rostral (-6,60 a -6,84 mm do bregma) e médio (-7,32 a -7,80 mm do bregma), as colunas contabilizadas foram a dmSCP, dISCP, ISCP e vISCP. No nível caudal (-8,28 a -8,52 mm do bregma), as colunas investigadas foram a dmSCP, ISCP e vISCP. O número de células contabilizadas em cada secção contendo a dISCP, ISCP ou vISCP representa a soma das células contadas nos lados esquerdo e direito dessas colunas.

Nesse experimento, comparamos o efeito da hipóxia em cortes encefálicos de machos e de fêmeas em proestro (baixa resposta comportamental à hipóxia) e diestro (resposta comportamental aumentada à hipóxia). Em relação ao grupo controle (normóxia) de fêmeas, uma vez que os experimentos não indicaram diferenças comportamentais entre as fases do ciclo estral, o grupo fêmeas/NOX

formado para as análises imunoistológicas incluiu cortes encefálicos de todas as quatro fases do ciclo (PRO = 1; EST = 3; MET = 1; DI = 2).

Para quantificação, selecionamos o material em que a coloração imunoistológica foi ideal. Por isso, o número de animais utilizados para a análise imunoistoquímica é menor do que para as análises comportamentais.

*Experimento 2: Análise do efeito da administração aguda e sistêmica de FLX (1,75 e 10 mg/kg) no comportamento e no padrão de ativação neural do NDR e da SCP em ratas em diestro expostas à hipóxia.*

Nesse experimento, foram utilizadas apenas fêmeas em diestro. As ratas foram manipuladas diariamente pelo experimentador e submetidos à coleta de esfregaço vaginal por 5 dias para avaliação da regularidade do ciclo, conforme já descrito. Esse procedimento diário foi então continuado até a observação da próxima fase de metaestro. Neste dia, 15 minutos após a coleta do esfregaço vaginal, os animais foram colocados individualmente na gaiola experimental por 15 minutos para se habituarem às condições do teste, conforme descrito no experimento anterior. Posteriormente, no mesmo dia, entre 16:30 e 17:00 h, após serem alocados aleatoriamente em seus grupos de tratamento, os animais foram injetados intraperitonealmente (i.p.) com FLX 1,75 ou 10 mg/kg ou solução veículo. No dia seguinte, no horário regular da manhã (8:00-9:00 h), uma nova coleta de esfregaço vaginal foi realizada para confirmar que as fêmeas estavam em diestro. Nos casos positivos, 15 minutos depois, elas foram injetadas com FLX (1,75 ou 10 mg/kg i.p.) ou solução de veículo, em concordância com a administração realizada no dia anterior. Uma hora depois, todos os animais foram submetidos ao desafio de hipóxia, conforme descrito no experimento 1. Foram formados os seguintes grupos: veículo (n = 8), FLX 1,75 mg/kg (FLX 1,75, n = 8) e FLX 10 mg/ kg (FLX 10, n = 8).

A dose baixa de FLX e o protocolo de injeção foram selecionados com base em estudos anteriores (DEVALL et al., 2015; MACHADO FIGUEIREDO et al., 2019). Já a maior dose foi baseada também em estudos anteriores (SPIACCI et al., 2015; VILELA-COSTA et al., 2019).

Da mesma forma que no primeiro experimento, a perfusão e a coleta dos encéfalos foram realizados duas horas após o teste comportamental. Os procedimentos subsequentes ao teste comportamental foram feitos conforme descritos no experimento 1.

*Experimento 3: Investigação dos efeitos da administração aguda e sistêmica de finasterida no comportamento de ratas no proestro e diestro submetidas à hipóxia.*

Nesse experimento, as ratas passaram pelos procedimentos de manuseio e esfregaço vaginal conforme descritos na sessão 3.3. O esfregaço diário continuou até a observação da próxima fase de metaestro ou diestro. Nesse dia, 15 minutos após a coleta do esfregaço vaginal, os animais foram colocados individualmente na gaiola experimental por 15 minutos para se habituar às condições de teste. No dia seguinte, no horário regular da manhã (8:00 - 9:00 h), uma nova coleta de esfregaço vaginal foi realizada para confirmar que as ratas estavam ou no diestro ou no proestro. Em casos positivos, 15 minutos depois, elas foram injetadas sistemicamente (i.p.) com finasterida (FIN; 50 mg/kg) ou solução veículo. Após 30 minutos, os animais passaram pelo teste comportamental. Os seguintes grupos foram formados: PRO/Veículo, n = 6; PRO/FIN, n = 5; DI/Veículo, n = 6; e DI/FIN, n = 6).

A dose utilizada e o método de diluição foram baseadas em estudos prévios (FRAU et al., 2017a, 2017b; RHODES; FRYE, 2001).

### **3.6 Análise estatística**

No experimento 1, os dados comportamentais foram analisados por análise de variância (ANOVA) de duas vias tendo como fatores independentes o teste e o sexo. A ANOVA de uma via foi usada para comparar fêmeas em diferentes estágios do ciclo estral. No experimento 2, os dados comportamentais foram analisados por ANOVA de uma via. Já no experimento 3, os dados foram analisados utilizando a ANOVA de duas vias, sendo os fatores independentes a

fase do ciclo e o tratamento, além de teste *t* de Student entre os grupos não tratados farmacologicamente.

Quanto à contagem de células, no experimento 1, o número de células c-Fos-IR ou TPH-IR contadas no NDR e de células c-Fos-IR na SCP foi analisado separadamente para machos e fêmeas pelo teste *t* de Student e ANOVA de uma via, respectivamente. No experimento 2, foi utilizada ANOVA de uma via.

Em todos os casos, quando apropriado, comparações post hoc foram realizadas com o teste de Duncan. As análises estatísticas foram realizadas no software SPSS Statistics 20.0 (IBM SPSS Statistical, EUA). O nível de significância foi estabelecido em  $p \leq 0,05$ .

# Resultados

---



## 4. RESULTADOS

### **4.1 *Experimento 1: Comparação do comportamento de ratos e de ratas, nas diferentes fases do ciclo estral, após a exposição ao teste da hipóxia, e análise do perfil de ativação neuronal através de imunistoquímica de dupla-marcação para c-Fos e TPH no NDR e na SCP***

#### **4.1.1 Análises comportamentais**

A figura 4A mostra que a exposição à hipóxia provocou saltos em direção ao teto da câmara de gás em ambos os sexos. Este comportamento ativo não foi observado em nenhum dos animais expostos ao ar atmosférico. A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo do desafio respiratório [ $F(1, 62) = 12,36$ ;  $p < 0,001$ ], mas não do sexo [ $F(1, 62) = 2,20$ ; NS], nem interação entre o desafio e o sexo [ $F(1, 62) = 2,20$ ; NS]. Quando apenas machos e fêmeas expostas à hipóxia são avaliados, o teste *t* de Student mostrou que as fêmeas expressam maior número de saltos do que os machos [ $t(48) = 6,117$ ;  $p < 0,001$ ].

Para avaliar o efeito da hipóxia nas diferentes fases do ciclo estral, as fêmeas foram subdivididas de acordo com a fase do ciclo, com base na citologia vaginal. As ratas em todas as fases saltaram durante a hipóxia, mas esse comportamento foi maior nas fêmeas em diestro (Figura 4B). A ANOVA de uma via mostrou uma diferença significativa entre as fases do ciclo estral [ $F(3, 37) = 4,41$ ;  $p < 0,01$ ] e as comparações *post hoc* mostraram que as fêmeas em diestro saltaram significativamente mais do que aquelas na fase de proestro.

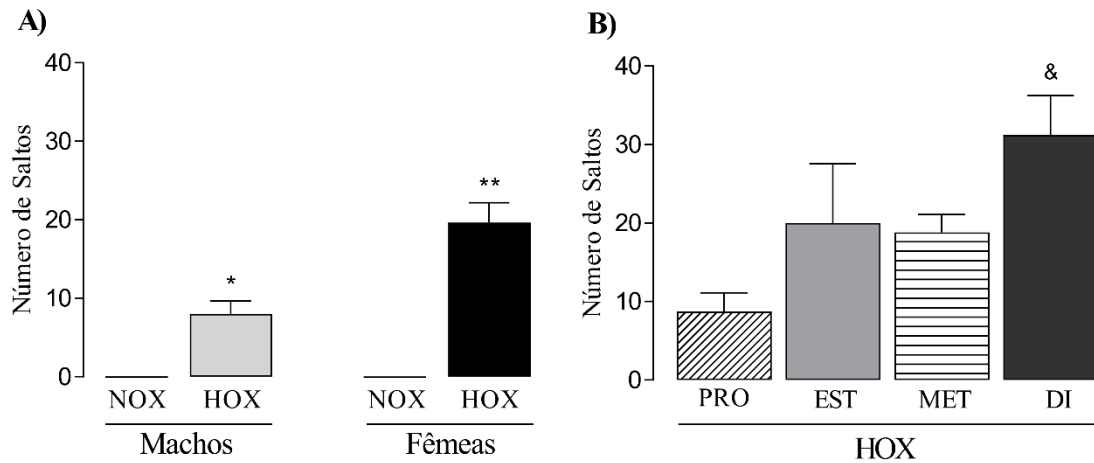


Figura 4: (A) Número de saltos realizados por machos e fêmeas durante a exposição ao ar atmosférico (normoxia - NOX) ou 7% O<sub>2</sub> (hipóxia - HOX) (machos/NOX, n = 5; machos/HOX, n = 13; fêmeas/NOX, n = 10; fêmeas/HOX, n = 38). (B) Efeito da exposição à hipóxia de fêmeas em diferentes fases do ciclo (proestro - PRO/HOX, n = 10; estro - EST/HOX, n = 8; metaestro - MET/HOX, n = 10; diestro - DI/HOX, n = 10) no número de saltos. Os dados são expressos como média ± erro-padrão médio (EPM). \*p < 0,01 e \*\*p < 0,001 em relação ao respectivo grupo controle (NOX); &p<0,001 em relação ao grupo PRO/HOX.

Com relação à atividade locomotora nos 5 minutos iniciais do teste, a Tabela 1 mostra que não houve diferença significativa entre os grupos quando comparados machos e fêmeas [Sexo: F(1,62) = 0,60, NS; Teste: F(1,62) = 3,47, NS; Interação: F(1,62) = 0,10, NS] e fêmeas nas diferentes fases do ciclo [F(3,37) = 1,23, NS].

Tabela 1: Distância percorrida (Média ± EPM) sob normóxia durante os primeiros cinco minutos de teste de animais do experimento 1.

<b>Sexo/Teste</b>	<b>Distância percorrida (m) ± EPM</b>
<b><i>Machos</i></b>	
NOX	3,14 ± 0,40
HOX	3,80 ± 0,34
<b><i>Fêmeas</i></b>	
NOX	3,47 ± 0,22
HOX	3,94 ± 0,15
<b><i>Ciclo Estral</i></b>	
PRO/HOX	4,41 ± 0,39
EST/HOX	3,85 ± 0,30
MET/HOX	3,68 ± 0,22
DI/HOX	3,82 ± 0,24

Nesse experimento, os dados foram primeiramente analisados pela ANOVA de duas vias, tendo como fatores independentes o teste e o sexo. Na sequência, para comparação das fases do ciclo estral, a ANOVA de uma via foi utilizada. NOX= normóxia, HOX= hipóxia, PRO= proestro, EST= estro, MET= metaestro, DI= diestro.

#### **4.1.2 Análises imunoistológicas**

Tanto nos ratos machos quanto nas fêmeas, as células TPH-IR estavam presentes em todo o NDR, mas não na SCP (Figura 5). O produto de imunorreação nuclear para c-Fos em marrom-preto foi observado em todos os subnúcleos do NDR e em todas as diferentes colunas da SCP (Figura 5).

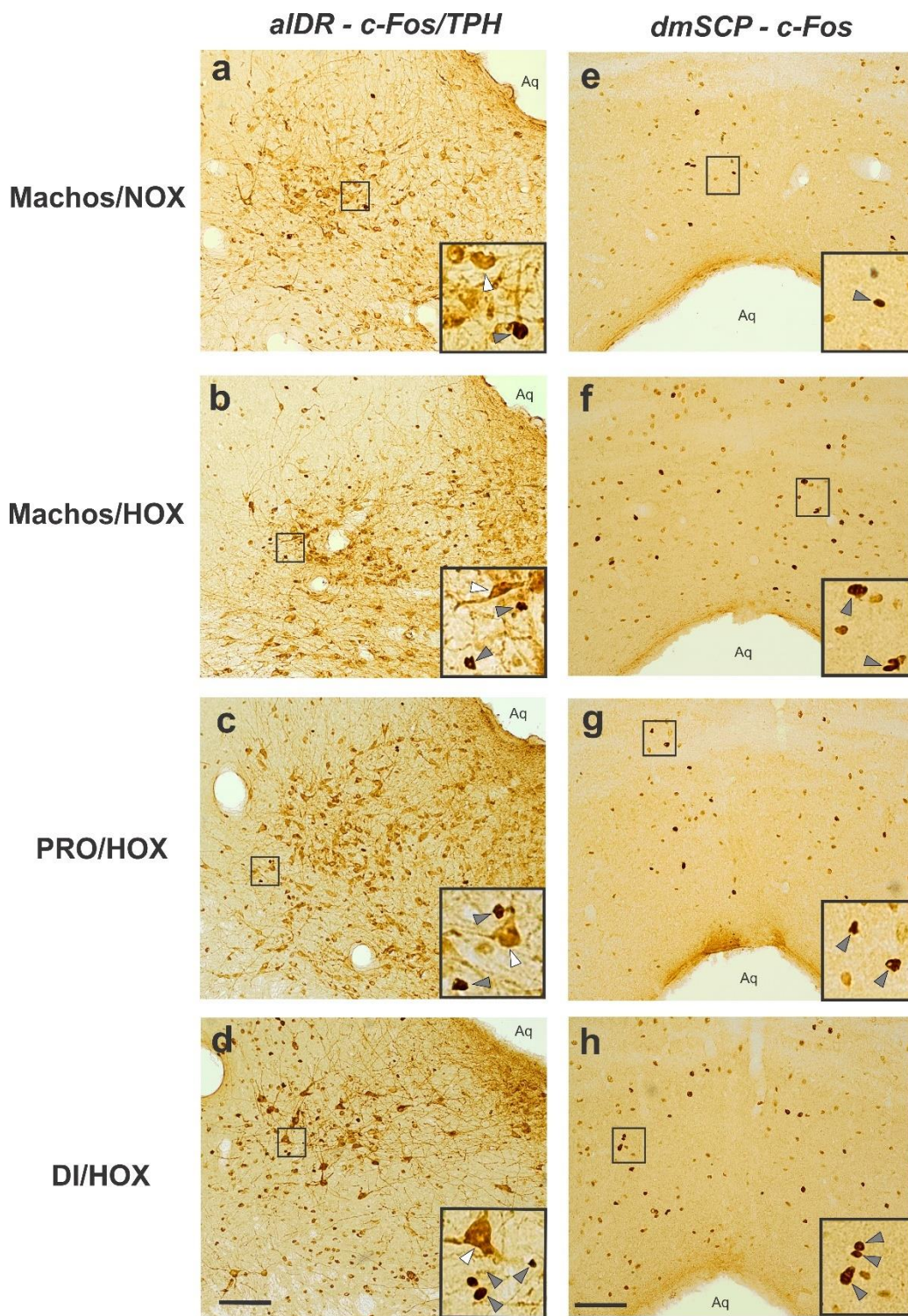


Figura 5: Fotomicrografias representando células c-Fos-IR e TPH-IR nas aDR (a-d) e c-Fos-IR na dmSCP (e-h) de animais representativos dos diferentes grupos testados no experimento 1. Caixas pretas no canto inferior direito de cada painel indicam regiões mostradas em maior ampliação. As pontas de seta brancas indicam células TPH-IR; pontas de seta cinza indicam células c-Fos-IR. Aq = aqueduto cerebral. Barra de escala = 100  $\mu$ m (a–e) e 50  $\mu$ m (f–j).

Quanto ao NDR, a exposição ao desafio de hipóxia não alterou o número de células TPH-IR presentes nos diferentes subnúcleos em machos no eixo rostral [DRD:  $t(7) = 0,66$ ; NS], médio-rostral [DRD:  $t(7) = 0,19$ ; NS, DRV:  $t(7) = 2,71$ ; NS, alDR:  $t(7) = 0,11$ ; NS], médio-caudal [DRD:  $t(7) = 0,27$ ; NS, DRV:  $t(7) = 0,12$ ; NS, alDR:  $t(7) = 1,17$ ; NS] e caudal [DRC:  $t(7) = 0,14$ ; NS, DRI:  $t(7) = 2,04$ ; NS] ou em fêmeas no eixo rostral [DRD:  $F(2,18) = 2,11$ ; NS], médio-rostral [DRD:  $F(2,18) = 0,82$ ; NS, DRV:  $F(2,18) = 1,67$ ; NS, alDR:  $F(2,18) = 0,60$ ; NS], médio-caudal [DRD:  $F(2,18) = 1,00$ ; NS, DRV:  $F(2,18) = 1,06$ ; NS, alDR:  $F(2,18) = 1,76$ ; NS] e caudal [DRC:  $F(2,18) = 0,21$ ; NS, DRI:  $F(2,18) = 0,34$ ; NS] (Tabela 2).

Nenhuma célula c-Fos + TPH duplamente marcada foi detectada no NDR.

Tabela 2: Número (media  $\pm$  EPM) de neurônios TPH-IR medidos nos diferentes subnúcleos do NDR no experimento 1.

Nível Rostrocaudal (mm do bregma)	Subnúcleo	Número de neurônios TPH-IR mm <sup>2</sup> $\pm$ EPM				
		Machos/NOX	Machos/HOX	Fêmeas/NOX	PRO/HOX	DI/HOX
-6,84 a -7,08	DRD	523,91 $\pm$ 21,26	561,21 $\pm$ 26,32	470,34 $\pm$ 30,80	398,20 $\pm$ 22,86	507,02 $\pm$ 46,23
-7,20 a -7,80	DRD	413,23 $\pm$ 9,61	503,63 $\pm$ 35,80	426,24 $\pm$ 24,06	476,02 $\pm$ 31,79	464,74 $\pm$ 28,89
	DRV	571,74 $\pm$ 15,56	657,60 $\pm$ 23,11	591,11 $\pm$ 29,12	646,16 $\pm$ 22,00	646,81 $\pm$ 22,02
	alDR	380,00 $\pm$ 19,67	334,77 $\pm$ 22,27	373,47 $\pm$ 15,78	348,67 $\pm$ 23,46	379,16 $\pm$ 21,13
-7,92 a -8,28	DRD	369,08 $\pm$ 20,13	387,76 $\pm$ 29,00	340,19 $\pm$ 9,10	365,38 $\pm$ 24,26	384,25 $\pm$ 28,33
	DRV	430,69 $\pm$ 35,91	444,04 $\pm$ 22,09	464,16 $\pm$ 16,11	509,92 $\pm$ 49,94	437,45 $\pm$ 34,79
	alDR	122,85 $\pm$ 6,83	119,42 $\pm$ 13,08	115,02 $\pm$ 3,45	133,19 $\pm$ 7,72	113,57 $\pm$ 10,03
-8,52 a -9,00	DRC	451,34 $\pm$ 27,51	467,96 $\pm$ 22,80	410,82 $\pm$ 25,52	419,65 $\pm$ 35,19	433,98 $\pm$ 20,30
	DRI	553,41 $\pm$ 73,97	621,55 $\pm$ 18,26	545,87 $\pm$ 37,97	577,16 $\pm$ 49,98	595,01 $\pm$ 43,05

Neste experimento, os dados foram submetidos a testes estatísticos distintos. Os dados de machos foram submetidos ao teste T de Student e das fêmeas foi submetido a ANOVA de uma via, em cada subnúcleo ao longo do eixo rostro-caudal. NOX: normóxia; HOX: hipóxia; PRO: proestro; DI: diestro; DRC: caudal; DRD: dorsal; DRI: interfascicular; DRV: ventral; alDR: asas laterais; TPH: triptofano hidroxilase

Com relação à ativação neuronal do NDR, nos machos, a exposição à hipóxia, induziu um aumento significativo no número de células c-Fos-IR nas alDR nos eixos médio-rostral [ $t(7) = 11,27$ ;  $p < 0,001$ ] e médio-caudal [ $t(7) = 5,92$ ;  $p < 0,001$ ], mas não em outros subnúcleos. Nas fêmeas, a ANOVA de uma via também revelou um aumento em c-Fos-IR nas alDR tanto no eixo médio-rostral ( $F(2, 18) = 112,14$ ;  $p < 0,001$ ) quanto no médio-caudal [ $F(2, 18) = 47,14$ ;  $p < 0,001$ ], mas não em outras regiões do NDR (Figura 6). O teste *post hoc* revelou que este efeito é significativo na fase de diestro, quando o número de células c-Fos-IR aumentou cinco vezes em comparação com o grupo normóxia. Ratas em proestro mostraram um aumento muito menor (duas vezes), mas significativo, nas células marcadas apenas nas alDR no nível médio-rostral.

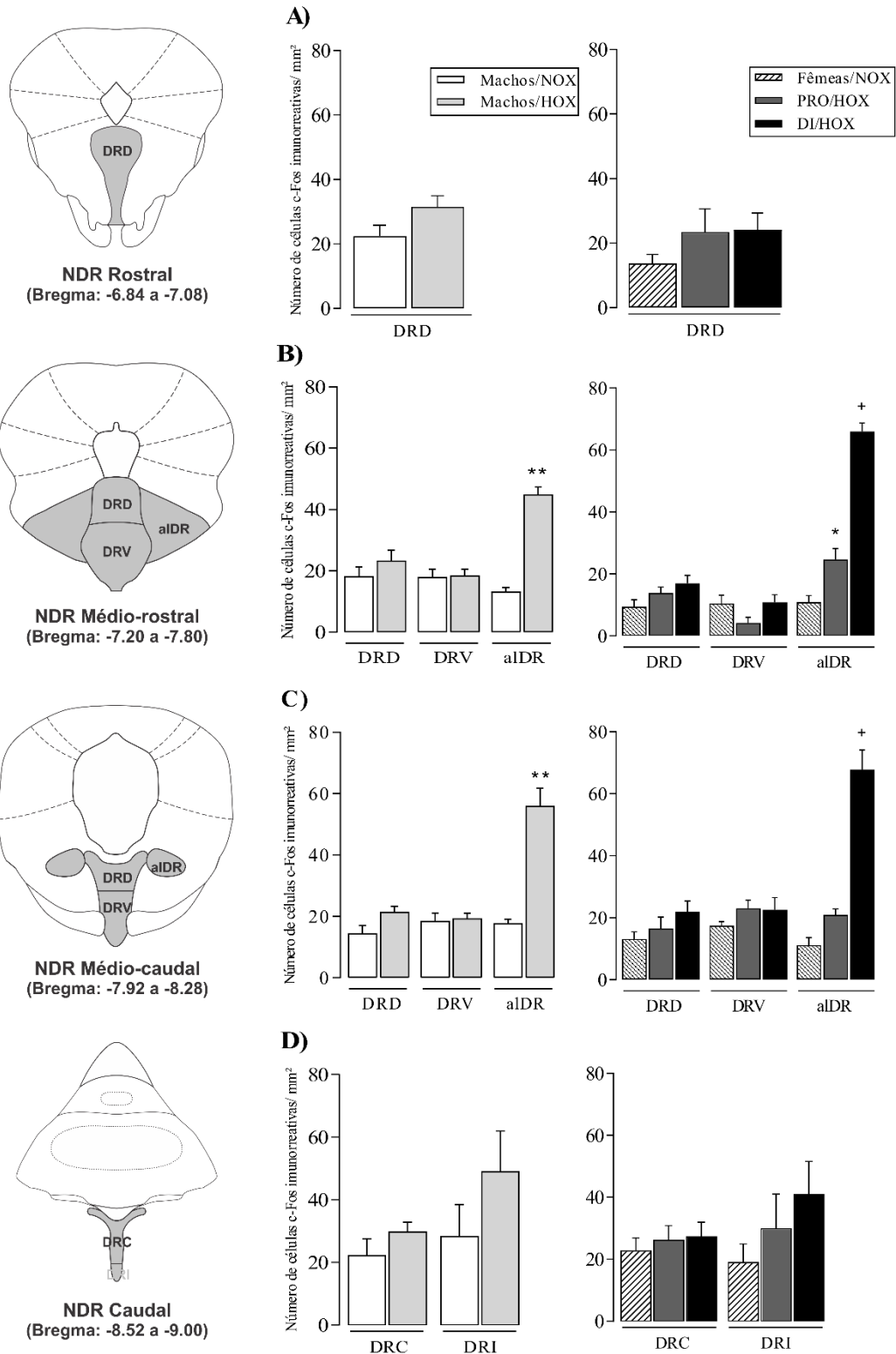


Figura 6: Número (média  $\pm$  EPM) de células c-Fos-IR contadas nos diferentes subnúcleos do NDR de machos e fêmeas expostos a normóxia ou à hipóxia (machos/NOX, n = 4; machos/HOX, n = 5; fêmeas/NOX, n = 7; PRO/HOX, n = 6; DI/HOX, n = 8). \* p < 0,01 e \*\* p < 0,001 em comparação com o respectivo grupo controle (NOX); + p < 0,001 em comparação com todos os outros grupos.

Quanto à ativação neuronal na SCP, números semelhantes de células c-Fos-IR estavam presentes em todas as colunas de machos e fêmeas mantidos em normóxia (Figura 7). Após a exposição à hipóxia, os machos apresentaram um aumento significativo no número de neurônios c-Fos-IR na dmSCP, nos níveis rostral [ $t(7) = 4,83$ ;  $p < 0,01$ ], médio [ $t(7) = 5,43$ ;  $p < 0,001$ ] e caudal [ $t(7) = 4,50$ ;  $p < 0,01$ ] e também na vlSCP no nível mais rostral [ $t(7) = 2,06$ ;  $p < 0,01$ ] (Figura 7). Nas fêmeas, a ANOVA de uma via também mostrou diferenças significativas entre os grupos na dmSCP, nos níveis rostral [ $F(2, 18) = 16,15$ ;  $p < 0,001$ ], médio [ $F(2, 18) = 39,77$ ;  $p < 0,001$ ] e caudal [ $F(2, 18) = 58,47$ ;  $p < 0,001$ ] e também na vlSCP rostral [ $F(2, 18) = 6,76$ ;  $p < 0,01$ ]. O teste *post hoc* mostrou que em todos os níveis da dmSCP, a exposição à hipóxia aumentou o número de células c-Fos-positivas, tanto durante a fase de proestro quanto de diestro, quando comparado com a normóxia. No entanto, o efeito foi mais de duas vezes maior durante o diestro quando comparado ao proestro. Como observado em ratos machos, as fêmeas em diestro, mas não aquelas em proestro, também apresentaram um aumento significativo no número de células c-Fos-IR na vlSCP rostral durante a hipóxia (Figura 7).



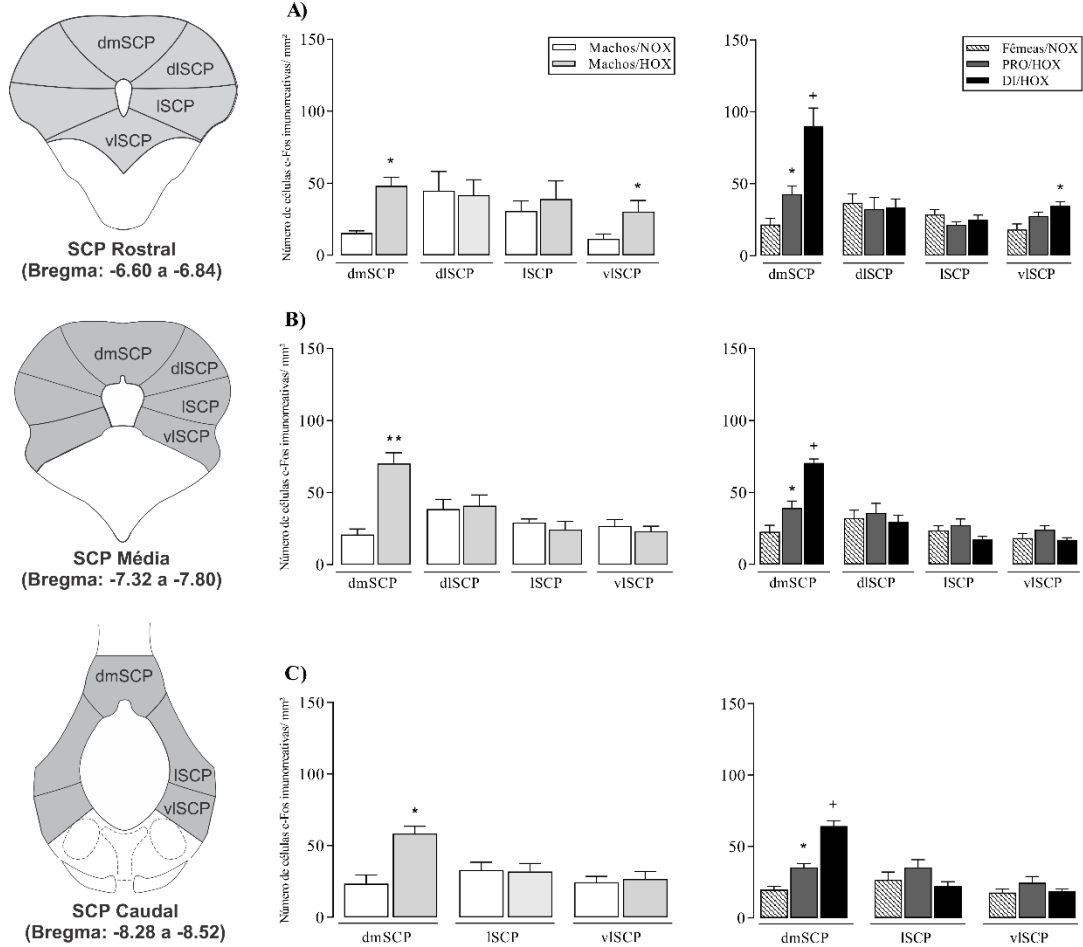


Figura 7: Número (média  $\pm$  EPM) de células c-Fos-IR contadas nas diferentes colunas da SCP de machos e fêmeas expostos à normóxia ou à hipóxia (machos/NOX, n = 4; machos/HOX, n = 5; fêmeas/NOX, n = 7; PRO/HOX, n = 6; DI/HOX, n = 8). \* p < 0,01 e \*\* p < 0,001 em comparação com o respectivo grupo controle (NOX); + p < 0,001 em comparação com todos os outros grupos.

## 4.2 Experimento 2: Análise do efeito da administração aguda e sistêmica de FLX no comportamento e no padrão de ativação neural do NDR e da SCP em ratas em diestro expostas à hipóxia.

### 4.2.1 Análises comportamentais

Neste experimento, testamos se o tratamento agudo com FLX (1,75 ou 10 mg/kg) evitaria o aumento do número de saltos observados em fêmeas no diestro submetidas ao desafio de hipóxia (Figura 8). A ANOVA de uma via revelou uma diferença significativa entre os grupos de tratamento [F(2, 21) = 45,35; p < 0,001]

e o teste *post hoc* mostrou que as fêmeas que receberam a dose mais baixa (1,75 mg/kg), mas não a mais alta (10 mg/kg) de FLX, saltaram significativamente menos do que os animais tratados com solução veículo.

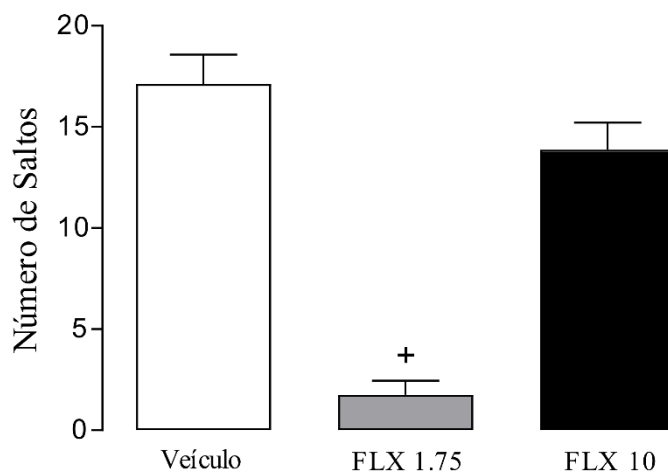


Figura 8: Efeito do tratamento (i.p.) com FLX (1,75 ou 10 mg/kg, n = 8 cada grupo) ou solução de veículo (n = 8) no número de saltos de ratas em diestro expostas ao desafio de hipóxia. Os dados são expressos como média ± EPM. +p < 0,001 em relação aos demais grupos.

Não foram observadas diferenças entre os grupos na atividade locomotora [ $F(2,21) = 1,80$ , NS], como pode ser observado na tabela 3.

Tabela 3: Distância percorrida (Média ± EPM) sob normóxia durante os cinco primeiros minutos de teste de fêmeas em diestro no experimento 2.

Grupo Experimental	Distância percorrida (m) ± EPM
Veículo	3,67 ± 0,27
FLX 1,75	3,32 ± 0,46
FLX 10	2,79 ± 0,23

Nesse experimento a ANOVA de uma via foi utilizada. FLX= fluoxetina

#### 4.2.2 Análises imunoistológicas

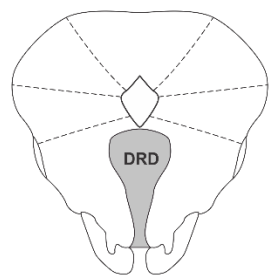
Da mesma maneira que no experimento 1, nesse experimento as células TPH-IR estavam presentes em todos os subnúcleos do NDR das fêmeas em diestro. No entanto, nenhuma célula duplamente marcada para c-Fos e TPH foi detectada. Não foram encontradas diferenças significativas no número de células TPH-IR no eixo rostral [DRD:  $F(2,17) = 1,44$ ; NS], médio-rostral [DRD:  $F(2,17) = 2,09$ ; NS, DRV:  $F(2,17) = 1,35$ ; NS, aIDR:  $F(2,17) = 0,90$ ; NS], médio-caudal [DRD:  $F(2,17) = 1,30$ ; NS, DRV:  $F(2,17) = 1,92$ ; NS, aIDR:  $F(2,17) = 1,25$ ; NS] e caudal [DRC:  $F(2,17) = 0,21$ ; NS, DRI:  $F(2,17) = 0,92$ ; NS] entre os grupos testados (Tabela 4).

Tabela 4: Número (média  $\pm$  EPM) de neurônios TPH-IR medidos nos diferentes subnúcleos do NDR no experimento 2

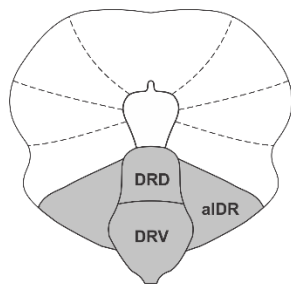
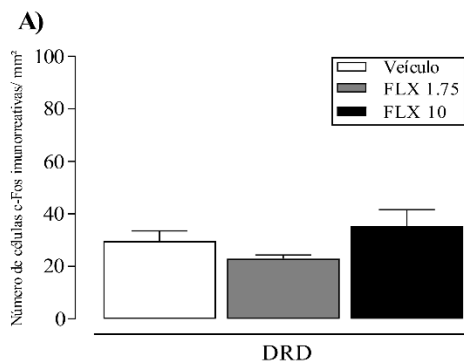
Nível Rostrocaudal (mm do bregma)	Subnúcleos	Número de neurônios TPH-IR em $\text{mm}^2 \pm$ EPM		
		Veículo	FLX 1.75	FLX 10
-6.84 a -7.08	DRD	380,81 $\pm$ 40,02	396,00 $\pm$ 33,86	368,97 $\pm$ 29,50
-7.20 a -7.80	DRD	449,22 $\pm$ 15,43	392,01 $\pm$ 24,50	413,88 $\pm$ 20,10
	DRV	616,73 $\pm$ 35,24	606,09 $\pm$ 32,55	534,97 $\pm$ 45,10
	aIDR	644,55 $\pm$ 36,35	623,86 $\pm$ 51,86	559,44 $\pm$ 46,93
-7.92 a -8.28	DRD	525,74 $\pm$ 32,48	456,22 $\pm$ 39,91	463,51 $\pm$ 26,19
	DRV	590,54 $\pm$ 25,43	528,91 $\pm$ 28,28	517,26 $\pm$ 32,32
	aIDR	253,64 $\pm$ 37,80	284,83 $\pm$ 28,08	216,63 $\pm$ 17,19
-8.52 a -9.00	DRC	641,22 $\pm$ 48,37	632,12 $\pm$ 27,03	605,32 $\pm$ 41,63
	DRI	854,56 $\pm$ 95,22	794,64 $\pm$ 36,68	947,85 $\pm$ 94,93

Nesse experimento, a ANOVA de uma via foi performeda para cada subnúcleo no eixo rostro-caudal. DRC= caudal, DRD= dorsal, DRI= interfascicular, DRV= ventral, aIDR= asas laterais, TPH= triptofano hidroxilase, FLX= fluoxetina.

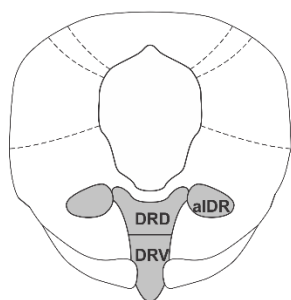
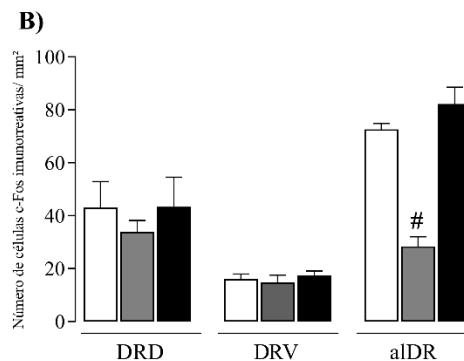
No que tange à ativação neuronal no NDR, a fluoxetina teve um efeito significativo na expressão de c-Fos evocada pela hipóxia nas aIDR (Figura 9). A ANOVA de uma via mostrou diferenças significativas entre os grupos no número de células c-Fos-IR nas aIDR nos eixos medio-rostral [ $F(2, 17) = 47,05; p < 0,001$ ] e médio-caudal [ $F(2, 17) = 34,27; p < 0,001$ ]. O teste post hoc revelou que o número de células c-Fos-IR de fêmeas em diestro tratadas com a dose mais baixa de fluoxetina (1,75 mg/kg) foi significativamente menor do que no grupo controle tratado com veículo. Curiosamente, a dose mais alta de fluoxetina (10 mg/kg) não teve efeito na expressão de c-Fos nas aIDR.



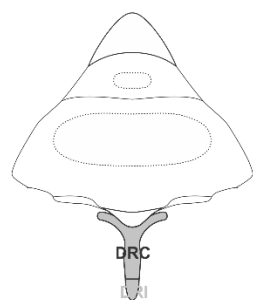
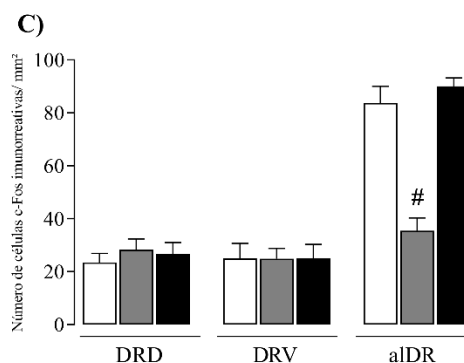
**NDR Rostral**  
(Bregma: -6.84 a -7.08)



**NDR Médio-rostral**  
(Bregma: -7.20 a -7.80)



**NDR Médio-caudal**  
(Bregma: -7.92 a -8.28)



**NDR Caudal**  
(Bregma: -8.52 a -9.00)

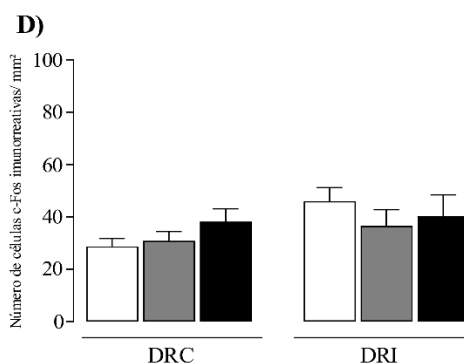


Figura 9: Número (média  $\pm$  EPM) de células c-Fos-IR contadas nos diferentes subnúcleos do NDR de fêmeas em diestro tratadas com solução veículo ou fluoxetina (FLX 1,75 ou 10 mg/kg) e submetidas ao desafio de hipóxia (veículo, n = 7; FLX 1,75, n = 7; FLX 10, n = 6). Os dados são expressos como média  $\pm$  SEM. +p < 0,001 em comparação com todos os outros grupos.

Quando avaliamos a SCP, a dose mais baixa de fluoxetina (1,75 mg/kg) foi capaz também de produzir uma redução de mais de 50% na expressão de c-Fos-IR após a hipóxia em fêmeas no diestro. Este efeito foi confinado a dmSCP, nos níveis rostral [ $F(2, 17) = 37,27; p < 0,001$ ], médio [ $F(2, 17) = 25,88; p < 0,001$ ] e caudal [ $F(2, 17) = 28,03; p < 0,001$ ] (Figura 10). Assim como no NDR, a dose mais alta de fluoxetina (10 mg/kg) não produziu efeito.

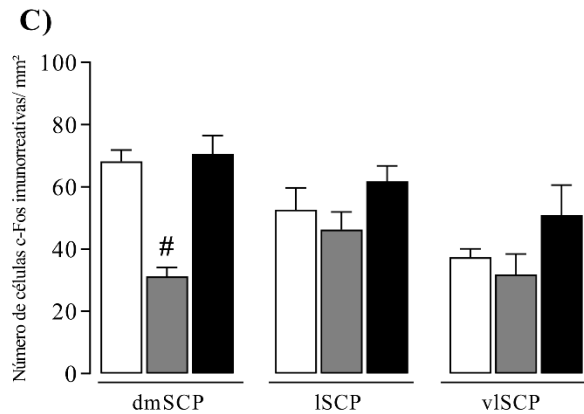
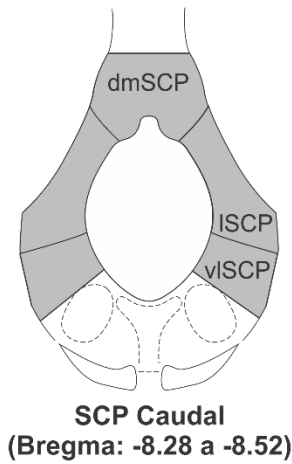
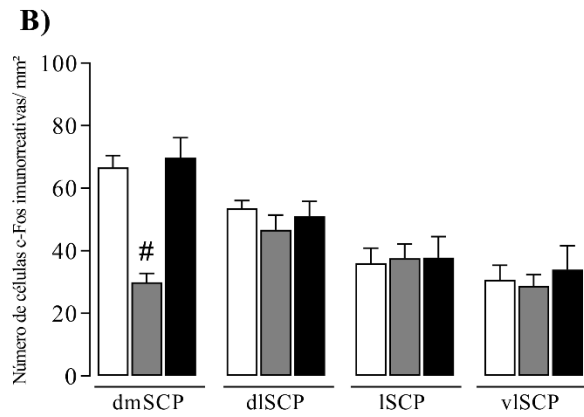
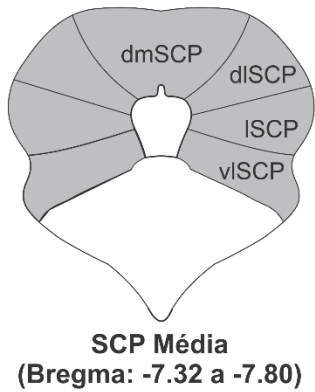
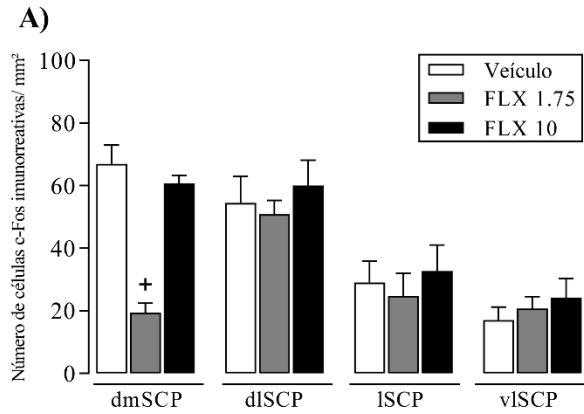
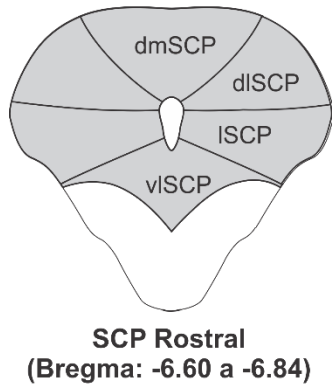


Figura 10: Número (média  $\pm$  EPM) de células c-Fos-IR contadas nas diferentes colunas da SCP de fêmeas em diestro tratadas com solução veículo ou fluoxetina (FLX 1,75 ou 10 mg/kg) e submetidas ao desafio de hipóxia (veículo, n = 7; FLX 1,75, n = 7; FLX 10, n = 6). Os dados são expressos como média  $\pm$  SEM. +p < 0,001 em comparação com todos os outros grupos.

### 4.3 Experimento 3: Efeitos da administração aguda e sistêmica de finasterida no comportamento de ratas no proestro e diestro submetidas à hipóxia.

A figura 11 mostra que o tratamento com a finasterida em fêmeas no proestro promoveu um número maior de saltos quando comparadas ao seu respectivo grupo veículo, sem promover qualquer alteração comportamental na fase de diestro. A ANOVA de duas vias não mostrou efeito da fase do ciclo estral [ $F(1,19) = 0,03$ ; NS], porém indicou o efeito do tratamento [ $F(1,19) = 9,50$ ;  $p < 0,05$ ] e também da interação entre os fatores [ $F(1,19) = 4,86$ ;  $p < 0,05$ ]. Como no experimento 1, nas fêmeas sem tratamento farmacológico, as que estavam em diestro saltaram mais do que as em proestro [ $t(10) = 2,25$ ;  $p < 0,05$ ].

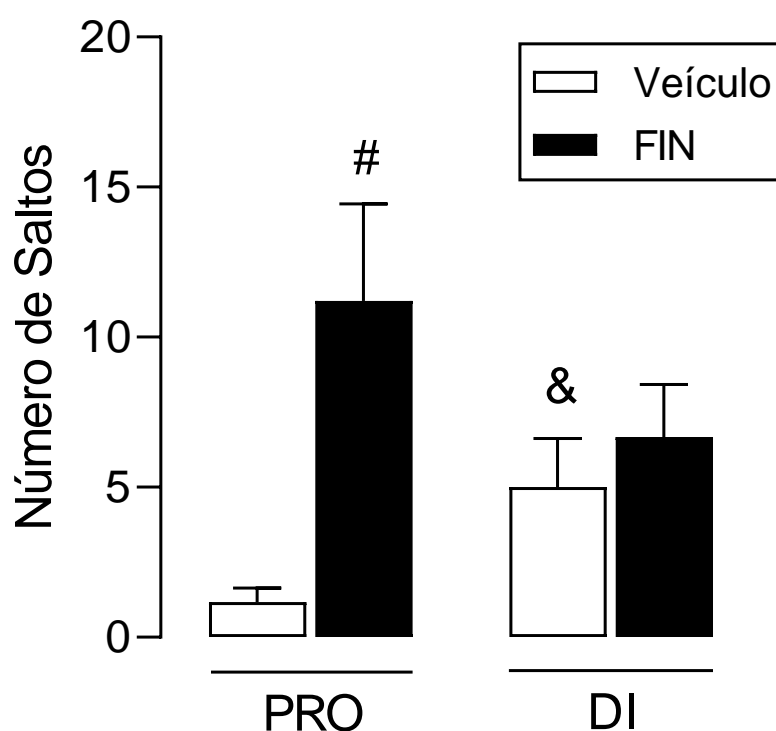


Figura 11: Número de saltos expressos por fêmeas nas fases de proestro (PRO) e diestro (DI) durante a exposição à hipóxia após a administração de veículo ou finasterida (FIN; 50 mg/kg) (PRO/Veículo, n = 6; PRO/FIN, n = 5; DI/Veículo, n = 6;



DI/FIN, n = 6). #p<0,05 em relação ao grupo PRO/Veículo; &p<0,05 em relação ao grupo PRO/Veículo.

A tabela 5 mostra que não há diferenças entre os grupos experimentais com relação à atividade locomotora medida nos primeiros 5 minutos de teste. A análise estatística não apontou diferenças entre a fase do ciclo [F(1,19) = 0,04; NS], tratamento [F(1,19) = 2,49; NS] ou interação entre os fatores [F(1,19) = 0,01; NS].

Tabela 5: Distância percorrida (Média ± EPM) sob normóxia durante os cinco primeiros minutos de teste de fêmeas em proestro e diestro tratadas com veículo ou finasterida (50 mg/kg) no experimento 3.

<b>Grupo Experimental</b>	<b>Distância percorrida (m) ± EPM</b>
PRO/Veículo	3,02 ± 0,44
PRO/FIN	2,37 ± 0,40
DI/Veículo	2,91 ± 0,39
DI/FIN	2,31 ± 0,33

Neste experimento, a ANOVA de duas vias foi utilizada. PRO= Proestro, DI= Diestro, FIN= Finasterida

Discussão

---

## 5. DISCUSSÃO

Na primeira parte do presente estudo, buscamos avaliar o efeito do sexo e da fase do ciclo estral de ratas e ratos da linhagem *Sprague Dawley* no comportamento de fuga avaliado no teste da hipóxia.

Os resultados comportamentais mostraram que machos e fêmeas são sensíveis ao teste da hipóxia, ou seja, que estes animais saltam em direção ao teto da câmara em resposta a baixa concentração de O<sub>2</sub>, comportamento este interpretado como uma resposta de fuga. No que concerne as diferenças sexuais, as fêmeas enquanto um grupo único, sem diferenciar as fases do ciclo, se mostraram mais responsivas ao teste do que os machos, sendo que estas saltaram o dobro em comparação a eles. Quando o ciclo estral é levado em consideração, maiores diferenças são observadas. As ratas na fase de diestro tiveram um nível de resposta significativamente maior quando comparadas à fase de proestro.

É válido mencionar que a questão do aumento de saltos no teste da hipóxia durante o diestro não é um fator secundário relacionado à alterações na atividade motora dos animais, uma vez que a locomoção medida durante a normóxia imediatamente antes de iniciar o desafio de hipóxia, não foi afetada pelo estágio do ciclo estral. Além disso, sabe-se que, embora a exposição à hipóxia seja conhecida por provocar alterações fisiológicas que incluem aumento significativo da frequência respiratória e do volume corrente (HAMASHIMA; SHIBATA, 2016; LIN et al., 2005; PRETER; KLEIN, 2008; THOMAS; MARSHALL, 1995), a resposta ventilatória não é afetada pelo estágio do ciclo estral (MARQUES et al., 2017). Portanto, ratas em todos os estágios de seu ciclo parecem ser igualmente propensas a ter um acréscimo na demanda metabólica devido ao aumento da atividade de saltos. Dessa maneira, o aumento da reação de fuga observado durante o diestro parece ser, portanto, devido ao aumento da resposta emocional em frente ao estressor, e não secundário a alterações fisiológicas induzidas pela hipóxia.

Trabalhos prévios de nosso laboratório mostraram que ratos da linhagem *Wistar* também são responsivos ao teste da hipóxia. No entanto, esses

resultados foram inicialmente obtidos apenas com animais machos (FERNANDES et al., 2019; SPIACCI et al., 2015). Dessa forma, é importante ressaltar que o presente estudo é o primeiro trabalho a mostrar as diferenças entre machos e fêmeas, além do efeito das diferentes fases do ciclo estral neste modelo experimental. Trabalho mais recente, realizado por Ferreira-Sgobbi e colaboradores (2022), que conta com a minha co-autoria (ver anexo 8.2), mostra que, como na linhagem *Sprague-Dawley*, ratas *Wistar* também expressam a resposta de saltos durante a hipóxia. Ademais, quando analisadas as fases do ciclo separadamente, o resultado vai de encontro ao observado aqui, ou seja, na fase de diestro as fêmeas saltam mais em direção ao teto da câmara comparadas àquelas na fase de proestro (FERREIRA-SGOBBI et al., 2022). Neste mesmo estudo, também foram avaliados os comportamentos desses animais frente a um predador, uma serpente da espécie *Bothrops alteratus*. Os autores mostraram que tanto machos quanto fêmeas têm um aumento nos comportamentos de avaliação de risco, esquiva inibitória e de fuga quando colocadas frente a frente com o predador, além de uma diminuição na interação com a cobra. Da mesma forma, quando avaliada a questão do ciclo estral, as ratas em metaestro e diestro tiveram uma frequência maior de fuga, quando expostas à cobra, do que àquelas nas outras fases do ciclo, reforçando que nesta fase as fêmeas são mais susceptíveis ao pânico (FERREIRA-SGOBBI et al., 2022).

É ainda digno de nota que o aumento da responsividade à hipóxia pelas fêmeas em diestro parece estar em concordância com outros dados da literatura que avaliaram o comportamento de roedores em testes de pânico/medo. Como já mencionado na introdução, o trabalho realizado por Devall e colaboradores (2015) mostra que durante a estimulação elétrica da SCPd, as fêmeas em diestro têm um limiar menor para a evocação do comportamento de fuga em comparação as outras fases do ciclo (DEVALL et al., 2015). Outro estudo que mostrou uma maior susceptibilidade das fêmeas no diestro foi o realizado por Machado-Figueiredo e colaboradores (2019). Nesse estudo, os pesquisadores avaliaram a vocalização ultrassônica de ratos e ratas expostos ao estressor de restrição de isolamento, uma resposta relacionada ao grau de aversão à situação. Sendo assim, o resultado mostrou que na frequência de 20 a 22 kHz,

as fêmeas em diestro vocalizaram mais que àquelas em outras fases do ciclo, demonstrando a aversão aumentada à situação durante esse período do ciclo (MACHADO FIGUEIREDO et al., 2019).

Curiosamente, no modelo do LTE, os resultados não pareceram ir na mesma direção. O estudo realizado por Gouveia Jr e colaboradores (2004) mostra que durante a esquivia inibitória as ratas em diestro iniciam o teste ficando mais tempo no braço fechado comparadas àquelas em outras fases do ciclo, sugerindo que nessa fase os níveis de ansiedade são mais elevados. No entanto, quando a fuga é avaliada, nenhuma diferença é encontrada entre os grupos analisados (GOUVEIA et al., 2004).

Os trabalhos supramencionados são os poucos que buscaram avaliar a diferença do ciclo estral com comportamentos relacionados ao pânico. A grande maioria dos trabalhos que se preocuparam em avaliar a influência do ciclo foram realizados em testes de ansiedade. Em revisão recente, Lovick e Zangrossi (2021) abordaram com mais detalhes essa questão. Por exemplo, no LCE alguns trabalhos mostram não haver diferenças entre as fases do ciclo (FERNÁNDEZ-GUASTI et al., 1999; MOLINA-HERNÁNDEZ et al., 2013; NIN et al., 2012; SAKAE et al., 2015; SANTOS et al., 2014; SCHOLL et al., 2019), enquanto em outros, as ratas em diestro se mostraram mais ansiosas do que as que estavam em outras fases (DÍAZ-VÉLIZ; DUSSAUBAT; MORA, 1997; FRYE; PETRALIA; RHODES, 2000). Isso também ocorre no LTE e no campo aberto, nos quais, ou são encontrados resultados negativos (HIROI; NEUMAIER, 2006; SANTOS et al., 2014), ou as fêmeas em diestro se mostram mais ansiosas (FRYE; PETRALIA; RHODES, 2000; GOUVEIA et al., 2004).

Apesar de não serem claras as razões para esses resultados conflitantes, alguns fatores devem ser levados em consideração. Por exemplo, nos estudos utilizando o LCE, há a formação de grupos através da junção de dados das fases do ciclo, geralmente proestro/estro e metaestro/diestro, o que dificulta uma análise mais apropriada da questão, já que em cada fase do ciclo os níveis hormonais de progesterona e estrogênio são diferentes e em constante mudança (DONNER; LOWRY, 2013).

Os nossos resultados, bem como os outros já apontados, destacam a fase de diestro como sendo aquela com maior reatividade a estímulos panicogênicos. Como já mencionado anteriormente, um evento importante que ocorre nessa fase do ciclo em comparação com as outras é a queda abrupta nos níveis de progesterona e, conseqüentemente da ALLO. Tendo em vista essa situação, na segunda parte do projeto, buscamos analisar a influência da administração de FLX no comportamento de ratas submetidas à hipóxia.

Apesar do conhecimento de que a FLX é um antidepressivo muito utilizado na clínica para tratamento do transtorno de ansiedade generalizada e do pânico por alterar a neurotransmissão serotoninérgica, a dose eficaz da droga utilizada nesse teste (1,75 mg/kg) está abaixo do limite para os efeitos sobre a neurotransmissão serotoninérgica (DEVALL et al., 2015; HERVÁS; ARTIGAS, 1998; PINNA; COSTA; GUIDOTTI, 2009). No entanto, essa dose já mostrou possuir propriedades esteroideogênicas, ou seja, que levam a um aumento na concentração do metabólito neuroativo da progesterona, a ALLO (DEVALL et al., 2015; FRY et al., 2014; PINNA; COSTA; GUIDOTTI, 2009). Testamos também o efeito da administração aguda da dose de 10 mg/kg, que comumente é utilizada para se estudar o efeito da inibição seletiva da recaptação de serotonina em testes animais de ansiedade e de pânico (POLTRONIERI; ZANGROSSI; DE BARROS VIANA, 2003; VILELA-COSTA et al., 2019, 2021; ZANOVELI et al., 2010).

Observamos que o aumento do comportamento de fuga observado durante o diestro foi prevenido pelo tratamento de curto prazo com a dose de 1,75 mg/kg de FLX, mas não com a de 10 mg/kg. Novamente, é improvável que este efeito seja devido a uma alteração da atividade motora, uma vez que a droga, nessas doses, não teve efeito na locomoção nos 5 minutos anteriores à hipóxia.

O efeito panicolítico da FLX em dose baixa encontrado aqui corrobora com resultados de estudos anteriores em ratas usando outros testes comportamentais (DEVALL et al., 2015; MACHADO FIGUEIREDO et al., 2019). Assim, no estudo realizado por Devall e colaboradores (2015), a dose de 1,75 mg/kg de FLX foi capaz de aumentar o limiar para a evocação da fuga na estimulação elétrica da SCPd na fase de diestro, não demonstrando efeito nas

outras fases do ciclo (DEVALL et al., 2015). Ademais, no trabalho de Machado-Figueiredo e colaboradores (2019), a mesma dose de FLX foi capaz de diminuir o número de vocalizações ultrassônicas não somente na frequência de 20 a 22 kHz, como também nas frequências de 18 a 20 e 22 a 24 kHz, mostrando um efeito anti-aversivo da droga. Curiosamente, uma única administração de FLX no fim da tarde do metaestro, sem haver a segunda administração na manhã do diestro, foi ineficaz, sugerindo que a FLX precisa permanecer suficientemente elevada por pelo menos 15 horas para evitar um aumento na excitabilidade do circuito de pânico (MACHADO FIGUEIREDO et al., 2019).

Em relação a dose maior de FLX, Zanoveli e colaboradores (2010) mostraram que em ratos machos ela produz um aumento modesto na concentração extracelular de 5-HT na SCPd uma hora após a administração aguda (ZANOVELI et al., 2010). Em fêmeas no diestro, Devall e colaboradores (2015) mostram que a concentração de 5-HT na SCPd aumenta significativamente após uma dose única de 10 mg/kg de FLX administrada 16 horas antes do teste, no fim da tarde do metaestro. Curiosamente nessas fêmeas, o mesmo protocolo de administração dupla de FLX na maior dose leva a uma diminuição na concentração extracelular de 5-HT na SCPd. Dessa forma, o resultado observado com a maior dose de FLX pode ter sido consequência da ativação autorreceptores somatodendríticos 5-HT<sub>1A</sub> inibitórios presentes em neurônios serotonérgicos do NDR (uma importante fonte de neurônios serotonérgicos para a SCP), o que deprimiria a atividade deste grupo neuronal (HAJÓS et al., 2001; RUTTER; AUERBACH, 1993), reduzindo a liberação de 5-HT na SCPd (DEVALL et al., 2015).

Na parte seguinte do presente estudo, buscamos investigar os mecanismos subjacentes às mudanças comportamentais observadas frente ao desafio da hipóxia e após a administração de FLX. Fizemos isso através da observação do padrão de ativação neuronal do NDR e da SCP refletido pela expressão de células c-Fos-IR e TPH-IR.

Os resultados encontrados mostraram que, tanto em machos quanto em fêmeas, o desafio de hipóxia recrutou neurônios não-serotonérgicos nos subnúcleos aLDR, dmSCP e, em menor extensão, na vLSCP. Além disso, vale

ressaltar que essas áreas do cérebro são recrutadas tanto nas fêmeas durante o proestro quanto no diestro, mas com o número de neurônios c-Fos-IR significativamente maior na última fase do ciclo, refletindo o maior nível de resposta ao estímulo panicogênico. De maneira interessante, a administração da FLX na dose de 1,75 mg/kg nas fêmeas em diestro foi capaz de diminuir o número de células c-Fos-IR nos subnúcleos supramencionados, o que não ocorreu no grupo administrado com a dose de 10 mg/kg.

Outros trabalhos de nosso laboratório também observaram um padrão de ativação neuronal similar, porém utilizando o modelo do LTE. Nesses casos, após a expressão da fuga, os autores observaram o recrutamento das aIDR e da dSCP, sendo que essa ativação também ocorreu em neurônios não-serotonérgicos (SPIACCI; COIMBRA; ZANGROSSI, 2012; VILELA-COSTA et al., 2019). Já com relação ao efeito da administração da FLX na dose de 1,75 mg/kg, vale ressaltar que este é o primeiro trabalho que mostra o seu efeito no padrão de ativação neuronal em estruturas encefálicas relacionadas ao pânico. Quanto a dose de 10 mg/kg, no estudo realizado por Vilela-Costa e colaboradores (2019), os autores mostram que essa dose administrada de maneira aguda também não foi capaz de atenuar a ativação das aIDR e dmSCP após a exposição dos animais aos braços abertos do LTE (VILELA-COSTA et al., 2019). Isto, no entanto, ocorre nos animais tratados cronicamente com essa dose, quando há um aumento da liberação de 5-HT na SCPd (ZANOVELI et al., 2010).

É digno de nota que em nosso estudo, células serotonérgicas não foram ativadas pelo desafio de hipóxia. Estudos realizados em machos também mostram um nível muito baixo, ou mesmo a ausência de expressão de c-Fos em células serotonérgicas de alguns subnúcleos do NDR após diferentes desafios estressantes (BARATTA et al., 2018; LOPES et al., 2016; ROCHE et al., 2003; SPANNUTH et al., 2011; VILELA-COSTA et al., 2019). Problemas metodológicos também parecem improváveis, pois em um estudo anterior, também em machos, utilizando os mesmos métodos de processamento, foi possível ver o recrutamento de células serotonérgicas no NDR em ratos no LTE após tratamento crônico com FLX (VILELA-COSTA et al., 2019). Desse modo, pode haver diferenças sexuais no recrutamento de neurônios serotonérgicos nas



fêmeas pelos estímulos panicogênicos ou, alternativamente, o c-Fos pode não ser o marcador mais adequado de ativação neuronal neste caso.

Por outro lado, vale a pena notar que outro estudo em ratos utilizando exposição ao CO<sub>2</sub> (hipercapnia), os invés de O<sub>2</sub>, relatou ativação de células serotoninérgicas no NDR, bem como na vlSCP (JOHNSON et al., 2005). Recentemente, nosso laboratório realizou um estudo em ratos para comparar a ativação funcional do NDR e da SCP em resposta à hipóxia e hipercapnia (dados não publicados). Os resultados encontrados confirmam os achados anteriores, mostrando uma ativação de neurônios serotoninérgicos no NDR em resposta ao CO<sub>2</sub>, porém que esta população não é significativamente ativada na exposição à hipóxia. Além disso, no estudo realizado por Johnson e colaboradores (2011) os autores mostram uma ativação funcional de neurônios em toda a SCP em resposta ao CO<sub>2</sub> (JOHNSON et al., 2011), enquanto em nosso estudo apenas a dmSCP e uma extensão limitada da vlSCP foram ativadas pela hipóxia.

De fato, o uso de CO<sub>2</sub> como estímulo panicogênico em ratos é controverso. Os neurônios da SCP de ratos são inerentemente mais sensíveis à hipóxia do que à hipercapnia (KRAMER; NOLAN; WALDROP, 1999). Essa sensibilidade parece ter uma base evolutiva, uma vez que os ratos, diferentemente de camundongos, não vivem em grandes altitudes, nas quais a concentração de O<sub>2</sub> é baixa e, portanto, essa espécie seria mais reativa a hipóxia (JOCHMANS-LEMOINE et al., 2015; SPIACCI et al., 2018; STORZ et al., 2007). Foi demonstrado em ratos que, enquanto a hipóxia citotóxica induzida por cianeto de potássio evoca a resposta de fuga, que é sensível a drogas antipânico, a resposta ao CO<sub>2</sub> se assemelha mais à excitação comportamental (AMÉNDOLA; RATUSKI; WEARY, 2019; SCHIMITEL et al., 2012). Sendo assim, a exposição ao CO<sub>2</sub> em ratos parece inibir o sistema de pânico na SCP, via ativação de células serotoninérgicas no NDR, enquanto a hipóxia ativa células não serotoninérgicas, que inibem a ação daquelas serotoninérgicas (para discussão desse ponto, ver SCHENBERG et al., 2014).

Nossos dados não permitem tirar conclusões sobre a identidade neuroquímica dos neurônios não-serotoninérgicos recrutados nas alDR em resposta ao desafio da hipóxia. Entretanto, evidências na literatura indicam que

eles possam ser GABAérgicos. As aDR contêm um grande número de interneurônios GABAérgicos (CALIZO et al., 2011; DAY et al., 2004; FU et al., 2010), que exercem controle inibitório tônico sobre neurônios serotoninérgicos no NDR (GERVASONI et al., 2000; TAO; AUERBACH, 2000, 2003; VARGA et al., 2001; WANG et al., 2017). Em ratos submetidos ao nado forçado, que evoca o comportamento de enfrentamento ativo do tipo fuga (por exemplo, nadar, escalar), foi encontrado um aumento da expressão de c-Fos em neurônios GABAérgicos, mas não serotoninérgicos, dentro das aDR (ROCHE et al., 2003). Curiosamente, após a exposição ao estresse do nado forçado nessa primeira tentativa, os níveis de serotonina diminuem em regiões inervadas pelo NDR, como septo lateral e amígdala (KIRBY; ALLEN; LUCKI, 1995; KIRBY; LUCKI, 1997). Dessa maneira, é concebível que um mecanismo similar esteja operando na projeção serotoninérgica do NDR para a SCP em resposta ao desafio da hipóxia.

Assim como nas aDR, mais estudos ainda são necessários para desvendar o fenótipo neuroquímico de neurônios ativados na SCP pela hipóxia, porém há evidências de que eles sejam glutamatérgicos. Já é descrito na literatura que a SCP é uma estrutura rica em glutamato e seus receptores do tipo ácido N-metil-D-aspartico (NMDA; ALBIN et al., 1990; TOLLE et al., 1993; COMMONS; VALENTINO, 2002). O estudo farmacológico realizado por Bittencourt e colaboradores (2004) mostrou que administração de glutamato na SCP de ratos era capaz de gerar comportamentos defensivos, como galopes, trotadas e saltos, especialmente quando realizadas na região dorsal dessa estrutura (BITTENCOURT et al., 2004). Além disso, em outras espécies como camundongos (CARVALHO-NETTO et al., 2009) e gatos (SCHUBERT; SHAIKH; SIEGEL, 1996), o mesmo padrão era observado, levando a sugestão de que os neurônios efetores da resposta comportamental de defesa na SCP eram majoritariamente glutamatérgicos.

Mais recentemente, o estudo realizado por Tovote e colaboradores (2016), utilizando a optogenética, pode contribuir ainda mais no entendimento desta questão, ao explorar o papel da neurotransmissão glutamatérgica em diferentes colunas da SCP. Nesse estudo, os autores observaram que quando neurônios glutamatérgicos (vGluT2) na vISCP de camundongos eram ativados pela luz,

estes respondiam com o comportamento de congelamento, relacionado à ansiedade. Por outro lado, quando esses neurônios glutamatérgicos eram ativados na dlSCP e ISCP, os animais expressavam o comportamento de fuga explosiva, relacionado ao pânico (TOVOTE et al., 2016).

Em nosso estudo, é importante ressaltar que somente a dmSCP e, em menor extensão a vlSCP, foram recrutados frente à exposição à hipóxia. Esse achado pode indicar que algumas subpopulações de neurônios glutamatérgicos, diferentes das encontradas nas outras colunas, estariam mediando o comportamento encontrado aqui. Estudos mostram que na dmSCP, área aqui extensamente recrutada, mas não na dlSCP ou ISCP, há abundância de neurônios glutamatérgicos contendo receptores NK-1 (COMMONS; VALENTINO, 2002). Não menos interessante, o bloqueio de receptores NK-1 na dSCP reduz a excitabilidade desta região, levando a uma maior facilidade na evocação das respostas de fuga (BROIZ et al., 2012), sugerindo então que esta população de receptores glutamatérgicos/NK-1 desempenha um papel fisiológico na regulação de respostas defensivas relacionadas ao pânico, tornando-as uma subpopulação plausível para mediar o comportamento consequente à exposição à hipóxia.

Em paralelo a essas evidências sobre o fenótipo dos neurônios aqui recrutados, outros resultados da literatura sugerem que o impacto do ciclo estral, mais especificamente do diestro, sobre o comportamento emocional pode ser decorrente de alterações em receptores GABAérgicos localizados em neurônios de estruturas como a SCPd.

Esses trabalhos mostram que durante a fase de diestro, ou também após a retirada abrupta da progesterona exógena, a expressão das subunidades  $\alpha 4$ ,  $\beta 1$  e  $\delta$  nos receptores GABA-A na SCPd é regulada positivamente, em consequência do rápido declínio da concentração cerebral da ALLO (GRIFFITHS; LOVICK, 2005; LOVICK et al., 2005). Essas subunidades podem se agrupar formando receptores funcionais (LOVICK et al., 2005) e, quando há a presença da subunidade  $\delta$ , esse receptor tem localização extrasináptica (FARRANT; NUSSER, 2005). Sabe-se que a expressão aumentada do receptor GABA-A  $\alpha 4\beta 1\delta$  após a queda da ALLO ocorre também em outras estruturas

encefálicas além da SCPd, como nas células granulares do cerebelo e no hipocampo (BIGGIO et al., 2001; GANGISETTY; REDDY, 2010; GULINELLO; GONG; SMITH, 2002; SMITH et al., 1998).

Vale ressaltar que não há registros na literatura sobre o efeito do ciclo estral sobre a expressão desses receptores no NDR, ou em quais populações neuronais poderiam estar localizados. No entanto, um estudo realizado por Kaura e colaboradores (2007), utilizando a técnica de eletrofisiologia, demonstrou que a administração de ALLO em neurônios 5-HT do NDR potencializa a ação inibitória de drogas agonistas de receptores GABA, como o muscimol (KAURA et al., 2007). Dessa forma, permanece por ser explorado de que maneira alterações em receptores GABAérgicos do tipo A, induzidas pelos níveis flutuantes de ALLO, se correlacionam com os achados obtidos no presente estudo.

Na área efetora da SCPd, também não há evidências de qual população neuronal esses receptores  $\alpha 4\beta 1\delta$  estariam. No entanto, hipotetizamos que eles seriam heterorreceptores, ou seja, estariam localizados em neurônios como os glutamatérgicos. Já é descrito na literatura que receptores GABAérgicos podem estar presentes nesses neurônios e que, quando ativados, inibem o tônus excitatório glutamatérgico (FAWLEY; PETERS; ANDRESEN, 2011; KANG et al., 2012; OUYANG et al., 2007; WEN et al., 2022). Dessa maneira, o aumento dessas subunidades levaria a uma menor inibição da neurotransmissão glutamatérgica que regula a excitabilidade da SCPd, o que levaria a um aumento na excitabilidade intrínseca da estrutura (BRACK; LOVICK, 2007; DEVALL et al., 2015; GRIFFITHS; LOVICK, 2005). Novamente, ressaltamos que novos estudos são necessários para se ter a compreensão de quais populações neuronais estariam localizados esses receptores.

Por fim, no último experimento realizado, verificamos o efeito da finasterida, um inibidor da  $5\alpha$ -redutase, no comportamento de ratas em proestro e diestro expostas à hipóxia. Essa droga é muito comumente utilizada na clínica para tratamento de alopecia e hiperplasia prostática, agindo ao impedir a conversão de progesterona em ALLO (FERTIG et al., 2017; SCHÜLE; NOTHDURFTER; RUPPRECHT, 2014).

Nossos resultados mostraram que o bloqueio da formação da ALLO na fase de proestro, mimetizando o que ocorre na fase de diestro, foi capaz de causar um efeito panicogênico nesses animais em relação ao grupo que não recebeu a droga. Ademais, e de maneira bastante interessante, nenhum efeito foi observado nas fêmeas em diestro que receberam a finasterida. Os nossos resultados vão de acordo com outras evidências na literatura que utilizaram a finasterida como agente anti-esteroidogênico em fêmeas no proestro. Nesses estudos, os comportamentos avaliados foram àqueles relacionados a ansiedade e a depressão, utilizando o teste do campo aberto, o LCE e o teste do nado forçado (FRYE; WALF, 2002; SMITH et al., 2006; WALF; SUMIDA; FRYE, 2006).

Por exemplo, os resultados encontrados por Frye e Walf (2002) mostram que nas ratas avaliadas no proestro a expressão de comportamentos associados à ansiedade e à depressão estava diminuída nos testes do campo aberto e no teste do nado forçado, respectivamente, quando comparados àquelas na fase de diestro e aos machos. Entretanto, quando tratadas com finasterida, na mesma dose aqui utilizada, os animais em proestro se comportavam de maneira semelhante as ratas na fase de diestro, ou seja, mais ansiosas e com fenótipo pró-depressivo (FRYE; WALF, 2002). Em consonância a esses resultados, os autores observaram, por radioimunoensaio, uma diminuição drástica nos níveis hipocâmpais de ALLO após a administração da finasterida (FRYE; WALF, 2002).

Em conjunto a essas evidências, Smith e colaboradores (2006) avaliaram o efeito da administração intraperitoneal da finasterida (50 mg/kg, 3 dias consecutivos) no comportamento de camundongas expostas ao LCE. Da mesma forma, esses animais tiveram um aumento de ansiedade medido no teste, além de uma diminuição nos níveis hipocâmpais de ALLO em comparação aos que não receberam a administração da droga. Além disso, ao avaliarem as subunidades dos receptores GABAérgicos no hipocampo, a queda acentuada da ALLO causou um aumento nas subunidades  $\alpha 4$  dos receptores GABA-A, mostrando uma direta e rápida ação do esteroide na regulação da conformação desses receptores (SMITH et al., 2006).

Em mulheres, um estudo realizado por Rapkin e colaboradores (1997) mostrou que os níveis de ALLO presentes em pacientes com os sintomas da

TPM eram menores do que naquelas que não possuíam os sintomas (RAPKIN et al., 1997). Da mesma maneira, a infusão intravenosa de ALLO em pacientes com depressão pós-parto resultou em uma redução clinicamente significativa nos escores de depressão em mulheres tratadas com a droga *versus* o grupo placebo. A melhora nos escores de depressão foi evidente em 60 horas após o início da infusão e ainda estava presente após 30 dias (KANES et al., 2017).

É digno de nota que os vários estudos sobre a ação da ALLO sobre o comportamento emocional foram essenciais para a sua transformação em um medicamento utilizado clinicamente. Como exemplo disso, no primeiro trimestre de 2019, um análogo sintético da ALLO, a brexanolona (de nome comercial Zulresso®, Sage Therapeutics), foi aprovada pela Food and Drug Administration (FDA) e tem se mostrado bastante eficaz para o tratamento da depressão pós-parto moderado a severo em mulheres nos Estados Unidos (PATATANIAN; NGUYEN, 2022; POWELL et al., 2020).

Em suma, nossos resultados mostram que a hipóxia aguda é um estímulo panicogênico em ratos de ambos os sexos. No entanto, a resposta das fêmeas se mostra ciclo-dependente, sendo significativamente aumentada na fase de diestro, que corresponde ao período pré-menstrual nas mulheres. Além disso, eles revelam que há a ativação funcional induzida pela hipóxia de neurônios não-serotonérgicos na alDR, dmSCP e, em menor extensão na vlSCP rostral. Ademais, o aumento da resposta comportamental e da ativação das alDR e dmSCP nas ratas em diestro foi prevenido pelo tratamento de curto prazo com uma dose baixa de FLX, que aumenta a concentração de ALLO. Além disso, observamos que a diminuição da concentração de ALLO pela administração de finasterida, inibidor da enzima 5 $\alpha$ -redutase, foi capaz de aumentar o comportamento de fuga no proestro, porém não no diestro, sustentando uma relação entre os níveis desse neuroesteroide e o comportamento defensivo expresso na hipóxia. Por fim, sugerimos que uso de baixas doses de FLX merece atenção como estratégia para o tratamento do TP em mulheres.

# Conclusão

---

## 6. CONCLUSÃO

- A hipóxia aguda é capaz de evocar o comportamento de fuga, relacionado ao pânico, em ratos e ratas. Em ratas, quando levado em conta o ciclo estral, observamos que esse efeito é mais pronunciado naquelas que estão na fase de diestro;
- A administração aguda de fluoxetina em dose baixa (como um agente esteroideogênico) nas ratas em diestro é capaz de atenuar o comportamento de fuga, enquanto que a administração de finasterida (como um agente bloqueador da síntese de esteroides) na fase de proestro é capaz de aumentar a expressão dessa resposta comportamental no teste da hipóxia;
- Tantos em machos, quanto em fêmeas a hipóxia foi capaz de recrutar neurônios não-serotonérgicos nas alDR e na dmSCP e, em menor grau, a vlSCP, porém a ativação foi maior nas fêmeas em diestro quando comparada aos outros grupos. A administração de fluoxetina aguda e em dose baixa foi capaz de reverter essa ativação neuronal encontrada nas ratas em diestro.



## Referências Bibliográficas

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMS, J. K. et al. Serotonergic systems associated with arousal and vigilance behaviors following administration of anxiogenic drugs. **Neuroscience**, v. 133, n. 4, p. 983–997, jan. 2005.

AHOKAS, A. et al. Estrogen Deficiency in Severe Postpartum Depression. **The Journal of Clinical Psychiatry**, v. 62, n. 5, p. 332–336, 15 maio 2001.

AL-FAYEZ, G. A.; OHAERI, J. U.; GADO, O. M. Prevalence of physical, psychological, and sexual abuse among a nationwide sample of Arab high school students: association with family characteristics, anxiety, depression, self-esteem, and quality of life. **Social Psychiatry and Psychiatric Epidemiology**, v. 47, n. 1, p. 53–66, 13 jan. 2012.

ALBIN, R. L. et al. Excitatory amino acid binding sites in the periaqueductal gray of the rat. **Neuroscience Letters**, v. 118, n. 1, p. 112–115, out. 1990.

ALMEIDA, O. P. Association Between Physiological Serum Concentration of Estrogen and the Mental Health of Community-Dwelling Postmenopausal Women Age 70 Years and Over. **American Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 13, n. 2, p. 142–149, 1 fev. 2005.

ALTEMUS, M.; SARVAIYA, N.; NEILL EPPERSON, C. Sex differences in anxiety and depression clinical perspectives. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 35, n. 3, p. 320–330, ago. 2014.

AMÉNDOLA, L.; RATUSKI, A.; WEARY, D. M. Variation in the onset of CO<sub>2</sub>-induced anxiety in female Sprague Dawley rats. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 19007, 12 dez. 2019.

AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 5th edition, text revision. Washington, DC, 2013.

ANDRADE, L. H. et al. Mental disorders in megacities: Findings from the São Paulo megacity mental health survey, Brazil. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, 2012.

ARIELI, R. Can the rat detect hypoxia in inspired air? **Respiration Physiology**, v. 79, n. 3, p. 243–253, mar. 1990.

ARIELI, R.; KEREM, D.; MELAMED, Y. Hyperoxic exposure affects the ventilatory response to hypoxia in awake rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 64, n. 1, p. 181–186, 1 jan. 1988.

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, 1 jun. 1978.

BACKSTROM, T. et al. Mood, Sexuality, Hormones, and the Menstrual Cycle. II. Hormone Levels and Their Relationship to the Premenstrual Syndrome. **Psychosomatic Medicine**, v. 45, n. 6, p. 503–507, dez. 1983.

BACKSTROM, T. et al. The Role of Hormones and Hormonal Treatments in Premenstrual Syndrome. **CNS Drugs**, v. 17, n. 5, p. 325–342, 2003.

BÄCKSTRÖM, T.; CARSTENSEN, H. Estrogen and progesterone in plasma in relation to premenstrual tension. **Journal of Steroid Biochemistry**, v. 5, n. 3, p. 257–260, maio 1974.

BANDELOW, B. et al. World Federation of Societies of Biological Psychiatry (WFSBP) Guidelines for the Pharmacological Treatment of Anxiety, Obsessive-Compulsive and Post-Traumatic Stress Disorders – First Revision. **The World Journal of Biological Psychiatry**, v. 9, n. 4, p. 248–312, 12 jan. 2008.

BANDELOW, B.; MICHAELIS, S. Epidemiology of anxiety disorders in the 21st century. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 17, n. 3, p. 327–335, 2015.

BANDELOW, B.; MICHAELIS, S.; WEDEKIND, D. Treatment of anxiety disorders. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 19, n. 2, p. 93–107, 30 jun. 2017.

BANDLER, R.; SHIPLEY, M. T. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? **Trends in Neurosciences**, v. 17, n. 9, p. 379–389, jan. 1994.

BANGASSER, D. A.; CUARENTA, A. Sex differences in anxiety and depression: circuits and mechanisms. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 22, n. 11, p. 674–684, 20 nov. 2021.

BARATTA, M. V. et al. Behavioural and neural sequelae of stressor exposure are not modulated by controllability in females. **European Journal of Neuroscience**, v. 47, n. 8, p. 959–967, abr. 2018.

BARNARD, K. et al. Health Status among Women with Menstrual Symptoms. **Journal of Women's Health**, v. 12, n. 9, p. 911–919, nov. 2003.

BEATTY, W. W.; FESSLER, R. G. Ontogeny of sex differences in open-field behavior and sensitivity to electric shock in the rat. **Physiology & Behavior**, v. 16, n. 4, p. 413–417, abr. 1976.

BEBBINGTON, P. E. et al. The influence of age and sex on the prevalence of depressive conditions: report from the National Survey of Psychiatric Morbidity. **Psychological Medicine**, v. 28, n. 1, p. 9–19, 1 jan. 1998.

BECKER, J. B. et al. Strategies and Methods for Research on Sex Differences in Brain and Behavior. **Endocrinology**, v. 146, n. 4, p. 1650–1673, 1 abr. 2005.

BIGGIO, G. et al. GABAA-receptor plasticity during long-term exposure to and withdrawal from progesterone. In: [s.l.: s.n.]. p. 207–241.

BITRAN, D.; SHIEKH, M.; MCLEOD, M. Anxiolytic Effect of Progesterone is Mediated by the Neurosteroid Allopregnanolone at Brain GABA A Receptors. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 7, n. 3, p. 171–177, mar. 1995.

BITTENCOURT, A. S. et al. Organization of single components of defensive behaviors within distinct columns of periaqueductal gray matter of the rat: role of N-METHYL-d-aspartic acid glutamate receptors. **Neuroscience**, v. 125, n. 1, p. 71–89, jan. 2004.

BLANCHARD, D. Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 3, p. 205–218, maio 2001.

BLANCHARD, R. J. et al. Defense system psychopharmacology: An ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. **Behavioural Brain Research**, v. 58, n. 1–2, p. 155–165, dez. 1993.

BLANCHARD, R. J.; FLANNELLY, K. J.; BLANCHARD, D. C. Defensive behavior

of laboratory and wild *Rattus norvegicus*. **Journal of comparative psychology (Washington, D.C. : 1983)**, v. 100, n. 2, p. 101–7, jun. 1986.

BLIZARD, D. A.; LIPPMAN, H. R.; CHEN, J. J. Sex differences in open-field behavior in the rat: The inductive and activational role of gonadal hormones. **Physiology & Behavior**, v. 14, n. 5, p. 601–608, maio 1975.

BLOCH, M.; SCHMIDT, P. J.; RUBINOW, D. R. Premenstrual Syndrome: Evidence for Symptom Stability Across Cycles. **American Journal of Psychiatry**, v. 154, n. 12, p. 1741–1746, dez. 1997.

BORKOWSKI, A. H. et al. Interaction between delta opioid receptors and benzodiazepines in CO<sub>2</sub>-induced respiratory responses in mice. **Brain Research**, v. 1396, p. 54–59, jun. 2011.

BRACK, K. E.; LOVICK, T. A. Neuronal excitability in the periaqueductal grey matter during the estrous cycle in female Wistar rats. **Neuroscience**, v. 144, n. 1, p. 325–335, jan. 2007.

BRENNER, I.; BEN-AMITAY, G. Sexual Revictimization: The Impact of Attachment Anxiety, Accumulated Trauma, and Response to Childhood Sexual Abuse Disclosure. **Violence and Victims**, v. 30, n. 1, p. 49–65, 2015.

BROIZ, A. C. et al. Effects of neurokinin-1 and 3-receptor antagonists on the defensive behavior induced by electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray. **Neuroscience**, v. 201, p. 134–145, jan. 2012.

BROWNING, J. R. et al. Air-puff induced vocalizations: A novel approach to detecting negative affective state following concussion in rats. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 275, p. 45–49, jan. 2017.

BUNACIU, L. et al. Biological sex and panic-relevant anxious reactivity to abrupt increases in bodily arousal as a function of biological challenge intensity. **Journal of Behavior Therapy and Experimental Psychiatry**, v. 43, n. 1, p. 526–531, mar. 2012.

BURGER, H. G. et al. The endocrinology of the menopausal transition: a cross-sectional study of a population-based sample. **The Journal of Clinical**

**Endocrinology & Metabolism**, v. 80, n. 12, p. 3537–3545, dez. 1995.

BUTCHER, R. L.; COLLINS, W. E.; FUGO, N. W. Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17beta throughout the 4-day estrous cycle of the rat. **Endocrinology**, v. 94, n. 6, p. 1704–1708, jun. 1974.

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

CAMPOS, R. N.; CAMPOS, J. A. DE O.; SANCHES, M. A evolução histórica dos conceitos de transtorno de humor e transtorno de personalidade: problemas no diagnóstico diferencial. **Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)**, v. 37, n. 4, p. 162–166, 2010.

CAROBREZ, A. P.; TEIXEIRA, K. V; GRAEFF, F. G. Modulation of defensive behavior by periaqueductal gray NMDA/glycine-B receptor. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 7–8, p. 697–709, dez. 2001.

CARVALHO-NETTO, E. F. et al. Role of glutamate NMDA receptors and nitric oxide located within the periaqueductal gray on defensive behaviors in mice confronted by predator. **Psychopharmacology**, v. 204, n. 4, p. 617–625, 25 jul. 2009.

CARVALHO, M. C. et al. Influence of estrous cycle stage on acquisition and expression of fear conditioning in female rats. **Physiology & Behavior**, v. 234, p. 113372, maio 2021.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Adverse childhood experiences reported by adults --- five states, 2009. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 59, n. 49, p. 1609–13, 17 dez. 2010.

CHRISLER, J. C.; CAPLAN, P. The strange case of Dr. Jekyll and Ms. Hyde: how PMS became a cultural phenomenon and a psychiatric disorder. **Annual review of sex research**, v. 13, p. 274–306, 2002.

CHRISTIANSEN, D. M. Examining Sex and Gender Differences in Anxiety Disorders. In: DURBANO, F. (Ed.). . **A Fresh Look at Anxiety Disorders**.

London: IntechOpen: [s.n.].

COHEN, L. S. et al. Short-Term Use of Estradiol for Depression in Perimenopausal and Postmenopausal Women: A Preliminary Report. **American Journal of Psychiatry**, v. 160, n. 8, p. 1519–1522, ago. 2003.

COMMONS, K. G.; VALENTINO, R. J. Cellular basis for the effects of substance P in the periaqueductal gray and dorsal raphe nucleus. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 447, n. 1, p. 82–97, 20 maio 2002.

CORA, M. C.; KOOISTRA, L.; TRAVLOS, G. Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse. **Toxicologic Pathology**, v. 43, n. 6, p. 776–793, 3 ago. 2015.

D'SOUZA, D.; SADANANDA, M. Estrous Cycle Phase-Dependent Changes in Anxiety- and Depression-Like Profiles in the Late Adolescent Wistar-Kyoto Rat. **Annals of Neurosciences**, v. 24, n. 3, p. 136–145, 2017.

DALY, R. C. et al. Concordant Restoration of Ovarian Function and Mood in Perimenopausal Depression. **American Journal of Psychiatry**, v. 160, n. 10, p. 1842–1846, out. 2003.

DARWIN, C.; EKMAN, P. **The Expression of the Emotions in Man and Animals**. 20. ed. Oxford, USA: Oxford University Press, 2009.

DAVID, D. J.; GARDIER, A. M. Les bases de pharmacologie fondamentale du système sérotoninergique: application à la réponse antidépressive. **L'Encéphale**, v. 42, n. 3, p. 255–263, jun. 2016.

DAY, H. E. W. et al. Differential expression of 5HT-1A,  $\beta$ 1b adrenergic, CRF-R1, and CRF-R2 receptor mRNA in serotonergic,  $\beta$ -aminobutyric acidergic, and catecholaminergic cells of the rat dorsal raphe nucleus. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 474, n. 3, p. 364–378, 28 jun. 2004.

DAZZI, L. et al. Depletion of cortical allopregnanolone potentiates stress-induced increase in cortical dopamine output. **Brain Research**, v. 932, n. 1–2, p. 135–139, abr. 2002.

DE BELLIS, M. D.; SPRATT, E. G.; HOOPER, S. R. Neurodevelopmental Biology Associated with Childhood Sexual Abuse. **Journal of Child Sexual Abuse**, v.

20, n. 5, p. 548–587, set. 2011.

DE BORTOLI, V. C.; NOGUEIRA, R. L.; ZANGROSSI, H. Alprazolam potentiates the antiaversive effect induced by the activation of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptors in the rat dorsal periaqueductal gray. **Psychopharmacology**, v. 198, n. 3, p. 341–349, 30 jun. 2008.

DE JONGH, R. et al. The effects of sex and neonatal maternal separation on fear-potentiated and light-enhanced startle. **Behavioural Brain Research**, v. 161, n. 2, p. 190–196, jun. 2005.

DE NOVAES SOARES, C. et al. Efficacy of Estradiol for the Treatment of Depressive Disorders in Perimenopausal Women. **Archives of General Psychiatry**, v. 58, n. 6, p. 529, 1 jun. 2001.

DE OLIVEIRA SERGIO, T. et al. Serotonin mediates the panicolytic-like effect of oxytocin in the dorsal periaqueductal gray. **Journal of Psychopharmacology**, v. 34, n. 4, p. 383–390, 28 abr. 2020.

DEAKIN, J. F. W.; GRAEFF, F. G. 5-HT and mechanisms of defence. **Journal of Psychopharmacology**, v. 5, n. 4, p. 305–315, 2 jul. 1991.

DEL-BEN, C. M.; GRAEFF, F. G. Panic Disorder: Is the PAG Involved? **Neural Plasticity**, v. 2009, p. 1–9, 2009.

DELGADO, J. M. R. CEREBRAL STRUCTURES INVOLVED IN TRANSMISSION AND ELABORATION OF NOXIOUS STIMULATION. **Journal of Neurophysiology**, v. 18, n. 3, p. 261–275, 1 maio 1955.

DELGADO, J. M. R.; ROBERTS, W. W.; MILLER, N. E. Learning Motivated by Electrical Stimulation of the Brain. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 179, n. 3, p. 587–593, 30 nov. 1954.

DELTHEIL, T. et al. Behavioral and serotonergic consequences of decreasing or increasing hippocampus brain-derived neurotrophic factor protein levels in mice. **Neuropharmacology**, v. 55, n. 6, p. 1006–1014, nov. 2008.

DENNERSTEIN, L. et al. Premenstrual Tension-Hormonal Profiles. **Journal of Psychosomatic Obstetrics & Gynecology**, v. 3, n. 1, p. 37–51, 7 jan. 1984.



DEVALL, A. J. et al. Elevation of brain allopregnanolone rather than 5-HT release by short term, low dose fluoxetine treatment prevents the estrous cycle-linked increase in stress sensitivity in female rats. **European Neuropsychopharmacology**, v. 25, n. 1, p. 113–123, jan. 2015.

DÍAZ-VÉLIZ, G.; DUSSAUBAT, N.; MORA, S. Ketanserin Effects on Rat Behavioral Responses: Modifications by the Estrous Cycle, Ovariectomy and Estradiol Replacement. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 57, n. 4, p. 687–692, ago. 1997.

DONNER, N. C.; LOWRY, C. A. Sex differences in anxiety and emotional behavior. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 465, n. 5, p. 601–626, 2013.

EATON, W. W. Progress in the epidemiology of anxiety disorders. **Epidemiologic Reviews**, v. 17, n. 1, p. 32–38, 1995.

ELLSBERG, M. et al. Domestic violence and emotional distress among Nicaraguan women: Results from a population-based study. **American Psychologist**, v. 54, n. 1, p. 30–36, 18 jan. 1999.

FACCHINETTI, F. et al. Lactate infusion induces panic attacks in patients with premenstrual syndrome. **Psychosomatic Medicine**, v. 54, n. 3, p. 288–296, maio 1992.

FARRANT, M.; NUSSER, Z. Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABAA receptors. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 6, n. 3, p. 215–229, mar. 2005.

FAULKNER, P.; DEAKIN, J. F. W. The role of serotonin in reward, punishment and behavioural inhibition in humans: Insights from studies with acute tryptophan depletion. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 46, p. 365–378, out. 2014.

FAWLEY, J. A.; PETERS, J. H.; ANDRESEN, M. C. GABA B -mediated inhibition of multiple modes of glutamate release in the nucleus of the solitary tract. **Journal of Neurophysiology**, v. 106, n. 4, p. 1833–1840, out. 2011.

FERNANDES, G. G. et al. Nitric oxide in the dorsal periaqueductal gray mediates the panic-like escape response evoked by exposure to hypoxia. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 92, p. 321–327, jun. 2019.

FERNÁNDEZ-GUASTI, A. et al. Chronic Treatment With Desipramine Induces an Estrous Cycle-Dependent Anxiolytic-Like Action in the Burying Behavior, But Not in the Elevated Plus-Maze Test. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 63, n. 1, p. 13–20, maio 1999.

FERREIRA-SGOBBI, R. et al. Panic-like responses of female Wistar rats confronted by *Bothrops alternatus* pit vipers, or exposure to acute hypoxia: Effect of oestrous cycle. **European Journal of Neuroscience**, v. 55, n. 1, p. 32–48, 21 jan. 2022.

FERTIG, R. M. et al. Sexual side effects of 5- $\alpha$ -reductase inhibitors finasteride and dutasteride: A comprehensive review. **Dermatology online journal**, v. 23, n. 11, 11 nov. 2017.

FILE, S. E. et al. Animal Tests of Anxiety. **Current Protocols in Pharmacology**, v. 27, n. 1, dez. 2004.

FOUQUET, G. et al. Serotonin, hematopoiesis and stem cells. **Pharmacological Research**, v. 140, p. 67–74, fev. 2019.

FRAU, R. et al. The 5-alpha reductase inhibitor finasteride reduces dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. **Experimental Neurology**, v. 291, p. 1–7, maio 2017a.

FRAU, R. et al. The Neurosteroidogenic Enzyme 5 $\alpha$ -Reductase Mediates Psychotic-Like Complications of Sleep Deprivation. **Neuropsychopharmacology**, v. 42, n. 11, p. 2196–2205, 19 out. 2017b.

FREEMAN, E. W. Premenstrual syndrome and premenstrual dysphoric disorder: definitions and diagnosis<sup>11</sup>Adapted from the symposium on Premenstrual Syndrome and Premenstrual Dysphoric Disorders, July 17, 2000, Rhodes, Greece. **Psychoneuroendocrinology**, v. 28, p. 25–37, ago. 2003.

FREEMAN, M. E. Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Rat. In: NEILL, J. D. (Ed.). . **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. 3. ed. [s.l.] Elsevier, 2006. p. 2328–2367.

FRICK, K. M. et al. Reference memory, anxiety and estrous cyclicity in C57BL/6NIA mice are affected by age and sex. **Neuroscience**, v. 95, n. 1, p. 293–307, nov. 1999.

FRITZ, A.-K.; AMREIN, I.; WOLFER, D. P. Similar reliability and equivalent performance of female and male mice in the open field and water-maze place navigation task. **American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics**, v. 175, n. 3, p. 380–391, set. 2017.

FRY, J. P. et al. Fluoxetine elevates allopregnanolone in female rat brain but inhibits a steroid microsomal dehydrogenase rather than activating an aldo-keto reductase. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, n. 24, p. 5870–5880, dez. 2014.

FRYE, C. A.; PETRALIA, S. M.; RHODES, M. E. Estrous cycle and sex differences in performance on anxiety tasks coincide with increases in hippocampal progesterone and 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 67, n. 3, p. 587–596, nov. 2000.

FRYE, C. A.; WALF, A. A. Changes in Progesterone Metabolites in the Hippocampus Can Modulate Open Field and Forced Swim Test Behavior of Proestrous Rats. **Hormones and Behavior**, v. 41, n. 3, p. 306–315, maio 2002.

FU, W. et al. Chemical neuroanatomy of the dorsal raphe nucleus and adjacent structures of the mouse brain. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 518, n. 17, p. 3464–3494, 20 maio 2010.

GANGISETTY, O.; REDDY, D. S. Neurosteroid withdrawal regulates GABA-A receptor  $\alpha$ 4-subunit expression and seizure susceptibility by activation of progesterone receptor-independent early growth response factor-3 pathway. **Neuroscience**, v. 170, n. 3, p. 865–880, out. 2010.

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, mar. 1970.

GEORGE, D. T.; AMELI, R.; KOOB, G. F. Periaqueductal Gray Sheds Light on Dark Areas of Psychopathology. **Trends in Neurosciences**, v. 42, n. 5, p. 349–360, maio 2019.

GERVASONI, D. et al. Role and Origin of the GABAergic Innervation of Dorsal Raphe Serotonergic Neurons. **The Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 11, p. 4217–4225, 1 jun. 2000.

GOFFAUX, P. et al. Sex differences in perceived pain are affected by an anxious brain. **Pain**, v. 152, n. 9, p. 2065–2073, set. 2011.

GONÇALVES, D. A. et al. Brazilian multicentre study of common mental disorders in primary care: rates and related social and demographic factors. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 30, n. 3, p. 623–632, mar. 2014.

GOREY, K. M.; LESLIE, D. R. The prevalence of child sexual abuse: Integrative review adjustment for potential response and measurement biases. **Child Abuse & Neglect**, v. 21, n. 4, p. 391–398, abr. 1997.

GORMAN, J. M. et al. Physiological Changes During Carbon Dioxide Inhalation in Patients With Panic Disorder, Major Depression, and Premenstrual Dysphoric Disorder. **Archives of General Psychiatry**, v. 58, n. 2, p. 125, 1 fev. 2001.

GOUVEIA, A. et al. Influence of the estrous cycle on the behavior of rats in the elevated T-maze. **Behavioural Processes**, v. 67, n. 2, p. 167–171, set. 2004.

GRACIA, C. R.; FREEMAN, E. W. Onset of the Menopause Transition. **Obstetrics and Gynecology Clinics of North America**, v. 45, n. 4, p. 585–597, dez. 2018.

GRAEFF, F. G. Minor tranquilizers and brain defense systems. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 14, n. 4–5, p. 239–65, out. 1981.

GRAEFF, F. G. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**,

v. 27, n. 4, p. 811–29, abr. 1994.

GRAEFF, F. G. Ansiedade. In: BRANDÃO, M. L.; GRAEFF, F. G. (Eds.). . **Neurobiologia das doenças mentais**. 5ª Ed ed. São Paulo: Lemos, 1999. p. 135–178.

GRAEFF, F. G. On serotonin and experimental anxiety. **Psychopharmacology**, v. 163, n. 3–4, p. 467–476, 1 out. 2002.

GRAEFF, F. G. Serotonina, matéria cinzenta periaquedutal e transtorno do pânico. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 25, n. suppl 2, p. 42–45, dez. 2003.

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

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, jun. 1970.

GRAEFF, F. G.; ZANGROSSI, H. J. Medicamentos Antiansiedade. In: GUIMARÃES, F. S.; GRAEFF, F. G. (Eds.). . **Fundamentos de Psicofarmacologia**. 3ª ed. [s.l.] Atheneu, 2021. p. 199–240.

GREGOIRE, A. J. . et al. Transdermal oestrogen for treatment of severe postnatal depression. **The Lancet**, v. 347, n. 9006, p. 930–933, abr. 1996.

GRESACK, J. E. et al. Sex differences in contextual fear conditioning are associated with differential ventral hippocampal extracellular signal-regulated kinase activation. **Neuroscience**, v. 159, n. 2, p. 451–467, mar. 2009.

GRIFFITHS, J. L.; LOVICK, T. A. GABAergic neurones in the rat periaqueductal grey matter express  $\alpha 4$ ,  $\beta 1$  and  $\delta$  GABAA receptor subunits: Plasticity of expression during the estrous cycle. **Neuroscience**, v. 136, n. 2, p. 457–466, jan. 2005.

GUILHERME GRAEFF, F.; ZANGROSSI JR., 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. 207–217, 1 set. 2010.

GUIMARÃES, F. S. et al. Anxiolytic effect in the elevated plus-maze of the NMDA receptor antagonist AP7 microinjected into the dorsal periaqueductal grey. **Psychopharmacology**, v. 103, n. 1, p. 91–94, jan. 1991.

GULINELLO, M.; GONG, Q. .; SMITH, S. . Progesterone withdrawal increases the  $\alpha 4$  subunit of the GABAA receptor in male rats in association with anxiety and altered pharmacology — a comparison with female rats. **Neuropharmacology**, v. 43, n. 4, p. 701–714, set. 2002.

GUO, X. et al. Meta-analysis of the prevalence of anxiety disorders in mainland China from 2000 to 2015 OPEN. **Nature Publishing Group**, 2016.

GUYTON, A. C. Female Physiology Before Pregnancy and Female Hormones. In: GUYTON, A. C.; HALL, J. E. (Eds.). . **Textbook of Medical Physiology**. 11. ed. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier Inc, 2006. p. 1011–1026.

HAJÓS, M. et al. Different tonic regulation of neuronal activity in the rat dorsal raphe and medial prefrontal cortex via 5-HT<sub>1A</sub> receptors. **Neuroscience Letters**, v. 304, n. 3, p. 129–132, maio 2001.

HALBREICH, U. et al. Low plasma gamma-aminobutyric acid levels during the late luteal phase of women with premenstrual dysphoric disorder. **American Journal of Psychiatry**, v. 153, n. 5, p. 718–720, maio 1996.

HALBREICH, U. The etiology, biology, and evolving pathology of premenstrual syndromes. **Psychoneuroendocrinology**, v. 28, p. 55–99, ago. 2003.

HALE, M. W. et al. Exposure to an open-field arena increases c-Fos expression in a subpopulation of neurons in the dorsal raphe nucleus, including neurons projecting to the basolateral amygdaloid complex. **Neuroscience**, v. 157, n. 4, p. 733–748, dez. 2008.

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, 7 jul. 2012.

HAMASHIMA, S.; SHIBATA, M. Cardiovascular Adaptation in Response to Chronic Hypoxia in Awake Rats. In: [s.l: s.n.]. p. 241–246.

HERVÁS, I.; ARTIGAS, F. Effect of fluoxetine on extracellular 5-hydroxytryptamine in rat brain. Role of 5-HT autoreceptors. **European Journal of Pharmacology**, v. 358, n. 1, p. 9–18, set. 1998.

HIROI, R.; NEUMAIER, J. F. Differential effects of ovarian steroids on anxiety versus fear as measured by open field test and fear-potentiated startle. **Behavioural Brain Research**, v. 166, n. 1, p. 93–100, jan. 2006.

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, ago. 1987.

HOWARD, L. M.; TREVILLION, K.; AGNEW-DAVIES, R. Domestic violence and mental health. **International Review of Psychiatry**, v. 22, n. 5, p. 525–534, 3 out. 2010.

HUGHES, R. N. Sex still matters: has the prevalence of male-only studies of drug effects on rodent behaviour changed during the past decade? **Behavioural Pharmacology**, v. 30, n. 1, p. 95–99, fev. 2019.

IMAI, H. et al. The morphology and divergent axonal organization of midbrain raphe projection neurons in the rat. **Brain and Development**, v. 8, n. 4, p. 343–354, jan. 1986.

INSTITUTE OF HEALTH METRICS AND EVALUATION. **Global Health Data Exchange (GHDx)**. Disponível em: <<https://vizhub.healthdata.org/gbd-results/>>. Acesso em: 6 mar. 2023.

JACOB, C. A. et al. Chronic imipramine enhances 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors-mediated inhibition of panic-like behavior in the rat dorsal periaqueductal gray. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 72, n. 4, p. 761–766, jul. 2002.

JENCK, F.; MOREAU, J.-L.; MARTIN, J. R. Dorsal periaqueductal gray-induced aversion as a simulation of panic anxiety: Elements of face and predictive validity. **Psychiatry Research**, v. 57, n. 2, p. 181–191, jul. 1995.

JOCHMANS-LEMOINE, A. et al. Divergent physiological responses in laboratory rats and mice raised at high altitude. **Journal of Experimental Biology**, v. 218,

n. 7, p. 1035–1043, 1 abr. 2015.

JOH, T. H. et al. Brain tryptophan hydroxylase: purification of, production of antibodies to, and cellular and ultrastructural localization in serotonergic neurons of rat midbrain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 72, n. 9, p. 3575–3579, set. 1975.

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, 1 jul. 2005.

JOHNSON, P. L. et al. Induction of c-Fos in ‘panic/defence’-related brain circuits following brief hypercarbic gas exposure. **Journal of Psychopharmacology**, v. 25, n. 1, p. 26–36, 15 jan. 2011.

JONGE, P. DE et al. Attacks in the World Mental Health Surveys. **Depress Anxiety**, v. 33, n. 12, p. 1155–1177, 2017.

KANES, S. et al. Brexanolone (SAGE-547 injection) in post-partum depression: a randomised controlled trial. **The Lancet**, v. 390, n. 10093, p. 480–489, jul. 2017.

KANG, Y.-H. et al. GABAA and GABAB receptors have opposite effects on synaptic glutamate release on the nucleus tractus solitarii neurons. **Neuroscience**, v. 209, p. 39–46, maio 2012.

KAURA, V. et al. The progesterone metabolite allopregnanolone potentiates GABAA receptor-mediated inhibition of 5-HT neuronal activity. **European Neuropsychopharmacology**, v. 17, n. 2, p. 108–115, jan. 2007.

KEISER, A. A. et al. Sex Differences in Context Fear Generalization and Recruitment of Hippocampus and Amygdala during Retrieval. **Neuropsychopharmacology**, v. 42, n. 2, p. 397–407, 31 jan. 2017.

KELLY, M. M. et al. Sex differences in emotional and physiological responses to the Trier Social Stress Test. **Journal of Behavior Therapy and Experimental Psychiatry**, v. 39, n. 1, p. 87–98, mar. 2008.

KELLY, M. M.; FORSYTH, J. P.; KAREKLA, M. Sex differences in response to a panicogenic challenge procedure: An experimental evaluation of panic



vulnerability in a non-clinical sample. **Behaviour Research and Therapy**, v. 44, n. 10, p. 1421–1430, out. 2006.

KINKEAD, R. The periaqueductal grey and its role in respiratory regulation. **Acta Physiologica**, v. 211, n. 3, p. 474–475, jul. 2014.

KIRBY, L. G.; ALLEN, A. R.; LUCKI, I. Regional differences in the effects of forced swimming on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid. **Brain Research**, v. 682, n. 1–2, p. 189–196, jun. 1995.

KIRBY, L. G.; LUCKI, I. Interaction between the forced swimming test and fluoxetine treatment on extracellular 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid in the rat. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 282, n. 2, p. 967–76, ago. 1997.

KLAIBER, E. L. Estrogen Therapy for Severe Persistent Depressions in Women. **Archives of General Psychiatry**, v. 36, n. 5, p. 550, 1 maio 1979.

KLOPPEN, K. et al. Prevalence of Child Sexual Abuse in the Nordic Countries: A Literature Review. **Journal of Child Sexual Abuse**, v. 25, n. 1, p. 37–55, 2 jan. 2016.

KNIGHT, P. et al. Sex differences in the elevated plus-maze test and large open field test in adult Wistar rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 204, p. 173168, maio 2021.

KOKRAS, N. et al. Behavioral sexual dimorphism in models of anxiety and depression due to changes in HPA axis activity. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 436–445, jan. 2012.

KOKRAS, N.; DALLA, C. Sex differences in animal models of psychiatric disorders. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, n. 20, p. 4595–4619, out. 2014.

KRAMER, J. M.; NOLAN, P. C.; WALDROP, T. G. In vitro responses of neurons in the periaqueductal gray to hypoxia and hypercapnia. **Brain Research**, v. 835, n. 2, p. 197–203, jul. 1999.

KRUK, M. R. Hypothalamic Attack: A Wonderful Artifact or a Useful Perspective

- on Escalation and Pathology in Aggression? A Viewpoint. p. 143–188, 2014.
- KUMAR, S. et al. Domestic violence and its mental health correlates in Indian women. **British Journal of Psychiatry**, v. 187, n. 1, p. 62–67, 2 jul. 2005.
- KUMAR, V.; BHAT, Z. A.; KUMAR, D. Animal models of anxiety: A comprehensive review. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 68, n. 2, p. 175–183, set. 2013.
- LANDÉN, M.; ERIKSSON, E. How does premenstrual dysphoric disorder relate to depression and anxiety disorders? **Depression and Anxiety**, v. 17, n. 3, p. 122–129, 2003.
- LE MELLEDO, J.-M. Response to Flumazenil in Women With Premenstrual Dysphoric Disorder. **American Journal of Psychiatry**, v. 157, n. 5, p. 821–823, 1 maio 2000.
- LE MELLÉDO, J. Sensitivity to CCK-4 in Women with and without Premenstrual Dysphoric Disorder (PMDD) During Their Follicular and Luteal Phases. **Neuropsychopharmacology**, v. 20, n. 1, p. 81–91, jan. 1999.
- LIN, T.-B. et al. GABAergic modulation of ventilatory response to acute and sustained hypoxia in obese Zucker rats. **International Journal of Obesity**, v. 29, n. 2, p. 188–195, 26 fev. 2005.
- LOGUE, C. M.; MOOS, R. H. Perimenstrual symptoms: prevalence and risk factors. **Psychosomatic Medicine**, v. 48, n. 6, p. 388–414, jul. 1986.
- LOPES, D. A. et al. Unpredictable chronic mild stress exerts anxiogenic-like effects and activates neurons in the dorsal and caudal region and in the lateral wings of the dorsal raphe nucleus. **Behavioural Brain Research**, v. 297, p. 180–186, jan. 2016.
- LOVICK, T. A. et al. Changes in GABAA receptor subunit expression in the midbrain during the oestrous cycle in Wistar rats. **Neuroscience**, v. 131, n. 2, p. 397–405, jan. 2005.
- LOVICK, T. A. Sex determinants of experimental panic attacks. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 46, p. 465–471, out. 2014.

LOVICK, T. A. et al. A specific profile of luteal phase progesterone is associated with the development of premenstrual symptoms. **Psychoneuroendocrinology**, v. 75, p. 83–90, jan. 2017.

LOVICK, T. A.; ZANGROSSI, H. Effect of Estrous Cycle on Behavior of Females in Rodent Tests of Anxiety. **Frontiers in Psychiatry**, v. 12, 31 ago. 2021.

LUCHETTI, A. et al. Mouse model of panic disorder: Vulnerability to early environmental instability is strain-dependent. **Developmental Psychobiology**, v. 63, n. 6, set. 2021.

LUDERMIR, A. B. et al. Violence against women by their intimate partner and common mental disorders. **Social Science & Medicine**, v. 66, n. 4, p. 1008–1018, fev. 2008.

LUSTYK, M. K. B.; WIDMAN, L.; BECKER, L. DE L. Abuse History and Premenstrual Symptomatology: Assessing the Mediating Role of Perceived Stress. **Women & Health**, v. 46, n. 4, p. 61–80, 19 fev. 2008.

MACHADO FIGUEIREDO, R. et al. Short-term, low-dose fluoxetine prevents oestrous cycle-linked increase in anxiety-like behaviour in female rats. **Journal of Psychopharmacology**, v. 33, n. 5, p. 548–557, 23 maio 2019.

MARCONDES, F. K. et al. Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. **Physiology & Behavior**, v. 74, n. 4–5, p. 435–440, nov. 2001.

MAREN, S.; DE OCA, B.; FANSELOW, M. S. Sex differences in hippocampal long-term potentiation (LTP) and Pavlovian fear conditioning in rats: positive correlation between LTP and contextual learning. **Brain Research**, v. 661, n. 1–2, p. 25–34, out. 1994.

MARGRAF, J.; EHLERS, A.; ROTH, W. T. Sodium lactate infusions and panic attacks: a review and critique. **Psychosomatic Medicine**, v. 48, n. 1, p. 23–51, jan. 1986.

MARQUES, D. A. et al. Influence of estrous cycle hormonal fluctuations and gonadal hormones on the ventilatory response to hypoxia in female rats.

**Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 469, n. 10, p. 1277–1286, 28 out. 2017.

MASUR, J.; SCHUTZ, M. T.; BOERNGEN, R. Gender differences in open-field behavior as a function of age. **Developmental Psychobiology**, v. 13, n. 2, p. 107–110, mar. 1980.

MCEVOY, K.; OSBORNE, L. M. Allopregnanolone and reproductive psychiatry: an overview. **International Review of Psychiatry**, v. 31, n. 3, p. 237–244, 3 abr. 2019.

MCLEAN, C. P. et al. Gender differences in anxiety disorders: Prevalence, course of illness, comorbidity and burden of illness. **Journal of Psychiatric Research**, v. 45, n. 8, p. 1027–1035, ago. 2011.

MICHELSEN, 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, out. 2007.

MILAD, M. R. et al. Estrous cycle phase and gonadal hormones influence conditioned fear extinction. **Neuroscience**, v. 164, n. 3, p. 887–895, dez. 2009.

MOBBS, D. et al. When Fear Is Near: Threat Imminence Elicits Prefrontal-Periaqueductal Gray Shifts in Humans. **Science**, v. 317, n. 5841, p. 1079–1083, 24 ago. 2007.

MOBBS, D. et al. From Threat to Fear: The Neural Organization of Defensive Fear Systems in Humans. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 39, p. 12236–12243, 30 set. 2009.

MOLINA-HERNÁNDEZ, M. et al. Estrous cycle variation in anxiolytic-like effects of topiramate in Wistar rats in two animal models of anxiety-like behavior. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 103, n. 3, p. 631–636, jan. 2013.

MUNDAY, M. R.; BRUSH, M. G.; TAYLOR, R. W. CORRELATIONS BETWEEN PROGESTERONE, OESTRADIOL AND ALDOSTERONE LEVELS IN THE PREMENSTRUAL SYNDROME. **Clinical Endocrinology**, v. 14, n. 1, p. 1–9, jan. 1981.

MUZERELLE, A. et al. Conditional anterograde tracing reveals distinct targeting of individual serotonin cell groups (B5–B9) to the forebrain and brainstem. **Brain Structure and Function**, v. 221, n. 1, p. 535–561, 18 jan. 2016.

NASHOLD, B. S. Central Pain: Its Origins and Treatment. **Neurosurgery**, v. 21, n. CN\_suppl\_1, p. 311–322, 1 jan. 1974.

NASHOLD, B. S.; WILSON, W. P.; SLAUGHTER, D. G. Sensations Evoked by Stimulation in the Midbrain of Man. **Journal of Neurosurgery**, v. 30, n. 1, p. 14–24, jan. 1969.

NEVATTE, T. et al. ISPMO consensus on the management of premenstrual disorders. **Archives of Women's Mental Health**, v. 16, n. 4, p. 279–291, 27 ago. 2013.

NILLNI, Y. I. et al. The influence of the menstrual cycle on reactivity to a CO<sub>2</sub> challenge among women with and without premenstrual symptoms. **Cognitive Behaviour Therapy**, v. 61, n. 6, p. 1–11, 30 set. 2016.

NILLNI, Y. I.; ROHAN, K. J.; ZVOLENSKY, M. J. The role of menstrual cycle phase and anxiety sensitivity in catastrophic misinterpretation of physical symptoms during a CO<sub>2</sub> challenge. **Archives of Women's Mental Health**, v. 15, n. 6, p. 413–422, 25 dez. 2012.

NILLNI, Y. I.; TOUFEXIS, D. J.; ROHAN, K. J. Anxiety sensitivity, the menstrual cycle, and panic disorder: A putative neuroendocrine and psychological interaction. **Clinical Psychology Review**, v. 31, n. 7, p. 1183–1191, nov. 2011.

NIN, M. S. et al. Anxiolytic effect of clonazepam in female rats: Grooming microstructure and elevated plus maze tests. **European Journal of Pharmacology**, v. 684, n. 1–3, p. 95–101, jun. 2012.

O'BRIEN, P. M. S. et al. Towards a consensus on diagnostic criteria, measurement and trial design of the premenstrual disorders: the ISPMO Montreal consensus. **Archives of Women's Mental Health**, v. 14, n. 1, p. 13–21, 12 fev. 2011.

OLSEN, R. W.; SIEGHART, W. International Union of Pharmacology. LXX.

Subtypes of  $\gamma$ -Aminobutyric Acid A Receptors: Classification on the Basis of Subunit Composition, Pharmacology, and Function. Update. **Pharmacological Reviews**, v. 60, n. 3, p. 243–260, set. 2008.

ORAM, S.; KHALIFEH, H.; HOWARD, L. M. Violence against women and mental health. **The Lancet Psychiatry**, v. 4, n. 2, p. 159–170, fev. 2017.

OUYANG, C. et al. Enhanced activity of GABA receptors inhibits glutamate release induced by focal cerebral ischemia in rat striatum. **Neuroscience Letters**, v. 420, n. 2, p. 174–178, jun. 2007.

PALANZA, P. Animal models of anxiety and depression: how are females different? **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 3, p. 219–233, maio 2001.

PATATANIAN, E.; NGUYEN, D. R. Brexanolone: A Novel Drug for the Treatment of Postpartum Depression. **Journal of Pharmacy Practice**, v. 35, n. 3, p. 431–436, 11 jun. 2022.

PAUL, E. D. et al. The Deakin/Graeff hypothesis: Focus on serotonergic inhibition of panic. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 46, p. 379–396, out. 2014.

PAUL, E. D.; LOWRY, C. A. Functional topography of serotonergic systems supports the Deakin/Graeff hypothesis of anxiety and affective disorders. **Journal of Psychopharmacology**, v. 27, n. 12, p. 1090–1106, 23 dez. 2013.

PENTKOWSKI, N. S. et al. Effects of estrus cycle stage on defensive behavior in female Long-Evans hooded rats. **Physiology & Behavior**, v. 194, p. 41–47, out. 2018.

PETERSEN, E. N.; BRAESTRUP, C.; SCHEEL-KRÜGER, J. Evidence that the anticonflict effect of midazolam in amygdala is mediated by the specific benzodiazepine receptors. **Neuroscience Letters**, v. 53, n. 3, p. 285–288, fev. 1985.

PETTERSSON, R.; HAGSÄTER, S. M.; ERIKSSON, E. Serotonin depletion eliminates sex differences with respect to context-conditioned immobility in rat. **Psychopharmacology**, v. 233, n. 8, p. 1513–1521, 24 abr. 2016.

PINNA, G.; COSTA, E.; GUIDOTTI, A. Fluoxetine and norfluoxetine stereospecifically facilitate pentobarbital sedation by increasing neurosteroids. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 16, p. 6222–6225, 20 abr. 2004.

PINNA, G.; COSTA, E.; GUIDOTTI, A. SSRIs act as selective brain steroidogenic stimulants (SBSSs) at low doses that are inactive on 5-HT reuptake. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 9, n. 1, p. 24–30, fev. 2009.

POLTRONIERI, S. C.; ZANGROSSI, H.; DE BARROS VIANA, M. Antipanic-like effect of serotonin reuptake inhibitors in the elevated T-maze. **Behavioural Brain Research**, v. 147, n. 1–2, p. 185–192, dez. 2003.

POWELL, J. G. et al. Brexanolone (Zulresso): Finally, an FDA-Approved Treatment for Postpartum Depression. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 54, n. 2, p. 157–163, 3 fev. 2020.

PRETER, M.; KLEIN, D. F. Panic, suffocation false alarms, separation anxiety and endogenous opioids. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 32, n. 3, p. 603–612, abr. 2008.

RAPKIN, A. et al. Progesterone metabolite allopregnanolone in women with premenstrual syndrome. **Obstetrics & Gynecology**, v. 90, n. 5, p. 709–714, nov. 1997.

REIMAN, E. M. Neuroanatomical Correlates of a Lactate-Induced Anxiety Attack. **Archives of General Psychiatry**, v. 46, n. 6, p. 493, 1 jun. 1989.

REN, J. et al. Anatomically Defined and Functionally Distinct Dorsal Raphe Serotonin Sub-systems. **Cell**, v. 175, n. 2, p. 472- 487.e20, out. 2018.

RHODES, M. E.; FRYE, C. A. Inhibiting progesterone metabolism in the hippocampus of rats in behavioral estrus decreases anxiolytic behaviors and enhances exploratory and antinociceptive behaviors. **Cognitive, Affective, & Behavioral Neuroscience**, v. 1, n. 3, p. 287–296, set. 2001.

ROBICHAUD, R. C.; SLEDGE, K. L. The effects of p-chlorophenylalanine on experimentally induced conflict in the rat. **Life Sciences**, v. 8, n. 17, p. 965–969,

set. 1969.

ROCA, C. A. et al. Differential Menstrual Cycle Regulation of Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in Women with Premenstrual Syndrome and Controls. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, n. 7, p. 3057–3063, jul. 2003.

ROCHE, M. et al. Circuitry Underlying Regulation of the Serotonergic System by Swim Stress. **The Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 3, p. 970–977, 1 fev. 2003.

ROCINHOLI, L. F.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Anxiety-like behavior in weanling and young adult male and female malnourished rats. **Physiology & Behavior**, v. 102, n. 1, p. 13–16, jan. 2011.

RODRÍGUEZ-LANDA, J. F. et al. Montanoa frutescens and Montanoa grandiflora Extracts Reduce Anxiety-Like Behavior during the Metestrus-Diestrus Phase of the Ovarian Cycle in Wistar Rats. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–9, 2014.

RODRÍGUEZ-LANDA, J. F. et al. Chrysin reduces anxiety-like behavior through actions on GABAA receptors during metestrus-diestrus in the rat. **Behavioural Brain Research**, v. 397, p. 112952, jan. 2021.

ROMPRÉ, P.-P.; MILIARESSIS, E. Behavioral determination of refractory periods of the brainstem substrates of self-stimulation. **Behavioural Brain Research**, v. 23, n. 3, p. 205–219, mar. 1987.

RUIZ-PÉREZ, I.; PLAZAOLA-CASTAÑO, J. Intimate Partner Violence and Mental Health Consequences in Women Attending Family Practice in Spain. **Psychosomatic Medicine**, v. 67, n. 5, p. 791–797, set. 2005.

RUTTER, J. J.; AUERBACH, S. B. Acute uptake inhibition increases extracellular serotonin in the rat forebrain. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 265, n. 3, p. 1319–24, jun. 1993.

RUTTER, M.; CASPI, A.; MOFFITT, T. E. Using sex differences in psychopathology to study causal mechanisms: unifying issues and research strategies. **Journal of Child Psychology and Psychiatry**, v. 44, n. 8, p. 1092–



1115, nov. 2003.

SAKAE, D. Y. et al. Relative luminosity in the plus maze upon the exploratory behaviour of female Wistar rats. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 73, n. 7, p. 601–606, jul. 2015.

SAKAI, Y. et al. Cerebral glucose metabolism associated with a fear network in panic disorder. **NeuroReport**, v. 16, n. 9, p. 927–931, jun. 2005.

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

SANFORD KISER, R.; LBOVITZ, 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, out. 1978.

SANTORO, N. et al. Characterization of reproductive hormonal dynamics in the perimenopause. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 81, n. 4, p. 1495–1501, abr. 1996.

SANTOS, R. O. et al. Evaluation of the Effect of Acute Sibutramine in Female Rats in the Elevated T-Maze and Elevated Plus-Maze Tests. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 114, n. 2, p. 181–187, fev. 2014.

SATTAR, K. Epidemiology of Premenstrual Syndrome, A Systematic Review and Meta-Analysis Study. **JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH**, 2014.

SCHENBERG, L. C. et al. Modeling panic attacks. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 7–8, p. 647–659, dez. 2001.

SCHENBERG, L. C. et al. Translational approach to studying panic disorder in rats: Hits and misses. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 46, p. 472–496, out. 2014.

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, set. 1978.

SCHIMITEL, F. G. et al. Evidence of a suffocation alarm system within the periaqueductal gray matter of the rat. **Neuroscience**, v. 200, p. 59–73, jan. 2012.

SCHMELZER, K. et al. Clinical Profiles of Premenstrual Experiences Among Women Having Premenstrual Syndrome (PMS): Affective Changes Predominate and Relate to Social and Occupational Functioning. **Health Care for Women International**, v. 36, n. 10, p. 1104–1123, 3 out. 2015.

SCHMIDT, P. J. et al. Estrogen replacement in perimenopause-related depression: A preliminary report. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 183, n. 2, p. 414–420, ago. 2000.

SCHMIDT, P. J. et al. Premenstrual Dysphoric Disorder Symptoms Following Ovarian Suppression: Triggered by Change in Ovarian Steroid Levels But Not Continuous Stable Levels. **American Journal of Psychiatry**, v. 174, n. 10, p. 980–989, out. 2017.

SCHMIDT, P. J.; HAQ, N.; RUBINOW, D. R. A Longitudinal Evaluation of the Relationship Between Reproductive Status and Mood in Perimenopausal Women. **American Journal of Psychiatry**, v. 161, n. 12, p. 2238–2244, dez. 2004.

SCHOLL, J. L. et al. Sex differences in anxiety-like behaviors in rats. **Physiology & Behavior**, v. 211, p. 112670, nov. 2019.

SCHUBERT, K.; SHAIKH, M. B.; SIEGEL, A. NMDA receptors in the midbrain periaqueductal gray mediate hypothalamically evoked hissing behavior in the cat. **Brain research**, v. 726, n. 1–2, p. 80–90, 8 jul. 1996.

SCHÜLE, C.; NOTHDURFTER, C.; RUPPRECHT, R. The role of allopregnanolone in depression and anxiety. **Progress in Neurobiology**, v. 113, p. 79–87, fev. 2014.

SERRA, M. et al. Opposite effects of short- versus long-term administration of fluoxetine on the concentrations of neuroactive steroids in rat plasma and brain. **Psychopharmacology**, v. 158, n. 1, p. 48–54, 1 out. 2001.

SHEIKH, J. I.; LESKIN, G. A.; KLEIN, D. F. Gender Differences in Panic Disorder:

Findings From the National Comorbidity Survey. **American Journal of Psychiatry**, v. 159, n. 1, p. 55–58, jan. 2002a.

SHEIKH, J. I.; LESKIN, G. A.; KLEIN, D. F. Gender Differences in Panic Disorder: Findings From the National Comorbidity Survey. **American Journal of Psychiatry**, v. 159, n. 1, p. 55–58, jan. 2002b.

SHUHAMA, R. et al. Defensive responses to threat scenarios in Brazilians reproduce the pattern of Hawaiian Americans and non-human mammals. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, n. 4, p. 324–332, abr. 2008.

SIGEL, E.; STEINMANN, M. E. Structure, Function, and Modulation of GABAA Receptors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 48, p. 40224–40231, nov. 2012.

SIGMON, S. T. et al. Psychophysiological, somatic, and affective changes across the menstrual cycle in women with panic disorder. **Journal of Consulting and Clinical Psychology**, v. 68, n. 3, p. 425–431, 2000.

SLOTTEN, H. A. et al. Long-lasting changes in behavioural and neuroendocrine indices in the rat following neonatal maternal separation: Gender-dependent effects. **Brain Research**, v. 1097, n. 1, p. 123–132, jun. 2006.

SMITH, R. N. J. et al. A randomised comparison over 8 months of 100 mug and 200 mug twice weekly doses of transdermal oestradiol in the treatment of severe premenstrual syndrome. **BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 102, n. 6, p. 475–484, jun. 1995.

SMITH, S. S. et al. GABAA receptor  $\alpha 4$  subunit suppression prevents withdrawal properties of an endogenous steroid. **Nature**, v. 392, n. 6679, p. 926–929, abr. 1998.

SMITH, S. S. et al. Steroid withdrawal in the mouse results in anxiogenic effects of  $3\alpha,5\beta$ -THP: a possible model of premenstrual dysphoric disorder. **Psychopharmacology**, v. 186, n. 3, p. 323–333, 29 jun. 2006.

SPANNUTH, B. M. et al. Investigation of a central nucleus of the amygdala/dorsal

raphe nucleus serotonergic circuit implicated in fear-potentiated startle. **Neuroscience**, v. 179, p. 104–119, abr. 2011.

SPIACCI, A. et al. Serotonin in the dorsal periaqueductal gray inhibits panic-like defensive behaviors in rats exposed to acute hypoxia. **Neuroscience**, v. 307, p. 191–198, out. 2015.

SPIACCI, A. et al. Panic-like escape response elicited in mice by exposure to CO<sub>2</sub>, but not hypoxia. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 81, p. 178–186, fev. 2018.

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, dez. 2012.

SPIEGEL, E. A.; KLETZKIN, M.; SZEKELY, E. G. PAIN REACTIONS UPON STIMULATION OF THE TECTUM MESENCEPHALI. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 13, n. 1, p. 212–220, jan. 1954.

STEINBUSCH, H. W. M.; VERHOFSTAD, A. A. J.; JOOSTEN, H. W. J. Localization of serotonin in the central nervous system by immunohistochemistry: Description of a specific and sensitive technique and some applications. **Neuroscience**, v. 3, n. 9, p. 811–819, set. 1978.

STEZHKA, V. .; LOVICK, T. . Projections from dorsal raphe nucleus to the periaqueductal grey matter: studies in slices of rat midbrain maintained in vitro. **Neuroscience Letters**, v. 230, n. 1, p. 57–60, jul. 1997.

STORZ, J. F. et al. The Molecular Basis of High-Altitude Adaptation in Deer Mice. **PLoS Genetics**, v. 3, n. 3, p. e45, 30 mar. 2007.

STRÖHLE, A. Increased response to a putative panicogenic nocebo administration in female patients with panic disorder. **Journal of Psychiatric Research**, v. 34, n. 6, p. 439–442, dez. 2000.

SUGASAWA, Y. et al. Site-specific effects of neurosteroids on GABA<sub>A</sub> receptor activation and desensitization. **eLife**, v. 9, 21 set. 2020.

TAO, R.; AUERBACH, S. B. Regulation of serotonin release by GABA and excitatory amino acids. **Journal of Psychopharmacology**, v. 14, n. 2, p. 100–113, 1 mar. 2000.

TAO, R.; AUERBACH, S. B. Influence of inhibitory and excitatory inputs on serotonin efflux differs in the dorsal and median raphe nuclei. **Brain Research**, v. 961, n. 1, p. 109–120, jan. 2003.

THOMAS, T.; MARSHALL, J. M. A study on rats of the effects of chronic hypoxia from birth on respiratory and cardiovascular responses evoked by acute hypoxia. **The Journal of Physiology**, v. 487, n. 2, p. 513–525, 1 set. 1995.

TOLLE, T. et al. The differential expression of 16 NMDA and non-NMDA receptor subunits in the rat spinal cord and in periaqueductal gray. **The Journal of Neuroscience**, v. 13, n. 12, p. 5009–5028, 1 dez. 1993.

TOVOTE, P. et al. Midbrain circuits for defensive behaviour. **Nature**, v. 534, n. 7606, p. 206–212, 9 jun. 2016.

TYE, N. C.; EVERITT, B. J.; IVERSEN, S. D. 5-Hydroxytryptamine and punishment. **Nature**, v. 268, n. 5622, p. 741–743, ago. 1977.

UZUNOV, D. P. et al. Fluoxetine-elicited changes in brain neurosteroid content measured by negative ion mass fragmentography. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 22, p. 12599–12604, 29 out. 1996.

VARGA, V. et al. Evidence for a role of GABA interneurons in the cortical modulation of midbrain 5-hydroxytryptamine neurones. **Neuroscience**, v. 106, n. 4, p. 783–792, out. 2001.

VICHNIN, M. et al. Premenstrual Syndrome (PMS) in Adolescents: Severity and Impairment. **Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology**, v. 19, n. 6, p. 397–402, dez. 2006.

VICKERS, K.; MCNALLY, R. J. Is premenstrual dysphoria a variant of panic disorder? **Clinical Psychology Review**, v. 24, n. 8, p. 933–956, dez. 2004.

VILELA-COSTA, H. H. et al. A Shift in the Activation of Serotonergic and Non-serotonergic Neurons in the Dorsal Raphe Lateral Wings Subnucleus Underlies

the Panicolytic-Like Effect of Fluoxetine in Rats. **Molecular Neurobiology**, v. 56, n. 9, p. 6487–6500, 7 set. 2019.

VILELA-COSTA, H. H. et al. Role of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors of the dorsal periaqueductal gray in the anxiety- and panic-modulating effects of antidepressants in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 404, p. 113159, abr. 2021.

WALF, A. A.; FRYE, C. A. A Review and Update of Mechanisms of Estrogen in the Hippocampus and Amygdala for Anxiety and Depression Behavior. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 6, p. 1097–1111, 22 jun. 2006.

WALF, A. A.; SUMIDA, K.; FRYE, C. A. Inhibiting 5 $\alpha$ -reductase in the amygdala attenuates antianxiety and antidepressive behavior of naturally receptive and hormone-primed ovariectomized rats. **Psychopharmacology**, v. 186, n. 3, p. 302–311, 12 jun. 2006.

WANG, M. et al. Relationship between symptom severity and steroid variation in women with premenstrual syndrome: study on serum pregnenolone, pregnenolone sulfate, 5 alpha-pregnane-3,20-dione and 3 alpha-hydroxy-5 alpha-pregnan-20-one. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 81, n. 3, p. 1076–1082, mar. 1996.

WANG, S. et al. In Vivo Effect of a 5-HT<sub>7</sub> Receptor Agonist on 5-HT Neurons and GABA Interneurons in the Dorsal Raphe Nuclei of Sham and PD Rats. **American Journal of Alzheimer's Disease & Other Dementias**, v. 32, n. 2, p. 73–81, 13 mar. 2017.

WEISSMAN, M. M. Sex Differences and the Epidemiology of Depression. **Archives of General Psychiatry**, v. 34, n. 1, p. 98, 1 jan. 1977.

WEISSMAN, M. M.; OLFSON, M. Depression in Women: Implications for Health Care Research. **Science**, v. 269, n. 5225, p. 799–801, 11 ago. 1995.

WEN, Y. et al. Glutamate and GABA<sub>A</sub> receptor crosstalk mediates homeostatic regulation of neuronal excitation in the mammalian brain. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 7, n. 1, p. 340, 3 out. 2022.

WITTCHEN, H. U.; HOYER, J. Generalized anxiety disorder: nature and course. **The Journal of clinical psychiatry**, v. 62 Suppl 1, p. 15–9; discussion 20-1, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Depression and other common mental disorders: Global Health Estimates**. Disponível em: <[www.who.int/mental\\_health/management/depression/prevalence\\_global\\_health\\_estimates/en/](http://www.who.int/mental_health/management/depression/prevalence_global_health_estimates/en/)>. Acesso em: 6 mar. 2023.

YAMASHITA, P. S. et al. Disinhibition of the rat prelimbic cortex promotes serotonergic activation of the dorsal raphe nucleus and panicolytic-like behavioral effects. **Journal of Psychopharmacology**, v. 31, n. 6, p. 704–714, 10 jun. 2017.

YONKERS, K. A.; O'BRIEN, P. S.; ERIKSSON, E. Premenstrual syndrome. **The Lancet**, v. 371, n. 9619, p. 1200–1210, abr. 2008.

ZANGROSSI, H. et al. Serotonergic regulation of inhibitory avoidance and one-way escape in the rat elevated T-maze. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 7–8, p. 637–645, dez. 2001.

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

ZANGROSSI, H. J.; GRAEFF, F. G. Modelos Animais. In: HETEM, L. A. B.; GRAEFF, F. G. (Eds.). **Transtornos de Ansiedade**. [s.l.] Atheneu, 2004. p. 55–73.

ZANOVELI, J. M. et al. Facilitation of 5-HT<sub>1A</sub>-mediated neurotransmission in dorsal periaqueductal grey matter accounts for the panicolytic-like effect of chronic fluoxetine. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 13, n. 08, p. 1079–1088, 27 set. 2010.

ZHANG, J. et al. A Clinical Study of the Effect of Estradiol Valerate on Sleep Disorders, Negative Emotions, and Quality of Life in Perimenopausal Women. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2021, p. 1–7, 16 out. 2021.

ZIOMKIEWICZ, A. et al. Higher luteal progesterone is associated with low levels of premenstrual aggressive behavior and fatigue. **Biological Psychology**, v. 91, n. 3, p. 376–382, dez. 2012.

ZULUAGA, M. J. et al. Experimental anxiety in the black and white model in cycling, pregnant and lactating rats. **Physiology and Behavior**, v. 84, n. 2, p. 279–286, 15 fev. 2005.



# Anexos

---

## 8. ANEXOS

### 8.1. Artigo publicado na *Journal of Psychopharmacology* (Batistela et al., 2021)

Original Paper

## Enhanced responsiveness to hypoxic panicogenic challenge in female rats in late diestrus is suppressed by short-term, low-dose fluoxetine: Involvement of the dorsal raphe nucleus and the dorsal periaqueductal gray



Matheus F Batistela<sup>1</sup>, Heloisa H Vilela-Costa<sup>1</sup>, Alana T Frias<sup>1</sup>,  
Paloma M Hernandez<sup>1</sup>, Thelma A Lovick<sup>2</sup>  and Helio Zangrossi Jr<sup>1</sup> 

### Abstract

**Background:** Acute hypoxia, which is panicogenic in humans, also evokes panic-like behavior in male rats. Panic disorder is more common in women and susceptibility increases during the premenstrual phase of the cycle.

**Aims:** We here investigated for the first time the impact of hypoxia on the expression of panic-like escape behavior by female rats and its relationship with the estrous cycle. We also evaluated functional activation of the midbrain panic circuitry in response to this panicogenic stimulus and whether short-term, low-dose fluoxetine treatment inhibits the hyper-responsiveness of females in late diestrus.

**Methods:** Male and female Sprague Dawley rats were exposed to 7% O<sub>2</sub>. Females in late diestrus were also tested after short-term treatment with fluoxetine (1.75 or 10 mg/kg, i.p.). Brains were harvested and processed for c-Fos and tryptophan hydroxylase immunoreactivity in the periaqueductal gray matter (PAG) and dorsal raphe nucleus (DR).

**Results:** Acute hypoxia evoked escape in both sexes. Overall, females were more responsive than males and this is clearer in late diestrus phase. In both sexes, hypoxia induced functional activation (c-Fos expression) in non-serotonergic cells in the lateral wings of the DR and dorsomedial PAG, which was greater in late diestrus than proestrus (lowest behavioral response to hypoxia). Increased responding in late diestrus (behavioral and cellular levels) was prevented by 1.75, but not 10 mg/kg fluoxetine.

**Discussion:** The response of female rats to acute hypoxia models panic behavior in women. Low-dose fluoxetine administered in the premenstrual phase deserves further attention for management of panic disorders in women.

### Keywords

Panic, estrous cycle, serotonin, dorsal raphe nucleus, periaqueductal gray matter

### Introduction

Panic disorder (PD) is characterized by episodes of intense fear accompanied by autonomic and respiratory changes such as tachycardia, sweating, and shortness of breath (American Psychiatric Association (APA), 2013). The recurring attacks happen unexpectedly and are the source of considerable distress to the sufferer, often leading to the development of agoraphobia and other avoidance behaviors. It is well established that the incidence of PD is 2–4 times higher in women compared with men (Christiansen, 2015; Eaton et al., 1994; Gao et al., 2016; Joyce et al., 1989; McLean et al., 2011; Sheikh et al., 2002). Moreover, in many women, vulnerability to panic shows a cyclical variation during the menstrual cycle with increased susceptibility during the late luteal phase, an effect that is particularly pronounced in women who suffer from premenstrual syndrome (Nillni et al., 2012, 2017).

In female rats, the late diestrus phase of the estrous cycle shows similarities to the late luteal phase in women. At this time, plasma and brain concentrations of progesterone, and hence its neuroactive metabolite allopregnanolone, decrease rapidly (Butcher et al.,

1974; Fry et al., 2014). Late diestrus is also a period when responsiveness to fear-provoking stimuli increases (Devall et al., 2015; Machado-Figueiredo et al., 2019). This effect is associated with increased excitability of neurons in the dorsal periaqueductal gray matter (dPAG), a brain region known to be crucial for mediating panic- and anxiety-related behaviors in rats and in humans (see Lovick, 2014, for review).

In female rats, the increase in unconditioned fear/panic-like behavior in late diestrus can be ameliorated by short-term

<sup>1</sup>Department of Pharmacology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>2</sup>School of Physiology, Pharmacology and Neuroscience, University of Bristol, Bristol, UK

### Corresponding author:

Helio Zangrossi Jr, Department of Pharmacology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Avenida Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto, São Paulo 14049-900, Brazil.  
Email: zangrossi@fmrp.usp.br

administration of a steroidogenic agent timed to offset and blunt the sharp fall in progesterone, and hence allopregnanolone concentration in the brain that normally occurs at this time (Devall et al., 2015; Machado-Figueiredo et al., 2019). For those experiments, fluoxetine was utilized as the steroid-stimulating agent since at low doses, that are subthreshold for influencing 5-HT, fluoxetine raises brain allopregnanolone concentration acutely (Devall et al., 2015; Fry et al., 2014; Pinna et al., 2004, 2006, 2009). Short-term administration of low-dose fluoxetine during late diestrus normalized brain allopregnanolone concentration, blocked the increase in fear/panic-like behavior, and prevented the increase in neuronal excitability of the dPAG that normally occurs at this time (Devall et al., 2015).

In humans, acute hypoxia is a recognized panicogenic stimulus (Beck et al., 1999; Johnson et al., 2014; Niccolai et al., 2009; Sracic et al., 2014). We recently reported that hypoxia also evokes panic-like escape behavior in male rats (Fernandes et al., 2019; Spiaci et al., 2015). In the next stage of this study, which we report here, we validated the hypoxia model of panic in female rats and showed that they respond in an estrous cycle-dependent manner. We also investigated whether short-term treatment with low-dose fluoxetine during late diestrus would prevent the increased responsiveness to hypoxia that occurs at this time.

Our second objective was to investigate the functional activation of the midbrain panic circuitry in response to hypoxia challenge, in particular, its relationship to the increase in panic-like escape response displayed by female rats in late diestrus, and the effect of fluoxetine. To do this, we mapped the pattern of neuronal activation in the PAG and dorsal raphe nucleus (DR) evoked by exposure to the panic-producing stimulus (7% O<sub>2</sub>), revealed by the distribution of c-Fos immunoreactivity.

A wealth of evidence in males indicates that both serotonergic (5-HT) and non-serotonergic neurons of the DR, more specifically, its dorsolateral region, also known as the lateral wings (lwDR), modulate the expression of panic-like responses mediated by the dPAG (Fox and Lowry, 2013; Hale et al., 2012; Paul et al., 2014; Paul and Lowry, 2013; Spiaci et al., 2012, 2016). Whereas stimulation of serotonergic neurons in the lwDR in males restrains escape performance, activation of local non-5-HT cells, presumably GABAergic interneurons, facilitates the expression of this panic-like response (Spiaci et al., 2012, 2016; Vilela-Costa et al., 2019). To determine the relative involvement of serotonergic and non-serotonergic neurons in response to the hypoxia, we counterstained for tryptophan hydroxylase (TPH) immunoreactivity as a marker for 5-HT-containing neurons. For this initial study, immunolabeling for c-Fos and TPH was compared in the DR and PAG in male rats and females in their proestrus and late diestrus phases, chosen to represent times respectively of low and high behavioral responsiveness to the panicogenic stimulus. We also investigated whether fluoxetine at the dose shown to block the behavioral panic response to hypoxia in late diestrus would influence functional activation of neurons in the DR and PAG.

## Material and methods

### Animals

Male and female Sprague Dawley rats 8–9 weeks old on the day of the experiments were housed in groups of five in polypropylene

cages (39 × 32 × 17 cm) and maintained under standard laboratory conditions (22 ± 1°C and 12:12h light: dark cycle, lights on at 07:00h), with food and water available ad libitum. The experimental procedures adopted in this study were conducted in conformity with the Brazilian Council for the Care and Use of Laboratory Animals (COBEA), in compliance with the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, and were approved by our local ethics committee (protocol number: 189/18). All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used.

### Drugs

Fluoxetine hydrochloride (Cristália, Brazil), was dissolved in saline with 2% Tween 80.

### Vaginal smears

All female rats went through a vaginal smearing procedure to determine the stage of their estrous cycle. A vaginal smear was taken in the morning (08:00–09:00h) for 5 consecutive days before the experiments. On each of these days, the animals were handled by the experimenter for 5 min, before the smearing procedure. For vaginal smear collection, an inoculation loop was sterilized in a flame, dipped in sterile water, and then gently inserted into the vagina to gather cells, which were then smeared onto a glass slide. The smears were stained using a staining set (Pantóico Rápido; Laborclin, Brazil).

Based on vaginal cytology, cycle stages were classified as proestrus: mainly round nucleated epithelial cells; estrus: mainly cornified cells; early diestrus: mainly leucocytes with well-defined lobular nuclei; and late diestrus: fewer cells than in early diestrus, nucleus “clumped,” and the presence of amorphous, disintegrating leucocytes (Brack and Lowick, 2007; Devall et al., 2015). Only female rats that displayed a regular cycle were used for the present study.

In experiment 1, male rats were individually submitted to the handling procedure and to a simulation of vaginal smear collection, for the same period of time described above for females. This simulation consisted in holding the male animals in the same way as the females, but without any further stimulation.

### Apparatus

The hypoxia chamber was a roof-scaled cylinder made of a cylindrical transparent Plexiglas (25 cm diameter and 35 cm height). The chamber had a flow valve connected to both an air pump and a nitrogen (N<sub>2</sub>) cylinder. Hypoxia was induced by administration of N<sub>2</sub> at a flow rate of 4.5 L/min, for approximately 4 min. Chamber concentrations of O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> were monitored continuously using a gas analyzer (ML206 Gas Analyzer; AD Instruments, Australia) and displayed on a PowerLab running Chart 5 software (AD Instruments).

### Procedures

*Experiment 1: Effect of estrous cycle on animal behavior and pattern of neuronal activation.* One day before the

hypoxia challenge, 15 min after the vaginal smearing or simulation (males) was completed on the fifth day, each rat was individually placed in the experimental chamber. During this habituation session, room air was flushed into the chamber at a flow rate of 4.5 L/min for 15 min to familiarize the animals to gas flow and to the air jet sound, and to prevent a neophobic reaction to subsequent exposure to the chamber environment.

Twenty-four hours later, a new vaginal smear collection or simulation (males) was performed at the regular time and, 15 min later, the animals were placed again in the experimental chamber and submitted either to the hypoxia challenge or exposed to atmospheric air (normoxia control group). For all groups, room air was flushed into the chamber at a flow rate of 4.5 L/min during the first 5 min. For animals randomly allocated in the hypoxia groups, N<sub>2</sub> was then flushed into the chamber (4.5 L/min) for approximately 4 min to gradually reach a concentration of 7% O<sub>2</sub>. At this point, N<sub>2</sub> infusion was suspended and the hypoxia condition (7% O<sub>2</sub>) was maintained for 6 min. Rats were then removed from the chamber and returned to their home cage. For animals of the control group, atmospheric air was flushed, at the same flow rate, for the remaining test period (10 min) before returning them to the home cage. The following groups were formed: male normoxia (male/NOX, n=5), male hypoxia (male/HOX, n=13), female normoxia (female/NOX, n=10), and female hypoxia (female/HOX, n=38). The latter group was subdivided into the following groups according to the stage of estrous cycle: proestrus (PRO/HOX, n=10), estrus (EST/HOX, n=8), early diestrus (ED/HOX, n=10), and late diestrus (LD/HOX, n=10).

Animal behavior was recorded throughout the experiment using a video camera connected to a DVD recorder. The number of jumps, considered as escape attempts, during the hypoxia challenge was scored manually off-line by an experimenter blind to the treatments used. Locomotor activity was assessed by recording the total distance traveled over the first 5 min of the test, when the animals were exposed to atmospheric air. For this analysis, a video tracking-system was used (ANY-Maze, USA).

#### *Experiment 2: Effect of low dose of fluoxetine on panic-like behavior and the pattern of neuronal activation in females in the late diestrus phase.*

In experiment 2, only females in late diestrus were used. Animals were handled daily by the experimenter and submitted to vaginal smear collection for 5 days to assess the cycle regularity, as described in experiment 1. This daily procedure was then continued until the observation of the next early diestrus phase. On this day, 15 min after the vaginal smear collection, animals were individually placed in the experimental cage for 15 min to habituate to the test conditions, as described in experiment 1. Later in the same day, between 16:30 and 17:00 h, after being randomly allocated to their treatment groups, the animals were intraperitoneally injected with fluoxetine (FLX, 1.75 or 10 mg/kg) or vehicle solution. On the next day, at the regular time in the morning (8:00–9:00 h), a new vaginal smear collection was performed to confirm that females were now in late diestrus. In positive cases, 15 min later, they were injected with FLX (1.75 or 10 mg/kg i.p.) or vehicle solution. One hour later, all animals were submitted to the hypoxia challenge as described in experiment 1. The following groups were formed: vehicle (n=8), fluoxetine 1.75 mg/kg (FLX 1.75, n=8), and fluoxetine 10 mg/kg (FLX 10, n=8).

The low dose of FLX and the injection protocol were selected based on previous studies (Devall et al., 2015; Machado-Figueiredo et al., 2019). For comparison, we also included a higher dose (10 mg/kg) to determine whether there was dose-response relationship in effectiveness.

#### *Tissue collection and preparation*

Two hours after the end of the hypoxia challenge, in both experiments, all animals were deeply anesthetized with urethane (1.25 g/kg; Sigma, USA) and then perfused transcardially with 0.01M phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4), followed by 4% paraformaldehyde in PBS (pH 7.4) at 4°C. Brains were immediately removed, postfixed for 2 h in the same fixative solution, rinsed in PBS, and then immersed in cryoprotectant solution (30% sucrose in 0.2M PBS, pH 7.4) at 4°C for 5 days. Next, brains were quickly frozen in isopentane in dry ice and stored at -20°C. Serial 40-µm-thick coronal sections of midbrain were cut in three alternate sets using a cryostat (Leica Microsystems, Germany) and collected in PBS. Only one of the sets was used to perform the histochemistry.

#### *Immunohistochemistry*

Brain sections containing the DR and PAG were double-immunostained for c-Fos protein and TPH using a free-floating immunohistochemistry methodology conducted on an orbital shaker. The protocol used was based on a previous study in our laboratory (Vilela-Costa et al., 2019). First, the staining for c-Fos was performed as follows: The sections were washed 3 times in PBS and endogenous peroxidase was inactivated by immersing in 1% hydrogen peroxide in PBS for 10 min, followed by washing in PBS 4 times. Tissue sections were then incubated in a blocking solution of 1% bovine serum albumin (BSA) in PBS for 30 min and afterward incubated overnight with a polyclonal rabbit anti-c-Fos protein antibody (ABE457, 1:1000; Merck, Germany). After incubation in the primary antiserum, the sections were washed in PBS and subsequently incubated for 2 h with biotinylated goat anti-rabbit antibody (1:1000, Vectastain; Vector Laboratories, USA). Tissue sections were then incubated for 2 h in avidin-biotin complex (Vectastain ABC kit, Vector Laboratories). c-Fos immunoreactivity was revealed after immersing the sections in a solution containing 0.02% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB), 0.0015% hydrogen peroxide, and 0.05% nickel ammonium sulfate in PBS for 10 min. After c-Fos immunostaining was completed, the tissue sections were washed 4 times in PBS and processed for TPH immunostaining. For this, sections were incubated overnight with polyclonal sheep anti-TPH antibody (AB1541, 1:1000; Millipore, USA).

After incubation in the primary antiserum, the sections were washed in PBS, sequentially incubated for 2 h with biotinylated anti-sheep (PK-6106, 1:1200; Vectastain, Vector Laboratories), and washed 3 times with PBS. Sections were then incubated with avidin-biotin complex (Vectastain ABC kit, Vector Laboratories) and washed 3 times in PBS. TPH immunoreactivity was revealed after immersing the sections in a solution containing 0.02% DAB and 0.0015% hydrogen peroxide in PBS for 10 min. Sections were then washed 4 times in PBS to stop the reaction. The tissue

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

### Analysis and quantification

The immunostaining was visualized using a microscope (Olympus DX50, Tokyo, Japan) and representative photomicrographs were taken using a digital camera linked to a computer with Image Pro Plus 6.0 software (Media Cybernetics, USA). c-Fos immunostaining was visualized as brown-black reaction product localized to the nucleus. TPH immunoreactivity displayed as orange-brown immunoreaction product, which was localized to the cytoplasm and proximal dendrites. Only those immunoreactive profiles with a well-defined boundary and immunoreaction product extending into proximal dendrites were accepted for counting.

Cell counts were conducted at 200 $\times$  magnification by an investigator blinded to the assignment of the tissue. The total number of c-Fos-immunoreactive cells (c-Fos-IR), TPH-immunoreactive neurons (TPH-IR), or c-Fos + TPH double-immunostained neurons (c-Fos + TPH-IR) in different regions of the DR was counted at four rostrocaudal levels, the divisions and coordinates of the DR and PAG based on previous studies (Spiacchi et al., 2012; Vilela-Costa et al., 2019; Yamashita et al., 2017). At each level, two to three optimally stained sections were selected for counting and the counts averaged. On each section, a mask of known area was drawn electronically to delineate the boundaries of different subnuclei of the DR or PAG, as defined in the atlas of Paxinos and Watson (1998). The number of single and double-labeled cells within the area was counted and the cell density (cells/mm<sup>2</sup>) calculated.

The DR was sampled between -6.84 and -9.00 mm caudal to bregma. The subdivisions analyzed were the dorsal subnucleus (DRD) at the rostral level (-6.84 to -7.08 mm bregma), the DRD, the ventral (DRV), and the hDR subnuclei at the mid-rostral (-7.20 to -7.80 mm bregma) and mid-caudal levels (-7.92 to -8.28 mm bregma), and the caudal (DRC) and interfascicular (DRI) subnuclei at the caudal level (-8.52 to -9.00 mm bregma). The number of cells sampled within the hDR was the sum of cells counted in the right and left sides of this subnucleus.

In the PAG, the number of c-Fos-IR cells was analyzed as follows: at the rostral (-6.60 to -6.84 mm bregma) and mid-rostro-caudal levels (-7.32 to -7.80 mm from bregma), the columns sampled were the dorsomedial (dmPAG), dorsolateral (dlPAG), lateral (lPAG), and ventrolateral (vlPAG). At the caudal level (-8.28 to -8.52 mm from bregma), the columns sampled were dmPAG, lPAG, and vlPAG. The number of cells sampled within in each section containing the dlPAG, lPAG, or vlPAG represents the sum of cells counted in the left and right sides of these columns.

In experiment 1, we compared the effect of hypoxia in material from males and females in proestrus (low behavioral response to hypoxia) and late diestrus (enhanced behavioral response to hypoxia). Since the behavioral experiments indicated no estrous cycle differences in behavior during normoxia, the control group for females (normoxia) comprised material from rats at all cycle stages (PRO=1; EST=3; ED=1; LD=2). For quantification, we selected material in which immunohistochemical staining was optimal. Because of this, in both experiments 1 and 2, the number

of animals used for immunohistochemical analysis is lower than for the behavioral analyses (the final number of animals used in each group is stated in the legends to Figures 3 and 4).

### Statistical analysis

In experiment 1, behavioral data were first analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA) with test condition and sex as independent factors and one-way ANOVA was used to compare females in different stages of the estrous cycle. In experiment 2, behavioral data were analyzed by one-way ANOVA.

In experiment 1, the effect of the hypoxia challenge on the number of c-Fos-IR or TPH-IR cells counted in each subregion of the DR or the number of c-Fos-IR cells counted in different columns of the PAG was analyzed separately for males and females, by Student's *t*-test and one-way ANOVA, respectively. In experiment 2, one-way ANOVA was used.

When appropriate, post hoc comparisons were performed with Duncan's test. Statistical analyses were performed using the software SPSS Statistics 20.0 (IBM SPSS Statistical, USA). The level of significance was set at  $p \leq 0.05$ .

## Results

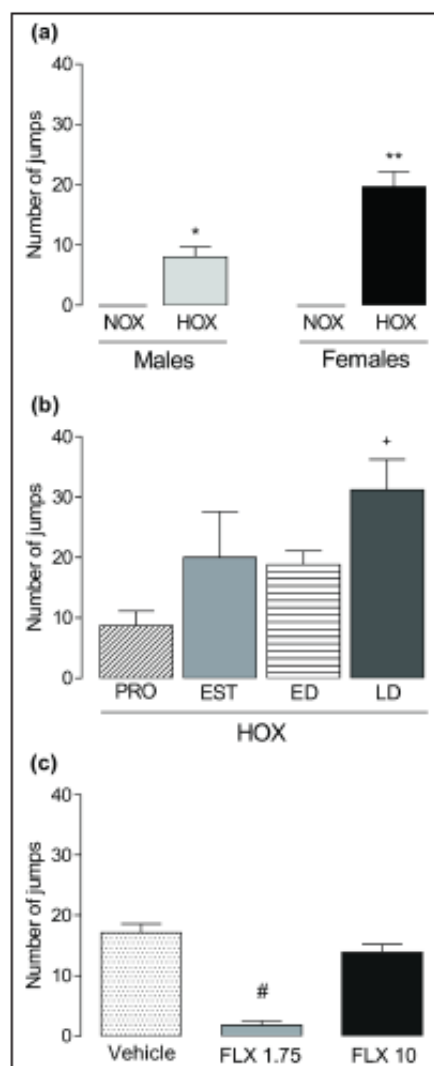
### Behavior

**Experiment 1—Response to acute hypoxia in males and females.** In both sexes, exposure to hypoxia evoked jumping toward the ceiling of the gas chamber (Figure 1(a)). This active behavior was not observed in any of the animals exposed to atmospheric air. Two-way ANOVA revealed a significant effect of the respiratory challenge ( $F(1, 62) = 12.36, p < 0.001$ ), but not of sex ( $F(1, 62) = 2.20, ns$ ), nor an interaction between procedure and sex ( $F(1, 62) = 2.20, ns$ ). However, the ANOVA is compromised by zero values in the normoxia groups in which no animals jumped. A Student's *t*-test between males and females in hypoxia showed a very significant sex difference ( $t(48) = 6.117, p < 0.001$ ), with females having a higher number of jumps than males.

To evaluate the effect of hypoxia across the estrous cycle, the females were subdivided according to the phase of the cycle, based on vaginal cytology. Animals in all phases jumped during hypoxia, but this behavior was higher in females in the late diestrus phase (Figure 1(b)). One-way ANOVA showed a significant difference across estrous cycle phases ( $F(3, 37) = 4.41, p < 0.01$ ) and post hoc comparisons indicated that females in late diestrus jumped significantly more than those in the proestrus phase.

**Experiment 2—Effect of fluoxetine.** We tested whether short-term treatment with FLX 1.75 or 10 mg/kg would prevent the increase in the number of jumps seen in females in the late diestrus submitted to the hypoxia challenge (Figure 1(c)). One-way ANOVA revealed a significant difference among the treatment groups ( $F(2, 21) = 45.35, p < 0.001$ ) and the post hoc test showed that females that received the lower (1.75 mg/kg), but not the higher dose (10 mg/kg) of FLX, jumped significantly less than saline-treated animals.

Neither in experiment 1 nor experiment 2 were there significant differences between the groups with respect to the total distance traveled by animals during the first 5 min of the experimental test when they breathed atmospheric air (Table 1).



**Figure 1.** (a) Number of jumps made by males and females during exposure to atmospheric air (normoxia—NOX) or 7% O<sub>2</sub> (hypoxia—HOX) (male/NOX,  $n=5$ ; male/HOX,  $n=13$ ; female/NOX,  $n=10$ ; female/HOX,  $n=38$ ). (b) Effect of exposure to hypoxia of females in different phases of the cycle (proestrus—PRO/HOX,  $n=10$ ; estrus—EST/HOX,  $n=8$ ; early diestrus—ED/HOX,  $n=10$ ; late diestrus—LD/HOX,  $n=10$ ) in the number of jumps. (c) Effect of the treatment (i.p.) with fluoxetine (FLX, 1.75 or 10 mg/kg,  $n=8$  each group) or vehicle solution ( $n=8$ ) on the number of jumps of female rats in late diestrus exposed to the hypoxia challenge. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.01$  and \*\* $p < 0.001$  compared with the respective NOX group; # $p < 0.001$  compared with the PRO/HOX group and  $\dagger p < 0.001$  compared with the other groups.

**Table 1.** Distance traveled (mean  $\pm$  SEM) under normoxia during the first 5 min of the test.

Sex/condition	Distance traveled (m)	Statistics
Experiment 1		
Male		
NOX	3.14 $\pm$ 0.40	Sex: $F(1, 62) = 0.600$ , ns
HOX	3.80 $\pm$ 0.34	Test: $F(1, 62) = 3.472$ , ns
Female		Sex $\times$ Test: $F(1, 62) = 0.104$ , ns
NOX	3.47 $\pm$ 0.22	
HOX	3.94 $\pm$ 0.15	
Estrous cycle		
PRO/HOX	4.41 $\pm$ 0.39	$F(3, 37) = 1.227$ , ns
EST/HOX	3.85 $\pm$ 0.30	
ED/HOX	3.68 $\pm$ 0.22	
LD/HOX	3.82 $\pm$ 0.24	
Experiment 2 (females)		
Vehicle	3.67 $\pm$ 0.27	$F(2, 21) = 1.801$ , ns
FLX 1.75	3.32 $\pm$ 0.46	
FLX 10	2.79 $\pm$ 0.23	

In experiment 1, data were first analyzed by two-way ANOVA with test condition and sex as independent factors, and one-way ANOVA was used to compare females in different stages of the estrous cycle. In experiment 2, one-way ANOVA was used. NOX: normoxia; HOX: hypoxia; PRO: proestrus; EST: estrus; ED: early diestrus; LD: late diestrus; FLX: fluoxetine; ANOVA: analysis of variance.

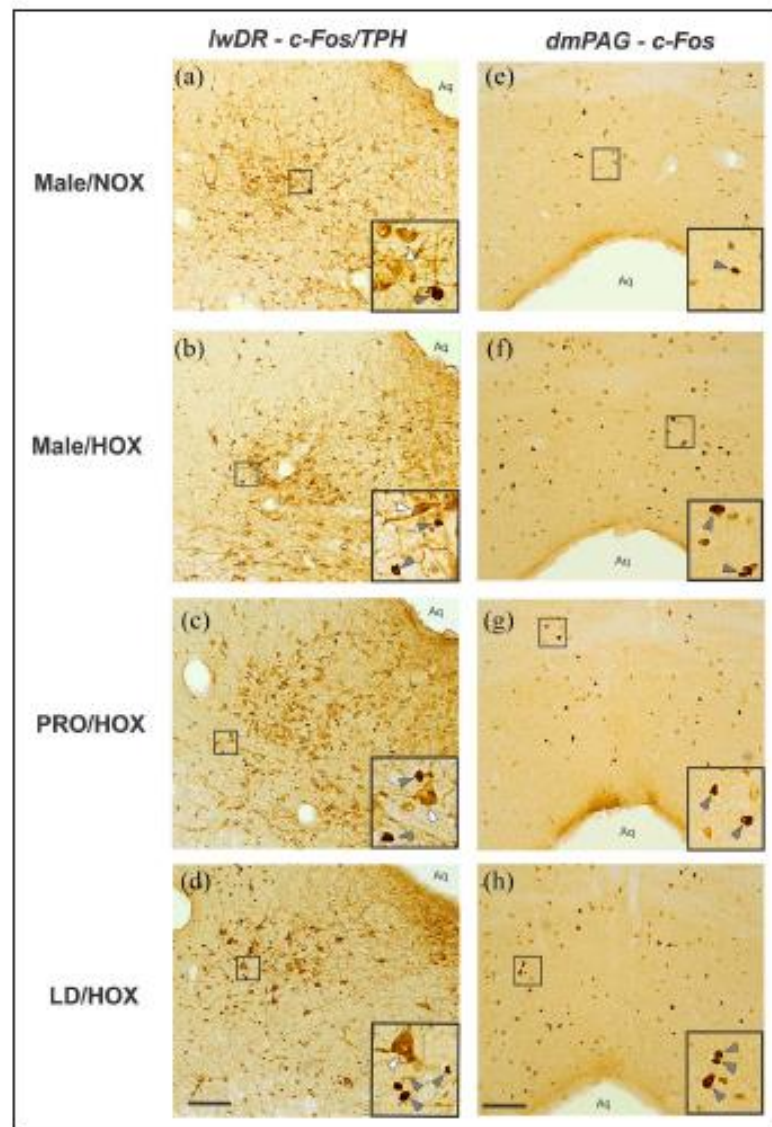
### Immunohistochemistry

In male and female rats, TPH-IR cells were present throughout the DR but not in the PAG (Figure 2). In double-stained material, small, light brown nuclear-shaped immunostained profiles were present in the PAG but were absent in single stained sections (Supplementary Figure 1(a)) and not considered to represent TPH immunoreactivity. Brown-black c-Fos nuclear immunoreaction product was observed in all subnuclei of the DR and within all the different columns of the PAG (Figure 2). These profiles were easy to distinguish from the lighter brown-colored profiles, despite appearing identical in size (Supplementary Figure 1B). The small, light brown nuclear-shaped immunostained profiles are also present in the DR where again, they could be readily distinguished from the brown-black stained nuclei, as well as immunostained neuronal perikarya (Supplementary Figure 1C).

c-Fos expression is not present in a binary/all-or-nothing manner but rather presents itself in different intensities/degrees of expression. Our animals were killed 2 h after the 6 min hypoxic stimulus when the cellular response to the hypoxic challenge would be maximal (Kovács, 2008) and generating the most intense immunoreaction product (brown-black in material stained using Ni-DAB). Accordingly, a weaker c-Fos signal would also be present, stimulated by events that occurred before and after the hypoxia challenge. The light brown reaction product likely reflects this activity, which can be seen in the PAG and the DR. We did not count these cells.

### Experiment 1—Effects of acute hypoxia

**Dorsal raphe nucleus.** Exposure to the hypoxia challenge did not alter the number of TPH-IR cells present in the different



**Figure 2.** Photomicrographs depicting (a–e) c-Fos-IR and TPH-IR cells in the lwdR or (f–j) c-Fos-IR cells in the dmPAG of representative animals of the different groups tested in experiment 1. Black boxes indicate regions shown at higher magnification in insets in the lower right corner of each panel. White arrowheads indicate TPH-IR cells; gray arrowheads indicate c-Fos-IR cells. Aq = cerebral aqueduct. Scale bar = 100  $\mu$ m (a–e) and 50  $\mu$ m (f–j).

DR subnuclei in males or in females (Table 2). No double-labeled c-Fos + TPH cells were detected in the DR.

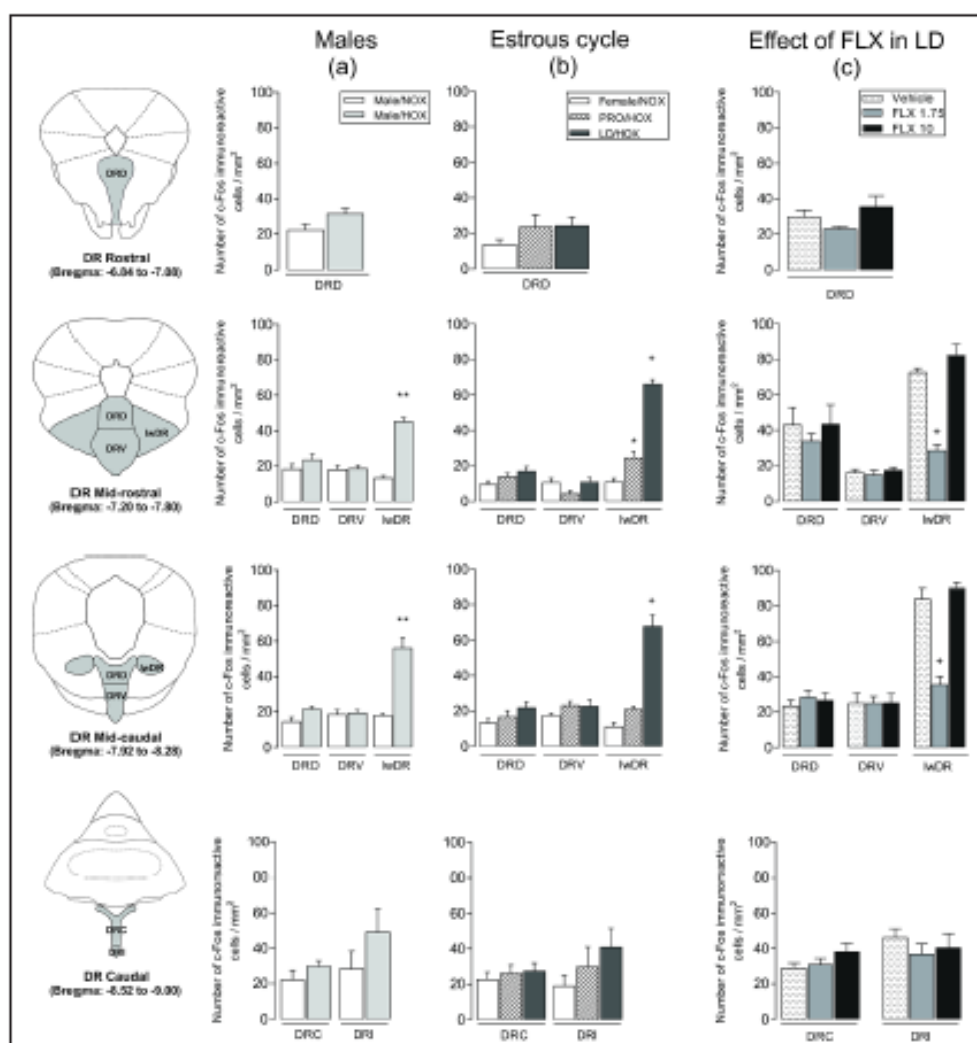
In males, exposure to hypoxia did, however, induce a significant increase in the number of c-Fos-IR cells in the lwdR at mid-rostral ( $t(7) = 11.27$ ,  $p < 0.001$ ) and mid-caudal ( $t(7) = 5.92$ ,  $p < 0.001$ ) levels but not in other subnuclei (Figure 3(a)). In females (Figure 3(b)), one-way ANOVA also revealed an increase in c-Fos-IR in the lwdR at both mid-rostral ( $F(2, 18) = 112.14$ ,  $p < 0.001$ ) and mid-caudal ( $F(2, 18) = 47.14$ ,  $p < 0.001$ ) levels

but not in other regions of the DR. The post hoc test revealed this effect to be highly significant in the late diestrus phase when the number of c-Fos-IR cells increased fivefold compared with normoxia. Rats in proestrus showed a much smaller (twofold) but significant increase in labeled cells at the lwdR mid-rostral level only.

**Periaqueductal gray.** In the PAG, similar numbers of c-Fos-IR cells were present in all sectors in males and females main-







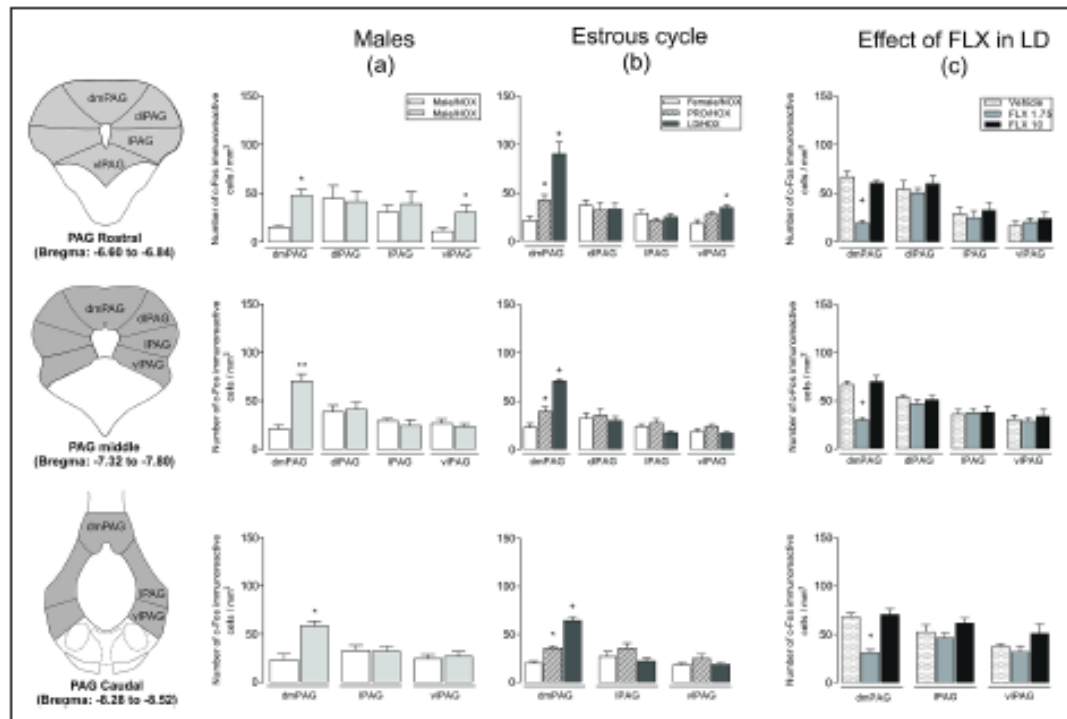
**Figure 3.** Number of c-Fos-IR cells counted in different DR subnuclei of (a) males exposed to normoxia or hypoxia challenge (male/NOX,  $n=4$ ; male/HOX,  $n=5$ ); (b) females exposed to normoxia (female/NOX,  $n=7$ ) or hypoxia during the proestrus (PRO/HOX,  $n=6$ ) and late diestrus (LD/HOX,  $n=8$ ); and (c) females in late diestrus treated with vehicle solution or fluoxetine (FLX 1.75 or 10 mg/kg) and submitted to the hypoxia challenge (vehicle,  $n=7$ ; FLX 1.75,  $n=7$ ; FLX 10,  $n=6$ ). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.01$  and \*\* $p < 0.001$  compared with the respective NOX group; † $p < 0.001$  compared with all other groups.

consideration, even bigger differences emerged. Females in late diestrus showed a significantly higher level of responding compared with other stages of the cycle.

It seems unlikely that the increase in motor behavior (jumping) during late diestrus could have been secondary to an overall increase in motor activity since locomotion measured during normoxia immediately prior to starting the hypoxia challenge, was unaffected by estrous cycle stage. Although exposure to hypoxia (7%  $O_2$ ) is known to evoke physiological changes that include a significant increase in respiratory rate and tidal volume, the

ventilatory response is not affected by estrous cycle stage (Marques et al., 2017). Rats at all stages of their cycle are thus equally likely to be able to sustain the rise in metabolic demand due to increased motor activity (jumping). The increased panic-like escape reaction seen during late diestrus is therefore most likely due to an enhanced emotional response to the stressor rather than secondary to physiological changes induced by hypoxia.

Our findings of increased responsiveness to acute exposure to hypoxia during the late diestrus phase in female rats are in line



**Figure 4.** Number of c-Fos-IR cells counted in the different columns of the PAG of (a) males exposed to normoxia and hypoxia challenge (male/NOX,  $n=4$ ; male/HOX,  $n=5$ ); (b) females exposed to normoxia (female/NOX,  $n=7$ ) or hypoxia during the proestrus (PRO/HOX,  $n=6$ ) and late diestrus (LD/HOX,  $n=8$ ); and (c) females in late diestrus treated with vehicle solution or fluoxetine (FLX 1.75 or 10 mg/kg) and submitted to the hypoxia challenge (vehicle,  $n=7$ ; FLX 1.75,  $n=7$ ; FLX 10,  $n=6$ ). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.01$  and \*\* $p < 0.001$  compared with the respective NOX group; † $p < 0.001$  compared with all other groups.

with other studies using behavioral tests that evoke unconditioned fear or anxiety-like behavior in females (Devall et al., 2009, 2015; Díaz-Véliz et al., 1997; Frye et al., 2000; Gouveia et al., 2004; Machado-Figueroa et al., 2019). During the late diestrus phase, there is an increase in excitability of the dPAG circuitry, in association with the rapid decline in progesterone secretion that occurs at this time and triggers upregulation of expression of certain GABA<sub>A</sub> receptor subunits on output neurons (Brack and Lovick, 2007; Brack et al., 2006; Devall et al., 2015; Griffiths and Lovick, 2005). The ensuing lowering of the threshold for activation of the panic circuitry in the dPAG (Devall et al., 2015) is likely to be a major factor underlying the enhanced response to hypoxia in late diestrus.

The increased panic-like behavior observed during late diestrus in females was prevented by short-term treatment, with a low dose of fluoxetine, starting on the evening of early diestrus. This effect is unlikely to be due to a depression of motor activity since the drug had no effect on locomotion in the 5 min preceding hypoxia. The effect of fluoxetine on hypoxia-induced panic-like behavior concurs with previous studies in female rats using other behavioral tests of unconditioned fear (Devall et al., 2015; Machado-Figueroa et al., 2019). In those studies, fluoxetine had no effect if administered at other stages of the cycle (Devall

et al., 2015). Moreover, a single dose of fluoxetine given on the evening of early diestrus but omitting the second “top up” dose on the morning of late diestrus was ineffective (Machado-Figueroa et al., 2019), suggesting that fluoxetine, or more likely its neuroactive metabolite norfluoxetine, needs to remain sufficiently elevated for at least 15 h to prevent an increase in excitability of the panic circuitry. The effective dose of fluoxetine (1.75 mg/kg) is subthreshold for effects of 5-HT systems (Devall et al., 2015; Hervás and Artigas, 1998; Pinna et al., 2009) but has steroid-stimulating properties, which lead to an increase in brain concentration of the neuroactive progesterone metabolite allopregnanolone (Devall et al., 2015; Fry et al., 2014; Pinna et al., 2009). It has been proposed that the increase in brain concentration of allopregnanolone in the dPAG produced by short-term administration of fluoxetine started in the evening of early diestrus offsets the sharp decline in the steroid that normally occurs in late diestrus. This stabilizes the excitability of the panic circuitry of the dPAG by preventing the progesterone withdrawal effect that trigger an increase in excitability and lowered threshold for activation by panicogenic stimuli (Devall et al., 2015).

An intriguing finding in the present study was that a higher dose of 10 mg/kg fluoxetine was ineffective in preventing the heightened response to hypoxia in late diestrus. At this dose,

fluoxetine is active on 5-HT systems and in male rats produces a modest rise in extracellular concentration of 5-HT in the dPAG within an hour of acute administration (Zanoveli et al., 2010). In females in late diestrus, 5-HT concentration in the dPAG was also raised significantly after a single dose of 10 mg/kg fluoxetine administered 16 h earlier in the evening of early diestrus (Devall et al., 2015), presumably reflecting the relatively long half-life of fluoxetine and its bioactive metabolite norfluoxetine, which has been reported in male rats after this dose (Hervás and Artigas, 1998). Interestingly in females in late diestrus, the same double-dosing protocol for fluoxetine used in the present study led to a decrease in extracellular 5-HT concentration in the dPAG after the second dose of 10 mg/kg was administered (Devall et al., 2015). It was suggested that this may have resulted from activation of inhibitory 5-HT<sub>1A</sub> somatodendritic autoreceptors on 5-HT-containing neurons in the DR (a major source of serotonergic input to the PAG), which would depress the activity of the DR population (Hajós et al., 2001; Rutter and Auerbach, 1993) and reduce 5-HT output in the dPAG (Devall et al., 2015). The net effect of the combination of increased allopregnanolone, which would increase GABA tone and reduced 5-HT inhibition, most likely explains the lack of effect of the 10 mg/kg dose on fluoxetine on behavior.

Further insights into the mechanisms underlying the differential responsiveness to the hypoxia challenge during the estrous cycle and the effect of fluoxetine were gained from observing the pattern of neuronal activation of the DR and PAG reflected by expression of c-Fos-IR. In males and females, the hypoxia challenge recruited cells within lwDR, dmPAG, and, to a lesser extent, the rostral pole of the vlPAG, in line with results of studies utilizing another model that associates the escape response with panic: the elevated T-maze (Spiacchi et al., 2012; Vilela-Costa et al., 2019). Therefore, independently of specific stimuli that evoke escape, the pathway that connects the lwDR to the dmPAG is recruited, reinforcing its critical role in panic regulation/generation (Paul and Lowry, 2013; Vilela-Costa et al., 2019). Moreover, it is noteworthy that these brain areas are recruited both in females during the proestrus and late diestrus, but with the number of c-Fos-IR neurons significantly higher in the latter cycle phase, reflecting the higher level of responsiveness to the panicogenic stimulus.

Notably, none of the serotonergic cell population was activated by the hypoxia challenge. However, a very low level or even absence of c-Fos expression in the serotonergic cell population in some subnuclei of the DR following a range of different stressful challenges is not unprecedented (Baratta et al., 2018; Lopes et al., 2016; Roche et al., 2003; Spannuth et al., 2011; Vilela-Costa et al., 2019). These studies were carried out in males. Methodological problems also seem unlikely since in a previous study in males using the same processing methods, we were able to recruit serotonergic cells in the DR in rats in the elevated T-maze after chronic treatment with fluoxetine (Vilela-Costa et al., 2019). There may therefore be sex differences in recruitment of 5-HT-containing neurons in females by panicogenic stimuli or, alternatively, c-Fos may not be the most appropriate marker of neuronal activation in this case. On the contrary, it is worth noting that other studies in rats utilizing exposure to CO<sub>2</sub>, rather than O<sub>2</sub> as a panicogenic stimulus, reported activation of 5-HT-containing cells in the DR as well as ventrolateral PAG where 35% of the serotonergic population was double

labeled compared with 6% in control rats (Johnson et al., 2005). This is in complete contrast to our finding that hypoxia does not activate serotonergic cells. Very recently, we carried out a study in rats to compare functional activation in the PAG in response to hypoxia and hypercarbia (data not published). This confirmed the earlier findings of serotonergic neuron activation in the DR in response to acute CO<sub>2</sub> but showed that this population is not significantly activated by hypoxia. Interestingly, the PAG also appears to display a similar differential response to hypoxia and hypercarbia. An earlier study showed functional activation of neurons throughout the PAG in response to CO<sub>2</sub> (Johnson et al., 2011), while in our study only the dmPAG and a limited extent of the vlPAG were activated by hypoxia.

In fact, the use of CO<sub>2</sub> as a panicogenic stimulus in rats is controversial. Neurons in the PAG of rats are inherently more sensitive to hypoxia than hypercapnia (Kramer et al., 1999). It has been shown in rats that whereas cytotoxic hypoxia induced with potassium cyanide (KCN) evokes a panic-like defensive behavioral repertoire that is sensitive to proven antipanic drugs, the response to CO<sub>2</sub> more closely resembles behavioral arousal (Améndola and Weary, 2020; Schmitel et al., 2012). Indeed, CO<sub>2</sub> exposure in rats seems to inhibit the PAG panic system via activation of serotonergic cells in the DR while hypoxia activates non-serotonergic cells, which inhibit the action of serotonergic cells (see Schenberg et al., 2014, for discussion of this point).

Our data do not allow conclusions to be drawn concerning the neurochemical identity of the non-serotonergic neurons recruited in the lwDR in response to the panicogenic hypoxia challenge. However, several factors indicate they are likely to be GABAergic. The lwDR contains a great number of GABAergic interneurons (Calizo et al., 2011; Day et al., 2004; Fu et al., 2010), which exert tonic inhibitory control over serotonergic cells within the DR (Gervasoni et al., 2000; Tao and Auerbach, 2000, 2003; Varga et al., 2001; Wang et al., 2017). In rats submitted to water immersion, which evokes active escape-like coping behavior (e.g. swimming, climbing), c-Fos was upregulated in GABAergic but not serotonergic neurons within the lwDR (Roche et al., 2003). Interestingly, after exposure to acute swim stress, serotonin levels decrease in regions innervated by the DR, such as lateral septum and amygdala (Kirby et al., 1995; Kirby and Lucki, 1997). A similar mechanism operating on the serotonergic projection from the DR to the PAG in response to the hypoxia challenge would lead to an increase in excitability of the PAG via disinhibition of the inhibitory 5-HT lwDR-dPAG projection. In support of this idea, in our study increased c-Fos immunoreactivity was observed in the dmPAG in both sexes and, to a lesser extent, in the rostral ventrolateral sector (only in males and females in late diestrus) following the hypoxia challenge.

As in the lwDR, further studies are still required to unveil the neurochemical phenotype of neurons activated in the PAG by hypoxia. However, it is noteworthy that in the dmPAG and, to a lesser extent, in the vlPAG, the two PAG areas recruited here by 7% O<sub>2</sub>, but not in the dlPAG or lPAG, there is an abundance of glutamatergic neurons containing NK-1 receptors (Commons and Valentino, 2002). Not less interesting, blockade of NK-1 receptors in the dPAG reduces the excitability of this region to evoke escape responses (Broiz et al., 2012), suggesting that this population of glutamatergic/NK-1 receptors plays a physiological role in the regulation of panic-like defensive responses,

making them a plausible candidate for mediating the behavioral consequences of exposure to hypoxia.

In summary, our results show acute hypoxia to be a panicogenic stimulus in male and female Wistar rats, as it is in male Sprague Dawley rats. However, the response of females is estrous cycle-dependent, with animals showing significantly enhanced responding in late diestrus, which correspond to the premenstrual phase in women. Hypoxia induced functional activation of non-serotonergic neurons in the lWDR, the dmPAG, and, to a lesser extent, the rostral vlPAG. The increase in behavioral responsiveness and enhanced functional activation of this pathway in late diestrus was prevented by short-term treatment with a low dose of fluoxetine sufficient to raise brain allopregnanolone concentration without effect on 5-HT systems. We suggest that short-term treatment with low-dose fluoxetine deserves further attention as a potential therapeutic strategy for management of PDs in women.

### Acknowledgements

The authors thank Afonso Paulo Padovan for helpful technical support and Cristiana Brazil for donating fluoxetine.


### Declaration of conflicting interests


The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

### Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This work was supported by research grants from the Research Foundation of the State of São Paulo (FAPESP; Grant Number 2017/18437-7), the National Council of Science and Technology, Brazil (CNPq; Grant Number 142509/2018-3), and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES; Grant Number 88882.328263/2019-01). T.A.L. is a Special Visiting Researcher in Brazil supported by FAPESP (Grant Number 2019/05240-6) to H.Z. Jr. Funders had no role in the preparation, review, or approval of the manuscript and decision to submit the manuscript for publication.

### ORCID iDs

Thelma A Lovick  <https://orcid.org/0000-0002-7329-4607>

Helio Zangrossi  <https://orcid.org/0000-0003-1200-0924>

### Supplemental material

Supplemental material for this article is available online.

### References

Améndola L and Weary DM (2020) Understanding rat emotional responses to CO<sub>2</sub>. *Translational Psychiatry* 10: 253.  
 American Psychiatric Association (APA) (2013) *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (5th edn). Washington, DC: APA.  
 Baratta MV, Leslie NR, Fallon JP, et al. (2018) Behavioural and neural sequelae of stressor exposure are not modulated by controllability in females. *European Journal of Neuroscience* 47: 959–967.  
 Beck JG, Ohtake PJ and Shipberd JC (1999) Exaggerated anxiety is not unique to CO<sub>2</sub> in panic disorder: A comparison of hypercapnic and hypoxic challenges. *Journal of Abnormal Psychology* 108: 473–482.  
 Brack KE and Lovick TA (2007) Neuronal excitability in the periaqueductal grey matter during the estrous cycle in female Wistar rats. *Neuroscience* 144: 325–335.

Brack KE, Jeffrey SM and Lovick TA (2006) Cardiovascular and respiratory responses to a panicogenic agent in anaesthetised female Wistar rats at different stages of the oestrous cycle. *European Journal of Neuroscience* 23: 3309–3318.  
 Braz AC, Bassi GS, De Souza Silva MA, et al. (2012) Effects of neurokinin-1 and 3-receptor antagonists on the defensive behavior induced by electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray. *Neuroscience* 201: 134–145.  
 Butcher RL, Collins WE and Fugo NW (1974) Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17beta throughout the 4-day estrous cycle of the rat. *Endocrinology* 94: 1704–1708.  
 Calizo LH, Akanwa A, Ma X, et al. (2011) Raphe serotonin neurons are not homogenous: Electrophysiological, morphological and neurochemical evidence. *Neuropharmacology* 61: 524–543.  
 Christiansen DM (2015) Examining sex and gender differences in anxiety disorders. In: F Durbano (ed.) *A Fresh Look at Anxiety Disorders*: 17–50. London: In TechOpen.  
 Commons KG and Valentino RJ (2002) Cellular basis for the effects of substance P in the periaqueductal gray and dorsal raphe nucleus. *Journal of Comparative Neurology* 447: 82–97.  
 Day HE, Greenwood BN, Hammack SE, et al. (2004) Differential expression of 5HT-1A, alpha 1b adrenergic, CRF-R1, and CRF-R2 receptor mRNA in serotonergic, gamma-aminobutyric acidergic, and catecholaminergic cells of the rat dorsal raphe nucleus. *Journal of Comparative Neurology* 474: 364–378.  
 Devall AJ, Liu ZW and Lovick TA (2009) Hyperalgesia in the setting of anxiety: Sex differences and effects of the oestrous cycle in Wistar rats. *Psychoneuroendocrinology* 34: 5875–5896.  
 Devall AJ, Santos JM, Fry JP, et al. (2015) Elevation of brain allopregnanolone rather than 5-HT release by short term, low dose fluoxetine treatment prevents the estrous cycle-linked increase in stress sensitivity in female rats. *European Neuropsychopharmacology* 25: 113–123.  
 Diaz-Vélez G, Alarcón T, Espinoza C, et al. (1997) Ketanserin and anxiety levels: Influence of gender, estrous cycle, ovariectomy and ovarian hormones in female rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 58: 637–642.  
 Eaton WW, Kessler RC, Wittchen HU, et al. (1994) Panic and panic disorder in the United States. *American Journal of Psychiatry* 151: 413–420.  
 Fernandes GG, Frias AT, Spiaci A Jr, et al. (2019) Nitric oxide in the dorsal periaqueductal gray mediates the panic-like escape response evoked by exposure to hypoxia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 92: 321–327.  
 Fox JH and Lowry CA (2013) Corticotropin-releasing factor-related peptides, serotonergic systems, and emotional behavior. *Frontiers in Neuroscience* 7: 169.  
 Fry JP, Li KY, Devall AJ, et al. (2014) Fluoxetine elevates allopregnanolone in female rat brain but inhibits a steroid microsomal dehydrogenase rather than activating an aldo-keto reductase. *British Journal of Pharmacology* 171: 5870–5880.  
 Fyfe CA, Petralia SM and Rhodes ME (2000) Estrous cycle and sex differences in performance on anxiety tasks coincide with increases in hippocampal progesterone and 3alpha,5alpha-THP. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 67: 587–596.  
 Fu W, Le Maitre E, Fatre V, et al. (2010) Chemical neuroanatomy of the dorsal raphe nucleus and adjacent structures of the mouse brain. *Journal of Comparative Neurology* 518: 3464–3494.  
 Gervasoni D, Peryon C, Rampon C, et al. (2000) Role and origin of the GABAergic innervation of dorsal raphe serotonergic neurons. *Journal of Neuroscience* 20: 4217–4225.  
 Gouveia A Jr, dos Santos UD, Felisbino FE, et al. (2004) Influence of the estrous cycle on the behavior of rats in the elevated T-maze. *Behavioral Processes* 67: 167–171.  
 Griffiths JL and Lovick TA (2005) GABAergic neurons in the rat periaqueductal grey matter express alpha4, beta1 and delta GABA

- receptor subunits: Plasticity of expression during the estrous cycle. *Neuroscience* 136: 457–466.
- Guo X, Meng Z, Huang G, et al. (2016) Meta-analysis of the prevalence of anxiety disorders in mainland China from 2000 to 2015. *Scientific Reports* 6: 292–300.
- Hajós M, Hoffmann WE, Tetko IV, et al. (2001) Different tonic regulation of neuronal activity in the rat dorsal raphe and medial prefrontal cortex via 5-HT1A receptors. *Neuroscience Letters* 304: 129–132.
- Hale MW, Shekhar A and Lowy CA (2012) Stress-related serotonergic systems: Implications for symptomatology of anxiety and affective disorders. *Cellular and Molecular Neurobiology* 32: 695–708.
- Hervás I and Artigas F (1998) Effect of fluoxetine on extracellular 5-hydroxytryptamine in rat brain. Role of 5-HT autoreceptors. *European Journal of Pharmacology* 358: 9–18.
- Johnson PL, Federici LM and Shekhar A (2014) Etiology, triggers and neurochemical circuits associated with unexpected, expected, and laboratory-induced panic attacks. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 3: 429–454.
- Johnson PL, Fitz SD, Hollis JH, et al. (2011) Induction of c-Fos in “panic/defence”-related brain circuits following brief hypercarbic gas exposure. *Journal of Psychopharmacology* 25: 26–36.
- Johnson PL, Hollis JH, Moratalla R, et al. (2005) Acute hypercarbic gas exposure reveals functionally distinct subpopulations of serotonergic neurons in rats. *Journal of Psychopharmacology* 19: 327–341.
- Joyce PR, Bushnell JA, Oakley-Browne MA, et al. (1989) The epidemiology of panic symptomatology and agoraphobic avoidance. *Comprehensive Psychiatry* 30: 303–312.
- Kirby LG, Allen AR and Lucki I (1995) Regional differences in the effects of forced swimming on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid. *Brain Research* 682: 189–196.
- Kirby LG and Lucki I (1997) Interaction between the forced swimming test and fluoxetine treatment on extracellular 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid in the rat. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 282: 967–976.
- Kovács KJ (2008) Measurement of immediate-early gene activation-c-fos and beyond. *Journal of Neuroendocrinology* 20: 665–672.
- Kramer JM, Nolan PC and Waldrop TG (1999) In vitro responses of neurons in the periaqueductal gray to hypoxia and hypercapnia. *Brain Research* 835: 197–203.
- Lopes DA, Lemes JA, Melo-Thomas L, et al. (2016) Unpredictable chronic mild stress exerts anxiogenic-like effects and activates neurons in the dorsal and caudal region and in the lateral wings of the dorsal raphe nucleus. *Behavioural Brain Research* 297: 180–186.
- Lowick TA (2014) Sex determinants of experimental panic attacks. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 46: 465–471.
- Machado-Figueiredo R, de Carvalho MC, Brandão ML, et al. (2019) Short-term, low-dose fluoxetine prevents estrous cycle-linked increase in anxiety-like behaviour in female rats. *Journal of Psychopharmacology* 33: 548–557.
- McLean CP, Asmaani A, Litz BT, et al. (2011) Gender differences in anxiety disorders: Prevalence, course of illness, comorbidity and burden of illness. *Journal of Psychiatric Research* 45: 1027–1035.
- Marques DA, de Carvalho D, da Silva GSF, et al. (2017) Influence of estrous cycle hormonal fluctuations and gonadal hormones on the ventilatory response to hypoxia in female rats. *Pflügers Archiv* 469: 1277–1286.
- Nicotai V, van Duinen MA and Griez EJ (2009) Respiratory patterns in panic disorder reviewed: A focus on biological challenge tests. *Acta Psychiatrica Scandinavica* 120: 167–177.
- Nitini YI, Pineles SL, Rohan KJ, et al. (2017) The influence of the menstrual cycle on reactivity to a CO<sub>2</sub> challenge among women with and without premenstrual symptoms. *Cognitive Behaviour Therapy* 3: 239–249.
- Nitini YI, Rohan KJ and Zlotensky MJ (2012) The role of menstrual cycle phase and anxiety sensitivity in catastrophic misinterpretation of physical symptoms during a CO<sub>2</sub> challenge. *Archives of Women's Mental Health* 15: 413–422.
- Paul ED and Lowy CA (2013) Functional topography of serotonergic systems supports the Deakin/Graeff hypothesis of anxiety and affective disorders. *Journal of Psychopharmacology* 27: 1090–1106.
- Paul ED, Johnson PL, Shekhar A, et al. (2014) The Deakin/Graeff hypothesis: Focus on serotonergic inhibition of panic. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 3: 379–396.
- Pacinos G and Watson C (1998) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (4th edn). San Diego, CA: Academic Press.
- Pinna G, Costa E and Guidotti A (2004) Fluoxetine and norfluoxetine stereospecifically facilitate pentobarbital sedation by increasing neurosteroids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 6222–6225.
- Pinna G, Costa E and Guidotti A (2006) Fluoxetine and norfluoxetine stereospecifically and selectively increase brain neurosteroid content at doses that are inactive on 5-HT reuptake. *Psychopharmacology (Berl)* 186: 362–372.
- Pinna G, Costa E and Guidotti A (2009) SSRIs act as selective brain steroidogenic stimulants (SBSSs) at low doses that are inactive on 5-HT reuptake. *Current Opinion in Pharmacology* 9: 24–30.
- Roche M, Commons KG, Peoples A, et al. (2003) Circuitry underlying regulation of the serotonergic system by swim stress. *Journal of Neuroscience* 23: 970–977.
- Rutter JJ and Auerbach SB (1993) Acute uptake inhibition increases extracellular serotonin in the rat forebrain. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 265: 1319–1324.
- Schenberg LC, Schmitel FG, Armini RS, et al. (2014) Translational approach to studying panic disorder in rats: Hits and misses. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 46: 472–496.
- Schmitel FG, de Almeida GM, Pitot DN, et al. (2012) Evidence of a suffocation alarm system within the periaqueductal gray matter of the rat. *Neuroscience* 200: 59–73.
- Sheikh JL, Leskin GA and Klein DF (2002) Gender differences in panic disorder: Findings from the National Comorbidity Survey. *American Journal of Psychiatry* 159: 55–58.
- Spannuth BM, Hale MW, Evans AK, et al. (2011) Investigation of a central nucleus of the amygdala/dorsal raphe nucleus serotonergic circuit implicated in fear-potentiated startle. *Neuroscience* 179: 104–119.
- Spicci A Jr, Coimbra NC and Zangrossi H (2012) Differential involvement of dorsal raphe subnuclei in the regulation of anxiety- and panic-related defensive behaviors. *Neuroscience* 81: 178–186.
- Spicci A Jr, Pobbe RHL, Matthiesen M, et al. (2016) 5-HT1A receptors of the rat dorsal raphe lateral wings and dorsomedial subnuclei differentially control anxiety- and panic-related defensive responses. *Neuropharmacology* 107: 471–479.
- Spicci A Jr, Sergio TO, da Silva GSF, et al. (2015) Serotonin in the dorsal periaqueductal gray inhibits panic-like defensive behaviors in rats exposed to acute hypoxia. *Neuroscience* 307: 191–198.
- Srnic MK, Thomas D, Pate A, et al. (2014) Syndrome of acute anxiety among marines after recent arrival at high altitude. *Military Medicine* 179: 559–564.
- Tao R and Auerbach SB (2000) Regulation of serotonin release by GABA and excitatory amino acids. *Journal of Psychopharmacology* 14: 100–113.
- Tao R and Auerbach SB (2003) Influence of inhibitory and excitatory inputs on serotonin efflux: differs in the dorsal and median raphe nuclei. *Brain Research* 961: 109–120.
- Varga V, Székely AD, Csillag A, et al. (2001) Evidence for a role of GABA interneurons in the cortical modulation of midbrain 5-hydroxytryptamine neurons. *Neuroscience* 106: 783–792.
- Vilela-Costa HH, Spicci A Jr, Bissoli IG, et al. (2019) A shift in the activation of serotonergic and non-serotonergic neurons in the dorsal raphe lateral wings subnucleus underlies the panicolytic-like effect of fluoxetine in rats. *Molecular Neurobiology* 56: 6487–6500.

- Wang S, Zhao Y, Gao J, et al. (2017) In vivo effect of a 5-HT<sub>7</sub> receptor agonist on 5-HT neurons and GABA interneurons in the dorsal raphe nuclei of sham and pd rats. *American Journal of Alzheimer's Disease and Other Dementias* 32: 73–81.
- Yamashita PS, Spiacci A Jr, Hassel JE, et al. (2017) Disinhibition of the rat prelimbic cortex promotes serotonergic activation of the dorsal raphe nucleus and panicolytic-like behavioral effects. *Journal of Psychopharmacology* 31: 704–714.
- Zanoveli JM, Pöbbe RLH, de Bortoli VC, et al. (2010) Facilitation of 5-HT<sub>1A</sub>-mediated neurotransmission in dorsal periaqueductal grey matter accounts for the panicolytic-like effect of chronic fluoxetine. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 13: 1079–1088.

## 8.2. Artigo publicado na *European Journal of Neuroscience* (Ferreira-Sgobbi et al., 2021)

Received: 8 July 2021 | Revised: 22 October 2021 | Accepted: 14 November 2021  
DOI: 10.1111/ejn.15548

RESEARCH REPORT

EJN *European Journal of Neuroscience* FENS WILEY

### Panic-like responses of female Wistar rats confronted by *Bothrops alternatus* pit vipers, or exposure to acute hypoxia: Effect of oestrous cycle

Renata Ferreira-Sgobbi<sup>1,2,3,4,5</sup> | Rebeca Machado de Figueiredo<sup>1,4</sup> |  
Alana Tercino Frias<sup>2</sup> | Melina Matthiesen<sup>1,2</sup> | Matheus Fitipaldi Batistela<sup>2</sup> |  
Luiz Luciano Falconi-Sobrinho<sup>1,4,5,6</sup> | Heloísa Helena Vilela-Costa<sup>2</sup> |  
Susana Isabel Sá<sup>7</sup> | Thelma Anderson Lovick<sup>5,8</sup> | Hélio Zangrossi Jr.<sup>2,4,5</sup> |  
Norberto Cysne Coimbra<sup>1,4,5,6</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Neuroanatomy and Neuropsychobiology, Department of Pharmacology, Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

<sup>2</sup>Laboratory of Neuropsychopharmacology, Department of Pharmacology, Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

<sup>3</sup>Department of Psychology, Division of Psychobiology, Ribeirão Preto School of Philosophy, Sciences and Literature of the University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

<sup>4</sup>NAP- USP- Neurobiology of Emotions Research Centre (NuPNE), Ribeirão Preto School of Medicine of the University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

<sup>5</sup>Behaviour of Snakes Division- MEDUSA Project, Behavioural Neurosciences Institute (INeC), Ribeirão Preto, Brazil

<sup>6</sup>Ophidiarium LNN- FMRP- USP/INeC, Ribeirão Preto School of Medicine of the University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

<sup>7</sup>Unidade de Anatomia, Departamento de Biomedicina, Faculdade de Medicina da Universidade de Porto, Porto, Portugal

<sup>8</sup>School of Physiology, Pharmacology and Neuroscience, University of Bristol, Bristol, UK

#### Correspondence

Norberto Cysne Coimbra and  
Hélio Zangrossi Jr., NAP-USP-  
Neurobiology of Emotions Research  
Centre (NuPNE), Ribeirão Preto School of  
Medicine of the University of São Paulo  
(FMRP-USP), Av. Bandeirantes, 3900,  
Ribeirão Preto, 14049-900, São Paulo,  
Brazil.  
Email: nccoimbra@fmrp.usp.br;  
zangrossi@fmrp.usp.br

#### Abstract

Anxiety-related diseases are more than twice as common in women than in men, and in women, symptoms may be exacerbated during the late luteal phase of the menstrual cycle. Despite this, most research into the underlying mechanisms, which drives drug development, have been carried out using male animals. In an effort to redress this imbalance, we compared responses of male and female Wistar rats during exposure to two unconditioned threatening stimuli that evoke panic-related defensive behaviours: confrontation with a predator (*Bothrops alternatus*) and acute exposure to hypoxia (7% O<sub>2</sub>). Threatened by venomous snake, male and female rats initially displayed

**List of abbreviations:** ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (National Health Surveillance Agency); CEUA-FMRP-USP, Committee for Ethics in Animal Experimentation of the Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo; CONCEA, National Council for Animal Experimentation Control; IBAMA, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais (Brazilian Institute of Environment and Natural Resources); MEDUSA Project, Mechanisms of Defensive behaviour and Unconditioned fear-induced antinociception in Snake-threatened Animals (MEDUSA); SISBIO, Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (Biodiversity Authorisation and Information System); SMA/DeFau, Departamento de Fauna da Secretaria do Meio Ambiente (Department of Fauna of the Environment Secretary).

© 2021 Federation of European Neuroscience Societies and John Wiley & Sons Ltd

32 | wileyonlinelibrary.com/journal/ejn

Eur J Neurosci. 2022;55:32–48.

**Funding information**

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Grant/Award Numbers: 2007/01174-1, 2017/11855-8, 2012/03798-0; Pro-Rectorcy of the University of São Paulo, Grant/Award Number: IaPq2012-156-USP-12.1.25440.01.6; Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico, Grant/Award Numbers: 427397/2018-9, 470119/2004-7

Edited by: Vidita Vaidya

defensive attention, risk assessment, and cautious interaction with the snake, progressing to defensive immobility to overt escape. Both males and females displayed higher levels of risk assessment but less interaction with the predator. They also spent more time in the burrow, displaying inhibitory avoidance, and more time engaged in defensive attention, and non-oriented escape behaviour. In females, anxiety-like behaviour was most pronounced in the oestrous and proestrus phases whereas panic-like behaviour was more pronounced during the dioestrus phase, particularly during late dioestrus. Acute hypoxia evoked panic-like behaviour (undirected jumping) in both sexes, but in females, responsiveness in late dioestrus was significantly greater than at other stages of the cycle. The results reveal that females respond in a qualitatively similar manner to males during exposure to naturally occurring threatening stimuli, but the responses of females is oestrous cycle dependent with a significant exacerbation of panic-like behaviour in the late dioestrus phase.

**KEYWORDS**

acute hypoxia, male and female rats, oestrous cycle, panic, prey-versus-snake confrontation, urutu-cruzeiro lancehead pit viper

**1 | INTRODUCTION**

It is well established that anxiety-related disorders are twice as common in women compared with men (Remes et al., 2016; Steel et al., 2014). Despite this, the majority of preclinical research continues to use male animal models (Hughes, 2019) with the assumption that findings in males can be translated to females. Moreover, when studies are carried out in females, the potential effects of hormonal changes due to the oestrous cycle are not always taken into account. This is a serious omission since in women, the menstrual cycle is a recognised factor that can affect the intensity of symptoms. Late luteal/premenstrual exacerbations of symptoms have been reported across a range of mental health disorders (Hendrick et al., 1996; Nillni et al., 2021). For example, women in their late-luteal phase become particularly susceptible to symptoms of depression, anxiety, and anhedonia (Yonkers et al., 2008) whilst in panic sufferers, symptoms of panic attacks worsen during the premenstrual period (Nillni et al., 2012, 2017).

In view of the clinical finding, our laboratories began to investigate the utility of a number of rodent models for studying anxiety- and panic attack-like behaviours in females, paying particular attention to oestrous cycle stage. We, and others, find that several of the commonly used behavioural tests of fear and anxiety developed in males, for example, elevated plus maze, conditioned fear, conditioned fear to context, and fear potentiated startle, are not influenced by the oestrous cycle in females

(Machado Figueiredo et al., 2019; Pentkowski et al., 2018; Soares-Rachetti et al., 2016). On the other hand, in tests employing unconditioned fear paradigms, although females as a whole usually respond in a similar manner to males, their responsiveness is oestrous cycle dependent. Furthermore, females in the late dioestrus stage consistently display enhanced responsiveness compared with other stages of the cycle (Devall et al., 2009, 2015; Machado Figueiredo et al., 2019), a finding which is in line with the clinical observation of increased psychological vulnerability to anxiety during the premenstrual period in women (see above).

Almost all laboratory-based tests of fear and anxiety in rodents employ artificial behavioural scenarios, for convenience and high throughput. We wished to employ more ethologically relevant behavioural models. We believe this approach to be important as it offers the opportunity to validate new psychobiological models of panic attack in comparison with less naturalistic laboratory-based tests in common use.

Confrontation with a snake, a natural predator of rodents, has been used to elicit anti-predator behaviour in mice (de Oliveira et al., 2018). In rats, exposure to snake odour elicits similar anxiogenic behaviour (de Paula et al., 2005; Tapocik et al., 2021). We utilised the rodent's innate fear of snakes to develop and validate a rodent-versus-snake confrontation paradigm test using Wistar rats as prey. Confrontation with a venomous snake in the polygonal arena for snake panic test elicits a mix of anxiety- and panic attack-related behaviours in

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.  
 Resources); MEDUSA Project, Mechanisms of Defensive behaviour and Unconditioned fear-induced antinociception in Snake-threatened Animals (MEDUSA); SISBIO, Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (Biodiversity Authorisation and Information System); SMA/DeFau, Departamento de Fauna da Secretaria do Meio Ambiente (Department of Fauna of the Environment Secretary).

© 2021 Federation of European Neuroscience Societies and John Wiley & Sons Ltd



male rats (Calvo, Almada, et al., 2019; Calvo, Lobão-Soares, et al., 2019; Coimbra, Mendes-Gomes, et al., 2017), golden hamsters (Paschoalin-Maurin et al., 2018), and mice (Almada et al., 2021; Coimbra, Calvo, et al., 2017; dos Anjos-Garcia & Coimbra, 2019, 2020; Lobão-Soares et al., 2008; Mendes-Gomes, Paschoalin-Maurin, et al., 2020). The test recruits similar cerebral and midbrain structures (Mendes-Gomes, Motta, et al., 2020; Paschoalin-Maurin et al., 2018) to those already reported to be related to the organisation of antipredatory behaviour (Blanchard et al., 2005; Canteras et al., 1997; Canteras & Goto, 1999) and panic-like responses (Biagioni et al., 2013; Ullah et al., 2015, 2017; Wilent et al., 2010). The behaviour of females in this test has not been reported.

In human beings, acute exposure to hypoxia is a well-established panicogenic stimulus (Beck et al., 1999; Johnson et al., 2014; Niccolai et al., 2009). Hypoxia also evokes panic-like escape defensive responses in male rats (Fernandes et al., 2019; Spiacci et al., 2015). To date, the behaviour of females in this test, or in the prey-versus-predator confrontation paradigm, has not been studied. To redress this omission, we conducted a study to analyse the behaviour of females in the polygonal arena for snake panic test and hypoxic challenge test, paying particular attention to the possible influence of the oestrous cycle.

## 2 | MATERIAL AND METHODS

### 2.1 | Ethical approval

All experiments were performed in compliance with the recommendations of the Committee for Ethics in Animal Experimentation of the Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo (CEUA-FMRP-USP), which agrees with the ethical principles in animal research adopted by the National Council for Animal Experimentation Control (CONCEA), and were approved by the CEUA-FMRP-USP (processes 224/2018 and 123/2019).

### 2.2 | Animals

Young-adult 60- to 70-day-old male and female *Wistar* rats (*Rattus norvegicus*, Rodentia, Muridae) weighing 200–210 g (females) and 250–300 g (males) from the animal facility of the Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo were used. These animals were housed in groups of four in plexiglass cages (41 × 34 cm) and given free access to food and water throughout the experiment.

We also used male South American urutu-cruzeiro venomous lancehead pit vipers (*Bothrops alternatus*, Reptilia, Viperidae) ( $n = 3$ ), with 115, 112, and 108 cm length, weighing 1198, 1056, and 782 g, respectively, as the source of aversive stimuli. The snakes were collected from Southeast Brazil and were maintained in the Laboratory of Neuroanatomy and Neuropsychobiology ophiarium (licensed by the IBAMA Committee; processes 3543.6986/2012-SP and 3543.6984/2012-SP and the São Paulo State government, SMA/DeFau 15.335/2012; Mechanisms of Defensive behaviour and Unconditioned fear-induced antinociception in Snake-threatened Animals (MEDUSA) Project, SISBIO processes 41435-1 and 41435-2) 1 week before the experimental procedures. The snakes were previously fed with the same species of prey used in this work (*Rattus norvegicus*) monthly and 1 week before the experiments.

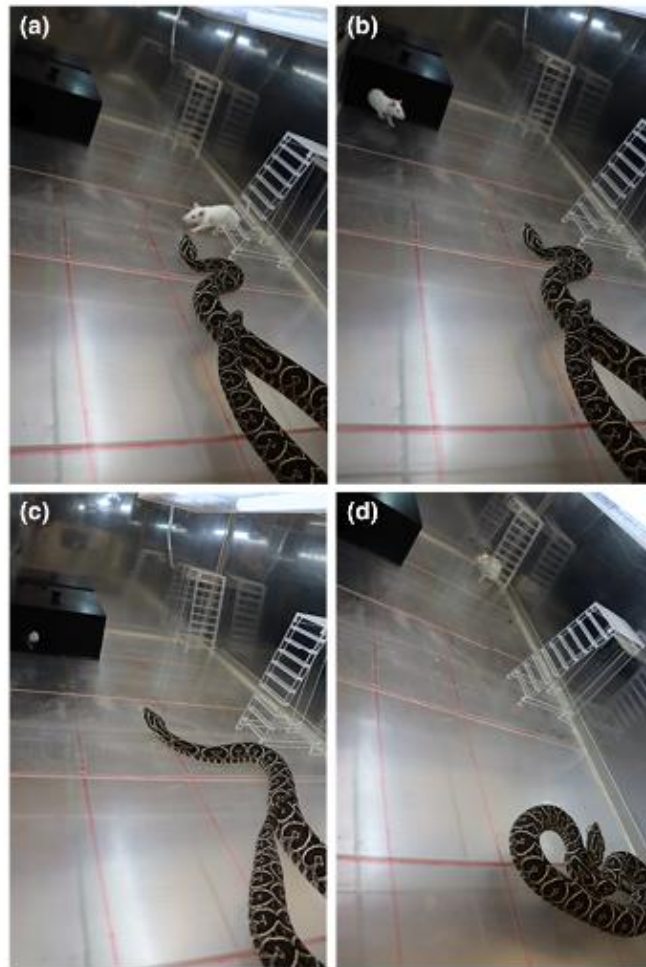
### 2.3 | Polygonal arena for snake panic test

The polygonal arena for snake panic test was used for prey-versus-predator confrontations. The experimental apparatus consists in an enriched polygonal arena (154 × 72 × 64 cm, crystal acrylic, with insulfilm) arranged on a granite surface (170 × 85 × 02 cm) and equipped with an artificial burrow (36 × 26 × 12.5 cm, with two outlets diametrically opposite) and two small elevated platforms (7 × 4 × 10.5 cm) for escape, accessed by acrylic stairs. This prey-versus-snake confrontation environment (see Figure 1) has been described in more detail in previous reports from our laboratory (Almada & Coimbra, 2015; Almada et al., 2015, 2021; Coimbra, Calvo, et al., 2017; Coimbra, Mendes-Gomes, et al., 2017; Coimbra, Paschoalin-Maurin, et al., 2017; dos Anjos-Garcia & Coimbra, 2019, 2020).

### 2.4 | Hypoxia chamber test

The hypoxia chamber was a roof-sealed cylinder made of transparent Plexiglas (25 cm diameter and 35 cm height). The chamber had a flow valve connected to both an air pump and a nitrogen ( $N_2$ ) cylinder. Hypoxia was produced by  $N_2$  administration at a flow rate of 4.5 L/min, for approximately 4 min. Chamber concentrations of both  $O_2$  and  $CO_2$  were monitored using a gas analyser (ML206 Gas Analyser, AD Instruments, Bella Vista, NSW, Australia) and scanned online with PowerLab Chart 5 software (AD Instruments, Bella Vista, Australia).

**FIGURE 1** Defensive behaviours evoked by *Rattus norvegicus* (Wistar rats) confronted with *Bothrops alternatus* pit vipers in the polygonal arena for snake panic test enriched with a burrow and two small elevated platforms for escape, accessed of acrylic stairs. (a) Flat back approach (female in oestrus), (b) stretch-attend posture (female in oestrus), (c) inhibitory avoidance (female in late dioestrus), and (d) defensive immobility (female in late dioestrus)



### 3 | BEHAVIOURAL PROCEDURES

#### 3.1 | Vaginal smears

All female rats went through a vaginal smearing procedure to determine the stage of their oestrous cycle 5 days before the test. A vaginal smear was taken immediately before the confrontation with the predator or the hypoxia challenge. An inoculation loop was sterilised in a flame, dipped in sterile water, and then gently inserted into the vagina to gather cells, which were then smeared onto a glass slide. The smears were stained using a staining set (*Panótico Rápido*, Laborclin, Paraná, Brazil; ANVISA number 10097010-105). Changes in the cytological

appearance of the smears were used to identify the cycle stage. The oestrous cycle comprises four phases, each one with a different cell configuration: Proestrus phase was characterised by an abundance of round nucleated epithelial cells; oestrus phase by larger cornified squamous cells; in early dioestrus, plenty of leucocytes, typically with multi-lobed nuclei was the main characteristic; late dioestrus is characterised by fewer leucocytes whose nucleus has become diffuse with many cells appearing to be disintegrating (Brack *et al.*, 2006). The vaginal smear was taken 5 min before each confrontation between prey and urutu-cruzeiro venomous lancehead pit vipers and in independent group of rats 5 min before the exposure of rats to the hypoxia challenge test.

### 3.2 | Prey-versus-predator confrontation

The rats were grouped according to sex and kept in the enriched polygonal arena for 78 h for habituation under a 12-h/12-h light/dark cycle, with a temperature between 22°C and 25°C, with free access to food and water, except on the experimental day. Habituation was conducted to generate a non-aversive and safe environment for the rats (Twardowschy et al., 2013; Uribe-Mariño et al., 2012). On the test day, the rats were removed from the polygonal arena, and a lancehead pit viper or a false (toy) snake was placed on the opposite side of the burrow. Subsequently, each animal was placed in the enriched polygonal arena in the corner opposite where the snake or the false snake is found. After a 5-min confrontation, the rats were removed from the experimental environment. After confrontation with three to four rodents, the snake was replaced by another one. Each rat was used in only one confrontation.

The behaviours were recorded by using videocamera (Sony Handcam HDR-CX350, Konan, Minato-ku, Tokyo, Japan) for 5-min off-line analysis by a researcher who was blinded to animal's oestrus phase. The behavioural responses were analysed using the free software X-Plo-Rat version 1.1.0, developed at the Laboratory of Exploratory Behaviour of Ribeirão Preto School of Philosophy, Sciences and Literature of the University of São Paulo. This software does not perform automatic measurement of behaviours, and the experimenter evaluates the behaviour and then uses the software to help quantify the number and duration of each behavioural response.

The following prey behaviours were quantified based on previously described analyses of responses of rats confronted by other species of snake (Calvo, Almada, et al., 2019; Coimbra, Calvo, et al., 2017): (I) risk assessment: comprised by flat back approach, defined as forward elongation of the body with frontward movement accomplished by slowly pulling the hind body (Figure 1a) and stretch attend posture, when the rat stretches to its full length with its forepaws, keeps its hind paws in the same place, and turns back to the anterior position (Figure 1b); (II) defensive attention (alertness): interruption of ongoing behaviours for up to 5 s, followed by an attentive posture, as well as behaviours characterised by small head movements, rearing, and smelling; (III) oriented escape: running or shifting the direction of running towards the burrow or the elevated platform for escape or climbing the side of the burrow; (IV) inhibitory avoidance (Figure 1c): involves behaviour that postpones the occurrence of a future aversive event (the rodent, after an oriented escape to the burrow, puts the head in the entrance of the burrow and displays defensive attention);

(V) non-oriented escape: running and/or jumping in a direction opposite that of the predator; (VI) defensive immobility (freezing): immobility for at least 6 s in a dorsiflexion defensive posture, followed by autonomic reactions, such as defecation, exophthalmia and/or micturition (Figure 1d); (VII) interactions between prey and predator: close contact, followed by sniffing, careful touching with the front paws and/or nose. In addition, we measured the time spent inside the burrow and time spent on, below or above the stairs (escape platforms) as safe places. Crossings (stepping with four legs within a delimited rectangle on the arena floor after crossing the border of each section line) were also recorded as a measure of locomotor activity of prey.

The occurrence of the different defensive behaviours of *Bothrops alternatus* was quantified as the number of events that occurred during the presence of prey in the polygonal arena.

The following behaviours were displayed by the snakes: (I) threatening posture: defensive reactions, in which the snakes elevated the first third of their bodies and assumed an "S" shape, with the curled body or with the body partially distended; (II) dorsoventral flattening of the body: a defensive response enlarging the size of the body; (III) hiding the head: a defensive posture for head protection; (IV) tail vibration: a threatening behaviour with rapid movements with the tail against the floor of the polygonal arena; (V) exploratory behaviour: elevation of the head and anterior body region (without "S" shape posture); (VI) threatening attack: strike without biting the prey with the mouth closed or partially open; (VII) offensive/defensive attack: strike and bite (in the event of this strike the experiment was interrupted, the prey was sacrificed with a lethal injection of ketamine and xylazine and discarded from the experiment, and the behavioural data related to the rodent that was attacked and poisoned were also discarded); (VIII) retreat backwards with threatening posture. Crossings (the first third of the anterior part of the body within a delimited rectangle on the arena floor after crossing the border of each section line) were also recorded as a measure of locomotor activity of the predator.

The following experimental groups were performed: male rats + toy snake ( $n = 8$ ); male rats + *Bothrops alternatus* ( $n = 9$ ); female rats + toy snake ( $n = 32$ ); proestrus,  $n = 8$ , oestrus,  $n = 8$ , early dioestrus,  $n = 8$ , and late dioestrus,  $n = 8$ ); female rats + *Bothrops alternatus* ( $n = 40$ ); proestrus,  $n = 8$ , oestrus,  $n = 12$ , early dioestrus,  $n = 7$ , and late dioestrus,  $n = 13$ ). All venomous snakes were submitted to confrontations to male and female prey in each cycle phases of oestrous cycle, and their behavioural reactions were not significantly influenced by prey behavioural responses.

### 3.3 | The hypoxia challenge test

In all experiments, 1 day before the hypoxia challenge, male and female rats were placed individually in the experimental chamber for 15 min (Fernandes et al., 2019). During this habituation session, room air was flushed into the chamber at a flow rate of 4.5 L/min in order to familiarise the rats with the gas flow and air jet sound, and to prevent a neophobic reaction to the cage environment.

The next day, animals were placed in the experimental chamber and submitted either to the hypoxia challenge or to atmospheric air (normoxia). For that purpose, the animals were placed individually into the chamber and acclimated to it for 5 min. During this period, room air was flushed into the chamber at a flow rate of a 4.5 L/min. Subsequently, N<sub>2</sub> was flushed into the chamber (4.5 L/min) for 4 min in order to reach a concentration of 7% O<sub>2</sub>. At this point, N<sub>2</sub> infusion was suspended, and the hypoxia condition of 7% O<sub>2</sub> was maintained for a further 6 min (Spiacci et al., 2015).

The behaviour of each rat was recorded throughout the experiment using a video camera connected to a DVD recorder. The number of jumps displayed by rats during the hypoxia challenge (10 final minutes of the test session) was computed manually by an experimenter blind to the experimental conditions being tested. Baseline locomotion was assessed by recording the total distance travelled over the first 5 min of the test, with animals under atmospheric air. For this analysis, a video tracking system was used (AnyMaze version 4.96, USA). The following experimental groups were used: male rats/normoxia ( $n = 8$ ); male rats/hypoxia ( $n = 9$ ); female rats/normoxia ( $n = 9$ ); female rats/hypoxia ( $n = 37$ ). Among females challenged with hypoxia, 7 were tested in proestrus, 9 in oestrus, 9 in early dioestrus, and 12 in late dioestrus. As described for male rats (Fernandes et al., 2019; Spiacci et al., 2015) and in pilot studies with females in our lab, no animals jumped during normoxia. Thus, for the sake of reducing the number of animals used, a smaller number of females from different cycle stages was tested in normoxia as the control group, even though this precludes statistical comparison.

## 4 | STATISTICAL ANALYSIS

Considering that according to Shapiro–Wilk test of normality the majority of defensive behaviour-related data did not follow a Gaussian distribution, the behavioural data of male and female rats submitted to either the polygonal arena for snake panic test or the hypoxia challenge were analysed by Kruskal–Wallis test by ranks

followed by Dunn's post hoc test. Data were reported as median with interquartile range and represented as scatter dot plot in the figures. However, concerning the females in different oestrous cycle phase submitted to the hypoxia chamber test, the majority of groups (except the proestrus group) followed the Gaussian curve, and for this reason, data represented in Figure 4b were submitted to the one-way analysis of variance followed by Tukey's post hoc test, and data were represented as means  $\pm$  S.E.M. Concerning the locomotor activity displayed by Wistar rats submitted to either the polygonal arena for snake panic test or the hypoxia challenge test, considering that data did not have a Gaussian distribution, the findings were submitted to the Kruskal–Wallis test by ranks followed by Dunn's post hoc test, and data were represented as median and interquartiles.  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

## 5 | RESULTS

### 5.1 | Defensive behavioural responses displayed by *Bothrops alternatus* pit vipers during the confrontation with prey

During the prey-versus-snake confrontation sessions, all three venomous snakes used displayed attentional behaviour towards the prey. As shown in Table 1, they displayed defensive postures such as elevation of the head and anterior body region (28.74%), dorsoventral flattening the body (16.09%), threatening attack (13.79%), and threatening posture (12.64%), in which they remained with the anterior portion of the body retracted in a sigmoid curve, a position in which the snake is ready to

TABLE 1 Incidence of defensive behaviour displayed by *Bothrops alternatus*

Behaviour	Incidence (%)
Elevation of the head and anterior third of the body	28.74
Dorsoventral flattening of the body	16.09
Threatening attack	13.79
Rapid tail vibration against the substrate	14.94
Threatening posture	12.64
Offensive/defensive attack	6.9
Retreat backward with threatening posture	5.75
Hiding the head	1.15

Note: Data correspond to the percentage of each behavioural response in comparison with the total incidence of behavioural reactions displayed by snakes ( $n = 3$ ) when confronted with prey.

launch a strike (Coimbra, Calvo, et al., 2017; Sazima, 1988). Threatening tail vibration against the polygonal arena floor (14.94%), as a warning behavioural response, retreat backwards with threatening posture, and defensive hiding the head were also displayed by the predator when confronted with fearless prey. Offensive/defensive attack with biting had an incidence of only 6.9%. There were not significant differences in the locomotor activity of *Bothrops alternatus* pit vipers during the confrontation with male and female prey (Kruskal-Wallis  $H$  test;  $\chi^2 = 0.8369$ ;  $p > 0.05$ ) (data not shown).

## 5.2 | Behavioural responses exhibited by male and female rats threatened by *Bothrops alternatus* pit viper

A summary of the statistical data presented in Figures 2 and 3 is shown in Tables 2 and 3.

In the presence of the toy snake, male and female rats displayed investigatory behaviour, but no anxiety- or panic-like responses, appearing to treat it as a benign novel object rather than a potential threat. Females did not appear any less inquisitive than males in this respect (Figures 2 and 3).

In contrast, the responses of both sexes were dramatically different when they were confronted with the live snake (Figures 2 and 3). Threatening behaviour by the snake consistently elicited anxiety-like responses in the rats, such as defensive attention, risk assessment (flat back approach and stretch attend posture), and inhibitory avoidance, as well as panic-like behaviours, including defensive immobility and escape behaviour. Although there was an ethological sequence of defensive responses, such defensive attention, flat back approach, startle, defensive immobility, escape, inhibitory avoidance, and stretch attend posture, not all prey display the whole range of these behaviours. For example, depending of each situation, escape can be elicited during the risk assessment, and defensive immobility can be replaced by explosive escape. Typically, the rat might initially display several episodes of flat back approach and startle as it appeared to investigate and assess the snake (risk assessment) and cautiously approach it (flat back approach and interaction between prey and predator). Compared with exposure to the toy snake the presence of the live snake induced a significant increase in the frequency of risk assessment in both male and female rats (Figure 2a;  $p < 0.05$  in both cases). Although females in all stages of the oestrus cycle carried out risk assessment in the presence of the predator, the incidence was highest in the oestrus phase (Figure 2b).

After displaying flat back approach and stretch attend postures, the prey usually interacted with the snake. However, both male and female rats displayed significantly fewer interactions with the live predator compared with the toy snake (Figure 2c;  $p < 0.05$  in both cases). In females, the interaction with the snake varied according to oestrous cycle phase. In oestrous, early dioestrus and late dioestrus rats tend towards to spend a shorter time interacting with the predator compared with the toy snake, and these behavioural responses were significantly shorted in comparison with those displayed by female rats in proestrus. In contrast, rats in proestrus appeared fearless, and interactions with the live snake were significantly higher compared with the toy snake (Figure 2d).

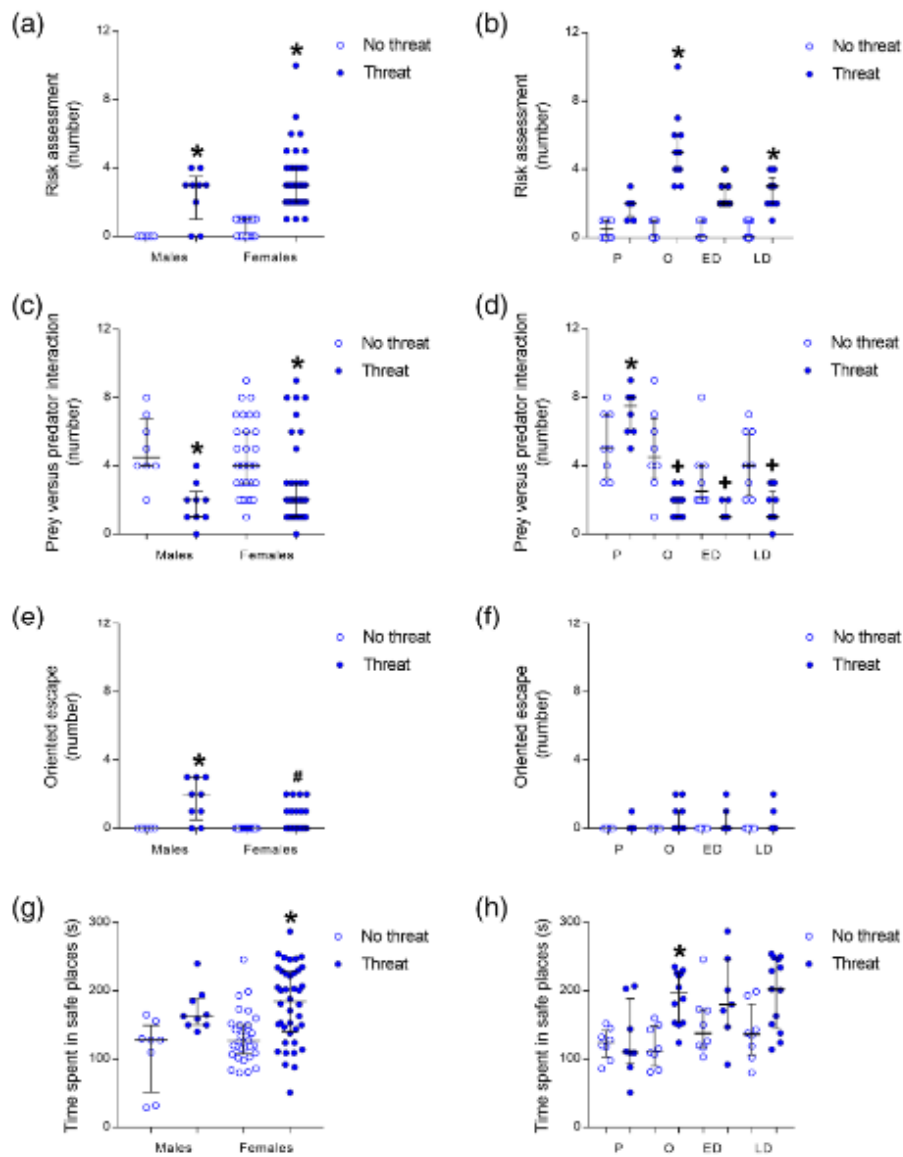
The next event depended on the response of the snake. For example, the snake reacting to the approach of the rat would elicit a jump and non-oriented escape of the prey, but if the snake made no offensive response, the rat typically displayed oriented escape. Interestingly, when threatened by the snake, after the elicitation of oriented escape to the burrow, usually prey displayed inhibitory avoidance, as shown in Figure 1c. Females displayed the same pattern of response as males in the presence of the snake. However, females appeared to be less fearful, as shown by significantly lower levels of defensive immobility (Figure 3e).

The close contact with the predator elicited mainly in male rats a significant oriented escape to safe places (the burrow and the elevated platforms for escape). According to Dunn's post hoc test, females displayed less oriented escape when compared with males, as shown in Figure 2c. No significant differences between oestrous cycle phases in females were observed (Figure 2f).

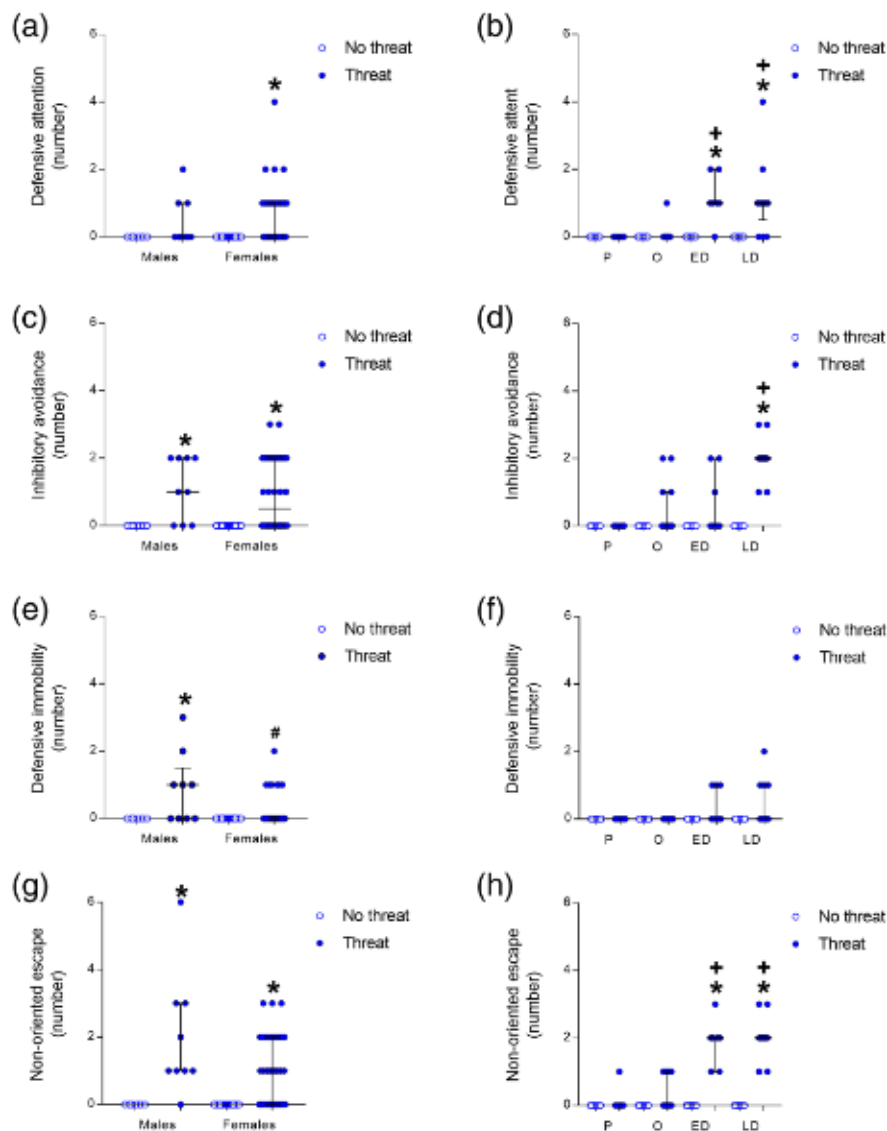
Concerning the time spent in safe places, there was a significant enhancement in the presence of the live snake only in female rats, as shown in Figure 2g. This behaviour was oestrous cycle specific with females in the oestrus phase spending significantly more time in safe places (Figure 2h;  $p < 0.05$ ).

Defensive attention, either displayed by prey in the open spaces of the polygonal arena or in safe places, was significantly displayed mainly by female rats exposed to the live snake but not the toy one (Figure 3a). In females, only rats in the early and late dioestrus phases showed this behaviour in the presence of the live snake, in comparison with threatened females in proestrus phase (Figure 3b;  $p < 0.05$  in all cases).

After oriented escape to the burrow, inhibitory avoidance, when the rat puts the head in the entrance of the burrow, was significantly displayed by male and female rats threatened by *Bothrops alternatus* when compared with the toy snake, as shown in Figure 3c. The exposure to the live venomous snake induced a significant increase



**FIGURE 2** Incidence of risk assessment (a and b), prey-versus-predator interactions (c and d), oriented escape to safe places (e and f), and time spent in safe places (g and h), displayed by Wistar rats during exposure to *Bothrops alternatus* pit vipers (Threat) or a toy snake (No threat) in males and females, and in females grouped according to stage of the oestrus cycle (P: proestrus; O: oestrus; ED: early dioestrus; LD: late dioestrus). Data are presented as median and interquartiles; \* $p < 0.05$  compared with the respective control group; # $p < 0.05$  compared with males confronted with the snake; † $p < 0.05$  compared with females in proestrus (Kruskal–Wallis  $H$  test followed by Dunn's post hoc test). The position of each dot indicates the value for an individual data point



**FIGURE 3** Incidence of defensive attention (a and b), inhibitory avoidance (c and d), defensive immobility (e and f), and non-oriented escape (g and h) displayed by prey, during exposure to the *Bothrops alternatus* pit vipers (Threat) or a false snake (No threat) considering males and females in different phases of the oestrous cycle (P: proestrus; O: oestrus; ED: early dioestrus; LD: late dioestrus). Data are presented as median  $\pm$  interquartiles; \* $p < 0.05$  compared with the respective control group; # $p < 0.05$  compared with males confronted with the snake; + $p < 0.05$  between females in different phases of the oestrous cycle confronted with the snake when compared with the females in proestrus phase (Kruskal–Wallis  $H$  test followed by Dunn's post hoc test). The position of each dot axis indicates the value for an individual data point

TABLE 2 Kruskal–Wallis-related *H* and *P* values regarding comparisons between male and female Wistar rats

Males and females	<i>H</i> ( $\chi^2$ ) statistic	Degrees of freedom	<i>P</i> value
Risk assessment	60.7	3	<0.001
Prey vs predator interaction	23.2	3	<0.001
Oriented escape	32.9	3	<0.001
Time spent in safe places	20.8	3	<0.001
Defensive attention	20.9	3	<0.001
Inhibitory avoidance	29.5	3	<0.001
Defensive immobility	20.9	3	<0.001
Non-oriented escape	43.6	3	<0.001

Note: The behavioural data, which were obtained after the prey versus predator confrontations, are expressed as the median and interquartiles.

TABLE 3 Kruskal–Wallis-related *H* and *P* values regarding comparisons female Wistar rats in different oestrous cycle phases

Oestrous cycle phases	<i>H</i> ( $\chi^2$ ) statistic	Degrees of freedom	<i>P</i> value
Risk assessment	59.3	7	<0.001
Prey vs predator interaction	46.4	7	<0.001
Oriented escape	11.0	7	<0.001
Time spent in safe places	26.2	7	<0.001
Defensive attention	48.6	7	<0.001
Inhibitory avoidance	51.2	7	<0.001
Defensive immobility	20.5	7	<0.001
Non-oriented escape	59.6	7	<0.001

Note: The behavioural data, which were obtained after the prey versus predator confrontations, are expressed as the median and interquartiles.

in the frequency of inhibitory avoidance behaviour in females in the late dioestrus phase compared with the control and to threatened females in proestrus (Figure 3d;  $p < 0.05$ ).

Close contacts between prey and predator, but not the toy snake, also elicited panic attack-like responses of defensive immobility and non-oriented/explosive escape behaviour. However, only male rats displayed a significant increase in defensive immobility when confronted with the snake compared with the control, and that defensive reaction was significantly higher than that displayed by females (Figure 3e;  $p < 0.05$  in both cases). No significant difference between oestrous cycle phases in threatened females was observed (Figure 3f).

Non-oriented escape behaviour was, however, displayed by both male and female rats when threatened by the venomous snake (Figure 3g;  $p < 0.05$  in both cases). Interestingly, when oestrous cycle stage was taken into account, only females in the early dioestrus and late dioestrus phases displayed a significant level of non-oriented escape behaviour compared with control (exposure to the toy snake), a defensive response that was also significantly different from that displayed by females in proestrus phase (Figure 3h;  $p < 0.05$  in all cases).

Concerning the locomotor activity (crossings) of male and female Wistar rats submitted to the polygonal arena for snake panic test, only females significantly decreased the locomotor activity when confronted with the predator (Kruskal–Wallis *H* test;  $\chi^2 = 22.7$ ;  $p < 0.001$ ), as compared with control group, as shown in Figure 5a (Dunn post hoc test;  $p < 0.05$ ). When oestrous cycle stage was taken into account, only females in the late dioestrus phase displayed a significant decrease in the number of crossings in comparison with the control group and that decrease in the locomotor activity was also significantly different from that displayed by females in proestrus phase (Kruskal–Wallis *H* test;  $\chi^2 = 34.8$ ;  $p < 0.001$ ), as shown in Figure 5b (Dunn post hoc test;  $p < 0.05$  in both cases).

### 5.3 | Effects of the hypoxia condition on the behaviour displayed by male and female rats

Both male and female Wistar rats displayed a panic attack-like escape reaction when submitted to the hypoxia challenge. Hypoxia induced significant jumping



behaviour in male and female Wistar rats but not in their respective control groups maintained in normoxia (Kruskal–Wallis  $H$  test;  $\chi^2 = 27.7$ ;  $p < 0.001$ ), as shown in Figure 4a (Dunn post hoc test;  $p < 0.05$  in both cases).

Regarding the responses of female Wistar rats at different phases of the oestrus cycle, there was significant effect of oestrus cycle on panic-like responses to hypoxia conditions ( $F_{3,33} = 4.068$ ,  $p < 0.05$ ). Females in the late dioestrus phase displayed the highest number of jumping responses, which was significantly greater compared with females in proestrus, as shown in Figure 4b (Tukey post hoc test;  $p < 0.05$ ).

There were neither significant differences between male and female rats (Kruskal–Wallis  $H$  test;  $\chi^2 = 2.65$ ;  $p > 0.05$ ) nor between females in different oestrus cycle phases (Kruskal–Wallis  $H$  test;  $\chi^2 = 2.29$ ;  $p > 0.05$ ) on baseline locomotion during normoxia condition: movements made during the 5 min in the chamber before hypoxia (Figure 5c,d).

## 6 | DISCUSSION

The prey-versus-predator confrontation and hypoxia challenge tests have previously been validated as models of panic attack-like defensive behaviours only in male laboratory animals (Coimbra, Calvo, et al., 2017; Mendes-Gomes, Motta, et al., 2020; Paschoalin-Maurin et al., 2018; Spiacci et al., 2015, 2018). The present study has shown that in both these tests, females behave in a qualitatively similar fashion to males. However, there are sex differences in terms of quantitative aspects of the responses, and the responsiveness of females is influenced by stage of the oestrus cycle.

In terms of responsiveness to the hypoxic challenge, female Wistar rats tended to be less sensitive than males, making only half the number of jumps. This finding is in contrast to results of a recent study in our laboratory using Sprague–Dawley rats, in which the responsiveness of males was similar to the Wistar rats used in the present study but females were much more responsive to hypoxia than males, making twice the number of jumps (Batistela et al., 2021). Since the apparatus, housing conditions, and the test protocol were the same in both studies and experiments were largely carried out at a similar time of year (August/September 2018 for Sprague–Dawleys and October/November 2017 for Wistars, plus a few experiments in March 2018), this suggests there could be strain-related sex differences in the female panicogenic response to hypoxia. However, it remains unclear whether this stems from a difference in the physiological and/or emotional component of the response.

Notwithstanding the blunted responsiveness of the female compared with male Wistar rats, it was clear that the response to hypoxia in females was oestrus cycle dependent. Indeed, the oestrus cycle influence far outweighed any sex differences. Whilst in the proestrus and oestrus stages, females showed only a minimal reaction to hypoxia, their responsiveness increased 10-fold by the time they reached the late dioestrus phase of the cycle, when the incidence of their panic-like jumping was comparable with that displayed by males.

In contrast to the straightforward panic attack-like jumping displayed by rats on exposure to acute hypoxia, the behaviour elicited by confrontation with the snake is more complex. Confrontation by a predator in a semi-naturalistic environment (the enriched polygonal arena)

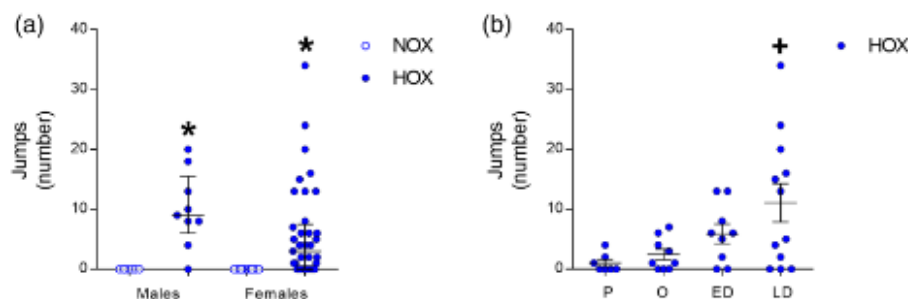
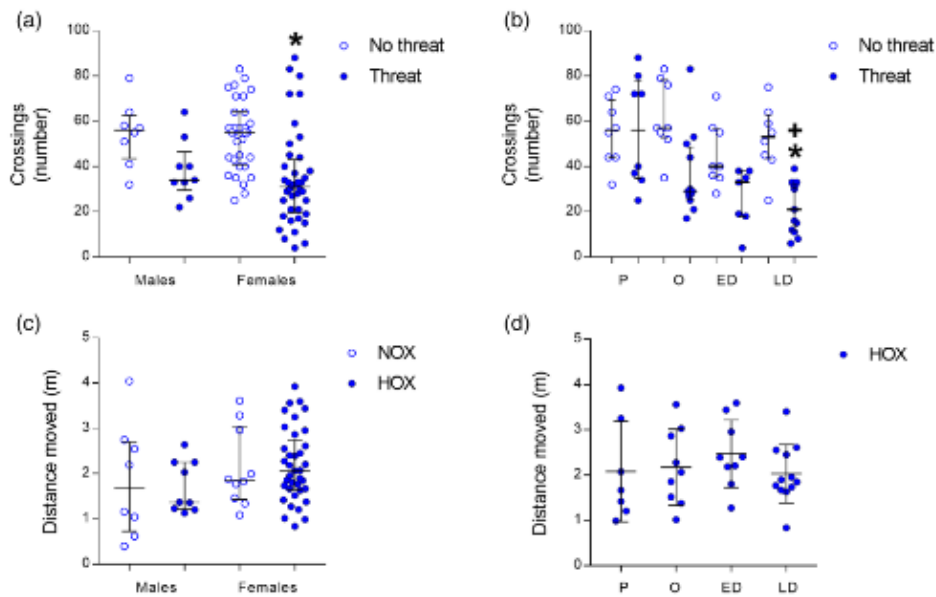


FIGURE 4 Number of jumps displayed by male and female Wistar rats submitted to either normoxia (NOX) or hypoxia (HOX) conditions (a) and by female rats in different oestrus cycle phases in a hypoxia condition (b). Data are presented as either median and interquartiles (a) or mean  $\pm$  SEM (b). \* $p < 0.05$ , compared with the respective control groups, according to either the Kruskal–Wallis  $H$  test followed by Dunn's post hoc test (a) or one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test (b); † $p < 0.05$  between females in different phases of the oestrus cycle confronted with the snake when compared with the females in proestrus phase, according to the one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. Dots represent individual data points



**FIGURE 5** Incidence of crossings (a and b), displayed by prey, during exposure to the *Bothrops alternatus* pit vipers (Threat) or a false snake (No threat) considering males and females in different phases of the oestrous cycle (P: proestrus; O: oestrus; ED: early dioestrus; LD: late dioestrus) and distance moved in metres of male and females Wistar rats. Data are presented as median and interquartiles; \* $p < 0.05$  compared with the respective control group; †significant differences ( $p < 0.05$ ) between females in different phases of the oestrous cycle confronted with the snake when compared with the females in proestrus phase (Kruskal–Wallis  $H$  test followed by Dunn's post hoc test). The position of each dot axis indicates the value for an individual data point

represents an ethologically relevant challenge to survival, which elicits a sophisticated behavioural repertoire to promote survival by first assessing the level of threat and then engaging in defensive behaviour if the threat is judged to pose a risk to survival. In large enriched polygonal arenas for snakes, such as the one used in the present study, the initial risk assessment approach-avoidance conflict behaviour elicited by the relatively distant threat is considered to reflect anxiety, whilst unconditioned freezing (defensive immobility) and escape responses evoked by the real proximal threat have been associated with panic (Almada et al., 2021; Blanchard, Griebel, & Blanchard, 2001; Blanchard, Hynd, et al., 2001; Coimbra, Calvo, et al., 2017; Paschoalin-Maurin et al., 2018). In the presence of the snake, both males and females initially displayed anxiety-like behaviour (risk assessment) followed by panic-like escape response. These behaviours were specific to the presence of the live predator, since the toy snake elicited only investigative behaviour and failed to evoke anxiety- and panic-like reactions in either sex. However, once rats came within close

proximity to the live snake, both males and females reacted with similar levels of escape behaviour to the proximal threat. The stereotypical sequence of responses of our Wistar rats exposed to *Bothrops alternatus* venomous pit vipers was similar to that reported previously for male rats confronted by other species of venomous snake (Calvo, Almada, et al., 2019; Calvo, Lobão-Soares, et al., 2019; Coimbra, Calvo, et al., 2017; Mendes-Gomes, Motta, et al., 2020).

When the response of females confronted by the snake was analysed with respect to oestrous cycle phase, striking differences emerged, which depended not only on the phase of the cycle but also on the particular type of behaviour. In terms of anxiety-like responses of risk assessment (flat back approach and stretch attend posture) behaviour, female rats in the early phases of the cycle (proestrus and oestrus) showed a significantly higher level of responding compared with female rats in their early and late dioestrus phases. Females in the proestrus phase were also more inclined to interact with the predator suggesting that they were less fearful at this time.

However, as the behaviour of prey progressed towards panic-like escape, the influence of the oestrous cycle shifted. Non-oriented escape was significantly enhanced in the dioestrus phase compared with the earlier stages of the oestrous cycle, as were defensive attention and inhibitory avoidance, which were low in the early stages of the cycle, and increased fourfold to fivefold as the rats reached the dioestrus phase. Although the latter are often considered as classical anxiety-related responses in rats, inhibitory avoidance behaviour can be also expressed in a panic disorder context, in the form of agoraphobia that follows a panic attack (Lelliott et al., 1989; Willi et al., 2000). Defensive attention is also displayed by threatened prey during inhibitory avoidance behaviour, when they maintain the entire body inside the burrow, putting the head in the entrance and scanning the aversive environment, in which the snake is found. The increased incidence of inhibitory avoidance displayed by threatened female rats in late dioestrus phase is reflected by a trend towards an increased time spent in safe places.

Our data indicate that the hypoxia challenge and confrontation with a predator both pose overt threats that evoke unconditioned panic-like defensive reactions in rats, which in females is influenced by oestrous cycle stage. These findings corroborate a number of recent observations that female rats in their dioestrus phase, particularly late dioestrus, show enhanced responsiveness to stimuli that evoke unconditioned fear-like behaviours (Devall et al., 2009, 2015; Ho et al., 2001; Machado Figueiredo et al., 2019; Pentkowski et al., 2018).

The mechanism whereby the oestrous cycle impacts so dramatically on responding of females is intriguing. The medial hypothalamus, the dorsal periaqueductal grey matter (PAG), the superior and the inferior colliculi are considered the main neural substrate for the integration of unconditioned aversive stimulus-related defensive behavioural states, such as those similar to panic attacks and anxiety (Paschoalin-Maurin et al., 2018). Evidence is accumulating that neuronal excitability in this system is differentially altered during the oestrous cycle. For example, within the PAG the rapid decline in brain progesterone concentration during late dioestrus triggers increased expression of extrasynaptic GABA<sub>A</sub> receptor subunits on GABAergic neurones (Griffiths & Lovick, 2005). Functionally, this manifests as increased neuronal excitability of the PAG circuitry, due to disinhibition of GABAergic interneurons activity (Brack & Lovick, 2007; Devall et al., 2015). In the amygdaloid complex too, a cycle-linked shift in the balance of inhibition and excitation across the lateral and basal amygdaloid nuclei has been reported, which is linked to a change in the *in vivo* sensitivity to GABA across the oestrous cycle

(Blume et al., 2017). Such actions could decrease the threshold for triggering the panic-like behaviour in the late dioestrus phase, rendering animals more sensitive to panicogenic challenges.

Another possibility may relate to changes in oestrogen secretion during the oestrous cycle. Oestrogen reaches a peak concentration in proestrus (Butcher et al., 1974). When injected into the amygdaloid complex it produces anxiolytic actions (Frye & Walf, 2004). Within the medial amygdala, expression of membrane-associated G protein-coupled oestrogen receptor 1 (GPER) displays remarkable oestrous cycle-linked plasticity (Llorente et al., 2020). A similar plasticity of expression of GPER has also been reported in the PAG (Spary et al., 2013). The high level of oestrogen during the proestrus phase may damp the excitability of the panic circuitry and attenuate responsiveness to panicogenic challenges.

To summarise, the present study has demonstrated that female Wistar rats react in a qualitatively similar manner to male rats in two models of panic-like behaviour: confrontation with a venomous snake in an enriched polygonal arena and acute exposure to hypoxia. In both tests, the behaviour of females was significantly influenced by oestrous cycle stage. Females displayed enhanced responses during the dioestrus phase and attenuated responses in the proestrus and oestrus phases at least considering anxiety-related responses of defensive attention and inhibitory avoidance, in addition to panic attack-related behaviours, such as defensive immobility and non-oriented escape behaviours displayed in the presence of snakes, as well as panic-like jumping elicited by acute exposure to hypoxia. Whether this cyclical change in responding has an adaptive value is unclear. Pentkowski et al. (2018) have proposed that the higher levels of circulating oestrogen and progesterone in proestrus and oestrus may promote mate seeking and facilitate subsequent reproduction by suppressing fear in novel and/or potentially dangerous environments. Notwithstanding the ethological relevance of such a strategy, it is clear that considerations of oestrous cycle must be taken into account when using females in tests of unconditioned fear.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) (research grants 470119/2004-7 and 427397/2018-9), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (research grants 2007/01174-1, 2012/03798-0, and 2017/11855-8), and a Pro-Rectorate of the University of São Paulo (USP) Research Grant (NAP-USP-NuPNE: IaPq2012-156-USP-12.1.25440.01.6). Each organisation played no further role in the design of the study; the collection, analysis, and interpretation of data; the

writing of the report; or the decision to submit the paper for publication. R. Ferreira-Sgobbi was supported by *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES) - Financing Code 001 (postdoctoral process fellowship process: PNPd-PPCLRP-USP-Psychobiology Division). R. M. de Figueiredo was financially supported by CAPES (Sc.D. fellowship, process 001). LL. Falconi-Sobrinho was supported by FAPESP (Scientiae Magister grant 2013/10984-8; Post-Doctoral grant 2019/05255-3) and CNPq (ScM fellowship grant 134267/2013-3; Scientiae Doctor fellowship grant 145258/2015-7). N.C. Coimbra was a researcher (level 1A) from CNPq (grants 301905/2010-0 and 301341/2015-0). TA Lovick is a Special Visiting Researcher in Brazil supported by FAPESP grant 2019/05240-6 to H Zangrossi Jr. The authors are grateful to D.H. Elias-Filho for their expert technical assistance. D.H. Elias Filho received a technician scholarship from FAPESP (TT-2, process 02/01497-1) and was a recipient of scholarships sponsored by CNPq (processes 501858/2005-9, 500896/2008-9, 505461/2010-2, and 372838/2018-9) and FAEPA (grants 345/2009 and 185/2010).

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interest with respect to the work presented herein.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

Renata Ferreira-Sgobbi and Norberto Cysne Coimbra performed experiments using urutu-cruzeiro venomous lancehead pit vipers. Renata Ferreira-Sgobbi, Rebeca Machado de Figueiredo, and Luiz Luciano Falconi-Sobrinho prepared the graphs and conducted the statistical analysis. Renata Ferreira-Sgobbi, Melina Matthiesen, Alana Tercino Frias, Heloisa Helena Vilela-Costa, and Matheus Fitipaldi Batistela performed experiments using hypoxia challenge. Susana Isabel Sá, Thelma Anderson Lovick, and Hélio Zangrossi Jr. interpreted data and wrote the manuscript. Norberto Cysne Coimbra designed the experiments, designed the enriched polygonal arena for snake-versus-prey confrontations, interpreted data, and wrote the manuscript.


#### PEER REVIEW


The peer review history for this article is available at <https://publons.com/publon/10.1111/ejn.15548>.

#### DATA AVAILABILITY STATEMENT

All data from this work will be made available in the USP Scientific Data Storage Repository, a platform provided by the University of São Paulo for all and any scientific content to be stored.

#### ORCID

Renata Ferreira-Sgobbi  <https://orcid.org/0000-0002-2199-8223>

Norberto Cysne Coimbra  <https://orcid.org/0000-0002-4676-2620>

#### REFERENCES

- Almada, R. C., & Coimbra, N. C. (2015). Recruitment of striatonigral disinhibitory and nigroreticular inhibitory GABAergic pathways during the organization of defensive behavior by mice in a dangerous environment with the venomous snake *Bothrops alternatus* (Reptilia, Viperidae). *Synapse*, 69(6), 299–313. <https://doi.org/10.1002/syn.21814>
- Almada, R. C., dos Anjos-Garcia, T., da Silva, J. A., Pigatto, G. R., Wotjak, C. T., & Coimbra, N. C. (2021). The modulation of striatonigral and nigroreticular pathways by CBI signalling in the substantia nigra pars reticulata regulates panic elicited in mice by urutu-cruzeiro lancehead pit vipers. *Behavioural Brain Research*, 401, 112996. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112996>
- Almada, R. C., Roncon, C. M., Elias-Filho, D. H., & Coimbra, N. C. (2015). Endocannabinoid signaling mechanisms in the substantia nigra pars reticulata modulate GABAergic nigroreticular pathways in mice threatened by urutu-cruzeiro venomous pit viper. *Neuroscience*, 303, 503–514. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.06.048>
- Batistela, M. F., Vilela-Costa, H. H., Frias, A. T., Hernandez, P. M., Lovick, T. A., & Zangrossi, H. Jr. (2021). Enhanced responsiveness to hypoxic panicogenic challenge in female rats in late diestrus is suppressed by short term, low dose fluoxetine: Involvement of the dorsal raphe nucleus and the dorsal periaqueductal gray. *Journal of Psychopharmacology*, 35(12), 1523–1535. <https://doi.org/10.1177/02698811211058986>
- Beck, J. G., Ohtake, P. J., & Shipperd, J. C. (1999). Exaggerated anxiety is not unique to CO<sub>2</sub> in panic disorder: A comparison of hypercapnic and hypoxic challenges. *Journal of Abnormal Psychology*, 108(3), 473–482. <https://doi.org/10.1037/0021-843X.108.3.473>
- Biagioni, A. F., de Freitas, R. L., da Silva, J. A., de Oliveira, R. C., de Oliveira, R., Alves, V. M., & Coimbra, N. C. (2013). Serotonergic neural links from the dorsal raphe nucleus modulate defensive behaviours organised by the dorsomedial hypothalamus and the elaboration of fear-induced antinociception via locus coeruleus pathways. *Neuropharmacology*, 67, 379–394. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.10.024>
- Blanchard, D. C., Canteras, N. S., Markham, C. M., Pentkowski, N. S., & Blanchard, R. J. (2005). Lesions of structures showing Fos expression to cat presentation: Effects on responsivity to a Cat, Cat odor, and nonpredator threat. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 29(8), 1243–1253. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.04.019>
- Blanchard, D. C., Griebel, G., & Blanchard, R. J. (2001). Mouse defensive behaviors: Pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 25(3), 205–218. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(01\)00009-4](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(01)00009-4)
- Blanchard, D. C., Hynd, A. L., Minke, K. A., Minemoto, T., & Blanchard, R. J. (2001). Human defensive behaviors to threat scenarios show parallels to fear- and anxiety-related