

Efeitos Agudos e Crônicos da Fluoxetina em Modelos Experimentais de Pânico, Ansiedade e Depressão em Ratos Adultos Submetidos ao Isolamento Social Neonatal.

Cristie Setubal Bernabé

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas

Mestrado em Ciências Fisiológicas

Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória, Abril de 2013

Efeitos Agudos e Crônicos da Fluoxetina em Modelos Experimentais de Pânico, Ansiedade e Depressão em Ratos Adultos Submetidos ao Isolamento Social Neonatal.

Cristie Setubal Bernabé

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em 19/04/13 por:

Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg – Orientador
Departamento de Ciências Fisiológicas, UFES

Prof. Dr. Hélio Zangrossi Jr.
Departamento de Farmacologia, FMRP-USP

Prof^a. Dr^a. Ana Paula S. V. Bittencourt
Departamento de Ciências Fisiológicas, UFES

Prof^a. Dr^a. Vanessa Beijamini Harres
Departamento de Ciências Farmacêuticas, UFES

Prof^a. Dr^a. Ivanita Stefanon – Coordenadora do PPGCF
Departamento de Ciências Fisiológicas, UFES

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

Vitória, Abril de 2013.

Bernabé, Cristie Setubal, 1984

Efeitos agudos e crônicos da fluoxetina em modelos experimentais de pânico, ansiedade e depressão em ratos adultos submetidos ao isolamento social neonatal. [Vitória] 2013

xxi, 152 p. 29,7 cm (UFES, M.Sc., Ciências Fisiológicas, 2013)

Dissertação, Universidade Federal do Espírito Santo, PPGCF.

1. Matéria cinzenta periaquedutal 2. Pânico 3. Isolamento social neonatal 4. Fluoxetina

Aos meus pais, por nunca medirem esforços para que eu me tornasse uma pessoa melhor e por terem deixado de lado muito dos seus sonhos para que os meus pudessem se tornar realidade.

Obrigado Pai e Mãe.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu orientador, Luiz Carlos Schenberg. Algum tempo antes de ingressar no mestrado havia uma coisa que eu gostava menos do que fisiologia: sistema nervoso. Redescobrir o fascínio pela ciência, especialmente em áreas que eu jamais imaginava trabalhar, foi algo que realmente me surpreendeu. Hoje eu não vejo outro caminho se não este que eu estou trilhando. Ao meu orientador o meu mais sincero agradecimento por ter me rerepresentado, com dedicação, sabedoria e traquejos, à ciência, à NEUROCIÊNCIA.

Aos colegas do Laboratório de Neurobiologia dos Transtornos de Humor e Ansiedade. Às doutorandas Cláudia pelos ensinamentos com o programa de estatística e Fagna por algumas vezes revezarmos na separação maternal nos finais de semana e feriados. À Jeyce, por ter iniciados os experimentos com separação maternal e ter introduzido esta nova linha de pesquisa no laboratório. Aos alunos de IC Martielo e Luana, pessoas com quem sempre pude contar nos momentos "intensos" do mestrado. Aos colegas e amigos de laboratório Carlos, Caroline, Rúbia e Tiago. Ciência não se faz sem parcerias e colaborações. Poder contar com a ajuda de vocês durante o meu projeto foi muito importante para a conclusão desta etapa da minha vida. Agradeço à Rúbia, que me ajudou muito em todos os experimentos, em particular nas cirurgias dos "grupinhos" extras "inesperadamente esperados". À Caroline, presente em vários finais de semana e feriados, mesmo já trabalhando a mais de 100 km de distância. Pelanca, muito obrigado! Ao Carlitos, embora aluno de IC, se comportou como um pós-graduando e pude confiar a ajuda na obtenção dos dados comportamentais e limpeza das caixas (todos sempre fugiam deste serviço). Ao Tiago que, embora inicialmente tenha quase tido uma fobia de ratos, superou

este medo e muito me ajudou em todos os experimentos na segunda metade do meu mestrado. Este trabalho é nosso!

Aos membros titulares da banca, os professores Ana Paula S. V. Bittencourt, Hélio Zangrossi Jr., Vanessa Beijamini Harres e suplentes, Jeyce Willig Quintino dos Santos e Rosana Suemi Tokumaru pelo aceite em participar da avaliação do meu trabalho.

Aos professores Ana Paula, Lívia Carla e Alexandre Martins, pessoas excepcionais com quem convivi durante esses anos. Vocês tiveram um papel fundamental na minha formação. Aos técnicos do departamento e colegas de trabalho, Enildo e Evaldo, pela força nos momentos turbulentos e de muito trabalho.

Aos professores chefes do Departamento de Ciências Fisiológicas, Hélder Mauad e Cláudia Leite, e demais professores pela concessão do horário especial de estudante sem o qual a realização do meu mestrado seria muito mais difícil.

Ao Laboratório de Histologia Molecular e Imunoistoquímica (LHMI), por fornecer os equipamentos necessários para as preparações histológicas do presente trabalho.

Ao Biotério Central e seus funcionários pelo fornecimento dos animais para o presente estudo.

Aos amigos da pós-graduação Carol, Lalá, Leandro, Leo, Pedro, Tatá, Thithi, Rúbia e Catita (essa não era da pós, mas é como se fosse). Quem falou que graduação só se vive uma vez não conheceu esse grupo. É triste saber que a vida nos reserva caminhos distintos e, muitas vezes, distantes. Mas eu tenho certeza de que a amizade criada entre nós vai permanecer e fazer com que nossos caminhos se

cruzem em vários momentos. Nesta "matilha" de amigos, é certo que sempre será TUDO NOSSO!

Aos amigos fora da pós Adriano, Clara, Cynara, João Gilberto, Renato e Rogério (sim, existe vida além da pós-graduação). Embora os encontros tenham diminuído, elas foram fundamentais para eu manter o foco nos meus objetivos. Em especial ao João, amigo com quem dividi o apartamento no último ano do mestrado pelas cervejas inesperadas e à Clarinha, amiga do peito que a UFES colocou em minha vida.

À minha namorada Izabela. É difícil de acreditar que convivemos e nos esbarramos pelos corredores do PPGCF durante dois anos como apenas conhecidos. É engraçado como a vida nos prega peças. Ontem você era apenas uma conhecida, hoje minha namorada e amanhã minha mulher. Você me deu muita força para que eu pudesse concluir esta etapa da minha vida. Esta conquista é sua também. Eu te amo minha linda.

À minha família, meus tios, primos, afilhados e avó. Em especial aos meus afilhados Caio e Mateus por me ensinarem uma nova forma de amar. Aos meus tios Marcelo, Margareth, Dorinha e Carlos César. Vocês me ensinaram a perseverança e garra, ciência alguma conseguiria me ensinar isso. Acreditem, tenho vocês como exemplos de vida. À minha avó, pelos cafés e bolos de cenoura nos domingos a tarde. Vó, tenho certeza que você sabe o quanto esses momentos são muito importante para mim. Poderia existir avó melhor no mundo? Guardo, com o sabor do seu bolo incomparável, o seu amor sem limite. Minha família, minha vida.

Ao meu irmão Rossano. Com brigas, implicâncias, erros e acertos eu aprendi coisas que universidade alguma me ensinaria. À minha cunhada Karyna, que embora toda implicância tenho um carinho especial. Desejo a vocês toda a felicidade do mundo.

Por fim, aos meus pais. Este é o mais difícil de todos os agradecimentos. Escrever minha dissertação me pareceu fácil agora. Agradecer àqueles que não mediram esforços em me fazer uma pessoa melhor e abdicaram muitos de seus sonhos para que os meus se tornassem realidade não é fácil. Pai e Mãe, obrigado pelo amor incondicional, pelas noites de sono em claro, pelos puxões de orelha nas horas devidas e pelo colo nas horas difíceis. Sem vocês eu seria apenas mais um. Se algum dia eu conseguir ser metade dos pais que vocês foram, tenho certeza que meus filhos estarão no caminho certo.

Obrigado a todos.

“Nada na biologia faz sentido exceto à luz da evolução”.

Theodosius Dobzhansky

LISTA DE ABREVIATURAS

%EBA	Porcentagem de entrada no braço aberto
%EBF	Porcentagem de entrada no braço fechado
%TBA	Porcentagem de tempo no braço aberto
%TBF	Porcentagem de tempo no braço fechado
5-HIAA	Ácido 5-hidroxiindolacético
5-HT	Serotonina
5-HTT	Transportador de membrana de serotonina
ACe	Núcleo central da amígdala
ACTH	Corticotrofina
ANOVA	Análise de variância
AP	Ataque de pânico
APA	Associação Psiquiátrica Norte Americana
ASI	Ansiedade de separação na infância
BDZ	Benzodiazepínicos
CA	Campo aberto
CO ₂	Dióxido de carbono
CORT	Cortisol ou Corticosterona (em humanos e roedores, respectivamente)
CPF	Córtex pré-frontal
CSM	Ambiente não familiar
DG	Giro denteado
DM	Depressão maior
DSM	Manual de Estatística e Diagnóstico
EBA	Entrada no braço aberto
EBF	Entrada no braço fechado
EP	Erro padrão
EPM	Erro padrão das médias
FG	Fobia generalizada
FIC	Ratos sem tratamento

FLX	Fluoxetina
FLX1	Fluoxetina 1 mg/kg/dia
FLX2	Fluoxetina 2 mg/kg/dia
g.l.	Grau de liberdade
GABA	Ácido- γ -amino butírico
HDG	Hipótese Deakin/Graeff
HDM	Hipotálamo dorsomedial
HDMc	Porção compacta do hipotálamo dorsomedial
HDMd	Porção difusa do hipotálamo dorsomedial
HHA	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
I ₅₀	Intensidade mediana
I ₇₀	Limiar que produz sete fugas em dez tentativas
IC95%	Intervalo de confiança com 95%
ISN	Isolamento social neonatal
ISRS	Inibidores seletivos de recaptção de serotonina
KCN	Cianeto de potássio
LAC	Lactato de sódio
LCE	Labirinto em cruz elevado
LTE	Labirinto em T elevado
MCPA	Matéria cinzenta periaquedutal
MCPAd	Matéria cinzenta periaquedutal dorsal
MCPAdl	Matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral
MCPAdm	Matéria cinzenta periaquedutal dorso medial
MCPAl	Matéria cinzenta periaquedutal lateral
MCPAv	Matéria cinzenta periaquedutal ventral
MCPAvl	Matéria cinzenta periaquedutal ventrolateral
NA	Noradrenalina
NaCl	Cloreto de sódio
NDR	Núcleo dorsal da rafe

NF	Teste da natação forçada
NIET	Núcleo intersticial da estria terminal
NMDA	N-Metil-D-aspartato
NMnR	Núcleo mediano da rafe
NOs	Sintetase do óxido nítrico
NP	Ratos não privados
OVLT	Órgão vascular da lâmina terminal
P	Ratos privados
PeF	Hipotálamo perifornical
PET	Tomografia por emissão positrônica
PN	Dia pós-natal
PRL	Prolactina
SAL	Salina
SPECT	Tomografia computadorizada por emissão de fóton
TBA	Tempo no braço aberto
TBF	Tempo no braço fechado
TGA	Transtorno de ansiedade generalizada
TP	Transtorno do pânico
TPC	Tempo na plataforma central
TFSM	Teste simulado de falar em público
VMH	Hipotálamo ventromedial
ΔI_{50}	Varição da intensidade mediana
χ^2	Chi-quadrado
μA	Microampere

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Organização colunar rostro-caudal da MCP.	29
Figura 2. Diagrama ilustrando o presumível papel da serotonina (5-HT) e noradrenalina (NE) no modelo de punição de Wise <i>et al.</i> (1973).....	44
Figura 3. Modelo da hipótese de Deakin e Graeff no cérebro de rato.....	49
Figura 4. Modelo proposto para os diferentes tipos de plasticidade neuronal baseados no tratamento por drogas antidepressivas.....	63
Figura 5. Ratos sete dias após a cirurgia de implantação dos eletrodos intracranianos.....	73
Figura 6. Localização dos eletrodos dos grupos não privados () e privados ().....	87
Figura 7. Efeitos da privação materna sobre os limiares das respostas de defesa induzidas pela estimulação elétrica da MCPAd.....	89
Figura 8. Curso temporal das variações das intensidades limiares medianas ($I_{50\pm EP}$) da resposta de exoftalmia, imobilidade, trote, galope e salto produzidas pela estimulação elétrica da MCPAd nos grupos NP () e P () tratados ficticiamente (FIC), com salina (SAL) ou 1 e 2 mg/kg/dia de fluoxetina (FLX1 e FLX2, respectivamente).....	91
Figura 9. Curso temporal das variações percentuais das intensidades limiares medianas ($I_{50\pm EP}$) da resposta de exoftalmia, imobilidade, trote, galope e salto produzidas pela estimulação elétrica da MCPAd nos grupos NP () e P () tratados ficticiamente (FIC), com salina (SAL) ou 1 e 2 mg/kg/dia de fluoxetina (FLX1 e FLX2, respectivamente).....	92
Figura 10. Efeitos do isolamento social no teste do labirinto-em-cruz elevado em ratos tratados ficticiamente (FIC), salina (SAL) e 1 e 2 mg/kg de fluoxetina (FLX1 e FLX2, respectivamente).	94

Figura 11. Efeitos do isolamento social no teste do campo aberto em ratos tratados ficticiamente (FIC), salina (SAL) e 1 e 2 mg/kg de fluoxetina (FLX1 e FLX2, respectivamente).....	95
Figura 12. Efeitos do isolamento social no teste da natação forçada em ratos tratados ficticiamente (FIC), salina (SAL) e 1 e 2 mg/kg de fluoxetina (FLX1 e FLX2, respectivamente).....	96
Figura 13. Efeitos do isolamento social no teste de anedonia em ratos tratados ficticiamente (FIC), salina (SAL) e 1 e 2 mg/kg de fluoxetina (FLX1 e FLX2, respectivamente).....	97
Figura 14. Efeitos do isolamento social no peso de ratos tratados ficticiamente (FIC), salina (SAL) e 1 e 2 mg/kg de fluoxetina (FLX1 e FLX2, respectivamente).	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Isomorfismo dos AP e das respostas induzidas por estimulação da MCPAd em homens e ratos (referências, ver o texto).....	36
Tabela 2. Cronograma experimental para os grupos P e NP.....	85
Tabela 3. Sítios de estimulação do grupos de animais separados e não separados.	86

SUMÁRIO

REVISÃO:

TRANSTORNO DO PÂNICO E ANSIEDADE DE SEPARAÇÃO NA INFÂNCIA22

Transtorno do pânico: de Freud ao DSM IV23

As bases neurais do Ataque de Pânico27

Serotonina e Pânico43

Comorbidade: Ansiedade de Separação na Infância e Pânico.....51

OBJETIVOS.....65

Objetivo geral.....65

Objetivo específico65

ESTUDO:

EFEITOS AGUDOS E CRÔNICOS DA FLUOXETINA EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE PÂNICO, ANSIEDADE E DEPRESSÃO DE RATOS ADULTOS SUBMETIDOS AO ISOLAMENTO SOCIAL NEONATAL.....66

INTRODUÇÃO67

MATERIAIS E MÉTODOS69

Animais.....69

Procedimentos.....70

Cruzamentos70

Privação materna.....71

Confecção dos eletrodos71

Implantação dos eletrodos na MCPAd72

<i>Pesagem dos animais</i>	73
<i>Sessão de estimulação</i>	73
<i>Registros comportamentais</i>	74
<i>Etograma do rato</i>	75
<i>Tratamento agudo e crônico</i>	77
<i>Teste do labirinto-em-cruz elevado</i>	77
<i>Teste do campo aberto</i>	78
<i>Teste da natação forçada</i>	79
<i>Teste de anedonia</i>	79
<i>Sacrifício</i>	80
<i>Histologia</i>	80
<i>Estatística</i>	81
<i>Análise das variáveis binárias</i>	81
<i>Comparação das curvas: Teste de verossimilhança</i>	82
<i>Análise das variáveis contínuas</i>	84
RESULTADOS	86
<i>Sítios estimulados</i>	86
<i>Efeitos do ISN sobre os limiares das respostas de defesa induzidas pela estimulação elétrica da MCPAd</i>	88
<i>Efeitos dos tratamentos sobre os limiares das respostas de defesa induzidas pela estimulação elétrica da MCPAd</i>	88
<i>Efeitos do ISN e dos tratamentos sobre o desempenho dos ratos no LCE</i>	93

<i>Efeitos do ISN e dos tratamentos sobre o desempenho dos ratos no CA</i>	93
<i>Efeitos do ISN e dos tratamentos sobre o desempenho dos ratos no NF</i>	95
<i>Efeitos do ISN e dos tratamentos no teste de anedonia</i>	96
<i>Efeitos do ISN e dos tratamentos no peso dos ratos</i>	97
DISCUSSÃO	99
<i>Efeitos do ISN e tratamentos sobre o LCE, CA, NF e anedonia</i>	99
<i>Efeitos da FLX sobre as respostas nos testes do LCE, CA, NF e anedonia de ratos P e NP</i>	100
<i>Efeitos do ISN sobre os limiares basais (PN59) das respostas de defesa produzidas pela estimulação elétrica da MCPAd</i>	101
<i>Efeitos da FLX sobre os limiares das respostas de defesa produzidas pela estimulação elétrica da MCPAd (PN60, 67, 74 e 81)</i>	103
REFERÊNCIAS	108
ANEXOS	150

RESUMO

EFEITOS AGUDOS E CRÔNICOS DA FLUOXETINA EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE PÂNICO, ANSIEDADE E DEPRESSÃO DE RATOS ADULTOS SUBMETIDOS AO ISOLAMENTO SOCIAL NEONATAL. Bernabé, C.S., **Dissertação de Mestrado, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, Brasil, 2013.** Estudos clínicos sugerem que a ansiedade de separação na infância (ASI) facilita a ocorrência dos ataques de pânico (AP) na vida adulta. Por outro lado, o isolamento social neonatal (ISN) e os comportamentos defensivos eliciados pela estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPAd) tem sido propostos como os modelos experimentais de ASI e AP, respectivamente. De fato, dados recentes do nosso laboratório mostraram que o ISN facilitou os comportamentos defensivos de exoftalmia, imobilidade, trote, galope e salto evocados pela estimulação elétrica da MCPAd de ratos adultos. Em contraste, estudos epidemiológicos mostraram que os AP são influenciados somente por fatores genéticos e eventos não compartilhados vivenciados na fase adulta. Como os inibidores seletivos de recaptção da serotonina são as drogas de primeira escolha no tratamento dos transtornos de ansiedade, nós verificamos os efeitos do tratamento crônico de 21 dias com fluoxetina (FLX, 1 e 2 mg/kg/dia, I.P), salina (SAL) e ratos sem tratamento (FIC) em modelos experimentais de pânico, ansiedade e depressão de ratos ISN. Ainda, nós removemos o isolamento social agrupando ratos adultos no período pós-cirúrgico para testar a influência deste evento nos AP em ratos ISN. O ISN foi realizado separando toda a ninhada da sua mãe por 3 horas diárias durante o período de lactação (dias pós-natal 2-21, PN2-PN21). Os filhotes separados (P, n=83) eram colocados em caixas individuais enquanto suas mães eram transferidas

para uma caixa nova num ambiente distinto ao de criação. Os controles (NP, n=80) permaneceram com suas mães e eram submetidos a mesma manipulação do grupo P. Ambos os grupos foram subdivididos para os tratamentos FIC, SAL, FLX1 e FLX2. A cirurgia de implantação de eletrodos era realizada no PN52, os estímulos elétricos no PN59 (sessão-triagem), PN60 (efeitos agudos), e PN67, PN74 e PN81 (efeitos crônicos). A ansiedade foi medida pelos testes do labirinto-em-cruz elevado (PN82) e do campo aberto (PN83), enquanto a anedonia e depressão pelos testes do consumo de sacarose (PN78-PN81) e da natação forçada (PN84), respectivamente. Nossos resultados mostraram que o grupo P foi mais depressivo ($p < 0.001$), comportamento revertido pelo tratamento com FLX ($p < 0.01$). Os tratamentos do grupo P tiveram um aumento de até 60% dos limiares defensivos (ΔI_{50}) em função do tempo ($p < 0,001$) e uma facilitação destes comparados aos NP (ΔI_{50} até -15,4%, $p < 0,001$). No grupo NP, apenas a FLX2 promoveu aumento dos limiares defensivos (ΔI_{50} até 70%, $p < 0,0001$). A redução das respostas tipo-depressivas do presente estudo corroboraram com a literatura e demonstraram o efeito antidepressivo da FLX em ratos ISN. Embora com reduções menos expressivas, este estudo corroborou os dados prévios da facilitação dos comportamentos defensivos produzidos pela estimulação da MCPAd de ratos ISN. Enquanto o grupo P não teve distinção das suas medianas em nenhum dos tratamentos empregados, somente FLX2 do grupo NP teve seus limiares defensivos elevados. O aumento gradual das medianas do grupo P em decorrência das estimulações semanais sugere um déficit motivacional tal qual como ratos depressivos submetidos ao desamparo aprendido.

ABSTRACT

FLUOXETINE ACUTE AND CHRONIC EFFECTS ON EXPERIMENTAL MODELS OF PANIC, ANXIETY AND DEPRESSION OF NEONATALLY-ISOLATED ADULT RATS. Bernabé, C.S. MSc Thesis, Department of Physiological Sciences, Federal University of Espírito Santo, Vitória, ES, Brazil, 2013. Clinical studies suggest that childhood separation anxiety (CSA) predisposes panic attacks (PA). In turn, neonatal social isolation (NSI) and the defensive behaviors produced by electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray matter (DPAG) were proposed as the rat analogues of CSA and PA, respectively. Indeed, recent evidence from our laboratory showed that NSI facilitates DPAG-evoked panic-like behaviors in adult rats under seven days of social isolation. On the other hand, epidemiologic studies show that only a genetic liability set during childhood contributes to the development of panic in the presence of environmental stressful events experienced into adulthood. Because the serotonin-selective reuptake inhibitors (SSRIs) are the first-line treatment of panic disorder, here we examined the effects of 21-day intraperitoneal administrations of either fluoxetine (FLX 1 and 2mg/kg/day), saline (SAL) or untreated (FIC) on anxiety-, depression- and panic-like responses of NSI adult rats. Also, we reduced the stressful condition of social isolation by grouping the rats after the electrode implantation surgery procedure to test the influence of housing on PA in NSI adult rats. The NSI was carried out by placing the entire litter separated from its mother for 3 hours daily throughout the lactation period (post-natal day 2-21, PN2-PN21). Separated pups (P, n=83) were placed in individual boxes while the dam was moved to a different box in a novel room while the controls (NP, n=80) remained with their mother and were submitted to the same manipulation protocol of P pups. Both groups were divided into FIC, SAL, FLX1 and FLX2 treatments. Rats were implanted

with electrodes in the DPAG at PN52 and electrically stimulated at PN59 (screening session), PN60 (acute effects) and PN67, PN74 and PN81 (chronic effects). Rat behaviors were also assessed for anxiety in the elevated-plus-maze (PN82) and open field (PN83), and for anhedonia and depression in sucrose intake test (PN78-81) and forced swimming test (PN84), respectively. Our data showed that the P group had depressive-like behaviors as compared to NP ($p < 0.001$) and FLX was able to reverse this effect ($p < 0.01$). All treatments of the P group had an increase of up to 60% of the defensive thresholds (ΔI_{50}) throughout the stimulation sessions ($p < 0,001$) and a decrease of these (ΔI_{50} up to -15,4%, $p < 0,001$) as compared to NP. In NP group, only FLX2 was able to increase the defensive thresholds of the DPAG (ΔI_{50} up to 70%, $p < 0,0001$). The depressive-like behaviors assessed on the present study corroborate with previous reports and show an antidepressive-like behavior produced by FLX treatment in NSI rats. Additionally, although with a less pronounced effect, the reduction of the defensive behaviors of the P group as compared to NP agrees with early reports from our laboratory. While the median rates of the P rats had no differences due to the different treatments, only FLX2 was able to increase the defensive thresholds on NP group. Interestingly, the gradual increase of the medians in all treatments of the P group throughout the stimulation sessions suggests a similar motivational deficit behavior observed on depressed rats submitted to the learned helplessness paradigm.

REVISÃO

TRANSTORNO DO PÂNICO E ANSIEDADE DE SEPARAÇÃO NA INFÂNCIA

Transtorno do pânico: de Freud ao DSM IV

Os transtornos de ansiedade foram primeiramente classificados nos estudos pioneiros de Sigmund Freud (1896) sobre as “neuroses de ansiedade” (*Angstneurose*). Nestes estudos, Freud procurou distinguir estes transtornos da depressão maior (melancolia) e de uma ampla gama de condições psiquiátricas denominadas à época de “neurastenias”. De fato, em escritos tão precoces quanto os “Estudos Seleccionados sobre a Histeria” (Freud, 1896), Freud já discriminava duas síndromes fundamentais de ansiedade, quais sejam, a “expectativa ansiosa” ou “apreensão” (*Angstliche*), que ele considerava a forma predominante do transtorno de ansiedade, e uma síndrome menos frequente, porém igualmente importante, que ele denominou “ataque de ansiedade” (*Angstanfall*). De acordo com suas descrições, a expectativa ansiosa consistia num “*quantum* de ansiedade livre e flutuante que controlava a escolha de ideias por antecipação”. Em contraste, nos ataques de ansiedade a “ansiedade irrompia repentinamente na consciência sem ter sido eliciada por qualquer ideia”. Freud ressaltou que estes ataques podiam manifestar-se tanto como “um sentimento puro de ansiedade” quanto pela combinação da ansiedade com “a interpretação mais próxima do término na vida, tal como a ideia de morte súbita ou da perda da razão” ou combinados à “alguma parestesia” [ou ao] “distúrbio de uma ou mais funções somáticas, tais como a respiração, atividade cardíaca, inervação vasomotora e atividade glandular”. Eventualmente, Freud distinguiu estes ataques das fobias, do transtorno obsessivo-compulsivo (neurose obsessiva) e transtorno do estresse pós-traumático (neurose comum), dentre outras condições. Suas descrições clínicas de “expectativa ansiosa” e “ataque de ansiedade” são bastante similares aos diagnósticos atuais do

transtorno de ansiedade generalizada (TAG) e transtorno do pânico (TP), respectivamente (APA, 2000).

Presumivelmente, a herança clínica de Freud foi esquecida tanto devido à ruptura entre a psicanálise e medicina quanto pela diminuição progressiva do seu interesse nos ataques de pânico após o desenvolvimento da teoria da ansiedade baseada na repressão da sexualidade. Assim, enquanto os transtornos de ansiedade continuaram a ser diagnosticados como neurastenias até meados do século passado, o TP recebeu uma variedade enorme de nomes, incluindo neurose da ansiedade, reação de ansiedade, neurastenia, astenia neurocirculatória, neurose vasomotora, taquicardia nervosa, síndrome de esforço, síndrome de Da Costa, coração de soldado e coração irritável, síndrome de hiperventilação, entre outros (Pitts e McClure, 1967).

A classificação nosológica do TP decorreu do estudo pioneiro de Klein (1964) que demonstrou a sensibilidade farmacológica específica deste quadro psiquiátrico. Klein mostrou que enquanto a “expectativa ansiosa” era tratável por ansiolíticos (barbitúricos, meprobamato, e clordiazepóxido) e doses baixas de sedativos (fenotiazinas), os ataques de pânico (AP) só puderam ser tratados pela administração crônica do antidepressivo tricíclico imipramina.

Ao redor da mesma época, Pitts e McClure (1967) demonstraram que os AP podiam ser precipitados pela infusão endovenosa de lactato de sódio (LAC) em pacientes predispostos aos ataques espontâneos de pânico. De fato, estudos prévios de Cohen e White (1951) já haviam mostrado que os AP podiam ser precipitados por hiperventilação em 5% de dióxido de carbono (CO₂), que não produz alcalose, mas não no exercício ou na ventilação ambiente (Klein, 1993). Klein

corroborou estes estudos e concluiu que o estímulo era o CO₂, e não a alcalose produzida pela hiperventilação. Estudos posteriores forneceram provas numerosas das propriedades panicogênicas do LAC e CO₂, bem como de outros agentes (Graeff *et al.*, 2005). Posteriormente, mostrou-se que a ioimbina, um antagonista α -2 adrenérgico, também induz pânico em mais de dois terços dos pacientes de TP, principalmente após administração endovenosa (Charney e Manji, 2004). Contudo, a infusão de ioimbina também provocou o aumento da ansiedade em pessoas normais, tal como ocorre com a cafeína, colecistocinina (CCK) e inúmeras drogas com ação panicogênica (Klein, 1993). Ainda, enquanto os AP induzidos por inalação de CO₂ e infusão endovenosa de LAC são bloqueados pelo tratamento crônico com antidepressivos tricíclicos (Gorman *et al.*, 1997; Liebowitz *et al.*, 1985b; Rifkin *et al.*, 1981; Woods *et al.*, 1990; Yeragani *et al.*, 1988), os AP induzidos por β -carbolina e ioimbina em indivíduos saudáveis são atenuados por baixas doses de diazepam mas não pelo tricíclicos (Dorow *et al.*, 1983; Klein, 1993). A sensibilidade específica às drogas e a existência de marcadores fisiológicos do TP sugeriram a existência de um circuito cerebral disparando de forma não adaptativa.

Embora situações de medo intenso sejam similares aos AP em vários aspectos (Ehlers e Breuer, 1996; Stein e Bouwer, 1997; Street *et al.*, 1989), o pânico clínico apresenta características que nem sempre são observadas naquelas condições. A falta de ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) em pacientes com TP, por exemplo, permanece como um dos principais enigmas da psiquiatria moderna (Hollander *et al.*, 1989a, 1989b; Levin *et al.*, 1987; Liebowitz *et al.*, 1984; Woods *et al.*, 1988, 1987). Não obstante, o TP somente foi reconhecido como entidade nosológica a partir de 1980 (EUA), quando foi incluído no Manual de Estatística e Diagnóstico da Associação Psiquiátrica Norte Americana, o DSM-III

(APA, 1980), aproximadamente um século após as observações pioneiras de Freud. De acordo com DSM-III, o TP, ou ansiedade episódica paroxística, inclui-se entre os transtornos de ansiedade, ou seja, estados emocionais repetitivos, ou persistentes, nos quais a ansiedade patológica desempenha o papel fundamental. O TP é uma síndrome tripartite caracterizada pela ocorrência de ataques espontâneos de pânico, ansiedade antecipatória e esquiva fóbica. Estes ataques são usualmente precedidos por ansiedade crescente (ansiedade antecipatória), podendo resultar em esquiva fóbica (agorafobia) das situações que os pacientes julguem favorecer estes ataques (pânico situacional). Os AP são acompanhados de intensos fenômenos viscerais e neurológicos como sudorese, dispneia, sensação de sufocamento, palpitação ou ritmo cardíaco acelerado, desconforto ou dor torácica, náusea ou dor abdominal, vertigem, desfiguração da realidade, despersonalização, receio de fazer algo fora do controle ou de ficar louco, medo de morrer, sensação de dormência nas mãos, rubor ou calafrios e desejo de fuga da situação imediata (APA, 1980). É interessante notar que a descrição clínica de Freud para o “ataque de ansiedade” já incluía 10 dos 13 sintomas necessários para o diagnóstico do TP quando este foi introduzido no DSM-III (APA, 1980).

Os critérios clínicos para o diagnóstico do TP foram estabelecidos a partir do DSM-III (APA, 1980). Neste, o TP é definido como a ocorrência de quatro ataques espontâneos em quatro semanas ou um ataque seguido pelo receio de novos ataques ao longo de quatro semanas. Também ficou estabelecida a distinção entre ataques completos, com mais de quatro sintomas (dentre 12 ou 13 característicos), ou ataques limitados, com número inferior de sintomas. Por sua vez, os AP situacionais estão relacionados à expectativa do paciente de desenvolver sintomas que se assemelham aos dos AP em um determinado local ou contexto.

Essa ansiedade é gradual, até que o indivíduo se confronte com a situação temida e ocorra um AP (Gentil, 1988).

O TP pode acarretar em enorme prejuízo aos indivíduos, principalmente, se for acompanhado de agorafobia, limitando as atividades sociais e profissionais de forma parcial ou completa. Devido à ausência de explicação dos sintomas e às frequentes consultas e exames médicos, geralmente negativos, os AP também desenvolvem insegurança e perda da autoestima, com grande desconforto físico e emocional. Com um custo social elevado, estimativas europeias avaliam que 7,5 a 10% da população adulta, entre 20 e 30 anos, terão AP ocasionais e 2% a 5% desenvolverão o TP, isto é, AP recorrentes com graves limitações do desempenho social e familiar do indivíduo (Goodwin *et al.*, 2004).

As bases neurais do Ataque de Pânico

As investigações pioneiras de Walter Rudolph Hess sobre a reação de defesa no gato originaram as técnicas de estimulação intracraniana em animais livres e não anestesiados (Hess e Brugger, 1943). Esses autores criaram o termo “reação afetiva de defesa” (*Affektiven Abwehrreaktion*) como denominação do conjunto de respostas produzidas pela estimulação da região perifornical do hipotálamo (PeF). A reação afetiva de defesa descrita por estes autores caracterizava-se por uma postura imóvel com o dorso arqueado, retração auricular, rosnar, silvar, exposição de garras e presas, piloereção e acentuada midríase, podendo culminar em fuga repentina ou ataque ao observador caso o estímulo fosse aumentado. Estas respostas eram idênticas ao comportamento defensivo de gatos face a um cão raivoso, sendo acompanhadas de intensa ativação simpática (Hess e

Brugger, 1943). Esses autores sugeriram que enquanto a fuga e a defecação eram manifestações típicas do “medo”, a postura agressiva imóvel seria uma manifestação da “raiva”. Cabe salientar, no entanto, que os pacientes de pânico não são indivíduos tipicamente agressivos (Cassano e Savino, 1993).

Posteriormente, Fernandes de Molina e Hunsperger (1962) forneceram o primeiro esboço do sistema cerebral de defesa centrado na a matéria cinzenta periaquedutal (MCPA). De acordo com estes autores, o sistema de defesa de gatos compreenderia duas zonas centrais, a região PeF e a MCPA, que controlariam a agressão defensiva. Estes núcleos seriam envolvidos por uma zona mais difusa, estendendo-se da área pré-óptica ao mesencéfalo caudal, que controlaria a resposta de fuga. Contudo, enquanto os comportamentos de defesa produzidos pela estimulação das estruturas rostrais eram abolidos pela lesão da MCPA, os comportamentos produzidos pela estimulação da MCPA não eram afetados pela lesão do hipotálamo ou da amígdala.

A estrutura da MCPA varia pouco entre mamíferos. A aparência indiferenciada dessa estrutura e sua relativa estabilidade evolutiva sugerem que ela esteja envolvida em funções importantes de proteção e na regulação homeostática (Carrive, 1993). Informações ascendentes e descendentes convergem na MCPA. Esta região recebe aferências diretas da medula espinhal e do núcleo do trigêmeo, o que indica um papel no processamento de estímulos somatossensoriais, provavelmente de natureza nociceptiva. Além disso, esta estrutura está conectada a uma série de regiões prosencefálicas que estão relacionadas ao comportamento emocional, como por exemplo, o córtex, amígdala, núcleo intersticial da estria terminal (NIET) e hipotálamo. Tais conexões sugerem que a MCPA participe na expressão dos estados emocionais. De fato, estudos neurofuncionais apontaram o

envolvimento da mesma na analgesia e no comportamento defensivo (Carrive, 1993).

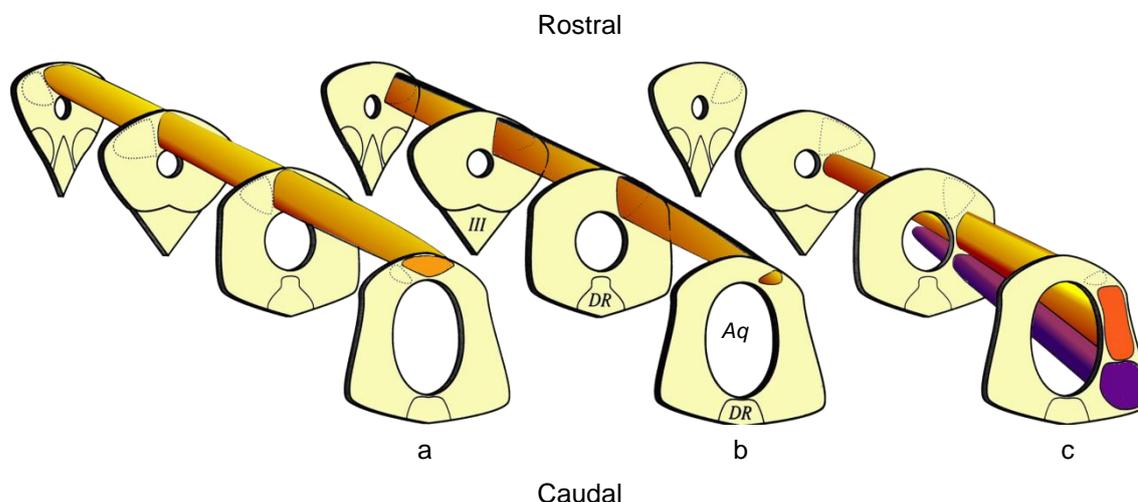


Figura 1. Organização colunar rostro-caudal da MCP. As figuras ilustram as colunas: (a) dorsomedial, (b) dorsolateral, (c) lateral (coluna superior) e ventrolateral (coluna inferior). (Aq) Aqueduto cerebral, (DR) núcleo dorsal da rafe, (III) núcleo óculo-motor.

A MCPA de gatos e ratos é organizada em colunas morfofuncionais dispostas ao longo do aqueduto, quais sejam, colunas dorsomedial (MCPAdm), dorsolateral (MCPAdl), lateral (MCPAl) e ventrolateral (MCPAvl), e cada uma dessas formam uma coluna longitudinal que varia ao longo do eixo rostrocaudal. A organização colunar da MCPA foi confirmada em humanos (Parvizi *et al.*, 2000). A marcação neuronal pela imunorreatividade da enzima sintetase do óxido nítrico (NOs) delimita a MCPAdl. Em níveis mais caudais, quando a MCPA assume uma forma trapezoide, a população de neurônios sensíveis a NOs se torna mais reduzida, dando espaço para a MCPAvl (Onstott *et al.*, 1993) (Figura 1). A distinção entre as colunas lateral e ventrolateral é baseada em observações fisiológicas e comportamentais. Enquanto a ativação dos neurônios laterais aumenta a atividade autonômica (simpática) e somatomotora, a ativação dos neurônios da coluna ventrolateral resulta numa resposta inversa (Bandler *et al.*, 1991; Carrive, 1993;

Morgan e Carrive, 2001). Usualmente, as colunas lateral, dorsolateral e dorsomedial são denominadas como a MCPA dorsal (MCPAd) e a coluna ventrolateral como MCPA ventral (MCPAv) (Keay e Bandler, 2004). A distinção entre cada uma destas colunas será feita sempre que necessário, caso contrário, utilizaremos as denominações MCPAd e MCPAv.

Embora o núcleo dorsal da rafe (NDR) não seja considerado como uma parte intrínseca da MCPA, ele situa-se na região ventromedial ao aqueduto e origina um grande contingente de projeções serotoninérgicas ascendentes tanto para a MCPA e amígdala, quanto para amplas áreas do prosencéfalo, incluindo o estriado e córtex pré-frontal (CPF) (Kosofsky e Molliver, 1987).

Embora a MCPA seja atualmente subdividida em colunas funcionais dispostas ao longo do aqueduto (Carrive, 1993), dados de nosso laboratório demonstraram que os comportamentos de congelamento e fuga podem ser obtidos mediante pequenas variações da intensidade de um estímulo aplicado por meio de um único eletrodo na MCPAdI ou MCPAI (Schenberg *et al.*, 2001; Sudré *et al.*, 1993; Vargas *et al.*, 2000). Assim, enquanto os estímulos de baixa intensidade induzem a reação de congelamento (*freezing behavior*), qual seja, uma postura de imobilidade tensa, acompanhada de exoftalmia e, menos frequentemente, defecação e micção, intensidades maiores induzem a reação de fuga caracterizada pelas respostas de trote, galope e salto. Estas observações foram confirmadas estimulando-se a MCPAd por meio da variação da frequência de um pulso de intensidade reduzida e constante, ou variando-se a dose de N-metil-D-aspartato (NMDA) (Bittencourt *et al.*, 2004, 2005).

Os mecanismos subjacentes à ansiedade e ao pânico podem estar relacionados aos distúrbios do “sistema cerebral de defesa” que serve para evitar, ou reduzir o impacto dos eventos aversivos (Deakin e Graeff, 1991). Deakin e Graeff sugeriram que enquanto as respostas de esquiva e congelamento a ameaças potenciais/distais foram devido à ativação do "circuito basolateral" compreendendo o CPF, o lobo temporal, amígdala e hipotálamo, a resposta de fuga a ameaças proximais/iminentes correspondem a ativação da MCPAd. Ainda, eles sugeriram que enquanto o pânico situacional era provavelmente devido a ativação de todo o sistema cerebral de defesa, os AP espontâneos clinicamente relevantes eram devidos a ativação da MCPA na ausência de estímulos incondicionados. As formas patológicas do medo (fobias) e ansiedade antecipatória também foram associadas a disfunção na circuitaria basolateral. Embora as proposições tenham sido feitas, em sua maioria, em considerações filogenéticas e neuroanatômicas, elas também foram inspiradas nos estudos de LeDoux e colaboradores no papel central da amígdala no medo condicionado (para revisão, ver LeDoux, 2012) e de estudos etofarmacológicos dos comportamentos defensivos de ratos conduzidos por Blanchard *et al.* (1986). Deakin e Graeff (1991) também se basearam nos comportamentos de fuga do hipotálamo comparados àqueles evocados pela MCPAd (Schmitt *et al.*, 1986).

De fato, diversas evidências sugerem que a MCPAd possa ser o substrato neural dos AP em decorrência de uma enorme similaridade entre os AP e as respostas aversivas induzidas pela estimulação da MCPAd. Em homens, a estimulação elétrica desta estrutura (0-5 mm lateral ao aqueduto) produz ansiedade intensa, terror, pânico e sensação de morte iminente, acompanhados por dor difusa na face e no coração, ou dor torácica profunda, taquicardia (não correlacionada à

dor torácica), dispneia (apneia, respiração profunda), abertura dos olhos, sensação de calor ou frio, sensações vesicais e urgências de micção, e sensação de vibração da cabeça, face ou tórax (Nashold *et al.*, 1969).

Adicionalmente, estudos de tomografia por emissão positrônica (PET) demonstraram que o polo frontal do lobo temporal, a ínsula, o cerebelo e o teto do mesencéfalo, compreendendo as camadas profundas do colículo superior e a MCPAd, foram as únicas estruturas ativadas durante os AP induzidos por infusão endovenosa de LAC (Reiman *et al.*, 1989). É importante salientar que medo e ansiedade também foram relatados durante a estimulação elétrica de outras áreas do cérebro de homens, tais como o hipotálamo medial, a amígdala e o hipocampo (Chapman *et al.*, 1954; Heath, 1975). Entretanto, as respostas induzidas por estimulação da amígdala diferem daquelas da MCPAd por evocarem um amplo espectro de emoções, incluindo o prazer intenso, associadas a imagens vívidas e recordações do passado (Ervin *et al.*, 1969). Adicionalmente, embora Meletti *et al.* (2006) não tenham relatado respostas de prazer nos estímulos intracranianos na amígdala de pacientes submetidos a neurocirurgias, o desconforto relatados pelos pacientes estimulados intracranialmente diferem da sensação de morte iminente relatada por indivíduos que vivenciaram um AP. Contudo, contrastando à estimulação da amígdala e do hipotálamo medial em animais e humanos, a “raiva” não foi induzida pela estimulação da MCPAd em homens (Nashold *et al.*, 1969). De fato, pacientes de pânico não são tipicamente agressivos (Cassano e Savino, 1993).

Notavelmente, a resposta de galope induzida pela estimulação da MCPAd de ratos foi seletivamente atenuada por panicolíticos clinicamente eficazes administrados em doses e regimes similares aos empregados na terapia do TP (Schenberg *et al.*, 2002, 2001; Vargas e Schenberg, 2001). Assim, embora as

respostas defensivas induzidas por estimulação da MCPAd tenham sido indistintamente propostas como um modelo de AP (Deakin e Graeff, 1991; Gentil, 1988; Jenck *et al.*, 1995), as evidências farmacológicas sugerem que o a resposta de galope seja o melhor representante do AP no modelo de estimulação elétrica da MCPA (Schenberg *et al.*, 2001). A mediação dos AP pela MCPAd também é apoiada pelo estudo das respostas endócrinas à estimulação desta estrutura. De fato, como a ausência de ativação dos "hormônios do estresse" corticotrofina (ACTH), cortisol (CORT) e prolactina (PRL) é uma das características mais intrigantes dos AP (Hollander *et al.*, 1989a, 1989b; Levin *et al.*, 1987; Liebowitz *et al.*, 1984; Woods *et al.*, 1987, 1988), a demonstração de que esses hormônios não estão alterados nas respostas intensas de ativação emocional e exercício físico induzidas por estimulação da MCPAd (Schenberg *et al.*, 2008) foi de grande importância. Apesar de observações contrárias (Lim *et al.*, 2010), estes estudos foram corroborados recentemente por (Armini, 2012) utilizando uma arena de estimulação de 20 cm de diâmetro que suprimia o exercício muscular de ratos estimulados eletricamente. Neste sentido, é interessante notar que a exposição de ratos a estímulos ultrassônicos na frequência da vocalização de alarme desta espécie (22-kHz) ativa a MCPAd (possivelmente, via camadas profundas do cóliculo superior) e induz comportamentos de fuga acompanhados de taquicardia e aumento da temperatura corporal, sem alteração dos níveis de CORT (Klein *et al.*, 2010).

De forma similar ao observado nos modelos de pânico da estimulação da MCPAd e do labirinto-em-T elevado (Schenberg *et al.*, 2001; Zanoveli *et al.*, 2010), as respostas naturais de fuga de ratos e camundongos apresentam perfil farmacológico similar ao dos AP, sendo atenuadas pela administração crônica de panicolíticos, mas não de ansiolíticos (Griebel *et al.* 1996; Blanchard *et al.* 1997).

Por sua vez, o uso generalizado dos inibidores seletivos de recaptação de serotonina (ISRS) no tratamento do TAG, TP e depressão sugere o papel central da 5-HT nestes transtornos. Neste sentido, Deakin e Graeff (1991) propuseram que a serotonina (5-HT) exerce funções tanto excitatórias quanto inibitórias nos mecanismos de defesa processados em estruturas prosencefálicas (CPF e amígdala basolateral) e mesencefálicas (MCPAd), respectivamente. Estes autores postularam que enquanto as projeções serotonérgicas do NDR ao CPF, amígdala e hipotálamo facilitariam respostas de defesa análogas às da ansiedade (congelamento e fuga coordenada ou esquiva) que seriam eliciadas por ameaças distais ou potenciais, as projeções serotonérgicas à MCPA inibiriam as respostas explosivas de defesa (galope e salto) similares aos AP eliciadas pelas ameaças proximais ou iminentes. Consequentemente, os AP seriam devido ao funcionamento inadequado das projeções serotonérgicas do NDR à MCPA. Deakin e Graeff (1991) também propuseram que os eferentes serotonérgicos do núcleo mediano da rafe (NMnR) para o hipocampo seriam o substrato de um “sistema comportamental de resiliência” que separaria os afazeres do dia-a-dia dos eventos aversivos, permitindo que o indivíduo se adaptasse às situações de estresse. A elevação dos níveis de glicocorticoides durante o estresse prolongado resultaria na sub-regulação dos receptores 5-HT_{1A} do hipocampo, causando uma falha no “sistema de resiliência” e desencadeando a depressão. Do ponto de vista do presente estudo, a implicação mais importante desta teoria seria que a 5-HT facilita a ansiedade no CPF e amígdala, inibe o pânico na MCPAd e tem papel antidepressivo no hipocampo.

Como a hipótese de Deakin e Graeff (1991) sugere que as respostas condicionadas e incondicionadas de medo estariam relacionadas, respectivamente, ao TAG e TP, Graeff e colaboradores desenvolveram um modelo animal mais

naturalístico com o intuito de separar esses comportamentos (Graeff *et al.*, 1993; Viana *et al.*, 1994). Este novo modelo foi chamado de labirinto-em-T elevado (LTE) por ser basicamente uma alteração procedural do modelo estabelecido do labirinto-em-cruz elevado (LCE) (Handley e Mithani, 1984; Pellow *et al.*, 1985). Brevemente, enquanto no LCE os animais exploram livremente os braços abertos (inseguros) e fechados (seguros) do equipamento, no LTE as respostas de esquiva e fuga dos braços abertos que, supõe-se, correspondam à ansiedade e pânico, são analisadas separadamente pela exposição inicial dos ratos ao braço fechado ou aberto, respectivamente. Os experimentos com o LTE corroboraram a participação da MCPA na mediação do TP (Casarotto *et al.*, 2010; Ramos *et al.*, 2011; Roncon *et al.*, 2012; Silveira *et al.*, 2001; Soares *et al.*, 2010; Zangrossi *et al.*, 2001; Zanoveli *et al.*, 2010). Neste sentido, enquanto a 5-HT inibiria as repostas de fuga do braço aberto do LTE (pânico), ela aumentaria a latência no braço fechado (ansiedade).

Assim, apesar das respostas induzidas pela estimulação da MCPAd terem sido originalmente consideradas como um modelo de ansiedade em procedimentos de condicionamento operante (Graeff, 1988; Schenberg and Graeff, 1978), as respostas aversivas inatas induzidas pela estimulação da MCPAd vêm sendo propostas como um paradigma experimental dos AP (Deakin e Graeff, 1991; Gentil, 1988; Jenck *et al.*, 1995; Schenberg *et al.*, 2001). O isomorfismo dos AP e das respostas induzidas pela estimulação da MCPAd está ilustrado na Tabela 1.

Tabela 1. Isomorfismo dos AP e das respostas induzidas por estimulação da MCPAd em homens e ratos (referências, ver o texto).

	AP espontâneos ou induzidos por lactato em homens	Estimulação da MCPAd em homens	Estimulação da MCPAd em ratos
Sensações/comportamento	“bloqueio do andar” desejo de fugir intenso desconforto ansiedade severa pânico, terror sensação de morte iminente medo de ficar louco medo de perder o controle	n.d. interrupção do estímulo intenso desconforto ansiedade severa pânico, terror “medo de morrer” n.d. n.d.	congelamento fuga aversão --- --- --- --- ---
Respostas autonômicas	taquipneia hiperventilação dispneia sensação de asfixia taquicardia ¹ hipertensão n.d. sudorese n.d.	n.d. hiperventilação apneia respiração profunda taquicardia n.d. abertura dos olhos n.d. piloereção	taquipneia hiperventilação n.o. respiração profunda taquicardia hipertensão exoftalmia n.d. n.o.
Respostas neurológicas/ Parestesias	sensação de tremor dor torácica sensação de calor/frio tonteira n.d. n.d.	sensação de vibração dor torácica e no coração sensação de calor/frio n.d. entorpecimento dor facial medial	--- --- --- --- --- ---
Áreas cerebrais estimuladas ou ativadas	MCPAd, camadas profundas do colículo superior, amígdala (PET)	MCPAd e teto adjacente (0-5mm lateral ao aqueduto) (raio-x)	MCPAd, camadas profundas do colículo superior

¹Estudos recentes parecem contradizer o consenso anterior acerca da resposta taquicárdica; n.d. dado não disponível; n.o. dado não observado.

Além dos modelos de AP em animais (para revisão, ver Graeff e Zangrossi, 2010; Graeff, 2004; Graeff *et al.*, 1996; Schenberg *et al.*, 2001, 2010), existem evidências de que o teste simulado de falar em público (TSFP) (McNair *et al.*, 1982) mobiliza as estruturas do pânico em humanos. Deakin e Graeff (1991) sugeriram que este teste induz medo espécie-específico similar às respostas defensivas às ameaças próximas/iminentes, recrutando os circuitos neurais que são ativados durante os AP. De fato, estudos farmacológicos mostraram que enquanto a ansiedade do período que precede o teste é reduzida pelos benzodiazepínicos

(BDZ), o medo durante o teste é resistente a estes agentes. Mais importante, o medo de falar em público foi afetado pelas drogas serotoninérgicas, um perfil similar ao observado no TP (Garcia-Leal *et al.*, 2005). É igualmente notável a observação de que os níveis salivares e plasmáticos de CORT e PRL não foram aumentados durante a execução do TSFP, ocorrendo o contrário durante a ansiedade antecipatória que precede a execução da tarefa (Garcia-Leal *et al.*, 2010).

Alternativamente, Klein (1993) sugeriu que os AP sejam alarmes falsos de sufocamento. Ele argumentou que esta hipótese é consistente com a hipersensibilidade dos pacientes de pânico ao LAC e CO₂, à ocorrência dos AP durante o relaxamento e o sono, ao aumento da frequência dos AP durante o transtorno disfórico da fase lútea tardia e, contrariamente, sua redução na gravidez, parto e lactação. De fato, os AP induzidos por baixas concentrações de CO₂ (5-7%) e LAC (0,5 M) permanecem como o melhor modelo clínico de AP, uma vez que não são precipitados em indivíduos sadios (Klein, 1993; Pitts e McClure, 1967) ou em pacientes com transtorno obsessivo-compulsivo (Griez e Schruers, 1998), fobia social (Liebowitz *et al.*, 1985b) e, menos certamente, TAG (Lapierre *et al.*, 1984). Além disso, enquanto os AP induzidos por CO₂ e LAC são bloqueados pelo tratamento crônico com antidepressivos tricíclicos (Gorman *et al.*, 1997; Liebowitz *et al.*, 1985a; Rifkin *et al.*, 1981; Woods *et al.*, 1990; Yeragani *et al.*, 1988), a β -carbolina e a ioimbina induzem AP em sujeitos saudáveis que são bloqueados por baixas doses de diazepam, mas não pelos tricíclicos (Dorow *et al.*, 1983; Klein, 1993). Portanto, segundo esta teoria, os AP seriam disparos mal adaptativos de um sistema de alarme de sufocamento.

Evidências pré-clínicas do nosso laboratório sugerem que a MCPA também esteja envolvida nas respostas comportamentais ao sufocamento proposto

por Klein (1993). Assim, Schimitel *et al.* (2012) mostraram que os sinais de hipóxia produzidos pela estimulação seletiva dos quimiorreceptores por doses subletais de cianeto de potássio (KCN) produzem comportamentos de defesa similares àqueles da estimulação elétrica ou química da MCPAd. Mais importante, enquanto doses subliminares de KCN potenciaram as respostas de defesa à estimulação elétrica da MCPAd, a lesão desta estrutura aboliu as respostas de defesa à administração isolada do KCN. Embora a exposição ao CO₂ (8% e 13%), isoladamente, tenha inibido os comportamentos de defesa eliciados pela estimulação da MCPAd, a exposição ao CO₂ potenciou as respostas de fuga induzidas pela administração de KCN. Os autores concluíram que a MCPAd abriga um sistema de alarme de sufocamento sensível à anóxia, cuja disfunção desencadearia os AP e tornaria os indivíduos hipersensíveis ao CO₂. Este estudo também sugere que o mecanismo fundamental do sistema de alarme de sufocamento esteja relacionado à hipóxia, e não à hipercapnia. Em todo caso, estes resultados são evidências importantes do envolvimento da MCPAd nos comportamentos de defesa ao sufocamento (Schimitel *et al.*, 2012). Por fim, estes autores sugeriram que os AP do tipo respiratório e não-respiratório sejam devido ao disparo errôneo dos sistemas de alarme de predação e sufocamento localizados na MCPAl e MCPAdl, respectivamente.

Uma alternativa à proposta da MCPA como substrato neural responsável pela gênese dos AP é defendida por Shekhar e colaboradores. Esses pesquisadores desenvolveram um modelo de TP em ratos com deficiência de ácido γ -aminobutírico (GABA) no hipotálamo dorsomedial/perifornical (HDM/PeF). Estes autores mostraram que a administração crônica de um inibidor da descarboxilase do ácido glutâmico (alilglicina) no HDM/PeF torna os ratos sensíveis tanto à infusão endovenosa de LAC (0,5 M), (Johnson e Shekhar, 2006; Shekhar e Keim, 1997;

Shekhar *et al.*, 1996) quanto à inalação ou CO₂ (7.5%) (Fitz *et al.*, 2003; ver revisão de DiMicco *et al.*, 2002), apresentando respostas comportamentais, autonômicas, respiratórias e endócrinas similares ao pânico. Estudos adicionais mostraram que as respostas induzidas pelo LAC são bloqueadas por antagonistas de receptores glutamatérgicos ionotrópicos ou metabotrópicos no HDM, e por microinjeções de tetrodotoxina no órgão vascular da lâmina terminal (OVLT), mas não no PeF (Shekhar e Keim, 1997). Adicionalmente, as respostas induzidas por LAC em ratos predispostos ao pânico foram facilitadas pela injeção periférica de ioimbina (Shekhar *et al.*, 2006, 1999), mas bloqueadas por alprazolam (Shekhar e Keim, 2000).

Contudo, estudos recentes de Shekhar e colaboradores levantaram dúvidas sobre a homologia do modelo da deficiência gabaérgica do HDM/PeF em relação aos AP de humanos. Por exemplo, Johnson e Shekhar (2006) observaram que enquanto os efeitos do LAC foram facilitados por microinjeções de angiotensina II no HDM/PeF, eles foram atenuados pelos antagonistas da angiotensina II, saralasin (não seletivo) e losartana (seletivo tipo-1). Johnson e Shekhar (2006) concluíram que o LAC ativa projeções angiotensinogênicas do OVLT para neurônios no HDM/PeF que, por sua vez, projetam-se para o NIET e núcleo central da amígdala (ACe), que mediarão os comportamentos ansiosos, e para núcleos autonômicos e respiratórios, que mediarão as respostas viscerais típicas dos AP.

Posteriormente, Johnson *et al.* (2009) mostraram que as respostas induzidas por LAC foram bloqueadas tanto por um antagonista do receptor de orexina-1 quanto pelo silenciamento do gene deste peptídeo. No seu conjunto, estes últimos estudos sugerem que as respostas induzidas por LAC em ratos predispostos ao pânico foram mediadas pelos peptídeos angiotensina e orexina, com funções bem definidas na sede (Antunes-Rodrigues *et al.*, 2004), alimentação (Rodgers *et*

al., 2002) e, no caso da orexina, vigília (Siegel, 1999; Taheri *et al.*, 2002). Surpreendentemente, esses autores mostraram que os comportamentos tipo-pânico também foram produzidos por infusão endovenosa de cloreto de sódio (NaCl) 0,5M. Como a infusão de D-manitol hipertônico não eliciou as respostas tipo-pânico, eles concluíram que os AP resultam da ativação de vias sensíveis ao aumento da concentração de sódio, mas não de lactato.

Contudo, enquanto Kellner *et al.* (1998) relataram que nem os pacientes com TP, nem os controles sadios apresentaram qualquer AP à infusão intravenosa de uma solução de NaCl (2.5%) isosmótica à solução de LAC 0,5 M, Peskind *et al.* (1998) induziram AP nos pacientes, mas não nos controles, pela administração endovenosa de uma solução similar de NaCl (3%). Assim, cabe investigar se a angiotensina II e/ou orexina têm algum papel específico nos AP ou se medeiam estados ansiosos secundários à sede, ou fome, induzidos pela administração de LAC ou NaCl.

Ainda, estudos recentes de nosso laboratório mostraram que enquanto a estimulação elétrica do HDM com pulsos de onda de alta resolução e intensidade variável elicia todas as respostas de defesa no rato (incluindo os comportamentos galope e salto), estímulos elétricos de frequência variável produziram somente exoftalmia na porção difusa do HDM (HDMd) ou exoftalmia, imobilidade, defecação e micção na porção compacta HDM (HDMc) (Alves, 2007). As últimas respostas também foram observadas após a estimulação química no HDMd com NMDA, a qual tem menor resolução espacial que a estimulação por variação da frequência de um pulso elétrico de intensidade reduzida. No entanto, na presença de alimentos, tanto as estimulações elétrica quanto química do HDMd eliciaram um robusto comportamento ingestivo, dose e intensidade dependentes, em ratos saciados.

Contrariamente, todo o repertório do comportamento defensivo dos ratos, incluindo a resposta de galope e salto, foi produzido em três ratos nos quais o eletrodo foi inadvertidamente implantado na divisão dorsomedial do hipotálamo ventromedial (VMHdm) (Alves, 2007). Esses dados sugerem que os comportamentos defensivos induzidos pela estimulação do HDMd foram provavelmente devidos à difusão da corrente para o VMHdm. De fato, a estimulação elétrica do VMH produz tanto comportamentos defensivos como AP em ratos (Blanchard *et al.*, 2005) quanto em humanos (Wilent *et al.*, 2010), respectivamente.

Contudo, a mediação dos AP pela MCPA também é apoiada pelos estudos sobre os correlatos endócrinos das respostas de defesa induzidas pela estimulação elétrica desta estrutura. A teoria do estresse de Hans Selye (Selye, 1936, 1950) teve um impacto enorme na prática médica e suas implicações foram intensivamente debatidas por quase um século. A marca fundamental da teoria é o conceito de inespecificidade da "reação de alarme", isto é, a ativação do eixo HHA que se segue à exposição aguda do organismo a uma variedade de estressores, tanto físicos quanto psicológicos. Estudos posteriores mostraram que outros eixos hipotalâmicos-hipofisários também respondem ao estresse. Particularmente, demonstrou-se que a PRL é consistentemente liberada em resposta a um grande número de estressores (Dijkstra *et al.*, 1992; Neill, 1970; Siegel *et al.*, 1980). Conseqüentemente, a demonstração da ausência de ativação de respostas do eixo HHA e da PRL após o estresse psicológico inquestionável de um AP aparece como um dos fatos mais intrigantes da psiquiatria contemporânea (Hollander *et al.*, 1989a, 1989b; Levin *et al.*, 1987; Liebowitz *et al.*, 1984; Woods *et al.*, 1988, 1987). De fato, numa revisão sobre este tópico, Graeff *et al.* (2005) concluíram que nem os AP da vida real, nem aqueles precipitados por panicógenos naturais (LAC e CO₂) ativam o

eixo HHA. Contrariamente, panicógenos não seletivos que produzem ansiedade antecipatória (ou estimulam o hipotálamo e a hipófise diretamente) aumentam a secreção dos hormônios do estresse. Mais importante, a ausência de respostas neuroendócrinas nos AP fornece uma pista preciosa para a compreensão do substrato neural destes ataques. De fato, dados recentes do nosso laboratório mostraram que os “hormônios do estresse” (ACTH, CORT e PRL) não estão alterados nas respostas intensas de ativação emocional e exercício físico induzidas por estimulação da MCPAd (Schenberg *et al.*, 2008). Ao contrário, estimulações químicas no HDM em ratos elevaram os níveis plasmáticos de corticotrofina (ACTH) e CORT em 600% e 80%, respectivamente (Zaretskaia *et al.*, 2002), tornando improvável o envolvimento do HDM na gênese dos AP. Contudo, Lim *et al.* (2011) observaram aumentos expressivos (200%) da CORT 30 min. após a respostas de fuga induzida por estimulação da MCPAd. Como os últimos resultados podem ter sido devidos ao exercício muscular, Armini (2012) avaliou as respostas hormonais à estimulação da MCPA em ratos confinados num cilindro de 20 cm de diâmetro e altura. O confinamento suprime as respostas de trote e galope que seriam observadas com a mesma intensidade de estimulação numa arena com 60 cm de diâmetro (Schenberg *et al.*, 2005). Contrariamente ao observado na arena tradicional, a estimulação da MCPA de ratos confinados com a intensidades limiar de fuga da arena tradicional não causou aumento algum dos níveis plasmáticos de lactato, confirmando a ausência de exercício muscular. Mais importante, tampouco foram observadas respostas dos hormônios do estresse, corroborando os estudos clínicos anteriores. Estes resultados são indícios convincentes do envolvimento da MCPAd na gênese dos AP.

Serotonina e Pânico

No início dos anos 90, Deakin e Graeff (1991) propuseram que as projeções serotoninérgicas ascendentes evoluíram como um sistema especializado no controle dos estados aversivos. Esta hipótese baseou-se tanto no reconhecimento precoce da importância crescente dos ISRS na terapia dos transtornos depressivos e ansiosos, quanto na longa tradição de pesquisa destes autores sobre as funções comportamentais da 5-HT.

Embora os ISRS tenham se tornado as drogas de primeira escolha no tratamento da maioria dos transtornos do humor e ansiedade, o sistema serotoninérgico é extremamente complexo, possuindo 14 tipos de receptores descritos até o momento, localizados pré- ou pós-sinapticamente, ou em ambas as estruturas. Além disto, a ativação destes receptores pode produzir efeitos opostos, dificultando a compreensão do papel deste sistema nos transtornos do humor e ansiedade (Hoyer *et al.*, 2002).

As primeiras evidências sobre o envolvimento da 5-HT na ansiedade foram obtidas em animais de laboratório submetidos a testes de conflito. Verificou-se que antagonistas ou depletors da 5-HT liberavam o comportamento alimentar suprimido por choque, efeito idêntico àquele dos ansiolíticos sinérgistas do GABA, tais como o etanol, barbitúricos e, principalmente, benzodiazepínicos (BDZ). Contrariamente, drogas que aumentavam a neurotransmissão serotoninérgica acentuaram a supressão comportamental (Graeff e Schoenfeld, 1970). De fato, estes autores mostraram que a α -metiltriptamina, um agonista do receptor da 5-HT, facilitou a supressão, enquanto a administração de antagonistas, metisergida e ácido bromolisérgico, liberaram o comportamento punido. Como os BDZ reduzem a taxa de renovação de 5-HT, Stein e colaboradores (Wise *et al.*, 1972, 1973) sugeriram

que este neurotransmissor era o mediador da punição e inibição comportamental em testes de conflito.

As vias serotoninérgicas ascendentes originam-se nos núcleos da rafe do mesencéfalo e se projetam para as estruturas corticais e límbicas do cérebro anterior, bem como para a MCPAd. Segundo o modelo teórico desenvolvido por Wise *et al.* (1972, 1973), a 5-HT inibiria o comportamento punido através da estimulação das estruturas periventriculares e MCPA, produzindo efeitos ansiogênicos. Ao contrário, a noradrenalina (NE) inibiria estas estruturas e teria efeitos gratificantes (Figura 2).

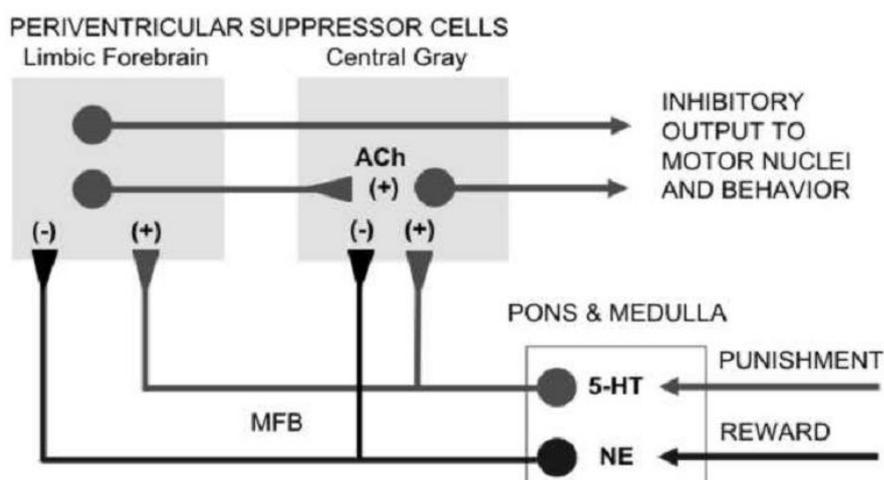


Figura 2. Diagrama ilustrando o presumível papel da serotonina (5-HT) e noradrenalina (NE) no modelo de punição de Wise *et al.* (1973). De acordo com estes autores, os sinais de reforço positivo liberam o comportamento controlado por neurônios colinérgicos (ACh) nas áreas de supressão periventricular, através das projeções noradrenérgicas do *locus coeruleus*. Por sua vez, os sinais de punição aumentam a supressão comportamental pela ativação dos neurônios serotoninérgicos dos núcleos da rafe. MFB, feixe prosencefálico medial (Schenberg, 2010).

Inesperadamente, no entanto, Schenberg e Graeff (1978) mostraram que a ciproptadina, um antagonista de receptores 5-HT_{2A/2C}, facilitava a resposta de fuga (por pressão à barra) à estimulação aversiva da MCPAd. O caráter aversivo da estimulação foi confirmado pelo efeito oposto de doses não sedativas de clordiazepóxido, que aumentaram as latências de fuga, ou até mesmo bloquearam

estas respostas. Estudos nos quais ratos foram treinados a apertar uma barra para reduzir a intensidade da estimulação na MCPAd em 5% (fuga decremental) levaram a resultados similares (Kiser e Lebovitz, 1975; Kiser *et al.*, 1978, 1980). Assim, a fuga decremental foi atenuada tanto pelo precursor da síntese de 5-HT (5-hidroxitriptofano) quanto pelo inibidor da recaptção (clomipramina) deste. Efeitos similares foram observados pela estimulação do NDR (Kiser *et al.*, 1980). No conjunto, estes resultados sugeriram que a 5-HT tem efeitos anti-aversivos na MCPAd.

Para explorar o modo de ação da 5-HT mais diretamente, Graeff colaboradores conduziram uma série de experimentos com ratos implantados com quimitrodos que permitiam a estimulação elétrica concomitantemente à administração de drogas na MCPAd. Os animais eram colocados em uma caixa de vaivém (*shuttle-box*) e a intensidade da corrente era gradualmente aumentada até que o rato apresentasse uma resposta de fuga para o compartimento oposto da caixa, desligando a estimulação intracraniana, considerando-se como o limiar aversivo a intensidade que produzisse sete fugas em dez tentativas (I_{70}). Após isso, a droga era microinjetada na MCPAd e, dez minutos após, registrava-se seus efeitos sobre o limiar aversivo (Graeff e Zangrossi, 2010; Graeff, 2004; Nogueira e Graeff, 1995). Usando este procedimento, estes autores mostraram que enquanto a aplicação de 5-HT ou seus agonistas 5-MeODMT (5-metoxi-N,N-dimetiltriptamina) e DOI aumentavam os limiares aversivos de maneira dose-dependente, a administração de antagonistas, tais como metergolina e quetanserina, facilitavam a resposta de fuga. Contrariamente, a aplicação do mCPP, um agonista preferencial de receptores 5-HT_{2C}, foi ineficaz. Portanto, estes autores sugeriram que o efeito antiaversivo da 5-HT na MCPAd era mediado pelos receptores 5-HT_{2A}. Estudos

adicionais com agonistas de receptores 5-HT_{1A} (8-OH-DPAT e ipsapirona) sugeriram seu envolvimento nos efeitos antiaversivos da 5-HT. Como os efeitos do 8-OH-DPAT e DOI foram bloqueados por antagonistas de receptores 5-HT_{1A} (NAN190) e 5-HT_{2A} (espiperona), Graeff e colaboradores concluíram que a fuga à estimulação da MCPAd era modulada por ambos os tipos de receptores (Graeff, 2012, 2004; Graeff *et al.*, 1996).

O LTE também tem sido utilizado para avaliação do papel da 5-HT nos comportamentos aversivos. Enquanto alguns estudos com LTE mostraram que a microinjeção de 5-HT na MCPAd afeta ambas as respostas do LTE (de Paula Soares e Zangrossi, 2004), outros apresentaram evidências de que os receptores 5-HT_{2C} na MCPAd estão preferencialmente envolvidos na regulação da ansiedade (esquiva inibitória), mas não no pânico (resposta de fuga) (Yamashita *et al.*, 2011). Adicionalmente, enquanto a fuga do braço aberto foi inibida tanto pela administração sistêmica como intracerebral de drogas que aumentam a ação da 5-HT, incluindo os antidepressivos eficazes na terapia do TP, ela foi facilitada pelos peptídeos panicogênicos CCK e CCK-4 administrados por via sistêmica e na MCPAd, respectivamente. Notavelmente, o efeito panicolítico dos antidepressivos no LTE também foi antagonizado pelo pré-tratamento com um bloqueador de receptor 5-HT_{1A} na MCPAd (Zanoveli *et al.*, 2010).

No que se diz respeito à esquiva inibitória, de Paula Soares e Zangrossi (2004) mostraram que os receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} têm funções opostas na MCPAd. Assim, enquanto a ativação do primeiro teve um efeito ansiolítico, inibindo a aquisição da esquiva ao braço aberto, a ativação do segundo teve efeitos ansiogênicos. Estes autores também apresentaram evidências de que os receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} medeiam a ação inibitória da 5-HT na

resposta de fuga do braço aberto, seja por uma ação inibitória nos neurônios de projeção da MCPAd, ou por uma ação excitatória em interneurônios inibitórios, tal como foi sugerido por (Brandão *et al.*, 1991).

A sensibilidade do LTE aos receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} também foi intensificada pela administração crônica por 21 dias, mas não aguda, de panicolíticos tanto serotoninérgicos (antidepressivos) como benzodiazepínicos (alprazolam) (Graeff, 2012, 2004; Pinheiro *et al.*, 2008). Adicionalmente, microinjeções de antagonistas dos receptores 5-HT_{1A/2A} na MCPAd de ratos submetidos ao LTE mostraram o envolvimento destes receptores na facilitação da esQUIVA inibitória (ansiedade, receptor 5-HT_{2A}) e inibição da fuga do braço aberto (pânico, receptores 5-HT_{1A/2A}) (Pobbe e Zangrossi, 2005). Similarmente, as microinjeções na MCPAd de quetanserina e do SDZ-SER-082, antagonistas preferenciais de receptores 5-HT_{2C}, não tiveram efeito algum nos comportamentos de fuga ou esQUIVA inibitória (de Paula Soares e Zangrossi, 2004). Estes resultados sugerem que os receptores serotoninérgicos na MCPAd tenham um papel na regulação, mas não na geração, destes comportamentos. Esta função regulatória é executada pelo recrutamento de diferentes subtipos de receptores dependendo da tarefa defensiva a ser desempenhada. Mais especificamente, enquanto os receptores 5-HT₂ da MCPAd medeiam os efeitos facilitatórios da esQUIVA inibitória (5-HT_{2C}) e inibitórios da fuga do braço aberto (5-HT_{2A}), os receptores 5-HT_{1A} parecem estar preferencialmente envolvidos na regulação da última resposta (Pobbe e Zangrossi, 2005). Além dos efeitos das drogas serotoninérgicas na MCPAd, os estudos no LTE mostraram que a estimulação dos receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} da MCPAv produz efeitos ansiolíticos, prejudicando a aquisição da esQUIVA inibitória sem alteração do comportamento de fuga (de Paula Soares e Zangrossi, 2004).

Em humanos, estudos de neuroimagem mostraram anormalidades da neurotransmissão serotonérgica mesencefálica em pacientes com TP. O experimento mais pertinente foi conduzido por Maron *et al.* (2004), que avaliaram a densidade do transportador de membrana de 5-HT (5-HTT) no cérebro de pacientes com TP por meio de tomografia computadorizada por emissão de fóton (SPECT). Pacientes com TP apresentaram uma redução significativa da ligação do radioligante ao 5-HTT no mesencéfalo, lobos temporais e tálamo, quando comparados aos controles saudáveis. Contrariamente, pacientes sob tratamento tiveram índices normais de ligação no mesencéfalo e lobos temporais, mas não no tálamo no qual a taxa de ligação permaneceu reduzida. Os autores sugeriram que a redução na densidade do 5-HTT pode ter sido causada tanto por um déficit de 5-HT neuronal quanto por um processo compensatório para aumentar a disponibilidade de 5-HT sináptica. Como o déficit de 5-HTT no mesencéfalo e lobos temporais não foi observado nos pacientes tratados, ele pode estar relacionado aos sintomas clínicos. Por sua vez, a redução de 5-HTT no tálamo pode ser um indicador de ansiedade antecipatória devido ao aumento da sensibilidade interoceptiva (Graeff, 2012).

Adicionalmente, estudos *in vivo* de PET mostraram uma redução da ligação específica para receptores 5-HT_{1A} tanto na rafe mediana quanto nas regiões anterior e posterior do giro cingulado dos pacientes com TP (Neumeister *et al.*, 2004). Como a MCPAd recebe fibras serotonérgicas do NDR, estas anormalidades podem resultar em mudanças funcionais dos neurônios que controlam os comportamentos defensivos.

Estes e outros estudos adicionaram novas evidências da hipótese proposta por Deakin e Graeff (1991). A hipótese Deakin/Graeff (HDG) supõe que a 5-HT exerça um papel duplo na modulação dos mecanismos de defesa processados

por diferentes estruturas anatômicas. Esta hipótese originou-se com os estudos pioneiros de Schenberg e Graeff (1978), Kiser e Lebovitz (1975) e Kiser *et al.* (1978, 1980) e consolidou-se com estudos posteriores de Graeff e colaboradores (para revisão, ver Graeff, 2004).

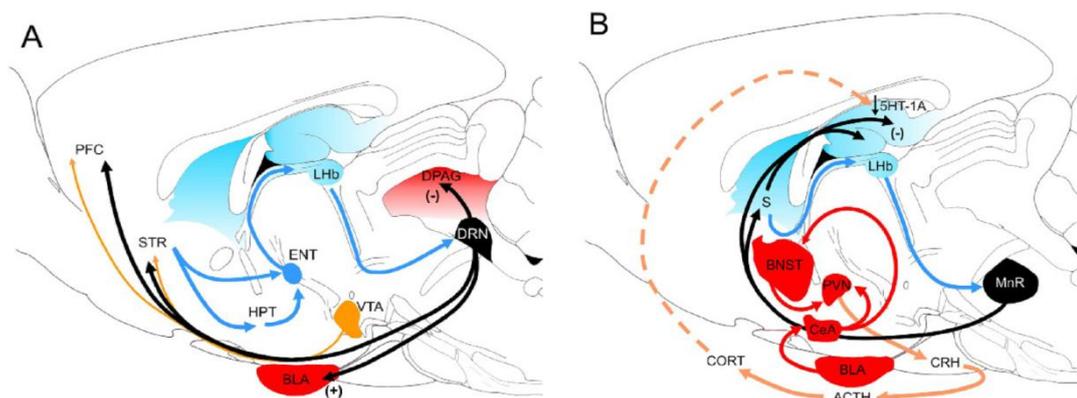


Figura 3. Modelo da hipótese de Deakin e Graeff no cérebro de rato: A) Deakin e Graeff (1991) sugeriram que enquanto o transtorno da ansiedade generalizada é produzido pela hiperatividade das projeções excitatórias 5-HT provenientes do núcleo dorsal da rafe (DRN) (setas pretas) para áreas do córtex pré-frontal (CPF) e amígdala (ABL), as quais processam ameaça distal, o ataque de pânico é uma disfunção das projeções inibitórias de 5-HT na matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPAd), desse modo liberando a resposta a ameaças proximais, medo inato ou anóxia. Por sua vez, o conflito da ansiedade é o resultado da atividade simultânea das projeções de 5-HT do NDR e das projeções dopaminérgicas provenientes da área tegmentar ventral (ATV), que se projetam para o estriado (STR), e medeiam os comportamentos de esquiva e aproximação, respectivamente. B) Deakin e Graeff (1991) também propuseram que as eferências 5-HT que se projetam do núcleo mediano da rafe (NMnR) ao hipocampo, sejam o substrato do "sistema de resiliência comportamental", que é responsável pelo equilíbrio dos eventos estressores das rotinas diárias. Neste modelo, os níveis aumentados de corticosterona (CORT) subregulariam os receptores 5-HT_{1A} no hipocampo, levando ao surgimento do desamparo aprendido e depressão. A habênula lateral (HbL) pode exercer um papel central na regulação prosencefálica nas atividades do NDR e do NMnR. ABL, amígdala basolateral; NIET, núcleo intersticial da estria terminal; ACe, amígdala central; CRH, hormônio liberador de corticotrofinas; HPT, hipotálamo; ENT, núcleo entopeduncular (pálido interno); PVN, núcleo paraventricular do hipotálamo; S, septum (Schenberg, 2010).

A HDG também se baseou nos estudos etológicos do casal Blanchard (Blanchard *et al.*, 1986), que elaboraram o conceito dos três níveis de defesa após análise das estratégias de defesa apresentadas por ratos selvagens diante de diferentes tipos de ameaças predatórias. O primeiro nível seria induzido por ameaça potencial, o animal depara-se com uma situação inédita, que pode envolver algum tipo de perigo, ou com uma situação onde vivenciou alguma ameaça no passado,

porém não se acha mais presente. Nestas circunstâncias, a reação de defesa apresentada é a exploração cautelosa (*risk assessment*). No segundo nível, o rato já identificou o predador, porém este se encontra a uma distância maior que um limite crítico. Neste caso, verifica-se inibição comportamental, culminando em imobilidade tensa ou “congelamento”. Finalmente, no terceiro nível de defesa, o predador se encontra a uma distância inferior ao limite crítico ou já estabeleceu contato com a presa, a qual reage com ataque ou fuga (Graeff, 2003).

Deakin e Graeff sugeriram que nos casos de ameaça potencial, projeções serotoninérgicas do NDR à amígdala e ao CPF facilitariam os comportamentos passivos de defesa (imobilidade e esquiva) tais como aqueles envolvidos na esquiva inibitória. Estes comportamentos seriam similares à ansiedade generalizada em humanos. Para isto, as projeções serotoninérgicas inibitórias do NDR à MCPAd inibiriam as respostas ativas da fuga, as quais estariam relacionadas ao pânico (Graeff e Zangrossi, 2010; Graeff, 2003, 2012; Pobbe e Zangrossi, 2005; Pobbe *et al.*, 2011). Considerando que as projeções 5-HT oriundas do NDR inervam tanto a amígdala como a MCPAd, Deakin e Graeff (1991) propuseram que a 5-HT facilita os comportamentos de defesa a ameaças próximas ou distantes, mediante efeitos excitatórios na amígdala, enquanto inibe a defesa proximal na MCPAd. O sentido adaptativo desta organização seria o de impedir reações intempestivas de fuga, que tornariam a presa mais conspícua, quando a ameaça fosse apenas potencial ou distal (Graeff, 2003). Uma das implicações clínicas mais importantes da HDG seria de que a 5-HT facilitaria a ansiedade, mas inibiria o pânico. Logo, enquanto o déficit de 5-HT na MCPAd poderia predispor o TP, a intensificação da neurotransmissão serotoninérgica desta região poderia estar implicada na ação antipânico dos medicamentos antidepressivos. Em suma, a

hipótese serotoninérgica da patofisiologia do TP propõe que pacientes de pânico possuem deficiência da inibição serotoninérgica nos neurônios localizados na MCPAd, estrutura que organiza reações defensivas para lidar com ameaças próximas ou iminentes (Graeff, 2012).

Além da função dupla da 5-HT nos comportamentos de pânico e ansiedade, Deakin e Graeff (1991) propuseram que os estados depressivos são devidos à sub-regulação de receptores 5-HT_{1A} no hipocampo, uma região que recebe uma proeminente inervação do NMnR. Neste modelo, o hipocampo é a estrutura central de um "sistema de resiliência comportamental" que separaria as tarefas do dia-a-dia dos eventos aversivos, permitindo o controle das situações estressantes (Figura 3). Esta hipótese baseia-se em achados anteriores mostrando que a os receptores 5-HT_{1A} do hipocampo são sub-regulados tanto pela exposição prolongada ao estresse (isolamento social) quanto pela administração de CORT. O déficit na neurotransmissão 5-HT_{1A} do hipocampo produzido pelos níveis elevados de corticoides do estresse prolongado seria a base do desenvolvimento tanto do desamparo aprendido (*learned helplessness*) de animais quanto da depressão em humanos. Os antidepressivos agiriam restaurando a neurotransmissão mediada pelo receptor 5-HT_{1A} (Deakin e Graeff, 1991).

Comorbidade: Ansiedade de Separação na Infância e Pânico

Os transtornos de ansiedade são uma das formas mais comuns de psicopatologia na juventude, com estimativas de prevalência variando entre 5% e 25% a nível mundial (Boyd *et al.*, 2000; Costello *et al.*, 2003; Essau *et al.*, 2000; Roza *et al.*, 2003; Wittchen *et al.*, 1998). Destes transtornos, a ansiedade de

separação na infância (ASI) (*childhood separation anxiety*) é o transtorno de ansiedade mais frequente da infância, responsável por quase 50% dos tratamentos de saúde mental de crianças (Bell-Dolan, 1995; Cartwright-Hatton *et al.*, 2006).

Segundo a definição do DSM-IV (APA, 2000), a ASI é caracterizada por uma "ansiedade excessiva decorrente da separação da casa ou daqueles em que o indivíduo tem apego". As crianças que apresentam sintomas de ASI tornam-se significativamente angustiadas quando separadas de sua casa ou da figura de apego (geralmente a mãe) e, muitas vezes, tomam medidas para evitar esta separação. Este medo é exibido por meio de uma preocupação desproporcional e persistente sobre a separação, incluindo o receio de que algum mal venha a acontecer aos pais, como exemplo o divórcio, caso a criança se ausente. A ASI é, portanto, agravada em casamentos litigiosos. Os comportamentos típicos de crianças que apresentam o transtorno da ASI são o apego excessivo aos pais e a recusa em participar de atividades que requerem separação (ir a escola, participar de acampamentos, dormir na casa de amigos, etc.).

Na sua forma mais grave, a ASI pode resultar numa recusa escolar severa, levando, conseqüentemente, a déficits significativos na educação e socialização da criança. Last *et al.* (1987) estimaram que aproximadamente 75% das crianças com ansiedade de separação apresentam alguma forma de recusa escolar. Estudos longitudinais indicam que este comportamento pode culminar em sérios problemas a curto prazo, tais como a queda no desempenho escolar, afastamento e isolamento dos amigos, bem como conflitos familiares (Kearney, 2006). Shear *et al.* (2006) destacaram também que a ansiedade de separação pode estar associada ao risco aumentado dos indivíduos que apresentaram ASI permanecerem solteiros ou vivenciarem, quando casados, problemas conjugais na vida adulta.

Outros sintomas comuns do transtorno de ansiedade de separação são as queixas somáticas. Crianças sintomáticas para ASI relatam dores de estômago e cabeça, bem como náuseas, mais frequentemente do que as crianças diagnosticadas com transtornos fóbicos (Last, 1991), por exemplo. Queixas somáticas ocorrem geralmente no contexto de situações de separação, podendo refletir tanto uma estratégia de evasão, chamando a atenção para si, ou um sintoma físico genuíno (Albano *et al.*, 1996; Tonge, 1994). Além de sintomas somáticos descritos, crianças com ASI têm, muitas vezes, dificuldades, ou mesmo se recusam a dormir quando a figura de apego não está presente (Black, 1995), ocasionando, em algumas circunstâncias, pesadelos sobre separação e prejuízo do sono (Francis *et al.*, 1987).

O transtorno de ansiedade de separação pode interferir não somente na criança que apresenta a psicopatologia, mas também nas figuras de apego e nos demais membros da família. As crianças podem apresentar ataques de fúria, se agarrando aos pais, se recusando a serem deixadas sozinhas face a situações de separação (Tonge, 1994). É comum encontrarmos pais que mudam a sua rotina, como dormir na cama da criança, não deixar o filho aos cuidados de outras pessoas e renunciar o tempo com seu cônjuge, a fim de satisfazer as vontades da criança e aliviar o seu sofrimento. Essas modificações podem levar à uma instabilidade entre todos os demais membros da família. Enquanto os parceiros geralmente se queixam da falta de tempo para com a figura de apego da criança, os irmãos comumente sentem ciúmes da atenção diferenciada que está sendo dada ao indivíduo sintomático. Além disso, o desenvolvimento de um vínculo muito mais estreito e dependente com a figura materna por crianças com ASI geralmente leva a um

comportamento de exclusão da figura paterna, desestabilizando a estrutura familiar (Bernstein e Borchardt, 1996).

A experiência de ansiedade de separação é, no entanto, um fenômeno normal que geralmente diminui à medida que a criança amadurece. Um diagnóstico de ASI só pode ser estabelecido quando a angústia da criança durante a separação é inadequada, levando em consideração a sua idade e nível de desenvolvimento (APA, 2000). Pesquisas sugerem que 4,1% das crianças exibem um nível clínico de ASI, e que, aproximadamente, um terço dos casos (36,1%) persistem na idade adulta se não houver um tratamento na infância (Shear *et al.*, 2006).

Estes estudos proporcionaram uma compreensão mais profunda da correlação e do curso destes transtornos, bem como do seu prognóstico (Brown e Barlow, 1992; Dunner, 2001; Goodwin, 2002; Kessler *et al.*, 1994). As considerações feitas por Klein (1980) foram baseadas em suas observações e nas teorias psicodinâmicas do apego ansioso (*anxious attachment*) de Bowlby (1973) que conferem um papel central à ansiedade de separação como um fator de risco para os transtornos de ansiedade na vida adulta. De acordo com os relatos da teoria do apego de Bowlby (1973), o relacionamento afetivo, íntimo e próximo, da mãe ou da figura-materna, na primeira infância (1 a 3 anos de idade), favorece o desenvolvimento de uma personalidade saudável. Ao contrário, a ausência do cuidado materno resultaria em ASI, levando ao desenvolvimento de apego ansioso (*anxious attachment*) e de “personalidade insegura” no adulto (Ainsworth e Bowlby, 1991; Bowlby, 1973; Bretherton, 1992), os quais seriam fatores predisponentes de diversos transtornos psiquiátricos, inclusive, fobia e pânico (Bowlby, 1973; Gittelman-Klein, 1995; Manicavasagar *et al.*, 2009). Qualquer que seja a via de desenvolvimento, a hipótese de que o TP e/ou agorafobia representem um conflito

não resolvido entre a autonomia e o apego baseados na ASI permanece como um dos postulados centrais na teoria do apego (Ruitter e van Ijzendoorn, 1992).

Em 1962, Klein e Fink ressaltaram uma alta correlação da ASI com TP e agorafobia na vida adulta, uma vez que 50% dos pacientes agorafóbicos relataram ASI severa que muitas vezes os impediram de comparecer à escola. De fato, Biederman *et al.* (2005) e Silove e Manicavasagar (1993) associaram ASI com um risco aumentado de desenvolver outros transtornos ansiosos e depressivos na adolescência e vida adulta, como pânico e agorafobia. Kagan *et al.* (1988) observaram que ao longo da vida dos pacientes com TP desenvolvem-se, primeiro, a ASI, seguida de fobia social na adolescência e TP na idade adulta. A eficácia do panicolítico imipramina na terapia de pacientes com ASI corroborou estas proposições (Bernstein *et al.*, 2000; Gittelman-Klein e Klein, 1973). Estas observações, juntamente com a teoria de apego e abordagens etológicas de ansiedade de Bowlby (1973), bem como as propostas estabelecidas por Klein (1980) e Margraf *et al.* (1986) impulsionaram o desenvolvimento das classificações dos transtornos de ansiedade no DSM-III (APA, 1980) e DSM-IV (APA, 2000) em relação aos transtornos de ansiedade.

De fato, Pine *et al.* (2000, 2005) mostraram que a hipersensibilidade respiratória à inalação de ar atmosférico enriquecido com 5% de CO₂ foi significativamente maior nas crianças com ASI e, em menor grau, no TAG, que nas crianças com fobia social. Ainda, as semelhanças na fisiologia respiratória de pacientes com ansiedade de separação e TP com agorafobia (Battaglia *et al.*, 1995; Silove *et al.*, 1995) corroboram a hipótese do alarme falso de sufocamento (Klein, 1993) e, sua extensão (Preter e Klein, 2008; Preter *et al.*, 2011) que sugere que o TP e a ASI estão relacionados a uma anormalidade dos mecanismos opióides

envolvidos tanto nos mecanismos respiratórios quanto nas relações parentais. De fato, Preter *et al.* (2011) mostraram que voluntários sadios pré-tratados com naloxona apresentaram respostas respiratórias similares aos ataques de pânico à infusão intravenosa de LAC. Os efeitos do LAC foram, no entanto, independentes de experiências estressantes na infância.

Notavelmente, o aumento da incidência do TP foi o único achado significativo de Rachel G. Klein (1995) no único estudo clínico de acompanhamento ao longo de 15 anos de 60 controles e 54 pré-adolescentes que apresentaram recusa escolar na infância. Este estudo tem especial importância na medida que foi baseado em entrevistas clínicas conduzidas por profissionais que desconheciam o histórico dos pacientes. Os resultados mostraram que o TP foi a única condição psiquiátrica estatisticamente significativa nos indivíduos adultos que sofreram de ASI (7% nos probandos versus 0% nos controles). Contudo, Gittelman-Klein (1995) também observou uma tendência ($p < 0,10$) para o desenvolvimento da depressão maior (DM) e uma incidência significativamente mais elevada de hospitalizações ($p < 0,02$) devidas, principalmente, a episódios depressivos dos probandos (14%) quando comparados aos controles (1,7%). De fato, pesquisas epidemiológicas das últimas décadas revelaram que os transtornos da ansiedade e do humor apresentam alta comorbidade (Brown *et al.*, 2001; Galatzer-Levy *et al.*, 2012; Hirshfeld-Becker *et al.*, 2012; Kendler, 1996). O início dos AP também é frequentemente precipitado pela separação, perda social, estresse familiar ou luto (Battaglia *et al.*, 1995; Faravelli e Pallanti, 1989; Kaunonen *et al.*, 2000; Klein e Fink, 1962; Klein, 1993; Milrod *et al.*, 2004).

Adicionalmente, Biederman *et al.* (2007) forneceram dados importantes sobre a correlação entre a ASI e TP. Em seu estudo, 233 crianças com riscos

variados para o TP e DM foram avaliadas. Embora o estudo realizado por Gittelman-Klein (1995) tenha apontado a correlação somente entre ASI e TP, com uma tendência para o quadro de DM, os resultados de Biederman *et al.* (2007) indicaram que os probandos com ASI têm um risco 9 vezes maior de desenvolver o TP e/ou agorafobia e 3 vezes maior de desenvolver DM. Contudo, as afirmações de que a ASI predispõe vários transtornos de ansiedade podem ser devidas a um diagnóstico ambíguo de AP com sintomas limitados ou à inconsistência dos métodos de entrevista (Preter and Klein, 2008).

Contrariamente, um estudo de acompanhamento conduzido por Aschenbrand *et al.* (2003) teve um resultado conflitante com os observados por Gittelman-Klein (1995). Naquele estudo, os pesquisadores reentrevistaram um grupo de crianças sete anos e meio após as mesmas terem completado o tratamento para transtornos previamente identificados como ASI, TAG e fobia generalizada. Contrariamente, no entanto, Aschenbrand *et al.* (2003) não observaram o aumento da incidência do TP em indivíduos diagnosticados com ASI, quando comparados àqueles com TAG e fobia generalizada. Contudo, um fator que pode ter diminuído a associação entre o TP e a ASI é a idade dos indivíduos entrevistados entre 9 e 13 anos. Assim, a maioria dos participantes ainda não tinha atingido a idade de risco para o TP (entre 20 e 30 anos) (APA, 2000).

Recentemente, Roberson-Nay *et al.* (2012) utilizaram a decomposição de Cholesky de dados epidemiológicos de gêmeos mono e dizigóticos adultos para verificar a influência dos fatores genéticos e ambientais tanto no desenvolvimento da ansiedade de separação e transtorno hiperansioso (*childhood overanxious disorder*) na infância quanto no desenvolvimento do TP na vida adulta. Este estudo mostrou que o mesmo conjunto de genes, é responsável por 40% da ASI e 35% do TP na

vida adulta. Surpreendentemente, no entanto, enquanto o ambiente compartilhado na infância contribuiu com 60% da ASI, ele foi responsável por apenas 1,2% dos ataques de pânico na vida adulta. Em contraste, o ambiente único da vida adulta contribuiu com 64% destes ataques. Estes autores também demonstraram que o transtorno hiperansioso da infância é determinado por genes distintos dos envolvidos na ASI e TP. No conjunto, este estudo sugere que genes específicos e ambiente da vida adulta explicariam 99% da variância dos ataques de pânico em jovens adultos.

Os resultados de Roberson-Nay *et al.* (2012) sobre os efeitos negligenciáveis do ambiente infantil no desenvolvimento do TP são, no mínimo, intrigantes em vista das evidências clínicas que apontam o estresse na infância como um dos fatores fundamentais no desenvolvimento deste transtorno (Battaglia *et al.*, 1995; Biederman *et al.*, 2005; Gittelman-Klein, 1995; Kagan *et al.*, 1988; Klein e Fink, 1962; Pine *et al.*, 2005, 2000; Silove e Manicavasagar, 1993; Silove *et al.*, 1995).

A influência do estresse infantil na etiologia do TP também foi sugerida por estudos pré-clínicos que mostraram que ratos submetidos ao isolamento social neonatal (ISN), um modelo de ASI, apresentam uma facilitação sexo-dependente das respostas respiratórias à hipóxia (machos) e hipercapnia (fêmeas) na vida adulta (Genest *et al.*, 2004, 2007a, 2007b). Mais importante, estudos originais de Quintino-dos-Santos (2011) mostraram que ratos submetidos ao ISN por 3 horas diárias ao longo de todo período de amamentação (20 dias) apresentaram reduções acentuadas dos limiares dos comportamentos de defesa para as respostas de imobilidade, exoftalmia, trote, galope e salto produzidos pela estimulação elétrica da MCPAd 45 dias após o desmame quando comparados aos irmãos da mesma

ninhada que não passaram pela privação materna (controle). Este estudo é a primeira evidência em animais da influência facilitatória da ASI nos ataques de pânico. Adicionalmente, estes dados sugerem que o ISN produz alterações permanentes dos circuitos intrínsecos ou eferentes da MCPAd, uma vez que os efeitos comportamentais foram observados 45 dias após o período de privação materna. Ainda, não foram encontradas diferenças entre os ratos isolados e controles com relação aos comportamentos ansioso e depressivo avaliados no LCE ou no teste da natação forçada (NF), respectivamente. Embora esses resultados corroborem observações similares de outros pesquisadores (Lehmann e Feldon, 2000; Shalev e Kafkafi, 2002), outros estudos apresentam dados contrários com relação aos comportamentos ansiosos e depressivos (Eklund e Arborelius, 2006; Greisen *et al.*, 2005). Os resultados contraditórios da literatura podem ter sido devidos à diversidade dos procedimentos de privação materna, principalmente, quanto ao modo da separação (isolamento de um único filhote ou de toda a ninhada), mas também quanto à duração, frequência e período pós-natal da separação materna, aos controles da temperatura e comunicação auditiva, visual, táctil ou olfativa com a mãe, e ao modo de criação (isolada ou agrupada) após o desmame, dentre outros fatores. De fato, enquanto períodos curtos (3-15 min) de separação materna reduziram as respostas comportamentais e endócrinas aos estressores na idade adulta (Meaney *et al.*, 1996, 1992), períodos prolongados (3-6 h) aumentaram estas respostas (Francis e Meaney, 1999; Plotsky e Meaney, 1993; van Oers *et al.*, 1998). Além do tempo de contato entre mãe e filhote (Meaney, 2001), existem outros fatores que podem influenciar nos resultados. Por exemplo, Hofer (1996) relatou que um pequeno “tapete” de pelo sintético foi a única variável que, isoladamente, reduziu a vocalização dos filhotes privados, dentre inúmeras

variáveis combinadas em complexidade crescente (textura, temperatura dos filhotes, do ambiente ou da mãe, propriedades de objeto substitutivo da mãe, etc.). Adicionalmente, a variabilidade dos resultados também pode ter sido devida à diversidade dos modelos de avaliação de ansiedade experimental (Lehman e Feldon, 2000).

Embora os estudos de ISN relatem tanto efeitos ansiogênicos do ISN (Lehmann e Feldon 2000; Shalev e Kafkafi, 2002), quanto sua ausência (Eklund e Arborelius, 2006; Greisen *et al.*, 2005; Quintino-dos-Santo, 2011), o ambiente pós-desmame também parece influenciar os efeitos comportamentais deste procedimento. Condições extremas, como isolamento social (alojamento individual) ou superlotação (aproximadamente 3,0 dm³/rato), por exemplo, promoveram comportamentos ansiosos e depressivos, bem como alteraram a resposta ao estresse na fase adulta (Brown e Grunberg, 1995; Maslova *et al.*, 2010; Weintraub *et al.*, 2010). Por outro lado, o enriquecimento do ambiente pelo alojamento em grupo, inserção de objetos variados e utilização de caixas maiores aumentou a interação social e tornou o animal mais resiliente às condições adversas (Konkle *et al.*, 2010). Não surpreendentemente, dados na literatura revelam uma grande variação na forma do alojamento dos animais entre os laboratórios. Enquanto alguns permanecem em grupos que variam entre quatro a cinco animais por gaiola (Maslova *et al.*, 2010), outros laboratório reportam o acondicionamento entre 2 e 3 ratos por caixa (Galler e Seelig, 1981).

A importância do enriquecimento para roedores utilizados em laboratório foi abordada inicialmente por Donald Hebb na década de 1940. Em suas observações, Hebb percebeu que os ratos mantidos como animais de estimação livres de confinamento tinham respostas melhores nos experimentos que envolviam

o aprendizado quando comparados àqueles animais que permaneciam nos alojamentos padrão de laboratório (Hebb, 1947). A partir de 1960, um número crescente de evidências mostraram que roedores criados em ambientes enriquecidos apresentavam uma grande plasticidade neural, quais sejam, neurogênese, arborização dendrítica, aumento do tamanho celular e melhora na memória e no aprendizado (Mohammed *et al.*, 2002; Petrosini *et al.*, 2009; Sale *et al.*, 2009). Este cenário teve grande importância em modelos animais de doenças neurodegenerativas, lesão cerebral e de transtornos psiquiátricos (Laviola *et al.*, 2008; Nithianantharajah e Hannan, 2006; Sale *et al.*, 2009; Solinas *et al.*, 2010; Will *et al.*, 2004).

De fato, resultados importantes acerca do alojamento de ratos no período pós-desmame estão presentes na literatura (para revisão, ver Simpson e Kelly, 2011). É conhecido que a exposição de ratos ao protocolo do ISN tem efeitos duradouros no desenvolvimento do controle respiratório (Cayetanot *et al.*, 2009; Kinkead *et al.*, 2009; Montandon *et al.*, 2008). Enquanto as duas primeiras semanas são vistas como sendo o período crítico no desenvolvimento do padrão respiratório da vida adulta (Bavis e Mitchell, 2008), a simples mudança na forma de alojamento dos ratos no período pós-desmame de duplas para tríades reverteu efeitos respiratórios desencadeados pelo ISN, sugerindo que a plasticidade deste sistema se prolonga por períodos maiores que os relatados na literatura (Fournier *et al.*, 2011, 2013). De um ponto de vista mais abrangente, estes dados corroboram dados clínicos em que a amamentação e o contato com a pele, os quais permitem uma maior proximidade entre a mãe e a criança, são interpretados como formas de enriquecimento que reduzem os riscos de instabilidades respiratórias associadas à

prematuridade (Blaymore Bier *et al.*, 1997; Ludington-Hoe *et al.*, 1998; Parmar *et al.*, 2009; Whitelaw *et al.*, 1988).

A explicação dos efeitos do agrupamento no padrão respiratório dos ratos adultos submetidos ao ISN pode residir no fato de que a produção, diferenciação e sobrevivência de neurônios são processos de alta plasticidade regulados por relações sociais. De fato, enquanto os estressores físicos ou sociais reduziram a neurogênese por meio da elevação dos níveis de CORT (Leuner e Gould, 2010; Schoenfeld e Gould, 2012), exposições ao exercício físico moderado (Van Praag *et al.*, 1999), aprendizado (Epp *et al.*, 2007; Gould *et al.*, 1999; Leuner *et al.*, 2004), experiência sexual (Leuner *et al.*, 2010), ambiente enriquecido (Kempermann *et al.*, 1997) e autoestimulação intracraniana (Takahashi *et al.*, 2009) aumentaram a neurogênese no giro denteado hipocampal (DG) a despeito dos efeitos contrários do aumento do nível de glicocorticoides em vários destes procedimentos (Burgess *et al.* 1993; Droste *et al.* 2003; Mirescu & Gould 2006; Harrison *et al.* 2009; Waldherr *et al.* 2010). Embora os agentes destas alterações permaneçam em grande parte desconhecidos, a ocitocina é um provável candidato. De fato, sua liberação em algumas situações de recompensa parece ter um importante papel na proliferação neuronal no DG (Devries *et al.*, 2003; Leuner *et al.*, 2012; Ross e Young, 2009).

A neurogênese no cérebro maduro é uma forma excepcional de plasticidade na qual os neurônios são produzidos e selecionados em regiões específicas no cérebro de mamíferos (Ming e Song, 2011). As duas principais áreas onde ocorrem a neurogênese são a zona subventricular que reveste os ventrículos cerebrais e dá origem aos precursores neuronais que migram para o bulbo olfativo e

a zona subgranular que reveste o DG e dá origem às células granulares do DG (Ming e Song, 2011).

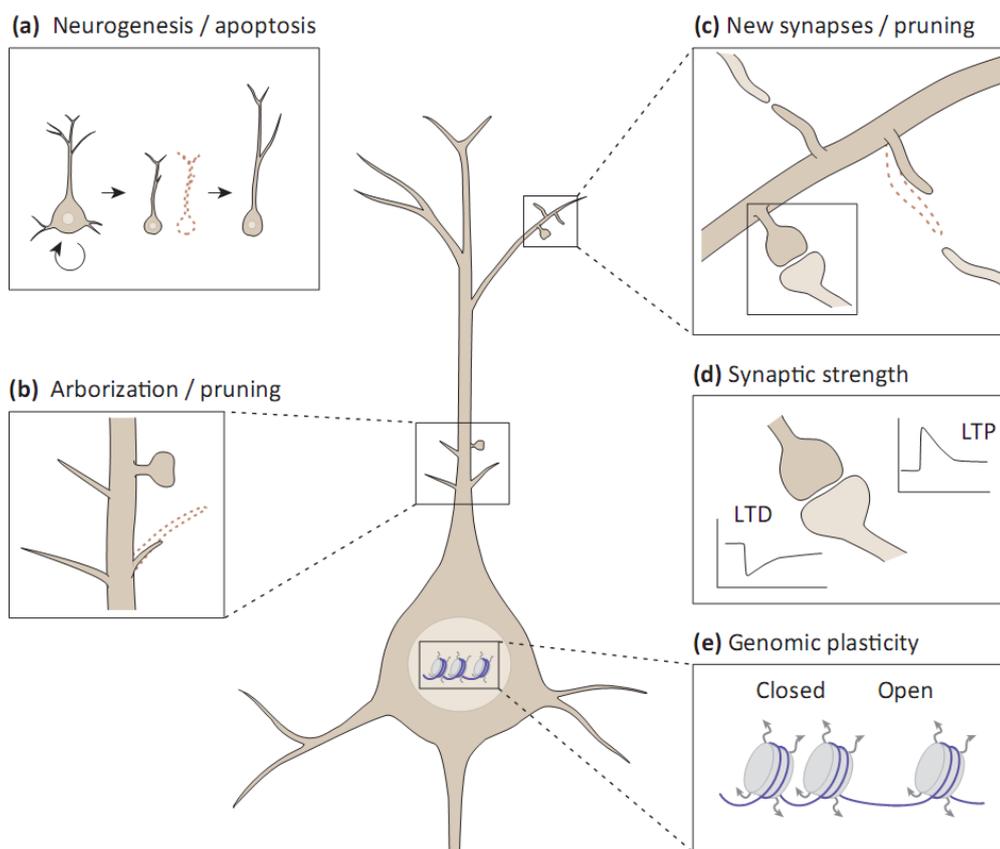


Figura 4. Modelo proposto para os diferentes tipos de plasticidade neuronal baseados no tratamento por drogas antidepressivas. A plasticidade neuronal atua em diferentes níveis estruturais para influenciar o funcionamento das redes neurais. O aumento da formação de estruturas em qualquer um destes níveis gera variabilidade e promove competição, ainda que o número total de estruturas permaneça constante em detrimento do processo simultâneo de remodelamento. (a) Neurogênese e apoptose seletiva. A proliferação de precursores no DG induzida por antidepressivos leva ao aumento da sobrevivência de neurônios recém formados que conseguem estabelecer atividade no circuito hipocampal. Os neurônios que falham em integrar este circuito são eliminados através da apoptose. (b) Remodelamento de axônios e dendritos. Enquanto as ramificações dendríticas de sinapses que melhor representam as condições ambientais são reforçadas, ramificações que falham em estabelecer sinapses têm um curto período de atividade e são reabsorvidas pelo neurônio. (c) Sinaptogênese e eliminação sináptica. A extensão filopodial caracteriza o início do processo da formação da sinapse entre dois neurônios. Os neurônios capazes de estabelecer as sinapses com sucesso são preferencialmente estabilizados, enquanto aqueles incapazes são eliminados. (d) Regulação da sinapse. A troca de informações entre sinapses ativas são aprimoradas pelo processo de potenciação a longo prazo (*long-term potentiation*), enquanto sinapses inativas ou inapropriadas são suprimidas pela depressão de longo prazo (*long-term depression*). (e) Plasticidade genômica. A regulação da transcrição e tradução de genes envolvidos na plasticidade neuronal tanto por controles transcricionais quanto por mecanismos epigenéticos pode ocorrer por remodelamento de regiões de hetero e eucromatinas, dentre outros mecanismos.

A neurogênese é um processo lábil que é regulado por fatores ambientais. No hipocampo, os estágios da neurogênese são estimulados por ambientes enriquecidos, exercícios de aprendizagem e medicamentos antidepressivos, mas inibidos pelo estresse crônico e envelhecimento (David *et al.*, 2010; van Praag *et al.*, 2000; Warner-Schmidt e Duman, 2006). Dentre outros fatores, os medicamentos antidepressivos estimulam a proliferação e especialização de células neuronais jovens, além de promover uma série de alterações estruturais que influenciam o funcionamento de neurônios já maduros (Figura 4) (Sahay e Hen, 2007; Wang *et al.*, 2008). Por outro lado, tanto o estresse agudo como crônico diminuem a proliferação e sobrevivência de neurônios em várias espécies, inclusive em primatas não-humanos (Schoenfeld e Gould, 2012; Vollmayr *et al.*, 2007).

Embora os mecanismos neuronais da comorbidade do pânico e transtornos da ansiedade e depressão permaneçam desconhecidos, estudos recentes do nosso laboratório adicionaram informações importantes sobre este problema. Mais importante, Rosa (2012) mostrou que os níveis de 5-HT da MCPA e do seu principal metabólito, o ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), foram igualmente aumentados nos grupos controle e ISN. Em conjunto com os estudos de Quintino-dos-Santos (2010), estes estudos prepararam o cenário para o desenvolvimento de modelos translacionais mais abrangentes do TP, envolvendo tanto as causas primárias relacionadas à fisiopatologia do desenvolvimento infantil do paciente de pânico como as causas imediatas de deflagração dos AP na vida adulta. Por outro lado, como os ISRSs são as drogas de primeira escolha no tratamento da maioria dos transtornos de ansiedade e depressão, incluindo o pânico, o presente estudo avaliou os efeitos do tratamento crônico da fluoxetina (FLX) em modelos experimentais de pânico, ansiedade e depressão de ratos submetidos ao ISN.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar os efeitos do tratamento com FLX sobre as respostas em modelos experimentais de pânico, ansiedade e depressão de ratos adultos que foram submetidos ao protocolo do ISN.

Objetivo específico

1. Avaliar o efeito do tratamento agudo com FLX (1 e 2 mg/kg) nas respostas tipo-pânico induzidas pela estimulação elétrica da MCPAd em ratos Wistar adultos submetidos ao ISN;
2. Avaliar o efeito do tratamento crônico com a FLX (1 e 2 mg/kg/dia por 7, 14 e 21 dias) sobre as respostas tipo-pânico induzidas pela estimulação elétrica da MCPAd em ratos Wistar adultos que foram submetidos ao ISN;
3. Avaliar o efeito crônico do tratamento com FLX (1 e 2 mg/kg/dia por 21 dias) sobre as respostas tipo-ansiedade e -depressão em ratos Wistar adultos submetidos ao ISN dos testes do LCE, NF e anedonia.

ESTUDO:

EFEITOS AGUDOS E CRÔNICOS DA FLUOXETINA EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE PÂNICO, ANSIEDADE E DEPRESSÃO DE RATOS ADULTOS SUBMETIDOS AO ISOLAMENTO SOCIAL NEONATAL.

INTRODUÇÃO

Os transtornos de ansiedade são uma das formas mais comuns de psicopatologia na infância e juventude, com prevalência variando entre 5% e 25% (Boyd *et al.*, 2000; Costello *et al.*, 2003; Essau *et al.*, 2000; Roza *et al.*, 2003; Wittchen *et al.*, 1998). Destes transtornos, a ASI é o mais frequente na fase precoce da vida, responsável por quase 50% dos tratamentos de saúde mental em crianças (Bell-Dolan, 1995; Cartwright-Hatton *et al.*, 2006). A ASI é caracterizada pela ansiedade excessiva da separação da criança em relação à figura de apego, bem como por um conjunto de sintomas e comportamentos da criança face à possível ruptura dos laços familiares (APA, 2000; Bowlby, 1973). Por outro lado, o TP acomete, principalmente, indivíduos na fase adulta (entre 20 e 30 anos) com uma ocorrência entre 2% e 5% da população e graves limitações do desempenho social e familiar do indivíduo (Goodwin e Barr, 2005). Segundo Klein (1993), o TP está relacionado ao medo produzido pelo disparo errôneo de um sistema de alarme de sufocamento.

Em 1962, Klein e Fink sugeriram que a ASI predispõe o TP e agorafobia na vida adulta, uma vez que 50% dos pacientes agorafóbicos hospitalizados relataram ter tido ASI severa que muitas vezes os impediram de comparecer à escola. Nos anos seguintes, Klein (1964) formulou a hipótese de que ASI favorece o TP, sendo corroborado por diversos autores (Biederman *et al.*, 2005; Kagan *et al.*, 1988; Silove e Manicavasagar, 1993). Esta hipótese ganhou força, entretanto, no estudo duplo-cego de acompanhamento por 15 anos de 54 pré-adolescentes com recusa escolar e 60 controles sadios realizado por Gittelman-Klein (1995). Este autor mostrou que o TP foi a única condição psiquiátrica estatisticamente significativa nos adultos que sofreram de ASI (7% nos probandos

versus 0% nos controles). Adicionalmente, houve uma tendência ($p < 0,10$) para o desenvolvimento de DM e um número maior de hospitalizações ($p < 0,02$) dos probandos devidas, principalmente, a episódios depressivos (14% nos probandos versus 1,7% nos controles). A “hipótese da ansiedade de separação” também foi apoiada pela eficácia comprovada do panicolítico imipramina no tratamento da ASI (Bernstein *et al.*, 2000; Gittelman-Klein e Klein, 1973). Em conjunto com a teoria de apego e as abordagens etológicas dos transtornos de ansiedade de John Bowlby (1973), as propostas de Klein (1980) e Margraf *et al.* (1986) impulsionaram o desenvolvimento da classificação dos transtornos de ansiedade no DSM-III (APA, 1980) e DSM-IV (APA, 2000).

A influência da ASI na etiologia do TP também foi sugerida por estudos pré-clínicos que mostraram que ratos submetidos ao ISN, um modelo de ASI, apresentaram uma facilitação sexo-dependente das respostas respiratórias à hipóxia (machos) e hipercapnia (fêmeas) na vida adulta (Dumont e Kinkead, 2010; Genest *et al.*, 2007a, 2007b, 2004). Embora o substrato neural responsável pela gênese dos AP permaneça questionável, a MCPAd é um forte candidato uma vez que sua estimulação evoca emoções aversivas em humanos (Nashold *et al.*, 1969) e comportamentos defensivos em animais (Bittencourt *et al.*, 2004) que se assemelham aos AP. De fato, vários trabalhos têm proposto a estimulação elétrica da MCPAd como um modelo de AP (Deakin e Graeff, 1991; Gentil, 1988; Jenck *et al.*, 1995; Schenberg, 2010; Schenberg *et al.*, 2001; Schimitel *et al.*, 2012).

Recentemente, Quintino-dos-Santo (2011) mostrou que ratos adultos submetidos ao ISN por 3 horas diárias ao longo do período de amamentação (20 dias) apresentaram reduções acentuadas e permanentes dos limiares dos comportamentos de defesa para as respostas de imobilidade, exoftalmia, trote,

galope e salto eliciados pela estimulação elétrica da MCPAd. Deakin e Graeff (1991), postularam, baseados evidências tanto clínicas quanto experimentais, que a 5-HT seria um neurotransmissor fundamental nos transtornos de ansiedade, pânico e depressão. Em virtude disso, Rosa (2012) realizou ensaios bioquímicos sobre os níveis tissulares de 5-HT da MCPAd e MCPAv de ratos adultos submetidos ao ISN. Surpreendentemente, no entanto, não foi encontrada nenhuma diferença estatística entre os grupos privados (P) e não privados (NP) em nenhuma das estruturas analisadas.

Como os ISRSs são as drogas de primeira escolha no tratamento da maioria dos transtornos de humor e ansiedade, o presente estudo avaliou os efeitos dos tratamentos agudo e crônico com FLX sobre as respostas de modelos experimentais de pânico, ansiedade e depressão de ratos Wistar adultos que foram submetidos ao protocolo do ISN.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Trinta e sete ratos Wistar, fêmeas, nulíparas, pesando entre 220-250g, fornecidas pelo Biotério Central do Centro de Ciências da Saúde, foram mantidas numa sala com controle de temperatura ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro/escuro (12 X 12 h, luzes acesas às 6:00 h). As ratas foram alojadas em grupos de dois a quatro animais em gaiolas de polietileno (caixa-viveiro) com dimensões de 49 cm X 34 cm X 16cm (comprimento X largura X altura), com assoalho coberto com maravalha e água e comida *ad libitum*. Vinte ratos Wistar, machos, pesando entre 250-300g, fornecidos pelo Biotério Central do Centro de Ciências da Saúde, foram mantidos nas mesmas

condições, em gaiolas separadas. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFES PROTOCOLO 005/2012, Anexo 1).

Procedimentos

Neste estudo foram utilizados 164 animais, dos quais 83 foram submetidos à privação materna (P) e 80 permaneceram com as mães (NP). Os ratos de uma mesma prole foram divididos homoganeamente nos seguintes tratamentos:

FIC: Ratos submetidos ao ISN e aos testes comportamentais sem quaisquer tratamentos.

SAL, FLX1 e FLX2: Ratos que foram submetidos ao ISN e receberam tratamento com salina (SAL), FLX 1 mg/kg/dia (FLX1) ou FLX 2 mg/kg/dia (FLX2), respectivamente, do dia pós-natal 60 (PN60) ao PN83.

Cruzamentos

As fêmeas e os machos foram alocados em caixas viveiro para o cruzamento na proporção de 2 ou 3 fêmeas para cada macho, com assoalho coberto com maravalha e água e comida *ad libitum*. A higienização das caixas e a troca da maravalha era realizada duas vezes por semana. A cada higienização as fêmeas eram levantadas gentilmente pelo abdômen para de se confirmar a gestação. Posteriormente, entre 10 e 15 dias após o início do cruzamento, as fêmeas gestantes eram removidas das caixas viveiro e alojadas individualmente em caixas menores de polipropileno (caixas ninho) com dimensões 30 cm X 20 cm X 25 cm, com assoalho coberto por maravalha e água e comida *ad libitum*.

Privação materna

No PN1 era feita a sexagem para a padronização das ninhadas (entre 2 e 8 filhotes por rata), permanecendo somente os machos com suas respectivas mães até o desmame (PN21).

Em PN2 toda a ninhada era classificada como grupo P ou NP. Durante o procedimento de privação materna, os ratos do grupo P eram acomodados individualmente em caixas de separação (30 cm x 20 cm x 13 cm) enquanto as respectivas mães eram transportadas individualmente para outra caixa, doravante denominada caixa de separação materna (CSM). O grupo NP passava por todo o procedimento do grupo P, entretanto os filhotes eram transportados juntamente com suas mães para a CSM. Adicionalmente, o cheiro e a comunicação com a mãe eram atenuados colocando-se as caixas de separação num compartimento fechado (49 cm x 66 cm x 96 cm) com uma pequena abertura para ventilação (10 cm x 10 cm) em sala distinta à da CSM. A privação materna era realizada pela separação dos filhotes por 3 horas, com início entre 08:00 e 09:00, de PN2 a PN21. Ao término das sessões de privação, os animais retornavam para a caixa-ninho. O grupo NP era manipulado de forma similar durante o transporte com as mães para a caixa CSM e o retorno para a caixa-ninho. Após o desmame, os ratos P e NP eram alojados em grupos de dois a quatro animais em caixas viveiro com assoalho coberto com maravalha e com água e comida *ad libitum*.

Confecção dos eletrodos

Os eletrodos eram confeccionados com um fio de aço inoxidável de 250 μm de diâmetro isolado em toda a sua extensão exceto na seção transversal de

sua extremidade (Califórnia Fine Wire Company, Grover City, CA, EUA). Um outro fio de aço inoxidável, não isolado, servia como eletrodo indiferente. Os eletrodos eram soldados a um soquete de circuito integrado (Celis, BCPT 50, São Paulo, SP, Brasil).

Implantação dos eletrodos na MCPAd

Em PN52, os ratos eram anestesiados com uma combinação de quetamina a 1,0 mg/kg e xilazina a 0,5 mg/kg (VetBrands, Jacareí, SP, Brasil) I.P., tratados com ceftriaxona sódica (30 mg/kg, I.M.) e diclofenaco sódico (1 mg/kg, I.M.), fixados ao aparelho estereotáxico (David Kopf, Tujunga, EUA) e cobertos com uma manta para evitar a perda de calor. Em seguida, fazia-se a assepsia da parte superior da cabeça com álcool 70° e solução de iodo e removia-se uma pequena área oval da pele e tecidos subcutâneos, expondo-se a calvária desde o bregma até o lâmbda. A tricotomia foi evitada pois a manutenção do pelo reduz as lesões da pele ao redor do campo cirúrgico, possivelmente devido à autolimpeza. Após a incisão e raspagem da gálea aponeurótica, eram feitos quatro orifícios (dois nos ossos parietais e dois no osso interparietal), com o auxílio de uma broca odontológica, para a fixação de pequenos parafusos de aço inoxidável para ancoragem da prótese. A seguir, realizava-se um orifício -2.1 mm lateralmente e -7.8 mm posteriormente ao bregma para introdução do eletrodo, num ângulo de 15°, até a profundidade de 5 mm abaixo da superfície óssea. Estas coordenadas correspondem àquelas da MCPAd. Após a soldagem do eletrodo indiferente a um parafuso de fixação e a limpeza e secagem da calota craniana, o campo cirúrgico era preenchido com resina acrílica autopolimerizável de secagem rápida e os ratos

eram colocados numa placa térmica (32°C) até se recuperarem da anestesia (Figura 5).

Pesagem dos animais

Os animais eram pesados em PN60, 67, 74 e 81 para monitoração do desenvolvimento dos grupos.

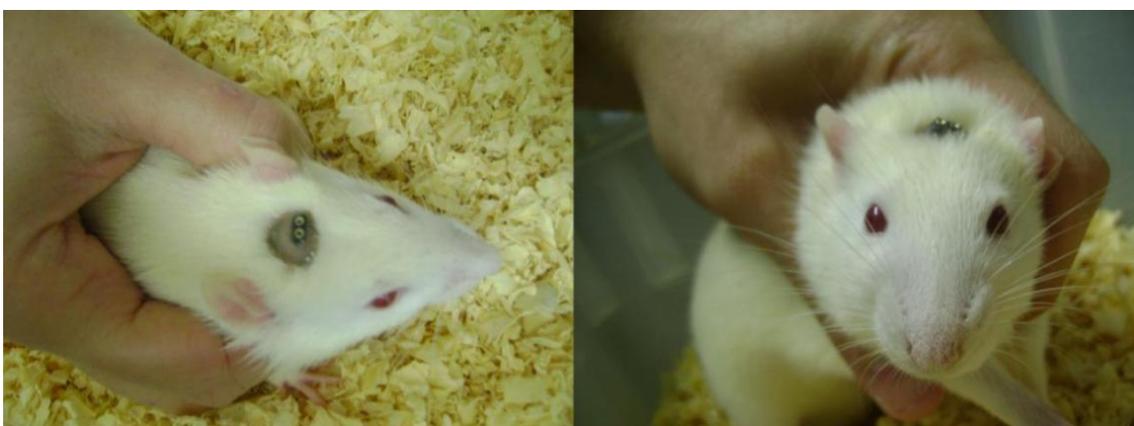


Figura 5. Ratos sete dias após a cirurgia de implantação dos eletrodos intracranianos.

Sessão de estimulação

Os ratos receberam a estimulação elétrica intracraniana nos dias PN59, 60, 67, 74 e 81, correspondentes às sessões de triagem, tratamento agudo, e tratamentos crônicos de 7, 14 e 21 dias, respectivamente, para os grupos FIC, SAL, FLX1 ou FLX2 (ver Tabela 2).

Os animais eram estimulados numa arena circular de acrílico transparente, com 60 cm de altura e diâmetro com pulsos senoidais (60 Hz, c.a.) gerados por um estimulador de corrente constante. Após dez minutos de habituação, os estímulos eram aplicados por meio de um cabo flexível acoplado a um conector

giratório de mercúrio. As intensidades de corrente eram monitoradas por meio de um osciloscópio (V-212-HITACHI, Malásia) conectado aos polos de uma resistência de 1 k Ω em série com o eletrodo. Os estímulos tinham 30 segundos de duração e eram aumentados em passos de 5 μ A. Os animais eram estimulados em intervalos entre 30 a 90 segundos, desde a intensidade zero (estímulo fictício) até a obtenção da resposta de fuga (galope e/ou saltos). As sessões eram realizadas em uma sala com atenuação acústica e temperatura mantida em aproximadamente 25°C. Uma sessão de triagem era realizada sete dias após a cirurgia de implantação, selecionando-se os animais que apresentavam resposta de galope em intensidades inferiores a 60 μ A (sessão-triagem). As sessões de estimulações subsequentes após os tratamentos agudo e crônicos seguiam o mesmo protocolo, exceto pelo limite máximo da intensidade da corrente de estimulação que era elevado para 100 μ A.

Registros comportamentais

Os registros comportamentais eram realizados de forma binária, ou seja, registrando-se a ocorrência ou não dos itens comportamentais durante os períodos de estimulação, independentemente de sua frequência ou duração durante o estímulo. As funções intensidade-resposta foram obtidas pelo ajuste logístico das frequências acumuladas de resposta. Curvas de limiar de resposta foram obtidas pela análise logística dos limiares de resposta (Bittencourt *et al.*, 2004; Schenberg *et al.*, 1990).

Etograma do rato

A observação comportamental dos animais foi feita com o auxílio de uma planilha (Anexo 2), contendo os itens comportamentais do etograma do rato:

Dormir - Postura horizontal com olhos fechados, sem atividade olfativa, e com relaxamento muscular indicado pelo rebaixamento do tronco, cabeça e pescoço e pela flexão dos membros.

Repouso - Postura horizontal com olhos semiabertos ou abertos, atividade olfativa reduzida e relaxamento muscular indicado pelo rebaixamento do tronco e pela flexão dos membros. O rato pode apresentar uma postura de “esfinge”, com o tronco rebaixado e pescoço e cabeça erguidos.

Autolimpeza - Manipulação repetitiva dos pelos da cabeça, tronco e genitais usando as patas dianteiras ou a boca (comportamentos autodirigidos). A manipulação dos pelos com as patas posteriores (coçar) foi incluída neste item.

Olfacção - Exploração olfativa do ambiente indicada pelo movimento das narinas e das vibrissas e movimentos pendulares da cabeça em posição elevada.

Esquadrinhar - Exploração visuomotora do ambiente caracterizada por movimentos laterais da cabeça, geralmente, acompanhados de olfacção.

Levantar - Postura ereta, com extensão das patas posteriores.

Marcha - Locomoção lenta do animal por, pelo menos, dois espaços do assoalho da arena, mediante a projeção simultânea das patas contralaterais anterior e posterior.

Mistacioplegia - Paralisia das vibrissas

Imobilidade tensa - Cessar brusco de todos os movimentos, frequentemente acompanhado de extensão dos membros (elevação do tronco),

orelhas e pescoço e, às vezes, da cauda, indicando o aumento do tônus muscular. O cessar brusco das atividades pode resultar em posturas anômalas.

Trote - Locomoção rápida do animal, mantendo o padrão contralateral da marcha.

Galope - Deslocamento rápido com a projeção alternada dos pares de patas dianteiras e traseiras.

Salto - Impulsos horizontais ou verticais, frequentemente em direção à borda superior da arena.

Exoftalmia - Abertura máxima das pálpebras (contração do músculo tarso palpebral) e protrusão do globo ocular (contração do músculo orbital), o qual assume aspecto esférico e cor brilhante indicativa de uma maior entrada de luz. Estas respostas resultam no aumento do campo visual e apresentam um sinergismo evidente com a midríase, também de natureza simpática, que ocorre durante a reação de defesa natural ou induzida por estimulação intracraniana.

Defecação e Micção - Eliminação de fezes e urina (não foram analisadas no presente estudo).

De acordo com o presente etograma, a “reação de congelamento” (*freezing behavior*) compreende as respostas de imobilidade tensa acompanhada de exoftalmia e, eventualmente, defecação e micção. O rato aparenta um estado de hipervigilância. A reação de fuga (*flight behavior*) compreende as respostas de trote, galope e salto, igualmente acompanhadas de exoftalmia. A reação de congelamento pode ocorrer isoladamente, mantendo-se por todo período de estimulação, ou combinada a outras respostas, por exemplo, precedendo ou seguindo-se à resposta de fuga, tanto na vigência da estimulação, quanto no período interestímulo (Schenberg *et al.*, 2001; Vargas *et al.*, 2000).

Tratamento agudo e crônico

No dia seguinte à sessão-triagem os animais eram administrados I.P. com SAL, FLX1 ou FLX2 e, 30 minutos após, submetidos a uma sessão de estimulação intracraniana (tratamentos agudos). O grupo FIC recebia apenas a manipulação do experimentador e, como nos grupos anteriores, era submetido à estimulação 30 minutos após o manuseio.

Após os testes dos efeitos agudos iniciava-se o tratamento com a administração crônica de FLX1, FLX2 ou SAL, reavaliando-se as curvas intensidade-resposta 7, 14 e 21 dias após a sessão do tratamento agudo. As sessões de estimulação bem como os testes de comportamento para a avaliação dos efeitos crônicos eram realizadas antes da administração da dose diária de FLX1, FLX2 ou SAL, evitando-se, assim, os efeitos agudos destes tratamentos. Os mesmos procedimentos de manipulação, exceto a administração diária de FLX ou SAL, eram realizados para o grupo FIC.

Teste do labirinto-em-cruz elevado

O LCE baseia-se na aversão natural dos roedores aos espaços abertos. O equipamento é feito de madeira com revestimento de fórmica e situa-se a 70 cm do assoalho. O LCE é formado por quatro braços perpendiculares de 50 cm de comprimento e 10 cm de largura, dos quais dois braços opostos apresentam paredes de 40 cm de altura (braços fechados ou "seguros") e os outros dois uma borda de apenas um cm de altura (braços abertos ou "inseguros"). Os braços se comunicam por uma plataforma central (10 x10 cm).

Em PN82 os ratos eram colocados na plataforma central voltados para o braço fechado e suas atividades eram gravadas por cinco minutos. Os filmes foram analisados *off-line* registrando-se os tempos de exploração dos braços abertos (TBA) e fechados (TBF), o tempo de exploração na plataforma central (TPC) e o número de entradas nos braços abertos (EBA) e braços fechados (EBF). A porcentagem de entradas (%EBA) e tempo (%TBA) no braço aberto foram calculados como $EBA/(EBA+EBF)$ e $TBA/(TBA+TBF)$, respectivamente. Os testes foram realizados numa sala com iluminação de 44 lux e filmados com uma câmara digital SONY (Modelo CM-910).

Teste do campo aberto

O teste do campo aberto (CA) foi realizado no dia PN83. O rato era colocado na periferia campo aberto de 100 cm de aresta. O assoalho era dividido em 49 quadrados de 15 cm, dos quais nove compunham a região central e 40 compunham a região periférica. Os testes foram realizados numa sala com iluminação de 44 lux e filmados com uma câmara digital SONY (Modelo CM-910). O rato era filmado por cinco minutos e os comportamentos de defecação, locomoção periférica (peritaxia) e a porcentagem da locomoção central central (%centrotaxia) foram quantificados *off-line* pela análise dos filmes. A %centrotaxia foi calculada como $centrotaxia/(centrotaxia+peritaxia)$.

Teste da natação forçada

O NF foi realizado nos dias PN84-85 conduzido num cilindro de acrílico de 28,5 cm de diâmetro por 62 cm de altura, e coluna d'água de 54 cm. Na sessão pré-teste os ratos eram colocados no cilindro por 15 min. No dia seguinte, os ratos eram filmados com uma câmera digital SONY (Modelo CM-910) durante cinco minutos. O comportamento de natação foi definido como o nado propriamente dito, mergulhos ou tentativas de escalar as paredes do cilindro. Na imobilidade o animal permanecia praticamente imóvel, apresentando apenas pequenos movimentos para manter a cabeça fora da água. O tempo de imobilidade foi quantificado posteriormente *off-line* pela análise dos filmes.

Teste de anedonia

O teste de anedonia foi realizado nos dias PN77-80, sendo avaliados a ingestão de água ou sacarose (solução de 5%). Para tanto, duas garrafas idênticas foram previamente identificadas, preenchidas com solução sacarose 5% ou água e foram pesadas (peso inicial). Os recipientes foram colocados nas caixas viveiro e pesados novamente após 24 horas (peso final). O volume ingerido por cada animal foi calculado pela diferença dos valores iniciais e finais, dividido pela quantidade de animais existentes em cada caixa viveiro. Ainda, os recipientes eram colocados em posições invertidas do dia anterior para evitar comportamentos de preferência de ingestão do líquido. Foram tomadas como medidas as médias aritméticas dos três dias do teste de anedonia.

Sacrifício

Os animais que apresentaram problemas com perda das próteses, infecção, sangramento ou qualquer sinal de doença foram sacrificados com sobredose anestésica (120 mg/kg I.P.) de tiopental sódico (Cristália, SP, Brasil). Da mesma maneira, constatada a inviabilidade de reaproveitamento dos filhotes excedentes, machos reprodutores, e/ou das fêmeas, efetuou-se o mesmo procedimento.

Histologia

Ao final dos experimentos os cérebros eram preparados para a análise histológica dos sítios estimulados. Os animais eram anestesiados com 120mg/kg I.P. de tiopental sódico (Cristália, SP, Brasil). A pele na região torácica era seccionada e removida até a região do pescoço. A cavidade torácica era exposta por meio de dois cortes do gradil-costal laterais ao esterno e rebatimento do hemitórax. Em seguida, clampeava-se a aorta descendente e puncionava-se o ventrículo esquerdo, seccionando-se a aurícula para dar vazão às soluções de perfusão (salina 0,9% e aldeído fórmico 10%, 200 mL cada), as quais eram injetadas lentamente a fim de evitar a ruptura de pequenos vasos. Após a perfusão, os ratos eram decapitados e as cabeças eram mergulhadas em solução de aldeído fórmico 10%, onde permaneciam por pelo menos três dias antes do processamento histológico. A seguir, os cérebros eram removidos e dissecados para a preparação do tronco encefálico. Os blocos eram posicionados em um criostato (Leica CM1850, Wetzlar, Germany) e seccionados em cortes de 40 μ m de espessura. Os cortes eram então estendidos em lâminas gelatinizadas, desidratados, corados com vermelho neutro

(Sigma, EUA) e montados com DPX (Aldrich Chemical Company, EUA). Os sítios das estimulações foram identificados, fotografados por microscopia de baixo aumento (Leica DM2500 acoplado a uma câmera DFC 300 FX, Wetzlar, Germany), e registrados em diagramas coronais do encéfalo do rato do atlas de Paxinos e Watson (1998).

Estatística

Análise das variáveis binárias

Considerações de ordem teórica e empírica sugerem que a função de resposta de variáveis binárias seja curvilínea. Em geral, estas funções apresentam a forma sigmoide, ou seja, um “S” inclinado, simétrico, aproximadamente linear em sua parte intermediária e com extremidades assintóticas em 0 e 1. São, portanto, funções que satisfazem às restrições impostas por uma variável aleatória de Bernoulli cuja Esperança, $E\{Y\} = p^i$, deve situar-se entre 0 e 1. O modelo usualmente adotado é dado por,

$$p^i = F(\alpha + \beta x_i)$$

onde α e β (respectivamente, o intercepto e o parâmetro de curvatura, ou “inclinação”) são os parâmetros que devem ser estimados, e F é uma função adequada, chamada função de ligação (*link function*), por exemplo, a distribuição normal (método dos probitos) ou a função logística (método dos logitos). Dada a sua maior operacionalidade, utilizamos a distribuição logística para descrever a probabilidade de emissão de respostas da reação de defesa em função da intensidade de estimulação. Assim, as curvas de probabilidade de resposta foram

obtidas por ajuste logístico das frequências acumuladas das respostas em função do logaritmo das intensidades de corrente, de acordo com o modelo,

$$P(y_{ij}|x_{ij}) = [1 + \exp(-(\alpha_j + \beta_j x_{ij}))]^{-1}$$

onde P é a probabilidade esperada da resposta y_{ij} para um dado estímulo x_{ij} , α_j é o intercepto e β_j a inclinação da j ésima curva estímulo-resposta (triagem, tratamento agudo, 7, 14 e 21). Ajustes logísticos significantes foram avaliados pelo chi-quadrado (χ^2) de Wald

$$\chi^2 = (\beta_j / EP_{\beta_j})^2,$$

onde EP é o erro padrão de β_j . A intensidade mediana (I_{50}) assim como seu erro padrão (EP) e o respectivo intervalo de confiança (IC95%) foram computados pelas fórmulas que se seguem,

$$\text{Log}(I_{50}) = -\alpha/\beta$$

$$I_{50} = 10^{-\alpha/\beta}$$

$$EP\{\text{Log}(I_{50})\} = \{[\text{Var}(\alpha) - 2(\alpha/\beta)\text{Cov}(\alpha, \beta) + (\alpha/\beta)^2 \text{Var}(\beta)] / \beta^2\}^{1/2}$$

$$EP(I_{50}) = I_{50} \{EP[\text{Log}(I_{50})]\}$$

$$\text{IC95 \% } (I_{50}) = I_{50} \pm 1,96 \{EP(I_{50})\}$$

onde as variâncias e covariâncias dos parâmetros foram obtidas pela matriz de covariância (procedimento Logistic do programa SAS).

Comparação das curvas: Teste de verossimilhança

Conforme estudos anteriores (Schenberg *et al.*, 2001; Vargas *et al.*, 2000), as curvas de limiares foram comparadas por meio dos testes de χ^2 da razão de verossimilhanças (*maximum likelihood ratio*) (Collett, 1991; Schenberg *et al.*, 2000). Para isso, modelos completos (k parâmetros) e reduzidos ($k-r$ parâmetros)

foram parametrizados por variáveis indicadoras, 0 ou 1, assinalando a presença ou ausência de uma determinada variável (Collett, 1991). As regressões foram comparadas pela diferença do logaritmo da razão de verossimilhanças (-2 Log *Likelihood deviance*) do modelo completo e dos modelos reduzidos. A diferença das verossimilhanças segue a distribuição χ^2 com $k-r$ graus de liberdade, possibilitando a realização de testes de coincidência (superposição) das regressões, bem como a análise de efeitos individuais sobre a locação e paralelismo das curvas de resposta. Assim, curvas pré-droga (triagem) e pós-droga (testes agudos e crônicos) foram inicialmente comparadas em testes gerais de coincidência, admitindo-se um nível de significância de $\alpha = 0,05$. Curvas de resposta significativamente diferentes foram adicionalmente avaliadas para desvios de locação (nível de disparo) e paralelismo (responsividade). Em seguida, testes *post hoc* foram realizados para a localização das diferenças (de locação ou paralelismo) entre pares de curvas. Para isso, admitiu-se o critério de Bonferroni ($\alpha_c = 0,05/c$, onde c é o número de pares de curvas em comparação).

Devido à ausência de testes de hipóteses acerca da igualdade de medianas populacionais, estas foram comparadas por testes de probabilidades de confiança (*confidence probability*), ou seja, as medianas foram consideradas diferentes quando foram detectadas diferenças significantes nos testes gerais de coincidência das curvas de resposta e, simultaneamente, não houve superposição dos respectivos IC95%. Todos os procedimentos estatísticos foram realizados por meio do programa Statistical Analysis Systems (SAS®, Cary, North Carolina).

Análise das variáveis contínuas

Os ratos que apresentaram valores extremos (*outliers*) para o teste de anedonia (n=2) foram excluídos por meio de análise do resíduo normal máximo (*maximum normed residual*) para $p < 0,05$ (Snedecor e Cochran, 1980). Os dados contínuos para os testes do LCE, CA, NF, anedonia e peso foram comparados por análise de variância (ANOVA) de duas vias (isolamento/tratamento) seguidos por testes-t de Bonferroni (5%) das médias mínimas quadráticas (*least square means*). Os resultados foram apresentados em valores médios e em erros-padrão das médias (EPM) dos 8 grupos estudados (FIC, SAL, FLX1 e FLX2, privados ou não privados).

Tabela 2. Cronograma experimental para os grupos P e NP.

Grupo	PN1	PN2-21	PN22-51	PN52	PN59	PN60*	PN67*	PN74*	PN77*-80*	PN81*	PN82*	PN83*	PN83*-84	PN84
FIC														
SAL	Sexagem	ISN	Cresc.	Cirurgia	EIC-I	EIC-II	EIC-III	EIC-IV	Anedonia	EIC-V	LCE	CA	NF	Sacrifício
FLX1														
FLX2														

*, Período de tratamento (SAL, FLX1 ou FLX2); Anedonia, teste de anedonia; CA, teste do campos aberto; EIC-I, estimulação elétrica intracraniana: sessão-triangem; EIC-II, estimulação elétrica intracraniana: sessão aguda; EIC-III-V, estimulação elétrica intracraniana: sessões-teste crônica de sete, 14 e 21 dias, respectivamente; Cresc., período de crescimento; ISN, isolamento social neonatal; LCE, teste do labirinto-em-cruz elevado; NF, teste da natação forçada; PN, dia pós-natal.

RESULTADOS

Sítios estimulados

Os sítios estimulados localizaram-se predominantemente MCPAdI (NP= 90%, P= 70%). Os restantes localizaram-se em áreas contíguas da MCPAI (NP= 7%, P= 21%) e, menos frequentemente, das camadas profundas do cóliculo superior (NP= 3%, P= 5%) (Tabela 3, Figura 6).

Tabela 3. Sítios de estimulação do grupos de animais separados e não separados. CPCS, camadas profundas do cóliculo superior; MCPAdI e MCPAI, colunas dorsolateral e lateral da MCPA, respectivamente; N, número de animais por grupo; NP, grupo não separado; P, grupo separado; FLX1 e FLX2, grupos fluoxetina 1 e 2mg/kg, respectivamente; SAL, grupo salina; FIC, grupo sem tratamento. Os valores percentuais são referentes a valores intra-grupos.

Grupo	Trat	N	MCPAdI	MCPAI	CPCS
NP	FIC	20	19 (95%)	1 (5%)	-
	SAL	20	17 (85%)	2 (10%)	1 (5%)
	FLX1	20	20 (100%)	-	-
	FLX2	20	17 (85%)	2 (10%)	1 (5%)
	Total	80	73 (92%)	4 (5%)	2 (3%)
P	FIC	20	10 (50%)	9 (45%)	1 (5%)
	SAL	21	14 (67%)	7 (33%)	-
	FLX1	21	17 (81%)	3 (14%)	1 (5%)
	FLX2	21	17 (81%)	2 (10%)	2 (9%)
	Total	83	58 (70%)	21 (25%)	4 (5%)

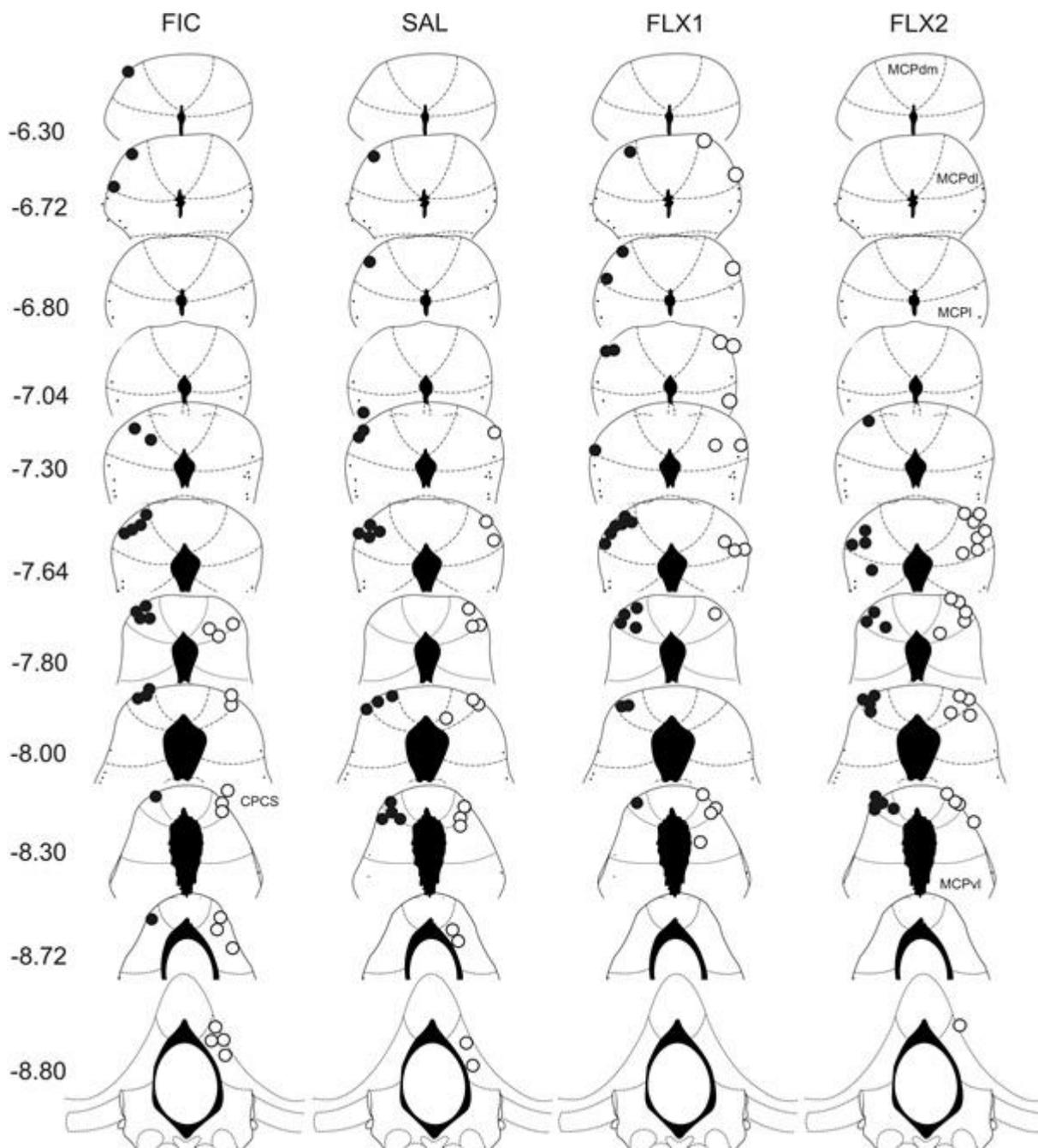


Figura 6. Localização dos eletrodos dos grupos não privados (●) e privados (○). Os números representam as coordenadas anteroposteriores em relação ao bregma de cortes coronais do atlas do cérebro do rato de Paxinos e Watson (1998). Embora todos os eletrodos tenham sido implantados no lado esquerdo do cérebro, eles foram representados em lados distintos para melhor visualização. FIC, tratamento fictício; SAL, grupo tratado com solução salina; FLX1 e FLX2, grupos tratados com 1 e 2 mg/kg de fluoxetina, respectivamente; MCPAdl, MCPAdm, MCPAl, MCPAvl colunas dorsolateral, dorsomedial, lateral e ventrolateral da matéria cinzenta periaquedual, respectivamente; CPCS, camadas profundas do colículo superior.

Efeitos do ISN sobre os limiares das respostas de defesa induzidas pela estimulação elétrica da MCPAd

Comparados aos limiares das respostas de defesa dos ratos NP (n=80), os ratos P (n=83) apresentaram uma redução significativa dos limiares de exoftalmia ($\Delta I_{50}\% = -14,2\%$; $\chi^2 = 15,2$; 1 g.l.; $p < 0,001$), imobilidade ($\Delta I_{50}\% = -11,2\%$; $\chi^2 = 14,4$; 1 g.l.; $p < 0,001$), trote ($\Delta I_{50}\% = -14,7\%$; $\chi^2 = 36,1$; 1 g.l.; $p < 0,001$), galope ($\Delta I_{50}\% = -11,7\%$; $\chi^2 = 36,1$; 1 g.l.; $p < 0,001$) e salto ($\Delta I_{50}\% = -15,4\%$; $\chi^2 = 41,6$; 1 g.l.; $p < 0,001$) (Figura 7).

Efeitos dos tratamentos sobre os limiares das respostas de defesa induzidas pela estimulação elétrica da MCPAd

Não foram observadas diferenças significativas entre os limiares das respostas de defesa dos tratamentos FIC, SAL, FLX1 e FLX2 dos ratos P na sessão-triagem (PN59). Este quadro se manteve na sessão-teste crônico de 21 dias (PN81) entre SAL, FLX1 e FLX2, exceto por um pequeno aumento nos limiares das respostas de galope ($\Delta I_{50}\% = 13,3\%$; $\chi^2 = 9,8$; 1 g.l., $p < 0,05$) e trote ($\Delta I_{50}\% = 16,5\%$; $\chi^2 = 10,1$; 1 g.l., $p < 0,05$) nos ratos tratados com SAL comparados ao FIC (Figura 8-9).

A sessão-triagem do grupo FLX2 dos ratos NP apresentou limiares estatisticamente menores que os grupos SAL e FLX1 para as respostas de trote ($\Delta I_{50}\% = -22,0\%$; $\chi^2 = 16,3$; 1 g.l.; $p < 0,05$ e $\Delta I_{50}\% = -30,3\%$; $\chi^2 = 34,3$; 1 g.l.; $p < 0,05$), galope ($\Delta I_{50}\% = -14,1\%$; $\chi^2 = 6,1$; 1 g.l.; $p < 0,05$ e $\Delta I_{50}\% = -17,2\%$; $\chi^2 = 9,6$; 1 g.l.; $p < 0,05$) e salto ($\Delta I_{50}\% = -19,6\%$; $\chi^2 = 8,4$; 1 g.l.; $p < 0,05$ e $\Delta I_{50}\% = -22,7\%$; $\chi^2 = 11,8$; 1

g.l.; $p < 0,05$), respectivamente (Figura 8-9). As diferenças entre os grupos FLX2 e SAL desapareceram em PN81 ou foram até mesmo revertidas na comparação entre os grupos FLX2 e FLX1 para as respostas de trote ($\Delta I_{50}\% = 12,9\%$; $\chi^2 = 8,6$; 1 g.l., $p < 0,05$), galope ($\Delta I_{50}\% = 25,5\%$; $\chi^2 = 20,6$; 1 g.l., $p < 0,05$) e salto ($\Delta I_{50}\% = 31,6\%$; $\chi^2 = 21,9$; 1 g.l., $p < 0,05$).

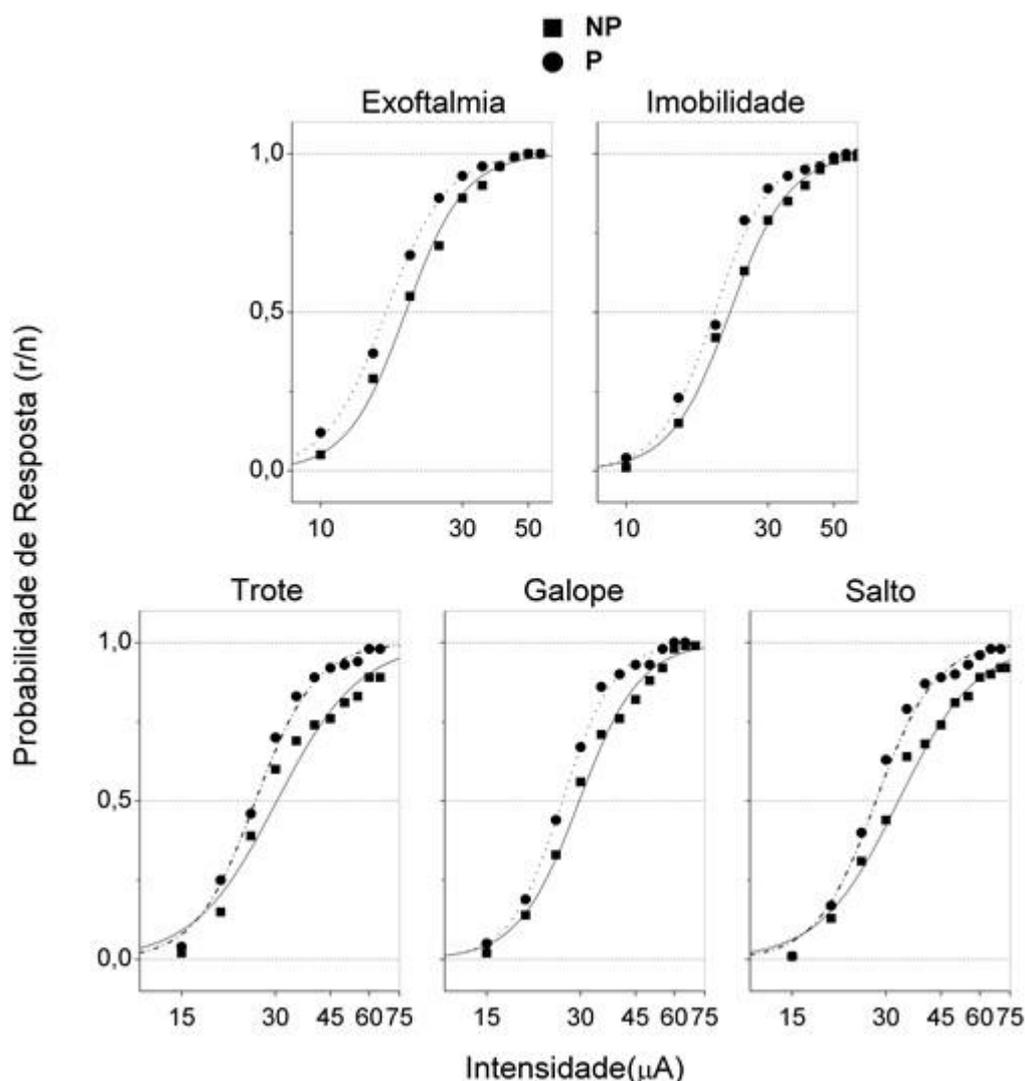


Figura 7. Efeitos da privação materna sobre os limiares das respostas de defesa induzidas pela estimulação elétrica da MCPAd. As curvas intensidade-resposta representam o ajuste logístico das frequências acumuladas das respostas limiares (r , número de respostas, n , número de ratos estimulados) das sessões-triangem (PN59) de todos os tratamentos (FIC, SAL, FLX1 e FLX2) para ratos privados (P, $n=83$) ou não-privados (NP, $n=80$). Linhas pontilhadas (...) e tracejadas (---) indicam diferenças significantes de locação e inclinação das curvas em relação ao grupo NP, respectivamente ($p < 0,05$, teste do χ^2 da razão de verossimilhanças).

Comparados aos limiares da sessão-triagem (PN59), não houve alteração dos limiares de defesa do grupo NP submetido ao tratamento FIC tanto agudamente quanto por 7, 14 ou 21 dias (PN60, 67, 73 e 81) (Figura 8-9). Exceto pelo aumento dos limiares da resposta de galope ($\Delta I_{50}\% = 21,7\%$; $\chi^2 = 13,5$; 1 g.l., $p < 0,01$) após 21 dias de tratamento, os limiares também não foram alterados no grupo SAL. Ainda nos ratos NP, o tratamento com 1 mg/kg de FLX produziu a redução de todos os limiares de defesa nas sessões PN60, PN67, PN74 e, exceto pelo galope, PN81. Em contraste, a dose de 2 mg/kg promoveu aumentos expressivos nos limiares de defesa em PN74 e, em maior grau, PN81, para a exoftalmia ($\Delta I_{50}\% = 24,0\%$; $\chi^2 = 12,4$; 1 g.l., $p < 0,01$), imobilidade ($\Delta I_{50}\% = 31,2\%$; $\chi^2 = 14,4$; 1 g.l., $p < 0,01$), trote ($\Delta I_{50}\% = 52,9\%$; $\chi^2 = 47,6$; 1 g.l., $p < 0,001$), galope ($\Delta I_{50}\% = 56,5\%$; $\chi^2 = 53,8$; 1 g.l., $p < 0,001$) e salto ($\Delta I_{50}\% = 65,2\%$; $\chi^2 = 47,6$; 1 g.l., $p < 0,001$) (Figura 8-9).

Foi observada uma alta homogeneidade no curso temporal dos limiares das respostas defensivas eliciadas pela estimulação elétrica da MCPAd dos ratos P submetidos tratamentos FIC, SAL, FLX1 e FLX2 (Figura 8-9). Em todos os casos houve um aumento significativo dos limiares em PN74 e PN81 quando comparado a sessão-triagem. A única exceção foi a resposta de trote do grupo FIC ($\Delta I_{50}\% = -7,8\%$; $\chi^2 = 9,2$; 1 g.l.; $p < 0,05$), que apresentou uma leve redução do limiar quando comparada a sessão-triagem (Figura 8-9).

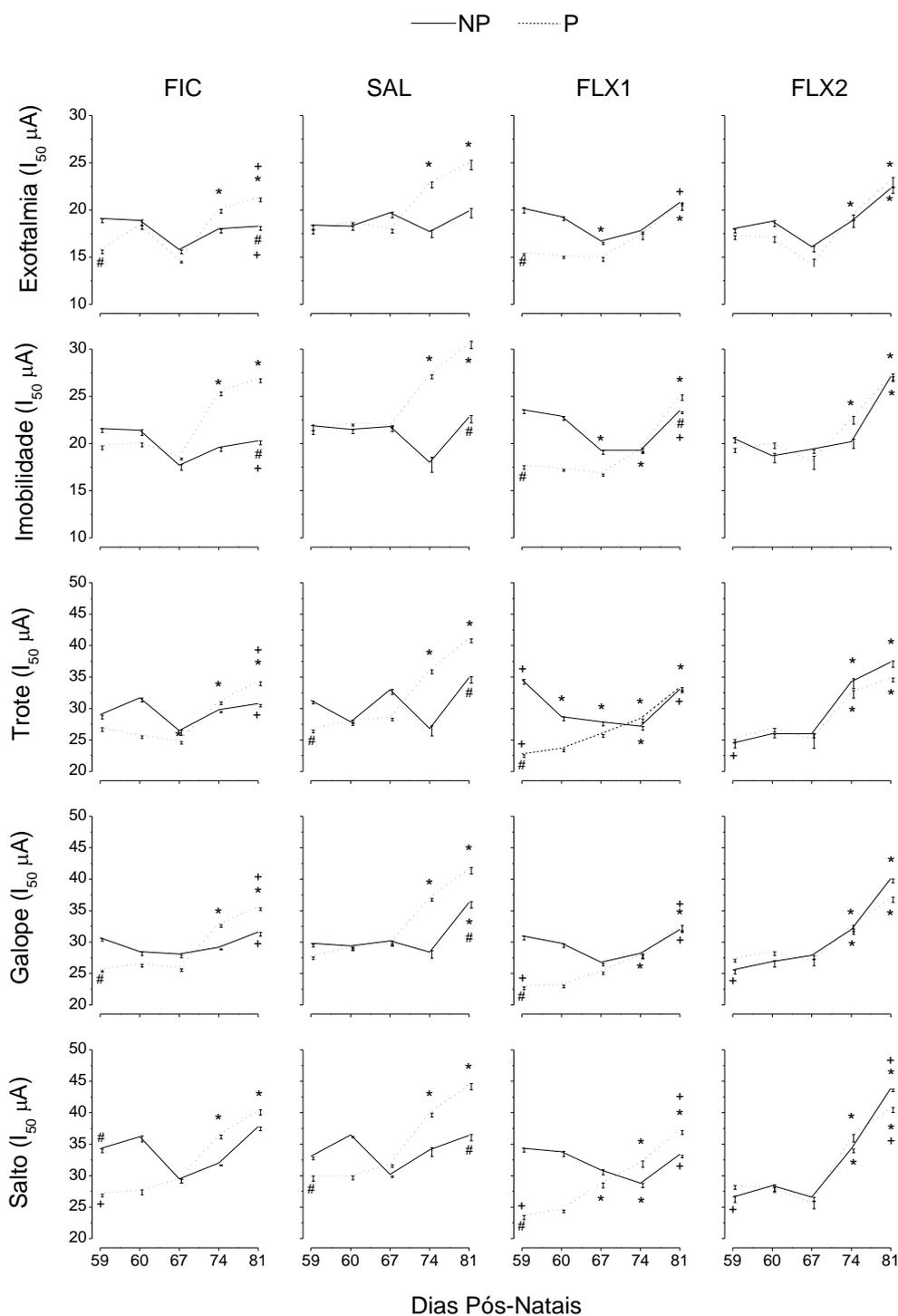


Figura 8. Curso temporal das variações das intensidades limiares medianas ($I_{50} \pm EP$) da resposta de exoftalmia, imobilidade, trote, galope e salto produzidas pela estimulação elétrica da MCPAd nos grupos NP (—) e P (- - -) tratados ficticiamente (FIC), com salina (SAL) ou 1 e 2 mg/kg/dia de fluoxetina (FLX1 e FLX2, respectivamente). Na sessão de avaliação dos efeitos agudos (PN60) as drogas foram aplicadas 30 min antes da estimulação da MCPAd, ocorrendo o inverso nas sessões para avaliação dos efeitos crônicos (PN67-PN81). Os símbolos indicam diferenças significantes em relação à sessão-triagem (*) do mesmo tratamento, ao tratamento SAL do mesmo grupo (+) e entre grupos P e NP da mesma sessão de estimulação (#) (critério de 5% de Bonferroni para testes do χ^2 da razão de verossimilhanças).

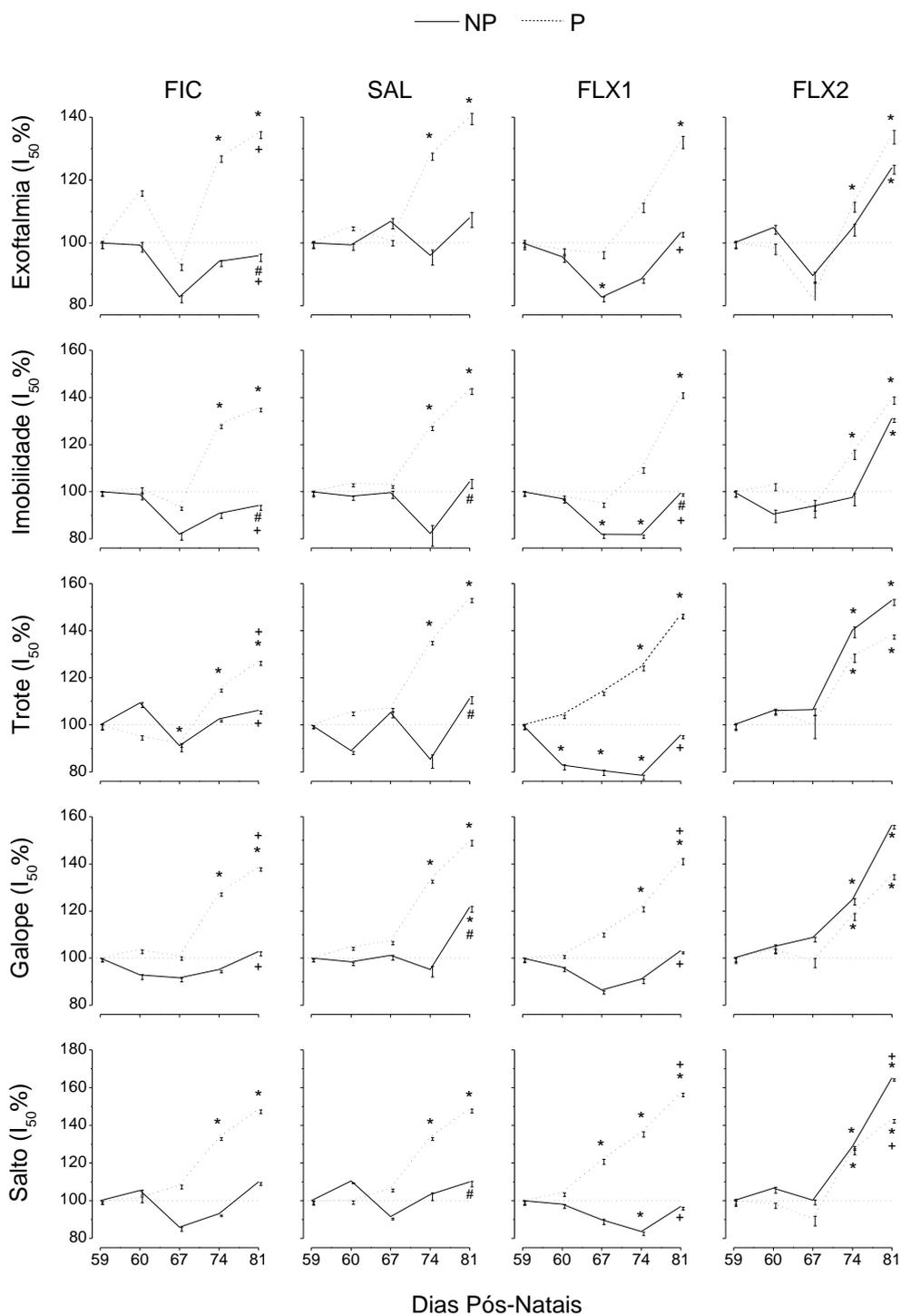


Figura 9. Curso temporal das variações percentuais das intensidades limiares medianas ($I_{50} \pm EP$) da resposta de exoftalmia, imobilidade, trote, galope e salto produzidas pela estimulação elétrica da MCPad nos grupos NP (—) e P (- - -) tratados ficticiamente (FIC), com salina (SAL) ou 1 e 2 mg/kg/dia de fluoxetina (FLX1 e FLX2, respectivamente). Demais detalhes como na Figura 8.

Efeitos do ISN e dos tratamentos sobre o desempenho dos ratos no LCE

Não houve diferença entre os grupos NP e P quanto à EBF (Figura 10). Contrariamente, os grupos apresentaram diferença altamente significativa para as variáveis %EBA ($F_{7,155} = 4,2$; $p < 0,0005$) e %TBA ($F_{7,155} = 5,5$; $p < 0,0001$). As diferenças na %EBA e %TBA foram devidas tanto à privação ($F_{1,155} = 7,2$; $p < 0,01$ e $F_{1,155} = 7,2$; $p < 0,01$) quanto tratamentos ($F_{3,155} = 4,21$; $p < 0,01$ e $F_{3,155} = 6,4$; $p < 0,0005$) e à interação destes fatores ($F_{3,155} = 3,3$; $p < 0,05$ e $F_{3,155} = 4,2$; $p < 0,01$), respectivamente. O grupo FIC privado apresentou aumentos significativos tanto na %EBA ($t = 3,5$; $p < 0,0005$) quanto no %TBA ($t = 3,9$; $p < 0,0001$) em relação ao grupo NP. Estes resultados sugerem efeitos ansiolíticos do ISN.

Comparados ao grupo SAL, os ratos NP apresentaram reduções significativas tanto na %EBA quanto na %TBA após o tratamento com FLX1 ($t = 2,8$; $p < 0,01$ e $t = 3,3$; $p < 0,001$) e FLX2 ($t = 3,1$; $p < 0,005$ e $t = 3,5$; $p < 0,001$), respectivamente (Figura 10).

Efeitos do ISN e dos tratamentos sobre o desempenho dos ratos no CA

Os grupos apresentaram diferenças altamente significantes na exploração periférica ($F_{7,154} = 4,1$; $p < 0,0005$) e na central ($F_{7,154} = 2,6$; $p < 0,05$) do CA. Para a peritaxia, as diferenças foram devidas unicamente à privação ($F_{1,154} = 20,8$; $p < 0,0001$), com efeitos maiores nos ratos P dos tratamentos FIC ($t = 3,7$; $p < 0,0005$) e SAL ($t = 3,3$; $p < 0,001$) (Figura 11). Com relação à centrotaxia, as diferenças foram devidas unicamente à privação ($F_{1,154} = 8,9$, $p < 0,005$). Em particular, a centrotaxia foi mais acentuada nos ratos privados SAL ($t = 3,0$; $p < 0,005$) e FLX1 ($t = 2,3$; $p < 0,05$). No grupo P, tanto o aumento da exploração do tratamento com SAL em relação ao

FIC ($t= 2,2$; $p<0,05$) quanto a redução da FLX2 em relação a SAL ($t= 3,2$; $p<0,001$) contribuíram para a interação da privação e tratamento (Figura 11).

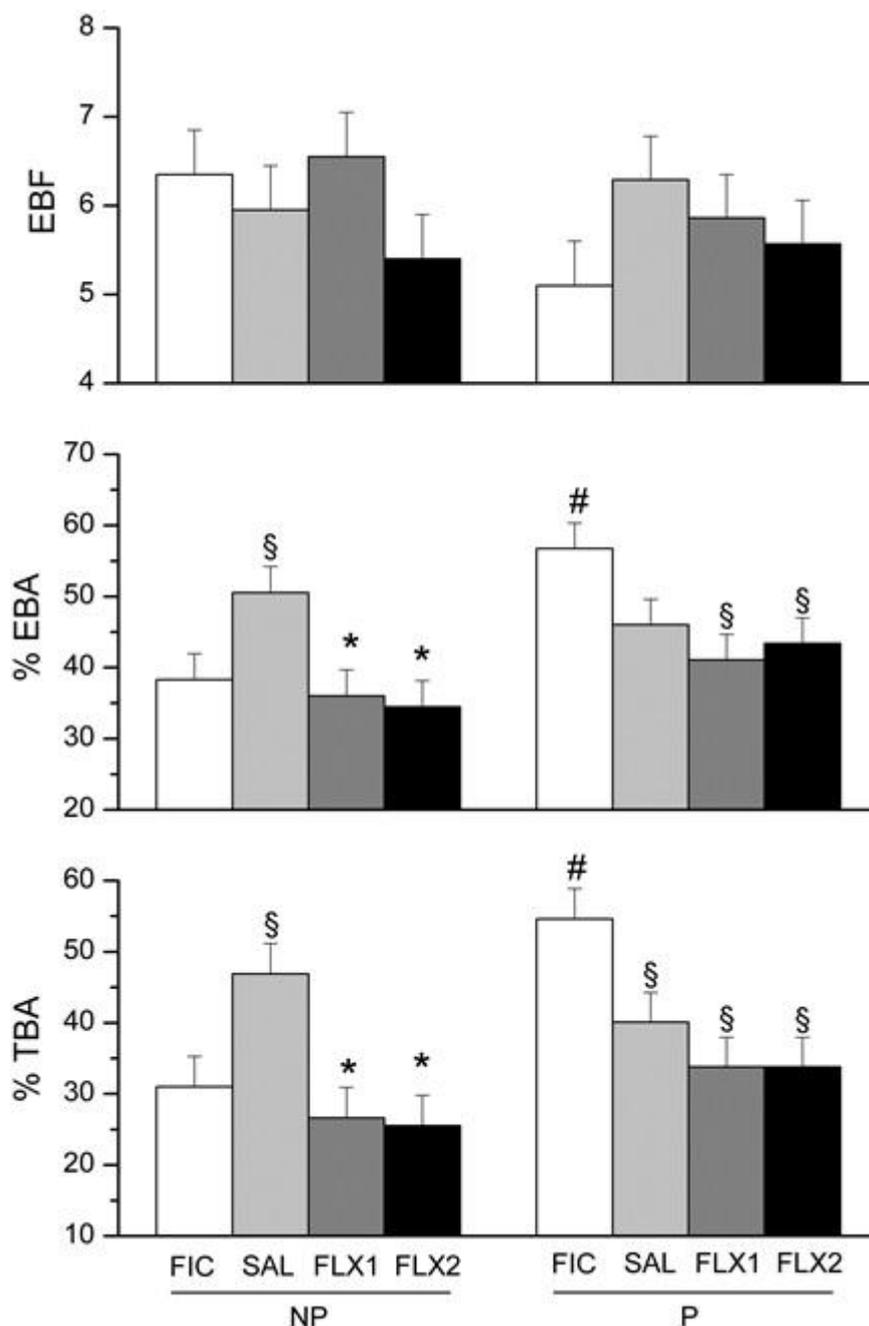


Figura 10. Efeitos do isolamento social no teste do labirinto-em-cruz elevado em ratos tratados ficticiamente (FIC), salina (SAL) e 1 e 2 mg/kg de fluoxetina (FLX1 e FLX2, respectivamente). EBF - entradas no braço fechado, %EBA - porcentagem de entradas no braço aberto, %TBA - porcentagem de tempo no braço aberto, NP ratos não-privados, P - ratos privados. *, estatisticamente diferente do grupo SAL. #, estatisticamente diferente do grupo FIC (critério de 5% de Bonferroni).

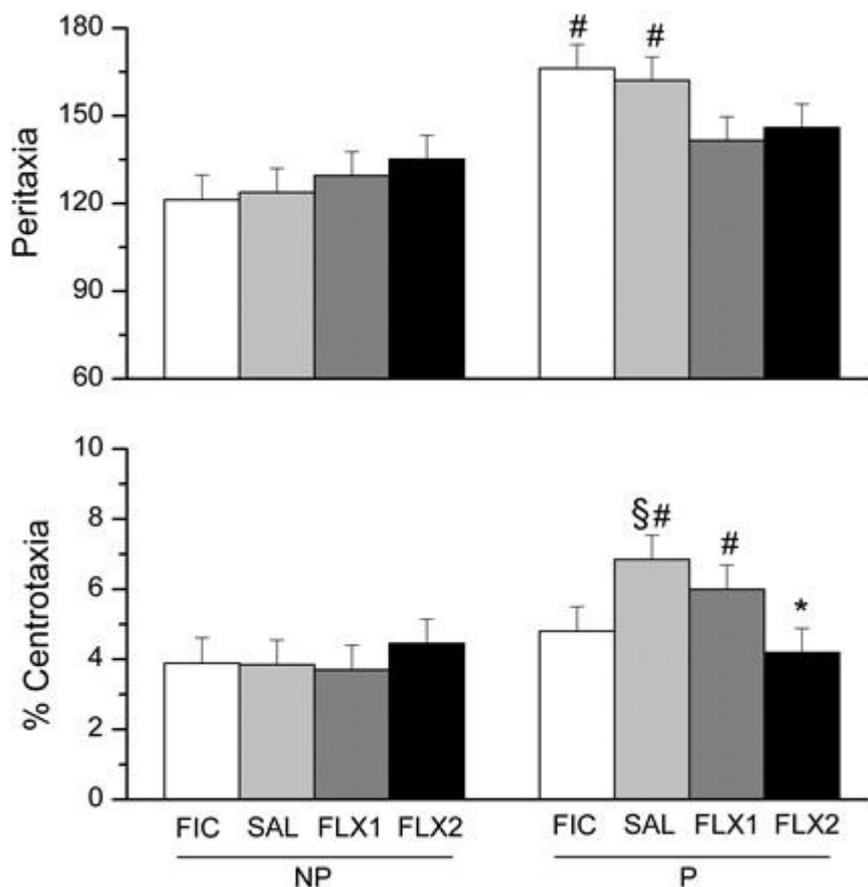


Figura 11. Efeitos do isolamento social no teste do campo aberto em ratos tratados ficticiamente (FIC), salina (SAL) e 1 e 2 mg/kg de fluoxetina (FLX1 e FLX2, respectivamente). Centrotaxia e Peritaxia - quadrantes percorridos no centro e na periferia, respectivamente, NP ratos não-privados, P - ratos privados. *, estatisticamente diferente do grupo SAL. #, estatisticamente diferente do NP. §, estatisticamente diferente grupo FIC (critério de 5% de Bonferroni).

Efeitos do ISN e dos tratamentos sobre o desempenho dos ratos no NF

Os grupos apresentaram diferenças altamente significantes no NF ($F_{7,154} = 6,8$; $p < 0,0001$). As diferenças foram devidas à privação ($F_{1,154} = 25,9$; $p < 0,0001$), tratamento ($F_{3,154} = 4,3$; $p < 0,01$) e às interações destes fatores ($F_{3,154} = 3,0$; $p < 0,05$). Comparados ao grupo NP, os ratos P apresentaram tempos maiores de imobilidade nos tratamentos FIC ($t = 4,3$; $p < 0,0001$), SAL ($t = 3,3$; $p < 0,001$) e FLX1 ($t = 2,0$; $p < 0,05$) (Figura 12). O tratamento FLX2 suprimiu as diferenças entre ratos P e NP. Nos ratos P, a duração da imobilidade foi significativamente reduzida nos tratamentos FLX1 e FLX2 quando comparados aos tratamentos FIC ($t = 2,7$; $p < 0,01$;

$t= 3,6$; $p<0,0005$) e SAL ($t= 2,63$; $p<0,01$; $t= 3,5$; $p<0,0005$), respectivamente (Figura 12).

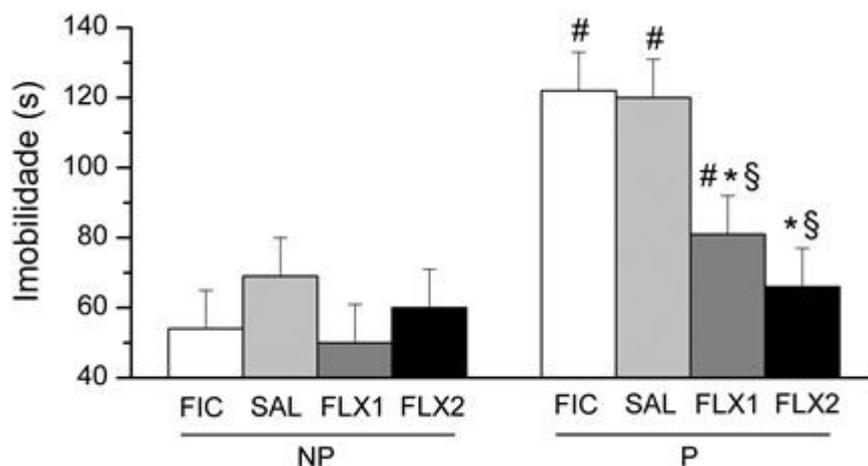


Figura 12. Efeitos do isolamento social no teste da natação forçada em ratos tratados ficticiamente (FIC), salina (SAL) e 1 e 2 mg/kg de fluoxetina (FLX1 e FLX2, respectivamente). Imobilidade - Tempo de imobilidade (natação passiva), NP - ratos não-privados, P - ratos privados. *, estatisticamente diferente do grupo SAL. #, estatisticamente diferente do NP. §, estatisticamente diferente grupo FIC (critério de 5% de Bonferroni).

Efeitos do ISN e dos tratamentos no teste de anedonia

Os grupos apresentaram diferenças significantes tanto na ingestão de água ($F_{7,144}= 4,0$; $p<0,0005$) quanto sacarose ($F_{7,144}= 10,6$; $p<0,0001$). No consumo de água, estas diferenças foram devidas tanto à privação ($F_{1,144}= 5,0$; $p<0,05$) quanto tratamento ($F_{3,144}= 5,3$; $p<0,005$) (Figura 13), enquanto que para o consumo de sacarose as diferenças forma devidas à privação ($F_{1,144}= 35,7$; $p<0,0001$), tratamento ($F_{3,144}= 9,2$, $p<0,0001$) e à interação destes fatores ($F_{3,144}= 3,1$; $p<0,05$). Em particular, o grupo NP apresentou um consumo maior de solução açucarada do que os ratos P ($t= 5,9$; $p<0,0001$). Nos ratos P, a SAL ($t= 4,3$; $p<0,0001$) e a FLX2 ($t= 2,1$; $p<0,05$) reduziram o consumo de sacarose em relação aos grupos FIC e FLX1, respectivamente. Adicionalmente, o consumo de açúcar foi aumentado tanto pela FLX1 ($t= 4,5$; $p<0,0001$) quanto pela FLX2 ($t= 2,1$; $p<0,05$) em relação ao grupo

SAL. Os ratos privados FIC ($t= 3,0$; $p<0,005$), SAL ($t= 5,4$; $p<0,0001$) e FLX2 ($t= 2,3$; $p<0,05$) (Figura 13) apresentaram um consumo menor de sacarose quando comparados aos mesmos tratamentos do grupo NP. A redução do consumo de sacarose nos ratos privados tratados com SAL foi revertida pelos tratamentos FLX1 ($t= 5,3$; $p<0,0001$) e FLX2 ($t= 3,0$; $p<0,005$) (Figura 13).

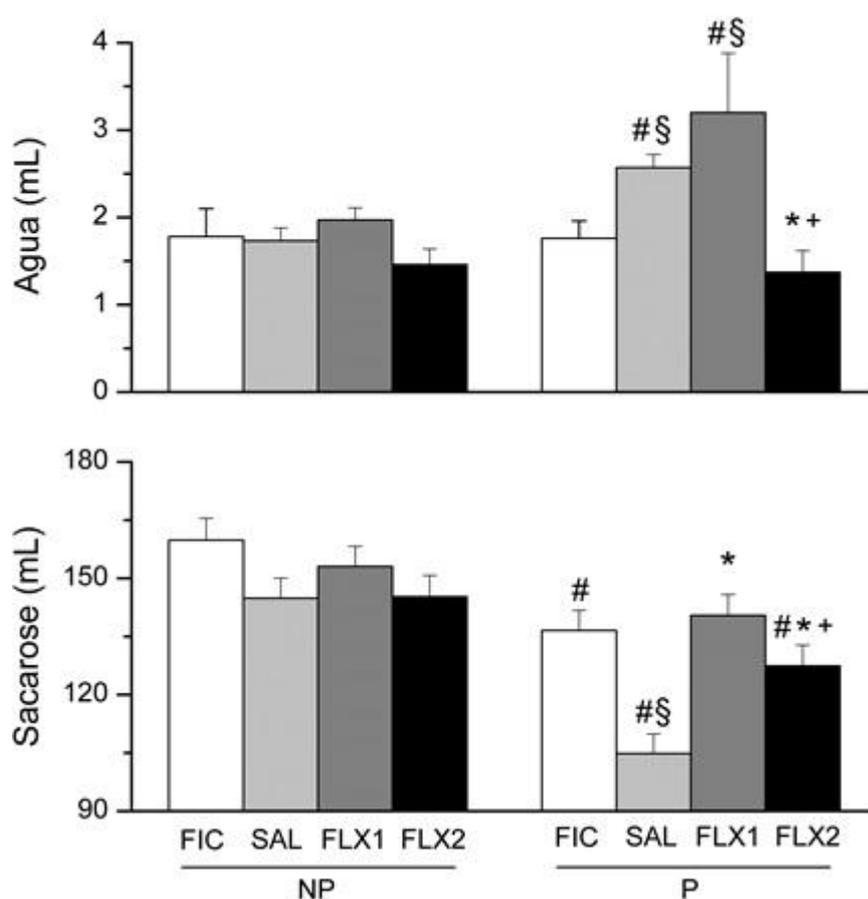


Figura 13. Efeitos do isolamento social no teste de anedonia em ratos tratados ficticiamente (FIC), salina (SAL) e 1 e 2 mg/kg de fluoxetina (FLX1 e FLX2, respectivamente). NP ratos não-privados, P - ratos privados. *, estatisticamente diferente do grupo SAL. #, estatisticamente diferente do NP. \$, estatisticamente diferente grupo FIC. +, estatisticamente diferente de FLX1 (critério de 5% de Bonferroni).

Efeitos do ISN e dos tratamentos no peso dos ratos

O peso dos ratos apresentou diferenças significantes em PN60 ($F_{7,155}= 4,2$, $p<0,0005$) e PN81 ($F_{7,155}= 3,3$, $p<0,005$). Estes efeitos foram devidos

unicamente à privação materna ($F_{1,154} = 15,9$, $p < 0,0001$, e $F_{1,154} = 14,8$, $p < 0,0005$; respectivamente), reduzindo o peso dos ratos tanto em PN60 ($t = 3,98$, $p < 0,0001$) quanto em PN81 ($t = 3,85$, $p < 0,0005$) (Figura 14). Embora não tenhamos observado diferenças entre os grupos P e NP tratados com FLX, este efeito pode ter sido devido às diferenças no peso basal (PN60) destes ratos.

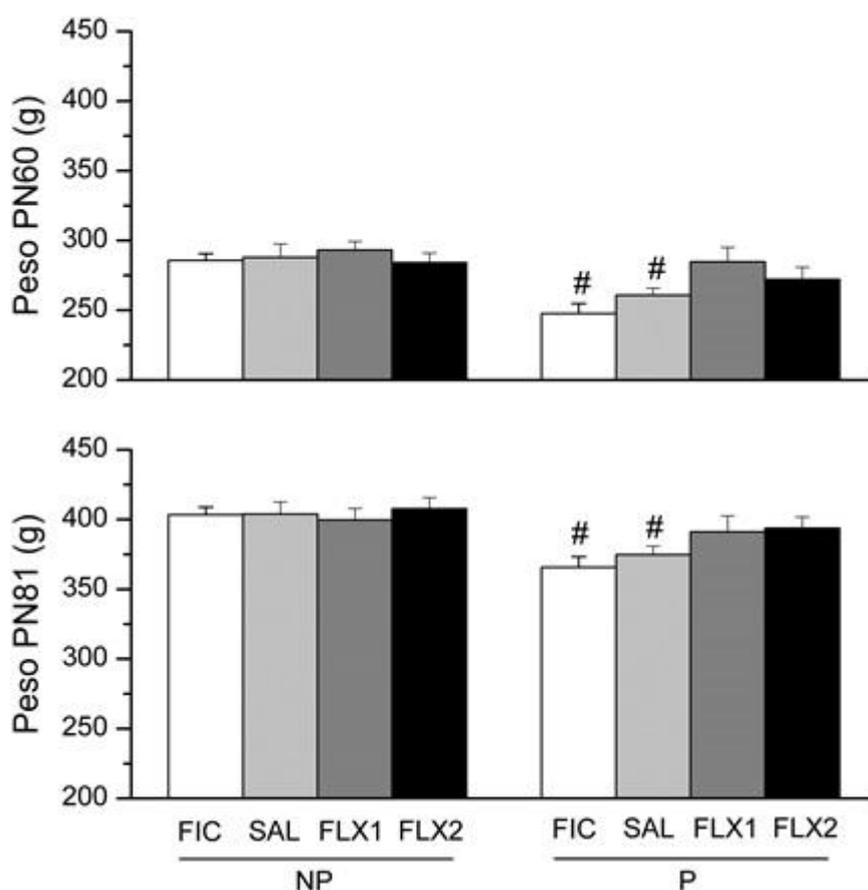


Figura 14. Efeitos do isolamento social no peso de ratos tratados ficticiamente (FIC), salina (SAL) e 1 e 2 mg/kg de fluoxetina (FLX1 e FLX2, respectivamente). NP ratos não-privados, P - ratos privados. #, estatisticamente diferente do NP correlato (critério de 5% de Bonferroni)

DISCUSSÃO

Efeitos do ISN e tratamentos sobre o LCE, CA, NF e anedonia.

O ISN (grupos FIC) produziu efeitos ansiolíticos no LCE, mas não no CA. Os efeitos ansiolíticos estão de acordo com outros estudos utilizando estes equipamentos e o LTE (Slotten *et al.*, 2006; Savignac *et al.*, 2011). Contudo, também existem vários estudos que não relataram qualquer alteração nos comportamentos de ansiedade nestes equipamentos e na caixa claro-escuro (Grace *et al.*, 2009; McIntosh *et al.*, 1999; Quintino-dos-Santos, 2011; Roman *et al.*, 2006). De acordo com a teoria tradicional dos efeitos tardios do estresse da infância (Bowlby, 1973), também existem estudos ou que relataram o aumento da ansiedade em ratos P expostos ao LCE (Daniels *et al.*, 2004; Huot *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2005; Pascual e Zamora-León, 2007; Troakes e Ingram, 2009; Wigger e Neumann, 1999). Os resultados contraditórios podem ter sido devidos à enorme variedade de procedimentos de "privação materna" (Lehmann e Feldon, 2000).

Em contraste, os efeitos depressivos do ISN nos testes da NF e anedonia estão de acordo tanto com as predições da teoria tradicional quanto com os estudos recentes (Aisa *et al.*, 2008; El Khoury *et al.*, 2006; Huot *et al.*, 2001; Lambás-Señas *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2007). Portanto, a ausência de efeitos na duração da flutuação relatada por Quintino-dos-Santos (2011) pode ter sido devida às condições particulares do último estudo, quais sejam, o estresse cirúrgico da craniotomia para exposição do seio venoso e o alojamento pós-cirúrgico em caixas isoladas. O desenvolvimento de anedonia nos ratos P do presente estudo é um aspecto notável, uma vez que esta resposta independe dos sistemas motores tanto da fuga eliciada por estimulação da MCPA quanto da natação no teste do NF.

Portanto, os efeitos do ISN não podem ser atribuídos à mera inibição dos sistemas motores. No conjunto, nossos resultados sugerem que os ratos submetidos ao ISN apresentam uma síndrome bastante similar à depressão. Em contraste, estes resultados tornam improvável a produção de ansiedade nas condições do presente estudo.

Efeitos da FLX sobre as respostas nos testes do LCE, CA, NF e anedonia de ratos P e NP.

Comparado ao grupo SAL dos ratos NP, os tratamentos com FLX reverteram os efeitos ansiolíticos do ISN no LCE. Contudo, o tratamento SAL produziu efeitos ansiolíticos inesperados quando comparados aos do grupo FIC, o que pode ter comprometido os resultados da análise. A diferença entre SAL e os tratamentos com FLX não foi observada nos ratos P.

Aparentemente, os resultados do CA foram mais claros que aqueles do LCE. De fato, os tratamentos não diferiram nos ratos NP nem em relação à peritaxia, nem centrotaxia. Contudo, o tratamento SAL dos ratos P produziu aumentos significativos em ambas as variáveis em relação aos ratos NP. Efeitos similares foram observados para a peritaxia no grupo FIC. Estes efeitos foram revertidos pelos tratamentos com FLX. Contudo, o aumento significativo da atividade geral (peritaxia) dos ratos P pode comprometer a análise dos efeitos da FLX na centrotaxia. Portanto, tanto os resultados no LCE quanto no CA são inconclusivos e merecem estudos adicionais com ansiolíticos tradicionais (e.g., diazepam) e com uma dose maior de FLX. De fato, a literatura é contraditória quanto aos efeitos dos ISRSs em modelos pré-clínicos de ansiedade. Assim, enquanto alguns estudos relatam a

produção de efeitos ansiogênicos no LCE após a administração aguda e crônica dos ISRSs (Handley e McBlane, 1992; Kshama *et al.*, 1990; Petkov *et al.*, 1995; Silva *et al.*, 1999), outros relatam efeitos ansiolíticos dos tratamentos crônicos (Huot *et al.*, 2001), ou ausência de efeitos tanto em tratamentos agudos e crônicos com estes agentes (Durcan *et al.*, 1988; Griebel *et al.*, 1997; Oh *et al.*, 2009; Sánchez e Meier, 1997; Sánchez, 1995).

Os resultados são mais consistentes em relação aos testes de depressão. Neste sentido, a FLX suprimiu os efeitos pró-depressivos do ISN tanto no NF quanto no teste da anedonia em relação ao tratamento com SAL, endossando o perfil depressivo dos ratos P. É importante notar que as injeções de SAL reduziram o consumo de sacarose destes ratos quando comparados ao tratamento FIC, sugerindo que os ratos P sejam menos resilientes ao estresse da captura e injeções diárias que os ratos NP. Embora não tenhamos observado diferenças entre os pesos dos grupos P e NP tratados com FLX (PN81), este efeito pode ter sido devido às diferenças no peso basal (PN60) destes ratos. Os efeitos da FLX sugerem o envolvimento da transmissão serotoninérgica nos efeitos pró-depressivos do ISN, corroborando diversos estudos com modelos pré-clínicos de depressão (Chen *et al.*, 2012; Djordjevic *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2009; Rayen *et al.*, 2011; Rygula *et al.*, 2006; Strelakova *et al.*, 2006; Thompson *et al.*, 2004).

Efeitos do ISN sobre os limiares basais (PN59) das respostas de defesa produzidas pela estimulação elétrica da MCPAd

O ISN facilitou as respostas de exoftalmia, imobilidade, trote, galope e salto, corroborando as observações de Quintino-dos-Santos (2011). Estes

resultados foram validados pela localização praticamente idêntica dos sítios de estimulação dos grupos P e NP, tanto neste quanto no último estudo, majoritariamente localizados nas MCPAdl e, em menor grau, MCPAl. Adicionalmente, Bittencourt *et al.* (2004) mostraram que a estimulação elétrica não é capaz de discriminar os repertórios defensivos destas colunas. Portanto, as diferenças observadas nos limiares basais dos comportamentos de defesa dos ratos P e NP foram provavelmente devidas ao procedimento de ISN. No conjunto, este estudo e o de Quintino-dos-Santos (2011) fornecem evidências pré-clínicas robustas dos efeitos predisponentes do estresse da primeira infância no desenvolvimento dos AP na vida adulta.

Contudo, as reduções nos limiares dos comportamentos defensivos no grupo P foram menores que aquelas observadas por Quintino-dos-Santos (2011). De fato, enquanto o último autor relatou reduções de até 30% nos limiares das respostas de defesa dos ratos P, o presente estudo mostrou reduções menores, porém significantes, entre 11% e 15%, a despeito do mesmo procedimento de ISN de Quintino-dos-Santos (2011). Embora pequenas, as reduções dos limiares foram bastante consistentes, pois estão baseadas em grandes amostras (83 P e 80 NP), conforme prescreve a análise de dados binários. Portanto, as diferenças destes estudos devem ter sido devidas à cirurgia menos invasiva de implantação do eletrodo (não foi feita craniotomia para exposição do seio venoso) e ao alojamento dos animais em caixas coletivas no período pós-cirúrgico do presente estudo. De fato, Konkle *et al.* (2010) mostraram que o alojamento em grupo, inserção de objetos e utilização de caixas maiores, aumenta a interação social e melhora a saúde dos animais, tornando-os mais resilientes às condições adversas. Mais importante, Fournier *et al.* (2011, 2013) observaram que a simples mudança no agrupamento

dos animais de duplas para tríades no período pós-desmame suprime o efeito facilitatório do ISN nas respostas respiratórias de ratos adultos à hipóxia, um modelo experimental de pânico respiratório (Dumont e Kinkead, 2010; Genest *et al.*, 2004, 2007a, 2007b). Os resultados deste estudo e os de Fournier *et al.* (2011, 2013) sugerem que a manutenção dos laços sociais na vida adulta atenua os efeitos tardios do ISN. A importância do ambiente da vida adulta também foi demonstrada por estudos epidemiológicos em gêmeos que sugerem que as predisposições genéticas e o ambiente da fase adulta contribuem com 34,8% e 64% dos AP, respectivamente, enquanto o ambiente da infância contribuiria com apenas 1,2% destes ataques (Roberson-Nay *et al.*, 2012). Embora os efeitos pequenos do estresse da infância do presente estudo se assemelhem às observações em humanos dos últimos autores, os resultados de Quintino-dos-Santos (2011) sugerem que os efeitos do ambiente infantil possam ser significativamente potenciados pelas situações estressantes da vida adulta, um tipo de interação que não foi analisado por Roberson-Nay *et al.* (2012). De fato, Spatola *et al.* (2011) observaram interações significantes entre genes e ambiente infantil no modelo de AP em humanos por inalação de CO₂.

Efeitos da FLX sobre os limiares das respostas de defesa produzidas pela estimulação elétrica da MCPAd (PN60, 67, 74 e 81)

O grupo NP apresentou intensidades medianas bastante similares nos tratamentos FIC e SAL. De fato, o único efeito da administração de SAL foi um aumento pequeno, porém significativo, dos limiares de galope ao final do tratamento (21,7%). A ausência de efeitos da SAL sobre as respostas defensivas e a ausência

de alterações dos limiares no tratamento FIC dos ratos NP corroboram estudos anteriores do nosso laboratório mostrando a estabilidade dos limiares de defesa nas 4 semanas posteriores à cirurgia (Vargas e Schenberg, 2001). Estes resultados tornam improvável a deterioração da preparação por lesão da área estimulada ou o afrouxamento da prótese e deslocamento do eletrodo.

Ao contrário do estudo de Vargas e Schenberg (2001), o tratamento dos ratos NP com 1 mg/kg/dia de FLX não teve efeito algum sobre os limiares das respostas de defesa. Contudo, aquele estudo foi corroborado, e até mesmo ampliado, pelo tratamento com a dose de 2 mg/kg/dia de FLX, no qual foram observados aumentos acentuados, entre 24% e 65%, dos limiares de todas as respostas de defesa do grupo NP. O aumento de 65% nos limiares do salto é notável, uma vez que esta resposta só foi inibida pelo tratamento crônico com clomipramina nos estudos anteriores do nosso laboratório (Vargas e Schenberg, 2001; Schenberg *et al.*, 2001). Conseqüentemente, a supressão seletiva e quase completa da resposta de galope relatada por Vargas e Schenberg (2001) para o tratamento crônico com 1 mg/kg de FLX (aumento de 738% da I_{50}) deve ser atribuída às condições particulares daquele estudo. Dentre estas, merecem destaque o estresse da cirurgia com craniotomia para exposição do seio venoso e o alojamento dos ratos em gaiolas de vidro individuais.

Embora Deakin e Graeff (1991) tenham sugerido que a MCPAd seja inibida pelas projeções serotoninérgicas do NDR, Andersen *et al.* (1999) mostraram que os níveis tissulares da 5-HT do NDR de ratos adultos submetidos ao protocolo do ISN não diferem dos ratos NP. Similarmente, Rosa (2012) mostrou que os níveis tissulares de 5-HT e de seu metabólito, o 5-HIAA, na MCPAd e MCPAv, foram igualmente aumentados nos ratos P e NP, possivelmente, devido à manipulação dos

filhotes de ambos os grupos durante a lactação. Estes estudos tornam improváveis os efeitos diferenciados do ISN na síntese ou metabolismo da 5-HT. Assim, os efeitos do presente estudo devem ter sido devidos à alteração na expressão ou na sensibilidade de receptores ou transportadores de 5-HT (Marais *et al.*, 2008; Matthews *et al.*, 2001; Vicentic *et al.*, 2006). De fato, os ratos submetidos ao ISN apresentaram tanto a redução do transportador e dos receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} no tronco cerebral (Oreland *et al.*, 2009), quanto o aumento da sensibilidade dos receptores 5-HT_{1A} do NDR (Arborelius *et al.*, 2004). De forma similar, Spinelli *et al.* (2010) observaram que macacos submetidos ao isolamento total por 14 dias apresentaram uma redução da densidade dos receptores 5-HT_{1A} de regiões presumivelmente envolvidas na depressão, tais como o hipocampo, os córtices cingulados medial e anterior, amígdala, CPF dorsomedial e nos núcleos da rafe. Embora a MCPA não tenha sido estudada em nenhum destes casos, estes estudos sugerem que a expressão dos receptores 5-HT_{1A} da MCPAd possa ter sido reduzida nos ratos P, facilitando os comportamentos de defesa à estimulação desta estrutura.

Ao contrário dos ratos NP, os ratos submetidos ao ISN apresentaram o aumento progressivo dos limiares de todas as respostas de defesa ao longo das sessões de estimulação em todos os tratamentos. Este efeito sugere o déficit motivacional à exposição repetida a eventos aversivos em modelos experimentais de depressão, tal como ocorre nas sessões pré-teste e teste do NF e do desamparo aprendido (*learned helplessness*). De fato, dados recentes de PET mostram que enquanto a MCPA é marcadamente ativada na sessão pré-teste do NF, ela permanece inativa na sessão-teste conduzida 24 h após (Jang *et al.*, 2009). Mais importante, um estudo recente do nosso laboratório mostrou que os limiares dos comportamentos de defesa por estimulação da MCPAd são progressivamente

aumentados em ratos previamente submetidos a choques inescapáveis (Quintino-dos-Santos *et al.*, 2013).

Por outro lado, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos nos ratos P, nem mesmo entre a maior dose de FLX e os grupos FIC e SAL. Estudos iniciais sobre a sensibilidade farmacológica do TP são contraditórios em relação à resistência aumentada aos panicolíticos dos pacientes com depressão e pânico comórbidos (Gorman, 1996; Lecrubier, 1998). Contudo, observações recentes de Marchesi *et al.* (2006) sugerem que a presença de depressão reduz a probabilidade da remissão completa do TP nos pacientes tratados com paroxetina ou citalopram. De fato, existem vários estudos mostrando o agravamento dos sintomas no pânico comórbido com depressão (Johnson e Lydiard, 1998; Roy-Byrne *et al.*, 2000). Similarmente, nossos resultados sugerem que a presença de depressão reduz a eficácia da FLX em inibir o pânico experimental. Não obstante, é interessante notar que os AP induzidos por infusão de LAC não foram nem facilitados, nem inibidos nos pacientes com pânico complicado por depressão (McGrath *et al.*, 1988).

Conclusões

Os resultados do presente estudo corroboraram observações anteriores em ratos NP (Vargas e Schenberg, 2001) que mostram que os comportamentos de defesa induzidos por estimulação elétrica da MCPAd são sensíveis ao tratamento crônico com doses baixas de FLX. Estes dados revalidam o modelo de AP por estimulação da MCPAd. Adicionalmente, o presente estudo sugere o ISN produza uma facilitação do pânico experimental por estimulação da

MCPAd e que o agrupamento dos animais minimizou este resultado. Além disso, o tratamento agudo e crônico com FLX não foi capaz de promover o aumento diferencial aos demais tratamentos dos limiares defensivos dos ratos submetidos ao ISN. Nossos dados também sugerem que o ISN seja um modelo experimental de depressão que leva ao desenvolvimento da anedonia e à potenciação do comportamento de flutuação no NF, e que o tratamento crônico com FLX reverte estes efeitos. As características depressivas destes ratos também foram ressaltadas pelo déficit motivacional à estimulação repetida da MCPAd. O perfil depressivo e a facilitação do pânico dos ratos P são similares às observações em pacientes adultos que apresentaram ansiedade severa de separação na infância (Gittelman-Klein, 1995).

REFERÊNCIAS

Ainsworth, M.D.S., Bowlby, J., 1991. An ethological approach to personality development. *American Psychologist* 46, 331–341.

Aisa, B., Tordera, R., Lasheras, B., Del Río, J., Ramírez, M.J., 2008. Effects of maternal separation on hypothalamic-pituitary-adrenal responses, cognition and vulnerability to stress in adult female rats. *Neuroscience* 154, 1218–1226.

Albano, A.M., Chorpita, B.R., Barlow, D.H., 1996. Childhood anxiety disorders. Em: Mash, E.J., Barkley, R.A. (Eds.), *Child Psychopathology*. Guilford Press, New York, pp. 196–241.

Alves, A.C.A., 2007. Funções Comportamentais das divisões compacta e difusa do núcleo dorsomedial do hipotálamo de ratos. Dissertação de Mestrado. UFES. Vitória.

Andersen, S.L., Lyss, P.J., Dumont, N.L., Teicher, M.H., 1999. Enduring neurochemical effects of early maternal separation on limbic structures. *Annals of the New York Academy of Sciences* 877, 756–759.

Antunes-Rodrigues, J., De Castro, M., Elias, L.L.K., Valença, M.M., McCann, S.M., 2004. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. *Physiological reviews* 84, 169–208.

APA, 1980. *DSM-III: Diagnostic and Statistical Manual for Mental Disorders of American Psychiatric Association.*, 3rd ed. American Association Psychiatry, Washington, DC.

APA, 2000. DSM-IV-TR: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders of American Psychiatric Association., 4th ed. American Psychiatry Association, Washington, DC.

Arborelius, L., Hawks, B.W., Owens, M.J., Plotsky, P.M., Nemeroff, C.B., 2004. Increased responsiveness of presumed 5-HT cells to citalopram in adult rats subjected to prolonged maternal separation relative to brief separation. *Psychopharmacology* 176, 248–255.

Armini, R. de S., 2012. Respostas neuroendócrinas de um modelo experimental de ataque de pânico. Dissertação de Mestrado. UFES. Vitória.

Aschenbrand, S.G., Kendall, P.C., Webb, A., Safford, S.M., Flannery-Schroeder, E., 2003. Is childhood separation anxiety disorder a predictor of adult panic disorder and agoraphobia? A seven-year longitudinal study. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry* 42, 1478–1485.

Bandler, R., Carrive, P., Depaulis, A., 1991. Emerging principles of organization in the midbrain periaqueductal gray matter. Em: Depaulis, A., Bandler, R. (Eds.), *The Midbrain Periaqueductal Gray Matter: Functional, Anatomical and Neurochemical Organization*. Plenum Press, New York, pp. 1–8.

Battaglia, M., Bertella, S., Politi, E., Bernardeschi, L., Perna, G., Gabriele, A., Bellodi, L., 1995. Age at onset of panic disorder: influence of familial liability to the disease and of childhood separation anxiety disorder. *The American journal of psychiatry* 152, 1362–1364.

Bavis, R.W., Mitchell, G.S., 2008. Long-term effects of the perinatal environment on respiratory control. *Journal of Applied Physiology* 104, 1220–1209.

Bell-Dolan, D., 1995. Separation anxiety disorder. Em: Ammerman, R.T., Hersen, M. (Eds.), *Handbook of Child Behavior Therapy in the Psychiatric Settings*. Wiley, New York, pp. 217–298.

Bernstein, G.A., Borchardt, C.M., 1996. School refusal: Family constellation and family functioning. *Journal of Anxiety Disorders* 10, 1–19.

Bernstein, G.A., Borchardt, C.M., Perwien, A.R., Crosby, R.D., Kushner, M.G., Thuras, P.D., Last, C.G., 2000. Imipramine plus cognitive-behavioral therapy in the treatment of school refusal. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry* 39, 276–283.

Biederman, J., Petty, C., Faraone, S. V, Ph, D., Hirshfeld-becker, D.R., Henin, A., Rauf, A., Scott, M., Pollack, M., Rosenbaum, J.F., 2005. Childhood antecedents to panic disorder in referred and nonreferred adults. *Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology* 15, 549–561.

Biederman, J., Petty, C.R., Hirshfeld-Becker, D.R., Henin, A., Faraone, S. V, Fraire, M., Henry, B., McQuade, J., Rosenbaum, J.F., 2007. Developmental trajectories of anxiety disorders in offspring at high risk for panic disorder and major depression. *Psychiatry Research* 153, 245–252.

Bittencourt, A.S., Carobrez, A. de P., Zamprogno, L.P., Tufik, S., Schenberg, L.C., 2004. 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* 125, 71–89.

Bittencourt, A.S., Nakamura-Palacios, E.M., Mauad, H., Schenberg, L.C., 2005. Organization of electrically and chemically evoked defensive behaviors

within the Deeper Collicular Layers as compared to the Periaqueductal Gray Matter of the rat. *Neuroscience* 133, 873–892.

Black, B., 1995. Anxiety disorders in children and adolescents. Em: March, J. (Ed.), *Separation Anxiety Disorder and Panic Disorder*. Guildford Press, New York, pp. 212–234.

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, 1243–1253.

Blanchard, R.J., Flannelly, K.J., Blanchard, D.C., 1986. Defensive behavior of laboratory and wild *Rattus norvegicus*. *Journal of Comparative Psychology* 100, 101–107.

Blanchard, R.J., Griebel, G., Guardiola-Lemaître, B., Brush, M.M., Lee, J., Blanchard, D.C., 1997. An ethopharmacological analysis of selective activation of 5-HT_{1A} receptors: the mouse 5-HT_{1A} syndrome. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 57, 897–908.

Blaymore Bier, J. a., Ferguson, a. E., Morales, Y., Liebling, J. a., Oh, W., Vohr, B.R., 1997. Breastfeeding Infants Who Were Extremely Low Birth Weight. *Pediatrics* 100, E3.

Bowlby, J., 1973. *Attachment and Loss.*, 2nd ed. Basic Books, New York, NY.

Boyd, C.P., Kostanski, M., Gullone, E., Ollendick, T.H., Shek, D.T., 2000. Prevalence of anxiety and depression in Australian adolescents: comparisons with worldwide data. *The Journal of Genetic Psychology* 161, 479–492.

Brandão, M.L., Lopez-Garcia, J.A., Graeff, F.G., Roberts, M.H., 1991. Electrophysiological evidence for excitatory 5-HT₂ and depressant 5-HT_{1A} receptors on neurones of the rat midbrain tectum. *Brain Research* 556, 259–266.

Bretherton, I., 1992. The origins of attachment theory: John Bowlby and Mary Ainsworth. *Developmental psychobiology* 28, 759–775.

Brown, K.J., Grunberg, N.E., 1995. Effect of housing on male and female rats: crowding stresses males but calms females. *Physiology and Behavior* 58, 1085–1089.

Brown, T.A., Barlow, D.H., 1992. Comorbidity among anxiety disorders: implications for treatment and DSM-IV. *Journal of Consulting and Clinical Psychology* 60, 835–844.

Brown, T.A., Campbell, L.A., Lehman, C.L., Grisham, J.R., Mancill, R.B., 2001. Current and lifetime comorbidity of the DSM-IV anxiety and mood disorders in a large clinical sample. *Journal of Abnormal Psychology* 110, 585–599.

Burgess, M.L., Davis, J.M., Wilson, S.P., Borg, T.K., Burgess, W.A., Buggy, J., 1993. Effects of intracranial self-stimulation on selected physiological variables in rats. *The American Journal of Physiology* 264, 149–155.

Carrive, P., 1993. The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. *Behavioural Brain Research* 58, 27–47.

Cartwright-Hatton, S., McNicol, K., Doubleday, E., 2006. Anxiety in a neglected population: prevalence of anxiety disorders in pre-adolescent children. *Clinical psychology Review* 26, 817–833.

Casarotto, P.C., De Bortoli, V.C., Corrêa, F.M.A., Resstel, L.B., Zangrossi, H., 2010. Panicolytic-like effect of BDNF in the rat dorsal periaqueductal grey matter: the role of 5-HT and GABA. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 13, 573–582.

Cassano, G.B., Savino, M., 1993. Symptomatology of panic disorder: an attempt to define the panic-agoraphobic spectrum phenomenology. Em: Montgomery, S.A. (Ed.), *The Psychopharmacology of Panic*. Oxford University Press, New York, pp. 38–57.

Cayetanot, F., Larnicol, N., Peyronnet, J., 2009. Antenatal environmental stress and maturation of the breathing control, experimental data. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 168, 92–100.

Chapman, W.P., Schroeder, H.R., Geyer, G., Brazier, M.A., Fager, C., Poppen, J.L., Solomon, H.C., Yakovlev, P.I., 1954. Physiological evidence concerning importance of the amygdaloid nuclear region in the integration of circulatory function and emotion in man. *Science* 120, 949–950.

Charney, D.S., Manji, H.K., 2004. Life stress, genes, and depression: multiple pathways lead to increased risk and new opportunities for intervention. *Science's STKE* 2004, re5.

Chen, Y.C., Tan, Q.R., Dang, W., Wang, H.N., Zhang, R.B., Li, Z.Y., Lin, H., Liu, R., 2012. The effect of citalopram on chronic stress-induced depressive-

like behavior in rats through GSK3 β / β -catenin activation in the medial prefrontal cortex. *Brain Research Bulletin* 88, 338–344.

Cohen, M.E., White, P.D., 1951. Life situations, emotions, and neurocirculatory asthenia (anxiety neurosis, neurasthenia, effort syndrome). *Psychosomatic Medicine* 13, 335–357.

Collett, D., 1991. *Modelling binary data*. Chapman & Hall, London.

Costello, E.J., Mustillo, S., Erkanli, A., Keeler, G., Angold, A., 2003. Prevalence and development of psychiatric disorders in childhood and adolescence. *Archives of General Psychiatry* 60, 837–844.

Daniels, W.M.U., Pietersen, C.Y., Carstens, M.E., Stein, D.J., 2004. Maternal separation in rats leads to anxiety-like behavior and a blunted ACTH response and altered neurotransmitter levels in response to a subsequent stressor. *Metabolic Brain Disease* 19, 3–14.

David, D.J., Wang, J., Samuels, B.A., Rainer, Q., David, I., Gardier, A.M., Hen, R., 2010. Implications of the functional integration of adult-born hippocampal neurons in anxiety-depression disorders. *The Neuroscientist* 16, 578–591.

De Molina, A.F., Hunsperger, R.W., 1962. Organization of the subcortical system governing defence and flight reactions in the cat. *The Journal of Physiology* 160, 200–213.

De Paula Soares, V., Zangrossi, H., 2004. Involvement of 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors of the dorsal periaqueductal gray in the regulation of the defensive behaviors generated by the elevated T-maze. *Brain Research Bulletin* 64, 181–188.

Deakin, J.W.F., Graeff, F.G., 1991. 5-HT and mechanisms of defense. *Journal of Psychopharmacology* 5, 305–315.

Devries, A.C., Glasper, E.R., Detillion, C.E., 2003. Social modulation of stress responses. *Physiology and Behavior* 79, 399–407.

Dijkstra, H., Tilders, F.J., Hiehle, M.A., Smelik, P.G., 1992. Hormonal reactions to fighting in rat colonies: prolactin rises during defence, not during offence. *Physiology and Behavior* 51, 961–968.

DiMicco, J.A., Samuels, B.C., Zaretskaia, M. V, Zaretsky, D. V, 2002. The dorsomedial hypothalamus and the response to stress: part renaissance, part revolution. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 71, 469–480.

Djordjevic, A., Djordjevic, J., Elaković, I., Adzic, M., Matić, G., Radojic, M.B., 2012. Fluoxetine affects hippocampal plasticity, apoptosis and depressive-like behavior of chronically isolated rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 36, 92–100.

Dorow, R., Horowski, R., Paschelke, G., Amin, M., 1983. Severe anxiety induced by FG 7142, a beta-carboline ligand for benzodiazepine receptors. *Lancet* 2, 98–99.

Droste, S.K., Gesing, A., Ulbricht, S., Mu, M.B., Linthorst, A.C.E., Reul, J.M.H.M., 2003. Effects of Long-Term Voluntary Exercise on the Mouse Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Axis. *Endocrinology* 144, 3012–3023.

Dumont, F.S., Kinkead, R., 2010. Neonatal stress and attenuation of the hypercapnic ventilatory response in adult male rats: the role of carotid

chemoreceptors and baroreceptors. *American Journal of Physiology* 299, R1279–1289.

Dunner, D.L., 2001. Management of anxiety disorders: the added challenge of comorbidity. *Depression and Anxiety* 13, 57–71.

Durcan, M.J., Lister, R.G., Eckardt, M.J., Linnoila, M., 1988. Behavioral interactions of fluoxetine and other 5-hydroxytryptamine uptake inhibitors with ethanol in tests of anxiety, locomotion and exploration. *Psychopharmacology* 96, 528–533.

Ehlers, A., Breuer, P., 1996. How good are patients with panic disorder at perceiving their heartbeats? *Biological Psychology* 42, 165–182.

Eklund, M.B., Arborelius, L., 2006. Twice daily long maternal separations in Wistar rats decreases anxiety-like behaviour in females but does not affect males. *Behavioural Brain Research* 172, 278–285.

El Khoury, A., Gruber, S.H.M., Mørk, A., Mathe, A.A., 2006. Adult life behavioral consequences of early maternal separation are alleviated by escitalopram treatment in a rat model of depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 30, 535–540.

Epp, J.R., Spritzer, M.D., Galea, L.A.M., 2007. Hippocampus-dependent learning promotes survival of new neurons in the dentate gyrus at a specific time during cell maturation. *Neuroscience* 149, 273–285.

Ervin, F.R., Mark, V.H., Stevens, J., 1969. Behavioral and affective responses to brain stimulation in man. *Proceedings of the Annual Meeting of the American Psychopathological Association* 58, 54–65.

Essau, C.A., Conradt, J., Petermann, F., 2000. Frequency, comorbidity, and psychosocial impairment of anxiety disorders in German adolescents. *Journal of Anxiety Disorders* 14, 263–279.

Faravelli, C., Pallanti, S., 1989. Recent life events and panic disorder. *The American Journal of Psychiatry* 146, 622–626.

Fitz, S.D., Keim, S.R., Sajdyk, T.J., Shekhar, A., 2003. Reboxetine, a potent norepinephrine reuptake inhibitor blocks lactate- and CO₂-induced panic-like responses in panic-prone rats. *Society of Neuroscience* 959, 13.

Fournier, S., Joseph, V., Kinkead, R., 2011. Influence of juvenile housing conditions on the ventilatory, thermoregulatory, and endocrine responses to hypoxia of adult male rats. *Journal of Applied Physiology* 516–523.

Fournier, S., Kinkead, R., Joseph, V., 2013. Influence of housing conditions from weaning to adulthood on the ventilatory, thermoregulatory, and endocrine responses to hypoxia of adult female rats. *Journal of Applied Physiology* 1474–1481.

Francis, D.D., Meaney, M.J., 1999. Maternal care and the development of stress responses. *Current Opinion in Neurobiology* 9, 128–134.

Francis, G., Last, C.G., Strauss, C.C., 1987. Expression of separation anxiety disorder: the roles of age and gender. *Child Psychiatry and Human Development* 18, 82–89.

Freud, S., 1896. On the right to separate from neurasthenia a definite symptom-complex as “anxiety neurosis” (Angstneurose). In: Hutchins, R.M. (Ed.),

The Major Works of Sigmund Freud (Great Books of Western World). Encyclopaedia Britannica, London, p. 884.

Galatzer-Levy, I.R., Nickerson, A., Litz, B.T., Marmar, C.R., 2012. Patterns of lifetime PTSD comorbidity: a latent class analysis. *Depression and Anxiety*.

Galler, J.R., Seelig, C., 1981. Home-orienting behavior in rat pups: the effect of 2 and 3 generations of rehabilitation following intergenerational malnutrition. *Developmental psychobiology* 14, 541–548.

Garcia-Leal, C., Del-Ben, C.M., Leal, F.M., Graeff, F.G., Guimarães, F.S., 2010. Escitalopram prolonged fear induced by simulated public speaking and released hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation. *Journal of Psychopharmacology* 24, 683–694.

Garcia-Leal, C., Parente, A.C.B. V, Del-Ben, C.M., Guimarães, F.S., Moreira, A.C., Elias, L.L.K., Graeff, F.G., 2005. Anxiety and salivary cortisol in symptomatic and nonsymptomatic panic patients and healthy volunteers performing simulated public speaking. *Psychiatry Research* 133, 239–252.

Genest, S.-E., Balon, N., Laforest, S., Drolet, G., Kinkead, R., 2007a. Neonatal maternal separation and enhancement of the hypoxic ventilatory response in rat: the role of GABAergic modulation within the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *The Journal of Physiology* 583, 299–314.

Genest, S.-E., Gulemetova, R., Laforest, S., Drolet, G., Kinkead, R., 2004. Neonatal maternal separation and sex-specific plasticity of the hypoxic ventilatory response in awake rat. *The Journal of Physiology* 554, 543–557.

Genest, S.-E., Gulemetova, R., Laforest, S., Drolet, G., Kinkead, R., 2007b. Neonatal maternal separation induces sex-specific augmentation of the hypercapnic ventilatory response in awake rat. *Journal of Applied Physiology* 102, 1416–1421.

Gentil, V., 1988. The aversive System, 5-HT and panic attacks. Em: Simon, P., Soubrié, P., Wildlocher, D. (Eds.), *Animal Models of Psychiatric Disorders*. Basel Karger, pp. 142–145.

Gittelman-Klein, R., 1995. Is panic disorder associated with childhood separation anxiety disorder? *Clinical Neuropharmacology* 18, 7–14.

Gittelman-Klein, R., Klein, D.F., 1973. School phobia: diagnostic considerations in the light of imipramine effects. *The Journal of Nervous and Mental Disease* 156, 199–215.

Goodwin, G.A., Barr, G.A., 2005. Developmental changes in the behavioral and autonomic effects of kappa opioid receptor stimulation of the midbrain periaqueductal gray. *Developmental Psychobiology* 46, 47–56.

Goodwin, R.D., 2002. Anxiety disorders and the onset of depression among adults in the community. *Psychological Medicine* 32, 1121–1124.

Goodwin, R.D., Lieb, R., Hoefler, M., Pfister, H., Bittner, A., Beesdo, K., Wittchen, H.-U., 2004. Panic attack as a risk factor for severe psychopathology. *The American Journal of Psychiatry* 161, 2207–2214.

Gorman, J.M., 1996. Comorbid depression and anxiety spectrum disorders. *Depression and Anxiety* 4, 160–168.

Gorman, J.M., Browne, S.T., Papp, L.A., Martinez, J., Welkowitz, L., Coplan, J.D., Goetz, R.R., Kent, J., Klein, D.F., 1997. Effect of antipanic treatment on response to carbon dioxide. *Biological Psychiatry* 42, 982–991.

Gould, E., Beylin, A., Tanapat, P., Reeves, A., Shors, T.J., 1999. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nature Neuroscience* 2, 260–265.

Grace, L., Heschem, S., Kellaway, L.A., Bugarith, K., Russell, V.A., 2009. Effect of exercise on learning and memory in a rat model of developmental stress. *Metabolic brain disease* 24, 643–57.

Graeff, F.G., 1988. Animal models of aversion. Em: Simon, P., Soubrié, P., Wildlocher, D. (Eds.), *Selected Models of Anxiety, Depression and Psychosis*. Basel Karger, pp. 115–141.

Graeff, F.G., 2003. 5-HT, matéria cinzenta periaquedutal e transtorno do pânico. *Revista Brasileira de Psiquiatria* 42–45.

Graeff, F.G., 2004. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 28, 239–259.

Graeff, F.G., 2012. New perspective on the pathophysiology of panic: merging serotonin and opioids in the periaqueductal gray. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 45, 366–375.

Graeff, F.G., Garcia-Leal, C., Del-Ben, C.M., Guimarães, F.S., 2005. Does the panic attack activate the hypothalamic-pituitary-adrenal axis? *Annals of the Brazilian Academy Sciences* 77, 477–491.

Graeff, F.G., Guimarães, F.S., De Andrade, T.G., Deakin, J.F., 1996. Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 54, 129–141.

Graeff, F.G., Schoenfeld, R.I., 1970. Tryptaminergic mechanisms in punished and nonpunished behavior. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 173, 277–283.

Graeff, F.G., Viana, M.B., Tomaz, C., 1993. The elevated T maze, a new experimental model of anxiety and memory: effect of diazepam. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 26, 67–70.

Graeff, F.G., Zangrossi, H., 2010. 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* 10, 207–17.

Greisen, M.H., Bolwig, T.G., Wörtwein, G., Gitta, W., 2005. Cholecystokinin tetrapeptide effects on HPA axis function and elevated plus maze behaviour in maternally separated and handled rats. *Behavioural Brain Research* 161, 204–212.

Griebel, G., Rodgers, R.J., Perrault, G., Sanger, D.J., 1997. Risk assessment behaviour: evaluation of utility in the study of 5-HT-related drugs in the rat elevated plus-maze test. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 57, 817–827.

Griebel, G., Sanger, D.J., Perrault, G., 1996. Further evidence for differences between non-selective and BZ-1 (omega 1) selective, benzodiazepine

receptor ligands in murine models of “state” and “trait” anxiety. *Neuropharmacology* 35, 1081–1091.

Griez, E., Schruers, K., 1998. Experimental pathophysiology of panic. *Journal of Psychosomatic Research* 45, 493–503.

Handley, S.L., McBlane, J.W., 1992. Opposite effects of fluoxetine in two animal models of anxiety. *British Journal of Pharmacology* 107, 446P (Abstract).

Handley, S.L., Mithani, S., 1984. Archives of Pharmacology Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear' - motivated behaviour. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives Pharmacology* 327, 1–5.

Harrison, F.E., Hosseini, A.H., McDonald, M.P., 2009. Endogenous anxiety and stress responses in water maze and Barnes maze spatial memory tasks. *Behavioural Brain Research* 198, 247–251.

Heath, R.G., 1975. Brain function and behavior. I. Emotion and sensory phenomena in psychotic patients and in experimental animals. *The Journal of Nervous and Mental Disease* 160, 159–175.

Hebb, D.O., 1947. The effects of early experience on problem solving at maturity. *American Psychologist* 2, 306–307.

Hess, W.R., Brugger, M., 1943. Das subkortikale zentrum der affektiven abwehrreaktion. *Helvetica Physiologica et Pharmacologica Acta* 1, 33–35.

Hirshfeld-Becker, D.R., Micco, J.A., Henin, A., Petty, C., Faraone, S. V, Mazursky, H., Bruett, L., Rosenbaum, J.F., Biederman, J., 2012. Psychopathology in

adolescent offspring of parents with panic disorder, major depression, or both: a 10-year follow-up. *The American Journal of Psychiatry* 169, 1175–1184.

Hofer, M.A., 1996. Multiple regulators of ultrasonic vocalization in the infant rat. *Psychoneuroendocrinology* 21, 203–217.

Hollander, E., Liebowitz, M.R., Cohen, B., Gorman, J.M., Fyer, A.J., Papp, L.A., Klein, D.F., 1989a. Prolactin and sodium lactate-induced panic. *Psychiatry Research* 28, 181–191.

Hollander, E., Liebowitz, M.R., Gorman, J.M., Cohen, B., Fyer, A., Klein, D.F., 1989b. Cortisol and sodium lactate-induced panic. *Archives of General Psychiatry* 46, 135–140.

Hoyer, D., Hannon, J.P., Martin, G.R., 2002. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 71, 533–554.

Huot, R.L., Thirivikraman, K. V, Meaney, M.J., Plotsky, P.M., 2001. Development of adult ethanol preference and anxiety as a consequence of neonatal maternal separation in Long Evans rats and reversal with antidepressant treatment. *Psychopharmacology* 158, 366–373.

Jang, D.-P., Lee, S.-H., Lee, S.-Y., Park, C.-W., Cho, Z.-H., Kim, Y.-B., 2009. Neural responses of rats in the forced swimming test: [F-18]FDG micro PET study. *Behavioural Brain Research* 203, 43–47.

Jenck, F., Moreau, J.L., Martin, J.R., 1995. Dorsal periaqueductal gray-induced aversion as a simulation of panic anxiety: elements of face and predictive validity. *Psychiatry Research* 57, 181–191.

Johnson, M.R., Lydiard, R.B., 1998. Comorbidity of major depression and panic disorder. *Journal of Clinical Psychology* 54, 201–210.

Johnson, P.L., Shekhar, A., 2006. Panic-Prone State Induced in Rats with GABA Dysfunction in the Dorsomedial Hypothalamus Is Mediated by NMDA Receptors. *The Journal of Neuroscience* 26, 7093–7104.

Johnson, P.L., Truitt, W., Fitz, S.D., Minick, P.E., Dietrich, A., Sanghani, S., Träskman-bendz, L., Goddard, A.W., Brundin, L., Shekhar, A., 2009. A key role for orexin in panic anxiety. *Nature Medicine* 16, 111–115.

Kagan, J., Reznick, J.S., Snidman, N., Gibbons, J., Johnson, M.O., 1988. Childhood derivatives of inhibition and lack of inhibition to the unfamiliar. *Child Development* 59, 1580–1589.

Kaunonen, M., Päivi, A.K., Paunonen, M., Erjanti, H., 2000. Death in the Finnish family: experiences of spousal bereavement. *International Journal of Nursing Practice* 6, 127–134.

Kearney, C.A., 2006. Dealing with school refusal behavior: a primer for family physicians. *The Journal of Family Practice* 55, 685–692.

Keay, K.A., Bandler, R., 2004. Periaqueductal Gray. In: Paxinos, G. (Ed.), *The Rat Nervous System*. Elsevier Inc., San Diego, CA, pp. 243–257.

Kellner, M., Knautd, K., Jahn, H., Holsboer, F., Wiedemann, K., 1998. Atrial natriuretic hormone in lactate-induced panic attacks: mode of release and endocrine and pathophysiological consequences. *Journal of Psychiatric Research* 32, 37–48.

Kempermann, G., Kuhn, H.G., Gage, F.H., 1997. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386, 493–495.

Kendler, K.S., 1996. Major depression and generalised anxiety disorder. Same genes, (partly)different environments--revisited. *The British Journal of Psychiatry* 68–75.

Kessler, R.C., McGonagle, K.A., Zhao, S., Nelson, C.B., Hughes, M., Eshleman, S., Wittchen, H.U., Kendler, K.S., 1994. Lifetime and 12-month prevalence of DSM-III-R psychiatric disorders in the United States. Results from the National Comorbidity Survey. *Archives of General Psychiatry* 51, 8–19.

Kinkead, R., Montandon, G., Bairam, A., Lajeunesse, Y., Horner, R., 2009. Neonatal maternal separation disrupts regulation of sleep and breathing in adult male rats. *Sleep* 32, 1611–1620.

Kiser, R.S., Brown, C.A., Sanghera, M.K., German, D.C., 1980. Dorsal raphe nucleus stimulation reduces centrally-elicited fearlike behavior. *Brain Research* 191, 265–272.

Kiser, R.S., German, D.C., Lebovitz, R.M., 1978. Serotonergic reduction of dorsal central gray area stimulation-produced aversion. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 9, 27–31.

Kiser, R.S., Lebovitz, R.M., 1975. Monoaminergic mechanisms in aversive brain stimulation. *Physiology and Behavior* 15, 47–53.

Klein, D.F., 1964. Delineation of Two Drug-Responsive Anxiety Syndromes. *Psychopharmacologia* 5, 397–408.

Klein, D.F., 1980. Anxiety reconceptualized. *Comprehensive Psychiatry* 21, 411–427.

Klein, D.F., 1993. Panic disorder with agoraphobia. *The British journal of psychiatry : the journal of mental science* 163, 835–837.

Klein, D.F., Fink, M., 1962. Psychiatric reaction patterns to imipramine. *The American Journal of Psychiatry* 119, 432–438.

Klein, S., Nicolas, L.B., Lopez-Lopez, C., Jacobson, L.H., McArthur, S.G., Grundschober, C., Prinssen, E.P., 2010. Examining face and construct validity of a noninvasive model of panic disorder in Lister-hooded rats. *Psychopharmacology* 211, 197–208.

Konkle, A.T.M., Kentner, A.C., Baker, S.L., Stewart, A., Bielajew, C., 2010. Environmental-enrichment-related variations in behavioral, biochemical, and physiologic responses of Sprague-Dawley and Long Evans rats. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 49, 427–436.

Kosofsky, B.E., Molliver, M.E., 1987. The serotonergic innervation of cerebral cortex: different classes of axon terminals arise from dorsal and median raphe nuclei. *Synapse* 1, 153–168.

Kshama, D., Hrishikeshavan, H.J., Shanbhogue, R., Munonyedi, U.S., 1990. Modulation of baseline behavior in rats by putative serotonergic agents in three ethoexperimental paradigms. *Behavioral and Neural Biology* 54, 234–253.

Lambás-Señas, L., Mnie-Filali, O., Certin, V., Faure, C., Lemoine, L., Zimmer, L., Haddjeri, N., 2009. Functional correlates for 5-HT(1A) receptors in

maternally deprived rats displaying anxiety and depression-like behaviors. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 33, 262–268.

Lapierre, Y.D., Knott, V.J., Gray, R., 1984. Psychophysiological correlates of sodium lactate. *Psychopharmacology Bulletin* 20, 50–57.

Last, C.G., 1991. Somatic Complaints in Anxiety Disordered Children. *Journal of Anxiety Disorders* 5, 125–138.

Last, C.G., Francis, G., Hersen, M., Kazdin, A.E., Strauss, C.C., 1987. Separation anxiety and school phobia: a comparison using DSM-III criteria. *The American journal of psychiatry* 144, 653–657.

Laviola, G., Hannan, A.J., Macrì, S., Solinas, M., Jaber, M., 2008. Effects of enriched environment on animal models of neurodegenerative diseases and psychiatric disorders. *Neurobiology of Disease* 31, 159–168.

Lecrubier, Y., 1998. The impact of comorbidity on the treatment of panic disorder. *The Journal of Clinical Psychiatry* 59 Suppl 8, 11–4; discussion 15–6.

LeDoux, J.E., 2012. Evolution of human emotion: a view through fear. *Progress in Brain Research* 195, 431–442.

Lee, J.-H., Kim, H.J., Kim, J.G., Ryu, V., Kim, B.-T., Kang, D.-W., Jahng, J.W., 2007. Depressive behaviors and decreased expression of serotonin reuptake transporter in rats that experienced neonatal maternal separation. *Neuroscience Research* 58, 32–39.

Lehmann, J., Feldon, J., 2000. Long-term biobehavioral effects of maternal separation in the rat: consistent or confusing? *Reviews in the Neurosciences* 11, 383–408.

Leuner, B., Caponiti, J.M., Gould, E., 2012. Oxytocin Stimulates Adult Neurogenesis Even Under Conditions of Stress and Elevated Glucocorticoids. *Hippocampus* 868, 861–868.

Leuner, B., Glasper, E.R., Gould, E., 2010. Sexual Experience Promotes Adult Neurogenesis in the Hippocampus Despite an Initial Elevation in Stress Hormones. *PLoS One* 5, e11597.

Leuner, B., Gould, E., 2010. Structural Plasticity and Hippocampal Function. *Annual Review of Psychology* 61, 111–140.

Leuner, B., Mendolia-loffredo, S., Kozorovitskiy, Y., Samburg, D., Gould, E., Shors, T.J., 2004. Learning Enhances the Survival of New Neurons beyond the Time when the Hippocampus Is Required for Memory. *The Journal of Neuroscience* 24, 7477–7481.

Levin, A.P., Doran, A.R., Liebowitz, M.R., Fyer, A.J., Gorman, J.M., Klein, D.F., Paul, S.M., 1987. Pituitary adrenocortical unresponsiveness in lactate-induced panic. *Psychiatry Research* 21, 23–32.

Liebowitz, M.R., Fyer, A.J., Gorman, J.M., Dillon, D., Appleby, I.L., Levy, G., Anderson, S., Levitt, M., Palij, M., Davies, S.O., 1984. Lactate provocation of panic attacks. I. Clinical and behavioral findings. *Archives of General Psychiatry* 41, 764–770.

Liebowitz, M.R., Fyer, A.J., Gorman, J.M., Dillon, D., Davies, S., Stein, J.M., Cohen, B.S., Klein, D.F., 1985a. Specificity of lactate infusions in social phobia versus panic disorders. *The American Journal of Psychiatry* 142, 947–950.

Liebowitz, M.R., Gorman, J.M., Fyer, A.J., Levitt, M., Dillon, D., Levy, G., Appleby, I.L., Anderson, S., Palij, M., Davies, S.O., 1985b. Lactate provocation of panic attacks. II. Biochemical and physiological findings. *Archives of General Psychiatry* 42, 709–719.

Lim, L.W., Blokland, A., Van Duinen, M., Visser-Vandewalle, V., Tan, S., Vlamings, R., Janssen, M., Jahanshahi, A., Aziz-Mohammadi, M., Steinbusch, H.W.M., Schruers, K., Temel, Y., 2011. Increased plasma corticosterone levels after periaqueductal gray stimulation-induced escape reaction or panic attacks in rats. *Behavioural Brain Research* 218, 301–307.

Liu, Q., Li, B., Zhu, H.-Y., Wang, Y.-Q., Yu, J., Wu, G.-C., 2009. Clomipramine treatment reversed the glial pathology in a chronic unpredictable stress-induced rat model of depression. *European Neuropsychopharmacology* 19, 796–805.

Ludington-Hoe, S.M., Ferreira, C.N., Goldstein, M.R., 1998. Kangaroo care with a ventilated preterm infant. *Acta Paediatrica* 87, 711–713.

Manicavasagar, V., Silove, D., Marnane, C., Wagner, R., 2009. Adult attachment styles in panic disorder with and without comorbid adult separation anxiety disorder. *The Australian and New Zealand Journal of Psychiatry* 43, 167–172.

Marais, L., Rensburg, S.J. Van, Zyl, J.M. Van, Stein, D.J., Daniels, W.M.U., 2008. Maternal separation of rat pups increases the risk of developing depressive-like behavior after subsequent chronic stress by altering corticosterone and neurotrophin levels in the hippocampus. *Neuroscience Research* 61, 106–112.

Marchesi, C., Cantoni, A., Fontò, S., Giannelli, M.R., Maggini, C., 2006. Predictors of symptom resolution in panic disorder after one year of pharmacological treatment: a naturalistic study. *Pharmacopsychiatry* 39, 60–65.

Margraf, J., Ehlers, A., Roth, W.T., 1986. Biological models of panic disorder and agoraphobia—a review. *Behaviour Research and Therapy* 24, 553–567.

Maron, E., Kuikka, J.T., Shlik, J., Vasar, V., Vanninen, E., Tiihonen, J., 2004. Reduced brain serotonin transporter binding in patients with panic disorder. *Psychiatry Research* 132, 173–181.

Maslova, L.N., Bulygina, V. V., Amstislavskaya, T.G., 2010. Prolonged social isolation and social instability in adolescence in rats: immediate and long-term physiological and behavioral effects. *Neuroscience and Behavioral Physiology* 40, 955–963.

Matthews, K., Dalley, J.W., Matthews, C., Tsai, T.H., Robbins, T.W., 2001. Periodic maternal separation of neonatal rats produces region- and gender-specific effects on biogenic amine content in postmortem adult brain. *Synapse* 40, 1–10.

McGrath, P.J., Stewart, J.W., Liebowitz, M.R., Markowitz, J.M., Quitkin, F.M., Klein, D.F., Gorman, J.M., 1988. Lactate provocation of panic attacks in depressed outpatients. *Psychiatry Research* 25, 41–47.

McIntosh, J., Anisman, H., Merali, Z., 1999. Short- and long-periods of neonatal maternal separation differentially affect anxiety and feeding in adult rats: gender-dependent effects. *Brain research* 113, 97–106.

McNair, D.M., Frankenthaler, L.M., Czerlinsky, T., White, T.W., Sasson, S., Fisher, S., 1982. Simulated public speaking as a model of clinical anxiety. *Psychopharmacology* 77, 7–10.

Meaney, M.J., 2001. Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annual Review of Neuroscience* 24, 1161–1192.

Meaney, M.J., Aitken, D.H., Sharma, S., Viau, V., 1992. Basal ACTH, corticosterone and corticosterone-binding globulin levels over the diurnal cycle, and age-related changes in hippocampal type I and type II corticosteroid receptor binding capacity in young and aged, handled and nonhandled rats. *Neuroendocrinology* 55, 204–213.

Meaney, M.J., Diorio, J., Francis, D., Widdowson, J., LaPlante, P., Caldji, C., Sharma, S., Seckl, J.R., Plotsky, P.M., 1996. Early environmental regulation of forebrain glucocorticoid receptor gene expression: implications for adrenocortical responses to stress. *Developmental Neuroscience* 18, 49–72.

Meletti, S., Tassi, L., Mai, R., Fini, N., Tassinari, C.A., Russo, G. Lo, 2006. Emotions induced by intracerebral electrical stimulation of the temporal lobe. *Epilepsia* 47 Suppl 5, 47–51.

Milrod, B., Leon, A.C., Shear, M.K., 2004. Can interpersonal loss precipitate panic disorder? *The American Journal of Psychiatry* 161, 758–759.

Ming, G.-L., Song, H., 2011. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron* 70, 687–702.

Mirescu, C., Gould, E., 2006. Stress and Adult Neurogenesis. *Hippocampus* 238, 233–238.

Mohammed, A.H., Zhu, S.W., Darmopil, S., Hjerling-Leffler, J., Ernfors, P., Winblad, B., Diamond, M.C., Eriksson, P.S., Bogdanovic, N., 2002. Environmental enrichment and the brain. *Progress in Brain Research* 138, 109–133.

Montandon, G., Bairam, A., Kinkead, R., 2008. Neonatal caffeine induces sex-specific developmental plasticity of the hypoxic respiratory chemoreflex in adult rats. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 295, 922–934.

Morgan, M.M., Carrive, P., 2001. Activation of the ventrolateral periaqueductal gray reduces locomotion but not mean arterial pressure in awake, freely moving rats. *Neuroscience* 102, 905–910.

Nashold, B.S., Wilson, W.P., Slaughter, D.G., 1969. Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. *Journal of Neurosurgery* 30, 14–24.

Neill, J.D., 1970. Effects of “stress” on serum prolactin and luteinizing hormone levels during the estrous cycle of the rat. *Endocrinology* 87, 1192–1197.

Neumeister, A., Bain, E., Nugent, A.C., Carson, R.E., Bonne, O., Luckenbaugh, D.A., Eckelman, W., Herscovitch, P., Charney, D.S., Drevets, W.C., 2004. Reduced serotonin type 1A receptor binding in panic disorder. *The Journal of Neuroscience* 24, 589–591.

Nithianantharajah, J., Hannan, A.J., 2006. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nature Reviews Neuroscience* 7, 697–709.

Nogueira, R.L., Graeff, F.G., 1995. Role of 5-HT receptor subtypes in the modulation of dorsal periaqueductal gray generated aversion. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 52, 1–6.

Oh, J., Zupan, B., Gross, S., Toth, M., 2009. Paradoxical anxiogenic response of juvenile mice to fluoxetine. *Neuropsychopharmacology* 34, 2197–2207.

Onstott, D., Mayer, B., Beitz, A.J., 1993. Nitric oxide synthase immunoreactive neurons anatomically define a longitudinal dorsolateral column within the midbrain periaqueductal gray of the rat: analysis using laser confocal microscopy. *Brain Research* 610, 317–324.

Oreland, S., Pickering, C., Gökturk, C., Oreland, L., Arborelius, L., Nylander, I., 2009. Two repeated maternal separation procedures differentially affect brain 5-hydroxytryptamine transporter and receptors in young and adult male and female rats. *Brain Research* 1305 Suppl, S37–49.

Park, H.-J., Chae, Y., Jang, J., Shim, I., Lee, H., Lim, S., 2005. The effect of acupuncture on anxiety and neuropeptide Y expression in the basolateral amygdala of maternally separated rats. *Neuroscience Letters* 377, 179–184.

Parmar, V.R., Kumar, A., Kaur, R., Parmar, S., Kaur, D., Basu, S., Jain, S., Narula, S., 2009. Experience with Kangaroo mother care in a neonatal intensive care unit (NICU) in Chandigarh, India. *Indian journal of pediatrics* 76, 25–28.

Parvizi, J., Van Hoesen, G.W., Damasio, A., 2000. Selective pathological changes of the periaqueductal gray matter in Alzheimer's disease. *Annals of Neurology* 48, 344–353.

Pascual, R., Zamora-León, S.P., 2007. Effects of neonatal maternal deprivation and postweaning environmental complexity on dendritic morphology of prefrontal pyramidal neurons in the rat. *Acta Neurobiologiae Experimentalis* 67, 471–479.

Paxinos, G., Watson, C., 1998. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, San Diego, CA.

Pellow, S., Chopin, P., File, S.E., Briley, M., 1985. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods* 14, 149–167.

Peskind, E.R., Jensen, C.F., Pascualy, M., Tsuang, D., Cowley, D., Martin, D.C., Wilkinson, C.W., Raskind, M.A., 1998. Sodium lactate and hypertonic sodium chloride induce equivalent panic incidence, panic symptoms, and hypernatremia in panic disorder. *Biological Psychiatry* 44, 1007–1016.

Petkov, V.D., Belcheva, S., Konstantinova, E., 1995. Anxiolytic effects of dotarizine, a possible antimigraine drug. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology* 17, 659–668.

Petrosini, L., De Bartolo, P., Foti, F., Gelfo, F., Cutuli, D., Leggio, M.G., Mandolesi, L., 2009. On whether the environmental enrichment may provide cognitive and brain reserves. *Brain Research Reviews* 61, 221–239.

Pine, D.S., Klein, R.G., Coplan, J.D., Papp, L.A., Hoven, C.W., Martinez, J., Kovalenko, P., Mandell, D.J., Moreau, D., Klein, D.F., Gorman, J.M., 2000. Differential carbon dioxide sensitivity in childhood anxiety disorders and nonill comparison group. *Archives of General Psychiatry* 57, 960–967.

Pine, D.S., Klein, R.G., Roberson-Nay, R., Mannuzza, S., Moulton, J.L., Woldehawariat, G., Guardino, M., 2005. Response to 5% carbon dioxide in children and adolescents: relationship to panic disorder in parents and anxiety disorders in subjects. *Archives of General Psychiatry* 62, 73–80.

Pinheiro, S.N., Del-Ben, C.M., Zangrossi, H., Graeff, F.G., 2008. Anxiolytic and panicolytic effects of escitalopram in the elevated T-maze. *Journal of Psychopharmacology* 22, 132–137.

Pitts, F.N., McClure, J.N., 1967. Lactate metabolism in anxiety neurosis. *The New England Journal of Medicine* 277, 1329–1336.

Plotsky, P.M., Meaney, M.J., 1993. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Brain Research* 18, 195–200.

Pobbe, R.L.H., Zangrossi, H., 2005. 5-HT 1A and 5-HT 2A receptors in the rat dorsal periaqueductal gray mediate the antipanic-like effect induced by the stimulation of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. *Psychopharmacology* 183, 314–321.

Pobbe, R.L.H., Zangrossi, H., Blanchard, D.C., Blanchard, R.J., 2011. Involvement of dorsal raphe nucleus and dorsal periaqueductal gray 5-HT receptors

in the modulation of mouse defensive behaviors. *European Neuropsychopharmacology* 21, 306–315.

Preter, M., Klein, D.F., 2008. Panic, suffocation false alarms, separation anxiety and endogenous opioids. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 32, 603–612.

Preter, M., Lee, S.H., Petkova, E., Vannucci, M., Kim, S., Klein, D.F., 2011. Controlled cross-over study in normal subjects of naloxone-preceding-lactate infusions; respiratory and subjective responses: relationship to endogenous opioid system, suffocation false alarm theory and childhood parental loss. *Psychological Medicine* 41, 385–393.

Quintino-dos-Santos, J.W., 2011. Determinantes biológicos da comorbidade dos ataques de pânico com depressão e ansiedade de separação. Tese de Doutorado. UFES. Vitória..

Quintino-dos-Santos, J.W., Müller, C.J.T., Santos, A.M. da C., Tufik, S., Rosa, C. de A., Schenberg, L.C., 2013. Long-lasting marked inhibition of periaqueductal gray-evoked defensive behaviors in inescapably-shocked rats. *European Journal of Neuroscience*.

Ramos, V., Biesdorf, C., Henrique, D., Zangrossi, H., Guilherme, F., Aparecida, E., 2011. Serotonin-1A receptors in the dorsal periaqueductal gray matter mediate the panicolytic-like effect of pindolol and paroxetine combination in the elevated T-maze. *Neuroscience Letters* 495, 63–66.

Rayen, I., Van den Hove, D.L., Prickaerts, J., Steinbusch, H.W., Pawluski, J.L., 2011. Fluoxetine during development reverses the effects of prenatal

stress on depressive-like behavior and hippocampal neurogenesis in adolescence. *PloS one* 6, e24003.

Reiman, E.M., Raichle, M.E., Robins, E., Mintun, M.A., Fusselman, M.J., Fox, P.T., Price, J.L., Hackman, K.A., 1989. Neuroanatomical correlates of a lactate-induced anxiety attack. *Archives of General Psychiatry* 46, 493–500.

Rifkin, A., Klein, D.F., Dillon, D., Levitt, M., 1981. Blockade by imipramine or desipramine of panic induced by sodium lactate. *The American Journal of Psychiatry* 138, 676–677.

Roberson-Nay, R., Eaves, L.J., Hetteema, J.M., Kendler, K.S., Silberg, J.L., 2012. Childhood separation anxiety disorder and adult onset panic attacks share a common genetic diathesis. *Depression and anxiety* 29, 320–327.

Rodgers, R.J., Ishii, Y., Halford, J.C.G., Blundell, J.E., 2002. Orexins and appetite regulation. *Neuropeptides* 36, 303–325.

Roman, E., Gustafsson, L., Berg, M., Nylander, I., 2006. Behavioral profiles and stress-induced corticosteroid secretion in male Wistar rats subjected to short and prolonged periods of maternal separation. *Hormones and Behavior* 50, 736–747.

Roncon, C.M., Biesdorf, C., Santana, R.G., Zangrossi, H., Graeff, F.G., Audi, E.A., 2012. The panicolytic-like effect of fluoxetine in the elevated T-maze is mediated by serotonin-induced activation of endogenous opioids in the dorsal periaqueductal grey. *Journal of Psychopharmacology* 26, 525–531.

Rosa, C.A., 2012. Efeitos tardios do isolamento social neonatal e do desamparo aprendido sobre os níveis tissulares e taxa de renovação da serotonina

das regiões Dorsal e Ventrolateral da Matéria Cinzenta Periaquedutal de ratos. Dissertação de Mestrado. UFES. Vitória.

Ross, H.E., Young, L.J., 2009. Oxytocin and the neural mechanisms regulating social cognition and affiliative behavior. *Frontiers in Neuroendocrinology* 30, 534–547.

Roy-Byrne, P.P., Stang, P., Wittchen, H.U., Ustun, B., Walters, E.E., Kessler, R.C., 2000. Lifetime panic-depression comorbidity in the National Comorbidity Survey. Association with symptoms, impairment, course and help-seeking. *The British Journal of Psychiatry* 176, 229–235.

Roza, S.J., Hofstra, M.B., Van der Ende, J., Verhulst, F.C., 2003. Stable prediction of mood and anxiety disorders based on behavioral and emotional problems in childhood: a 14-year follow-up during childhood, adolescence, and young adulthood. *The American Journal of Psychiatry* 160, 2116–2121.

Ruiter, C.D.E., Van Ijzendoorn, M.H., 1992. Agoraphobia and Anxious-Ambivalent Attachment: An Integrative Review. *Journal of Anxiety Disorders* 6, 365–381.

Rygula, R., Abumaria, N., Flügge, G., Hiemke, C., Fuchs, E., Rüter, E., Havemann-Reinecke, U., 2006. Citalopram counteracts depressive-like symptoms evoked by chronic social stress in rats. *Behavioural Pharmacology* 17, 19–29.

Sahay, A., Hen, R., 2007. Adult hippocampal neurogenesis in depression. *Nature Neuroscience* 10, 1110–1115.

Sale, A., Berardi, N., Maffei, L., 2009. Enrich the environment to empower the brain. *Trends in Neurosciences* 32, 233–239.

Sánchez, C., 1995. Serotonergic mechanisms involved in the exploratory behaviour of mice in a fully automated two-compartment black and white text box. *Pharmacology and Toxicology* 77, 71–78.

Sánchez, C., Meier, E., 1997. Behavioral profiles of SSRIs in animal models of depression, anxiety and aggression. Are they all alike? *Psychopharmacology* 129, 197–205.

Schenberg, L.C., 2010. Towards a translational model of panic attack. *Psychology and Neuroscience* 3, 9–37.

Schenberg, L.C., Bittencourt, A.S., Sudré, E.C.M., Vargas, L.C., Cristina, E., Sudre, M., Ce, L., 2001. Modeling panic attacks. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 25, 647–659.

Schenberg, L.C., Capucho, L.B., Vatanabe, R.O., Vargas, L.C., 2002. Acute effects of clomipramine and fluoxetine on dorsal periaqueductal grey-evoked unconditioned defensive behaviours of the rat. *Psychopharmacology* 159, 138–144.

Schenberg, L.C., Costa, M.B., Borges, P.C.L., Castro, M.F., Logistic, M.F.S.C., 1990. Logistic analysis of the defense reaction induced by electrical stimulation of the rat mesencephalic tectum. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 14, 473–479.

Schenberg, L.C., Dos Reis, A.M., Ferreira Póvoa, R.M., Tufik, S., Silva, S.R., 2008. A panic attack-like unusual stress reaction. *Hormones and Behavior* 54, 584–591.

Schenberg, L.C., Graeff, F.G., 1978. Role of the periaqueductal gray substance in the antianxiety action of benzodiazepines. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 9, 287–95.

Schenberg, L.C., Marçal, L.P., Seeberger, F., Barros, M.R., Sudré, E.C., 2000. L-type calcium channels selectively control the defensive behaviors induced by electrical stimulation of dorsal periaqueductal gray and overlying collicular layers. *Behavioural Brain Research* 111, 175–185.

Schenberg, L.C., Póvoa, R.M.F., Costa, A.L.P., Caldellas, A. V, Tufik, S., Bittencourt, A.S., 2005. Functional specializations within the tectum defense systems of the rat. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 29, 1279–1298.

Schimitel, F.G., De Almeida, G.M., Pitol, D.N., Armini, R.S., Tufik, S., Schenberg, L.C., 2012. Evidence of a suffocation alarm system within the periaqueductal gray matter of the rat. *Neuroscience* 200, 59–73.

Schmitt, P., Carrive, P., Di Scala, G., Jenck, F., Brandao, M., Bagri, A., Moreau, J.L., Sandner, G., 1986. A neuropharmacological study of the periventricular neural substrate involved in flight. *Behavioural Brain Research* 22, 181–190.

Schoenfeld, T.J., Gould, E., 2012. Stress, stress hormones, and adult neurogenesis. *Experimental Neurology* 233, 12–21.

Selye, H., 1936. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences* 10, 230–231.

Selye, H., 1950. Stress and the general adaptation syndrome. *British Medical Journal* 1, 1383–1392.

Shalev, U., Kafkafi, N., 2002. Repeated maternal separation does not alter sucrose-reinforced and open-field behaviors. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 73, 115–122.

Shear, K., Jin, R., Ruscio, A.M., Walters, E.E., Kessler, R.C., 2006. Prevalence and correlates of estimated DSM-IV child and adult separation anxiety disorder in the National Comorbidity Survey Replication. *The American Journal of Psychiatry* 163, 1074–1083.

Shekhar, A., Johnson, P.L., Sajdyk, T.J., Fitz, S.D., Keim, S.R., Kelley, P.E., Gehlert, D.R., DiMicco, J.A., 2006. Angiotensin-II is a putative neurotransmitter in lactate-induced panic-like responses in rats with disruption of GABAergic inhibition in the dorsomedial hypothalamus. *The Journal of Neuroscience* 26, 9205–9215.

Shekhar, A., Keim, S.R., 1997. The Circumventricular Organs Form a Potential Neural Pathway for Lactate Sensitivity: Implications for Panic Disorder. *The Journal of Neuroscience* 17, 9726–9735.

Shekhar, A., Keim, S.R., 2000. LY354740, a potent group II metabotropic glutamate receptor agonist prevents lactate-induced panic-like response in panic-prone rats. *Neuropharmacology* 39, 1139–1146.

Shekhar, A., Keim, S.R., Simon, J.R., McBride, W.J., 1996. Dorsomedial hypothalamic GABA dysfunction produces physiological arousal following sodium lactate infusions. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 55, 249–256.

Shekhar, A., Sajdyk, T.S., Keim, S.R., Yoder, K.K., Sanders, S.K., 1999. Role of the basolateral amygdala in panic disorder. *Annals of the New York Academy of Sciences* 877, 747–750.

Siegel, J.M., 1999. Narcolepsy: a key role for hypocretins (orexins). *Cell* 98, 409–412.

Siegel, R.A., Conforti, N., Chowers, I., 1980. Neural pathways mediating the prolactin secretory response to acute neurogenic stress in the male rat. *Brain Research* 198, 43–53.

Silove, D., Harris, M., Morgan, A., Boyce, P., Manicavasagar, V., Hadzi-Pavlovic, D., Wilhelm, K., 1995. Is early separation anxiety a specific precursor of panic disorder-agoraphobia? A community study. *Psychological Medicine* 25, 405–411.

Silove, D., Manicavasagar, V., 1993. Adults who feared school: is early separation anxiety specific to the pathogenesis of panic disorder? *Acta Psychiatrica Scandinavica* 88, 385–390.

Silva, M.T., Alves, C.R., Santarem, E.M., 1999. Anxiogenic-like effect of acute and chronic fluoxetine on rats tested on the elevated plus-maze. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 32, 333–339.

Silveira, M.C.L., Zangrossi, H., Viana, M.B., Silveira, R., Graeff, F.G., 2001. Differential expression of Fos protein in the rat brain induced by performance of avoidance or escape in the elevated T-maze. *Behavioural Brain Research* 126, 13–21.

Simpson, J., Kelly, J.P., 2011. The impact of environmental enrichment in laboratory rats - Behavioural and neurochemical aspects. *Behavioural Brain Research* 222, 246–264.

Slotten, H.A., Kalinichev, M., Hagan, J.J., Marsden, C.A., Fone, K.C.F., 2006. Long-lasting changes in behavioural and neuroendocrine indices in the rat following neonatal maternal separation: gender-dependent effects. *Brain Research* 1097, 123–132.

Snedecor, G.W., Cochran, W.G., 1980. *Statistical Methods.*, 7th ed. The Iowa State University Press, Iowa.

Soares, V.P., Campos, A.C., De Bortoli, V.C., Zangrossi, H., Guimarães, F.S., Zuardi, A.W., 2010. Intra-dorsal periaqueductal gray administration of cannabidiol blocks panic-like response by activating 5-HT_{1A} receptors. *Behavioural Brain Research* 213, 225–229.

Solinas, M., Thiriet, N., Chauvet, C., Jaber, M., 2010. Prevention and treatment of drug addiction by environmental enrichment. *Progress in Neurobiology* 92, 572–592.

Spatola, C.A.M., Scaini, S., Pesenti-Gritti, P., Medland, S.E., Moruzzi, S., Ogliari, A., Tambs, K., Battaglia, M., 2011. Gene-environment interactions in panic disorder and CO₂ sensitivity: Effects of events occurring early in life. *American Journal of Medical Genetics* 156B, 79–88.

Spinelli, S., Chefer, S., Carson, R.E., Jagoda, E., Lang, L., Heilig, M., Barr, C.S., Suomi, S.J., Higley, J.D., Stein, E. a, 2010. Effects of early-life stress on

serotonin(1A) receptors in juvenile Rhesus monkeys measured by positron emission tomography. *Biological Psychiatry* 67, 1146–1153.

Stein, D.J., Bouwer, C., 1997. A Neuro-Evolutionary Approach to the Anxiety Disorders. *Journal of Anxiety Disorders* 11, 409–429.

Street, L.L., Craske, M.G., Barlow, D.H., 1989. Sensations, cognitions and the perception of cues associated with expected and unexpected panic attacks. *Behaviour Research and Therapy* 17, 189–198.

Strekalova, T., Gorenkova, N., Schunk, E., Dolgov, O., Bartsch, D., 2006. Selective effects of citalopram in a mouse model of stress-induced anhedonia with a control for chronic stress. *Behavioural Pharmacology* 17, 271–287.

Sudré, E.C.M., Barros, M.R. de, Sudré, G.N., Schenberg, L.C., Cristina, E., Sudrf, M., Sudrf, G.N., Carlos, L., De Barros, M.R., 1993. Thresholds of electrically induced defence reaction of the rat: short- and long-term adaptation mechanisms. *Behavioural Brain Research* 58, 141–154.

Taheri, S., Zeitzer, J.M., Mignot, E., 2002. The role of hypocretins (orexins) in sleep regulation and narcolepsy. *Annual Review of Neuroscience* 25, 283–313.

Takahashi, T., Zhu, Y., Hata, T., 2009. Intracranial self-stimulation enhances neurogenesis in hippocampus of adult mice and rats. *Neuroscience* 158, 402–411.

Thompson, M.R., Li, K.M., Clemens, K.J., Gurtman, C.G., Hunt, G.E., Cornish, J.L., McGregor, I.S., 2004. Chronic fluoxetine treatment partly attenuates

the long-term anxiety and depressive symptoms induced by MDMA ('Ecstasy') in rats. *Neuropsychopharmacology* 29, 694–704.

Tonge, B., 1994. Separation anxiety disorder. Em: King, N.J., Yule, W. (Eds.), *International Handbook of Phobic and Anxiety Disorders in Children and Adolescents*. Plenum Press, New York, pp. 145–167.

Troakes, C., Ingram, C.D., 2009. Anxiety behaviour of the male rat on the elevated plus maze: associated regional increase in c-fos mRNA expression and modulation by early maternal separation. *Stress* 12, 362–369.

Van Oers, H.J., De Kloet, E.R., Li, C., Levine, S., 1998. The ontogeny of glucocorticoid negative feedback: influence of maternal deprivation. *Endocrinology* 139, 2838–2846.

Van Praag, H., Christie, B.R., Sejnowski, T.J., Gage, F.H., 1999. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 13427–13431.

Van Praag, H., Kempermann, G., Gage, F.H., 2000. Neural consequences of environmental enrichment. *Nature Reviews Neuroscience* 1, 191–198.

Vargas, L.C., Marques, T. de A., Schenberg, L.C., 2000. Micturition and defensive behaviors are controlled by distinct neural networks within the dorsal periaqueductal gray and deep gray layer of the superior colliculus of the rat. *Neuroscience Letters* 280, 45–48.

Vargas, L.C., Schenberg, L.C., 2001. Long-term effects of clomipramine and fluoxetine on dorsal periaqueductal grey-evoked innate defensive behaviours of the rat. *Psychopharmacology* 155, 260–268.

Viana, M. de B., Tomaz, C., Graeff, F.G., 1994. The Elevated T-Maze : A New Animal Model of Anxiety and Memory. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 49, 549–554.

Vicentic, A., Francis, D., Moffett, M., Lakatos, A., Rogge, G., Hubert, G.W., Harley, J., Kuhar, M.J., 2006. Maternal separation alters serotonergic transporter densities and serotonergic 1A receptors in rat brain. *Neuroscience* 140, 355–365.

Vollmayr, B., Mahlstedt, M.M., Henn, F.A., 2007. Neurogenesis and depression: what animal models tell us about the link. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience* 257, 300–3.

Waldherr, M., Nyuyki, K., Maloumy, R., Bosch, O.J., Neumann, I.D., 2010. Hormones and Behavior Attenuation of the neuronal stress responsiveness and corticotrophin releasing hormone synthesis after sexual activity in male rats. *Hormones and Behavior* 57, 222–229.

Wang, J.-W., David, D.J., Monckton, J.E., Battaglia, F., Hen, R., 2008. Chronic fluoxetine stimulates maturation and synaptic plasticity of adult-born hippocampal granule cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28, 1374–84.

Warner-Schmidt, J.L., Duman, R.S., 2006. Hippocampal neurogenesis: opposing effects of stress and antidepressant treatment. *Hippocampus* 16, 239–249.

Weintraub, A., Singaravelu, J., Bhatnagar, S., 2010. Enduring and sex-specific effects of adolescent social isolation in rats on adult stress reactivity. *Brain Research* 1343, 83–92.

Whitelaw, A., Heisterkamp, G., Sleath, K., Acolet, D., Richards, M., 1988. Skin to skin contact for and their mothers low birthweight infants and their mothers. *Archives of Disease in Childhood* 1377–1381.

Wigger, A., Neumann, I.D., 1999. Periodic maternal deprivation induces gender-dependent alterations in behavioral and neuroendocrine responses to emotional stress in adult rats. *Physiology and Behavior* 66, 293–302.

Wilent, W.B., Oh, M.Y., Buetefisch, C.M., Bailes, J.E., Cantella, D., Angle, C., Whiting, D.M., 2010. Induction of panic attack by stimulation of the ventromedial hypothalamus. *Journal of Neurosurgery* 112, 1295–1298.

Will, B., Galani, R., Kelche, C., Rosenzweig, M.R., 2004. Recovery from brain injury in animals: relative efficacy of environmental enrichment, physical exercise or formal training (1990-2002). *Progress in Neurobiology* 72, 167–182.

Wise, C.D., Berger, B.D., Stein, L., 1972. Benzodiazepines: anxiety-reducing activity by reduction of serotonin turnover in the brain. *Science* 177, 180–183.

Wise, C.D., Berger, B.D., Stein, L., 1973. Evidence of -noradrenergic reward receptors and serotonergic punishment receptors in the rat brain. *Biological Psychiatry* 6, 3–21.

Wittchen, H.U., Nelson, C.B., Lachner, G., 1998. Prevalence of mental disorders and psychosocial impairments in adolescents and young adults. *Psychological Medicine* 28, 109–126.

Woods, S.W., Charney, D.S., Delgado, P.L., Heninger, G.R., 1990. The effect of long-term imipramine treatment on carbon dioxide-induced anxiety in panic disorder patients. *The Journal of Clinical Psychiatry* 51, 505–507.

Woods, S.W., Charney, D.S., Goodman, W.K., Heninger, G.R., 1988. Carbon dioxide-induced anxiety. Behavioral, physiologic, and biochemical effects of carbon dioxide in patients with panic disorders and healthy subjects. *Archives of General Psychiatry* 45, 43–52.

Woods, S.W., Charney, D.S., McPherson, C.A., Gradman, A.H., Heninger, G.R., 1987. Situational panic attacks. Behavioral, physiologic, and biochemical characterization. *Archives of General Psychiatry* 44, 365–375.

Yamashita, P.S.M., Bortoli, V.C. de, Zangrossi, H., 2011. Neuropharmacology 5-HT_{2C} receptor regulation of defensive responses in the rat dorsal periaqueductal gray. *Neuropharmacology* 60, 216–222.

Yeragani, V.K., Pohl, R., Balon, R., Rainey, J.M., Berchou, R., Ortiz, A., 1988. Sodium lactate infusions after treatment with tricyclic antidepressants: behavioral and physiological findings. *Biological Psychiatry* 24, 767–774.

Zangrossi, H., Viana, M.B., Zanoveli, J.M., Bueno, C., Nogueira, R.L., Graeff, F.G., 2001. Serotonergic regulation of inhibitory avoidance and one-way escape in the rat elevated T-maze. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 25, 637–645.

Zanoveli, J.M., Pobbe, R.L.H., Bortoli, V.C. de, Carvalho, M.C., Brandão, M.L., Zangrossi, H.H., De Bortoli, V.C., 2010. Facilitation of 5-HT_{1A}-mediated neurotransmission in dorsal periaqueductal grey matter accounts for the panicolytic-like effect of chronic fluoxetine. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 13, 1079–1088.

Zaretskaia, M. V, Zaretsky, D. V, Shekhar, A., DiMicco, J.A., 2002. Chemical stimulation of the dorsomedial hypothalamus evokes non-shivering thermogenesis in anesthetized rats. *Brain Research* 928, 113–125.

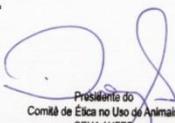
ANEXOS*Anexo 1**Certificado do CEUA de aprovação do presente estudo*

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 005/2012, relativo ao projeto de pesquisa intitulado **"Efeitos da fluoxetina sobre as respostas de fuga da estimulação elétrica intracraniana produzidas pela separação maternal na infância e pela aplicação de choques inescapáveis periféricos."**, que tem como responsável o (a) docente **Luiz Carlos Schenberg**, está de acordo com os princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFES), tendo sido aprovado na reunião ordinária de 04/05/12.



Presidente do
Comitê de Ética no Uso de Animais
CEUA / UFES

Vitória (ES), 07 de maio de 2012.

Anexo 2

Planilha de estimulação

RATO: _____ EXPERIMENTO: _____ SESSÃO N°: _____

DATA: ____ / ____ / ____ PROCEDIMENTO: _____ RESPONSÁVEL: _____

RATO	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	10 ²	
DORMIR																					
REPOUSO																					
OLFAÇÃO																					
ESQUADRINHAR																					
AUTOLIMPEZA																					
LEVANTAR																					
MARCHA																					
EXOFTALMIA																					
MISTACIOPLEGIA																					
IMOBILIDADE																					
DEFECAÇÃO																					
MICÇÃO																					
TROTE																					
GALOPE																					
SALTO VERT.																					

OBS:

Anexo 3

Publicações em curso

NEONATAL SOCIAL ISOLATION FACILITATES PANIC-LIKE BEHAVIORS
 EVOKED BY ELECTRICAL STIMULATION OF THE PERIAQUEDUCTAL GRAY
 MATTER OF ADULT RATS. Quintino-dos-Santos JW, **Bernabé CS**, Alvarenga VM,
 Rosa CA, Tufik S and Schenberg LC.

LATE EFFECTS OF NEONATAL ISOLATION AND LEARNED HELPLESSNESS ON SEROTONIN METABOLISM OF THE DORSAL AND VENTROLATERAL REGIONS IN PERIAQUEDUCTAL GRAY MATTER IN WISTAR RATS. Rosa CA, **Bernabé CS**, Armini RS, Siller CA, Vigil FAB, Santos AMC, Ribeiro AM and Schenberg LC.

FURTHER EVIDENCE OF THE LACK OF 'STRESS HORMONE' RESPONSES FOLLOWING AVERSIVE ELECTRICAL STIMULATIONS OF THE PERIAQUEDUCTAL GRAY MATTER OF RATS. Armini RS, **Bernabé CS**, Rosa CA, Siller CA and Schenberg LC.

LACK OF "STRESS HABITUATION" FOLLOWING DAILY HANDLING AND REPEATED EXPOSURE TO A NEW ENVIRONMENT: END OF A MYTH? Armini RS, **Bernabé CS**, Rosa CA, Siller CA, Schimitel FG and Schenberg LC.