

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FARMACOLOGIA

ERICH ANTONIO MORAES

**EFEITOS DO ISOLAMENTO SOCIAL NEONATAL, DA FLUOXETINA
E DO LACTATO DE SÓDIO SOBRE O PÂNICO EXPERIMENTAL
INDUZIDO POR CIANETO DE POTÁSSIO OU ESTIMULAÇÃO
DA MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL EM RATOS**

VITÓRIA
2015

ERICH ANTONIO MORAES

**EFEITOS DO ISOLAMENTO SOCIAL NEONATAL, DA FLUOXETINA
E DO LACTATO DE SÓDIO SOBRE O PÂNICO EXPERIMENTAL
INDUZIDO POR CIANETO DE POTÁSSIO OU ESTIMULAÇÃO
DA MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg

VITÓRIA
2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade
Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

M827e Moraes, Erich Antonio, 1976-
Efeitos do isolamento social neonatal, da fluoxetina e do lactato desódio sobre o pânico experimental induzido por cianeto de potássio ou estimulação da matéria cinzenta periaquedutal em ratos/Erich Antonio Moraes– 2015.
98f. : il.

Orientador:Luiz Carlos Schenberg.

Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Farmacologia) –
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da
Saúde.

1.Transtorno de Pânico. 2.Ansiedade de
Separação.3.Substância Cinzenta Periaquedutal. 4.Fluoxetina.
5. Cianeto de Potássio. 6. Lactato de Sódio. I. Schenberg, Luiz
Carlos.II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de
Ciências da Saúde.III.Título.

CDU: 61

ERICH ANTONIO MORAES

**EFEITOS DO ISOLAMENTO SOCIAL NEONATAL, DA FLUOXETINA
E DO LACTATO DE SÓDIO SOBRE O PÂNICO EXPERIMENTAL
INDUZIDO POR CIANETO DE POTÁSSIO OU ESTIMULAÇÃO
DA MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Espírito Santo, para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Farmacologia

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg - UFES
Orientador

Profa. Dra. Karla Nívea Sampaio
Membro Externo

Profa. Dra. Vanessa Benjamini Harres
Membro Interno

À minha esposa Janaína

Pela compreensão com a minha ausência, pelo apoio irrestrito nos momentos difíceis e principalmente, pelos valiosos conselhos. Você trouxe a tranquilidade para que as dificuldades fossem superadas. Obrigado pela família linda que você me ajudou a construir... você é a minha grande e verdadeira inspiração.

Ao meu filho Mikael

Pelo companheirismo, por encher os meus dias de alegria e principalmente, por ter mudado de forma tão intensa a minha vida. Você é o meu orgulho e a minha fonte de superação/motivação. A força que eu busco para vencer os obstáculos da vida. Te amo!

Aos meus pais e em especial, a minha mãe Elsa

A vida infelizmente não me deu a oportunidade de conviver por muito tempo com o pai maravilhoso que tive até os 9 anos, mas me deu a oportunidade de conhecer e conviver mais intensamente com essa pessoa dinâmica e trabalhadora que foi a minha mãe. Obrigado pelo caráter, honestidade, sinceridade e tantos outros valores que me passou ao longo desses anos juntos. Estejam em paz!!!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Luiz Carlos Schenberg, que além de ter aberto as portas do seu laboratório para esse postulante a cientista, foi fonte para a minha sede de conhecimento. Nesses mais de dois anos em que convivemos e compartilhamos dos mesmos interesses, posso afirmar que esse intenso convívio acrescentou mais a minha vida científica do que qualquer outra experiência anterior que tive e de uma forma ou de outra, sempre levarei um pouco dos inúmeros ensinamentos que contigo obtive. Independente de qualquer coisa: agradecimentos sinceros professor.

As professoras Dra. Daniela do Bem do Departamento de Ciências Farmacêuticas - UFES e Dra. Rita Pires do Departamento de Ciências Fisiológicas - UFES, por terem me recebido de forma extremamente cordial e atenciosa no primeiro contato que tive com o PPGBF. Admiro muito o trabalho de vocês e sou fã incondicional da pesquisa que realizam.

À todos os demais professores do PPGBF que conviveram comigo durante o meu mestrado e sempre me trataram de forma extremamente respeitosa e compreensiva, demonstrando profunda preocupação com a minha formação.

As professoras Dra. Vanessa Harres e Dra. Karla Sampaio, pelo aceite em fazerem parte da minha banca e contribuições/sugestões que deram ao longo desse trabalho. Algumas colocações feitas ainda na minha qualificação foram vitais para a conclusão desses estudos.

Ao técnico e amigo Ms. Enildo Pimentel; e a mestranda Carmen Castardelli (ambos do Laboratório de Fisiopatologia Cardiovascular), pelos ensinamentos nas técnicas de canulação. Agradecimento eterno.

Ao mestre Cristian Bernabé, por sua ajuda e ensinamento nas técnicas de ISN e EIC. Obrigado e sucesso sempre.

Aos funcionários e professores do PPGCF da UFES, pela maneira respeitosa que sempre me trataram, mesmo sendo aluno de outro programa. Foi muito bom relembrar os meus tempos de IC nesses corredores e também reencontrar antigos conhecidos e amigos: entre funcionários, professores, alunos e ex-alunos que hoje se tornaram pesquisadores.

As professoras Dra. Ester Palacios e Dra. Livia Rodrigues, sou eternamente grato pelos ensinamentos que obtive com vocês, professoras e pessoas maravilhosas, que tenho enorme admiração.

Aos colegas que colaboraram de alguma forma para a conclusão dos experimentos utilizados nesse trabalho: Ivana, Carlos, Luana, Martielo e Rúbia. Sem a ajuda de vocês talvez boa parte desse trabalho ainda estivesse por fazer.

Aos laboratórios multiusuário da UFES, pela disponibilidade dos aparelhos e sua equipe para a realização dos procedimentos de histologia desse trabalho.

Ao Biotério da UFES, que sempre me atendeu com total eficiência, nunca me deixando sem material para trabalhar. O veterinário Rodolfo e toda a sua equipe estão de parabéns.

Aos colegas que fiz dentro do programa, em especial: Johnathan, Willyan, Tamara, Rayssa, Bárbara, Bruna, Bruno e Tassiane. A convivência foi curta mas intensa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES), pelo apoio financeiro e confiança mútua, depositada nesses dois anos de financiamento.

E por último, mas de extrema importância, aos ratos que utilizei nesse trabalho. É inestimável a contribuição desses animais para o conhecimento científico e conseqüentemente, para a qualidade de vida de nós humanos. Vejo feliz o dia em que não mais será necessário a utilização desses em nossos procedimentos.

Muito obrigado a todos!!!

"O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas; é quem faz as verdadeiras perguntas."

Claude Lévi-Strauss

RESUMO

Os ataques de pânico (AP) podem ser precipitados pela inalação de dióxido de carbono (CO₂ 5%) ou pela infusão de lactato de sódio 0,5 mol/L (LAC) em pacientes predispostos, mas não nos indivíduos saudáveis ou pacientes com outros transtornos psiquiátricos. Estas e outras observações sugeriram que os AP sejam "alarmes falsos de sufocamento". O TP também caracteriza-se pela alta comorbidade com ansiedade de separação da infância (ASI). De fato, a ASI tem sido considerada como um fator predisponente tanto do pânico como da resistência aos pânicofóbicos. Estudos pré-clínicos do nosso laboratório mostraram, por outro lado, que a fluoxetina (FLX) atenua o pânico experimental à estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPAd) e à injeção de cianeto de potássio (KCN) em doses e regimes similares aos empregados na clínica. Adicionalmente, estes estudos mostraram que o isolamento social neonatal (ISN), um modelo de ASI, abole os efeitos pânicofóbicos da fluoxetina (1-2 mg.kg⁻¹.dia⁻¹, 21 dias) no modelo de pânico por estimulação da MCPAd. Portanto, o presente trabalho avaliou os efeitos da administração de 4 mg/kg de FLX (Estudo-1) e da infusão de uma solução 0,5 mol/L de LAC (Estudo-2) sobre as respostas de pânico à estimulação da MCPAd ou à injeção de KCN, respectivamente, em ratos submetidos ao isolamento social neonatal tanto efetivo (ISN) quanto fictício (ISF). No Estudo-1, ratos Wistar machos adultos submetidos ao ISN (3 h diárias) ou ao ISF (somente manipulação), ao longo da lactação, foram implantados com eletrodos na MCPAd e tratados com salina (0,9%, SAL) ou FLX (4 mg.kg⁻¹.dia⁻¹) ao longo de 21 dias. Nos ratos tratados com SAL, enquanto os limiares das respostas de pânico mantiveram-se praticamente inalterados no grupo ISF, eles foram progressivamente aumentados no grupo ISN. Os ratos tratados com FLX4 apresentaram limiares mais elevados que aqueles dos ratos tratados com SAL. A comparação aos limiares basais mostrou que a FLX4 teve efeitos diferenciados nos grupos ISF e ISN, aumentando ou reduzindo seus limiares, respectivamente. Embora não tenhamos observado diferenças dos efeitos da FLX4 sobre os limiares de pânico dos grupos ISN e ISF, as variações percentuais em relação à sessão de triagem indicam que a FLX4 teve efeitos até mesmo facilitadores. Estes resultados estendem observações anteriores da ausência de efeitos de doses menores de FLX nos ratos submetidos ao ISN. Por sua vez, o Estudo-2 mostrou que a infusão endovenosa de uma concentração clinicamente

eficaz de LAC (0,5 mol/L) não tem efeito algum sobre o pânico induzido pelo KCN em ratos tanto virgens quanto submetidos ao ISF ou ISN. Embora os últimos resultados sugiram que os AP ao KCN (em ratos) e LAC (em humanos) envolvam mecanismos distintos, a conclusão definitiva requer experimentos adicionais com concentrações maiores de LAC.

Palavras-chave: Transtorno do Pânico, Ansiedade de Separação na Infância, Matéria Cinzenta Periaquedutal, Fluoxetina, Cianeto de Potássio, Lactato de Sódio.

ABSTRACT

Panic attacks (PAs) can be precipitated either by the inhalation of 5% carbon dioxide (CO₂) or by the infusion of 0.5 mol/L sodium lactate (LAC) in predisposed patients, but not in healthy subjects or patients with other psychiatric disorders. These and other observations suggested that PAs are "suffocation false alarms". The panic disorder is likewise characterized by the high comorbidity with childhood separation anxiety (CSA). Consequently, the CSA has been considered both as a predisposing factor of panic and as an important factor of the resistance to panicolitics. Preclinical studies of our laboratory showed, on the other hand, that panicolitics attenuate experimental panic attacks to both the electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray matter (DPAG) and the intravenous injection of potassium cyanide (KCN) in doses and regimens similar to those used in the clinics. These studies also showed that neonatal social isolation, a model of CSA, suppresses the panicolitic effect of fluoxetine (FLX, 1-2 mg.kg⁻¹.dia⁻¹, 21 days) on panic-like responses to electrical stimulation of DPAG. Therefore, the present study evaluated the effects of a higher dose of FLX (Experiment-1) as well as of the infusion of LAC (Experiment-2) on PAs to electrical stimulations of DPAG or to intravenous injections of KCN, respectively, in rats subjected to social isolation as neonates. In Experiment-1, adult male Wistar rats subjected either to 3-h daily neonatal social isolation (NSI) or brief-handling fictive social isolation (FSI) throughout the lactation period, were implanted with electrodes into the DPAG and treated with saline (0.9%, SAL) or fluoxetine (4 mg.kg⁻¹.dia⁻¹, FLX4) over 21 days. Although the panic thresholds remained virtually unchanged in SAL-treated FSI rats, they were progressively increased in SAL-treated NSI rats. Moreover, FLX4-treated rats showed higher thresholds than those treated with SAL. However, comparison to baseline thresholds showed that FLX4 had differential effects on FSI and NSI groups, increasing or reducing thresholds, respectively. Although there were no significant differences between ISF and FSI at the end of the treatment with FLX4, the threshold percent changes relative to baseline suggest that FLX4 had effects even facilitatory on panic responses. The resistance of neonatally-isolated rats to FLX4 extended previous studies with smaller doses of FLX. In turn, the results of Experiment-2 showed that intravenous infusion of a clinically effective concentration of LAC (0.5 mol/L) does not have any effect on the escape responses to KCN in rats either virgin

or submitted to the FSI or NSI. Although the latter results suggest that panics to both KCN (experimental) and LAC (clinical) are mediated by different systems, conclusions require further experiments with higher concentrations of LAC.

Keywords: Panic Disorder, Childhood Separation Anxiety, Periaqueductal Gray Matter, Fluoxetine, PotassiumCyanide, Sodium Lactate.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1:** Nomenclatura dos transtornos de ansiedade segundo classificação do DSM 5 (2013) e os seus respectivos códigos. É possível observar uma relação entre o TAS e TP observada por Klein (1964) conhecida como Hipótese da Ansiedade de Separação. _____ 23
- Figura 1.2:** Organização colunar rostro-caudal da MCPA. As linhas tracejadas delimitam as colunas: (1) dorsomedial, (2) dorsolateral, (3) lateral e (4) ventrolateral que circundam o aqueduto (Aq) cerebral. As colunas dorsolateral e dorsomedial juntas também são denominadas de matéria cinzenta periaquedutal dorsal ou MCPAd. Adaptado de Carrive (1993). _____ 35
- Figura 1.3:** Síntese da serotonina. Triptofano hidroxilase (TPH) e aminoácido aromático descarboxilase (AADC). tetrahydrobiopterina (BH_4), dihydrobiopterina (BH_2), molécula de oxigênio (O_2) hidroxila (OH), dióxido de carbono (CO_2). Adaptado de Purves et al., 2004. _____ 38
- Figura 1.4:** Dendrograma que compara todos os 14 receptores 5-HT quanto as diferenças em suas seqüências protéicas. Quanto maior a linha que separa um receptor do outro, maior é a variação na seqüência protéica desses. Adaptado de Barnes e Sharp (1999). _____ 39
- Figura 3.1:** Organização (A) e procedimento cirúrgico (B) para a implantação do eletrodo utilizado no Estudo-1. Detalhes da instrumentação cirúrgica (C) e estereotáxico (D). _____ 51
- Figura 3.2:** Localização dos eletrodos dos grupos ISF (●) e ISN (●) dos ratos tratados com 4 mg.kg^{-1} de FLX. Os números representam as coordenadas ântero-posteriores em relação ao bregma de cortes coronais do atlas do cérebro do rato de Paxinos e Watson (2006). Abreviaturas: MCPDM/DL/L, colunas dorsomedial, dorsolateral e lateral da MCPA. _____ 58
- Figura 3.3:** Efeitos da administração crônica de fluoxetina (4 mg/kg , i.p.) ou salina sobre as intensidades limiars medianas ($I_{50 \pm EP}$) das respostas de pânico experimental à estimulação elétrica da MCPAd nos grupos ISN e ISF. * $P < 0,05$, diferente do outro grupo. _____ 59
- Figura 3.4:** Valores percentuais das intensidades limiars medianas ($I_{50 \% \pm CV}$) das respostas de pânico à estimulação elétrica da MCPAd dos grupos ISF e ISN administrados com fluoxetina (4 mg.kg^{-1} , i.p.) ou salina. # e + $P < 0,05$, diferenças significantes em relação à sessão de triagem (Dia 0) do respectivo grupo. _____ 60

Figura 4.1: Organização (A), procedimento cirúrgico (B) para a canulação da veia jugular e estimulação por KCN (C). _____ 72

Figura 4.2: Sistema utilizado no Estudo-2. Todo procedimento comportamental era filmado e posteriormente analisado, sendo o tempo contabilizado utilizando-se o recurso timecode do Sony Vegas Pro 11® (A). Arena para estimulação química com a bomba de infusão acopladas (B). _____ 72

Figura 4.3: Gráfico mostrando a variação do tempo de fuga em segundos (eixo y) nos diversos grupos (VG: virgem, ISF: isolamento social fictício, ISN: isolamento social neonatal e NLX: naloxona) utilizados nesse estudo (eixo x) pré (vermelho) e pós infusão (verde) de lactato de sódio 0,5mol/l (LAC) ou solução salina isosmolar 2,5% (SAL). _____ 73

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Protocolo experimental. Abreviaturas: EIC-I a V: sessões de estimulação intracraniana de triagem e dos tratamentos agudo (dia 2) e crônicos (dias 7, 14 e 21) com FLX4, respectivamente; ISN: isolamento social neonatal; PN: dia pós-natal. _ 52

Tabela 3.2: Sítios de estimulação dos grupos de ratos separados (ISN) e não separados (ISF), tratados com FLX4 e os seus valores percentuais. CPCS: camadas profundas do colículo superior; MCPAdl e MCPAl: colunas dorsolateral e lateral da MCPA, respectivamente; N: número de animais por grupo. _____ 56

Tabela 4.1: Cronograma experimental para os grupos P e NP tratados com KCN. EKCN: estimulação química com KCN; ISN: isolamento social neonatal; PN: dia pós-natal. _____ 71

Tabela 4.2: Cronograma experimental para os grupos VG tratados com KCN. EKCN: estimulação química com KCN; D: dia de procedimento a partir da chegada desses ratos no laboratório (D-0). _____ 71

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5-HT, 5-hidroxitriptamina ou serotonina

5-HTP, 5-hidroxitriptofano

ACh, acetilcolina

AP, ataques de pânico

APA, Associação Americana de Psiquiatria

ASI, ansiedade de separação na infância

CEUA, Comitê de Ética no Uso de Animais - UFES

CID, Classificação Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde

CO₂, dióxido de carbono

CPF, córtex pré-frontal

CSM, caixa de separação maternal

DA, desamparo aprendido

DRVl, núcleo dorsal da rafe ventrolateral

FDA, Food and Drug Administration

FLX, fluoxetina

FLX4, fluoxetina na dose de 4mg/kg/dia

HCO₃⁻, bicarbonato

HDM, hipotálamo dorsomedial

HP, hipotálamo posterior

IM, intramuscular

IP, intraperitoneal

ISN, isolamento social neonatal

ISRS, Inibidores Seletivos da Recaptura de Serotonina

KCN, cianeto de potássio

LAC, lactato de sódio

LTE, labirinto-em-T elevado

MCPA, matéria cinzenta periaquedutal

MCPAd, matéria cinzenta periaquedutal dorsal

MCPAdl, matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral

MCPAdm, matéria cinzenta periaquedutal dorsomedial

MCPAl, matéria cinzenta periaquedutal lateral

MCPAvl, matéria cinzenta periaquedutal ventrolateral

NC, núcleo cuneiforme

NCS-R, National Comorbidity Survey Replication

NLX, naloxona

NMR, núcleo mediano da rafe

NS, grupo não-separado (mesmo que ISF)

NPbL, núcleo parabraquial lateral

NTP, núcleo tegmental pedúnculo pontino

OMS, Organização Mundial de Saúde

PCO₂, pressão parcial de CO₂

PET, tomografia de emissão de pósitron

pH, potencial hidrogeniônico

PN, período pós-natal

SAL, salina

SERT, transportador de membrana de 5-HT

SNC, sistema nervoso central

SP, grupo separado (mesmo que ISN)

SPECT, tomografia computadorizada por emissão de fóton

TA, transtornos de ansiedade

TAG, transtorno de ansiedade generalizada

TAS, transtorno de ansiedade de separação

TEPT, transtorno do estresse pós-traumático

TOC, transtorno obsessivo-compulsivo

TP, transtorno do pânico

UI, unidades internacionais

VG, grupo virgem

VL, ventrolateral

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xv
SUMÁRIO	xviii
1. INTRODUÇÃO	21
1.1. TRANSTORNO DO PÂNICO	21
1.2. TEORIA DO ALARME FALSO DE SUFOCAMENTO	29
1.3. ANSIEDADE DE SEPARAÇÃO NA INFÂNCIA	31
1.4. MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL E TRANSTORNO DE PÂNICO	34
1.5. SEROTONINA E O TRANSTORNO DE PÂNICO	36
2. OBJETIVOS	43
2.1. OBJETIVO GERAL	43
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
3. ESTUDO-1: EFEITO DA FLUOXETINA SOBRE AS RESPOSTAS DO PÂNICO EXPERIMENTAL À ESTIMULAÇÃO DA MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL DE RATOS ADULTOS SUBMETIDOS AO ISOLAMENTO SOCIAL NEONATAL.	46
3.1. <i>INTRODUÇÃO</i>	46
3.2. <i>MATERIAIS E MÉTODOS</i>	48
3.2.1. Animais	48
3.2.2. Separação materna	49
3.2.3. Tratamento com FLX	49
3.2.4. Eletrodos	49
3.2.5. Implantação dos eletrodos	50
3.2.6. Protocolo	51
3.2.7. Registros comportamentais	52
3.2.8. Sacrifício	54
3.2.9. Histologia	54
3.2.10. Estatística	55
3.3. <i>RESULTADOS</i>	55
3.3.1. Sítios estimulados	55
3.3.2. Comparação dos efeitos da FLX4 ou SAL sobre os limiares do pânico experimental à estimulação elétrica da MCPA de ratos submetidos tanto ao ISN quanto ao ISF	56
3.4. <i>DISCUSSÃO</i>	60
3.5. <i>CONCLUSÕES</i>	64

4. ESTUDO-2: EFEITOS DO ISOLAMENTO SOCIAL NEONATAL E DO LACTATO DE SÓDIO NO PÂNICO EXPERIMENTAL À ADMINISTRAÇÃO ENDOVENOSA DE CIANETO DE POTÁSSIO.	66
4.1. INTRODUÇÃO	66
4.2. MATERIAIS E MÉTODOS	68
4.2.1. Animais	68
4.2.2. Canulação da veia jugular	69
4.2.3. Protocolo	70
4.2.4. Sacrifício	70
4.2.5. Estatística	71
4.3. RESULTADOS	73
4.4. DISCUSSÃO	74
4.5. CONCLUSÃO	77
5. REFERÊNCIAS	79
ANEXOS	92
ANEXO 1	93
ANEXO 2	94
ANEXO 3	95
ANEXO 4	96
ANEXO 5	97
ANEXO 6	98

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. TRANSTORNO DO PÂNICO

Os transtornos de ansiedade (TA) são um grupo de distúrbios psicológicos que compartilham características de medo excessivo e ansiedade que estão relacionados com distúrbios comportamentais. Medo é uma resposta emocional a uma ameaça iminente e real (percebida), ao passo que a ansiedade é a antecipação a uma futura ameaça (ainda inexistente). É o conjunto de transtornos mentais mais comuns, começando cedo e seguindo um curso crônico, gerando um enorme prejuízo na vida dos pacientes acometidos por essa desordem (APA, 2013; BAXTER et al., 2013).

São classificados como TA os seguintes distúrbios: transtorno de ansiedade generalizada (TAG), fobias específicas (FE), fobia social (FS), transtorno do estresse pós-traumático (TEPT), transtorno de ansiedade de separação (TAS) e transtorno do pânico (TP) (APA, 2013; ANTONY e SWINSON, 1996). Apesar da incapacidade associada a cada uma dessas perturbações, no Brasil apenas uma pequena parte dos pacientes com algum TA é identificada na atenção primária à saúde, sendo importante e necessária, a articulação entre a saúde mental e a atenção básica nesse sentido (KROENKE et al., 2007, BRASIL, 2003).

Dentre os TA, o TP é o que acaba gerando um custo econômico maior para o paciente e sua família por estar associado a um alto nível de incapacidade física, social, ocupacional e necessidade de um maior número de consultas médicas. Logo, é uma doença grave e debilitante, marcada pela ansiedade súbita e intensa, acompanhada de excitação fisiológica (tremor, taquicardia, sudorese, tonturas e parestesia), sensações de falta de ar ou sufocamento (sensação de asfixia), dor ou desconforto no peito, medo de morte iminente ou perda de controle mental, sendo caracterizado por ataques de pânico (AP) recorrentes e imprevisíveis (apreensão intensa, medo e desconforto de início súbito, sem causa determinável) com ou sem agorafobia. Essa última é a ansiedade relacionada a condição de estar em locais ou

situações em que a saída seja difícil, como por exemplo, multidões, um supermercado muito grande ou um local onde o auxílio possa não estar disponível (APA, 2013; PILECKI, et al., 2011).

O seu diagnóstico, como entidade nosológica individual, surgiu em 1980 a partir da 3ª edição do Manual de Diagnóstico e Estatística de Transtornos Mentais (DSM III) da Associação Americana de Psiquiatria (APA) e de acordo com a DSM IV publicada em 1994, o TP caracteriza-se pela presença de AP que atingem o pico máximo em até 10 minutos e são acompanhados por uma sensação de medo iminente ou urgência em escapar.

Ainda, segundo estimativa da National Comorbidity Survey Replication (NCS-R, estudo representativo realizado com 9282 indivíduos adultos domiciliados nos EUA), 23% da população norte-americana preencheu critérios para ao menos um ataque de pânico isolado ao longo da vida, sendo o TP menos comum, com apenas 5% (4% sem agorafobia, e 1% com agorafobia) dos respondentes preenchendo critérios para esse transtorno (WOLPE e ROWAN, 1988; KESSLER et al., 2006). Na população estadunidense e europeia em geral, a prevalência estimada para o TP é de cerca de 2-3% entre adultos e adolescentes, sendo que mulheres são mais frequentemente afetadas do que os homens (relação aproximada de 2:1) e de ocorrência comum após os 14 anos de idade (inferior a 0,4% antes dos 14 anos) (APA, 2013). Tal estimativa, com amostragem significativa, inexistente no Brasil (SALUM, BLAYA e MANFRO, 2009) o que é preocupante, pois o TP também é caracterizado pela sua resistência a remissão espontânea e comorbidade com outros transtornos como a depressão e ansiedade de separação na infância (ASI) (SÁNCHEZ-MECA et al., 2010).

Nesse sentido Klein (1964) foi o pioneiro em propor uma relação entre a ASI e o TP (Figura 1.1) quando observou a existência de dois grupos de pacientes com AP: o primeiro grupo era compreendido por pacientes que desenvolveram AP em condições de separação ou privação e possuíam histórico de ASI, enquanto o segundo grupo havia desenvolvido AP por alterações endócrinas (pacientes acometidas por altos níveis de tensão pré-menstrual, pós-histerectomia e pós-ooforectomia). Ainda de acordo com a sua hipótese da ansiedade de separação na infância, a aflição gerada em resposta a separação materna seria uma reação

adaptativa, inata e evolutiva com o objetivo de proteger a prole de um perigo possivelmente letal e que tanto as crianças com transtorno de ansiedade de separação (TAS), assim como adultos com TP experimentaram uma desregulação dos mecanismos responsáveis pelo controle dessa ansiedade (KLEIN, 1995).

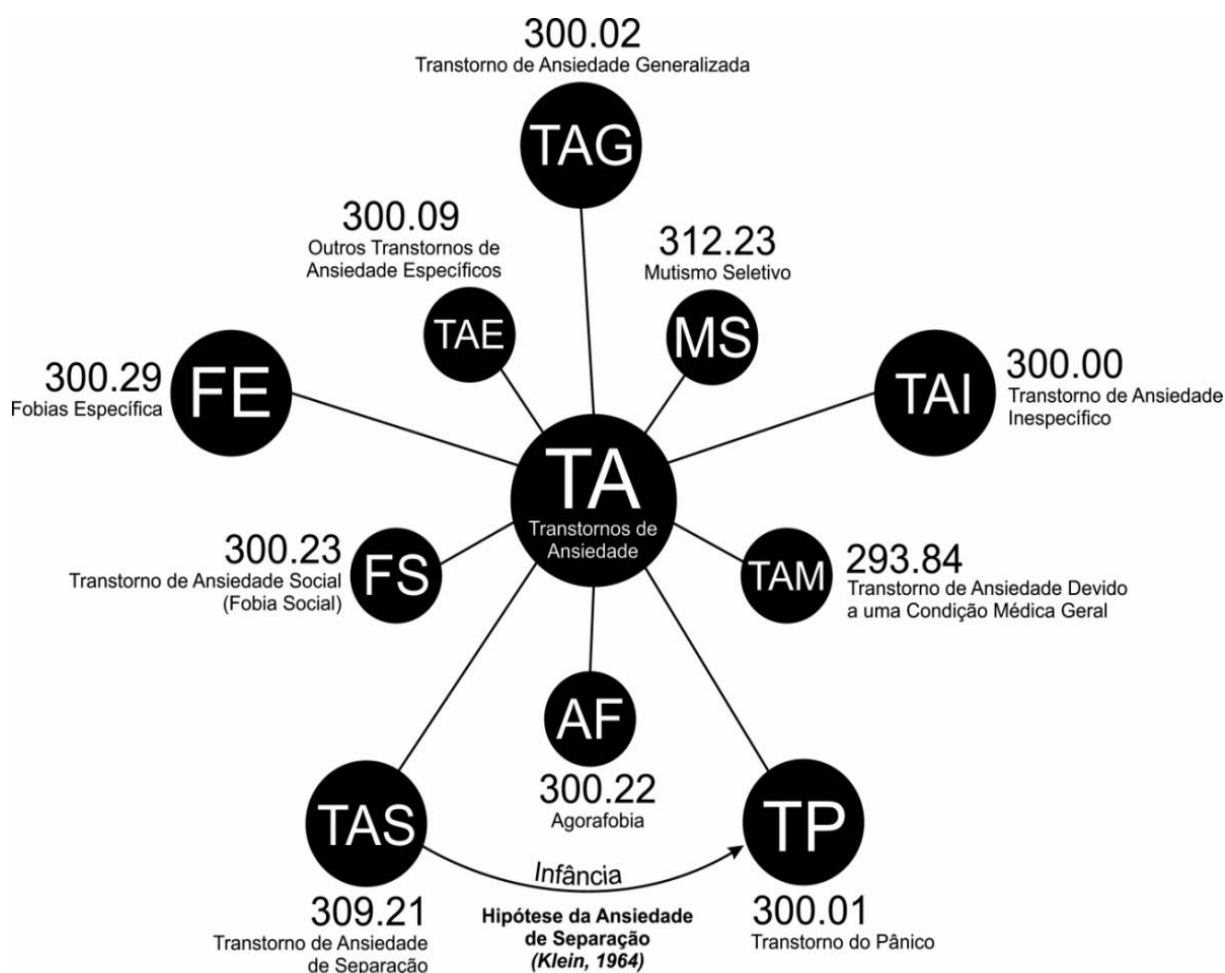


Figura 1.1: Nomenclatura dos transtornos de ansiedade segundo classificação do DSM 5 (2013) e os seus respectivos códigos. É possível observar uma relação entre o TAS e TP observada por Klein (1964) conhecida como Hipótese da Ansiedade de Separação.

Além da hipótese da ansiedade de separação na infância, Klein (1993a,b) também propôs o AP como um alarme falso de sufocamento, sugerindo que a hipersensibilidade ao dióxido de carbono (CO₂) apresentada pelos pacientes de pânico seria resultado de uma interpretação incorreta de um sistema de alarme de sufocamento fisiológico existente em todos nós.

Esta teoria foi condizente com a demonstração de que os AP podiam ser precipitados por hiperventilação a 5% de CO₂, mas não no exercício físico ou na ventilação ambiente em estudos publicados anteriormente por Cohen e White (1951). Adicionalmente, Pitts e McClure (1967) mostraram que os ataques de pânico podem ser precipitados pela infusão endovenosa de lactato de sódio (LAC) na concentração de 0,5 mol/L em pacientes que apresentam ataques de pânico espontâneos, mas não em pessoas saudáveis (KLEIN, 1993a). De fato os resultados com a infusão de LAC tem sido bastante consistentes e parecem diferenciar os pacientes de pânico dos indivíduos saudáveis. Entretanto, estudos adicionais sugeriram que as respostas de pânico provocadas pela infusão de lactato não estão confinadas aos pacientes de pânico e sim relacionadas com os limiares de ansiedade (COWLEY et al. 1987).

Apesar de inúmeros estudos, os mecanismos que produzem as respostas de pânico pela infusão de lactato ainda são incertos. A influência dos níveis de CO₂, que aumentam nos ataques de pânico provocados pela infusão de LAC, é um dos mecanismos propostos para explicar porque os pacientes do TP possuem uma hipersensibilidade a inalação do dióxido de carbono, sugerindo que essa alteração fisiológica seria a gênese dos AP (MONTGOMERY, 1993).

Também é verdade que a infusão de lactato produz alcalose metabólica periférica acompanhada por hipercapnia cerebral e acidose respiratória. A fisiologia respiratória nos diz que na presença de alcalose metabólica, tal qual aquela produzida pela infusão de lactato, deve-se respirar menos na tentativa de se manter o pH sanguíneo a níveis fisiológicos (7,35 - 7,45) pela retenção de CO₂. Entretanto, o que se observa é o aumento respiratório tanto nos pacientes de pânico como nos indivíduos controle após a infusão de lactato.

Independente da indução dos AP pelo lactato ou CO₂, as manifestações respiratórias relatadas com maior frequência por pacientes com TP são dispnéia, respiração rápida e hiperventilação. Nesse sentido, Klein (1993a) propôs ainda que o ataque de pânico é constituído por três etapas:

1 - Disparo do sistema de alarme de sufocamento: este provoca sensação de falta de ar e aumento do volume corrente, como se houvesse havido um aumento da PCO_2 .

2 - Desencadeando as respostas comportamentais: se o sistema continua recebendo sinais de asfixia, ocorre a segunda etapa, desencadeando as respostas comportamentais de um AP.

3 - Taquipnéia: o aumento na frequência respiratória ocorre de forma persistente, mesmo após o término dos eventos comportamentais do ataque de pânico (Klein, 1993a).

Outros estudos apresentaram ainda evidências da hipersensibilidade fisiológica dos pacientes de pânico ao CO_2 (GORMAN et al., 1988; FISHMAN et al., 1994; PAIN et al., 1988). Assim, comparados aos controles sadios e aos pacientes que não responderam ao CO_2 , pacientes que tiveram ataques de pânico induzidos por CO_2 apresentaram aumentos maiores do volume corrente respiratório durante a inalação do gás antes do ataque de pânico, tal como tiveram efeito acentuado os pacientes que apresentaram AP com infusão de lactato (GORMAN et al., 1988, LIEBOWITZ et al., 1985). Embora estes resultados com CO_2 não tenham sido corroborados por outros pesquisadores (WOODS et al., 1986; ROTH et al., 1992), estudos posteriores mostraram que pacientes tratados com pânico, como a fluoxetina (FLX), são menos sensíveis ao CO_2 que os pacientes não-tratados (GORMAN et al., 1997).

A FLX é o fármaco de primeira escolha na terapia do TP devido a sua eficácia e segurança (HOFFMAN e MATHEW, 2008). Geralmente o tratamento do TP começa com esse fármaco na dose de 10 mg/dia, após uma semana aumentando para a dose de 20 mg/dia. Embora a dose de 20 mg/dia seja eficaz para a maior parte dos sintomas do TP, pacientes que não alcançam uma resposta satisfatória a essa posologia são elegíveis ao escalonamento de dose até o máximo de 60 mg/dia (PULL e DANSA, 2008; MICHELSON et al., 2001). O seu mecanismo de ação consiste na inibição da recaptura (transporte) da serotonina (5-hidroxitriptamina ou 5-HT) nas terminações nervosas e a importância dessa classe medicamentosa na terapêutica do TP aponta o sistema serotoninérgico como uma peça central para o entendimento dessa comorbidade. Embora os inibidores seletivos da recaptura de serotonina (ISRS) tenham se tornado as drogas de primeira linha 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-sinápticamente, 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).

Estudos com tomografia de emissão de pósitron (PET) e imunohistoquímica com marcação para c-Fos, mostraram que durante a hipercapnia o hipotálamo posterior (HP), núcleo parabraquial lateral (NPbL) e matéria cinzenta periaquedutal (MCPA) são ativados, sendo essa última marcada tanto pelas administrações repetidas de cianeto de potássio (KCN), assim como pela exposição prolongada ao CO₂. Com exceção do NPbL, todas as regiões mencionadas possuem quimiorreceptores para H⁺/CO₂ e/ou O₂ e ao passo que a anóxia citotóxica dos quimiorreceptores por KCN produz uma ativação generalizada da MCPA, o CO₂ ativa apenas as regiões caudais da matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPAd). Resultados obtidos por Franchini e colaboradores (FRANCHINI e KRIEGER, 1993; FRANCHINI et al., 1997) mostraram que a administração de KCN em baixas doses produz comportamento de defesa em ratos (DILLON e WALDROP, 1992; COATES, LI e NATTIE, 1993; RYAN e WALDROP, 1995; PINEDA e AGHAJANIAN, 1997; KRAMER, NOLAN e WALDROP, 1999; HAYWARD e VON REITZENSTEIN, 2002; BERQUIN et al., 2000).

A hipersensibilidade dos pacientes do TP à hipercapnia, hipóxia e infusão de lactato pode estar relacionada com algum tipo de disfunção desses núcleos (SCHENBERG et al., 2014) e nesse sentido, Schimitel e colaboradores (2012) realizaram um estudo em que examinaram os efeitos individuais e combinados do KCN e CO₂ (antes e após lesão da MCPA) sobre os comportamentos espontâneos e produzidos por estimulação elétrica da MCPA de rato. Os resultados obtidos nesse trabalho sugeriram que a matéria cinzenta periaquedutal lateral (MCPAl) abriga um sistema de alarme sensível a hipóxia cuja a ativação tornaria o indivíduo hiperresponsivo à hipercapnia. Foi observado também que enquanto os animais tratados com dose baixa KCN (20µg) tiveram facilitação dos principais comportamentos de fuga (trote, galope e salto), a exposição de ratos a concentrações elevadas de CO₂ provocou

uma inibição de tais comportamentos tanto pela estimulação elétrica da MCPA, como pela estimulação química pelo KCN, quando comparados ao grupo exposto ao ar ambiente e que a lesão da MCPA resultou na supressão dos comportamentos mencionados pela administração de KCN na dose de 80µg.

É verdade que estudos realizados em humanos mostraram que a MCPAd também é ativada em resposta a ameaças próximas ou iminentes, gerando um comportamento que em diversos aspectos se relaciona aos AP (MAREN, 2007; MOBBS et al., 2007). Da mesma forma, a estimulação elétrica ou química da MCPAd em animais tem sido proposta como um modelo consistente de AP (GENTIL, 1988; JENCK et al., 1995; DEAKIN e GRAEFF, 1991; SCHENBERG et al., 2001; SCHENBERG, 2010).

Em ratos, enquanto a estimulação da MCPAd com estímulos de baixa magnitude produz a “reação de congelamento” caracterizada por imobilidade tensa e exoftalmia (protrusão do globo ocular e abertura máxima das pálpebras), estímulos mais intensos dão origem a um comportamento vigoroso de fuga caracterizado por galopes e saltos que alcançam 1 m/s e 50 cm de altura, respectivamente (BITTENCOURT et al., 2004; SCHENBERG et al., 2005). Estes comportamentos são acompanhados por padrões distintos de respostas cardiovasculares e respiratórias e, menos freqüentemente, micção e defecação (SCHENBERG et al., 1993; BITTENCOURT et al., 2004).

Estudos farmacológicos realizados em nosso laboratório mostraram que a resposta de galope induzida pela estimulação da MCPAd do rato foi seletivamente atenuada pela administração de fluoxetina na dose de 1mg/kg, dose e regime similares aos empregados na clínica. Em contraste, os comportamentos de defesa induzidos por estimulação elétrica da MCPAd não foram afetados por tratamentos ineficazes no TP, incluindo a administração aguda de antidepressivos e benzodiazepínicos (SCHENBERG et al., 2001, 2002; VARGAS e SCHENBERG, 2001). Entretanto, estudos realizados por Bernabé (2013) mostraram que o mesmo regime de tratamento (FLX 1 mg/kg) não teve efeito algum sobre os limiares das respostas de defesa e o autor justificou essa diferença devido a condições particulares referentes ao estudo anterior, como a cirurgia com craniotomia para exposição do seio venoso e o alojamento dos ratos em gaiolas de vidro individuais. Nesse mesmo estudo, o tratamento com a dose de 2 mg/kg/dia de FLX demonstrou efeito sobre tais limiares,

sendo observado aumentos acentuados, entre 24% e 65%, em todas as respostas de defesa do grupo ISF enquanto os ratos submetidos ao ISN apresentaram 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, teste do nado forçado, do desamparo aprendido (learned helplessness) e mais importante, esses resultados estão de acordo com estudo recente do nosso laboratório que mostrou o aumento progressivo dos limiares dos comportamentos de defesa por estimulação da MCPAd em ratos previamente submetidos a choques inescapáveis (QUINTINO-DOS-SANTOS et al., 2013).

De fato, diversos estudos sugerem que a ASI parece predispor o indivíduo a diversas psicopatologias na vida adulta, em particular, a depressão maior (KLEIN, 1993b; CANETTI et al., 1997; MANICAVASAGAR, 1998; FAVA e KENDLER, 2000; HEIM e NEMEROFF, 2001; BIEDERMAN et al., 2004; DOERFLER et al., 2008; KLAUKE et al., 2010; MROCZKOWSKI et al., 2011). Além disso pacientes com transtornos comórbidos de depressão e ansiedade também apresentam sintomas mais severos e prognósticos menos favoráveis, exigindo tratamentos mais precoces e um número maior de hospitalizações. Estes pacientes também apresentam um risco maior de suicídio comparado àqueles com transtornos isolados (FAWCETT, 1992; LECRUBIER, 1998; LECRUBIER e USTÜN, 1998; JOHNSON e LYDIARD, 1998; KAUFMAN e CHARNEY, 2000; KINLEY et al., 2011).

Sendo assim é de enorme importância aprofundar no entendimento sobre as conseqüências da ligação existente entre a ASI com as demais comorbidades psiquiátricas, em especial o TP, e a provável existência de eventos depressivos e as conseqüências envolvidas nessa relação, uma vez que ainda existem lacunas importantes em termos de diagnóstico e classificação, etiologia e tratamento das condições clínicas envolvidas aqui discutidas.

1.2. TEORIA DO ALARME FALSO DE SUFOCAMENTO

Os ataques de pânico são um intrigante enigma clínico com ramificações generalizadas na medicina. Por exemplo, quase metade de todos os pacientes com pânico recebem atendimento inicial no serviço de emergência médica, com queixas de dor no peito e dificuldade para respirar que se assemelham a um ataque cardíaco agudo. Além disso asma, enfisema e tabagismo predis põem ao TP (EHLERS e BREUER, 1996).

Inicialmente, em sua Teoria do Alarme Falso de Sufocamento, Klein (1993b) acreditou que o efeito panicogênico do lactato fosse devido ao seu metabolismo, quando o lactato é, por hidrólise, convertido em bicarbonato (HCO_3^-) e dióxido de carbono, podendo assim induzir a hipercapnia cerebral, uma vez que a alcalose metabólica periférica acompanhada de acidose respiratória central tinha sido observada nos pacientes durante os episódios de AP.

A fisiologia nos ensina que temos de respirar menos na vigência de alcalose metabólica, numa tentativa de reduzir o pH pela retenção de CO_2 , contudo, conforme discutido anteriormente, observa-se hiperventilação tanto em pacientes de pânico quanto em indivíduos saudáveis, durante a infusão de lactato.

Além disso, foi demonstrado que o d-lactato, isômero não metabolizado em mamíferos, também possui efeito panicogênico e é capaz de gerar resposta respiratórias nos pacientes de pânico (GORMAN et al., 1990). Portanto, o metabolismo do lactato não seria uma condição necessária para a indução de pânico ou estimulação respiratória e para explicar este fenômeno, Klein (1993a, 1993b) sugeriu que o sistema de alarme de sufocamento não diferencia os isômeros pois jamais foi exposto ao d-lactato no curso da evolução, propondo também que o sistema de alarme de sufocamento pode ser deflagrado tanto pelo CO_2 quanto pelo lactato diretamente, de formas independentes. Nesse sentido, considerando que os sensores de gases e o sistema de alarme de sufocamento estão em contínua interação, a hipótese de Klein prevê ainda que os AP poderiam ser facilitados ou inibidos por manobras respiratórias (hipercapnia e hipóxia, respiração compassada,

hiperventilação ativa, lactato) ou drogas que agem na respiração, como os agonistas e antagonistas opióides.

De fato, os opióides induzem depressão respiratória através da ativação de receptores opióides do tipo μ em locais específicos do sistema nervoso central, como o complexo de pré-Bötzinger, pequeno núcleo do bulbo ventro lateral que parece ser o local da gênese do ritmo ventilatório em mamíferos adultos e no período perinatal. O ritmo básico da respiração é gerado, formatado e modificado no complexo pré-Bötzinger sendo posteriormente transmitido aos neurônios pré-motores bulbo-espinhais, os quais transmitem o padrão respiratório resultante aos neurônios motores espinhais que controlam os músculos respiratórios (FELDMAN et al., 2003; FELDMAN e DEL NEGRO, 2006). Distúrbios neurais nesta área e suas adjacências modificam o padrão ventilatório de maneira acentuada e estes neurônios, quando expostos à substância P e opióides expressam sítios de ligação na membrana e modificam a frequência respiratória (PATTINSON, 2008; FELDMAN, MITCHELL e NATTIE, 2003).

Embora presente em ratos, esta área ainda não foi identificada em humanos (PATTINSON, 2008) e estudos recentes (SUBRAMANIAN e HOLSTEGE, 2013) demonstraram que o disparo dos neurônios pré-inspiratórios do complexo de Bötzinger é afetado de maneira diferente pela estimulação química de regiões distintas da matéria MCPAI. Nesses estudos a estimulação da MCPAI em sua porção medial produziu apneuse, enquanto estimulando a sua porção lateral observou-se o relaxamento do diafragma e por fim a estimulação de sua porção ventral induziu a taquipnéia. Já a estimulação da matéria cinzenta periaquedutal ventrolateral (MCPAvl) levou ao relaxamento do diafragma e apnéia. Outros estudos (SUBRAMANIAN et al. 2008) mostraram que a estimulação química da matéria cinzenta periaquedutal dorso medial (MCPAdm) em gatos induziu a um tipo de resposta sugestivo para dispnéia, enquanto a estimulação da MCPA em sua porção dorso lateral (MCPAdl) resultou em hiperventilação e taquipnéia, que corresponde as mudanças respiratórias de medo e fuga.

Esses resultados sugerem que a respiração é controlada pelo núcleo supramedular durante as reações de defesa e que a progressão dos sintomas do pânico pode ser explicada pela ativação precoce das regiões lateral e ventrolateral da MCPA,

produzindo dispnéia, seguido pela ativação da MCPAdl, gerando hiperventilação e taquipneia. Esses padrões respiratórios estão presentes no início dos AP, em particular, aqueles induzidos pela infusão de lactato, que são caracterizados por dispnéia precoce, seguido de pânico, desejo de fuga e hiperventilação persistente, que continua vários minutos após o final da infusão (KLEIN, 1993b; SCHENBERG et al., 2014).

1.3. ANSIEDADE DE SEPARAÇÃO NA INFÂNCIA

Depois do transtorno de déficit de atenção e hiperatividade e transtorno de conduta, os transtornos ansiosos encontram-se entre as doenças psiquiátricas mais comuns em crianças e adolescentes. Até 10% das crianças e adolescentes sofrem de algum transtorno ansioso (excluindo-se o transtorno obsessivo-compulsivo ou TOC, que afeta até 2% das crianças e adolescentes). Mais de 50% das crianças ansiosas experimentarão um episódio depressivo como parte de sua síndrome ansiosa (ASBAHR, 2004). No Brasil, um estudo populacional encontrou os índices de prevalência de 4,6% em crianças e 5,8% entre adolescentes para algum TA (FLEITLICH-BILYK e GOODMAN, 2004). Na Inglaterra, Ford, Goodman e Meltzer (2003) observaram índices de morbidade similares aos encontrados na pesquisa brasileira, com prevalência de 3,4% em crianças e 5,04% em adolescentes. Outros estudos sugerem ainda que 4,1% das crianças irão exibir um nível clínico de TAS e aproximadamente um terço desses casos (36,1%) irão persistir até o indivíduo se tornar adulto, caso não sejam tratadas (SHEAR et al, 2006).

Os TA podem causar manifestações clínicas capazes de gerar importantes prejuízos no funcionamento normal do indivíduo (LAST, PERRIN, HERSEN & KAZDIN, 1996). A ansiedade, em um nível patológico, leva o paciente ao desenvolvimento de estratégias compensatórias para evitar o contato com aquilo que lhe causa temor. Isso gera um conseqüente e imediato prejuízo funcional, além de possíveis implicações de médio e longo prazo, como a diminuição da auto-estima e o desinteresse pela vida (APA, 1994). Quando o transtorno é presente na infância ou na adolescência, seguindo sem o tratamento adequado, há um aumento na possibilidade do agravamento progressivo da condição mórbida ao longo da vida.

Com a publicação pela Organização Mundial de Saúde (OMS) da Classificação Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde em 1993 (CID-10), a ASI foi inserida no item Transtornos Emocionais com Início Específico na Infância (F-93) como Transtorno Ligado à Angústia de Separação. Lá diz que esse é um transtorno no qual a ansiedade está focalizada sobre o temor relacionado com a separação, ocorrendo pela primeira vez durante os primeiros anos da infância. Diz ainda que a ansiedade apresentada nesse transtorno distingue-se da angústia de separação normal por sua intensidade (gravidade), evidência excessiva (que pode persistir para além da primeira infância) e por sua associação com uma perturbação significativa do funcionamento social. De acordo com a CID-10, a ASI trata-se de um transtorno distinto dos demais, como: Distúrbio de Ansiedade Social da Infância (F93.2), Transtorno Fóbico Ansioso da Infância (F93.1), Transtorno do Humor (afetivos) (F30-F39) e Transtorno Neuróticos (F40-F48).

Na ASI é comum as crianças sintomáticas relatarem dores de estômago e cabeça, bem como náuseas, mais freqüentemente do que as crianças diagnosticadas com transtornos fóbicos (LAST, 1991; KOSSOWSKY et al. 2014). Exemplo disso é que 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 próprio (ALBANO et al., 1996; TONGE, 1994). Além de sintomas somáticos descritos, crianças com ASI apresentam ataques de fúria, se agarrando aos pais, se recusando a serem deixadas sozinhas face a situações de separação e muitas vezes, dificuldades, ou mesmo recusa em dormir quando a figura de apego não está presente, ocasionando, em algumas circunstâncias, pesadelos sobre separação e prejuízo do sono (TONGE, 1994; BLACK, 1995; FRANCIS et al., 1987). Em sua forma mais severa, a ASI pode resultar em recusa e até mesmo abandono escolar. É estimado que aproximadamente 75% das crianças com ASI exibem algum nível de aversão a escola e esse tipo de comportamento pode resultar em prejuízo do aprendizado a curto prazo, e a longo prazo em exclusão por parte dos colegas, alienação (baixos níveis de esforço, desatenção, falta de persistência na realização das tarefas, mudanças constantes de turma ou escola, além de outros problemas disciplinares) e conflitos familiares, que poderão resultar em futuro prejuízo social, isolamento e até mesmo instabilidade conjugal (EHRENREICH, SANTUCCI e WEINER, 2008).

A ASI interfere não somente na criança que apresenta essa psicopatologia, mas também nas figuras de apego e nos demais membros da família. É comum encontrarmos pais que mudam a sua rotina, como dormir na cama com a 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).

Estudos retrospectivos sugerem que a presença da ASI é um fator de risco para o desenvolvimento de diversos transtornos de ansiedade, entre eles o TP e os transtornos do humor, na vida adulta (BIEDERMAN et al., 1993). Nesse sentido, uma possível correlação existente entre a ASI e o sistema de alarme de sufocamento foi fortalecida por estudos feitos com ratos submetidos ao isolamento social neonatal (ISN). Esse modelo experimental de ASI, mostrou que esses animais apresentaram uma facilitação respiratória sexo dependente das respostas respiratórias para hipóxia (machos) e hipercapnia (fêmeas) na vida adulta (GENEST et al., 2004, 2007a,b; DUMONT et al., 2010). Nesse sentido, estudos realizados por Quintino-dos-Santos (2011) mostraram que ratos submetidos ao ISN por 3 horas diárias ao longo de todo período de amamentação (20 dias) apresentam reduções acentuadas dos limiares dos comportamentos de defesa (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).

1.4. MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL E TRANSTORNO DE PÂNICO

A MCPA é uma importante estrutura mesencefálica presente no cérebro dos mamíferos que está organizada em colunas semi-longitudinais funcionalmente e histoquimicamente distintas, que integram informações descendentes das regiões límbico-hipotalâmicas do encéfalo e informações sensoriais ascendentes das aferências da medula espinhal envolvidas na coordenação dos processos motores que resultam nos comportamentos. Aferências diretas provenientes da medula espinhal e do núcleo do trigêmeo indicam um papel da MCPA no processamento de estímulos somato-sensoriais, provavelmente de natureza nociceptiva e está conectada a uma série de regiões prosencefálicas que estão relacionadas ao comportamento emocional, como por exemplo, o córtex, amígdala, núcleo do leito da estria terminal e hipotálamo. Tais conexões sugerem também que a MCPA participe na expressão dos estados emocionais e estudos neurofuncionais apontaram o envolvimento da mesma na analgesia e no comportamento defensivo (CARRIVE, 1993).

Ao contrário de outras estruturas encefálicas, a MCPA parece ter mudado pouco no decorrer da evolução entre o homem e os demais mamíferos, sendo o seu tamanho relativo cerca de 10% do mesencéfalo em secção transversal, tanto em humanos quanto em gatos e ratos (CARRIVE, 1993). As colunas que compreendem a MCPA estão dispostas ao longo do aqueduto, sendo: colunas dorsomedial (DM), dorsolateral (DL), lateral (L) e ventrolateral (VL), e cada uma dessas formam uma coluna longitudinal que varia ao longo do eixo rostrocaudal (Figura 1.2).

Diferentes estímulos sociais induzem a padrões únicos de ativação ao longo das várias colunas da MCPA. Por exemplo, interações agressivas produzem ativação de neurônios da coluna DL em ratos machos dominante e nas colunas DM e VL dos animais subordinados, enquanto a exposição ao predador ativa rostralmente as colunas DM e DL, além das colunas L e VL a nível caudal. Em contraste, a copulação nos roedores machos dominantes ativa apenas as regiões mediais das colunas DM e L na MCPA rostral (KINGSBURY et al., 2011).

Estudos pioneiros de Nashold e colaboradores (1969, 1974) mostraram que, em humanos, a estimulação intracraniana da MCPA produz ansiedade, pânico, terror e sentimentos de morte iminente acompanhados por sinais neurológicos e respostas viscerais que reproduzem os sintomas cardinais dos AP. Nesses estudos 12 indivíduos sem histórico de transtornos psiquiátricos foram cronicamente implantados com 34 eletrodos no mesencéfalo e a localização dos eletrodos por raios-X mostrou que os sítios eficazes encontravam-se na MCPAd. Nashold e colaboradores (1974) descreveram da seguinte maneira os resultados observados durante os procedimentos de estimulação elétrica em seus estudos:

...dentro ou próximo da borda lateral da MCPA resultou em fortes reações na maioria dos pacientes. Sentimentos de medo e de morte foram assim expressados muitas vezes. Ativação autonômica tal qual a piloereção contra-lateral e sudorese, aumento do pulso e frequência respiratória, rubor facial e do pescoço... também foram observados.

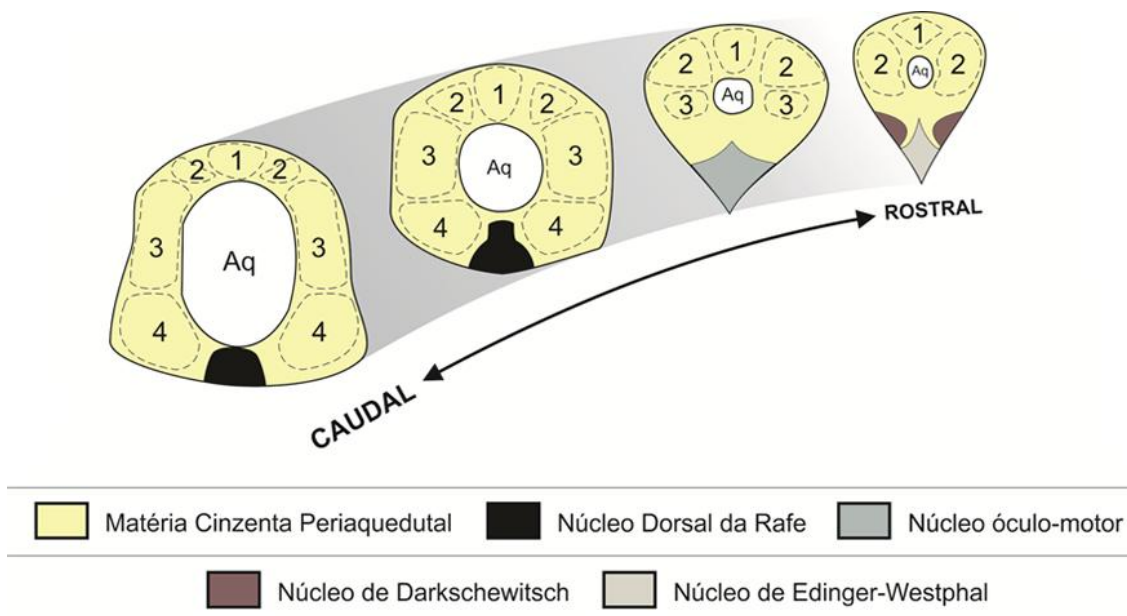


Figura 1.2: Organização colunar rostro-caudal da MCPA. As linhas tracejadas delimitam as colunas: (1) dorsomedial, (2) dorsolateral, (3) lateral e (4) ventrolateral que circundam o aqueduto (Aq) cerebral. As colunas dorsolateral e dorsomedial juntas também são denominadas de matéria cinzenta periaquedutal dorsal ou MCPAd. Adaptado de Carrive (1993).

Além disso, estudos posteriores com tomografia por emissão positrônica de ataques de pânico induzidos por infusão de LAC corroboraram a possível participação da MCPAd nos ataques de pânico (REIMAN et al., 1989). A MCPAd de humanos também é ativada em resposta a ameaças próximas ou iminentes, um estado emocional que tem sido relacionado aos AP (MAREN, 2007; MOBBS et al., 2007). Sendo assim, a estimulação elétrica ou química da MCPAd em animais tem sido proposta como um modelo consistente de AP (GENTIL, 1988; JENCK et al., 1995; DEAKIN e GRAEFF, 1991; SCHENBERG et al., 2001; SCHENBERG, 2010).

Em ratos, enquanto a estimulação da MCPAd com estímulos de baixa magnitude produz a “reação de congelamento” caracterizada por imobilidade tensa e exoftalmia (protrusão do globo ocular e abertura máxima das pálpebras), estímulos mais intensos dão origem a um comportamento vigoroso de fuga caracterizado por galopes e saltos que alcançam 1 m/s e 50 cm de altura, respectivamente (BITTENCOURT et al., 2004; SCHENBERG et al., 2005). Estes comportamentos são acompanhados por padrões distintos de respostas cardiovasculares e respiratórias (SCHENBERG et al., 1993; BITTENCOURT et al., 2004), além do que estudos farmacológicos mostraram que a resposta de galope induzida pela estimulação da MCPAd em ratos foi seletivamente atenuada por panicolíticos administrados em doses e regimes similares aos empregados na clínica (SCHENBERG et al., 2001, 2002; VARGAS e SCHENBERG, 2001) sugerindo que essa resposta seja aquela que melhor representa esta síndrome.

1.5. SEROTONINA E O TRANSTORNO DE PÂNICO

Embora a serotonina tenha sido descoberta há mais de 60 anos, os estudos que envolvem esse neurotransmissor ainda são de enorme relevância médica para o entendimento dos principais sistemas fisiológicos como: sistema cardiovascular, sistema respiratório, sistema gastrointestinal, sistema excretor e em especial o sistema nervoso central (SNC). A 5-HT e os seus receptores são importantes para a regulação de praticamente todas as funções cerebrais e a desregulação desse

sistema tem sido relacionado com a patogênese de diversos transtornos psiquiátricos e neurológicos (BERGER, GRAY e ROTH, 2009).

De fato a serotonina é uma molécula com diversos efeitos no SNC, assim como no periférico, atuando como hormônio, neurotransmissor, mitógeno e está amplamente distribuída por todo reino animal (MURPHY et al. 1998). Os comportamentos e processos neuropsicológicos modulados pela serotonina incluem humor, percepção, recompensa, raiva, agressão, apetite, memória, sexualidade e atenção, entre outros. Embora seja difícil encontrar um comportamento humano que não seja regulado por esse neurotransmissor, os circuitos neurais responsáveis por modular cada um desses processos ainda estão sendo elucidados e a maneira com que a serotonina age sobre esses padrões de comportamentos estaria relacionado com o receptor específico 5-HT, presente em determinada(s) região(ões) do cérebro que estaria(m) envolvida(s) na produção de determinado comportamento, que por ela seria ativada e por conseguinte modulada (BERGER, GRAY e ROTH, 2009).

Assim como a norepinefrina, epinefrina, dopamina e histamina, a serotonina é classificada na categoria de neurotransmissores como sendo uma amina biogênica. É sintetizada a partir do aminoácido triptofano por uma via metabólica curta, que consiste de duas etapas e utiliza apenas duas enzimas: a triptofanohidroxilase (TPH) e a aminoácido aromático descarboxilase (AADC). A reação catalizada pela TPH é a etapa limitante da via em que o triptofano é convertido a 5-hidroxitriptofano (5-HTP) por hidroxilação, e na etapa seguinte acontece a descarboxilação do 5-HTP pela AADC, resultando em 5-hidroxitriptamina ou 5-HT (Figura 1.3). A TPH é encontrada em duas isoformas: a TPH1, encontradas em diversos tecidos e a TPH2, que é uma isoforma neurônio - específica (MOHAMMAD-ZADEH, MOSES e GWALTNEY-BRANT, 2008).

A 5-HT foi isolada e caracterizada em 1948 por Maurice Rapport e o seu descobrimento ocorreu quando se estudava uma substância vasoconstritora do soro sanguíneo, daí o nome serotonina (do latim *serum* e do grego *tonic*) (MOHAMMAD-ZADEH, MOSES e GWALTNEY-BRANT, 2008). Em 1986 a farmacologia da 5-HT foi revista (BRADLEY et al. 1986) com a descoberta da existência de 3 famílias de receptores 5-HT (5-HT₁, 5-HT₂ e 5-HT₃), embora já se suspeitasse da existência de

um número maior desses receptores. Naquela ocasião, em que a função dos subtipos individuais desses receptores ainda permanecia obscura, foi descoberto que o receptor 5-HT₁ era na verdade um auto-receptor e que o receptor 5-HT₂ possui ação despolarizante nos neurônios do SNC. Devido as técnicas de biologia molecular as demais famílias de receptores serotoninérgicos foram descobertos, sendo que atualmente estão classificados em 7 famílias, que correspondem a um número total de 14 subtipos de receptores 5-HT existentes em mamíferos (Figura 1.4), estruturalmente e farmacologicamente distintos (BARNES e SHARP, 1999).

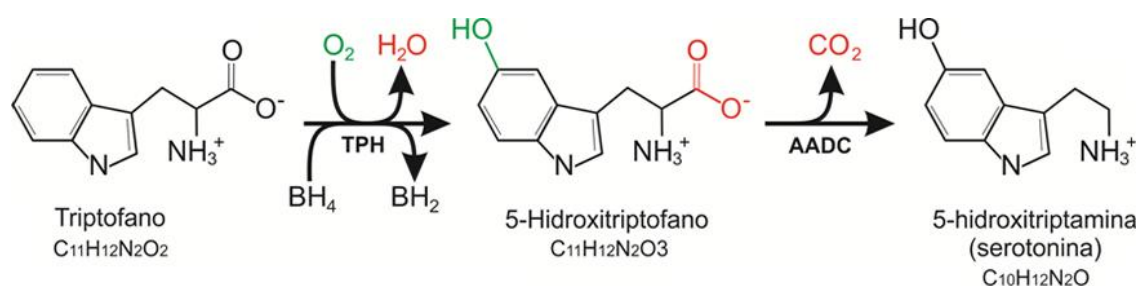


Figura 1.3: Síntese da serotonina. Triptofano hidroxilase (TPH) e aminoácido aromático descarboxilase (AADC). tetrahydrobiopterina (BH₄), dihydrobiopterina (BH₂), molécula de oxigênio (O₂) hidroxila (OH), dióxido de carbono (CO₂). Adaptado de Purves et al., 2004.

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. Estudos de neuroimagem realizados em seres humanos mostraram anormalidades da neurotransmissão serotoninérgica em pacientes com TP na região mesencefálica. O experimento mais pertinente foi conduzido por Maron e colaboradores (2004), que avaliaram a densidade do transportador de membrana de 5-HT (SERT) no cérebro de pacientes com TP por meio de tomografia computadorizada por emissão de fóton (SPECT). Esse transportador está localizado na membrana pré-sináptica, sendo responsável por remover a 5-HT da fenda sináptica e os pacientes com TP apresentaram uma redução significativa da ligação do radioligante ao SERT 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 SERT 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 SERT no mesencéfalo e lobos temporais não foi observado nos pacientes tratados, ele pode estar relacionado aos sintomas clínicos. Por sua vez, a redução de SERT no tálamo pode ser um indicador de ansiedade antecipatória devido ao aumento da sensibilidade interoceptiva (GRAEFF, 2012).

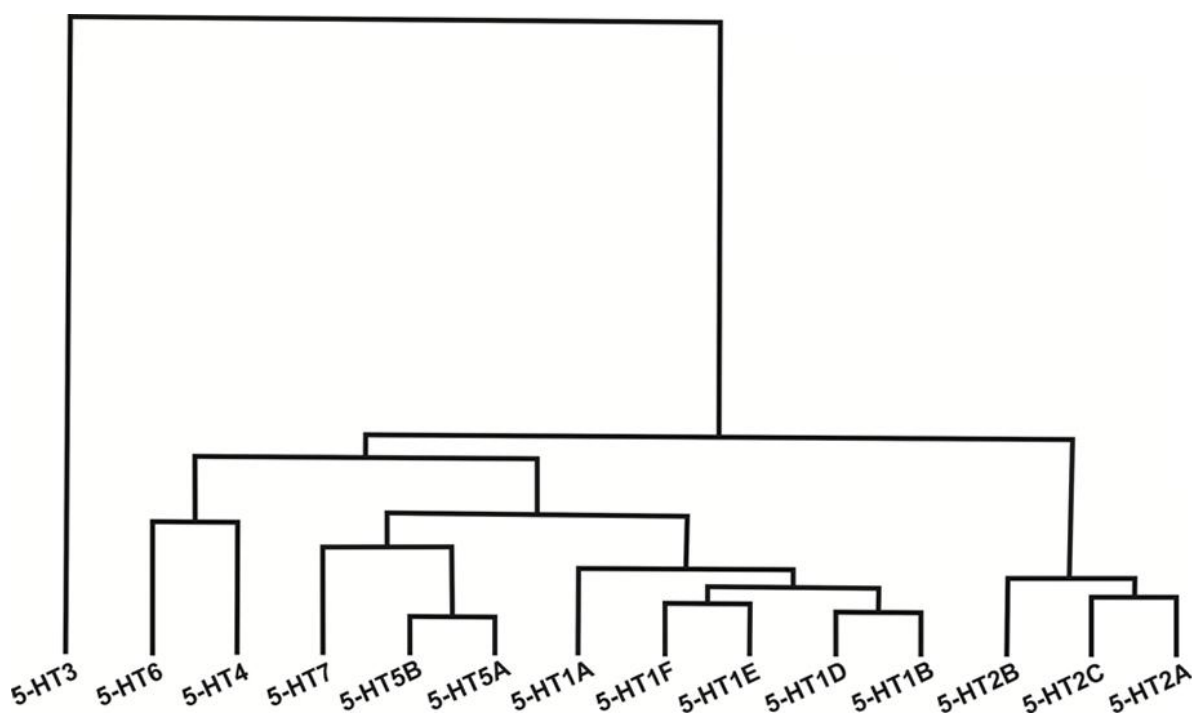


Figura 1.4: Dendrograma que compara todos os 14 receptores 5-HT quanto as diferenças em suas seqüências protéicas. Quanto maior a linha que separa um receptor do outro, maior é a variação na seqüência protéica desses. Adaptado de Barnes e Sharp (1999).

Além disso, há evidências consideráveis que sugerem a 5-HT, também como, elemento desencadeador da ansiedade em estudos conduzidos em animais. Uma das formas de avaliar o papel desse neurotransmissor nos comportamentos aversivos, em ratos, é pelo uso do labirinto-em-T elevado (LTE). O LTE é um equipamento com 2 braços abertos que se comunicam com um braço circundado por paredes. Baseia-se na aversão natural que os ratos têm de espaços abertos e foi desenvolvido para permitir a medida, no mesmo animal, dos comportamentos de

fuga ou esquivas inibitórias dos braços abertos. Estudos farmacológicos sugerem que estas respostas assemelham-se ao pânico e ansiedade generalizada, respectivamente (SOARES e ZANGROSSI, 2004; POBBE et al., 2010; GRAEFF, 2012) e alguns estudos com LTE mostraram que a microinjeção de 5-HT na MCPAd afeta ambas as respostas do LTE (SOARES e ZANGROSSI, 2004), enquanto 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 pela administração tanto 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 da colecistocinina (CCK-4 e CCK-8) 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 (GRAEFF, 2012).

Todos esses estudos, somados a outros, adicionaram novas evidências a hipótese proposta por Deakin e Graeff em 1991 ou hipótese Deakin/Graeff (HDG). Essa originou-se de estudos pioneiros realizados por Schenberg e Graeff (1978), além de Kiser et al., (1975, 1978, 1980), tendo se consolidado com estudos posteriores de Graeff e colaboradores (SCHUTZ et al., 1985; GRAEFF, 2004) e baseado-se também nos estudos etológicos conduzidos pelo casal Blanchard (BLANCHARD et al., 1994).

Nela supõe-se que a 5-HT exerça um papel duplo na modulação dos mecanismos de defesa processados por diferentes estruturas anatômicas e que nos casos de ameaça potencial, projeções serotoninérgicas do NDR à amígdala e ao córtex pré-frontal (CPF) facilitarão os comportamentos de imobilidade e esquiva. 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, 2003; POBBE e ZANGROSSI, 2005; POBBE et al., 2010; GRAEFF e ZANGROSSI, 2010; GRAEFF, 2012). Considerando que as projeções 5-HT oriundas do NDR inervam tanto a amígdala como a MCPAd, foi proposto por Deakin e Graeff (1991) que a 5-HT facilita

a defesa contra ameaças distais ou potenciais na amígdala (ansiedade), enquanto inibe a defesa às ameaças proximais ou iminentes 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). A implicação clínica mais importante da HDG seria 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 proximais (GRAEFF, 2012).

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

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do tratamento com FLX e LAC sobre as respostas de fuga em modelos experimentais de pânico em ratos adultos que foram submetidos ao estresse de separação materna ao longo do período de lactação.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar os efeitos da administração aguda de 4 mg.kg^{-1} de FLX (i.p.) nas respostas de pânico experimental induzidas pela estimulação elétrica da MCPAd em ratos Wistar machos adultos submetidos ao isolamento social fictício (ISF) ou isolamento social neonatal (ISN);
2. Avaliar o efeito do tratamento crônico (21 dias) com $4 \text{ mg.kg}^{-1}\text{dia}^{-1}$ de FLX (i.p.) nas respostas de pânico experimental induzidas pela estimulação elétrica da MCPAd em ratos Wistar machos adultos submetidos ao ISF ou ISN;
3. Avaliar os efeitos do LAC na concentração utilizada na clínica para a indução dos AP ($0,5 \text{ mol/L}$) nas respostas de pânico experimental produzidas pela administração endovenosa de KCN ($80 \text{ }\mu\text{g}/0,1 \text{ ml}$) em ratos virgens ou ratos submetidos ao ISF ou ISN.

ESTUDO-1

3. ESTUDO-1: EFEITO DA FLUOXETINA SOBRE AS RESPOSTAS DO PÂNICO EXPERIMENTAL À ESTIMULAÇÃO DA MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL DE RATOS ADULTOS SUBMETIDOS AO ISOLAMENTO SOCIAL NEONATAL.

3.1. INTRODUÇÃO

A ansiedade de separação da infância (ASI) é um transtorno no qual a separação da criança da figura de apego, geralmente, a mãe, é acompanhada de ansiedade excessiva (APA, 2000). Rachel Kein (1995) descreve a ASI como um conjunto de sintomas e comportamentos que refletem a ativação de um “sistema neurofisiológico de alarme” que protege o jovem de rupturas reais ou potenciais dos laços familiares. Por sua vez, o transtorno do pânico (TP) ocorre principalmente em jovens adultos e caracteriza-se por crises recorrentes de intensa ansiedade e/ou desconforto, acompanhadas de desejo de fuga, dispnéia, sensação de asfixia, dores precordiais, taquicardia, vertigem e receio de ficar louco, de perda do controle ou de morte iminente (APA, 1980). Contudo, estudos clínicos e epidemiológicos sugerem que os AP podem ser do tipo respiratório ou não-respiratório, dependendo da proeminência dos sintomas respiratórios (ROBERSON-NAY et al., 2012). Evidências abundantes sugerem, por outro lado, que a ASI seja um fator predisponente tanto do TP como do eventual desenvolvimento de resistência dos pacientes de pânico aos panicolíticos (KLEIN, 1964; KLEIN, 1995; ROBERSON-NAY et al., 2012; BATTAGLIA et al., 2014).

Embora o substrato neural dos AP permaneça incerto, a metade dorsal da matéria cinzenta periaquedutal (MCPAd) é um forte candidato à mediação destes ataques, uma vez que sua estimulação evoca emoções aversivas intensas em humanos (NASHOLD et al., 1969) e comportamentos defensivos em animais (BITTENCOURT et al., 2004), acompanhados de acentuadas respostas viscerais (SCHENBERG et al., 1993). Conseqüentemente, vários autores propõem que as respostas à estimulação da MCPAd sejam um modelo experimental de AP (GRAEFF, 1987; DEAKIN e

GRAEFF, 1991; GENTIL, 1988; JENCK et al., 1995; SCHENBERG, 2010; SCHENBERG et al., 2001, 2014; CANTERAS e GRAEFF, 2014).

De fato, estudos anteriores de nosso laboratório mostraram que enquanto estas respostas são atenuadas pelo tratamento crônico (21 dias) com doses clinicamente eficazes de fluoxetina (FLX, 1-2 mg.kg⁻¹), elas são insensíveis aos tratamentos agudos ou crônicos com drogas carentes de ação panicolítica (diazepam, midazolam, buspirona, maprotilina) (SCHENBERG et al., 2001; BERNABÉ, 2013). Adicionalmente, Schimitel et al. (2012, 2014) mostraram que as respostas de pânico experimental do tipo respiratório eliciadas pela injeção endovenosa de cianeto de potássio (KCN) são mediadas pela MCPAd, potenciadas pela hipercapnia e atenuadas pelos tratamentos agudos e crônicos com os panicolíticos clonazepam e FLX, respectivamente (SCHIMITEL et al., 2012, 2014). Por fim, um estudo recente de QUINTINO-DOS-SANTOS et al. (2014) mostrou que ratos adultos submetidos ao isolamento social neonatal (ISN), um modelo de ASI, apresentam reduções acentuadas dos limiares das respostas de imobilidade, exoftalmia, trote, galope e salto eliciadas pela estimulação elétrica da MCPAd. No conjunto, estes estudos fornecem amplo apoio à mediação dos AP tanto respiratórios como não-respiratórios pela MCPAd (DEAKIN e GRAEFF, 1991; SCHENBERG et al., 2001, 2010, 2014; CANTERAS e GRAEFF, 2014).

Contudo, resultados não publicados do nosso laboratório mostraram que enquanto os limiares do pânico de ratos submetidos ao isolamento social fictício (ISF) permanecem estáveis, os limiares dos ratos submetidos ao ISN apresentam aumentos progressivos ao longo de 4 sessões semanais de estimulação da MCPAd (BERNABÉ, 2013). Como os ratos submetidos ao ISN apresentaram traços depressivos (anedonia), o aumento dos limiares foi interpretado como um déficit motivacional à exposição repetida ao evento aversivo, tal como é observado em modelos experimentais de depressão (BERNABÉ, 2013). Esta interpretação também se apoiou no estudo recente de Quintino-dos-Santos e colaboradores (2014) que mostrou que os limiares das respostas de pânico à estimulação da MCPAd são marcadamente aumentados em ratos que desenvolveram depressão 7 dias após sua exposição a choques inescapáveis. Bernabé (2013) também mostrou que enquanto a FLX (2 mg.kg⁻¹) causou aumentos significativos dos limiares de todas as

respostas de pânico no grupo ISF, ela não teve efeito algum nos limiares do grupo ISN. Os últimos resultados sugerem que o ISN favorece o desenvolvimento de resistência aos inibidores seletivos da recaptura de serotonina (ISRS).

Para avaliar a extensão do desenvolvimento da resistência à FLX, o Estudo-1 comparou os efeitos do tratamento com 4 mg.kg^{-1} de FLX em ratos submetidos tanto ao ISN quanto ao ISF, aos efeitos observados nos grupos respectivos tratados com salina (SAL) (BERNABÉ, 2013).

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1. Animais

Os ratos submetidos à separação materna provieram do cruzamento de 4 ratos machos e 15 fêmeas nulíparas, ambos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), pesando 250-300 g, fornecidos pelo Biotério do Centro de Ciências da Saúde da UFES. Os ratos foram alojados em grupos com 3 a 4 fêmeas para cada macho, em caixas-viveiro de polietileno (49 cm x 34 cm x 16cm) providas de água e comida *ad libitum* e assoalho coberto com maravalha. As caixas eram mantidas numa sala com controle de temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo claro/escuro de 12 h (luzes acesas às 6:00 h). As caixas eram limpas 2 vezes por semana, levantando-se as fêmeas pelo dorso para verificação da gestação. Cerca de 2 semanas após o início do cruzamento, as gestantes eram removidas das caixas-viveiro e alojadas individualmente em caixas menores de polipropileno (caixas-ninho) (30 cm x 20 cm x 25 cm) com água e comida *ad libitum* e assoalho coberto por maravalha. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFES PROTOCOLO 070/2013, ANEXO 1).

3.2.2. Separação materna

No primeiro dia pós-natal (PN1) era feita a sexagem para a padronização das ninhadas, mantendo-se somente os machos com suas mães até o desmame em PN21. Em PN2 as ninhadas eram classificadas como grupo isolamento social neonatal (ISN) ou isolamento social fictício (ISF). Durante o procedimento de separação, os ratos eram acomodados individualmente em caixas-de-separação (30 cm x 20 cm x 13 cm) enquanto as mães eram transportadas para outra caixa. Os filhotes ISF eram submetidos à mesma manipulação do grupo ISN, mas eram reunidos às mães logo em seguida. A comunicação da mãe com os filhotes separados era atenuada transportando-se as caixas-de-separação para outra sala e alojando-as numa estufa à temperatura ambiente que media 49 cm x 66 cm x 96 cm e tinha uma abertura no teto para ventilação (10 cm de aresta). A separação materna era realizada por 3 h diárias, entre 8:00 e 9:00 h da manhã, de PN2 a PN21. Ao término da separação, as mães e os filhotes retornavam à caixa-ninho. Após o desmame em PN21, os ratos ISN e ISF eram alojados em grupos de 2 a 5 animais em caixas-viveiro com água e comida *ad libitum* e assoalho coberto com maravalha (ANEXOS 2-3).

3.2.3. Tratamento com FLX

A FLX (cloridrato de fluoxetina gotas, Daforin[®], EMS, Hortolândia, Brasil) foi administrada de forma injetável a 40 animais, dos quais 21 foram submetidos ao ISN e 19 ao ISF. Os ratos foram administrados intraperitonealmente com 4 mg.kg⁻¹ de FLX, ao longo de 21 dias, e comparados aos grupos respectivos tratados com salina em estudo anterior (BERNABÉ, 2013).

3.2.4. Eletrodos

Os eletrodos foram confeccionados com um fio de aço inoxidável de 250 µm de diâmetro isolado em toda a extensão exceto na seção transversal de sua extremidade (Califórnia Fine WireCompany, Grover City, CA, EUA). Um fio não

isolado de aço inoxidável servia de eletrodo indiferente. Os eletrodos eram soldados a um soquete de circuito integrado (BCPT 50, Cromatek, Guarulhos, SP, Brasil).

3.2.5. Implantação dos eletrodos

Quando adultos (PN52), os ratos eram anestesiados com cetamina (1.0 mL/kg, I.P) e xilazina (0.5 mL/kg, I.P.) (Vetbrands, Jacareí, SP, Brasil), 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 o crânio desde o bregma até o lâmbda. A tricotomia foi evitada, pois a pelagem reduz lesões devidas, possivelmente, 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 oblíqua do eletrodo, num ângulo de 15°, até a profundidade de 5 mm abaixo da superfície óssea. Estas coordenadas correspondem àquelas da MCPAd (PAXINOS e WATSON, 2007). 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 (30°C) até se recuperarem da anestesia (Figura 3.1).

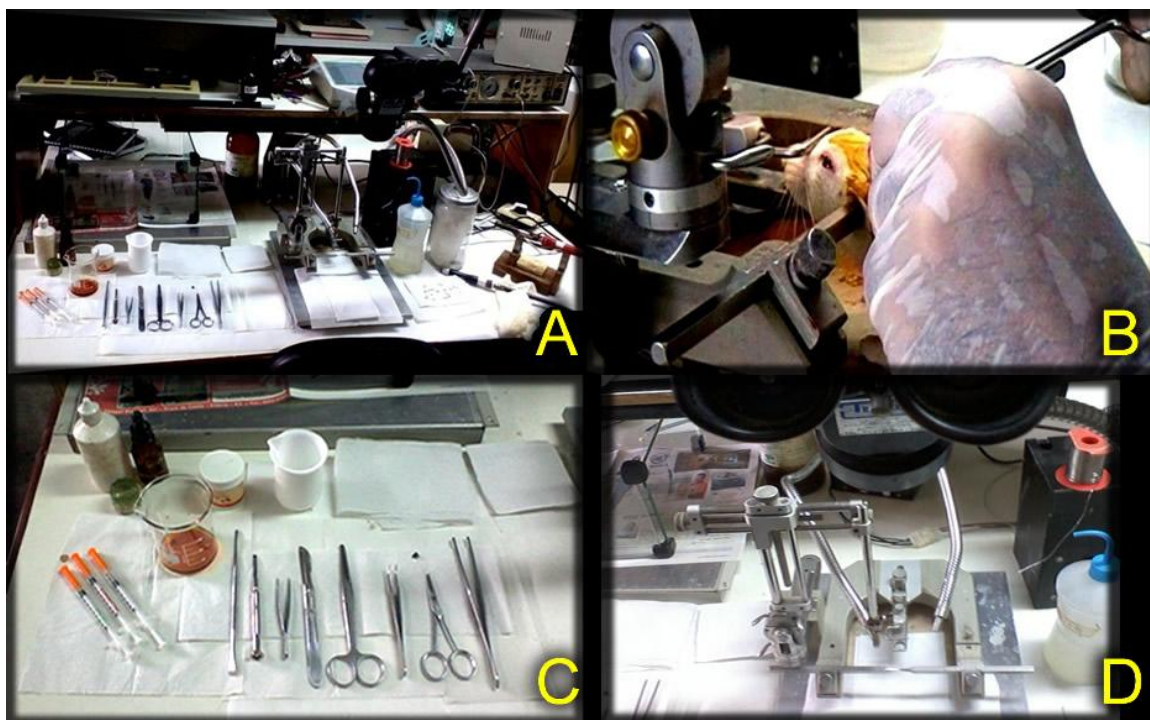


Figura 3.1: Organização (A) e procedimento cirúrgico (B) para a implantação do eletrodo utilizado no Estudo-1. Detalhes da instrumentação cirúrgica (C) e estereotáxico (D).

3.2.6. Protocolo

Os ratos foram estimulados em PN59, PN60, PN67, PN74 e PN81, correspondentes às sessões de triagem, tratamento agudo e tratamentos crônicos de 7, 14 e 21 dias, respectivamente. Os efeitos agudos e crônicos eram avaliados 30 min e 24 h após a administração das drogas, respectivamente (Tabela 3.1). Na estimulação intracraniana os ratos 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 (Flávio Del Vecchio, Ribeirão Preto, SP, Brasil). 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 pólos de uma resistência de 1 k Ω em série com o eletrodo. Os estímulos tinham 30 segundos de duração sendo aumentados em passos de 5 μ A. Os animais foram 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).

Tabela 3.1: Protocolo experimental. Abreviaturas: EIC-I a V: sessões de estimulação intracraniana de triagem e dos tratamentos agudo (dia 2) e crônicos (dias 7, 14 e 21) com FLX4, respectivamente; ISN: isolamento social neonatal; ISF: isolamento social fictício; PN: dia pós-natal.

PN1	PN2-21	PN22-51	PN52	PN59	PN60	PN67	PN74	PN81
Sexagem	ISN/ISF	Crescimento	Cirurgia	EIC-I	EIC-II	EIC-III	EIC-IV	EIC-V

As sessões foram realizadas numa sala com atenuação acústica e temperatura aproximada de 25°C. A 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. As sessões de estimulação após os tratamentos agudo e crônico seguiam o mesmo protocolo, exceto pelo limite máximo da intensidade da corrente de estimulação que era elevado para 100 μ A.

3.2.7. Registros comportamentais

O comportamento dos animais foi registrado por observação direta dos itens comportamentais (ANEXO 4) constantes do etograma do rato (Bittencourt et al., 2004), como se seguem:

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 assoalhoda arena, mediante a projeção simultânea das patas contralaterais anterior e posterior.

Imobilidade tensa - Cessar brusco de todos os movimentos, freqüentemente 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.

Saltos - 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.

De acordo com o presente etograma, a "reação de congelamento" (*freezing behavior*) compreende as respostas de imobilidade tensa acompanhada de exoftalmia. O rato aparenta um estado de hipervigilância. A "reação de fuga" (*flight*

behavior) compreende as respostas de trote, galope e/ou salto, que são 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 (SCHENBERG et al., 2001; VARGAS et al., 2000; BITTENCOURT et al., 2004).

3.2.8. Sacrifício

Os animais que perderam as próteses ou desenvolveram infecção, sangramento ou qualquer sinal de doença eram sacrificados com sobredose anestésica (4 x a dose anestésica) de hidrato de cloral (400 mg/kg, I.P.). Os demais foram sacrificados ao final dos experimentos durante o processo de perfusão com salina e formaldeído para preparo dos cérebros para histologia.

3.2.9. Histologia

Ao término do experimento os ratos eram anestesiados com hidrato de cloral (400 mg/kg, I.P.), fixados a uma plataforma de perfusão e submetidos a uma toracotomia. Após a exposição do coração e da ligadura da aorta descendente, introduzia-se uma agulha no ventrículo esquerdo. Em seguida, o átrio direito era seccionado e realizava-se a perfusão com 200 ml de solução salina (NaCl 0,9 %) e 250 ml de solução de formaldeído (10 %) com o auxílio de uma bomba peristáltica (Masterflex CE 77120-70, Barrington, EUA). As cabeças eram mantidas por cerca de 10 dias em solução de formaldeído (10 %) para “moldar” o trato do eletrodo e, em seguida, os cérebros eram retirados das caixas cranianas e mantidos por 2 dias adicionais em formaldeído. Por fim, os cérebros eram preparados em blocos do mesencéfalo e seccionados num micrótomo de congelamento (Leica CM 1850) em cortes de 40 µm de espessura. Os cortes eram 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

por microscopia, fotografados e registrados em diagramas coronais do cérebro do rato do atlas de PAXINOS e WATSON (2007).

3.2.10. Estatística

As freqüências acumuladas das respostas limiaries foram submetidas à análise logística e comparadas por testes do χ^2 da razão de verossimilhanças (SCHENBERG et al., 1990, 2005; VARGAS et al., 2000; BITTENCOURT et al., 2004). A comparação pareada das intensidades limiaries medianas ($I_{50\pm EP}$) dos grupos FLX4 ou SAL, ISN ou ISF, foi realizada para um modelo de curvas paralelas ao nível descritivo de 5%. As comparações múltiplas em relação à sessão-triagem utilizaram o nível descritivo de 5% de Bonferroni.

Os valores percentuais ($I_{50\% \pm EP}$) em relação à sessão de triagem foram calculados como $(I_{50\text{-sessão}}/I_{50\text{-triagem}}) \times 100$ e o erro padrão percentual como $(EP_{I_{50}}/I_{50}) \times 100$ (que corresponde ao coeficiente de variação). A análise logística dos limiaries foi realizada por meio do programa Statistical Analysis Systems (SAS®, Cary, North Carolina).

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Sítios estimulados

A histologia foi realizada em 36 ratos tratados com FLX4. Os resultados mostraram que a maioria dos sítios estimulados localizou-se na MCPAdI. Também foram identificados números expressivos de eletrodos na MCPAl e camadas profundas do colículo superior (Tabela 3.2, Figura 3.2).

Tabela 3.2: Sítios de estimulação dos grupos de ratos separados (ISN) e não separados (ISF), tratados com FLX4 e os seus valores percentuais. CPCS: camadas profundas do colículo superior; MCPAdI e MCPAl: colunas dorsolateral e lateral da MCPA, respectivamente; N: número de animais por grupo submetidos a histologia.

Grupo	N	MCPAdI	MCPAl	CPCS
ISF	19	9 (47%)	5 (26,5%)	5 (26,5%)
ISN	17	8 (47%)	5 (29,5%)	4 (23,5%)

3.3.2. Comparação dos efeitos da FLX4 ou SAL sobre os limiares do pânico experimental à estimulação elétrica da MCPA de ratos submetidos tanto ao ISN quanto ao ISF

Não foram observados efeitos significantes entre os tratamentos agudos de SAL e FLX4 nos grupos ISN e ISF (resultados não apresentados). Em contraste, ratos tratados cronicamente com FLX4 apresentaram limiares mais elevados que aqueles tratados com SAL (Fig.3.3). Contudo, os limiares basais (sessões-triagem) dos ratos tratados com FLX4 também foram maiores que aqueles dos grupos tratados com SAL. Portanto, as diferenças entre grupos podem ter sido devidas aos valores diferentes de limiares, possivelmente, resultantes da distribuição desigual dos sítios estimulados nos grupos FLX4 e SAL. Por outro lado, os grupos ISF e ISN tratados com FLX4 apresentaram limiares virtualmente idênticos tanto nas sessões de triagem quanto ao término do tratamento (Fig.3.3). Os últimos resultados indicam que a FLX4 não discriminou entre os grupos ISN e ISF.

A influência dos limiares basais torna-se evidente no exame dos efeitos percentuais das várias sessões de estimulação em relação à sessão-triagem (Fig.3.4). Por exemplo, nos grupos tratados com SAL, enquanto os limiares do grupo ISF permaneceram praticamente inalterados, os limiares do grupo ISN foram marcadamente aumentados ao longo das 4 sessões de estimulação. Assim, enquanto o único efeito significante no grupo ISF-SAL foi o aumento de 22%

($\chi^2= 13,5$; 1 g.l.; $P<0,0005$) no limiar de galope da última sessão de estimulação, o grupo ISN-SAL apresentou aumentos entre 40% e 50% nos limiares desta sessão para exoftalmia ($\Delta= 40,1\%$; $\chi^2= 28,9$; 1 g.l.; $P<0,0001$), imobilidade ($\Delta= 43,5\%$; $\chi^2= 36,0$; 1 g.l.; $P<0,0001$), galope ($\Delta= 49,8\%$; $\chi^2= 52,7$; 1 g.l.; $P<0,0001$), trote ($\Delta= 53,8\%$; $\chi^2= 55,8$; 1 g.l.; $P<0,0001$) e salto ($\Delta= 48,8\%$; $\chi^2= 29,3$; 1 g.l.; $P<0,0001$). Comparados à sessão de triagem, os aumentos no grupo ISN-SAL também foram maiores que aqueles observados no grupo ISN-FLX4, os quais situaram-se entre 23% e 37% para exoftalmia ($\Delta= 27,2\%$; $\chi^2= 16,7$; 1 g.l.; $P<0,0001$), imobilidade ($\Delta= 28,8\%$; $\chi^2= 60,1$; 1 g.l.; $P<0,0001$), galope ($\Delta= 22,6\%$; $\chi^2= 16,6$; 1 g.l.; $P<0,0001$), trote ($\Delta= 29,4\%$; $\chi^2= 16,1$; 1 g.l.; $P<0,0001$) e salto ($\Delta= 37\%$; $\chi^2= 13,4$; 1 g.l.; $P<0,00$) (Fig.3.4). Os últimos resultados sugerem que a dose de 4 mg.kg^{-1} de FLX possa ter tido um efeito até mesmo facilitador do pânico experimental nos ratos submetidos ao ISN.

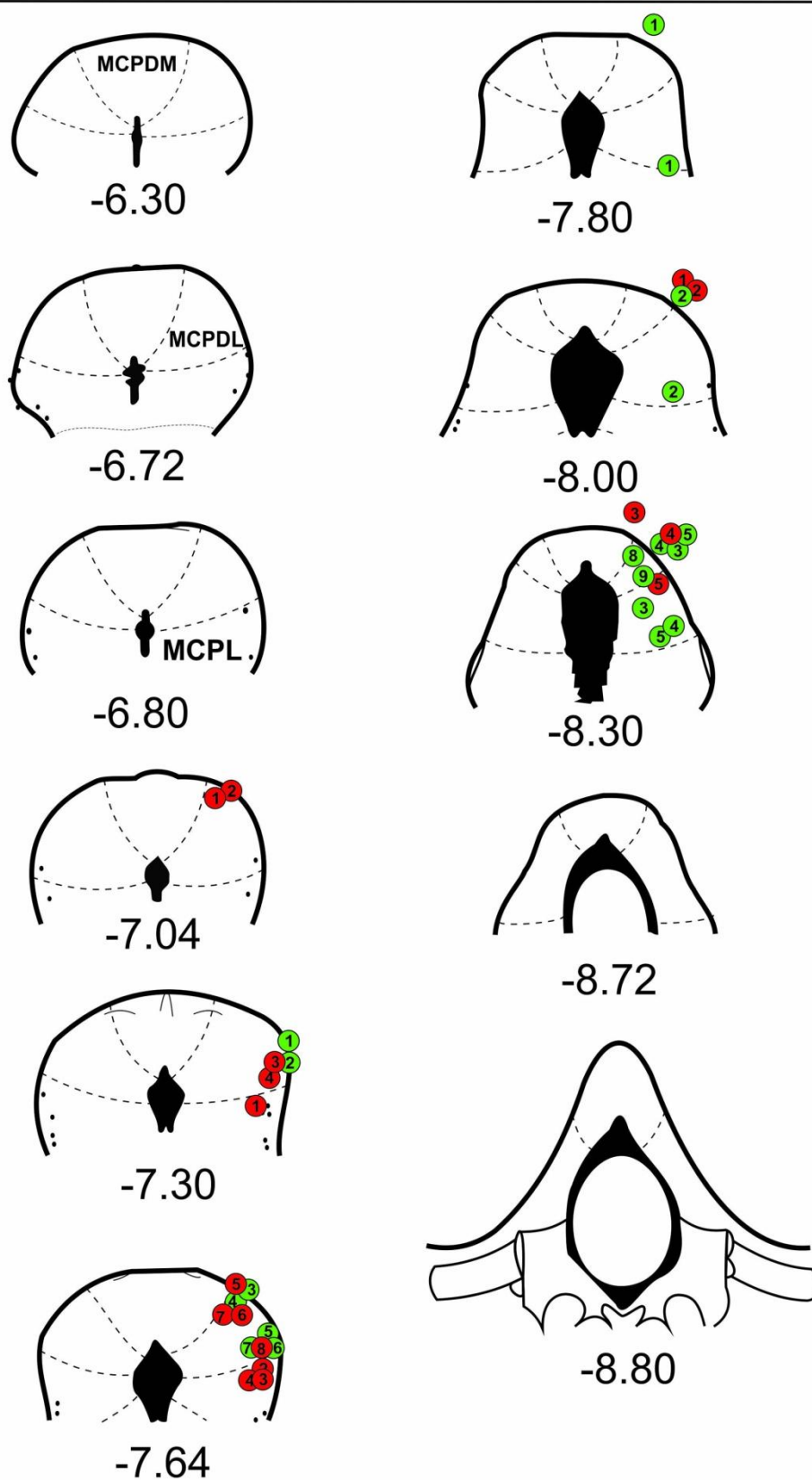


Figura 3.2: Localização dos eletrodos dos grupos ISF (●) e ISN (●) dos ratos tratados com 4 mg.kg^{-1} de FLX. Os números representam as coordenadas ântero-posteriores em relação ao bregma de cortes coronais do atlas do cérebro do rato de Paxinos e Watson (2006). Abreviaturas: MCPDM/DL/L, colunas dorsomedial, dorsolateral e lateral da MCPA.

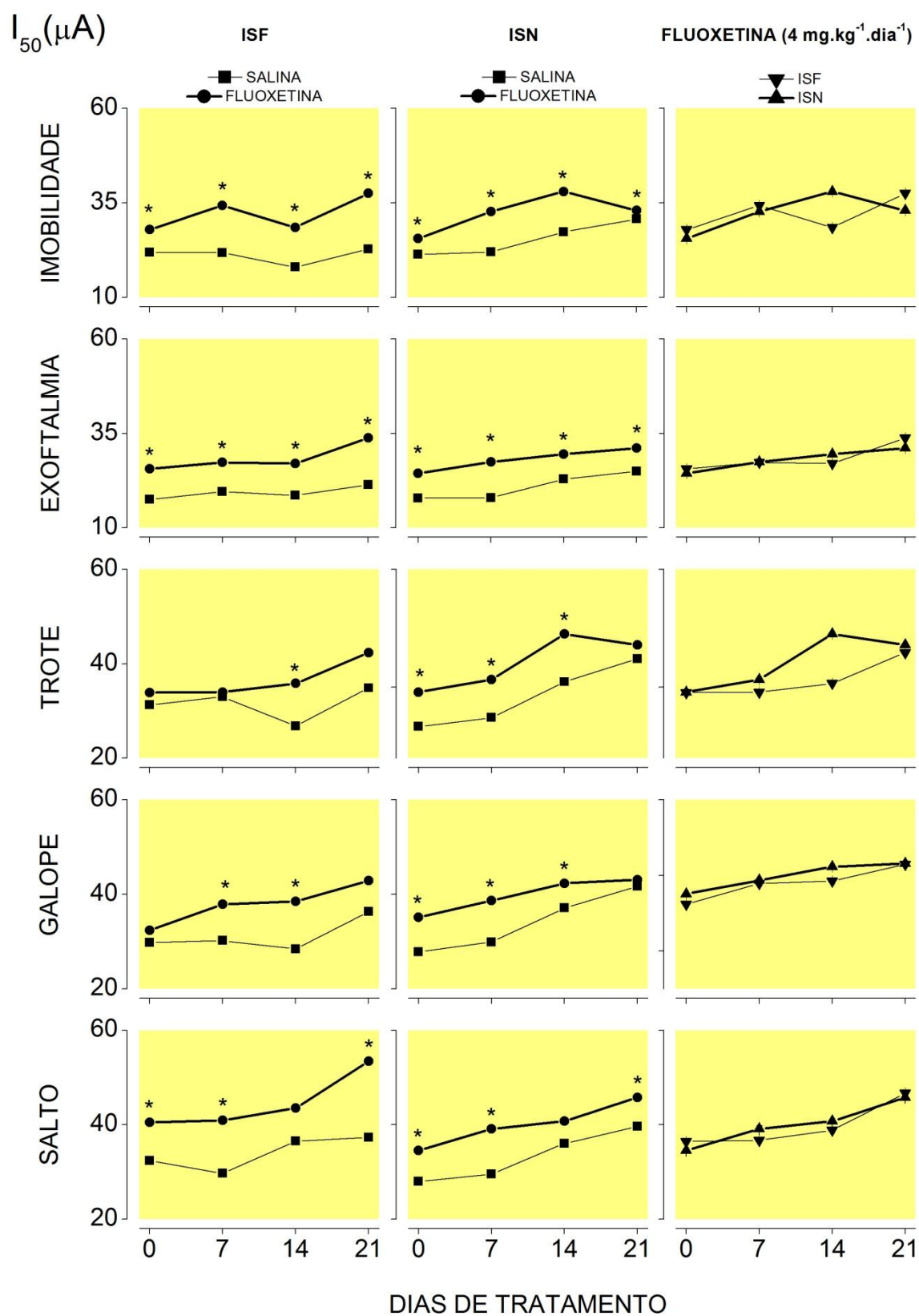


Figura 3.3: Efeitos da administração crônica de fluoxetina (4 mg/kg, i.p.) ou salina sobre as intensidades limiarias medianas ($I_{50} \pm EP$) das respostas de pânico experimental à estimulação elétrica da MCPad nos grupos ISN e ISF. * $P < 0,05$, diferente do outro grupo.

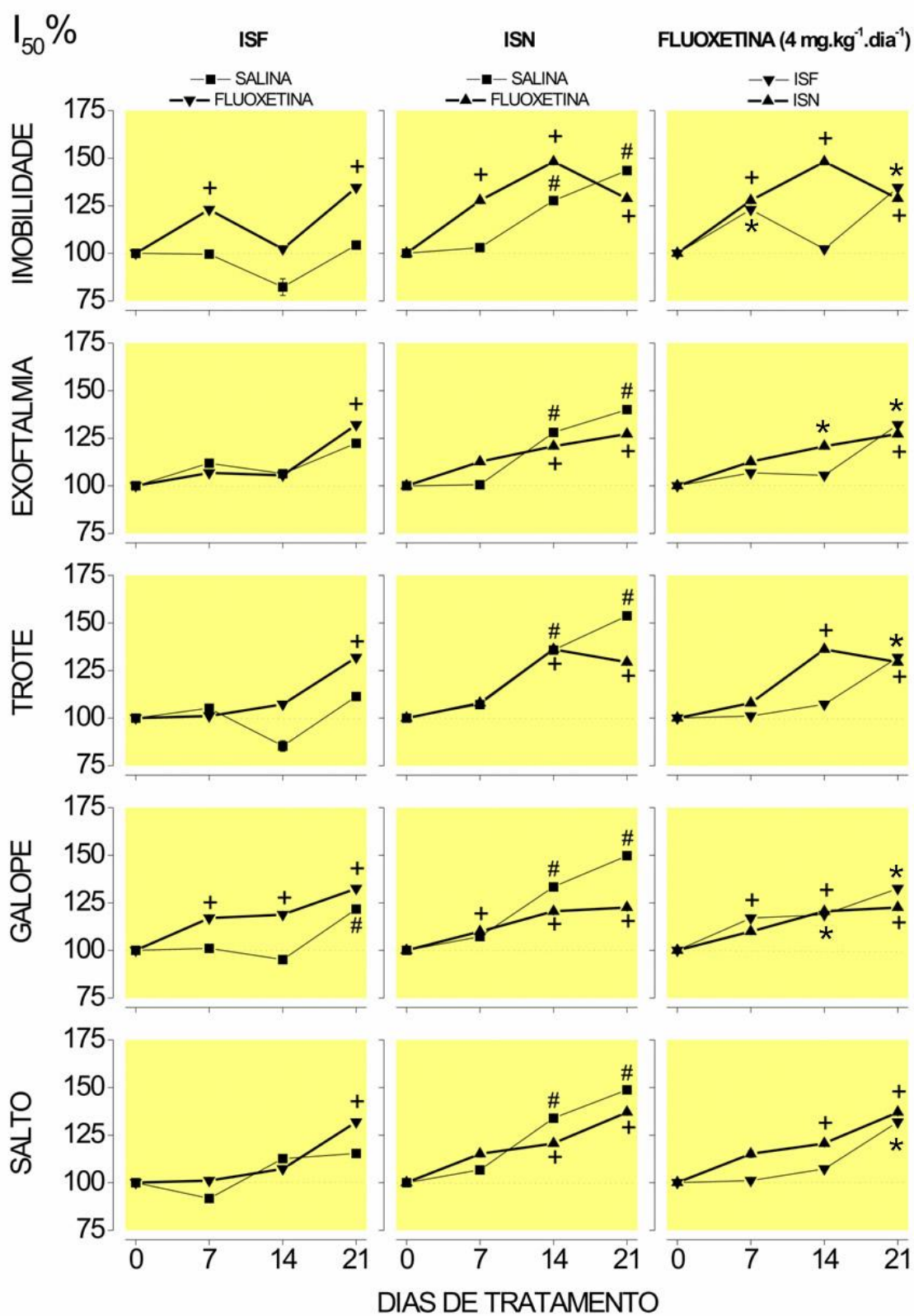


Figura 3.4: Valores percentuais das intensidades limiares medianas ($I_{50}\pm CV$) das respostas de pânico à estimulação elétrica da MCPAD dos grupos ISF e ISN administrados com fluoxetina (4 mg.kg⁻¹, i.p.) ou salina ou fluoxetina ISF: #, + e * P<0,05, diferenças significantes em relação à sessão de triagem (Dia 0) do respectivo grupo.

3.4. DISCUSSÃO

Os grupos tratados com SAL mostram que enquanto os limiares do pânico experimental mantêm-se praticamente inalterados no grupo ISF, eles são progressivamente aumentados no grupo ISN. Por outro lado, embora os ratos tratados com FLX4 tenham apresentado limiares mais elevados que os tratados com SAL em ambos os grupos, a comparação das variações percentuais em relação aos limiares basais mostrou que a FLX4 teve efeitos diferenciados nos grupos ISF e ISN, aumentando ou reduzindo os limiares, respectivamente. Em realidade, as variações percentuais indicaram que a FLX4 produziu efeitos até mesmo facilitadores do pânico experimental. Estes resultados complementam observações anteriores da ausência de efeito de doses menores de FLX (1 e 2 mg.kg⁻¹) em ratos submetidos ao ISN (BERNABÉ, 2013). Contudo, estes resultados também estão de acordo com a ausência de efeitos de tratamento similar de ratos virgens com 5 mg.kg⁻¹ de FLX (VARGAS e SCHENBERG, 2001). Embora a ausência de efeitos da dose de 4 mg.kg⁻¹ de FLX possa ser devida ao limite superior da “janela terapêutica”, os resultados do presente estudo estendem e corroboram a ausência de efeitos das doses de 1 e 2 mg.kg⁻¹ (BERNABÉ, 2013), sugerindo, portanto, o desenvolvimento de resistência aos pânicolíticos nos ratos submetidos ao ISN.

Em ensaios clínicos, a FLX tem eficácia de 40 a 70%, com remissão em apenas 20 a 47% dos pacientes. Não obstante, 33% dos pacientes com TA desenvolvem resistência ao tratamento farmacológico (i.e., ausência de resposta ou resposta insuficiente) (POLLACK et al., 2008).

A FLX é o fármaco de primeira escolha na terapia do TP e é tido como um medicamento de uso crônico ou seja, cujos efeitos sobre a sintomatologia do paciente são notados apenas algumas semanas após o início do tratamento. A dose inicial mínima para o TP é de 10 mg/dia, sendo que diversos estudos em humanos demonstram que 20 mg/dia, como dose inicial, está associada com uma resposta superior aquela anteriormente descrita, em comparação ao grupo placebo. Os efeitos sobre os sintomas do TP surgem por volta da 6^o semana, com redução da frequência e intensidade dos AP observados entre a 3^o e 4^o semanas iniciais ao tratamento, melhora da ansiedade antecipatória e, se presente, ansiedade fóbica

dentro de 6 a 8 semanas (PULL e DAMSA, 2008; HOLT e LYDIARD, 2007). Pacientes que não respondem satisfatoriamente a esses tratamentos (10 ou 20 mg/dia de fluoxetina) são selecionados para o escalonamento da dose até 60 mg/dia. Aproximadamente, 30% dos pacientes do TP não respondem ao tratamento com até mais de um ISRS e esses são considerados resistentes a terapia com ISRS (PULL e DAMSA, 2008).

Um dos fatores que contribui para a resistência a terapia farmacológica no TP é a sua alta comorbidade com outros transtornos. A comorbidade com a depressão maior (DM), de fato, é um complicador no tratamento dos sintomas do TP. Achados recentes de um estudo de seguimento (*follow up*) conduzido por 12 anos e realizado junto à *Harvard/Brown Anxiety Research Program (HARP)* ressalta o impacto da comorbidade depressiva sobre o curso e tratamento do TP. Esse estudo mostrou que pacientes com a ocorrência simultânea de TP e DM possuem a chance de recuperação reduzida à metade, além de alta recorrência para todos os outros transtornos de ansiedade. Enquanto 80% dos pacientes com TP simples tiveram melhora frente ao tratamento, menos da metade daqueles com TP e agorafobia mostraram resposta (HOLT e LYDIARD, 2007). Além disso, em jovens diagnosticados com depressão, os transtornos de ansiedade são a mais comum comorbidade dos transtornos da saúde mental, tendo uma estimativa que oscila entre 15% a 75%, enquanto o contrário ou seja, jovens que são diagnosticados com algum TA, essa estimativa varia entre 10% a 15%, mostrando que esses dois transtornos mentais estão significativamente ligados. Alguns autores sugerem que o TAS pode ser um precursor dos TP (PERUGI et al., 1988; SAVINO et al., 1993) e que esses compartilhariam uma diátese genética comum (ROBERSON-NAY et al., 2012). Por sua vez o TP está associado com a depressão em jovens e adultos, e assim crianças com TAS podem possuir predisposição a depressão (CUMMINGS, CAPORINO e KENDALL, 2014).

Estudos mostram que as características depressivas de ratos foram ressaltadas pelo déficit motivacional à estimulação repetida da MCPAd e o perfil depressivo, assim como a facilitação do pânico dos ratos submetidos ao protocolo de privação, são similares aquelas observadas em pacientes adultos que apresentaram ansiedade severa de separação na infância (KLEIN, 1995). Esses resultados estão de acordo

com observações anteriores de nosso laboratório; que mostram que os comportamentos de defesa induzidos por estimulação elétrica da MCPAd são sensíveis ao tratamento crônico com doses baixas, na ordem de $1 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ (Vargas e Schenberg, 2001) e $2 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ (BERNABÉ, 2013), de FLX em ratos ISF, enquanto aqueles que foram submetidos ao ISN não respondem a este agente.

No presente estudo avaliamos o efeito da fluoxetina na dose de $4 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ afim de complementar os resultados obtidos por Bernabé (2013) em ratos submetidos ao ISN. Os efeitos da FLX4 no grupo ISF corroboraram o modelo de AP por estimulação da MCPAd. Contudo, nos grupos submetidos ao ISN, o tratamento com FLX4 não foi capaz de promover o aumento dos limiares em relação ao grupo tratado com salina. Os últimos resultados sugerem que o ISN por 3 h diárias ao longo do período de lactação aumenta a resistência ao tratamento com FLX na vida adulta.

3.5. CONCLUSÕES

1. A resistência dos ratos separados ao tratamento crônico com a dose de $4 \text{ mg}^{-1}.\text{kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ de fluoxetina corroborou e estendeu o estudo anterior de Bernabé (2013) com as doses de 1 e $2 \text{ mg}^{-1}.\text{kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$;
2. Os resultados obtidos, somados aos anteriores do nosso laboratório (BERNABÉ, 2013) sugerem que a separação materna seja um fator importante na resistência aos efeitos à fluoxetina.

ESTUDO-2

4. ESTUDO-2: EFEITOS DO ISOLAMENTO SOCIAL NEONATAL E DO LACTATO DE SÓDIO NO PÂNICO EXPERIMENTAL À ADMINISTRAÇÃO ENDOVENOSA DE CIANETO DE POTÁSSIO.

4.1. INTRODUÇÃO

O lactato de sódio (LAC) foi primeiramente identificado no soro do leite por Karl Scheele em 1780. Cerca de 70 anos depois Joseph Scherer mostrou que o LAC também estava presente no sangue humano (BAKKER et al., 2013). O LAC é uma molécula essencial aos dois principais processos de geração de energia, glicólise e fosforilação oxidativa. A glicólise é um processo anaeróbico de produção de energia que surgiu muito cedo na evolução (cerca de 3 bilhões de anos atrás) e que converte 1 molécula de glicose em 2 moléculas de piruvato, gerando 2 moléculas de ATP. Quando os níveis de O₂ aumentaram na atmosfera há, aproximadamente, 1 bilhão de anos, surgiu um processo muito mais eficiente de geração de energia - a fosforilação oxidativa - que ocorre nas mitocôndrias e gera 28 moléculas de ATP a partir de 1 molécula de ácido pirúvico. Contudo, na ausência de O₂ o ácido pirúvico é convertido em LAC (STRYER, 1999). Araki e Zillesen foram os primeiros a observar a relação existente entre o aumento dos níveis de LAC e a hipóxia tecidual. Embora o LAC seja freqüentemente empregado como um índice de hipóxia tecidual, certas doenças agudas do metabolismo da glicose também podem causar aumentos nos níveis de LAC independentes da hipóxia tecidual (BAKKER et al., 2013).

A descoberta que infusões endovenosas de LAC (0,5 mol/L) provocam ataques de pânico (AP) em pacientes predispostos, mas não em indivíduos saudáveis (PITTS e McCLURE, 1967; LIEBOWITZ et al., 1984) constitui-se, portanto, num dos argumentos centrais da teoria de KLEIN (1993) de que os APs sejam 'alarmes falsos de sufocamento'. Adicionalmente, enquanto a hipersensibilidade ao LAC tem sido proposta com um marcador do TP, sua infusão tem sido utilizada como um modelo

para o estudo das causas etiológicas dos AP (LIEBOWITZ et al., 1985; LAPIERRE et al., 1984).

Contudo, numa revisão sobre os efeitos panicogênicos do LAC, Margraf e colaboradores (1986) questionam sua utilização como marcador biológico do pânico. Em outro estudo (MARGRAF et al., 1986b), no qual o LAC foi infundido em 10 pacientes com TP e 10 indivíduos sadios, os autores observaram níveis basais de ansiedade e frequência cardíaca aumentados nos pacientes, mas nenhuma diferença nos controles, durante a infusão do LAC. De fato, só foram encontradas diferenças significativas para a pressão arterial. Estes autores propuseram que ao invés de reatividade anormal ao LAC, as diferenças entre pacientes e controles estão relacionadas às diferenças nos níveis basais de ansiedade destes grupos. Estes autores propuseram uma teoria cognitiva (cortical) do transtorno do pânico segundo a qual os pacientes de pânico “catatrofizam” sintomas corporais indistintamente.

Contrariamente, Klein (1993) propôs uma teoria baseada na hipersensibilidade dos pacientes de pânico ao LAC e CO₂, na qual sugere que os AP sejam devidos um “alarme falso de sufocamento”. Klein (1993) postulou a existência de um “sistema de alarme” que traduziria as informações viscerais dos quimiorreceptores (centrais ou periféricos) sobre perigo de sufocamento em respostas comportamentais adequadas à situação. O disparo do sistema de alarme de sufocamento produziria um repentino desconforto respiratório (dispnéia) seguido por breve hiperventilação, pânico e desejo de fuga. A hipersensibilidade dos pacientes de pânico ao LAC e CO₂ seria o resultado de uma anormalidade desse sistema.

Contudo, os pacientes de pânico podem apresentar disfunção em qualquer nível do circuito respiratório, incluindo os quimiorreceptores centrais e periféricos, ou num sensor externo aos mecanismos da eupneia que permanece inativo em condições de ar ambiente. Embora o papel das informações periféricas nos comportamentos defensivos permaneça incerto, observações casuais de Franchini e Krieger (1993) mostraram que a estimulação seletiva dos quimiorreceptores carotídeos com doses subletais de KCN (30 µg/kg) produz comportamentos de alerta e defesa. O envolvimento dos quimiorreceptores arteriais nas respostas comportamentais ao

KCN foi demonstrado pela ausência destas respostas em ratos com desnervação sino-aórtica (FRANCHINI e KRIEGER, 1993).

Por outro lado, estudos recentes de nosso laboratório (SCHIMITEL et al., 2012) mostraram que enquanto a administração endovenosa de KCN produz todas as respostas de defesa do rato, a exposição ao CO₂ produz somente um estado de imobilidade. No mesmo sentido, enquanto o CO₂ aumentou os limiares das respostas de exoftalmia, imobilidade, trote e galope à estimulação da MCPAd, o KCN reduziu os limiares destas respostas e, principalmente, da imobilidade, trote e galope. Por fim, enquanto a lesão eletrolítica da MCPAd causou forte atenuação ou até mesmo a abolição das respostas ao KCN, a pré-exposição ao CO₂ teve efeitos facilitadores. Estudos ainda mais recentes mostraram que as respostas ao KCN foram virtualmente abolidas por tratamentos clinicamente eficazes, agudo e crônico, com os panicóticos clonazepam e fluoxetina (SCHIMITEL et al., 2014).

A presença da consciência humana levanta enormes dificuldades na interpretação dos AP induzidos por LAC ou CO₂. Por outro lado, esta dificuldade constitui-se, num forte ensejo para o desenvolvimento de um modelo animal de AP sensível ao LAC. Como as respostas de defesa à administração de cianeto de potássio (KCN) têm sido propostas como um modelo de pânico respiratório (SCHIMITEL et al., 2012, 2014), o Estudo-2 avaliou os efeitos da infusão de soluções isosmolares (0,5 mol/l) de LAC e NaCl sobre o pânico respiratório experimental à administração endovenosa de KCN (80 µg/0,1ml).

4.2. MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1. Animais

Foram utilizados 84 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos, pesando entre 200-250g. Os animais foram mantidos todos nas mesmas condições do estudo anterior

(Estudo-1) quanto à climatização da sala e ciclo claro/escuro. Os ratos foram alojados em grupos de quatro animais em gaiolas de polietileno (caixa-viveiro) com dimensões de 49 cm x 34 cm x 16cm, água e comida *ad libitum* e assoalho coberto com maravalha (ANEXO 3 E ANEXO 4). Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFES PROTOCOLO 070/2013, ANEXO 1).

Dos animais utilizados, 36 formaram os grupos virgens (VG) e o grupo pré-tratado com naloxona (NLX), e 48 foram submetidos ao ISN ou ISF (n=24) (ANEXO 5 e ANEXO 6), tal como foi descrito no Estudo-1. Enquanto os primeiros foram tratados com salina (SAL, n=12), LAC (n= 12) ou LAC precedido por naloxona (NLX, n=12).

4.2.2. Canulação da veia jugular

Os animais eram anestesiados com cetamina (1.0 mL/kg, I.P) e xilazina (0.5 mL/kg, I.P.) (Vetbrands, Jacareí, SP, Brasil) e colocados em posição supina numa mesa cirúrgica com os membros fixados. Em seguida, realizava-se uma tricotomia ao nível do pescoço, do lado direito do animal. Uma incisão de aproximadamente 1,5 cm permitia a localização e acesso à veia jugular externa. Após a dissecação e isolamento do vaso, realizava-se um pequeno orifício na veia para introdução de um cateter de silastic preenchido com solução de salina e heparina (5.000 UI/0,25 mL, Cristália, SãoPaulo, SP). O cateter era, então, conduzido até o átrio direito e fixado com linha de algodão. Por fim, a extremidade livre do cateter era conduzida por meio de um trocáter sob a pele da região dorsal e exposta ao nível da nuca. Após a sutura das incisões, os animais eram mantidos numa placa aquecida à 30°C até a recuperação da anestesia (Figura 4.1: C e D).

4.2.3. Protocolo

No dia seguinte a implantação da cânula na veia jugular, os animais eram conectados a uma bomba de infusão (Insight, Ribeirão Preto, ISN, Brasil) e colocados numa arena de estimulação química (acrílico transparente de 60 cm x 60 cm) específica para esse fim. Após 5 minutos de habituação, os ratos eram administrados com SAL 0,9% (grupo controle) ou com $80 \mu\text{g} \cdot 0,1 \text{ ml}^{-1}$ de KCN (grupo teste) (efeitos pré-infusão). Na etapa seguinte, eles eram infundidos ($10 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot 20 \text{ min}^{-1}$) com soluções isomolares (0,5 mol/l) de LAC ou SAL (2,5%) (KELLNER et al.1998) e re-administrados com KCN e SAL (efeitos pós-infusão). As respostas à administração do KCN foram filmadas com uma câmera SAMSUNG® (FlashCAM AD69) para análise posterior da duração das respostas de fuga do animal (Figura 4.1). Também foi feito um grupo com administração de 0,5 ml de NLX (0,4mg/ml) para avaliar a possível participação do sistema opióide nos AP induzidos pelo KCN na presença ou ausência de LAC (Tabela 4.1 e Tabela 4.2).

4.2.4. Sacrifício

Animais que tiveram perda da cânula ou apresentaram qualquer sinal de doença decorrente do procedimento operatório foram sacrificados seguindo os mesmos procedimentos descritos no Estudo-1.

Tabela 4.1: Cronograma experimental para os grupos P e NP tratados com KCN. EKCN: estimulação química com KCN; ISN: isolamento social neonatal; PN: dia pós-natal.

PN1	PN2-21	PN22-51	PN52	PN54-55
Sexagem	ISN	Crescimento	Cirurgia	EKCN

Tabela 4.2: Cronograma experimental para os grupos VG tratados com KCN. EKCN: estimulação química com KCN; D: dia de procedimento a partir da chegada desses ratos no laboratório (D-0).

D0	D2	D4-6
Pesagem (200-250g)	Cirurgia	EKCN

4.2.5. Estatística

As respostas de fuga pela administração de KCN no pré- e pós-infusão ao tratamento e a comparação entre os grupos teste e controle foram avaliadas por ANOVA para medidas repetidas seguida por teste-t pareado. As diferenças foram consideradas significantes para $P < 0,05$.

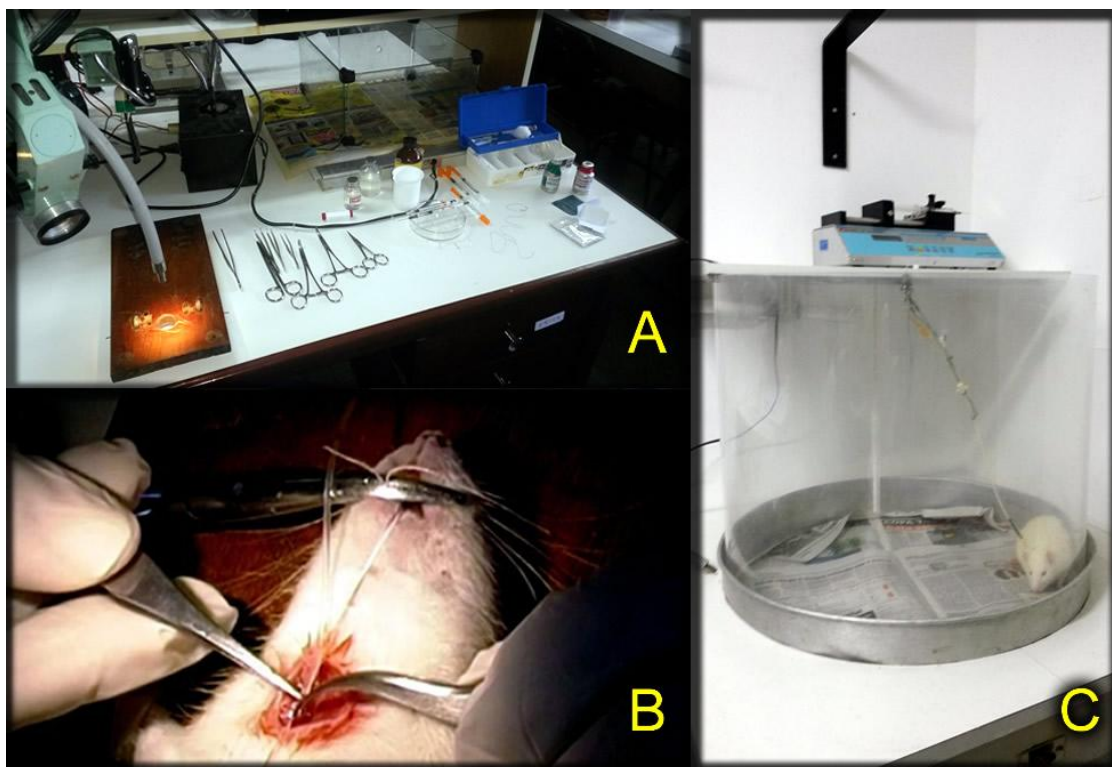


Figura 4.1: Organização (A), procedimento cirúrgico (B) para a canulação da veia jugular e estimulação por KCN (C).



Figura 4.2: Sistema utilizado no Estudo-2. Todo procedimento comportamental era filmado e posteriormente analisado, sendo o tempo contabilizado utilizando-se o recurso timecode do Sony Vegas Pro 11® (A). Arena para estimulação química com a bomba de infusão acopladas (B).

4.3. RESULTADOS

Não foram observadas diferenças significantes na duração das respostas de fuga à administração de KCN ($80 \mu\text{g}/0,1\text{ml}$, e.v.) antes e após a infusão das soluções isosmolares ($0,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot 15 \text{ min}^{-1}$) de LAC ou NaCl, tanto nos ratos VG, tratados ou não-tratados com NLX, quanto naqueles submetidos ao ISN e ISF (Figura 4.3).

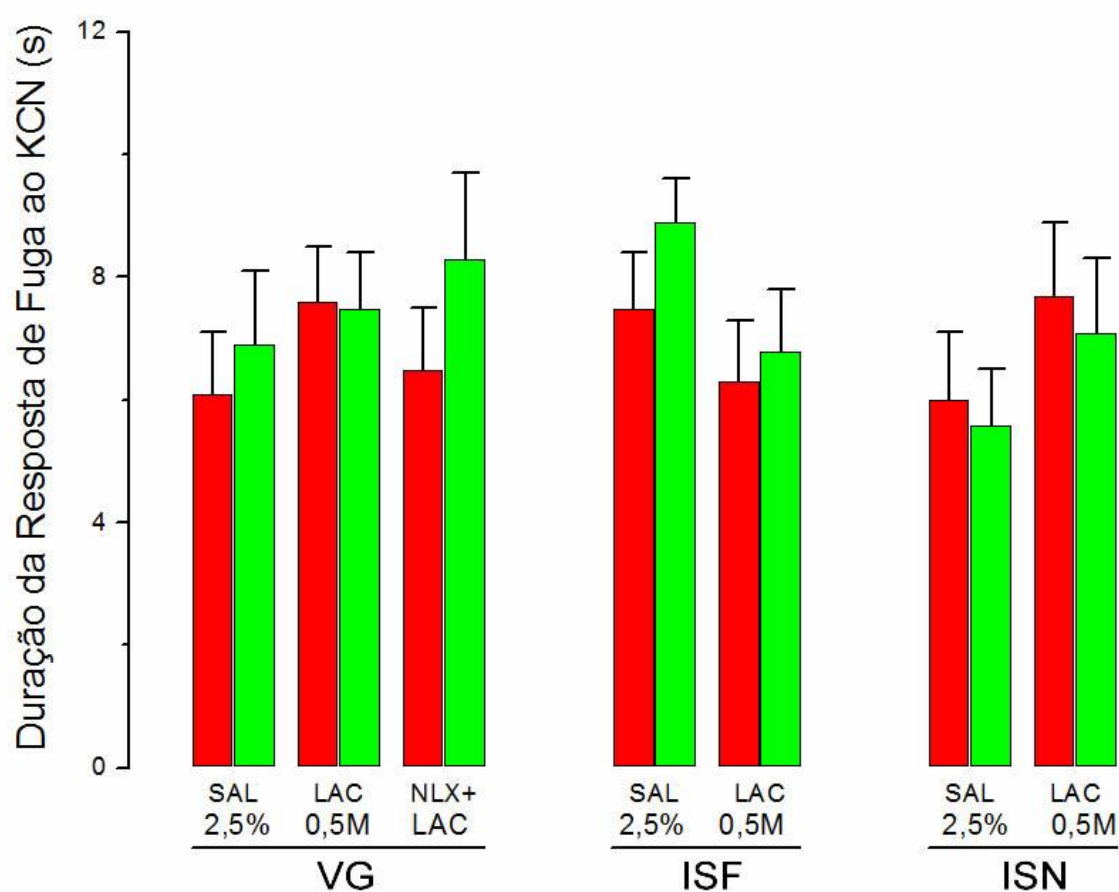


Figura 4.3: Gráfico mostrando a variação do tempo de fuga em segundos (eixo y) nos diversos grupos (VG: virgem, ISF: isolamento social fictício, ISN: isolamento social neonatal e NLX: naloxona) utilizados nesse estudo (eixo x) pré (vermelho) e pós infusão (verde) de lactato de sódio $0,5\text{mol/l}$ (LAC) ou solução salina isosmolar 2,5% (SAL).

4.4. DISCUSSÃO

Os grupos celulares do campo tegmental pontino e bulbar são considerados como os principais elementos de controle da respiração, exercendo o controle diferencial dos movimentos inspiratórios e expiratórios. Juntos, os centros pré-motores da respiração regulam o ciclo respiratório ou eupnéia com base nas informações aferentes dos mecanorreceptores pulmonares (volume pulmonar, estiramento e fluxo respiratório) e dos quimiorreceptores periféricos ou centrais, do seio carotídeo e superfície ventral do bulbo, que monitoram os níveis sanguíneos e cerebrais de PO_2 e PCO_2 , respectivamente. A maior parte dessa informação chega ao tronco cerebral via nervos vago e glossofaríngeo e pode-se considerar os grupos celulares do tronco cerebral caudal relacionados à respiração como o centro reflexo que regula a frequência e amplitude respiratórias, aumentando, diminuindo ou não alterando, dependendo do tipo de informação periférica (VON EULER, 1983; SUBRAMANIAN et al. 2008). Contudo, este sistema reflexo não parece ser suficiente para a produção dos comportamentos de sobrevivência (reação de fuga e luta) a situações de perigo ou outras condições que requerem alterações dramáticas da respiração.

De fato, os neurônios pré-motores do tronco cerebral caudal que estão relacionados à respiração carecem de aferências visuais, auditivas e somestésicas, sendo necessária uma estrutura que seja o recipiente destas informações e que tenha acesso aos mecanismos do tronco encefálico relacionados à respiração e ao controle do comportamento. Essa estrutura teria a função de ajustar a respiração aos eventos que possam ameaçar a sobrevivência do organismo (SUBRAMANIAN et al. 2008).

Em estudo recente, Subramanian e colaboradores (2008) postularam que a MCPA possa ser esse núcleo mediador, uma vez que a estimulação química de diferentes regiões da MCPA produzem diferentes padrões respiratórios. Esses resultados condizem com o fato de que diante de uma situação aversiva é necessário que haja o aumento da frequência respiratória e conseqüente aumento da oferta de oxigênio.

Franchini e Krieger (1993) mostraram, por outro lado, que a estimulação dos quimiorreceptores por KCN produz reações de alerta e defesa acompanhadas de hiperventilação, vasodilatação do leito muscular e vasoconstrição dos leitos mesentérico e renal. Adicionalmente, mostraram que estas respostas são abolidas pela deservação do seio carotídeo, sugerindo que as mesmas são promovidas pela ativação dos quimiorreceptores no corpo carotídeo. Além disso, estudos mostraram que a estimulação dos quimiorreceptores por KCN resulta num aumento significativo de imunorreatividade à proteína c-Fos na MCPA em ratos anestesiados, tal como ocorre em ratos conscientes submetidos à hipóxia (HAYWARD e VON REITZENSTEIN, 2002; BERQUIN et al., 2000; ERICKSON e MILLHORN, 1994; TEPPEMA et al., 1997; HORN, KRAMER e WALDROP, 2000; CASANOVA ET AL., 2013). A participação da MCPA nas respostas defensivas ao KCN foi definitivamente demonstrada pelos estudos fisiológicos e farmacológicos de nosso laboratório em ratos não anestesiados (SCHIMITEL et al., 2012, 2014)..

Por outro lado, Johnson e colaboradores (2008) mostraram que a infusão de LAC 0,5 mol/L aumentou a expressão de c-Fos no NDR ventrolateral (DRVl) e MCPAvl de ratos controles, mas não teve efeito algum em ratos LAC-sensíveis que infundidos com l-alilglicina (um inibidor da síntese de GABA) no hipotálamo dorsomedial (HDM). Os autores justificaram os resultados descrevendo o papel inibitório, ainda não muito compreendido, que os neurônios serotoninérgicos do DRVl e MCPAvl possuem sobre a MCPAdl, a qual seria responsável pelas respostas simpatoexcitatórias e comportamentos de fuga ou luta. Além disso postularam um papel chave do HDM, em que esse núcleo ativaria as projeções serotoninérgicas DRVl/MCPAvl e os seus interneurônios GABAérgicos teriam um papel fundamental nesse controle.

As considerações acima sugerem que a administração sistêmica de KCN é um modelo válido de pânico respiratório. Portanto, o fato da infusão de LAC 0,5mol/l não ter produzido efeito sobre a duração da fuga conduz a questionamentos que apenas poderão ser respondidos com estudos posteriores, com avaliação cardiorrespiratória, concentrações maiores de lactato, entre outros. Também devemos considerar que os estudos que mostram o papel panicogênico do LAC 0,5 mol/L sistêmico nos pacientes de pânico se baseiam, em sua maioria, na escala de

avaliação de Hamilton, que compreende alguns itens impossíveis de serem avaliados em um modelo experimental e além disso, não há relatos na literatura de uma reação do tipo fuga no momento pós a infusão de LAC nesses pacientes.

De fato os ataques de pânico induzidos pela infusão de LAC ou pela inalação de CO₂ constituem um importante núcleo da teoria do alarme falso de sufocamento de Donald Klein (KLEIN, 1993) e embora alguns estudos conduzidos com animais corroboram com essa teoria (JOHNSON et al., 2012; OLSSON et al., 2002; KINKEAD et al., 2005), em geral, estes avaliam os efeitos do LAC sobre as respostas cardiorrespiratórias, que não foram mensuradas no presente estudo, além do teste da interação social, que seria um modelo experimental de TAG e não de AP.

No presente trabalho, não houve diferença significativa na duração da fuga pela administração de KCN (80 µg/0,1ml), nos animais tratados com LAC (0,5 mol/l), quando comparados aos controles (salina isosmolar) e diferentemente do Estudo-1, os resultados obtidos no Estudo-2 conduzem ao entendimento de que o ISN não tem nenhum efeito, seja facilitação ou inibição, sobre as respostas ao KCN antes ou após o LAC 0,5 mol/l. Por fim, o LAC também não teve efeitos na duração de fuga nos grupos virgens, tanto nos controles como nos tratados com SAL, ou com LAC precedido por NLX.

Sendo assim, nossos resultados sugerem que o LAC e KCN atuem por mecanismos distintos na geração das respostas de pânico. Contudo, Olsson et al. (2002) observaram que o volume minuto respiratório dos ratos somente é aumentado com infusões de soluções de LAC 2 mol/L as quais, sugerem, seriam equivalentes à solução 0,5 mol/L utilizada em humanos. Portanto, as conclusões definitivas tornam imperativa a realização de grupos adicionais com concentrações mais elevadas de LAC, que foram feitos na concentração de 2 mol/L (3 ratos. Resultados não inclusos) e esses apresentaram resultados similares aqueles observados com a concentração de 0,5mol/L.

4.5. CONCLUSÕES

1. Os resultados sugerem que a infusão endovenosa de LAC, similar à utilizada para a indução de LAC em humanos, não tem efeito sobre as respostas de pânico experimental induzidas pelo KCN.
2. Os resultados também sugerem que o ISN, nos moldes utilizados no presente estudo, não facilita o pânico experimental por infusão de KCN.

REFERÊNCIAS

5. REFERÊNCIAS

ALBANO, A.M.; CHORPITA, B.R.; BARLOW, D.H. Childhood anxiety disorders. In: Mash, E.J., Barkley, R.A. (Eds.), **Child Psychopathology**. Guilford Press, New York: 196–241, 1996.

ANTONY M. M. e SWINSON R. P. Anxiety Disorders and their Treatment: A Critical Review of the Evidence-Based Literature. **CANADA**, 1996

APA. DSM 5: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders of American Psychiatric Association, Fourth Edition, **American Psychiatric Press**, Washington, DC, 2013.

APA. DSM III: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders of American Psychiatric Association, Fourth Edition, **American Psychiatric Press**, Washington, DC, 1980.

APA. DSM IV: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders of American Psychiatric Association, Fourth Edition, **American Psychiatric Press**, Washington, DC, 1994.

ASBAHR, F. R. Transtornos ansiosos na infância e adolescência: aspectos clínicos e neurobiológicos. **Jornal de Pediatria**. 80(2): S28-S34, 2004.

BAKKER, J.; NIJSTEN, M. W. N. e JANSEN, T. C. Clinical use of lactate monitoring in critically ill patients. **Annals of Intensive Care**. 3(12), 2013.

BANDLER, R. e SHIPLEY, M. T. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? **Trends Neurosci**. 17(9): 379-89, 1994.

BARNES, N. M. e SHARP, T. A review of central 5-HT receptors and their function. **Neuropharmacology**. 38: 1083–1152, 1999.

BATTAGLIA, M.; OGLIARI A.; D'AMATO F.; KINKEAD R. Early-life risk factors for panic and separation anxiety disorder: insights and outstanding questions arising from human and animal studies of CO2 sensitivity. **Neurosci Biobehav**. 46(3): 455-64, 2014.

BAXTER, A. J. SCOTT, K. M. VOS T. WHITEFORD H. A. Global prevalence of anxiety disorders: a systematic review and meta-regression. **Psychological Medicine**. 43: 897–910. 2013

BERGER, M.; GRAY, J. A. e ROTH, B. L. The Expanded Biology of Serotonin. **Annu Rev Med**. 60: 355–66, 2009.

BERNABÉ, C. S. Efeitos Agudos e Crônicos da Fluoxetina em Modelos Experimentais de Pânico, Ansiedade e Depressão de Ratos Adultos Submetidos ao Isolamento Social Neonatal. Dissertação de Mestrado. **UFES**. Vitória, 2013.

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

BERQUIN, P.; BODINEAU, L.; GROS, F.; LARNICOL, N. Brainstem and hypothalamic areas involved in respiratory chemoreflexes: a Fos study in adult rats. **Brain Res**. 857: 30–40, 2000.

BIEDERMAN, J.; PETTY, C.; FARAONE, S. V.; HIRSHFELD-BECKER, D.; POLLACK, M. H.; HENIN, A.; GILBERT, J.; ROSENBAUM, J. F. Moderating effects of major depression on patterns of comorbidity in patients with panic disorder. **Psychiatry Research**. 126: 143-149, 2004.

BIEDERMAN, J.; ROSENBAUM, J. F.; BOLDUC-MURPHY, E. A.; FARAONE, S. V.; CHALOFF, J.; HIRSHFELD, D. R.; KAGAN, J. A. 3-year follow-up of children with and without behavioral inhibition. **J Am Acad Child Adolesc Psychiatry**. 32 (4): 814-821, 1993.

BITTENCOURT, A. S.; CAROBREZ, A. P.; ZAMPROGNO, L. P.; TUFIK, S.; SCHENBERG, L. C. 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, 2004.

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

BLANCHARD, R.; FLANNELLY, K. J.; BLANCHARD, C. Defensive behavior of laboratory and wild *Rattus norvegicus*. **J Comp Psychol**. 100:101-107, 1986.

BLANDIN, N.; PARQUET, P. J.; BAILLY, D. Separation anxiety. Theoretical considerations. **Encephale**. 20: 121-129, 1994.

BRADLEY, P. B.; ENGEL, G.; FENIUK, W.; FOZARD, J. R.; HUMPHREY, P. P.; MIDDLEMISS, D. N.; MYLECHARANE, E. J.; RICHARDSON, B. P.; SAXENA, P. R. Proposals for the classification and nomenclature of functional receptors for 5-hydroxytryptamine. **Neuropharmacology**. 25: 563–576, 1986.

BRASIL. Saúde mental e atenção básica: O vínculo e o diálogo necessários. **Ministério da Saúde**, 2003

CANETTI, L.; BACHAR, E.; GALILI-WEISSTUB, E.; DE-NOUR, A. K.; SHALEV, A.Y. Parental bonding and mental health in adolescence. **Adolescence**. 32: 381-394, 1997.

CANTERAS, N. S. e GRAEFF, F. G. Executive and modulatory neural circuits of defensive reactions: implications for panic disorder. **Neurosci Biobehav Rev.** 46(3): 352-64, 2014.

CARRIVE, P. The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. **Behavioral Brain Research.** 58: 27-47, 1993.

CASANOVA, J.P.; CONTRERAS, M.; MOYA, E.A.; TORREALBA, F.; ITURRIAGA, R. Effect of insular cortex inactivation on autonomic and behavioral responses to acute hypoxia in conscious rats. **Behav Brain Res.** 253:60-67, 2013

CLASSIFICAÇÃO DOS TRANSTORNOS MENTAIS E DE COMPORTAMENTO. **CID 10.** Editora Artes Médicas, 1993.

COATES, E. L. LI, A.; NATTIE, E. E. Widespread sites of brain stem ventilator chemoreceptors. **J Appl Physiol.** 75, 5–14, 1993.

COHEN, M.E.; e WHITE, P.D. Life situations, emotions and neurocirculatory asthenia. **Psychosom Med.** 13, 335-357. 1951.

COWLEY, D. S.; HYDE, T. S.; DAGER, S. R.; DUNNER, D. L. Lactate infusions: the role of baseline anxiety. **Psychiatry Res.** 21(2): 169-179, 1987.

CUMMINGS, C. M.; CAPORINO, N. E.; KENDALL, P. C. Comorbidity of anxiety and depression in children and adolescents: 20 years after. **Psychol Bull.** 140(3): 816-845, 2014.

DEAKIN, J. F. W.; GRAEFF, F. G. 5-HT and mechanisms of defence. **J Psychopharmacol.** 5: 305-315, 1991.

DILLON, G. H.; WALDROP, T. G. In vitro responses of caudal hypothalamic neurons to hypoxia and hypercapnia. **Neuroscience.** 51, 941–950, 1992.

DOERFLER, L. A.; TOSCANO, P. F. JR.; CONNOR, D. F. Separation anxiety and panic disorder in clinically referred youth. **J Anxiety Disord.** 22: 602-611, 2008.

DUMONT, F. S.; KINKEAD, R. Neonatal stress and attenuation of the hypercapnic ventilatory response in adult male rats: the role of carotid chemoreceptors and baroreceptors. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 299: R1279-R1289, 2010.

EHLERS, A.; BREUERB, P. How good are patients with panic disorder at perceiving their heartbeats? **Biological Psychology.** 42: 165- 182, 1996.

EHRENREICH, J. T.; SANTUCCI, L. C. e WEINER, C. L. Separation Anxiety Disorder in Youth: Phenomenology, Assessment, and Treatment. **Psicol Conductual,** 2008.

ERICKSON, J. T. e MILLHORN D. E. Hypoxia and electrical stimulation of the carotid sinus nerve induce fos-like immunoreactivity within catecholaminergic and serotonergic neurons of the rat brainstem. **Journal of Comparative Neurology**. 348(2): 161–182, 1994.

FAVA, M. e KENDLER, K. S. Major depressive disorder. **Neuron**. 28: 335–341, 2000.

FAWCETT, J. Suicide risk factors in depressive disorders and in panic disorder. **J Clin Psychiatry**. 53: 9-13, 1992.

FELDMAN, J. L.; DEL NEGRO, C. A. Looking for inspiration: new perspectives on respiratory rhythm. **Nat Rev Neurosci**. 7: 232-242, 2006.

FELDMAN, J. L.; MITCHELL, G. S.; NATTIE, E. E. Breathing, Rhythmicity, Plasticity, Chemosensitivity. **Ann Rev Neuroscience**. 26:239-66, 2003.

FISHMAN, S. M.; CARR, D. B.; BECKETT, A.; ROSENBAUM, J. F. Hypercapnic ventilatory response in patients with panic disorder before and after alprazolam treatment and in pre-and postmenstrual women. **J Psychiatr Res**. 28: 165-170, 1994.

FLEITLICH-BIL, Y. K. B. e GOODMAN, R. Prevalence of child and adolescent psychiatric disorders in southeast Brazil. **Journal of American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**. 43 (6), 727-734, 2004.

FORD, T.; GOODMAN, R. e MELTZER, H. The British Child and Adolescent Mental Health Survey 1999: the prevalence of DSM-IV disorders. **Journal of American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**. 42(10): 1203-1211, 2003.

FRANCHINI, K. G.; KRIEGER, E. M. Cardiovascular responses of conscious rats to carotid body chemoreceptor stimulation by intravenous KCN. **J Auton Nerv Syst**. 42: 63–70, 1993.

FRANCHINI, K. G.; OLIVEIRA, V. L.; KRIEGER, E. M. Hemodynamics of chemoreflex activation in unanesthetized rats. **Hypertension**. 30: 699–703, 1997.

FRANCIS, G.; LAST, C. G.; STRAUSS, C. C.. Expression of separation anxiety disorder: the roles of age and gender. **Child Psychiatry and Human Development**. 18, 82–89, 1987.

GENEST, S. E.; BALON, N.; LAFOREST, S.; DROLET, G.; KINKEAD, R. Neonatal maternal separation and enhancement of the hypoxic ventilator response in rat: the role of GABAergic modulation within the paraventricular nucleus of the hypothalamus. **J Physiol**. 583: 299-314, 2007a.

GENEST, S. E.; GULEMETOVA, R.; LAFOREST, S.; DROLET, G.; KINKEAD, R. Neonatal maternal separation induces sex-specific augmentation of the hypercapnic ventilatory response in awake rat. **J Appl Physiol**. 102: 1416-1421, 2007b.

GENEST, S. E.; GULEMETOVA, R.; LAFOREST, S.; DROLET, G.; KINKEAD, R. Neonatal maternal separation and sex-specific plasticity of the hypoxic ventilatory response in awake rat. **The Journal of Physiology**. 554, 543–557, 2004.

GENTIL, V. The aversive System, 5-HT and panic attacks. In: Simon, P.; Soubrié, P.; e Wildlocher, D. **Animal Models of Psychiatric Disorders**. Karger: Basel, p. 142-145, 1988.

GORMAN, J. M.; BROWNE, S. T.; PAPP, L. A.; MARTINEZ, J.; WELKOWITZ, L.; COPLAN, J. D.; GOETZ, R. R.; KENT, J.; KLEIN, D. F. Effect of antipanic treatment on response to carbon dioxide. **Biol Psychiatry**. 42: 982-991, 1997.

GORMAN, J. M.; FYER, M. R.; GOETZ, R.; ASKANAZI, J.; LIEBOWITZ, M. R.; FYER, A. J.; KINNEY, J.; KLEIN, D. F. Ventilatory physiology of patients with panic disorder. **Arch Gen Psychiatry**. 45(1): 31-39 [erratum in: Arch Gen Psychiatry 48(2):181, 1991], 1988.

GORMAN, J. M.; GOETZ, R. R.; DILLON, D.; LIEBOWITZ, M. R.; FYER, A. J.; DAVIES, S.; KLEIN, D. F. Sodium d-lactate infusion of panic disorder patients. **Neuropsychopharmacology**. 3: 181 - 189, 1990.

GRAEFF, F. G. 5-HT, matéria cinzenta periaquedutal e transtorno do pânico. **Revista Brasileira de Psiquiatria**. 25 (Supl II) 42-5, 2003.

GRAEFF, F. G. 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, 2012.

GRAEFF, F. G. Serotonin, the periaqueductal Gray and panic. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. 28: 239-259, 2004.

GRAEFF, F. G.; ZANGROSSI, H. J. 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: 207-217, 2010.

HAYWARD, L. F. e CASTELLANOS, M. Activation of the dorsal periaqueductal gray in the rat induces Fos-like immunoreactivity in select non-cholinergic mesopontine neurons. **Neuroscience Letters**. 360: 5–8, 2004.

HAYWARD, L. F. e VON REITZENSTEIN, M. c-Fos expression in the midbrain periaqueductal gray after chemoreceptor and baroreceptor activation. **Am J Physiol Heart Circ**. 283: H1975–H1984, 2002.

HEIM, C. e NEMEROFF, C. B. The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. **Biol Psychiatry**. 49: 1023-1039, 2001.

HOFFMAN, E. J. e MATHEW, S. J. Anxiety Disorders: A Comprehensive Review of Pharmacotherapies. **Mount Sinai Journal of Medicine**. 75: 248 –262, 2008.

HOLT, R. L. e LYDIARD, R. B. Management of Treatment-Resistant Panic Disorder. **Psychiatry** (Edgmont). 4 (10): 48–59, 2007.

HORN, E. M.; KRAMER, J. M.; WALDROP, T. G. Development of hypoxia-induced Fos expression in rat caudal hypothalamic neurons. **Neuroscience**. 99(4):711-20, 2000.

HOYER, D.; HANNON, J. P.; MARTIN, G. R. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**. 71, 533–554, 2002.

IWATA, J.; LEDOUX, J. E.; REIS, D. J. Destruction of intrinsic neurons in the lateral hypothalamus disrupts the classical conditioning of autonomic but not behavioral emotional responses in the rat. **Brain Res**. 368, 161–166, 1986.

JENCK, F.; MOREAU, J. L.; MARTIN, J. R. Dorsal periaqueductal gray-induced aversion as a simulation of panic anxiety: elements of face and predictive validity. **Psychiatry Res**. 57: 181-191, 1995.

JOHNSON, P. L.; LOWRY, C. A.; TRUITT, W.; SHEKHAR, A. Disruption of GABAergic tone in the dorsomedial hypothalamus attenuates responses in a subset of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus following lactate-induced panic. **Journal of Psychopharmacology**. 22(6): 642–652, 2008.

JOHNSON, M. R. e LYDIARD, R. B. Comorbidity of major depression and panic disorder. **J Clin Psychol**. 54: 201-210, 1998.

KAUFMAN, J. e CHARNEY, D. Comorbidity of mood and anxiety disorders. **Depress Anxiety**. 12: 69-76, 2000.

KELLNER, M.; KNAUDT, K.; JAHN, H.; HOLSBOER, F.; WIEDEMANN, K. Atrial natriuretic hormone in lactate-induced panic attacks: mode of release and endocrine and pathophysiological consequences. **J. Psychiatr**. 32: 37-48, 1998.

KESSLER, R. C.; CHIU, W. T.; JIN, R.; RUSCIO, A. M.; SHEAR, K.; WALTERS, E. E. The epidemiology of panic attacks, panic disorder, and agoraphobia. In: **National Comorbidity Survey Replication**. Arch Gen Psychiatry. 2006.

KINKEAD, R.; GENEST, S. E.; GULEMETOVA, R.; LAJEUNESSE, Y.; LAFOREST, S.; DROLET, G.; BAIRAM, A. Neonatal maternal separation and early life programming of the hypoxic ventilatory response in rats. **Respir Physiol Neurobiol**. 15 (149):313-24, 2005.

KINLEY, D. J.; WALKER, J. R.; MURRAY, W.; ENNS, M. W.; SAREEN, J. Panic attacks as a risk for later psychopathology: results from a nationally representative survey. **Depress Anxiety**. 0: 1-8, 2011.

KISER, R. S.; BROWN, C. A.; SANGHERA, M. K.; GERMAN, D. C. Dorsal raphe nucleus stimulation reduces centrally elicited fearlike behavior. **Brain Res**. 191: 265-272, 1980.

KISER, R. S.; GERMAN, D. C.; LEOVITZ, R. M. Serotonergic reduction of dorsal central gray area stimulation-produced aversion. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. 9:27-31, 1978.

KISER, R. S.; LEOVITZ, R. M. Monoaminergic mechanisms in aversive brain stimulation. **Physiol Behav**. 15:47-53, 1975.

KISER, R. S.; BROWN, C. A.; SANGHERA, M. K.; GERMAN, D. C. Dorsal raphe nucleus stimulation reduces centrally elicited fearlike behavior. **Brain Res**. 191: 265-272, 1980.

KLAUKE, B.; DECKERT, J.; REIF, A.; PAULI, P.; DOMSCHKE, K. Life events in panic disorder – an update on “candidate stressors”. **Depress Anxiety**. 27: 716-730, 2010.

KLEIN, D. F. Delineation of two drug-responsive anxiety syndromes. **Psychopharmacology**. 5, 397–408, 1964.

KLEIN, D. F. Panic may be a misfiring suffocation alarm. In: The psychopharmacology of panic (Montgomery SA). **Oxford University Press**. New York, 67-73, 1993a.

KLEIN, D. F. False suffocation alarms, spontaneous panics, and related conditions. An integrative hypothesis. **Arch Gen Psychiatry**. 50: 306-317, 1993b.

KLEIN, R. G. Is panic disorder associated with childhood separation anxiety disorder. **Clinical Neuropharmacology**. 1995.

KOSSOWSKY, J.; PFALTZ, M. C.; SCHNEIDER, S.; TAEYMANS, J.; LOCHER, C.; GAAB, J. The Separation Anxiety Hypothesis of Panic Disorder Revisited: A Meta-Analysis. **Am J Psychiatry**. 170(7): 768-81, 2013.

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

KROENKE, K.; SPITZER, R. L.; WILLIAMS, J.B.W.; MONAHAN, P. O.; LÖWE, B. Anxiety Disorders in Primary Care: prevalence, Impairment, Comorbidity, and Detection. **Ann Intern Med**. 146, 317-325. 2007

LAPIERRE, Y.; KNOTT, V. e GRAY, R. Psychophysiological correlates of sodium lactate. **Psychopharmacol Bull**. 20 (1): 50-57, 1984.

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

LAST, C. G.; PERRIN, S.; HERSEN, M.; KAZDIN, A. E. A prospective study of childhood anxiety disorders. **Journal of American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**. 35: 1502-1510, 1996.

LECRUBIER, Y. e USTÜN, T. B. Panic and depression: a worldwide primary care perspective. **Int Clin Psychopharmacol**. 13 (Suppl 4): S7-11, 1998.

LECRUBIER, Y. The impact of comorbidity on the treatment of panic disorder. **J Clin Psychiatry**. 59 (Suppl 8): 11-14, 1998.

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.; KLEIN, D. F. Lactate Provocation of Panic Attacks: I. Clinical and Behavioral Findings. **Arch Gen Psychiatry**. 1984; 41(8): 764 - 770, 1984.

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. Lactate provocation of panic attacks. II. Biochemical and physiological findings. **Arch Gen Psychiat**. 42: 709-719, 1985.

MANICAVASAGAR, V.; SILOVE, D.; HADZI-PAVLOVIC, D. Subpopulations of early separation anxiety: relevance to risk of adult anxiety disorders. **J Affect Disorders**. 48: 181-190, 1998.

MAREN, S. The Threatened Brain. *Science* 317: 1043-1044. Mobbs D, Petrovic P, Marchant JL, Hassabis D, Weiskopf N, Seymour B, Dolan RJ, Frith CD (2007). When fear is near: threat imminence elicits prefrontal- periaqueductal gray shifts in humans. **Science**. 317: 1079-1083, 2007.

MARGRAF, J.; EHLERS, A. e ROTH, W. T. Sodium lactate infusions and panic attacks: A review and critique. **Psychosom Med**. 48 (1-2): 23 - 51, 1986.

MARON, E.; KUIKKA, J. T.; SHLIK, J.; VASAR, V.; VANNINEN, E.; TIIHONEN, J. Reduced brain serotonin transporter binding in patients with panic disorder. **Psychiatry Research**. 132, 173–181, 2004.

MICHELSON, D.; ALLGULANDER, C.; DANTENDORFER, K.; KNEZEVIC, A.; MAIERHOFER, D.; MICEV, V.; PAUNOVIC, V. R.; TIMOTIJEVIC, I.; SARKAR, N.; SKOGLUND, L.; PEMBERTON, S. C. Efficacy of usual antidepressant dosing regimens of fluoxetine in panic disorder: randomised, placebo-controlled trial. **Br J Psychiatry**. 179: 514 - 8, 2001.

MOBBS, D.; PETROVIC, P.; MARCHANT, J.; HASSABIS, D.; WEISKOPF, N.; SEYMOUR, B.; DOLAN, R. J.; FRITH, C. D. When Fear is Near: Threat Imminence Elicits Prefrontal - Periaqueductal Grey Shifts in Humans. **Science**. 317:1079–1083, 2007.

MOHAMMAD-ZADEH, L. F.; MOSES, L. e GWALTNEY-BRANT, S. M. Serotonin: a review. **J Vet Pharmacol. Therap**. 31: 187–199, 2008.

MONTGOMERY, S. A. The areas of clinical and biological advance in panic disorder: an introduction. In: SA Montgomery (Ed.), **Psychopharmacology of Panic**. New York: Oxford University Press, p. 1-6, 1993.

MROCZKOWSKI, M. M.; GOES, F. S.; RIDDLE, M. A.; GRADOS, M. A.; BIENVENU, O. J.; GREENBERG, B. D.; FYER, A. J.; MCCRACKEN, J. T.; RAUCH, S. L.; MURPHY, D. L.; KNOWLES, J. A.; PIACENTINI, J.; CULLEN, B.; RASMUSSEN, S. A.; GELLER, D. A.; PAULS, D. L.; LIANG, K. Y.; NESTADT, G.; SAMUELS, J. F. Separation anxiety disorder in OCD. **Depress Anxiety**. 28: 256-262, 2011.

MURPHY, D. L.; ANDREWS, A. M.; WICHEMS, C. H.; LI, Q.; TOHDA, M.; GREENBERG, B. Brain serotonin neurotransmission: an overview and update with an emphasis on serotonin subsystem heterogeneity, multiple receptors, interactions with other neurotransmitter systems, and consequent implications for understanding the actions of serotonergic drugs. **J Clin Psychiatry**. 59 (15):4-12, 1998.

NASHOLD, JR. B. S.; WILSON, W. P.; SLAUGHTER, D. G. Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. **J Neurosurgery**. 30: 14–24, 1969.

NASHOLD, JR. B. S.; WILSON, W. P.; SLAUGHTER, G. S. The midbrain and pain. In: Bonica, J.J. (Ed.), **Adv. Neurol.** 4: International Symposium on Pain. **Raven Press**, New York, NY, p. 191–196, 1974.

OLSSON, M.; HO, H. P.; ANNERBRINK, K.; THYLEFORS, J.; ERIKSSON, E. Respiratory responses to intravenous infusion of sodium lactate in male and female Wistar rats. **Neuropsychopharmacology**. 27(1): 85-91, . 2002.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde. Porto Alegre (RS). **Editora Artmed**. 1993.

PAIN, M. C. F.; BIDDLE, N.; TILLER, J. W. G. Panic disorder, the ventilatory response to carbon dioxide and respiratory variables. **Psychosom Med**. 50: 541-548, 1988.

PATTINSON, K. T. S. Opioids and the control of respiration. **British Journal of Anaesthesia**. 100 (6): 747–58, 2008.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. **Academic Press**, San Diego, CA. 1998.

PERUGI, G.; DELTITO, J.; SORIANI, A.; MUSETTI, L.; PETRACCA, A.; NISITA, C.; MAREMMANI, I.; CASSANO, G. B. Relationships between panic disorder and separation anxiety with school phobia. **Comprehensive Compr Psychiatry**. 29 (2): 98-107, 1988.

PILECKI, B. ARENTOFT, A. MCKAY, D. An evidence-based causal model of panic disorder. **Journal of Anxiety Disorders**. 25, 381–388. 2011.

PINEDA, J.; AGHAJANIAN, G. K. Carbon dioxide regulates the tonic activity of locuscoeruleus neurons by modulating a proton- and polyamine-sensitive inward rectifier potassium current. **Neuroscience**. 77, 723–743, 1997.

PITTS, F. N.; MCCLURE, J. N. Lactate metabolism in anxiety neurosis. **New Engl J Med**. 277: 1329-1336, 1967.

POBBE, R. L. H. e ZANGROSSI, H. J. R. 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, 2005.

POBBE, R. L. H.; ZANGROSSI, H. JR.; BLANCHARD, C. D.; BLANCHARD, R. J. Involvement of dorsal raphe nucleus and dorsal periaqueductal gray 5-HT receptors in the modulation of mouse defensive behaviors. **European Neuropsychopharmacology**. 21 (4): 306-315, 2010.

POLLACK, M. H.; OTTO, M. W.; ROY-BYRNE, P. P.; COPLAN, J. D.; ROTHBAUM, B. O.; SIMON, M. N.; GORMAN, J. M. Novel treatment approaches for refractory anxiety disorders. *Depress Anxiety*. **Depress Anxiety**. 25 (6): 467 - 476, 2008.

PULL, C. B. e DAMSA, C. Pharmacotherapy of Panic Disorder. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**. 4: 779-795, 2008.

QUINTINO-DOS-SANTOS, J. W. Determinantes biológicos da comorbidade dos ataques de pânico com depressão e ansiedade de separação. Tese de Doutorado. **UFES**. Vitória. 2011.

QUINTINO-DOS-SANTOS, J. W.; MÜLLER, C. J. T.; SANTOS, A. M. C.; TUFIK, S.; ROSA, C. A.; SCHENBERG, L. C. Long-lasting marked inhibition of periaqueductal gray-evoked defensive behaviors in inescapably-shocked rats. **European Journal of Neuroscience**. 2013.

QUINTINO-DOS-SANTOS, J. W. ; MULLER, C. J. T. ; BERNABE, C. S. ; ROSA, C. A. ; TUFIK, S. ; SCHENBERG, L. C. . Evidence That the Periaqueductal Gray Matter Mediates the Facilitation of Panic-Like Reactions in Neonatally-Isolated Adult Rats. **Plos One**. 3, 2014

REIMAN, E. M.; RAICHLE, M. E.; ROBINS, E.; MINTUN, M. A.; FUSSELMAN, M. J.; FOX, P. T.; PRICE, J. L.; HACKMAN, K. A. Neuroanatomical correlates of a lactate-induced anxiety attack. **Arch Gen Psychiatry**. 46, 493–500, 1989.

ROBERSON-NAY, R.; EAVES, L. J.; HETTEMA, J. M.; KENDLER, K. S.; SILBERG, J. L. Childhood separation anxiety disorder and adult onset panic attacks share a common genetic diathesis. **Depression and Anxiety**. 29: 320 –327, 2012.

ROTH, W. T.; MARGRAF, J.; EHLERS, A.; TAYLOR, C. B.; MADDOCK, R. J.; DAVIES, S. Stress test reactivity in panic disorder. **Arch Gen Psychiatry**. 49: 301-310, 1992.

RYAN, J. W.; WALDROP, T. G. Hypoxia sensitive neurons in the caudal hypothalamus project to the periaqueductal gray. **Resp Physiol.** 100, 185–194, 1995.

SALUM, G. A.; BLAYA, C. E.; MANFRO, G. G. Transtorno do pânico. **Revista de Psiquiatria do RS.** 2009.

SÁNCHEZ-MECA, J.; ROSA-ALCÁZAR, A. I.; MARÍN-MARTÍNEZ, F.; GÓMEZ-CONESA, A. Psychological treatment of panic disorder with or without agoraphobia: a meta-analysis. **Clin Psychol Rev.** 30(1):37-50, 2010.

SAVINO, M.; PERUGI, G.; SIMONINI, E.; SORIANI, A.; CASSANO, G. B.; AKISKAL, H. S. Affective comorbidity in panic disorder: is there a bipolar connection? **J Affect Disord.** 28 (3): 155-163, 1993.

SCHENBERG, L. C. Towards a translational model of panic attack. **Psychol Neurosci.** 3: 9-37, 2010.

SCHENBERG, L. C.; BITTENCOURT, A. S.; SUDRÉ, E. C.; VARGAS, L. C. Modeling panic attacks. **Neurosci Biobehav.** Rev 25: 647-659, 2001.

SCHENBERG, L. C.; CAPUCHO, L. B.; VATANABE, R. O.; VARGAS, L. C. Acute effects of clomipramine and fluoxetine on dorsal periaqueductal grey-evoked unconditioned defensive behaviours of the rat. **Psychopharmacology.** 159: 138-144, 2002.

SCHENBERG, L. C.; VASQUEZ, E. C.; COSTA, M. B. Cardiac baroreflex dynamics during the defence reaction in freely moving rats. **Brain Res.** 621: 50-58, 1993.

SCHENBERG, L. C.; COSTA, M. B.; BORGES, P. C. L.; CASTRO, M. F. S. Logistic analysis of the defense reaction induced by electrical stimulation of the rat mesencephalic tectum. **Neuroscience and Behavioral Reviews.** 14, 473–479, 1990.

SCHENBERG, L. C.; GRAEFF, F. G. Role of the periaqueductal gray substance in the anti-anxiety action of benzodiazepines. **Pharmacol Biochem Behav.** 9, 287–295, 1978.

SCHENBERG, L. C.; PÓVOA, R. M. F.; COSTA, A. L. P.; CALDELLAS, A. V.; TUFIK, S.; BITTENCOURT, A. S. Functional specializations within the tectum defense systems of the rat. **Neurosci Biobehav.** Rev 29: 279-1298, 2005.

SCHENBERG, L. C.; VASQUEZ, E. C.; COSTA, M. B. Cardiac baroreflex dynamics during the defence reaction in freely moving rats. **Brain Res.** 621(1):50-8, 1993.

SCHENBERG, L. C.; SCHIMITEL, F. G.; ARMINI, R. S.; BERNABÉ, C. S.; ROSA, C. A.; TUFIK, S.; MÜLLER, C. J. T.; QUINTINO-DOS-SANTOS, J. W. Translational approach to studying panic disorder in rats: Hits and misses. **Neuroscience and Behavioral Reviews.** 46 472–496, 2014.

SCHIMITEL, F. G.; DE ALMEIDA, G. M.; PITOL, D. N.; ARMINI, R. S.; TUFIK, S.; SCHENBERG, L. C. Evidence of a suffocation alarm system within the periaqueductal gray matter of the rat. **Neuroscience**. 200: 59–73, 2012.

SCHIMITEL, F. G.; MULLER, C. J.; TUFIK, S.; SCHENBERG, L. C. Evidence of a suffocation alarm system sensitive to clinically-effective treatments with the panicolytics clonazepam and fluoxetine. **J Psychopharmacol**. 28(12):1184-1188, 2014.

SCHÜTZ, M. T.; DE AGUIAR, J. C.; GRAEFF, F. G. Anti-aversive role of serotonin in the dorsal periaqueductal gray matter. **Psychopharmacology**. 85:340-5, 1985.

SHEAR, K.; JIN, R.; RUSCIO, A. M.; WALTERS, E. E.; KESSLER, R. C. Prevalence and correlates of estimated DSM-IV child and adult separation anxiety disorder in the national comorbidity survey replication. **American Journal of Psychiatry**. 2006.

SOARES, V. P.; ZANGROSSI, H. JR. 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, 2004.

STEININGER, T. L.; RYE, D. B. e WAINER, B. H. Afferent projections to the cholinergic pedunculo-pontine tegmental nucleus and adjacent midbrain extrapyramidal area in the albino rat. I. Retrograde tracing studies. **J Comp Neurol**. 321(4):515-43, 1992.

SUBRAMANIAN, H. H.; BALNAVE, R. J.; HOLSTEGE, G. The midbrain periaqueductal gray control of respiration. **J Neurosci**. 28: 12274–12283, 2008.

SUBRAMANIAN, H. H. e HOLSTEGE, G. Stimulation of the Midbrain Periaqueductal Gray Modulates Preinspiratory Neurons in the Ventrolateral Medulla in the Rat In Vivo. **J Comp Neurol**. 521(13): 3083–3098, 2013.

TEPPEMA, LJ; VEENING, JG; KRANENBURG, A; DAHAN, A; BERKENBOSCH, A; OLIEVIER, C. Expression of c-fos in the rat brainstem after exposure to hypoxia and to normoxic and hyperoxic hypercapnia. **J Comp Neurol**. 388:169-190, 1997

TONGE, B. 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, 1994.

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

VARGAS, L. C.; MARQUES, T. DE A.; SCHENBERG, L. C. 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, 2000.

VON EULER, C. On the central pattern generator for the basic breathing rhythmicity. **J Appl Physiol.** 55:1647–1659, 1983.

WOLPE, J.; ROWAN, V. C. Panic disorder: a product of classical conditioning. **Behm Res Ther.** 26(6), 1988.

WOODS, S. W.; CHARNEY, D. S.; LAKE, J.; GOODMAN, W. R.; REDMOND, D. E.; HENINGER, G. R. Carbon dioxide sensitivity in panic anxiety. **Arch Gen Psychiatry.** 43: 900-909, 1986.

YAMASHITA, P. S. M.; DE BORTOLI, V. C.; ZANGROSSI, H. Neuropharmacology 5-HT_{2C} receptor regulation of defensive responses in the rat dorsal periaqueductal gray. **Neuropharmacology.** 60, 216–222, 2011.

ANEXOS

ANEXO 1

Certificado do CEUA-UFES autorizando a utilização de animais no presente trabalho, ainda com o título anterior de Bases Moleculares dos Transtornos de Pânico com Depressão e Ansiedade de Separação.



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



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 070/2013, relativo ao projeto de pesquisa intitulado "**Bases Moleculares da comorbidade dos ataques de pânico com depressão e ansiedade de separação.**", que tem como responsável o (a) docente **Luiz Carlos Schenberg**, está de acordo com os princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFES), tendo sido aprovado na reunião ordinária de 07/03/14.

Vitória (ES), 07 de março de 2014.


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

ANEXO 2

Condicionamento dos animais utilizados no presente estudo: sala sem estresse, com temperatura e luz controlada, além de comida e água *ad libitum*.



ANEXO 3

Condicionamento dos animais utilizados no presente estudo: sala sem estresse, com temperatura e luz controlada, além de comida e água *ad libitum*.



ANEXO 4

Modelo de etograma utilizado como referência durante as EIC.

ETOGRAMA DO RATO

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

Repouso - Postura horizontal com olhos semi-abertos ou abertos, atividade olfativa reduzida e relaxamento muscular indicado pela flexão dos membros e rebaixamento do tronco, cabeça e pescoço.

Autolimpeza - Manipulação repetitiva dos pêlos da cabeça, tronco e genitália, usando as patas dianteiras ou a boca (comportamentos auto-dirigidos). A manipulação dos pêlos com as patas posteriores (coçar) também 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 visuo-motora do ambiente caracterizada por movimentos laterais (ou verticais) 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, por meio da 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, sugerindo 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 alternância dos pares de patas dianteiras e traseiras.

Saltos - Impulso vertical, quase sempre, em direção à borda superior da arena.

Exoftalmia - Abertura máxima das pálpebras e protrusão do globo ocular, o qual assume aspecto esférico e cor brilhante indicativa de uma maior entrada de luz.

Defecação e Micção - Eliminação dos dejetos. Comportamentos específicos como escolha de local, posturas específicas ou comportamento de encobrir os dejetos, tal como ocorrem no gato e cachorro, não têm sido observados no rato.

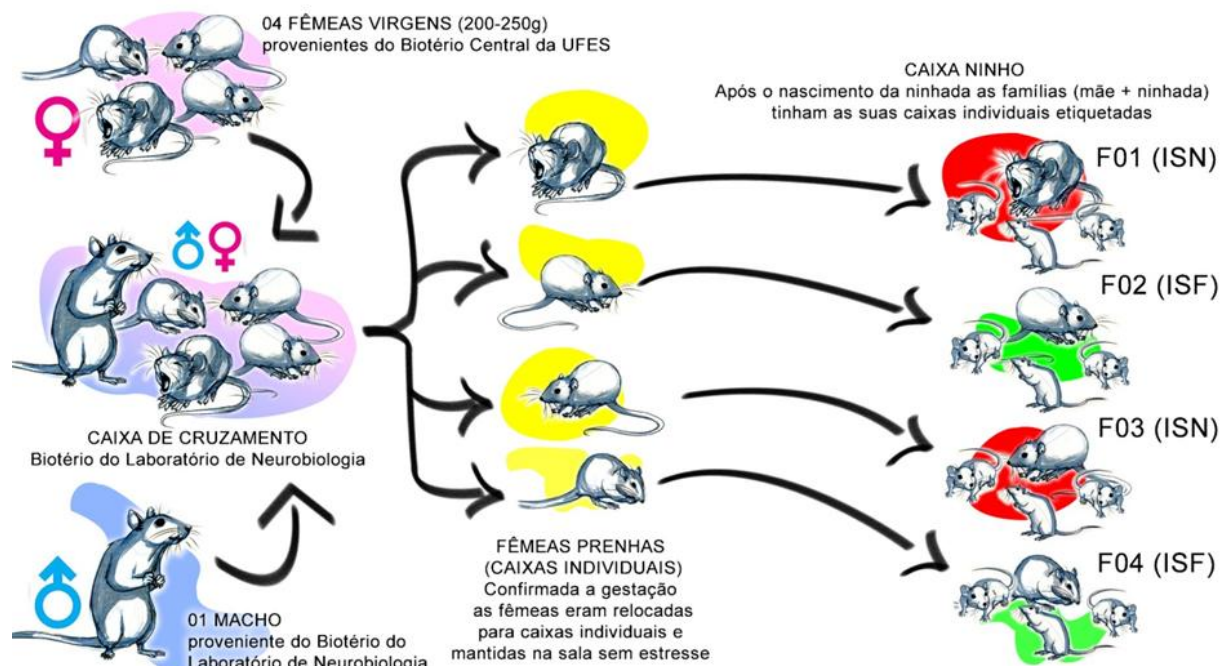
ANEXO 5



Duas imagens que mostram um mesmo momento durante o procedimento de ISN. Na figura de cima é possível ver a mãe na caixa CSM, já sem os filhotes, que estão individualmente alocados em suas caixas de privação. Na figura da esquerda é possível ver os filhotes dentro das caixas de separação, que posteriormente foram fechadas e levadas para uma sala longe daquela em que a mãe se encontrava.

OBS: Esse procedimento foi realizado durante 19 dias interrompidos por um período de 3 horas diárias.

ANEXO 6



Nos animais submetidos ao isolamento social neonatal (ISN) as mães foram relocadas para a CAIXA DE SEPARAÇÃO MATERNA, enquanto os filhotes são relocados em caixas individuais por um período de 3 horas (t). As mães foram mantidas em uma sala distinta e longe dos filhotes (d).

