



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

**EXPRESSÃO GENÔMICA DE RECEPTORES SEROTONÉRGICOS E
DE NEUROPEPTÍDEOS NA MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL
DORSAL DE RATOS SUBMETIDOS AO ISOLAMENTO SOCIAL
NEONATAL E ADULTO**

CAROLINE AZEVEDO ROSA

Tese de Doutorado em Ciências Fisiológicas

Vitória, E.S

2020

CAROLINE AZEVEDO ROSA

**EXPRESSÃO GENÔMICA DE RECEPTORES SEROTONÉRGICOS E DE
NEUROPEPTÍDEOS NA MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL DORSAL DE
RATOS SUBMETIDOS AO ISOLAMENTO SOCIAL NEONATAL E ADULTO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Fisiológicas.

Área de Concentração: Fisiologia

Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg

Orientador

Profa. Dra. Rita Gomes Wanderley Pires

Co-orientadora

Vitória, E.S

2020

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

R788e Rosa, Caroline Azevedo, 1985-
Expressão genômica de receptores serotoninérgicos e de neuropeptídeos na matéria cinzenta periaquedutal dorsal de ratos submetidos ao isolamento social neonatal e adulto / Caroline Azevedo Rosa. - 2020.
201 f. : il.

Orientador: Luiz Carlos Schenberg.
Coorientadora: Rita Gomes Wanderley Pires.
Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. pânico. 2. isolamento social. 3. serotonina. 4. neuropeptídeos. I. Schenberg, Luiz Carlos. II. Pires, Rita Gomes Wanderley. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

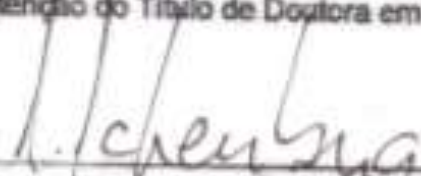
CDU: 612

Universidade Federal do Espírito Santo
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

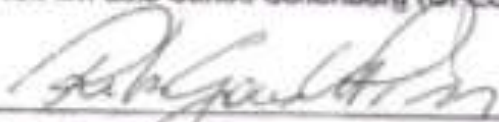
REGISTRO DE JULGAMENTO DA DEFESA DE TESE DA CANDIDATA AO
TÍTULO DE DOUTORA PELO PPGCF/CCSAUFES

Nº de matrícula da candidata: 2016241086

A Comissão Julgadora que examinou a Tese de Doutorado, intitulada *"Expressão Genômica de Recaptadores Serotoninérgicos e de Neuropeptídeos na Matéria Cinzenta Periaquedutal Dorsal de Ratos Submetidos ao Isolamento Social Neonatal e Adulto"*, apresentada e defendida publicamente pela aluna **Caroline Azevedo Rosa**, no dia 30 de abril de 2020, às 14:00 horas, decidiu, por unanimidade, aprovar a referida tese de Doutorado e, portanto, declara que a aluna faz jus à obtenção do Título de Doutora em Ciências Fisiológicas.



Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg (UFES, Orientador)



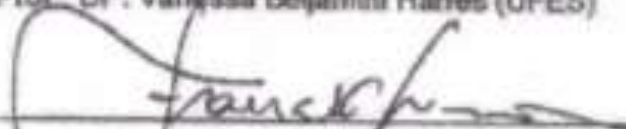
Prof.ª Dr.ª Rita Gomes Wanderley Pires (UFES, Co-orientadora)



Prof. Dr. Fernando Zanela da Silva Arbas (UFES)



Prof.ª Dr.ª Vanessa Beijamini Harres (UFES)



Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães (FMRP, USP)



Prof. Dr. Antônio de Pádua Carobrez (UFSC)

Vitória – ES, 30 de abril de 2020.

Dedico esta tese para aqueles que sofrem de solidão,
pânico e depressão.

AGRADECIMENTOS

Entender como as drogas atuam no sistema nervoso central e compreender o que leva uma pessoa a desencadear ansiedade, pânico e depressão, algo tão próximo a mim, me levou ao doutorado. Não tenho dúvidas que os Transtornos da Ansiedade são o mal do século XXI. Por isso, começo meu agradecimento a meu orientador, Professor Dr. Luiz Carlos Schenberg, um ser humano inspirador. Tenho imensa gratidão a ele, por tudo e por tanto. Ter me apresentado à neurociência é só um detalhe diante do todo, pois seu acolhimento e responsabilidade com seus orientandos nos inspira a querer ser igual. Ele é aquele que senta ao nosso lado - inclusive, à distância. E em particular, comigo, me acolheu diante de uma situação tão difícil, e com todo seu otimismo e leveza, me ajudou nos mínimos detalhes. Sua compreensão em relação às minhas limitações foi fundamental. Que sorte a minha ter, desde 2010, um orientador maravilhoso e o melhor, um verdadeiro cientista, uma raridade hoje em dia, do qual tenho enorme orgulho e admiração. Gratidão, Professor, por fazer de nós, seus alunos, respirar ciência. Me sinto honrada por fazer parte da história que o senhor vem contando.

À toda minha família, com todo meu amor, vos dedico essa tese. À minha avó (*in memoriam*), uma pequena grande mulher que tanto torcia por minha luta. Aos meus pais, meu eterno obrigada por sempre abrirem mão de tudo para que a vida me reservasse o melhor. Em especial, a meu pai, Heleno, que é minha inspiração por tamanha grandeza, sabedoria e espiritualidade; e à minha mãe, Rosângela, por suas incansáveis orações e por me permitir seguir livre mesmo sabendo que seria a que mais sentiria por isso. Amo muito vocês, minha base.

À Dona Marlene, Odon e Patrícia. Vocês que são luz na minha vida, meus anjos sem asas, sempre abençoando meu caminho, tornando-o mais leve e florido. Nunca largaram da minha mão um minuto sequer, mesmo longe. Gratidão eterna por tanto carinho comigo, que faz-me emocionar, sempre. Amo tanto vocês, que me faltam palavras, minha eterna família!

À Professora Dra. Rita Gomes Wanderley Pires (UFES), minha co-orientadora, por sua generosidade e atenção. Desde nossa primeira conversa, abriu a porta do seu

laboratório me deixando à vontade para trabalhar, usando seus equipamentos, materiais e reagentes. Gratidão, Professora.

Ao Professor Dr. Sérgio Tufik (UNIFESP), pelo financiamento do meu doutorado. Sem seu apoio, seria impossível concretizá-lo. Agradeço a você, Professor, em nome de tantos.

À Professora Dra. Angela Maria Ribeiro (UFMG), ao aluno Fábio Antônio Borges Vigil, e ao Professor Dr. Alexandre Martins Costa Santos (UFES), pela contribuição nos experimentos da dosagem da serotonina, que enriqueceu este trabalho.

Aos professores que compuseram a banca de avaliação desse trabalho, Prof^a Rita, Prof^a Vanessa, Prof. Francisco, Prof. Antônio e Prof. Fernando pelas suas importantes contribuições.

Minha tese foi uma enorme rede de colaboração. Tive a sorte de pessoas, que chamo de anjos, terem aparecido no momento certo e na hora certa. Que foram minhas mãos e meus olhos nos períodos que estava ausente. Assim, agradeço com todo carinho, à Fabíola Donato e ao Hugo Sanches, alunos de Iniciação Científica que me auxiliaram nos experimentos de separação materna, cuidando muito bem dos meus ratos até chegarem na fase adulta. Sem eles, não saberia como continuar. Agradeço aos amigos que fiz no LNMC-UFES, Tamara, Raphael e Sarah, que me ensinaram todos os protocolos bioquímicos. Obrigada, queridos amigos. Todo meu aprendizado na biologia molecular devo a vocês. Mas mais importante, é a amizade e as trocas que ficam, porque no final das contas, é isso que importa! À querida amiga Rúbia e à Jeyce, do LANTHA-UFES, pela contribuição nos experimentos de imunohistoquímica e do ISA. Ao Cristian, por sempre ajudar em todos os momentos.

Aos amigos do IFPA que também foram meus anjos: Sandro, Camila, Gu e Tiago. Em especial, Sandro e Camila, meus encontros de alma. Estendo meus agradecimentos ao meu ex-diretor, professor Roberto, que sempre foi solícito e sensível com meus pedidos de afastamento.

Aos amigos da UFES, Cynara, Lu, Steven e Dani, pelas risadas e momentos

descontraídos nos sagrados cafezinhos da tarde. Ao amigo da vida, Áthyla, por sempre, nos momentos difíceis, me fazer enxergar o quanto eu era (sou).

Aos ratos, que doam suas vidas em prol da humanidade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, ao LANECS, LNMC e LABIOM.

Aos ex-presidentes Luiz Inácio Lula da Silva e Dilma Rousseff, e ao ex-ministro da Educação, Professor Dr. Fernando Haddad, pela sensibilidade e bom senso em proporcionar oportunidade para tantos. Sou fruto das políticas públicas de incentivo e expansão da Educação.

A todos aqueles que colaboraram indiretamente para a conclusão desta tese.

Agradeço à vida, à deus, ao universo, à energia, ou seja lá o que me guia. Àquilo que aguça minha intuição, fortalece minha alma, e me permite ter a sensibilidade de enxergar o que realmente importa...

*“...A mim ensinou-me tudo.
Ensinou-me a olhar para as cousas.
Aponta-me todas as cousas que há nas flores.
Mostra-me como as pedras são engraçadas
Quando a gente as tem na mão
E olha devagar para elas...”*

*Alberto Caeiro
(Fernando Pessoa)*

Os ensaios bioquímicos de dosagem de serotonina com HPLC foram realizados no Laboratório de Neurociências Comportamental e Molecular (LANEC) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, sob supervisão da professora Dra. Angela Maria Ribeiro. Os ensaios de biologia molecular com rt-PCR foram realizados no Laboratório de Neurobiologia Molecular e Comportamental (LNMC) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Espírito Santo, sob supervisão da professora Dra. Rita Gomes Wanderley Pires.

*O amor vem em silêncio. . .
mas você sabe quando está lá
porque de repente. . .
você não está mais sozinho. . .
e não há tristeza dentro de você.*

*(J. W. Anglund, "Love Is a Special Way of Feeling", 1960
apud Jaak Panksepp, 2005, p. 246)*

RESUMO

ROSA, CA. Expressão genômica de receptores serotoninérgicos e de neuropeptídeos na matéria cinzenta periaquedutal dorsal de ratos submetidos ao isolamento social neonatal e adulto. Tese de doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória-ES, 2020. A resposta defensiva à estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPD) tem sido proposta como um modelo de ataque de pânico. Por outro lado, estudos clínicos e epidemiológicos sugerem que a ansiedade de separação da infância (ASI) predispõe o indivíduo ao desenvolvimento do pânico e da depressão. As bases moleculares destes efeitos ainda são desconhecidas. Nesse sentido, o presente estudo avaliou os níveis de 5-HT e a expressão dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} e dos neuropeptídeos substância P (SP), Δ FosB, e do fator neurotrófico do cérebro (BDNF) na MCPD de ratos adultos submetidos a dois modelos de ASI: o isolamento social neonatal (ISN) de 3 h diárias nos dias pós-natais 2 a 21 (PN2-PN21) e a privação materna (PM) de 24 h em PN9. Os controles foram filhotes brevemente manipulados por 15 s (BM) ou aqueles criados sem manipulação. Os efeitos do cuidado materno foram avaliados em ratos que foram reunidos a mães conscientes (MC) ou anestesiadas (MA) quando neonatos. Na fase adulta (PN60), os animais foram avaliados em testes de ansiedade e depressão e, em seguida, sacrificados para a coleta da MCPD para análise bioquímica (HPLC) e genômica (rt-PCR). Os efeitos do ISN e da PM foram comparados àqueles do isolamento social adulto (ISA). Neste caso, os animais foram isolados durante 1 (ISA-1) ou 7 dias (ISA-7). Enquanto o peso do adulto foi principalmente reduzido no ISN, a anedonia foi observada apenas na PM (MA ou MC) e BM-MA (ISN e PM). A ansiedade foi reduzida no grupo ISN. Embora a expressão de 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, SP, Δ FosB e BDNF não tenha alterado, os níveis de 5-HT aumentaram acentuadamente na MCPD dos grupos ISN e BM. Em contraste, o ISA aumentou a expressão tanto de SP (grupos ISA-1 e ISA-7) quanto do BDNF (grupo ISA-7). Estes resultados sugerem que o aumento da expressão de SP e BDNF na MCPD pode ser um marcador molecular apenas para o ISA.

Palavras-chave: pânico; isolamento social; serotonina; SP; Δ FosB; BDNF.

ABSTRACT

ROSA, CA. Genomic expression of serotonergic receptors and neuropeptides of dorsal periaqueductal gray matter of rats subjected to neonatal and adult social isolation. PhD Thesis, Post-Graduate Program in Physiological Sciences, Federal University of Espírito Santo, Vitória-ES, 2020. The defensive responses to electrical stimulation of dorsal periaqueductal gray matter (DPAG) have been proposed as a model of panic attacks. In turn, clinical and epidemiological studies suggest that childhood separation anxiety (CSA) predisposes individuals to the development of both panic and depression. The molecular basis of these effects are nevertheless completely unknown. Accordingly, here we evaluated the DPAG 5-HT levels and the expression of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} serotonin receptors and the neuropeptides Δ FosB, substance P (SP) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in adult rats which were subjected to two models of CSA, namely, 3-h daily neonatal social isolation (NSI) from postnatal days 2 to 21 (PN2-PN21) and 24-h maternal deprivation (MD) at PN9. Controls were puppies briefly manipulated for 15 s (BH) or those bred without manipulation. The effects of maternal care were also examined in adult rats reunited to mothers either conscious (CM) or anesthetized (AM) when neonates. As adults (PN60), rats were evaluated in anxiety and depression tests and sacrificed for DPAG collection for biochemical (HPLC) and genomic (rt-PCR) analysis. The effects of neonatal isolation were further compared to those of the adult social isolation (ASI) for 1 (ASI-1) or 7 (ASI-7) days. While adult weight was reduced mainly in NSI, an anhedonia was observed only in MD (AM or CM) and BH-AM (NSI and MD). Anxiety was reduced in the NSI group. Although expression of 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, SP, Δ FosB and BDNF did not change, 5-HT levels increased markedly in DPAG of NSI and BH groups. In contrast, the ASI produced significant increase in both SP (ASI-1 and ASI-7 groups) and BDNF (ISA-7 group). These results suggest that DPAG increased expression of SP and BDNF is a marker of ASI only.

Keywords: panic; social isolation; serotonin; SP; Δ FosB; BDNF.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO

Figura 1. A aproximação da ameaça desloca a atividade neural do prosencéfalo para o mesencéfalo.....	24
Figura 2. Organização colunar rostro-caudal da MCPA.....	26
Figura 3. Via de síntese e degradação da 5-HT.....	29
Figura 4. Neurotransmissão serotoninérgica.	30
Figura 5. Classificação dos receptores serotoninérgicos.	31
Figura 6. O presumível papel da 5-HT e noradrenalina (NE) no modelo de punição de Wise e colaboradores (1973).	32
Figura 7. Labirinto-em-T-elevado (LTE) e Labirinto-em-cruz-elevado (LCE).	34
Figura 8. Modelo da hipótese de Deakin e Graeff no cérebro de rato.....	38
Figura 9. Estruturas primárias da cadeia de aminoácidos das neurocininas.....	40
Figura 10. Origem das neurocininas e de seus precursores em mamíferos.	41
Figura 11. Distribuição da serotonina (5-HT, esquerda) e da substância P (SP, direita) numa seção coronal do mesencéfalo do rato.....	44
Figura 12. Expressão do BDNF.....	47
Figura 13. Vias de sinalização do BDNF.....	48
Figura 14. Mecanismo de ação do uso crônico de antidepressivos.	52
Figura 15. Efeito celular e molecular do mecanismo de ação do uso de antidepressivos e a patofisiologia de transtornos relacionados ao estresse na região do hipocampo.....	53
Figura 16. Bases bioquímicas da estabilidade da proteína Δ FosB.....	54
Figura 17. Estudos longitudinais da comorbidade do transtorno do pânico e depressão.....	57
Figura 18. A modificação epigenética do DNA.	68
Figura 19. Comportamento de <i>rough-and-tumble play</i> (pega-pega).	71

ESTUDO I

- Figura 20. Fatiador de cérebro e limites da região da qual foram coletadas as seções da MCPA (escala em milímetros)..... 120
- Figura 21. Procedimento de picotagem (*punching*) das regiões da MCPA..... 120
- Figura 22. Representação esquemática dos grupos experimentais e os números dos dados amostrais..... 122
- Figura 23. Eletroforese do RNA extraído em gel de agarose..... 123
- Figura 24. Efeitos do ISN, da PM e da atenção materna durante a reunião do filhote separado à ninhada, sobre o peso do rato adulto.. 126
- Figura 25. Efeitos do ISN e da atenção materna durante a reunião do filhote separado à ninhada, sobre o comportamento do rato adulto no campo aberto (CA). 127
- Figura 26. Efeitos da PM e da atenção materna durante a reunião do filhote separado à ninhada, sobre o comportamento do rato adulto no campo aberto (CA). 127
- Figura 27. Efeitos do ISN e da atenção materna durante a reunião do filhote separado à ninhada, sobre o comportamento do rato adulto no labirinto-em-cruz elevado (LCE). 127
- Figura 28. Efeitos da PM e da atenção materna durante a reunião do filhote separado à ninhada, sobre o comportamento do rato adulto no no labirinto-em-cruz elevado (LCE). 127
- Figura 29. Efeitos do ISN, da PM e da atenção materna durante a reunião do filhote separado à ninhada, no consumo percentual por sacarose do rato adulto. 129
- Figura 30. Efeitos do ISN, da PM e da atenção materna durante a reunião do filhote separado à ninhada, sobre a preferência por sacarose dos ratos adultos. 129
- Figura 31. Concentrações de 5-HT, 5-HIAA e 5-HIAA/5-HT, das regiões dorsal e ventral da matéria cinzenta periaquedutal de ratos virgens (VRG), brevemente manipulados (BM) e ratos submetidos ao isolamento social neonatal (ISN) de 3 h diárias de PN2-PN21..... 131
- Figura 32. Expressão relativa do RNAm dos receptores 5-HT_{1A} (esquerda) e 5-HT_{2A} (direita) de ratos submetidos ao ISN de 3 h diárias por 20 dias ou à PM de 24 h no 9º dia pós-natal, reunidos a mães conscientes ou anestesiadas. 132
- Figura 33. Expressão relativa do RNAm do BDNF, Δ FosB e da SP de ratos submetidos ao ISN de 3 h diárias por 20 dias ou à PM de 24 h no 9º dia pós-natal, reunidos a mães conscientes ou anestesiadas. 133

Figura 34. Correlações entre a expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$) de BDNF (acima) ou do $\Delta FosB$ (abaixo) com as da SP (esquerda) ou dos receptores 5-HT _{1A} e 5-HT _{2A} da MCPA de ratos adultos virgens, brevemente manipulados e submetidos à PM ou ISN	134
Figura 35. Correlações entre a expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$) de BDNF da MCPD dos grupos ISN (acima) e PM (abaixo) com as da SP (esquerda) ou dos receptores 5-HT _{1A} (centro) e 5-HT _{2A} (direita)	135
Figura 36. Fatores principais e respectiva rotação ortogonal (Varimax) da expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$) dos receptores serotoninérgicos 5-HT _{1A} e 5HT _{2A} e dos neuropeptídeos SP e $\Delta FosB$	137
Figura 37. Comparação dos efeitos do tipo de separação materna (ISN vs PM), da duração da separação (3h vs 24h) e do cuidado materno no momento da reunião (MC vs MA) no peso do rato adulto.....	139

ESTUDO II

Figura 38. Expressão relativa do RNAm dos receptores 5HT _{1A} , 5HT _{2A} e 5HT _{2C} e dos neuropeptídeos SP, BDNF e $\Delta FosB$ de ratos submetidos ao isolamento social adulto de 1 (ISA-1) ou 7 dias (ISA-7), e respectivos controles (VRG).....	173
Figura 39. Correlações entre a expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$) de BDNF com aquelas da SP e dos receptores 5-HT _{1A} , 5-HT _{2A} e 5-HT _{2C} da MCPD dos ratos isolados e dos controles.....	174
Figura 40. Correlações entre a expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$) de $\Delta FosB$ com aquelas da SP e dos receptores 5-HT _{1A} , 5-HT _{2A} e 5-HT _{2C} da MCPD dos ratos isolados e dos controles.....	175

LISTA DE TABELAS

REVISÃO

Tabela 1. Isomorfismo dos ataques de pânico e das respostas induzidas por estimulação da MCPD em homens e ratos27

ESTUDO I

Tabela 2. Grupos utilizados para ensaios bioquímicos dos níveis tissulares de 5-HT e 5-HIAA117

Tabela 3. Grupos utilizados para ensaios da expressão de receptores serotoninérgicos e de neuropeptídeos117

Tabela 4. Sequência dos iniciadores (*primers*) da Exxtend Biotecnologia, Paulínia, Brasil utilizados na rt-PCR.....124

Tabela 5. Efeitos da separação e da atenção maternas no teste de preferência por sacarose (TPS).128

Tabela 6. Concentrações de 5-HT, 5-HIAA, 5-HIAA/5-HT, das regiões dorsal e ventral da MCPA de ratos virgens (VRG), brevemente manipulados quando neonatos (BM) e ratos submetidos ao isolamento social neonatal (ISN) de 3 h diárias de PN2-PN21.130

Tabela 7. Análise de componente principal da expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$) dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} e dos neuropeptídeos SP, BDNF, Δ FosB da matéria cinzenta periaquedutal de ratos virgens, brevemente manipulados e ratos submetidos à PM e ISN.....136

Tabela 8. Análise de fator principal da expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$) dos neuropeptídeos (SP, BDNF, Δ FosB) e dos receptores serotoninérgicos (5-HT_{1A}, 5-HT_{2A})......136

ESTUDO II

Tabela 9. Sequência dos iniciadores (*primers*) da Exxtend Biotecnologia, Paulínia, Brasil utilizados na rt-PCR.....172

LISTA DE SIGLAS

%CS – Consumo percentual de sacarose	LTE - Labirinto-em-T elevado
5-HT - Serotonina	MA - Mãe anestesiada
5-HIAA - Ácido 5-hidroxi-indolacético	MC - Mãe consciente
8-OH-DPAT - 8-hidroxi-2- (N, N-dipropilamino) tetralina	MCPA - Matéria cinzenta periaquedutal
ACTH - Corticotrofina	MCPD - Matéria cinzenta periaquedutal dorsal
AP - Ataque de Pânico	MCPAdm - Matéria cinzenta periaquedutal dorsomedial
ANOVA – Análise de variância	MCPAdI - Matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral
APA - Associação Psiquiátrica Americana	MCPAl - Matéria cinzenta periaquedutal lateral
ASI - Ansiedade de separação na infância	MCPV - Matéria cinzenta periaquedutal ventral
BHE - Barreira hematoencefálica	MCPAvI - Matéria cinzenta periaquedutal ventrolateral
BDNF - Fator neurotrófico derivado do cérebro	MCPAvI_c - Matéria cinzenta periaquedutal caudoventrolateral
BDZ - Benzodiazepínicos	MCPAlr - Matéria cinzenta periaquedutal rostrolateral
BM - Brevemente manipulados	mCPP - 1- (<i>m</i> -clorofenil) piperazina diidrocloreto
BS - Brevemente separados	NDR - Núcleo dorsal da rafe
CA – Campo aberto	NMR - Núcleo mediano da rafe
CCK - Colecistocinina	NOS - Sintase do Óxido Nítrico
CCK-4 - Colecistocinina (tetrapeptídeo)	OMS – Organização Mundial de Saúde
CCK-8s - Colecistocinina (octapeptídeo sulfatado)	PM - Privação materna
CPF - Córtex pré-frontal	PN - Pós-natal
CORT - Corticosterona	PPS – Preferência por sacarose
CRH - Hormônio liberador de corticotrofina	RNA_m - Ácido ribonucleico mensageiro
DOI - 2,5-dimetoxi-4-iodoanfetamina	SERT - Transportador de serotonina
DM - Depressão Maior	SM - Separação materna
DSM - Manual de Estatística e Diagnóstico da Sociedade Americana de Psiquiatria	SP - Substância P
EBA – Entrada no braço aberto	SPECT - Tomografia computadorizada por emissão de fóton
EBF – Entrada no braço fechado	TAG - Transtorno de ansiedade generalizada
GABA - Ácido gama-aminobutírico	TBA – Tempo no braço aberto
HDG - Hipótese Deakin & Graeff	TBF – Tempo no braço fechado
HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	TPC – Tempo na plataforma central
HPA - Hipotálamo-pituitária-adrenal	TEP - Tomografia por emissão positrônica
ICV – Intracerebroventricular	TNF – Teste de Natação Forçada
ISA-1 - Isolamento social adulto por 1 dia	TPH₂ - Triptofano hidroxilase 2
ISA-7 - Isolamento social adulto por 7 dias	TP - Transtorno do pânico
IP - Intraperitoneal	TPS – Teste de preferência à sacarose
ISN - Isolamento social neonatal	VRG - Virgens
ISRS - Inibidor seletivo da recaptura de serotonina	
LCE - Labirinto-em-cruz elevado	

SUMÁRIO

1. REVISÃO: EFEITOS DO ISOLAMENTO SOCIAL NA INFÂNCIA E NA FASE ADULTA NOS TRANSTORNOS DE ANSIEDADE	19
1.1 OS TRANSTORNOS DE ANSIEDADE	19
1.2 O TRANSTORNO DO PÂNICO	21
1.3 O PAPEL DA MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL NO TRANSTORNO DO PÂNICO.....	24
1.4 A SEROTONINA E SEU PAPEL NOS TRANSTORNOS DE ANSIEDADE	28
1.5 A SUBSTÂNCIA P E SEU PAPEL NOS TRANSTORNOS DE ANSIEDADE	39
1.6 O BDNF E SEU PAPEL NOS TRANSTORNOS DE ANSIEDADE.....	46
1.7 A Δ FosB E SEU PAPEL NOS TRANSTORNOS DE ANSIEDADE	53
1.8 COMORBIDADE DO PÂNICO COM OUTROS TRANSTORNOS PSIQUIÁTRICOS.....	56
1.9 MECANISMOS NEUROMOLECULARES DA SEPARAÇÃO MATERNA NEONATAL.....	62
2.0 O ISOLAMENTO SOCIAL ADULTO E SEUS EFEITOS NEUROBIOLÓGICOS	68
2. REFERÊNCIAS	72
3. OBJETIVOS.....	107
3.1 OBJETIVO GERAL	107
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	108
4. ESTUDO I.....	109
4.1 INTRODUÇÃO	112
4.2 OBJETIVO	115
4.3 METODOLOGIA	115
4.3.1 Animais	115
4.3.2 Protocolos experimentais.....	116
4.3.3 Testes comportamentais.....	118
4.3.4 Ensaios bioquímicos	119
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	124
4.5 RESULTADOS.....	125
4.5.1 Efeitos Comportamentais.....	125
4.5.2 Efeitos Bioquímicos	130
4.6 DISCUSSÃO	137
4.7 CONCLUSÕES.....	149
4.8 REFERÊNCIAS.....	150
5. ESTUDO II.....	163

5.1 INTRODUÇÃO	165
5.2 OBJETIVO	168
5.3 METODOLOGIA	168
5.3.1 Animais	168
5.3.2 Protocolos experimentais.....	169
5.3.3 Ensaio bioquímico	169
5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	172
5.5 RESULTADOS.....	173
5.6 DISCUSSÃO	175
5.7 CONCLUSÕES	181
5.8 REFERÊNCIAS.....	181
6. APÊNDICES	192
Apêndice A – Protocolo de dosagem de serotonina na HPLC.....	192
Apêndice B – Protocolo de extração de RNA	196
Apêndice C – Protocolo de eletroforese de RNA em gel de agarose	198
Apêndice D - Protocolo de síntese de cDNA (rt-PCR)	200

1. REVISÃO

EFEITOS DO ISOLAMENTO SOCIAL NA INFÂNCIA E NA FASE ADULTA NOS TRANSTORNOS DE ANSIEDADE

1.1 OS TRANSTORNOS DE ANSIEDADE

Os transtornos de ansiedade foram primeiramente classificados nos estudos pioneiros de Sigmund Freud (1896) sobre as “neuroses de ansiedade” (*Angstneurose*). Freud distinguiu estes transtornos da depressão maior (melancolia) e de uma ampla gama de condições psiquiátricas denominadas à época de “neurastenias”. De fato, em escritos tão precoces quanto os “Estudos Seleccionados sobre a Histeria” (1896), Freud já distinguia duas síndromes fundamentais de ansiedade, quais sejam, a “expectativa ansiosa” (*ängstliche Erwartung*), que ele considerava a forma predominante do transtorno de ansiedade, e uma síndrome menos frequente, porém igualmente importante, que ele denominou “ataque de ansiedade” (*Angstanfall*). De acordo com suas descrições, a expectativa ansiosa consistia num “*quantum de ansiedade livre e flutuante que controlava a escolha de idéias por antecipação*”. Em contraste, nos ataques de ansiedade a “*ansiedade irrompia repentinamente na consciência sem ter sido eliciada por qualquer idéia*”. Freud ressaltou que estes ataques podiam manifestar-se tanto como “*um sentimento puro de ansiedade*” quanto pela combinação da ansiedade com “*a interpretação mais próxima do término na vida, tal como a idéia de morte súbita ou da perda da razão*” ou combinados à “*alguma parestesia*” . . . [ou ao] *distúrbio de uma ou mais funções somáticas, tais como a respiração, atividade cardíaca, inervação vasomotora e atividade glandular*”. Eventualmente, Freud distinguiu estes ataques das fobias, do transtorno obsessivo-compulsivo (neurose obsessiva) e transtorno do estresse pós-traumático (neurose comum), dentre outras condições. Suas descrições clínicas de “expectativa ansiosa” e “ataque de ansiedade” são bastante similares aos diagnósticos atuais do transtorno de ansiedade generalizada (TAG) e transtorno no pânico (TP), respectivamente (APA, 2000).

Presumivelmente, a herança clínica de Freud foi em grande medida esquecida após o divórcio profundo entre a psicanálise e a medicina. Assim,

enquanto os transtornos de ansiedade continuaram a ser diagnosticados como neurastenias até meados do século passado, o TP recebeu uma variedade enorme de nomes, incluindo neurose da ansiedade, reação de ansiedade, neurastenia, astenia neurocirculatória, neurose vasomotora, taquicardia nervosa, síndrome de esforço, síndrome de Da Costa, coração de soldado e coração irritável, entre outros (Pitts e McClure, 1967). Este cenário começou a se alterar após a publicação do estudo influente de Donald Klein (1964) mostrando que o TAG e o TP respondiam a classes diferentes de drogas. Klein mostrou que enquanto a “*expectativa ansiosa*” era tratável por ansiolíticos (barbitúricos, meprobamato e clordiazepóxido) e doses baixas de sedativos (fenotiazinas), os ataques de pânico eram tratáveis pela administração crônica do antidepressivo tricíclico imipramina.

Atualmente, o critério diagnóstico do TAG é definido como ansiedade e preocupação excessivas (expectativa apreensiva), ocorrendo em mais dias do que os dias em que não ocorreu, por pelo menos 6 meses, sobre um número de eventos ou atividades (como trabalho ou desempenho escolar) e com dificuldade em controlar uma situação. A ansiedade e a preocupação devem estar associadas a três (ou mais) dos seis sintomas seguintes: inquietação ou sensação de estar tenso ou no limite; sensação de se sentir facilmente fadigado; dificuldade de se concentrar ou ter “mente em branco”; irritabilidade; tensão muscular e distúrbios no sono (APA, 2013).

Os distúrbios de ansiedade estão entre os problemas mais prevalentes de saúde mental em humanos. Nos Estados Unidos, a prevalência do TAG é de 0,9% entre os adolescentes e 2,9% entre os adultos. Em outros países, varia entre 0,4 a 3,6% (APA, 2013). Com relação ao Brasil, no relatório mais recente emitido pela Organização Mundial da Saúde (OMS), os transtornos de ansiedade estão presentes em 9,3% da população, possuindo o maior número de casos de ansiedade entre todos os países do mundo, enquanto a prevalência da depressão é de 5,8% (OMS, 2017). Os modelos experimentais de ansiedade (condicionamento clássico, teste de Vogel, labirinto em cruz elevado, etc) possibilitam tanto a reprodução de aspectos da ansiedade humana quanto o estudo de possíveis tratamentos para esse distúrbio (Brandão *et al.*, 2008). Esses modelos também contribuem para elucidar a participação de diferentes estruturas encefálicas e

mecanismos neuroquímicos envolvidos na mediação das respostas defensivas (Brandão *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2005).

1.2 O TRANSTORNO DO PÂNICO

A prevalência do transtorno do pânico (TP) varia entre 1,2% e 4% da população, mas tem uma incidência 2 ou 3 vezes maior no sexo feminino e pode atingir entre 8% e 14% dos indivíduos com 30 anos de idade (Angst e Wicki, 1993). O elemento central do TP é a presença de ataques de pânico (AP) recorrentes caracterizados por episódios agudos de medo, desconforto intenso ou sensação similar e respostas viscerais acentuadas, que ocorrem na ausência de qualquer ameaça identificável. Seus principais sintomas são dispnéia (desconforto respiratório), sensação de sufocamento, taquicardia, dor torácica, suor, vertigem, tremores, desejo de fuga da situação imediata e medo de morrer ou de ficar louco (Goetz *et al.*, 1994).

Atualmente, o TP é considerado como uma síndrome distinta tanto do TAG quanto dos demais transtornos de ansiedade. Em realidade, o TP é uma síndrome tripartite caracterizada pela ocorrência de 1) ataques espontâneos de pânico, 2) ansiedade antecipatória e 3) esquiva fóbica ou agorafobia. De fato, os pacientes de TP queixam-se frequentemente de 'ansiedade antecipatória', isto é, o temor de desamparo na eventualidade de um ataque de pânico, condição que pode agravar-se em agorafobia incapacitante e uma vida de total enclausuramento. Notavelmente alguns pacientes desenvolvem agorafobia após um único ataque de pânico. Como consequência, uma parte considerável dos portadores da síndrome do pânico para de trabalhar ou até mesmo perde o emprego devido à queda de desempenho (APA, 1980).

Contudo, agorafobia é um termo incorreto uma vez que os pacientes não têm medo de locais públicos, mas da falta de amparo na eventualidade de um AP nos locais públicos. Os AP e a ansiedade antecipatória parecem ser devidos a mecanismos relativamente independentes, uma vez que apresentam cursos distintos à terapia com antidepressivos (Klein, 1964). De fato, muito freqüentemente a ansiedade antecipatória continua se manifestando mesmo após o desaparecimento

completo dos AP. Conseqüentemente, o desenvolvimento da ansiedade antecipatória tem sido um complicador adicional dos estudos clínicos sobre os mecanismos neurais dos AP propriamente ditos (Graeff *et al.*, 2005). O outro complicador consiste na alta comorbidade do TP com outras condições psiquiátricas, principalmente, transtornos depressivos e fobias (Angst e Wicki, 1993). Estas dificuldades têm ensejado o desenvolvimento de modelos de AP e TP em animais, nos quais estes fatores podem ser controlados separadamente. Os critérios operacionais para a definição dos AP e agorafobia foram estabelecidos a partir do DSM-III (APA, 1980). Neste, o TP é definido como a ocorrência de 4 ataques espontâneos em 4 semanas, ou 1 ataque seguido pelo receio de novos ataques ao longo de 4 semanas.

Em 1967, Pitts e McClure demonstraram que os AP tinham “marcadores fisiológicos”, uma vez que eles podiam ser precipitados pela infusão endovenosa de lactato de sódio (LAC) em pacientes predispostos, mas não em voluntários normais. Na realidade, Cohen e White (1951) já haviam mostrado que os AP podiam ser precipitados por hiperventilação a 5% de dióxido de carbono (CO₂), mas não no exercício ou no ar ambiente (Klein, 1993). Estudos posteriores forneceram provas numerosas das propriedades panicogênicas do LAC e CO₂, bem como de outros agentes (Graeff *et al.*, 2005). Posteriormente, mostrou-se que a ioimbina, um antagonista alfa-2 adrenérgico, também induz pânico em mais de dois terços dos pacientes de TP (Charney *et al.*, 1984). Contudo, a infusão de ioimbina também provocou o aumento da ansiedade em pessoas normais, tal como ocorre com a cafeína, colecistocinina (CCK) e vários panicógenos (Klein, 1993). A existência de marcadores fisiológicos e tratamentos específicos do TP sugeriram que os AP sejam disparos errôneos de algum circuito cerebral. Não obstante, o TP somente seria incluído como uma síndrome independente de ansiedade na 3ª edição do Manual de Diagnóstico e Estatística da Associação Psiquiátrica Americana (APA, 1980), quase um século após as observações pioneiras de Freud (1895).

Estudos clínicos e epidemiológicos sugerem, no entanto, que existam 2 tipos de pânico, “respiratório” ou “não-respiratório”, dependendo da proeminência dos sintomas respiratórios (Roberson-Nay *et al.*, 2012b). Em particular, Klein (1993) sugeriu que os AP da clínica sejam especificamente associados a um alarme falso

de sufocamento (*suffocation false alarm*) uma vez que são precipitados por infusão de LAC (0,5 M) ou pela inalação de concentrações baixas (5-7%) de dióxido de carbono (CO₂), os principais metabólitos da respiração. Klein (1993) argumenta que a teoria do “alarme falso de sufocamento” (AFS) é uma explicação consistente da redução dos AP durante a gravidez, parto e lactação e, contrariamente, do seu aumento no transtorno disfórico da fase lútea tardia (tensão pré-menstrual), situações em que há aumentos ou reduções da respiração paralelamente às alterações na secreção de progesterona (Klein, 1993). A teoria do AFS também é compatível com a alta comorbidade do pânico com doenças respiratórias presentes e antecedentes (Shavitt *et al.*, 1992; Preter and Klein, 2008). Por fim, Klein (1993) sugere que os AP induzidos por 7% de CO₂ e 0,5 M de LAC são como os melhores modelos do pânico clínico, pois não são precipitados em sujeitos saudáveis (Pitts e McClure, 1967; Klein, 1993), pacientes obsessivos (como citado por Griez e Schruers, 1998) ou com fobia social (Liebowitz *et al.*, 1985). Adicionalmente, enquanto o tratamento crônico com imipramina bloqueia o pânico produzido por CO₂ e LAC (Rifkin *et al.*, 1981; Liebowitz *et al.*, 1984; Woods *et al.*, 1990; Yeragani *et al.*, 1988), ele é ineficaz no pânico induzido por β -carbolina ou ioimbina (Dorow *et al.*, 1983; Klein, 1993).

Por sua vez, o pânico do tipo não-respiratório seria mais parecido a um alarme falso a ameaças próximas ou iminentes (Deakin e Graeff, 1991). Em particular, os estudos etológicos de Blanchard e colaboradores (1986) sobre as estratégias de defesa de ratos selvagens a diferentes tipos de ameaças predatórias sugerem que existem três níveis de defesa. O primeiro nível seria caracterizado pelas respostas a uma ameaça potencial, a uma situação inédita que possa envolver algum tipo de perigo, ou a uma situação onde o animal vivenciou alguma ameaça no passado. Nestas circunstâncias, o rato apresenta uma exploração cautelosa do ambiente (*risk assessment*). No segundo nível, o rato já identificou o predador, porém este se encontra a uma distância maior que um limite crítico. Neste caso, o rato apresenta inibição comportamental, culminando em imobilidade tensa ou “congelamento”. Finalmente, no terceiro nível de defesa, o predador se encontra a uma distância inferior ao limite crítico ou já estabeleceu contato com a presa, a qual reage com ataque ou fuga (Graeff, 2003). O terceiro nível seria associado ao pânico não-respiratório (Fig. 1). Contudo, é importante notar que os

pacientes de pânico não são particularmente agressivos (“irritáveis”), nem durante os ataques, nem durante a remissão. De fato, a análise da irritabilidade de 374 pares de gêmeos de 9 a 14 anos de idade mostrou que não há nenhuma correlação entre as predisposições genéticas ao pânico e irritabilidade (Rappaport *et al.*, 2018).

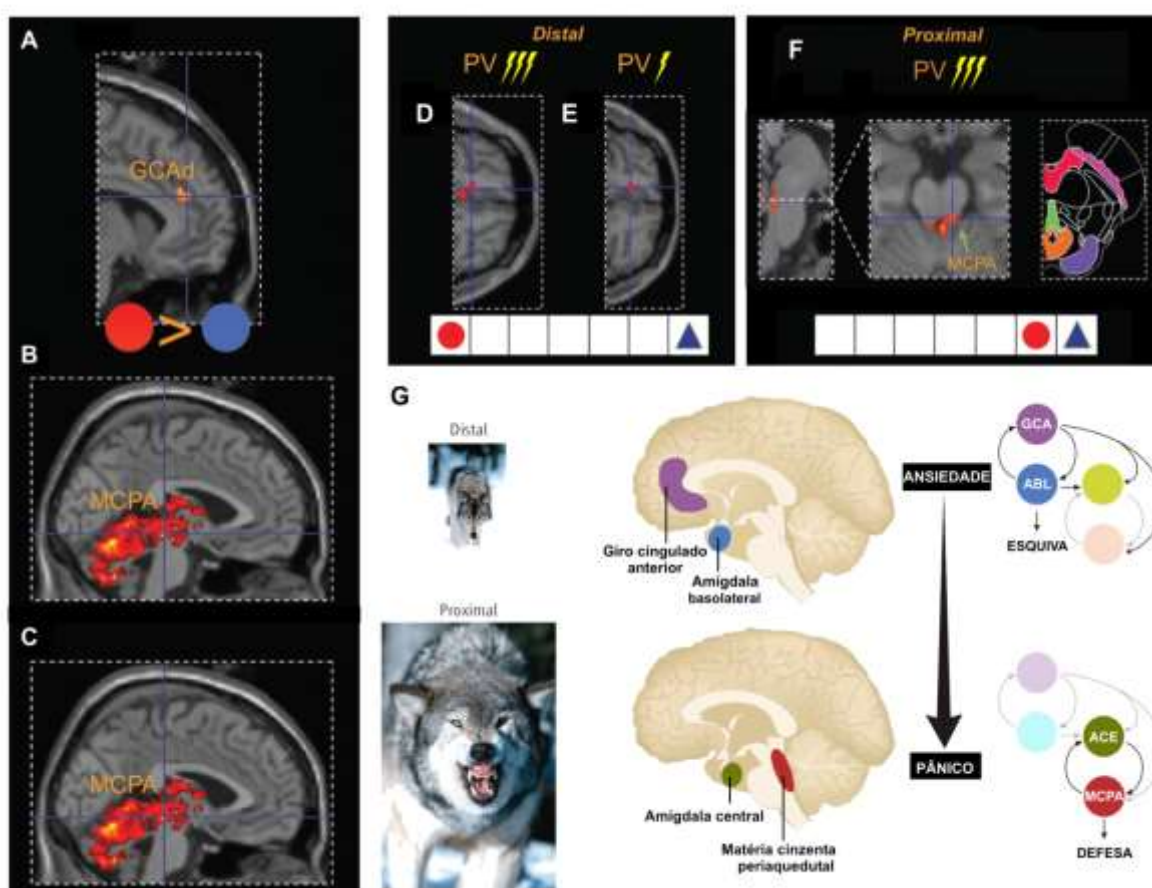


Figura 1. A aproximação da ameaça desloca a atividade neural do prosencéfalo para o mesencéfalo. A-B, Diferenças entre as atividades neurais da região dorsal do giro cingulado anterior (A, GCAAd) e matéria cinzenta periaquedutal (B, MCPA) às pistas de neutralidade (círculo azul) ou da presença de um predador virtual (PV, círculo vermelho) que podia desferir 1 ou 3 choques ao participante. **C,** diferença entre as ativações da MCPA durante a caça ou movimentos controles, **D-E,** ativações do GCAAd a um PV distante capaz de desferir choques leves ou intensos. **F,** ativação da MCPA na iminência da captura (modificado de Mobbs *et al.*, 2007). **G,** à medida que o predador se aproxima, a atividade cerebral desloca-se das regiões do prosencéfalo envolvidas com a avaliação da ameaça e tomada de decisão para regiões mesencéfálicas envolvidas com a resposta de fuga (modificado de Maren, 2007). Outras abreviações: CPMf, córtex pré-frontal medial.

1.3 O PAPEL DA MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL NO TRANSTORNO DO PÂNICO

A matéria cinzenta periaquedutal (MCPA) é uma estrutura importante da

região mesencefálica do cérebro de mamíferos. A aparência indiferenciada dessa estrutura e sua relativa estabilidade evolutiva sugerem que ela esteja envolvida em funções importantes de proteção e na regulação homeostática (Carrive, 1993).

Informações ascendentes e descendentes convergem na MCPA. Esta região recebe aferências diretas da medula espinhal e do núcleo do trigêmeo, o que indica um papel no processamento de estímulos somatossensoriais, provavelmente de natureza nociceptiva. Além disso, esta estrutura está conectada a uma série de regiões prosencefálicas que estão relacionadas ao comportamento emocional, como por exemplo, o córtex orbitofrontal medial, amígdala, núcleo do leito da estria terminal e hipotálamo. Tais conexões sugerem que a MCPA participe na expressão dos estados emocionais. De fato, estudos neurofuncionais apontaram o envolvimento da mesma na analgesia e no comportamento defensivo (Carrive, 1993).

A MCPA é organizada em colunas morfofuncionais dispostas ao longo do aqueduto, quais sejam, colunas dorsomedial (MCPAdm), dorsolateral (MCPAdl), lateral (MCPAl) e ventrolateral (MCPAvl) (Fig. 2). A marcação neuronal pela imunoreatividade da enzima sintase do óxido nítrico (NOS) delimita a coluna dorsolateral da MCPA. Em níveis mais caudais, quando a MCPA assume uma forma trapezoidal, a população de neurônios sensíveis a NOS se torna mais reduzida, dando espaço para a coluna lateral (Onstott *et al.*, 1993). A distinção entre as colunas lateral e ventrolateral é baseada em observações fisiológicas e comportamentais: enquanto a ativação dos neurônios laterais aumenta a atividade autonômica (simpática) e somatomotora, a ativação dos neurônios da coluna ventrolateral proporciona uma resposta inversa (Bandler *et al.*, 1991; Carrive, 1993; Morgan e Carrive, 2001). Embora não seja considerado como parte intrínseca da MCPA, o núcleo dorsal da rafe (NDR) situa-se na região ventromedial ao aqueduto e origina um grande contingente de projeções serotoninérgicas ascendentes tanto para a MCPA e amígdala, quanto para amplas áreas do prosencéfalo, incluindo o estriado e córtex prefrontal (Kosofsky and Molliver, 1987).

Dentre vários modelos concorrentes, as respostas produzidas por estimulações elétricas ou químicas da matéria cinzenta periaquedotal (MCPA) têm sido propostas como um modelo de AP (Gentil, 1988; Jenck *et al.*, 1995; Deakin and Graeff, 1991;

Canteras e Graeff, 2014; Schenberg *et al.*, 2001, 2014). De fato, Nashold e colaboradores (1969) mostraram que a estimulação da MCPA de voluntários produz sintomas que reproduzem os AP (Tabela 1). O raio-X dos eletrodos mostrou que estes se situavam na metade dorsal da MCPA (MCPD), mas não em sua metade ventral (MCPV) ou no tegumento adjacente (Nashold *et al.*, 1969). Estas observações foram apoiadas por tomografia de emissão positrônica (TEP) de AP simulados em voluntários expostos a um predador virtual (Mobbs *et al.*, 2007) ou em AP reais induzidos por infusão endovenosa de lactato de sódio (LAC) em pacientes predispostos (Reiman *et al.*, 1989).

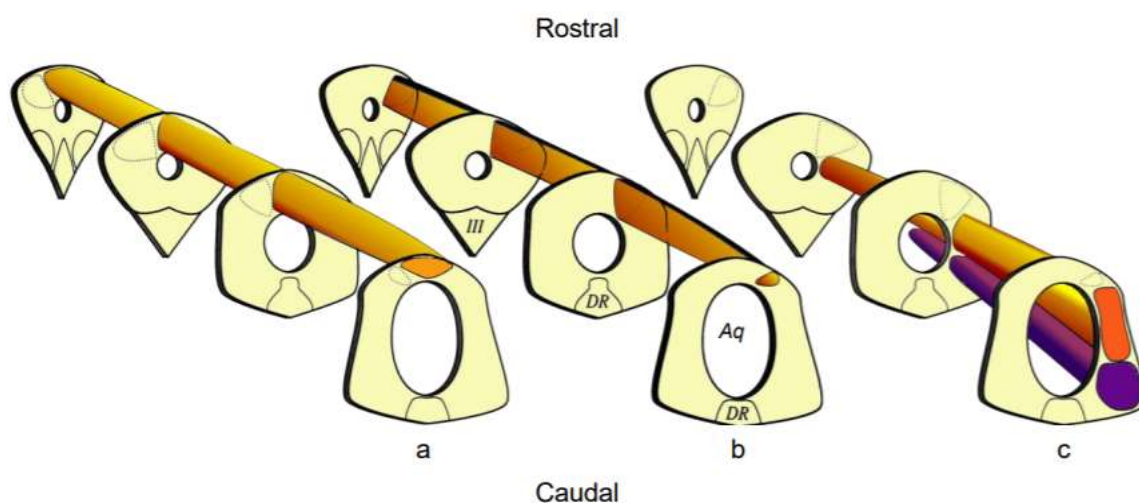


Figura 2. Organização colunar rostro-caudal da MCPA. As figuras ilustram as colunas: (a) dorsomedial, (b) dorsolateral, (c) lateral (coluna superior) e ventrolateral (coluna inferior). Aq, aqueduto cerebral; DR, núcleo dorsal da raia; III, núcleo óculo-motor.

Em ratos, a estimulação da MCPD produz reações de “congelamento” (imobilidade tensa e exoftalmia) e fuga (trote, galopes e saltos) acompanhadas de respostas cardiovasculares e respiratórias e, menos freqüentemente, micção e defecação (Schenberg *et al.*, 1993; Bittencourt *et al.*, 2004). Mais importante, os galopes induzidos pela estimulação da MCPD do rato foram atenuados por pânicolíticos (fluoxetina e clomipramina) em doses e regimes similares aos empregados na terapia do TP (Schenberg *et al.*, 2001, 2002, Vargas *et al.* 2001). Estes e outros resultados sugerem que a MCPD seja o melhor candidato ao substrato neural dos AP.

Ainda que indiretamente, o envolvimento da MCPD nos AP também foi apoiado pela provocação de AP pela inalação de um volume corrente de CO₂ 35%

por pacientes com doença de Urbach-Wiethe que não têm memória de experiências de medo devido à calcificação bilateral da amígdala (Feinstein *et al.*, 2013). As últimas observações indicam que os AP prescindem da amígdala a despeito do seu envolvimento reconhecido no processamento do medo e da ansiedade em humanos e animais. Os AP também se diferenciam do medo ordinário pela ausência de respostas dos “hormônios do estresse” (corticotrofina, glicocorticóides e prolactina) tanto em humanos (Liebowitz *et al.*, 1985; Cameron *et al.*, 1987; Woods *et al.*, 1987, 1988) como em ratos estimulados na MCPD (Schenberg *et al.*, 2008; De Souza Armini *et al.*, 2015).

Tabela 1. Isomorfismo dos ataques de pânico e das respostas induzidas por estimulação da MCPD em homens e ratos (Schenberg *et al.*, 2001).

	AP espontâneos ou induzidos por lactato em homens	Estimulação da MCPD em homens	Estimulação da MCPD em ratos
Sensações/ comportamento	“bloqueio do andar” desejo de fugir intenso desconforto ansiedade grave pânico, terror medo de morte iminente medo de ficar louco medo de perder o controle	n. d. interrupção do estímulo intenso desconforto ansiedade grave pânico, terror “medo de morrer” n. d. n. d.	congelamento fuga aversão n. d. n. d. n. d. n. d. n. d.
Respostas autonômicas	Taquipneia hiperventilação dispneia sensação de asfixia taquicardia hipertensão n. d. sudorese n. d.	taquipneia hiperventilação apneia respiração profunda taquicardia n. d. abertura dos olhos n. d. piloereção	taquipnéia hiperventilação n. o. respiração profunda taquicardia hipertensão exoftalmia n. d. n. o.
Respostas neurológicas/ Parestesias	sensação de tremor dor torácica sensação de calor/frio tonteira n. d. n. d.	sensação de vibração dor precordial sensação de calor/frio n. d. entorpecimento dor facial medial	n. d. n. d. n. d. n. d. n. d. n. d.
Áreas cerebrais estimuladas ou ativadas	MCPD, camadas profundas do colículo superior, amígdala (PET ¹).	MCPD e teto adjacente (0-5mm lateral ao aqueduto) (raio-x).	MCPD, camadas profundas do colículo superior.

¹ Tomografia por emissão positrônica. n. d. dado não disponível; n. o. dado não observado.

Embora a MCPD seja comumente associada ao pânico não-respiratório (Jenck *et al.*, 1995; Deakin, Graeff, 1991; Canteras e Graeff, 2014), resultados recentes de nosso laboratório mostraram que a estimulação seletiva dos quimiorreceptores por doses baixas de cianeto de potássio (KCN) produz

comportamentos defensivos similares àqueles eliciados pela estimulação da MCPD (Schimitel *et al.*, 2012). Mais importante, enquanto a lesão da MCPD bloqueou os comportamentos defensivos ao KCN, a infusão de KCN facilitou os comportamentos defensivos eliciados pela estimulação da MCPD (Schimitel *et al.*, 2012). Por fim, mostramos que as respostas ao KCN são bloqueadas por tratamentos agudos e crônicos com doses clínicas de clonazepam e fluoxetina, respectivamente (Schimitel *et al.*, 2014). Estes resultados sugerem que a MCPD do rato abrigue um sistema de alarme de sufocamento sensível à hipóxia cuja ativação poderia tanto deflagrar um AP “espontâneo” quanto tornar o indivíduo hipersensível ao CO₂ (Schimitel *et al.*, 2012).

Schimitel e colaboradores (2012) sugeriram, adicionalmente, que os AP do tipo respiratório (similar ao medo por sufocamento) e não respiratório (similar ao medo do predador) sejam processados pelas regiões lateral (MCPAl) e dorsolateral (MCPAdl) da MCPA, respectivamente (Fig. 2). Embora os estudos anteriores com imunistoquímica da proteína *c-fos* mostraram ativações da MCPAdl e da MCPAl em ratos que apresentaram reações de fuga a uma hipóxia intensa (O₂ 8%) (Casanova *et al.*, 2013), ativações seletivas dos quimiorreceptores por KCN ativaram apenas as regiões rostralateral (MCPAr) e caudoventrolateral (MCPAcvl). No mesmo sentido, estudos anteriores de marcação anterógrada com leucoaglutinina do *Phaseolus vulgaris* mostraram que o núcleo comissural do trato solitário se projeta majoritariamente para a última área (Hebert e Saper, 1992). Portanto, as ativações da MCPAdl e MCPAl relatadas por Casanova e colaboradores (2013) foram provavelmente devidas à sensibilidade intrínseca dos neurônios periaquedutais à hipóxia tissular (Kramer *et al.*, 1999; Horn *et al.*, 2000).

1.4 A SEROTONINA E SEU PAPEL NOS TRANSTORNOS DE ANSIEDADE

A serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) é um neurotransmissor modulatório amplamente distribuído no sistema nervoso central (SNC). Devido à sua característica hidrofílica, sabe-se que ela não é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) sendo, portanto, totalmente sintetizada no SNC. A síntese da 5-HT ocorre nos neurônios, terminais e varicosidades axonais dos núcleos da rafe do mesencéfalo, ponte e bulbo, a partir do triptofano, um aminoácido essencial

que é capturado do plasma por meio dos transportadores de aminoácidos neutros da BHE (Blundell, 1992). Uma vez capturado, o triptofano é convertido em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) pela ação da enzima triptofano-hidroxilase. Esta enzima é preferencialmente expressa em neurônios serotoninérgicos dos núcleos da rafe (Azmitia, 1999).

A 5-HT é sintetizada a partir do 5-HTP mediante a ação da descarboxilase do aminoácido L-aromático (Eaton e Gudehithlu *et al.*, 1993; Azmitia, 1999). Uma vez sintetizada, a 5-HT é armazenada em vesículas por meio de um processo que envolve bombas de prótons. A despolarização do neurônio promove o influxo do Ca^{2+} em botões e varicosidades axonais, liberando o neurotransmissor na fenda sináptica. A atividade dos neurônios serotoninérgicos é fortemente inibida por auto-receptores 5-HT_{1A} localizados nos dendritos e corpos celulares. O aumento da concentração extracelular de 5-HT também ativa auto-receptores terminais ($5\text{-HT}_{1B/1D}$ pré-sinápticos), os quais inibem a síntese e, portanto, a liberação do neurotransmissor (Raymond *et al.*, 2001) (Fig. 3).

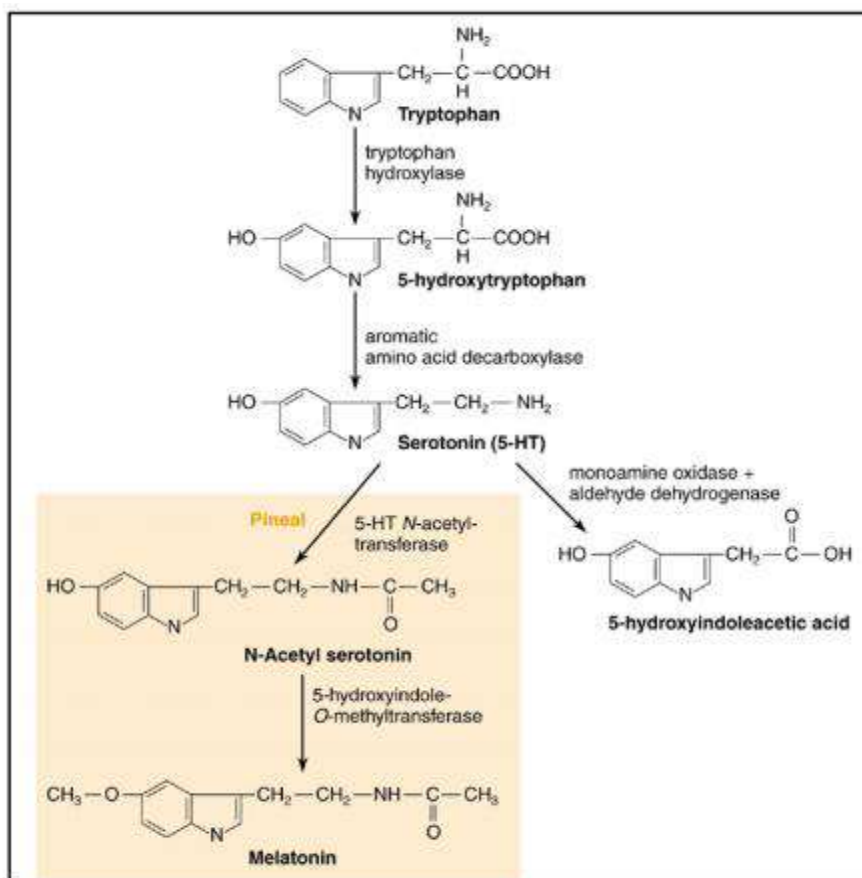


Figura 3. Via de síntese e degradação da 5-HT. No neurônio, o aminoácido triptofano é hidroxilado

pela enzima triptofano hidroxilase se convertendo ao composto 5-hidroxitriptofano, que é substrato da enzima descarboxilase do aminoácido aromático, em serotonina (5-HT). Em seguida, a 5-HT pode ser metabolizada pela monoamina oxidase ao ácido 5-hidroxiindolacético, ou pode ser convertida à melatonina, na glândula pineal, pela ação das enzimas 5-HT-*N*-acetiltransferase e 5-hidroxiindol-*O*-metiltransferase.

O término da ação da 5-HT ocorre por dois processos. O primeiro é a remoção do neurotransmissor por um transportador seletivo de 5-HT (*5-HT transporter*, SERT). Este transportador é uma proteína transmembrânica da família de transportadores de neurotransmissores dependentes de Na^+/Cl^- que é responsável pela recaptura da 5-HT, regulando os níveis do neurotransmissor e sua ação na sinapse, mantendo a homeostasia do sistema (Blakely *et al.*, 1994; Borowsky e Hoffman, 1995). O outro processo é a degradação enzimática pela monoamina oxidase (MAO). Essa enzima encontra-se na membrana das mitocôndrias do terminal pré-sináptico e converte a 5-HT no ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) (Cooper *et al.*, 1991) (Fig. 3 e Fig. 4).

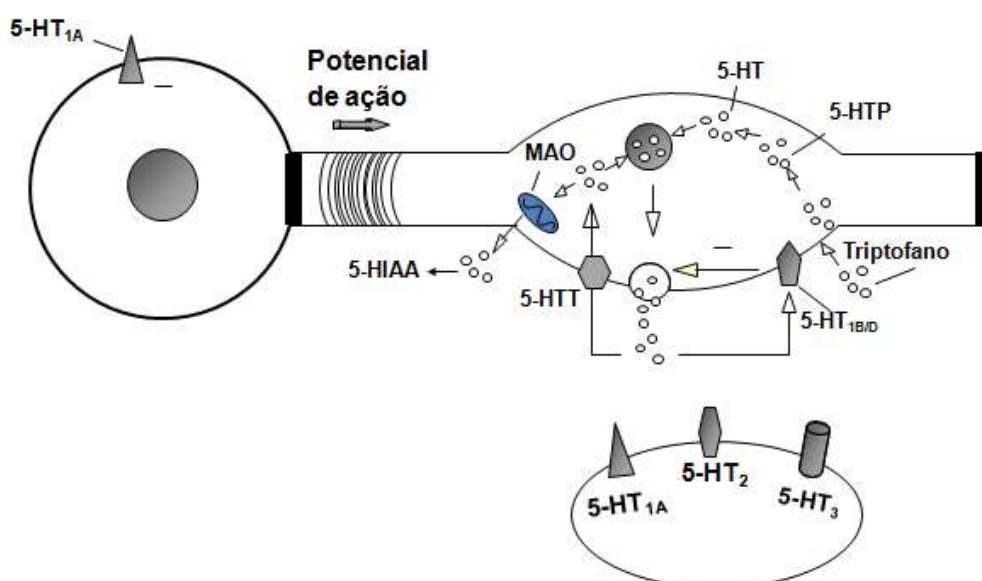


Figura 4. Neurotransmissão serotoninérgica. A serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) é uma indolamina sintetizada a partir do aminoácido L-triptofano. O primeiro passo da síntese é a conversão do L-triptofano em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) pela enzima triptofano-hidroxilase. Em seguida, o 5-HTP é descarboxilado pela triptofano-descarboxilase, gerando a 5-HT que é armazenada nas vesículas sinápticas. Após sua liberação pelo impulso nervoso, a 5-HT pode agir em 7 tipos de receptores pós-sinápticos (5-HT_{1-7}), inibitórios ou excitatórios, dos quais o 5-HT_3 é o único receptor ionotrópico. A 5-HT também pode agir em auto-receptores inibitórios somato-dendríticos ou pré-sinápticos, do tipo $5\text{-HT}_{1A,B,D}$. Exceto pelo receptor 5-HT_3 , que opera um canal catiônico, os receptores serotoninérgicos são receptores metabotrópicos associados às proteínas G. O término da ação da 5-HT ocorre principalmente pela recaptura da 5-HT mediante transportador específico (SERT). Sua degradação intracelular ocorre pela ação da monoamina oxidase (MAO), sendo um de seus principais metabólitos o ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) (modificado de Graeff e Guimarães, 1999).

O sistema serotoninérgico é extremamente complexo, possuindo mais de 14 tipos de receptores 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). No homem, a 5-HT pode atuar em 7 tipos de receptores (5-HT₁₋₇) que possuem vários subtipos (Fig. 5). Existem ainda auto-receptores ou receptores somato-dendríticos e pré-sinápticos inibitórios, principalmente 5-HT_{1A}, e 5-HT_{1B/D} (dependendo da espécie). Com exceção do receptor 5-HT₃, que é ligado a um canal iônico controlado por ligante, os receptores 5-HT pertencem à superfamília de receptores acoplados à proteína G. Contudo, durante vários anos, não houve nova adição aos 14 receptores conhecidos, com a exceção de uma segunda subunidade (5-HT_{3B}) e possivelmente uma terceira (5-HT_{3C}) para o receptor 5-HT₃. No entanto, múltiplas variantes de *splicing* (5-HT₄, 5-HT₇) ou isoformas de RNA (5-HT_{2C}) foram descritas (Graeff e Guimarães, 1999; Hoyer *et al.*, 2002).

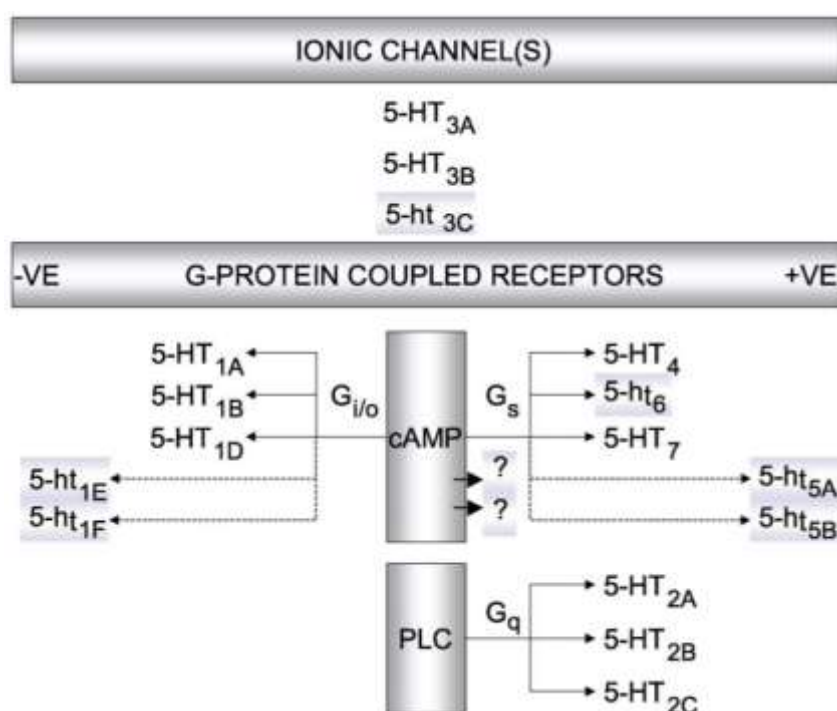


Figura 5. Classificação dos receptores serotoninérgicos. Receptores da classe 5-HT₃ são ligados a um canal catiônico e os demais a vários tipos de proteína G (G_i, G_s e G_q). Os sistemas de sinalização intracelular envolvem a ativação da adenilcilase, gerando o cAMP (3' -5' *cyclic adenosine monophosphate*), e a ativação da PLC (*phospholipase C*), gerando IP₃ (bifosfato de fosfatidilinositol) e DAG (diacilglicerol). Outras abreviaturas: -VE, negativo; +VE, positivo (Hoyer *et al.*, 2002).

Por outro lado, as primeiras evidências sobre o envolvimento da 5-HT na ansiedade foram observadas em animais de laboratório submetidos a testes de conflito. Verificou-se que antagonistas ou depletors da 5-HT liberavam o comportamento alimentar suprimido por choque, efeito idêntico àquele dos ansiolíticos sinergistas do ácido gama-aminobutírico (GABA), tais como o etanol, barbitúricos e, principalmente, benzodiazepínicos (BDZ). Contrariamente, drogas que aumentavam a neurotransmissão serotoninérgica acentuavam a supressão comportamental (Graeff e Schoenfeld, 1970). Em particular, os últimos autores mostraram que enquanto um agonista serotoninérgico (alfa-metilriptamina) facilitava a supressão, os antagonistas (metisergida e ácido bromolisérgico) liberavam o comportamento punido. Wise e colaboradores (1972, 1973) sugeriram, portanto, que o efeito ansiolítico dos BDZ era devido à comprovada redução da taxa de renovação da 5-HT produzida por estes compostos. Adicionalmente, sugeriram que a 5-HT mediava tanto a punição quanto a inibição do comportamento em testes de conflito. Segundo o modelo pioneiro desenvolvido por Wise e colaboradores (1972, 1973), a 5-HT exerceria uma ação inibidora do comportamento punido tanto em regiões prosencefálicas quanto na MCPA, nas quais exerceria um efeito ansiogênico (Fig. 6).

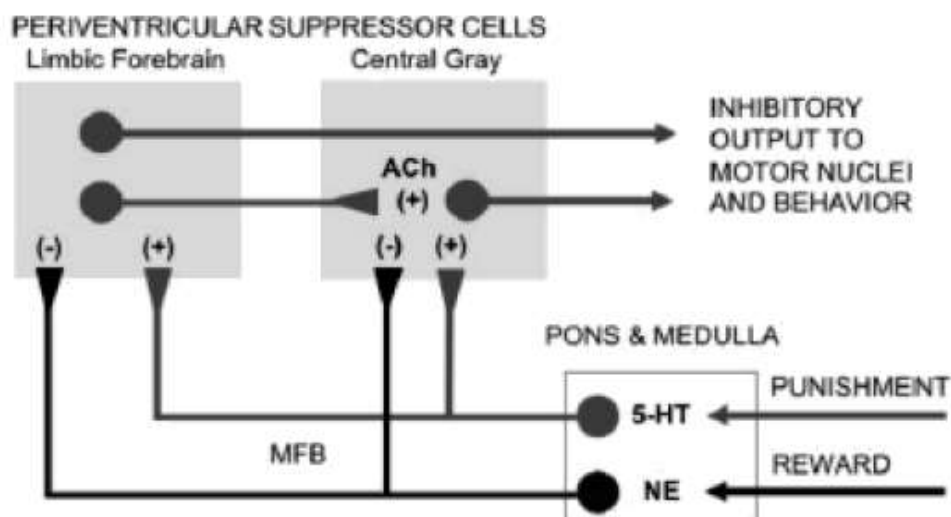


Figura 6. O presumível papel da 5-HT e noradrenalina (NE) no modelo de punição de Wise e colaboradores (1973). De acordo com estes autores, os sinais de reforço positivo liberam o comportamento controlado por neurônios colinérgicos (ACh) nas áreas de supressão periventricular, através da ativação de NE proveniente principalmente dos núcleos pontinos (*locus coeruleus*). Por sua vez, os sinais de punição aumentam a supressão comportamental pela ativação dos neurônios 5-HT, provenientes dos núcleos da rafe. MFB, feixe prosencefálico medial (Schenberg, 2010).

Inesperadamente, no entanto, Schenberg e Graeff (1978) mostraram que a

ciproeptadina, um antagonista de receptores 5-HT_{2A/C}, facilitava a resposta de fuga por pressão-à-barras à estimulação aversiva da MCPD. O caráter aversivo da estimulação da MCPD foi confirmado pela inibição da resposta de fuga por doses não-sedativas de clordiazepóxido, as quais aumentaram as latências da pressão-à-barras ou até mesmo bloquearam a resposta de fuga. Estes estudos corroboraram estudos anteriores nos quais um inibidor da síntese de serotonina (paraclorofenilalanina) aumentou a frequência de uma resposta de pressão a uma barra que reduzia a intensidade da estimulação na MCPD em 5% (fuga decremental) (Kiser e Lebovitz, 1975; Kiser *et al.*, 1978, 1980). Contrariamente, a fuga decremental foi atenuada tanto pelo precursor da síntese (5-hidroxitriptofano) quanto pelo inibidor da recaptura (clomipramina) de 5-HT. Efeitos similares foram observados pela estimulação do núcleo dorsal da rafe (Kiser *et al.*, 1980). No conjunto, estes resultados sugeriram que a 5-HT exerce efeitos antiaversivos na MCPD.

Para explorar o modo de ação da 5-HT mais diretamente, Graeff e colaboradores conduziram uma série de experimentos com ratos implantados com quimitrodos que permitiam a estimulação elétrica e a administração de drogas do mesmo sítio da MCPD. Os animais eram colocados numa caixa de vaivém (*shuttle-box*) e a intensidade da corrente era gradualmente aumentada até o rato correr para o compartimento oposto da caixa, desligando a estimulação intracraniana. O efeito das drogas sobre o 'limiar aversivo' era avaliado 10 min após a microinjeção das mesmas na MCPD (Shütz *et al.*, 1985; Nogueira e Graeff, 1995; Graeff, 2004; Graeff e Zangrossi, 2010). Usando este procedimento, estes autores mostraram que enquanto a aplicação de 5-HT ou dos agonistas 5- MeODMT (5-metoxi-N, N-dimetiltriptamina) e DOI ((+)-1-(2,5-dimetoxi-4-iodofenil)-2-aminopropano) aumentavam os limiares aversivos de maneira dose-dependente, a administração dos antagonistas metergolina (antagonista 5-HT não seletivo) e quetanserina (5-HT_{2A/2C}) facilitavam a resposta de fuga. Contrariamente, a aplicação do mCPP (1-(*m*-clorofenilpiperazina), um agonista preferencial de receptores 5-HT_{2C}, foi ineficaz. Portanto, os autores sugeriram que o efeito antiaversivo da 5-HT na MCPD era mediado pelos receptores 5-HT_{2A}. Estudos adicionais com agonistas de receptores 5-HT_{1A} (8-OH-DPAT e ipsapirona) sugeriram que estes receptores também estavam envolvidos nos efeitos antiaversivos da 5-HT. Como os efeitos do 8-OH-

DPAT e DOI foram bloqueados por antagonistas de receptores 5-HT_{1A} (NAN190) e 5-HT_{2A} (espiperona), Graeff e colaboradores concluíram que a fuga à estimulação da MCPA é modulada por ambos os tipos de receptores (Graeff, 2004, 2012).

O labirinto-em-T elevado (LTE) também tem sido extensivamente utilizado na avaliação do papel da 5-HT nos comportamentos aversivos. O LTE é um equipamento derivado do labirinto-em-cruz elevado (LCE) (Fig. 7) que, no entanto, possui apenas 2 braços abertos que se comunicam com um braço circundado por paredes. Tal como o LCE, o LTE baseia-se na aversão natural que os ratos têm de espaços abertos. Contudo, o procedimento empregado no LTE permite a medida, no mesmo animal, de comportamentos de fuga e de esquiva dos braços abertos que se assemelham ao pânico e ansiedade, respectivamente (Soares e Zangrossi, 2004; Pinheiro *et al.*, 2008; Pobbe *et al.*, 2010; Graeff, 2012).

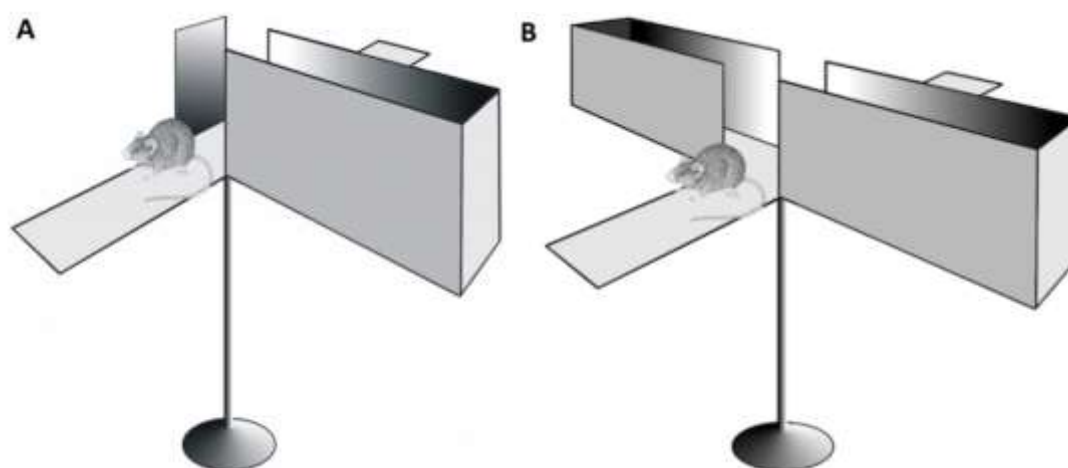


Figura 7. Labirinto-em-T-elevado (LTE) e Labirinto-em-cruz-elevado (LCE). A) LTE, modelo experimental para avaliar comportamentos de fuga (*escape*) e esquiva inibitória (*inhibitory avoidance*) no mesmo animal. B) LCE, modelo experimental para avaliar comportamento de ansiedade no animal. Cortesia de L. C Schenberg.

Enquanto alguns estudos com LTE mostraram que a microinjeção de 5-HT na MCPD afeta ambas as respostas do LTE (Soares e Zangrossi, 2004), estudos adicionais do mesmo grupo sugeriram que os receptores 5-HT_{2C} 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 sistêmica e intracerebral de drogas que aumentam a ação da 5-HT, incluindo os antidepressivos eficazes na terapia do TP, ela foi facilitada pelos peptídeos

panicogênicos da CCK (CCK-8S e CCK-4) administrados por via sistêmica e na MCPD, respectivamente. Notavelmente, ainda, o efeito panicolítico dos antidepressivos no LTE foi antagonizado pelo pré-tratamento com um bloqueador de receptor 5-HT_{1A} na MCPD (Graeff, 2012).

No que se refere à esquiva inibitória, Soares e Zangrossi (2004) mostraram que os receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} têm funções opostas na MCPD. Assim, enquanto a ativação do primeiro teve um efeito ansiolítico, inibindo a aquisição da esquiva ao braço aberto, a ativação do segundo teve efeitos ansiogênicos. Estes autores também mostraram que os receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} medeiam a ação inibitória da 5-HT na resposta de fuga do braço aberto, seja por uma ação inibitória nos neurônios de projeção da MCPD, ou por uma ação excitatória em interneurônios inibitórios, tal como foi sugerido por Brandão e colaboradores (1991).

A sensibilidade dos receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} aos seus agonistas também foi intensificada pela administração crônica (21 dias), mas não aguda, de panicolíticos serotoninérgicos (antidepressivos) e benzodiazepínicos (alprazolam) (Graeff, 2004; Pinheiro *et al.*, 2008; Graeff, 2012). Para analisar a função das projeções do núcleo dorsal da rafe (NDR) à MCPD, Pobbe e Zangrossi (2005) analisaram os efeitos no LTE de microinjeções dos antagonistas de receptores 5-HT_{1A} (WAY-100635) e 5-HT_{2A} (quetanserina) nestas estruturas. Os resultados mostraram que o bloqueio dos receptores 5-HT_{1A} pelo WAY-100635, no NDR, facilitou a esquiva inibitória ao mesmo tempo em que prejudicou a fuga dos animais. Os resultados também mostraram que a esquiva e fuga do LTE envolvem diferentes subtipos de receptores de 5-HT. Enquanto os receptores 5-HT_{2A} na MCPD parecem mediar o efeito da 5-HT em ambos os comportamentos, os receptores 5-HT_{1A} estão envolvidos apenas na regulação da fuga. Contrariamente, microinjeções na MCPD dos antagonistas preferenciais de receptores 5-HT_{2C} (SDZ-SER-082) não tiveram efeito algum nos comportamentos de fuga ou esquiva inibitória (Soares e Zangrossi, 2004). Estes resultados sugerem que os receptores serotoninérgicos na MCPD tenham um papel na regulação, mas não na geração, destes comportamentos. Esta função regulatória é executada pelo recrutamento de diferentes subtipos de receptores dependendo da tarefa defensiva a ser desempenhada. Mais especificamente, enquanto os receptores 5-HT₂ da MCPD

facilitam a esquia inibitória (5-HT_{2C}) e inibem a fuga do braço aberto (5-HT_{2A}), os receptores 5-HT_{1A} estão preferencialmente envolvidos na regulação da fuga (Pobbe e Zangrossi, 2005). Os estudos com LTE também mostraram que a estimulação dos receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} da MCPV é ansiolítica, prejudicando a aquisição da esquia inibitória sem alteração do comportamento de fuga (Soares e Zangrossi, 2009).

Em humanos, estudos de neuroimagem mostraram anormalidades da neurotransmissão serotoninérgica da rafe mesencefálica em pacientes com TP. O experimento mais pertinente foi conduzido por Maron e colaboradores (2004), que utilizaram o inibidor seletivo da recaptura de serotonina (ISRS) [¹²³I]-nor-beta-citalopram para avaliar a densidade do SERT no cérebro de pacientes com TP por meio de tomografia computadorizada por emissão de fóton (SPECT). Pacientes com TP sintomático apresentaram uma diminuição significativa da ligação do radioligante ao SERT na rafe mesencefálica, lobos temporais e tálamo, quando comparados aos controles sadios. O tratamento normalizou a taxa 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 do SERT pode ser devida tanto a um déficit de 5-HT neuronal quanto a 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.

Estudos *in vivo* de TEP também mostraram uma redução da ligação específica para receptores 5-HT_{1A} na rafe e nas regiões anterior e posterior do giro cingulado dos pacientes com TP (Neumeister *et al.*, 2004). Como a MCPD recebe fibras serotoninérgicas do NDR, a redução dos receptores 5-HT_{1A} da rafe pode resultar num aumento compensatório da atividade do NDR e na consequente inibição dos AP.

Por sua vez, os ISRSs são as drogas de primeira escolha no tratamento da maioria dos transtornos do humor e da ansiedade, incluindo o TAG e o TP. Os estudos acima adicionaram novas evidências à hipótese proposta por Deakin e Graeff (1991) que a 5-HT evoluiu como um neurotransmissor especializado no

controle dos estados aversivos. A hipótese Deakin/Graeff (HDG) também supõe que a 5-HT exerça um papel duplo na modulação das estruturas que medeiam a ansiedade (amígdala) e o pânico (MCPD), as quais seriam facilitadas ou inibidas por este transmissor, respectivamente (Fig. 8). O papel dual da 5-HT é congruente com a natureza oposta das respostas de ansiedade (esquiva passiva, congelamento) e pânico (esquiva ativa, fuga). Esta hipótese baseou-se nos achados pioneiros de Schenberg e Graeff (1978) e Kiser e colaboradores (1975, 1978, 1980) e foi apoiada por dezenas de estudos posteriores de Graeff e colaboradores (para revisão, ver Graeff, 2004). A HDG também se apoiou fortemente nos estudos etoexperimentais de Robert e Caroline Blanchard (1986) sobre os comportamentos de defesa do rato em ambientes semi-naturais (ver descrição na página 23).

Brevemente, Deakin e Graeff (1991) sugeriram que nos casos de ameaça distante ou potencial, as projeções serotoninérgicas do NDR à amígdala e ao córtex pré-frontal (CPF) facilitariam os comportamentos passivos de defesa (imobilidade e esquiva), tais como aqueles envolvidos na esquiva inibitória. Estes comportamentos seriam similares ao TAG em humanos. Por outro lado, as projeções serotoninérgicas inibitórias do NDR à MCPD inibiriam as respostas ativas da fuga que seriam relacionadas ao pânico (Graeff, 2003; Pobbe e Zangrossi, 2005; Pobbe *et al.*, 2010; Graeff e Zangrossi, 2010; Graeff, 2012). Considerando que as projeções de 5-HT oriundas do NDR inervam tanto a amígdala como a MCPD, Deakin e Graeff (1991) propuseram que a 5-HT medeia efeitos ansiogênicos na amígdala, enquanto inibe o pânico na MCPD. 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 (Graeff, 2003). A implicação clínica mais importante da HDG seria que a 5-HT facilitaria a ansiedade enquanto inibe o pânico. Assim, enquanto o déficit de 5-HT na MCPD 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 dos neurônios da MCPD, estrutura que organiza reações defensivas para lidar com ameaças próximas (Graeff, 2012).

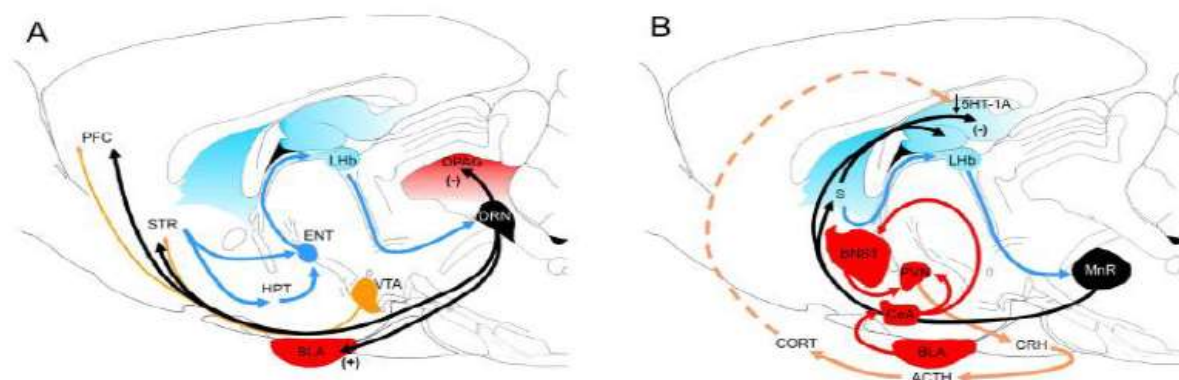


Figura 8. Modelo da hipótese de Deakin e Graeff no cérebro de rato. A) Deakin e Graeff (1991) sugeriram que enquanto o transtorno da ansiedade generalizada é devido à hiperatividade das projeções excitatórias serotonérgicas (5-HT) do núcleo dorsal da rafe (DRN) (setas pretas) para áreas do córtex pré-frontal (PFC) e amígdala (BLA) que processam ameaças distais ou potenciais, o ataque de pânico deve-se à disfunção das projeções serotonérgicas inibitórias daquele núcleo às áreas da matéria cinzenta periaquedutal dorsal (DPAG), que medeiam as respostas a ameaças próximas, inatas ou à anóxia. Por sua vez, o conflito da ansiedade seria o resultado da atividade simultânea das projeções serotonérgicas e dopaminérgicas do NDR e da área tegmentar ventral (VTA) que se projetam para o estriado ventral (STR), e medeiam os comportamentos de esquiva e aproximação, respectivamente. B) Deakin e Graeff (1991) também propuseram que as eferências serotonérgicas do núcleo mediano da rafe (MnR) ao hipocampo sejam o substrato de um "sistema de resiliência comportamental", que separaria os eventos estressores das rotinas diárias. Segundo esta hipótese, o aumento do nível circulante de glicocorticóides (CORT) no estresse promoveria a subregulação dos receptores 5-HT_{1A} do hipocampo, resultando no desamparo aprendido e depressão. Note a localização central da habênula lateral (LHb) na regulação das atividades do DRN e do MnR. Demais abreviaturas: BLA, amígdala basolateral; BNST, núcleo do leito da estria terminal; CeA, amígdala central; CRH, hormônio liberador de corticotrofinas; HPT, hipotálamo; ENT, núcleo entopeduncular (pálido interno); PVN, núcleo paraventricular do hipotálamo; S, septum (Schenberg, 2010).

Além da dupla função da 5-HT nos comportamentos de pânico e ansiedade, Deakin & 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 (NMnR). Neste modelo, o hipocampo seria 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 (CORT). O déficit da neurotransmissão 5-HT_{1A} do hipocampo produzido pelos níveis elevados de corticóides do estresse prolongado seria a base do desenvolvimento do desamparo aprendido (*learned helplessness*) em animais e da depressão em humanos. Os antidepressivos agiriam restaurando a neurotransmissão mediada pelo receptor 5-HT_{1A} (Deakin e Graeff, 1991).

A circuitaria serotoninérgica também tem sido apontada como um dos substratos fundamentais das conseqüências tardias do estresse neonatal (Lesch e Waider, 2012; Ohta *et al.*, 2014). A 5-HT desempenha um papel importante no desenvolvimento e na maturação de neurônios, influenciando na diferenciação, migração, sinaptogênese e remodelamento dendrítico (Lesch and Waider, 2012). Modificações na neurotransmissão serotoninérgica durante o período pós-natal, tanto por tratamento farmacológico como pela administração de ISRS (Ansorge *et al.*, 2007), ou por nocaute do gene do transportador de serotonina (SERT), provocaram comportamento de ansiedade e depressão (Ansorge *et al.*, 2007; Gross e Hen, 2004; Houwing *et al.*, 2019). Mais recentemente, Keesom e colaboradores (2018) mostraram que a separação materna na infância reduziu a densidade das fibras serotoninérgicas no colículo inferior das ratas fêmeas, enquanto Pollano e colaboradores (2017) mostraram que em ratos separados da mãe por 4,5 h ao longo da amamentação, apresentaram imunoreatividade aumentada de neurônios serotoninérgicos do subnúcleo lateral da rafe dorsal, também conhecido por “asa lateral” (*lateral wing*) do NDR, que situa-se na MCPAvl.

1.5 A SUBSTÂNCIA P E SEU PAPEL NOS TRANSTORNOS DE ANSIEDADE

A substância P (SP) é um neuropeptídeo que consiste em 11 aminoácidos (Regoli *et al.*, 1987; Fig. 9). A SP foi identificada por von Euler e Gaddum (1931) no cérebro e no intestino de cavalos. Estes pesquisadores também mostraram que ela reduz a pressão arterial de coelhos após sua administração sistêmica. Aparentemente, a denominação “substância P” vem das palavras “pó” (*powder*) ou “preparação”, pois von Euler relatou ter usado uma preparação na forma de pó seco (Otsuka e Yoshioka, 1993). A SP faz parte da família das neurocininas, assim como a neurocinina-A (NKA) e neurocinina-B (NKB).

Primary structures of neurokinins											F	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
Substance P	Arg	Pro	Lys	Pro	Gln	Gln	Phe	Phe	Gly	Leu	Met	NH ₂
Neurokinin A	His	Lys	Thr	Asp	Ser	Phe	Val	Gly	Leu	Met	NH ₂	
Neurokinin B	Asp	Met	His	Asp	Phe	Phe	Val	Gly	Leu	Met	NH ₂	

Figura 9. Estruturas primárias da cadeia de aminoácidos das neurocininas. Substância P, Neurocinina-A (NKA) e Neurocinina-B (NKB) (Regoli *et al.*, 1987).

Estudos de biologia molecular e análise seqüencial de DNA revelaram que as NKs são sintetizadas a partir de dois genes distintos: o gene da PPT-I ou PPT-A (pré-pró-taquicinina A) e o gene da PPT-II ou PPT-B (pré-pró-taquicinina B), no corpo celular. A transcrição do gene da PPT-A produz três RNAm de NKs distintas (α , β e λ pré-pró-taquicininas). A PPT-I α origina a SP e a PPT-I β origina a SP, NKA e um análogo da NKA expandido na porção amino-terminal, o NPK (neuropeptídeo K). Por sua vez, a PPT-I λ origina a SP, NKA e um análogo da NKA expandido na porção amino-terminal, o NP λ (neuropeptídeo λ) (Nawa *et al.*, 1983; Kotani *et al.*, 1986; Bonner *et al.*, 1987; Krause *et al.*, 1987; Maggio, 1988; Guard e Watson, 1991). A PPT-II codifica a informação para a síntese de uma proteína precursora da NKB (Dornan *et al.*, 1993), conforme esquema abaixo (Fig. 10).

As NKs, e particularmente a SP, são substratos para várias enzimas proteolíticas. Enquanto a endopeptidase SPDE (enzima de degradação da SP) hidrolisa ligações peptídicas internas nas posições 7-8 e 8-9, liberando os fragmentos SP 1-7 e SP 1-8, a PPEP (endopeptidase pós-prolina) cliva a SP e libera os fragmentos SP 3-11 e SP 5-11. A NEP (endopeptidase neutra) e a ACE (enzima conversora de angiotensina) promovem a liberação do fragmento SP 1-7, com maior ação sobre o SNC. Assim, o uso de inibidores dessas enzimas, portanto, aumentam, de uma maneira geral, a disponibilidade e, algumas vezes, as ações da SP no SNC (Regoli *et al.*, 1994).

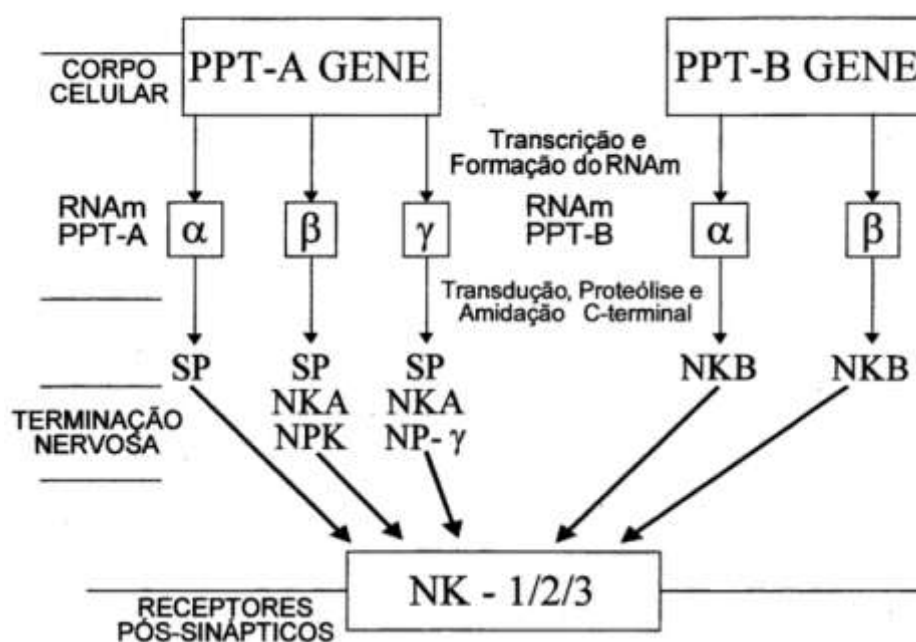


Figura 10. Origem das neurocininas e de seus precursores em mamíferos. PPT, pré-pró-taquicinina; SP, substância P; NKA, neurocinina-A; NKB, neurocinina-B; NPK, neuropeptídeo K; NP- λ neuropeptídeo λ (adaptado de Guard e Watson, 1991).

Em animais, a SP induz a hipotensão e a salivação, a NKA estimula o músculo liso dos brônquios e do intestino e a NKB modula a liberação de transmissores de terminais nervosos autonômicos. A seletividade da ação deve-se, em parte, à sua distribuição periférica e aos receptores pós-sinápticos (Regoli *et al.*, 1987). A SP age em receptores NK-1, NK-2, and NK-3. Embora a SP se ligue a todos receptores, ela possui afinidade maior para o NK-1 (Dam *et al.*, 1988 e Regoli *et al.*, 1987). Em contraste, a NKA tem maior afinidade pelo receptor NK-2, e a NKB pelo receptor NK-3 (Maggi *et al.*, 1993; Stables *et al.*, 1994). Os efeitos da SP decorrentes de sua interação com os receptores NK-1 estão relacionados à ativação de proteínas G, com a consequente ativação de fosfolipase C, acúmulo de inositol trifosfato (IP₃) e o subsequente aumento de Ca²⁺ citoplasmático. Além disso, a SP também promove a liberação do óxido nítrico, um agente relaxante da musculatura lisa (Zawadzki *et al.*, 1981).

As evidências existentes sugerem que a SP esteja envolvida na dor, estresse, medo, ansiedade, aprendizagem, memória e comportamentos defensivos (Unger *et al.*, 1988; Mongeau *et al.*, 1998; Hasenohrl *et al.*, 2000; Drew *et al.*, 2005; Chahl, 2006; Ebner *et al.*, 2008). Notavelmente, evidências neuroquímicas mostraram alterações no conteúdo de SP do cérebro de animais submetidos a

estímulos estressores, tais como, a imobilização, o isolamento social e choques nas patas (Mongeau *et al.*, 1998; Rupniak *et al.*, 2000). Em particular, os últimos estudos mostraram que os animais expostos a estes eventos aversivos apresentam alterações da neurotransmissão por SP no sistema mesolímbico, no hipocampo, no septo, na MCPA e no hipotálamo. Estudos clínicos, por outro lado, mostraram aumento dos níveis de SP no líquido cefalorraquidiano de pacientes deprimidos (Rimon *et al.*, 1984).

Também existem evidências de que injeções centrais de SP produzem comportamentos defensivos e alterações cardiovasculares em animais (Unger *et al.*, 1988; Duarte *et al.*, 2004). Microinjeções de SP na MCPD produziram aversão condicionada ao contexto (Aguiar e Brandão, 1994), aumento da pressão arterial e da frequência cardíaca (Ku *et al.*, 1998) e efeitos ansiogênicos no LCE (Aguiar e Brandão, 1994; Aguiar e Brandão, 1996; Duarte *et al.*, 2004). Curiosamente, no entanto, a injeção de SP no hipocampo dorsal causou efeitos ansiolíticos em animais testados no LCE e no campo aberto (Carvalho *et al.*, 2008). Diversos autores têm sugerido que os efeitos da SP dependem da interação dos segmentos terminais com os receptores. Em particular, enquanto a microinjeção do fragmento C-terminal (SP 6-11) na MCPD causou efeitos aversivos em animais testados no LCE (de Araújo *et al.*, 2001a), a injeção do fragmento N-terminal (SP 1-7) promoveu efeitos anti-aversivos em ratos testados no LCE (de Araújo *et al.*, 2001a,b; Duarte *et al.*, 2004).

Evidências neuroquímicas mostram que os neurônios de SP estão colocalizados com os neurônios serotoninérgicos (Chan-Palay *et al.*, 1978; Harding *et al.*, 2004) no bulbo e, em particular, nos núcleos do sistema descendente da rafe (Hokfelt *et al.*, 1978; Fu *et al.*, 2010). Estudos de depleção serotoninérgica com 5,6- e 5,7-diidoxitriptamina confirmaram a coexistência de SP e 5-HT em neurônios da rafe bulbar e em axônios e nervos terminais nervosos do corno ventral da medula espinhal do rato (Hokfelt *et al.*, 1978; Bjorklund *et al.*, 1979; Singer *et al.*, 1979; Gilbert *et al.*, 1982).

Embora os neurônios serotoninérgicos também se projetem a muitas áreas prosencefálicas (Parent *et al.*, 1981), não há evidências da coexistência destes

transmissores no sistema ascendente da rafe. Não obstante, Barden e colaboradores (1983) mostraram uma correlação inversa entre as concentrações de 5-HT e SP na MCPA, uma vez que a depleção de 5-HT pela para-cloroanfetamina aumentou o conteúdo de SP da MCPA de ratos. Estas interações funcionais são apoiadas por testes *in vivo* pela administração repetida de antidepressivos, que provocaram uma regulação negativa na biossíntese da SP em regiões discretas do cérebro em ratos, levantando a possibilidade de que as alterações dos sistemas de neurocininas podem contribuir para a eficácia das drogas antidepressivas (Barden *et al.*, 1983; Brodin *et al.*, 1987; Riley *et al.*, 1991; Shirayama *et al.*, 1996).

A SP também é abundante nas regiões cerebrais envolvidas com os comportamentos de defesa e o estresse, tais como a amígdala, o septo, o hipocampo, o hipotálamo, a MCPA (Maeno *et al.*, 1993; Barbaresi, 1998; Commons and Valentino, 2002; Hietala *et al.*, 2005; Rigby *et al.*, 2005; Nagano *et al.*, 2006) e, em especial, a MCPD (Rosén *et al.*, 1992; Broiz *et al.*, 2012; Li *et al.*, 1990 e Barbaresi, 1998). Estudos de Harding e colaboradores (2004) mostraram que toda a região da MCPA é intensamente corada para SP (Fig. 11). No mesmo sentido, experimentos de imunohistoquímica de Kingsbury e colaboradores (2011) mostraram que a região lateral da MCPA é rica em SP. Ainda, Rosén e colaboradores (1992) mostraram que o simples fato de segurar o rato pela cauda por 1 min, ou a aplicação de salina, eleva os níveis de SP na MCPA.

A SP participa de vários processos comportamentais tais como, reforço, aprendizado, memória, medo e ansiedade (Huston and Hasenohrl, 1995; Hasenohrl *et al.*, 2000; Drew *et al.*, 2005; Chahl, 2006). Mais notavelmente, há evidências abundantes de que a SP esteja envolvida no estresse, na depressão e na ansiedade (Kramer *et al.*, 1998; Bondy *et al.*, 2003; Hokfelt *et al.*, 2003; Dableh *et al.*, 2005; McLean, 2005). Em particular, a microinjeção de SP na MCPD produz efeitos ansiogênicos que parecem ser mediados por receptores NK-1 (Mongeau *et al.*, 1998; De Araújo *et al.*, 2001a,b; Duarte *et al.*, 2004). Relatos experimentais de que os antagonistas dos receptores NK-1 podem ser eficazes no tratamento da depressão de pacientes ansiosos ensejam pesquisas para seu emprego na terapia da depressão e da ansiedade (Kramer *et al.*, 1998; Santarelli *et al.*, 2001). Pesquisas com cobaias mostraram que a infusão intracerebroventricular do

agonista do receptor NK-1, GR73632, induziu respostas de vocalização que foram inibidas pelos antidepressivos imipramina e fluoxetina, mas não pelos ansiolíticos, diazepam ou buspirona (Kramer *et al.*, 1998; Rupniak *et al.*, 2000).

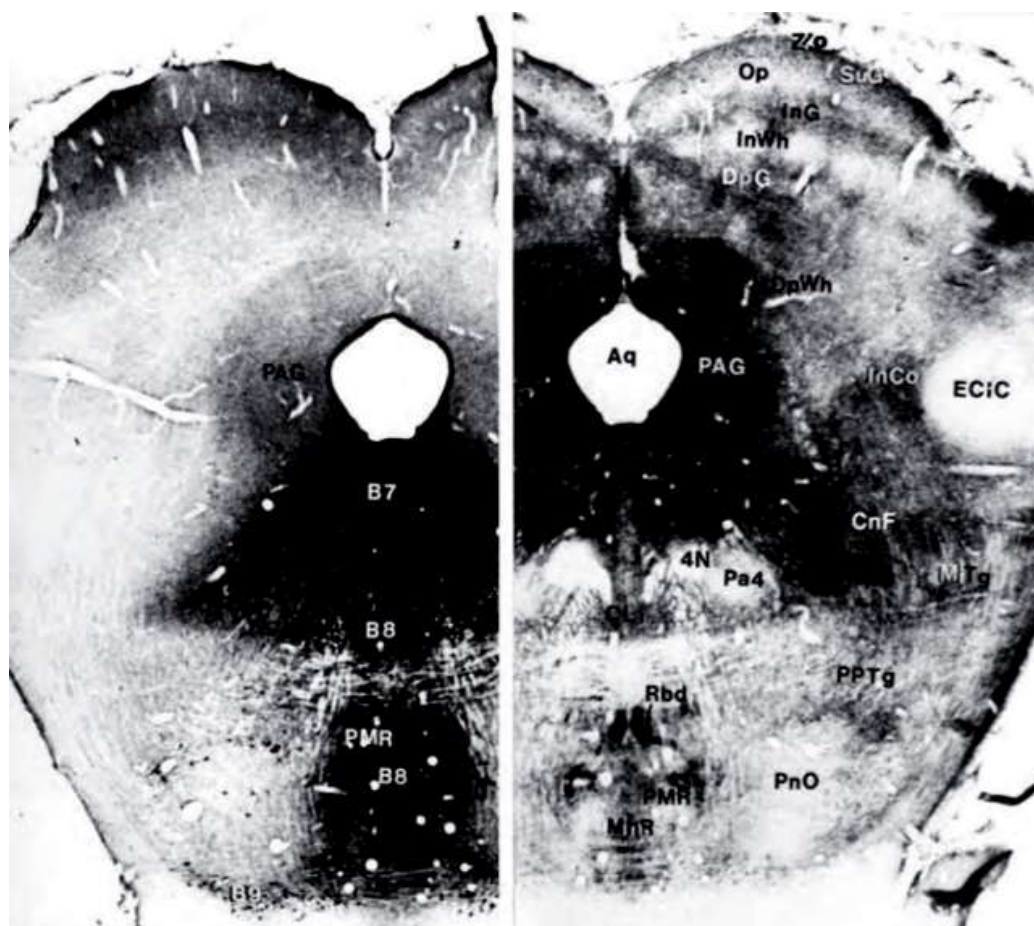


Figura 11. Distribuição da serotonina (5-HT, esquerda) e da substância P (SP, direita) numa seção coronal do mesencéfalo do rato. Abreviaturas: Aq, aqueduto; B7 e B8, núcleos dorsal e mediano da rafe; DpG, camada cinzenta profunda do colículo superior; DpWh, camada branca profunda do colículo superior; InWh, camada branca intermediária do colículo superior; InG, camada cinzenta intermediária do colículo superior; Op, camada óptica do colículo superior; SuG, camada cinzenta superficial do colículo superior; Zo, camada zonal do colículo superior; InCo, núcleo intercolicular; ECiC, córtex externo do colículo interior; CnF, núcleo cuneiforme; 4N, núcleo do nervo troclear; Pa4, núcleo paratroclear; PAG, matéria cinzenta periaquedutal; CLi, núcleo linear caudal da rafe; MiTg, núcleo tegumentar microcelular; MnR, núcleo mediano da rafe; Rbd, núcleo rabdóide; PMR, núcleo paramediano da rafe; PPTg, núcleo tegumentar pedunculopontino; PnO, núcleo reticular da ponte, parte oral (Harding, Paxinos e Halliday, 2004).

Mais importante para o presente estudo, a administração dos antagonistas do receptor NK-1 inibe a vocalização ultrassônica de filhotes de cobaia separados de suas mães, e o nocaute do receptor NK-1 reduz a vocalização de filhotes de camundongos submetidos à separação materna (Rupniak *et al.*, 2000). Estudos adicionais do mesmo grupo (Boyce *et al.*, 2001) mostraram que o pico da

vocalização à separação materna coincide com o aumento no número de neurônios na amígdala basolateral que exibiram endocitose do receptor NK-1. Estes autores também mostraram que microinjeções da amígdala basolateral com um antagonista dos receptores NK-1 (L760735) inibem a vocalização induzida pela separação. Estudos com técnicas de superfusão e microdiálise *in vivo* mostraram que o estresse de imobilização e as respostas ansiogênicas de ratos produzem aumento (150%) da liberação de SP na amígdala medial (Ebner *et al.*, 2004).

A maior parte dos estudos comportamentais sobre SP abordou o papel dos receptores NK-1 no estresse, ansiedade e depressão. Embora os receptores NK-2 não tenham distribuição tão ampla como os receptores NK-1, os antagonistas não peptídicos dos receptores NK-2 apresentaram efeitos tanto ansiolíticos (camundongos e sagüis) como antidepressivos (em ratos) (Walsh *et al.*, 1995; Dableh *et al.*, 2005). Em camundongos, o agonista seletivo do receptor NK-3 (aminosenktide) apresentou efeito antidepressivo no teste de natação forçada, um modelo de depressão. Corroborando estudos anteriores (Massi *et al.*, 2000), o último efeito foi abolido por um antagonista opióide não-seletivo (naltrexona), sugerindo, portanto, que os efeitos dos agonistas do receptor NK-3 sejam mediados por vias opioidérgicas. Além disso, demonstrou-se que enquanto um agonista do receptor NK-3 (senktide) tinha efeitos ansiolíticos, o antagonista deste receptor [Trp⁷-Ala⁸]-NKA[4-10] era ansiogênico (Ribeiro *et al.*, 1999). Não obstante, estudos recentes mostraram que os três tipos de antagonistas do receptor NK produzem um efeito antidepressivo no teste de natação forçada em ratos (Dableh *et al.*, 2005).

Por outro lado, estudos de tomografia por emissão positrônica mostraram que pacientes com transtorno do pânico (Fujimura *et al.* 2009) apresentam redução generalizada na densidade do receptor NK-1 (12% em pacientes com pânico versus 21% em voluntários saudáveis). Embora este estudo não tenha especificado regiões específicas, ele é um achado significativo sobre a correlação entre SP e pânico.

A SP também tem sido envolvida nas respostas comportamentais de animais submetidos ao estresse de separação na infância ou na vida adulta. Por exemplo, enquanto Husume colaboradores (2008) mostraram que a privação materna na

infância promove o aumento dos níveis de SP da MCPA de ratos adultos geneticamente depressivos, Steinberg e colaboradores (2001) relataram que o bloqueio seletivo de receptores NK-2 atenua o comportamento depressivo de filhotes de ratos e de cobaias que foram separadas da mãe, reduzindo sua vocalização durante o período do estresse de separação. No mesmo sentido, Brodin e colaboradores (1994) observaram aumentos significantes da SP na MCPD (mas não da amígdala) de ratos adultos que foram isolados de seu grupo por 1 ou 7 dias. Contudo, não temos conhecimento de estudos mostrando os efeitos da separação ou privação materna na infância, nos níveis de SP na metade dorsal da MCPA.

1.6 O BDNF E SEU PAPEL NOS TRANSTORNOS DE ANSIEDADE

O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) faz parte da família das neurotrofinas, a qual compreende o fator de crescimento do nervo (NGF), a neurotrofina-3, a neurotrofina 4/5 e a neurotrofina-6 (Bathina e Das, 2015). O BDNF é sintetizado a partir de um precursor (pro-BDNF) de 32 a 35 kDa. Após sua expressão, o pro-BDNF migra ao complexo de Golgi e à rede trans-Golgi (*trans-Golgi network*) (TNG). Na TNG, o pro-BDNF é clivado formando o BDNF maduro e biologicamente ativo de 13 kDa. Na presença de receptores da carboxilpeptidase-E, o pro-BDNF é envolvido por vesículas que são secretadas pelos dendritos (Fig. 12) (Bathina e Das, 2015). O BDNF maduro é secretado por duas vias. Uma delas é a via constitutiva, na qual as vesículas que transportam a proteína fundem-se continuamente à membrana plasmática, liberando seu conteúdo no espaço extracelular. A outra via é regulada por sinais específicos que regulam a fusão das vesículas à membrana plasmática e a secreção da proteína (Thomas e Davies, 2005). O BDNF é preferencialmente empacotado e liberado pela via de secreção regulada (Goodman *et al.*, 1996; Farhadi *et al.*, 2000). O RNAm do pró-BDNF está presente em todo o cérebro e seus níveis de expressão são baixos durante o desenvolvimento fetal, aumentam acentuadamente após o nascimento e diminuem na fase adulta (Aid *et al.*, 2007; Bathina e Das, 2015).

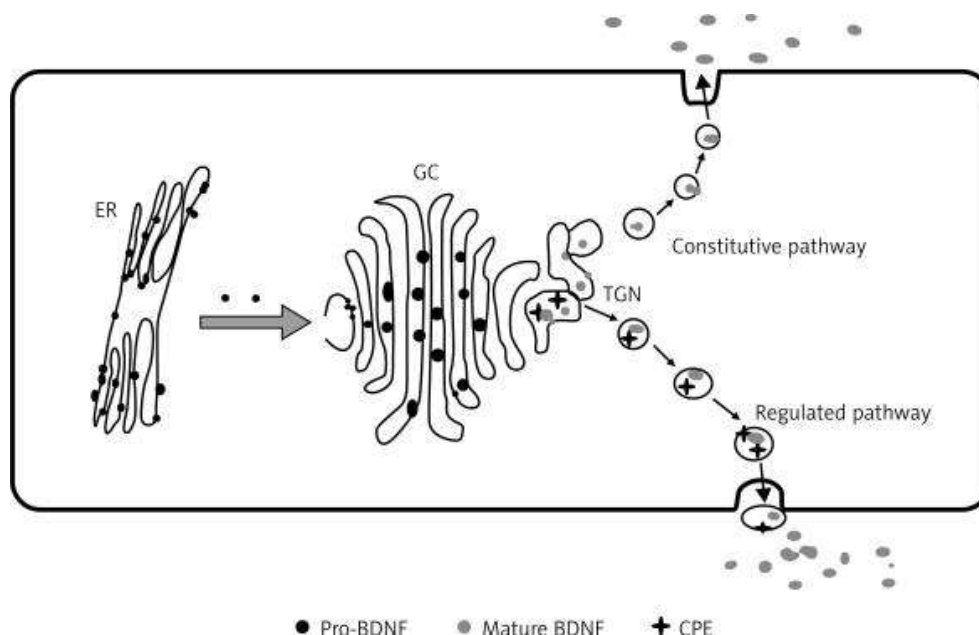


Figura 12. Expressão do BDNF. O pro-BDNF é sintetizado no retículo endoplasmático (ER) e transportado ao complexo de Golgi e à rede trans-Golgi (*trans-golgi network*) (TNG), na qual ele é regulado pela carboxilpeptidase-E (CPE) e convertido em BDNF maduro. O BDNF maduro biologicamente ativo é liberado no meio extracelular mediante a fusão das vesículas do TNG à membrana plasmática (Bathina e Das, 2015).

O BDNF possui alta afinidade para o receptor da fosfoquinase da tropomiosina B (TrkB) que regula a sobrevivência celular, proliferação neuronal, o destino de precursores neurais e o crescimento de axônios e dendritos, através da regulação da atividade de uma tirosina cinase localizada no domínio intracelular do receptor (Duman *et al.*, 1997; Bathina e Das, 2015) (Fig. 13).

Dentre as principais funções do BDNF, destaca-se a neurogênese. Noble e colaboradores (2011) relataram que a neurogênese na região hipotalâmica é aumentada pela administração intracerebroventricular de BDNF ao longo de 12 dias. O BDNF também pode promover a sobrevivência de neurônios sensoriais periféricos durante o desenvolvimento do cérebro do rato (Bus *et al.*, 2011; Pillai *et al.*, 2012; Hofer e Barde, 1988). Estes pesquisadores mostraram que a aplicação exógena de BDNF resultou no aumento do comprimento e da complexidade da arborização dendrítica de neurônios piramidais do córtex visual. Adicionalmente, mostraram que a inibição espontânea da atividade elétrica, ou da transmissão sináptica ou dos canais de cálcio tipo-L impede o crescimento dendrítico eliciado pela administração

exógena de BDNF, indicando, portanto, que os neurônios devem estar suficientemente ativos para responder à ação moduladora do BDNF.

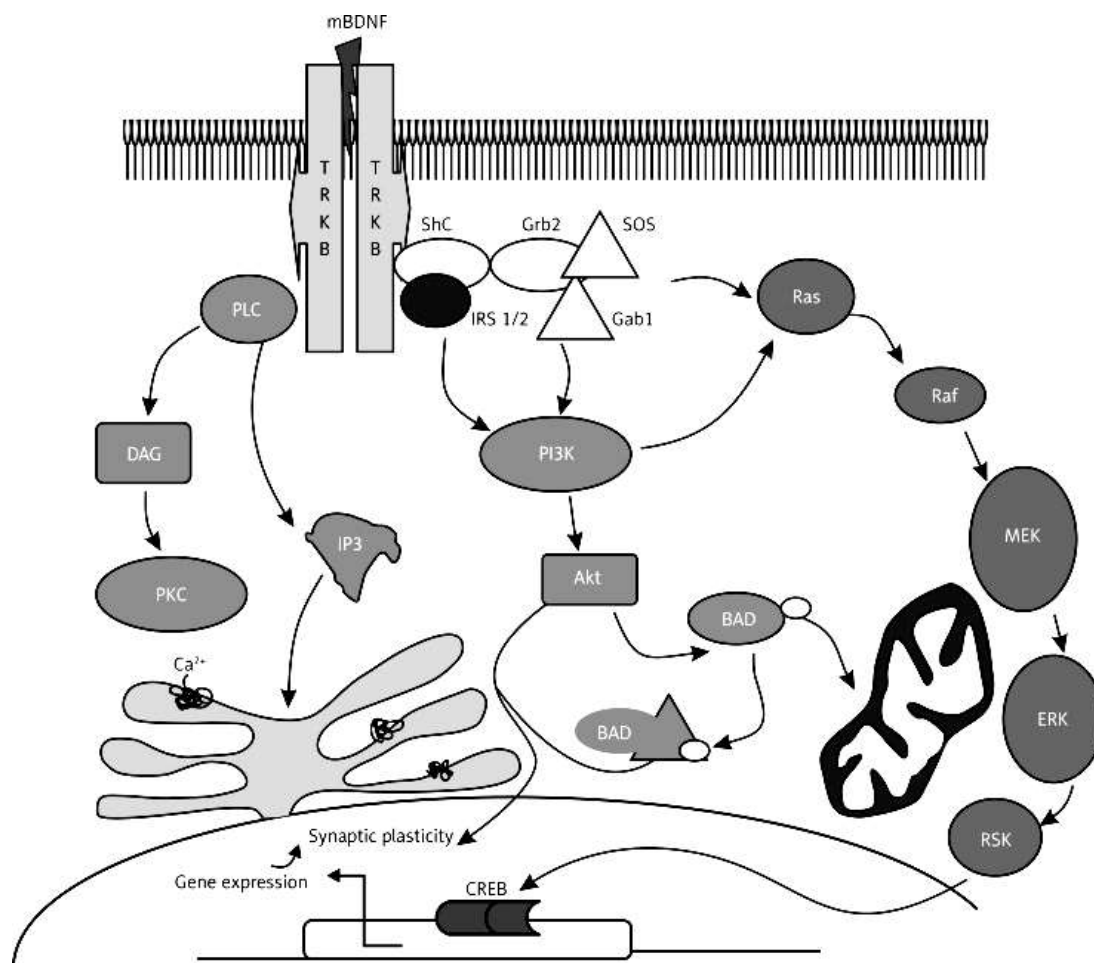


Figura 13. Vias de sinalização do BDNF. O BDNF se liga ao receptor TrkB resultando no recrutamento de proteínas que podem ativar três cascatas distintas de transdução do sinal. Uma cascata envolve a ativação sequencial da via PI3K-Akt, através do IRS-1/2 e da proteína adaptadora Gab1. No citoplasma, o Akt fosforila a proteína BAD impedindo a liberação do citocromo C da membrana mitocondrial e, conseqüentemente, a ativação da cascata das caspases, prevenindo a apoptose. No núcleo, o Akt pode estimular a plasticidade sináptica e a transcrição de genes anti-apoptóticos ou pode inibir fatores de transcrição que promovem a expressão de genes relacionados à morte celular. A segunda cascata envolve a ativação do complexo de proteínas fosfocinases Shc/Grb2/SOS, que transmitem sinais mitogênicos para a Ras GTPase. Esta, por sua vez, ativa a cascata Raf/MEK/ERK/RSK (MAPK, cascata de proteínas cinases ativadas por mitógeno) que estimulam o fator de transcrição CREB que regula a expressão do próprio BDNF e de outros fatores de transcrição (*c-fos*, *c-jun*, etc) que codificam proteínas envolvidas na plasticidade neural, resistência ao estresse e sobrevivência celular. A terceira cascata envolve a ativação da PLC e seus segundos mensageiros IP3, DAG e PKC. O IP3 liga-se a receptores dos canais de liberação de Ca²⁺ no retículo endoplasmático, promovendo o aumento intracelular deste íon e a resposta celular. Abreviaturas: TrkB, fosfocinase B da tropomiosina; IRS-1/2, substrato do receptor de insulina; Gab1, proteína ligante associada ao Grb2; PI3K, cinase 3-fosfatidilinositol; Akt, fosfocinase proteica B; BAD, proteína agonista de morte celular associada à BCL2; Shc, *Src homology/collagen*; Grb2, proteína 2-ligada ao receptor de fator de crescimento; Sos, *son of sevenles*; Ras, proteínas reguladoras derivadas de *rat sarcoma vírus*; Raf, *rapidly accelerating fibrosarcoma*; MEK, fosfocinase proteica ativada pelo mitógeno; ERK, fosfocinase regulada por sinal extracelular; RSK, fosfocinase ribossômica S6; PLC, fosfolipase C; IP3, 1,4,5-trifosfato de inositol; DAG, diacilglicerol; PKC, fosfocinase protéica C; CREB, proteína de ligação em resposta ao AMPc (Bathina e Das, 2015).

O BDNF também está relacionado com a regulação da plasticidade sináptica. Ito e colaboradores (2003) mostraram que ele é essencial para a reciclagem do NMDA de vesículas pré-sinápticas, a qual depende da ativação de receptores em cultura de neurônios neocorticais de camundongos com nocaute genômico do BDNF. Este papel parácrino (mensageiro retrógrado) do BDNF foi confirmado por Bramham e Messaoudi (2005). Estes pesquisadores mostraram que a administração hipocampal de BDNF restaurou a polimerização de actina e a estabilidade da LTP (*long-term-potential*). Adicionalmente, os níveis de BDNF não somente aumentaram a expressão de receptor NMDA e a concentração de cálcio intracelular (Walz *et al.*, 2006), como também aliviaram o bloqueio dos receptores de NMDA pelo Mg^{2+} (Kramar *et al.*, 2010), promovendo mudanças duradouras na atividade sináptica. No mesmo sentido, Caldeira e colaboradores (2007) mostraram que a redução de TrkB e da secreção de BDNF diminuíram a indução de LTP.

A expressão do RNAm do BDNF pode ser regulada pela atividade neuronal, uma vez que a ativação epileptogênica das sinapses glutamatérgicas aumenta a expressão do RNAm do BDNF em fatias do hipocampo de ratos (Ernforset *et al.*, 1994; Zafra *et al.*, 1992). O aumento na atividade sináptica induzida pelos agonistas do receptor AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico) produz uma elevação transitória nos níveis de RNAm codificando BDNF e TrkB no hipocampo e no córtex (Lauterborn *et al.*, 2000). Estímulos elétricos que induzem a potenciação de LTP no hipocampo, um modelo celular de aprendizado e memória, aumentaram a expressão de BDNF e NGF (Patterson *et al.*, 1992). Além disso, o exercício físico aumenta a expressão de NGF e BDNF no hipocampo (Neeper *et al.*, 1995), o que pode explicar sua ação benéfica na memória e na prevenção do Alzheimer. Em contrapartida, Zafra e colaboradores (1990, 1991) mostraram que o bloqueio de receptores glutamatérgicos ou a estimulação do sistema GABAérgico reduziu a expressão do RNAm de BDNF na região hipocampal. No mesmo sentido, Bozzi e colaboradores (1995), em estudos sobre os efeitos da privação monocular de ratos adultos na região cortical, demonstraram que o aumento ou a diminuição da atividade neural pode levar à elevação ou redução da expressão de BDNF. Consistente com estas observações, a estimulação induzida por luz aumentou a expressão do RNAm de BDNF no córtex visual e a privação monocular provocou uma diminuição notável no mRNA do BDNF no córtex visual correspondente ao olho

privado (Bathina, Das, 2015).

Por outro lado, estudos comportamentais e moleculares têm indicado que o mecanismo de ação de drogas antidepressivas vai além da hipótese monoaminérgica. Duman e colaboradores (1997) postularam o envolvimento de fatores neurotróficos, especialmente o BDNF, na patogênese da depressão e no mecanismo de ação de drogas antidepressivas (Fig. 14). Estes pesquisadores apontaram a proteína de ligação ao elemento de resposta do AMPc (CREB) como um importante alvo celular para os tratamentos com antidepressivos de longo-prazo, e que o BDNF seria um alvo desta proteína. A hipótese neurotrófica da depressão sugere que os níveis de BDNF estejam reduzidos em estados depressivos e que as drogas antidepressivas atuam restaurando esse déficit (Nestler *et al.*, 2002). Esta hipótese é corroborada por Siuciak e colaboradores (1996) que mostraram que o BDNF apresentou efeitos antidepressivos em dois modelos animais de depressão, natação forçada e desamparo aprendido. Adicionalmente, Nibuya e colaboradores (1995 e 1996) e Mamounas (1995) mostraram que o tratamento a longo prazo de drogas antidepressivas elevou a expressão de BDNF e de TrkB no hipocampo e que esta neurotrofina favoreceu o crescimento de neurônios serotoninérgicos e noradrenérgicos diante de danos neurotóxicos.

De uma forma geral, transtornos de ansiedade e depressão têm sido associados à diminuição dos níveis de BDNF (Gonul *et al.*, 2005; Berry *et al.*, 2012) ou de um polimorfismo na síntese de BDNF (Soliman *et al.*, 2010; Lonsdorf *et al.*, 2010). A figura abaixo (Fig. 15) sintetiza os principais mecanismos da participação do BDNF na depressão, em células hipocâmpais, sugeridos por Duman e colaboradores (1997).

O papel do BDNF e TrkB na patofisiologia dos transtornos do estresse tem sido amplamente investigado (Shirayama *et al.*, 2002; Casarotto *et al.*, 2010), em especial na MCPA (Siuciak *et al.*, 1997), região que possui níveis elevados deste neuropeptídeo (Conner *et al.*, 1997; Yan *et al.*, 1997; Numan e Seroogy, 1999). Os estudos de Siuciak e colaboradores (1994, 1996) foram os primeiros a demonstrar a modulação do BDNF em neurônios serotoninérgicos. Ainda, estes pesquisadores (Siuciak *et al.* 1997) mostraram que a injeção de BDNF numa área compreendendo

a MCPA e o núcleo dorsal da rafe (NDR), diminui o déficit comportamental (ou seja, a falha de escape) causado pela exposição de ratos a choques inescapáveis. Também observaram uma redução no tempo de imobilidade no teste de natação forçada. Mais interessante ainda, estes mesmos autores (Siuciak *et al.*, 1994, 1996) mostraram que os efeitos antidepressivos podem estar associados com um aumento na atividade de serotonina nestas áreas e em outras regiões, como hipocampo, estriado e o córtex. Ainda, mostraram que a infusão local de BDNF em áreas adjacentes à MCPA promovem uma modificação no disparo de neurônios serotoninérgicos do NDR (Celada *et al.*, 1996). Estes autores também mostraram que a microinjeção de BDNF na MCPA/NDR aumentou a expressão da enzima triptofano hidroxilase, que é fator limitante para a síntese de 5-HT (Siuciak *et al.*, 1998).

Com relação a efeitos panicolíticos, os estudos de Casarotto e colaboradores (2010, 2015) demonstraram que a microinjeção de BDNF na região da MCPD produziu efeito antipânico à estimulação elétrica desta região, e que este efeito interagiu com o sistema gabaérgico, e não serotoninérgico. É importante salientar que nos estudos de Siuciak e colaboradores (1998) o aumento da expressão da triptofano hidroxilase bem como da taxa de renovação (*turnover*) da serotonina foi observado em áreas próximas da MCPA e do NDR, e não especificamente na MCPD. Além disso, as análises neuroquímicas realizadas por estes pesquisadores foram feitas 24 horas após a infusão de BDNF, diferentemente do grupo de Casarotto (2010), que observaram os efeitos farmacológicos 30 minutos após a infusão desta neurotrofina. O mecanismo do efeito panicolítico demonstrado por Casarotto e colaboradores (2010) foi dependente de GABA_A, o que está de acordo com os estudos de Vaz e colaboradores (2008), que revelaram que o BDNF, via ativação de TrkB, inibe a captação de GABA mediada por seu carreador em terminais nervosos isolados. Também há evidências de que BDNF pode regular os receptores gabaérgicos GABA_A através da fosforilação deste receptor em cultura de células hipocámpais (Jovanovic *et al.*, 2004). Adicionalmente, Casarotto e colaboradores (2015) mostraram que ratos tratados com antidepressivos tricíclicos (imipramina, clomipramina e desipramina) ou um ISRS (fluoxetina) apresentaram níveis aumentados de BDNF e do receptor fosforilado de TrkB (forma ativa) na MCPD. Ao contrário, as drogas carentes de

efeitos pânicolíticos (diazepam, clonazepam e buspirona) não tiveram efeito algum nos níveis de BDNF da MCPD. Mais recentemente, Ribeiro e colaboradores (2019) demonstraram que a administração crônica de aminoguanidina, um inibidor da NOS, que tem efeitos aparentemente pânicolíticos, também aumentou a fosforilação do receptor TrkB na MCPD.

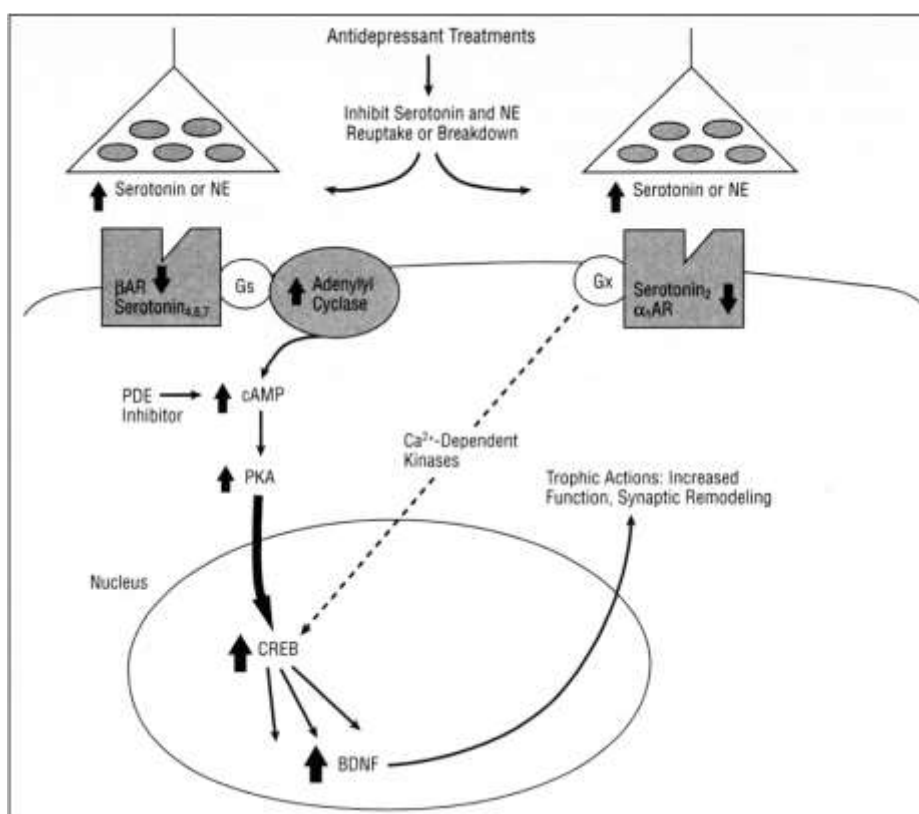


Figura 14. Mecanismo de ação do uso crônico de antidepressivos. O uso agudo de drogas antidepressivas causa o aumento de serotonina e norepinefrina (NE) por inibir a recaptura destas monoaminas. A administração crônica de antidepressivos diminui a função e a expressão de alguns subtipos de receptores noradrenérgicos e serotoninérgicos (β -adrenérgico [β AR] e 5-HT₂ [*serotonin*₂]), entretanto os níveis de 3, 5 – adenosina – monofosfato cíclica (cAMP), adenilato ciclase e de proteína cinase A dependente de AMPc (PKA) permanecem elevados, incluindo a translocação do PKA para o núcleo da célula. Estudos demonstraram que a expressão e a função da proteína de ligação da resposta ao AMPc (CREB) foi aumentada por diferentes tipos de antidepressivos, o que sugere que o CREB possui um receptor em comum com as drogas antidepressivas. CREB pode ser regulado por receptores monoaminérgicos que se acoplam à cascata AMPc-PKA (serotonin_{4,6,7} and β AR) ou via receptores que levam à ativação de cinases dependentes de Ca²⁺ (serotonin₂ e α_1 -adrenérgico [α_1 -AR]). A atividade aumentada da cascata de transdução via AMPc indica que a via de sinalização final da estimulação serotoninérgica e noradrenérgica ficam sobre-reguladas (*up-regulation*) em pelo menos algumas regiões do cérebro, mesmo os níveis de seus receptores permanecerem parcialmente sub-regulados (*down-regulation*). Esta possibilidade é corroborada pela expressão de BDNF e TrkB, dois alvos potenciais de CREB, também estarem aumentados no tratamento crônico com antidepressivos. A sobre-regulação do BDNF e do TrkB poderia influenciar a função dos neurônios serotoninérgicos e noradrenérgicos ou aqueles que inervam esta região, promovendo, assim, o aumento da sobrevivência neural, do remodelamento sináptico e da arquitetura celular (Duman *et al.*, 1997).

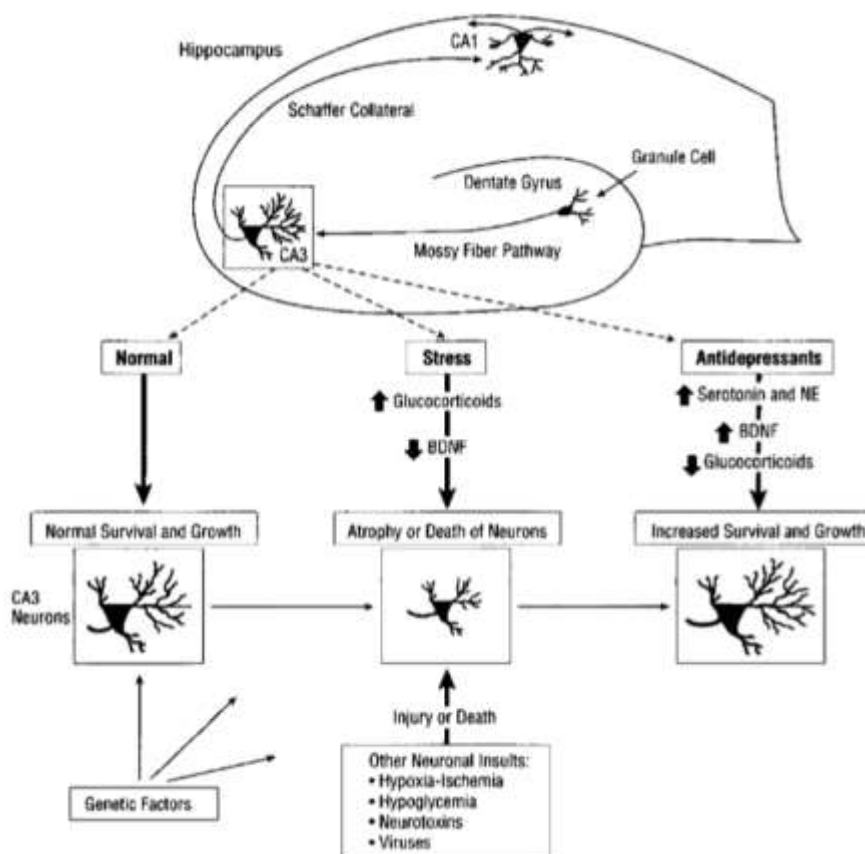


Figura 15. Efeito celular e molecular do mecanismo de ação do uso de antidepressivos e a patofisiologia de transtornos relacionados ao estresse na região do hipocampo. Os três principais conjuntos de células hipocâmpicas (células piramidais CA3 e CA1 e células granulares do giro dentado) estão conectadas pelas vias colaterais de Schaffer e pelas fibras musgosas. O estresse crônico diminui a expressão de BDNF no hipocampo, e isso contribuiu para a atrofia ou morte celular de células da camada piramidal CA3. O aumento crônico de glicocorticóides também pode levar à diminuição da sobrevivência destes neurônios. Outros tipos de danos neuronais tais como hipoxia-isquemia, hipoglicemia, neurotoxinas e infecções virais também podem causar atrofia ou dano a estas células e, conseqüentemente, permitir que um indivíduo se torne vulnerável a transtornos psiquiátricos. Este tipo de interação está relacionada à diminuição do volume hipocâmpal bem como de sua função em pacientes com transtornos afetivos, o que explica a vulnerabilidade seletiva de certos indivíduos se tornarem depressivos. O tratamento prolongado com antidepressivos aumenta a expressão de BDNF, bem como de TrkB, e previne a sub-regulação do BDNF eliciada pelo estresse. Isso aumenta o crescimento de neurônios ou ajuda a reparar/proteger os mesmos de mais danos. A expressão aumentada de BDNF e TrkB parece ser mediada pela elevação sustentada de serotonina e norepinefrina e da cascata de ativação do AMPc. A normalização dos níveis de glicocorticóides pelo uso crônico de antidepressivos também pode contribuir para a recuperação de neurônios CA3 (Duman *et al.*, 1997).

1.7 A Δ FosB E SEU PAPEL NOS TRANSTORNOS DE ANSIEDADE

A proteína FosB é um fator de transcrição codificado pelo gene FosB no cromossomo 19 de seres humanos (19q13. 32). O termo Fos se refere a uma família de 4 genes: Fos, FosB, FosL1 e FosL2 (Morgan e Curran, 1995). Os fatores de transcrição da família Fos se heterodimerizam com as proteínas da família Jun,

a saber, JunD (Perez-Otano *et al.*, 1998), JunB (Chen *et al.*, 1995) e, em menor escala, c-Jun (Nakabeppu e Nathans, 1991). Os heterodímeros formam complexos ativadores da proteína-1 (AP-1) que se ligam aos sítios AP-1 das seqüências promotoras, promovendo a expressão ou a repressão gênica (Jorissen *et al.*, 2007). A variante Δ FosB é uma forma truncada do fator de transcrição FosB (Chen *et al.*, 1995; Laine *et al.*, 2017). Contudo, enquanto a FosB é transiente, a Δ FosB se acumula com a repetição do estímulo (Laine *et al.*, 2017). A estabilidade da Δ FosB deve-se à falta de dois domínios “degron” na região C-terminal, impedindo sua degradação pela ubiquitina e pelo proteasoma, e porque a Δ FosB tem um resíduo de serina (Ser27) que pode ser fosforilado por várias fosfocinases proteicas, tais como a caseína cinase 2 e a proteína cinase II dependente de calmodulina/ Ca^{2+} (CaMKII), conferindo proteção adicional à Δ FosB (Ruffle, 2014; Nestler, 2015) (Fig. 16).

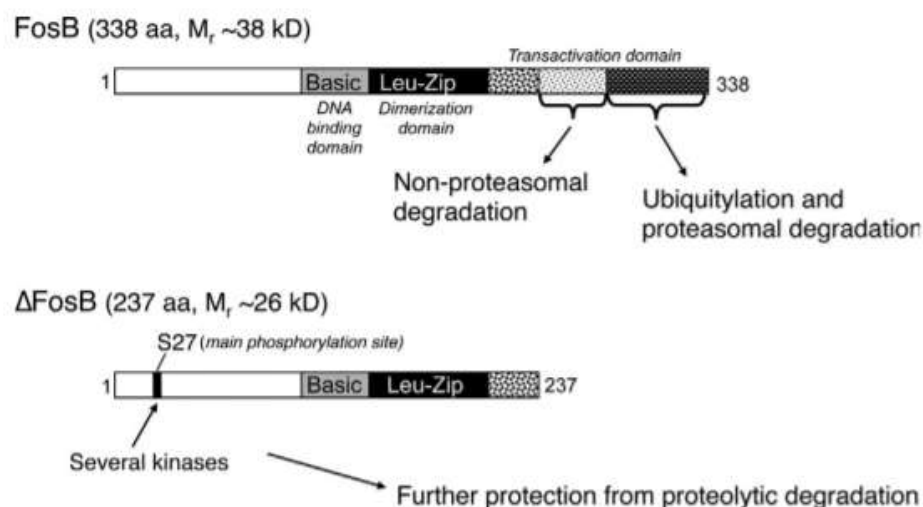


Figura 16. Bases bioquímicas da estabilidade da proteína Δ FosB. As proteínas Δ FosB e FosB são codificadas pelo gene FosB. A Δ FosB é gerada por emenda alternativa (*alternative splicing*) que resulta na perda de 101 aminoácidos localizados na região C-terminal da FosB. A perda de 101 aminoácidos na região C-terminal e a fosforilação do resíduo Ser27 por múltiplas fosfocinases protegem a Δ FosB da degradação (Nestler, 2015).

Δ FosB é uma proteína de 237 aminoácidos que é gerada pela emenda alternativa (*alternative splicing*) do gene FosB e que está implicada em numerosas alterações celulares e moleculares (Ruffle, 2014). A via da fosfocinase proteica A (PKA) também pode estar implicada nessas alterações (Boundy *et al.*, 1998). As alterações da expressão gênica incluem receptores, proteínas sinápticas, canais

iônicos, moléculas sinalizadoras intracelulares e peptídeos citoesqueléticos (McClung e Nestler, 2003; Winstanley *et al.*, 2007). Estudos recentes mostraram que a Δ FosB também tem influência significativa em mecanismos epigenéticos mediante a alteração da expressão gênica e a modificação das histonas. Como a Δ FosB também é um fator de transcrição, algumas das mudanças moleculares e comportamentais relacionadas à sua expressão podem ser devidas às alterações epigenéticas (Renthal *et al.*, 2007; Tsankova *et al.*, 2007; Anier *et al.*, 2010). As características únicas da Δ FosB colocam-na numa posição privilegiada para mediar os processos adaptativos de longo prazo do sistema nervoso central.

De fato, enquanto a Δ FosB acumula-se no córtex frontal, núcleo acumbens, amígdala basolateral e córtex cingulado anterior, em vários modelos de estresse crônico, incluindo o estresse crônico moderado imprevisível, estresse de restrição, e estresse de derrota social (Perrotti *et al.*, 2004; Vialou *et al.*, 2010; Lehmann e Herkenham, 2011), a Δ FosB foi reduzida no núcleo acumbens de camundongos submetidos ao isolamento social quando adultos (ISA) (Vialou *et al.*, 2010). Ainda, muitos estudos sugerem que a Δ FosB é sub-regulada em modelos de estresse e depressão e parece desempenhar um papel importante nas respostas de resiliência e no efeito dos antidepressivos. Nestler (2015) mostrou que a administração crônica de drogas antidepressivas induz a Δ FosB no núcleo acumbens. Além disso, a autópsia na mesma região em pacientes deprimidos revelou níveis reduzidos de Δ FosB.

O papel da Δ FosB também foi investigado em modelos clássicos de estresse inescapável como o “desamparo aprendido” (*learned helplessness*). O desamparo aprendido é sensível aos antidepressivos e é considerado um modelo válido de depressão em roedores. Berton e colaboradores (2007) mostraram que a expressão de Δ FosB está aumentada em neurônios de SP da MCPA de ratos resilientes aos choques inescapáveis. Adicionalmente, mostraram que o aumento da Δ FosB está inversamente correlacionado aos níveis da SP dos mesmos neurônios. Propuseram, portanto, que o aumento da expressão de Δ FosB nos ratos resilientes faz parte de um mecanismo adaptativo que promove a resiliência ao choque inescapável, inibindo a expressão de SP de neurônios periaquedutais que

se projetam ao núcleo acumbens. Como a SP é um neurotransmissor excitatório (Drew *et al.*, 2005), este modelo supõe a presença de um interneurônio inibitório no núcleo acumbens.

Mais recentemente, Lopes e colaboradores (2018) examinaram os efeitos de um ambiente enriquecido nas respostas de ansiedade (esquiva do braço aberto) e pânico (fuga do braço aberto) de ratos expostos ao labirinto em T-elevado (LTE) e nos níveis de Δ FosB de várias regiões do cérebro. Estes autores mostraram que embora a exposição ao ambiente enriquecido tenha reduzido a resposta de esquiva (ansiedade) dos ratos expostos ao LTE, a resposta de fuga (pânico) permaneceu inalterada. Mais importante, a exposição ao ambiente enriquecido produziu reduções diferenciadas da imunoreatividade à Δ FosB de várias regiões do cérebro e, em particular, da MCPA dorsomedial nos ratos expostos ao braço aberto do LTE (tarefa de fuga).

Embora a expressão cerebral de Δ FosB tenha sido examinada em vários modelos de estresse, ansiedade e depressão, não há estudos sobre sua expressão em regiões relacionadas ao pânico (por exemplo, a MCPD) de ratos adultos que foram submetidos ao estresse neonatal.

1.8 COMORBIDADE DO PÂNICO COM OUTROS TRANSTORNOS PSQUIÁTRICOS

Recentemente, tem sido dada uma importância cada vez maior à comorbidade dos transtornos psiquiátricos. Em particular, os transtornos de ansiedade, depressão e pânico são altamente comórbidos a despeito das diferenças marcantes no diagnóstico e prognóstico destes transtornos isoladamente. Pacientes de pânico também se queixam freqüentemente de “ansiedade antecipatória”, isto é, do medo antecipado da falta de amparo na eventualidade de um AP, uma condição que pode agravar-se numa agorafobia incapacitante.

Alguns autores sugerem ainda que a comorbidade do TP e agorafobia está associada à presença de depressão (Thompson *et al.*, 1989; Angst e Wicki, 1993).

Em particular, estudos de acompanhamento (*follow-up*) com entrevistas clínicas mostraram que 22% dos pacientes diagnosticados apenas como depressivos aos 20 anos de idade desenvolveram TP aos 30 anos. Destes 7% apresentaram apenas TP (*uncomplicated panic*) e 15% TP e depressão (Angst e Wicki, 1993) (Fig. 17A). Por outro lado, 46% dos pacientes diagnosticados com TP simples aos 20 anos de idade desenvolveram depressão aos 30 anos, tanto isoladamente (31%) quanto associada ao TP (15%). Também foram observadas altas taxas de remissão do pânico (54%) e da depressão (40%) (Fig. 17B).

Estes autores também observaram que 41% e 95% dos pacientes com TP desenvolveram depressão no ano seguinte ou dez anos após o primeiro diagnóstico, respectivamente (note que a soma da porcentagem de todos os tipos de depressão está incorreta na Tabela 2. 7 do artigo original). Portanto, o TP simples é raramente encontrado na clínica.



Figura 17. Estudos longitudinais da comorbidade do transtorno do pânico e depressão. A) pacientes diagnosticados como depressivos aos 20 anos de idade, B) pacientes com diagnóstico de transtorno de pânico simples (*uncomplicated panic disorder*) aos 20 anos de idade (modificado de Angst e Wicki, 1993).

A ansiedade de separação da infância (ASI) também tem sido associada ao desenvolvimento do TP na vida adulta (Klein, 1964; R. G. Klein, 1995; Roberson-Nay *et al.*, 2012a). Embora níveis fisiológicos de ansiedade de separação sejam

cruciais para o desenvolvimento normal da criança (Bowlby, 1983), contribuindo para o estabelecimento do vínculo apropriado entre mãe e filho (Hock e Schirtzinger, 1992), a ASI é uma condição na qual as crianças demonstram sofrimento excessivo e recorrente em antecipação, ou durante, ou imediatamente após sua separação da figura de apego (mãe ou substituta) (APA, 2013). A ASI também tem sido associada a vivências infantis de estresse familiar (orfandade, divórcio, conflitos conjugais, etc) e à depressão (Cassano *et al.*, 1989; Klein, 1993; Klein, 1995; Blandin *et al.*, 1994; Gorman e Coplan, 1996; Johnson e Lydiard; 1998; Ballenger, 1998; Dunner, 1998, 2001; Kaufman e Charney, 2000; Preter *et al.*, 2008, 2011). Portanto, a ASI é um conjunto de sintomas e comportamentos que refletem uma ativação anormal de um sistema de alarme que protege a criança de rupturas reais, ou potenciais dos laços familiares (Bowlby, 1983; Klein R., 1995). Esta síndrome tem características específicas, diferindo do transtorno superansioso da infância (*children overanxious disorder*) (Roberson-Nay *et al.*, 2012a).

A hipótese de que a ASI predispõe ao desenvolvimento do TP na vida adulta foi primeiramente formulada por Donald Klein (1964) após constatar que 50% de 32 pacientes agorafóbicos haviam sofrido ASI tão intensa que os impediu de comparecer à escola (recusa escolar). Silove e colaboradores (1996) sugeriram, adicionalmente, que a ASI se relaciona preferencialmente ao pânico, mas não à agorafobia. Por sua vez, Kagan e colaboradores (1988) propuseram que pacientes com TP desenvolvem primeiramente a ASI e, em seguida, fobia social e TP na adolescência e na vida adulta, respectivamente.

Em particular, Rachel G. Klein (1995) relatou que o TP foi o único diagnóstico psiquiátrico estatisticamente significativo ($P=0,05$) de indivíduos adultos (7% nos probandos versus 0% nos controles) no único estudo duplo-cego de acompanhamento (*follow-up*) por 15 anos de entrevistas clínicas de 54 pré-adolescentes que apresentavam intensa recusa escolar, um sintoma típico da ASI. Embora estes pacientes também tenham apresentado um número maior ($P<0,02$) de hospitalizações devidas a crises depressivas (14% versus 1,7%), o diagnóstico de depressão maior (DM) apresentou aumentos apenas marginais ($P=0,10$). De forma similar, Angst e Wicki (1993) observaram que os pacientes com TP apresentam principalmente episódios de “depressão breve recorrente”

(hospitalizações). A “hipótese da ansiedade de separação” também foi fortemente apoiada pela eficácia comprovada da imipramina no TP e na ASI (Bernstein *et al.*, 2000; Gittelman-Klein e Klein, 1973).

Notavelmente, estudos epidemiológicos de larga escala em gêmeos monozigóticos e dizigóticos (n=1437 pares) sugerem que o mesmo conjunto genes determina 39% da ASI e 35% dos AP na vida adulta. Estes autores também mostraram que enquanto o ambiente adulto (não compartilhado) determina 60% dos AP, o ambiente infantil (compartilhado) determinaria apenas 1,2% destes ataques (Roberson-Nay *et al.*, 2012a).

O estresse neonatal também pode influir no desenvolvimento da ansiedade na vida adulta. De fato, vários estudos relataram que ratos submetidos à privação materna ao longo do período de amamentação apresentaram níveis elevados de ansiedade quando adultos (Wigger e Neumann, 1999; Huot *et al.*, 2002; Rentesi *et al.*, 2010). Contrariamente, no entanto, também há vários estudos mostrando que os índices de ansiedade não estão alterados (Slotten *et al.*, 2006; Hulshof *et al.*, 2011; Quintino-dos-Santos *et al.*, 2014; Borges-Aguiar *et al.*, 2018), ou estão até mesmo reduzidos (Roman *et al.*, 2006) em ratos adultos submetidos ao isolamento social neonatal (ISN). A variabilidade dos efeitos do ISN na ansiedade experimental pode ser devida à diversidade dos modelos de separação materna (isolamento individual ou de toda a ninhada), à duração da separação e ao período da vida em que a separação foi realizada, dentre outros fatores (controle de temperatura ou da comunicação sonora, visual ou olfativa com a mãe, etc) (Lehman e Feldon, 2000). De fato, enquanto os períodos curtos (3-15 min) de separação materna reduziram as respostas comportamentais e endócrinas a estressores na idade adulta (Meaney *et al.*, 1992; 1996), períodos prolongados (3-6 h) aumentaram estas respostas (Plotsky e Meaney, 1993; Van Oers *et al.*, 1998; Francis e Meaney, 1999).

Além do tempo de contato entre a mãe e o filhote (Meaney, 2001), os efeitos da separação também podem ser influenciados por outros fatores. Por exemplo, Suchecki e colaboradores (1993a,b; 1995) mostraram que a regulação materna do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) do filhote ocorre em múltiplos níveis, nos quais a alimentação regula a secreção de CORT, as carícias anogenitais inibem a

secreção de corticotrofina (ACTH) e o contato físico regula a secreção de CRH. No mesmo sentido, Hofer (1996) relatou que dentre inúmeras variáveis que foram combinadas em complexidade crescente (temperatura dos filhotes, do ambiente ou da mãe, propriedades do objeto substitutivo da mãe, etc.), a disponibilidade de um pequeno “tapete” de pelo sintético foi a única variável que, isoladamente, reduziu a vocalização dos filhotes privados.

Embora saibamos muito pouco sobre a neurobiologia da comorbidade do TP com os outros transtornos psiquiátricos, a versão ampliada da teoria do AFS (Preter e Klein, 2008; Preter *et al.*, 2011) sugere que tanto o TP quanto a ASI estejam relacionados a uma deficiência de mecanismos opióides inibitórios que são comuns aos sistemas de alarme de sufocamento e de separação. De fato, Preter e colaboradores (2011) mostraram que voluntários sadios pré-tratados com um antagonista de receptores opióides (naloxona) apresentam resposta respiratórias similares às dos AP eliciados pela infusão intravenosa de LAC. No mesmo sentido, experimentos pré-clínicos de Roncon e colaboradores (2012, 2013) mostraram que os efeitos panicolíticos da fluoxetina em ratos expostos ao LTE são antagonizados pelo pré-tratamento dos ratos com naloxona. Esses dados sugerem uma interação relevante dos mecanismos serotoninérgicos e opióides da MCPA (Graeff, 2017).

Embora Roberson-Nay e colaboradores (2012b) não tenham detectado uma influência importante do ambiente infantil nos AP da vida adulta, estudos pré-clínicos mostraram que ratos submetidos ao ISN, um modelo epigenético de ASI, apresentam respostas respiratórias aumentadas à hipóxia (machos) e à hipercapnia (fêmeas) quando adultos (Dumont e Kinkead, 2010). É importante notar que estes estudos realizaram o ISN entre o 4^o e o 14^o dias pós-natais (PN), ou seja, no “período hiporresponsivo ao estresse” no qual a mãe exerce um papel crucial na proteção do filhote contra os efeitos nocivos do estresse. No mesmo sentido, estudos do nosso laboratório (Quintino-dos-Santos *et al.*, 2014) mostraram que enquanto as respostas de ansiedade e depressão não foram alteradas, os AP à estimulação da MCPD foram facilitados nos ratos adultos submetidos ao ISN (separação da mãe e dos irmãos) de 3 h diárias ao longo da lactação (PN2–PN21). Embora os últimos resultados salientem a especificidade dos efeitos panicogênicos do ISN, não está claro se a facilitação dos AP foi devida à separação materna em

si, ao excesso de atenção materna dedicada ao filhote reunido, ou à interação do estresse infantil de separação materna com o estresse adulto da cirurgia de implantação dos eletrodos.

Estudos mais recentes do nosso laboratório (Borges-Aguiar *et al.*, 2018) mostraram, no entanto, que o pânico somente é facilitado nos ratos que foram submetidos à privação materna (PM) de 3 h diárias no 'período hiporresponsivo ao estresse' (PN4-PN14) (note que na PM toda ninhada é transferida à caixa de separação). Adicionalmente, a utilização de mães conscientes ou anestesiadas no momento da reunião mostrou que o cuidado materno tem um papel menor, porém importante, para a expressão dos efeitos da PM no pânico e depressão de ratos adultos. No conjunto, estes resultados sugerem que os efeitos tardios da PM dependem da interação do período do isolamento com a atenção dada ao filhote no momento da reunião. Em contraste, filhotes submetidos à PM ao longo de toda lactação (PN2-PN21) não apresentaram efeito algum nas respostas de pânico (MCPD) e ansiedade (LCE) e apresentaram índices até mesmo menores de depressão no teste de natação forçada (TNF) e teste de preferência por sacarose (TPS). Estes e outros estudos (Enthoven *et al.*, 2008; Daskalakis *et al.*, 2011) sugerem que os filhotes habituem-se às PM repetidas, tornando-se até mesmo mais resilientes que os controles. Estes resultados justificam a utilização de outros protocolos de trauma infantil, como por exemplo, a PM de 24 h em PN9 ou PN10 (final do período hiporresponsivo ao estresse) (Wertheime *et al.*, 2016; Vázquez *et al.*, 2006).

Os resultados acima ensejam a análise das alterações dos níveis de 5-HT e da expressão dos receptores serotoninérgicos e de outros sistemas neuroquímicos da MCPD que possam estar diretamente envolvidos nos efeitos panicogênicos do ISN e da PM. Por outro lado, embora a MCPA seja tradicionalmente subdividida em colunas longitudinais dispostas ao longo do aqueduto (Bandler *et al.*, 1991; Bandler and Shipley, 1994; Bandler and Keay, 1996), estudos neuroquímicos indicam subdivisões adicionais, bem como núcleos diferenciados no interior de uma mesma coluna. Em particular, enquanto a MCPAdI cora-se intensamente para a sintetase do óxido nítrico (NOS), colecistocinina, acetilcolinesterase e metilencefalina, mas carece do transportador de glicina-2 e da citocromo oxidase, a MCPAdm e a MCPAI

coram-se intensivamente para as duas últimas substâncias e apenas levemente para aquelas que apresentam alta concentração na MCPAdl (por exemplo, a NOS) (Keay e Bandler, 2004).

Por outro lado, no seu estudo pioneiro sobre a “neuroquímica da solidão”, Brodin e colaboradores (1994) mostraram que o isolamento social de ratos adultos (ISA) por 1 ou 7 dias causa aumentos significativos (~25%) dos níveis periaquedutais de SP. O aumento dos níveis de SP foi revertido pela administração de diazepam antes do sacrifício e pode estar associado aos efeitos pró-pânico da ASI. No mesmo sentido, Berton e colaboradores (2007) mostraram que a MCPA de camundongos resilientes ao choque inescapável (menos depressivos) apresentam níveis reduzidos de SP. Mais importante, os últimos autores apresentaram evidências convincentes de que este efeito foi devido à expressão aumentada do peptídeo Δ FosB. Estes estudos levantam a questão se os ratos submetidos ao estresse de separação na infância ou ao isolamento na vida adulta apresentam níveis alterados de SP e/ou Δ FosB na MCPD.

1.9 MECANISMOS NEUROMOLECULARES DA SEPARAÇÃO MATERNA NEONATAL

Estudos clínicos e epidemiológicos fornecem evidências abundantes da associação entre estresse infantil com sintomas e distúrbios psiquiátricos. Além de evidências convincentes da enorme plasticidade do cérebro do rato, tanto na infância como na vida adulta, os efeitos duradouros do estresse no desenvolvimento do cérebro e dos sistemas efetores, incluindo os sistemas autônomo, endócrino e imune, podem resultar no desenvolvimento de fenótipos vulneráveis a vários distúrbios comportamentais. Esta hipótese apóia-se em extensa literatura sobre os efeitos adversos do estresse na infância, tais como separação ou negligência maternas, nas regiões cerebrais envolvidas nas respostas neuroendócrinas, autonômicas e emocionais, incluindo o medo (Kaffman e Meaney, 2007; Lupien *et al.*, 2009; Plotsky *et al.*, 2001).

Os mecanismos neuromoleculares subjacentes aos eventos estressantes na infância têm sido objeto de vários estudos em modelos animais de estresse de

separação em neonatos. Em particular, existem evidências de que os efeitos tardios destes procedimentos resultam da interrupção do desenvolvimento normal do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA). De fato, enquanto o eixo HPA é hiporresponsivo nas duas primeiras semanas de vida (*stress hyporesponsive period*, SHRP), ele se torna plenamente responsivo após uma PM de 24 h no 3º ou 10º dia pós-natal (Levine *et al.*, 1991; Suchecki *et al.*, 1993, 1995; Levine, 2001, 2002).

A separação materna (SM) também pode provocar alterações em diversos neurotransmissores. Estudos recentes relataram aumentos da taxa de renovação da dopamina (DA) no estriado, córtex pré-frontal e amígdala de ratos adultos que foram submetidos à PM por 24 h em PN9. Estes efeitos parecem ser responsáveis pelas alterações elevadas da atividade locomotora e da impulsividade destes animais (Rentesi *et al.*, 2013). De forma similar, Récamier-Carballo e colaboradores (2017) mostraram que enquanto os níveis de DA dos camundongos submetidos à SM (3 h, PN8 a PN21) foram marcadamente aumentados na amígdala, eles sofreram aumentos apenas leves no hipocampo e foram até mesmo reduzidos no córtex frontal. Estes autores também observaram que o estresse de natação forçada somente aumentou os níveis de DA no hipocampo dos animais submetido à PM. Adicionalmente, foi observado que ratos adultos submetidos à PM apresentaram maior sensibilidade aos efeitos de agentes dopaminérgicos como a apomorfina e a anfetamina (Ellenbroek e Cools, 2004; Rentesi *et al.*, 2013).

O estresse de separação também afeta o sistema canabinóide. Em particular, foi relatado que a PM em PN13 provoca alterações específicas no desenvolvimento do sistema endocanabinóide, tais como a sub-regulação do receptor CB1 no hipocampo e o aumento dos níveis de 2-araquidonil glicerol (2-AG) devido ao aumento ou redução da expressão das enzimas responsáveis pela sua síntese ou degradação, respectivamente (Llorente *et al.*, 2010; Marco *et al.*, 2015). Contudo, Suárez e colaboradores (2009) relataram que ratos submetidos à PM de 24 h em PN9, apresentaram sobre-regulação do receptor CB2 no hipocampo (regiões CA1, CA3 e giro denteado) nos ratos com 13 dias de idade (PN13).

Os resultados também são controversos em relação ao sistema

serotonérgico. Existem evidências sugerindo aumentos da 5-HT e do seu metabólito 5-HIAA no tronco encefálico de ratos separados da mãe (3 h, PN2 a PN12), após administração sistêmica de buspirona (O'Mahony *et al.*, 2008). Bravo e colaboradores (2014) mostraram que embora a expressão do receptor 5-HT_{1A} no hipocampo de ratos adultos não tenha sido afetada pela PM (3 h, PN2 a PN12), sua expressão foi aumentada nas regiões basomedial, basolateral e central da amígdala. Em contraste, tanto a expressão do receptor 5-HT_{1A} quanto aquela do SERT foram reduzidas no NDR. Não obstante, Arborelius e colaboradores (2004) relataram que os ratos submetidos ao ISN (3 h, PN2-PN14) apresentaram respostas aumentadas a um ISRS (citalopram). Mais importante, Récamier-Carballo e colaboradores (2017) relataram que enquanto os níveis de 5-HT dos camundongos submetidos à SM (3 h, PN8 a PN21) foram aumentados no hipocampo e, marcadamente na amígdala, eles foram reduzidos no córtex frontal, tanto no repouso como no estresse de natalidade forçada. Estudos anteriores mostraram que a amplitude da corrente evocada pela 5-HT em neurônios piramidais do CPF medial (CPFm) também está inalterada nos ratos adultos submetidos à PM (3 h, PN2-PN14) quando neonatos (Goodfellow *et al.*, 2009). Contudo, a corrente à estimulação dos receptores 5-HT_{1A} foi abolida em ratos submetidos à privação materna nas duas primeiras semanas de vida e ao isolamento quando adultos, sugerindo a interação entre estresse infantil e experiências da vida adulta. Resultados mais recentes do último grupo mostram, no entanto, que embora a excitabilidade intrínseca dos neurônios do CPFm não esteja afetada, a neurotransmissão 5-HT₂ destes neurônios está facilitada tanto *in vitro* (*patch-clamp*) quanto *in vivo* (*c-fos*) nos ratos submetidos à SM quando neonatos (Benekareddy *et al.*, 2010). Notavelmente, estes efeitos ocorreram a despeito da ausência de qualquer alteração significativa na expressão dos receptores 5-HT_{2A/C} do CPFm. Conforme revelado por métodos de microarranjo (*microarray*), estes autores mostraram que os efeitos da PM (3 h, PN2-PN14) parecem ter sido devidos ao aumento da expressão dos genes implicados nos processos de desenvolvimento celular e de transdução e sinalização intracelular mediada por proteínas-G. Outros estudos mostraram alteração nos receptores 5-HT após a PM aguda, Vázquez e colaboradores (2002) relataram que animais privados por 24 horas em PN13 e decapitados imediatamente após o término da separação, apresentaram aumento na expressão de RNAm de 5HT_{1A} no hipocampo e aumento de 5HT_{2A} no córtex no PN14.

Os efeitos tardios do estresse neonatal também parecem ser devidos a alterações de vários neuropeptídeos. Recentemente, muitos pesquisadores têm sugerido que o BDNF seja o mediador das alterações estruturais desencadeadas pelos eventos adversos da infância (Cirulli *et al.*, 2009; Cowansage *et al.*, 2010; de Lima *et al.*, 2011; Pinheiro *et al.*, 2012, 2015; Li *et al.*, 2016). Estudos clínicos em pacientes depressivos tratados com ISRSs mostraram que o aumento dos níveis plasmáticos de BDNF somente foi observado nos pacientes que não sofreram abuso infantil (van der Meij *et al.*, 2014). Por outro lado, Pinheiro e colaboradores (2015) mostraram que a PM de ratos neonatos (3h, PN1 a PN14) reduz o BDNF hipocampal no indivíduo adulto. Wang e colaboradores (2015) mostraram, no entanto, que estas alterações dependem da idade do rato. Estes pesquisadores observaram que ratos submetidos ao ISN (4h, PN1 a PN21) apresentaram níveis elevados de BDNF no hipocampo (CA1 e giro denteado) na adolescência (PN35), enquanto a expressão do BDNF no CPFm de ratos adultos (PN56) mostrou-se reduzida. Mais recentemente, Récamier-Carballo e colaboradores (2017) relataram que enquanto os níveis de BDNF de camundongos submetidos à SM (3 h, PN8 a PN21) foram aumentados na amígdala e, acentuadamente, no hipocampo, eles foram reduzidos no córtex frontal. Curiosamente, no entanto, o estresse de natação forçada somente aumentou o BDNF no hipocampo e no córtex frontal dos camundongos não-separados.

Por outro lado, sabe-se muito pouco ou quase nada sobre os efeitos do estresse neonatal nos níveis de SP e Δ FosB nas regiões cerebrais envolvidas com a emoção. Não obstante, estudos pré-clínicos em cobaias mostraram que a vocalização à SM é atenuada tanto pelo antagonista do receptor NK-1 (L733,060) quanto pelos antidepressivos e ansiolíticos (Kramer *et al.*, 1998), indicando o possível envolvimento do receptor de SP nas respostas agudas ao estresse de SM.

Por outro lado, vários estudos sugerem que os efeitos tardios do estresse infantil sejam devidos a alterações neuromoleculares e sinápticas devidas a processos epigenéticos (Bock *et al.*, 2014). Mecanismos epigenéticos são considerados a interface entre as influências do ambiente infantil e processos de desenvolvimento geneticamente programados, incluindo a maturação de dendritos

neuronal e da conectividade sináptica. Esse processo bioquímico fornece uma base racional para compreendermos a influência do ambiente na expressão de determinados genes e a herança transgeracional (não-genômica) de características adquiridas. Estes mecanismos poderiam explicar como os efeitos do estresse neonatal poderiam se estender ao longo da vida. Ao nível molecular, os mecanismos epigenéticos são modificações bioquímicas no DNA e das histonas. As alterações no DNA incluem a metilação em regiões CpG (citosina seguido de guanina, 5'-C-fosfato-G-3') e da acetilação, fosforilação ou metilação das histonas (Bock *et al.*, 2014; Lutz e Turecki, 2014; Graeff e Mansuy, 2008). A metilação do DNA em regiões promotoras do gene prejudica a habilidade dos fatores de transcrição em se ligar em regiões específicas do DNA e promover a expressão gênica.

Vários estudos mostram mudanças estruturais em neurônios, alterações na secreção de hormônios, citocinas e neurotransmissores e alterações epigenéticas como a metilação do DNA e modificações das histonas no estresse infantil (Hennessy *et al.*, 2010; Kaffman and Meaney, 2007; Veenema, 2009). Estas possibilidades foram corroboradas por vários estudos. Por exemplo, Roth e colaboradores (2009) mostraram que ratos neonatos expostos a mães negligentes apresentaram mudanças persistentes na metilação do DNA do gene do BDNF, que resultaram na expressão alterada de BDNF no CPF quando adultos. Kundakovic e colaboradores (2013) mostraram, em adição, o aumento da metilação no promotor do BDNF no hipocampo de camundongos BALB/c (linhagem modificada geneticamente com fenótipo ansioso) submetidos à PM. Em relação às modificações das histonas, Suri e colaboradores (2013) relataram que ratos neonatos separados da mãe exibiram níveis reduzidos da metilação das histonas do gene do BDNF no hipocampo, em ratos com 2 meses de idade. Contrariamente, mostraram um aumento desta metilação em ratos com 15 meses, na mesma região. No conjunto, esses estudos indicam que o estresse de ratos neonatos ou jovens resulta em alterações epigenéticas do gene do BDNF. Embora a expressão do BDNF tenha sido examinada em várias áreas do cérebro de animais submetidos à PM e ao ISN, ela não foi examinada na MCPD.

Várias outras proteínas e neurotransmissores podem estar envolvidos nos

efeitos epigenéticos da SM. Franklin e colaboradores (2010) mostraram que animais submetidos à PM (3 h, PN1-PN14) apresentaram a metilação do DNA diminuída para o gene do receptor do fator de liberação de corticotrofina e o contrário para os genes de receptores canabinóides (CB-1) e para a proteína de ligação à região CpG metilada do DNA (MeCP2, proteína associada a comportamentos emocionais/depressivos). Já para receptores 5-HT_{1A} e para o gene da monoaminaoxidase A (MAO-A) não foram encontradas alteração alguma.

Por outro lado, os estudos clássicos de psiquiatria de John Bowlby (1983, 1988) sugerem que o cuidado materno apropriado resulta em adultos menos ansiosos e mais resilientes. Em animais, as alterações epigenéticas devidas ao cuidado materno foram demonstradas por Liu e colaboradores (1997). Estes pesquisadores mostraram que filhotes de mães com comportamento acentuado de lamber e acariciar (*grooming*) apresentavam uma redução da reatividade do eixo HPA frente aos estímulos estressores, uma diminuição dos comportamentos ansiosos e um aprendizado superior na vida adulta. Em outros experimentos do mesmo grupo, mostraram que o excesso de zelo materno resultou na expressão aumentada de receptores glicocorticóides (GR) de baixa afinidade no hipocampo dos seus descendentes, potenciando a retroalimentação negativa do eixo HPA nas situações de estresse. Curiosamente, esses efeitos foram correlacionados com a diminuição dos níveis de metilação da região exon-1₇ do promotor do GR (Meaney, 2001; Weaver *et al.*, 2004).

Champagne e Curley (2009) sugerem, por outro lado, que os mecanismos epigenéticos nos primeiros anos da vida podem desempenhar um papel crítico na formação de diferenças individuais estáveis na expressão gênica, na fisiologia e no comportamento (Fig. 18). Para estes pesquisadores os mecanismos epigenéticos representam apenas um passo de complexas adaptações cerebrais diante do estresse neonatal, as quais incluem mudanças estruturais e funcionais de plasticidade sináptica e de padrões de conectividade. No entanto, não está claro como a atividade neuroquímica em diferentes áreas do cérebro é afetada pelo estresse no início da vida e se essas alterações permanecem ou contribuem para as respostas ao estresse de indivíduos adultos.

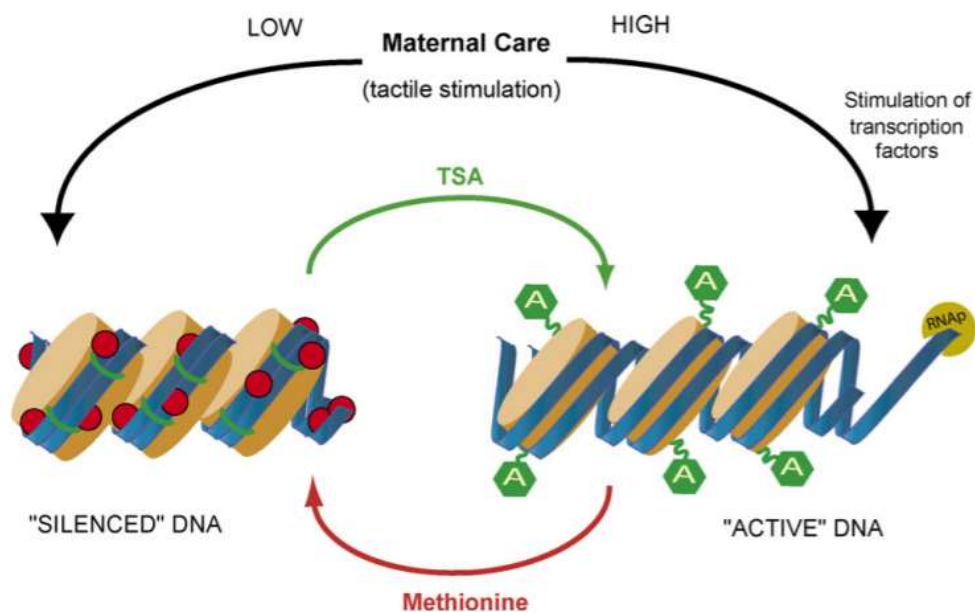


Figura 18. A modificação epigenética do DNA. O DNA "silenciado" é fortemente metilado (círculos vermelhos) com cauda de histona desacetilada (bandas verdes). O DNA (faixas azuis) é ligado às proteínas histonas (cilindros marrons) impedindo a transcrição por RNA polimerase (RNAP). O DNA "ativo" é desmetilado com caudas de histonas acetiladas (verde "A") permitindo a transcrição por RNA polimerase. A expressão dos genes pode ser ajustada por fatores ambientais, como cuidado materno, drogas, dieta e agentes farmacológicos. No rato, níveis elevados do cuidado materno leva à redução à longo prazo na metilação do gene GR (receptor de glicocorticoides) no hipocampo. Níveis baixos de cuidado materno levam à metilação e desacetilação dos mesmos promotores do gene GR. Essas modificações epigenéticas induzidas pelo ambiente podem ser parcialmente revertidas em animais adultos através da administração central de agentes farmacológicos, como o inibidor de histona desacetilase tricostatina A (TSA) e doador de metil metionina (Champagne, Curley, 2009).

2.0 O ISOLAMENTO SOCIAL ADULTO E SEUS EFEITOS NEUROBIOLÓGICOS

Embora seja amplamente aceito que o ser humano seja uma espécie gregária e que o isolamento social tenha efeitos negativos sobre a saúde do indivíduo (Eisenberger, 2012; Leigh-Hunt *et al.*, 2017), "viver sozinho" não pode ser igualado a "sentir-se sozinho". De fato, embora alguns indivíduos descrevam experiências de perda ou de privação dos pais como "dolorosas", outros reagem de forma limitada a estes eventos. Em particular, o DSM-V (2013) considera que embora o luto à perda de um ente querido seja uma resposta culturalmente aceita, o "transtorno de luto complexo persistente" (*persistent complex bereavement disorder*) é diagnosticado quando o luto persiste por pelo menos 12 meses (ou 6 meses em crianças). Este transtorno também se caracteriza pela dificuldade em aceitar que o indivíduo tenha falecido (por exemplo, continuando a preparar suas refeições ou a arrumar sua cama), por lembranças angustiantes do falecido, pelo sentimento de raiva à perda,

por avaliações inadequadas sobre suas relações com o falecido ou em relação à sua morte e pela evitação de quaisquer lembranças do evento. Os indivíduos também relatam desejo de morrer para reencontrar o falecido, desconfiam das outras pessoas, sentem-se isolados, acreditam que a vida perdeu o sentido, experimentam alterações de identidade (como se houvessem perdido uma parte de si mesmo), e têm dificuldade em se envolver em atividades, buscar relacionamentos ou planejar o futuro. Contudo, ainda não sabemos por que reagimos tão fortemente à ruptura dos laços sociais (Eisenberger, 2012).

Por outro lado, enquanto o relacionamento social pode ter um efeito protetor contra os efeitos nocivos do estresse (Thorsteinsson *et al.*, 1998; Heinrichs *et al.*, 2003; Steptoe *et al.*, 2013), o isolamento social e o sentimento de solidão são, por si mesmos, estressores, tendo sido associados às respostas neuroendócrinas do estresse (Cacioppo *et al.*, 2015) e aos transtornos mentais como ansiedade, depressão e déficit cognitivo (Leigh-Hunt *et al.*, 2017). Embora parte dos efeitos benéficos do suporte social estejam bem documentados, como por exemplo o aumento da longevidade em humanos (Holt-Lunstad *et al.*, 2010; Beery & Kaufer, 2015), os mecanismos destes efeitos abordam principalmente a resposta do eixo HPA durante o isolamento e o papel da ocitocina e da vasopressina na formação dos laços sociais (Beery & Kaufer, 2015).

As espécies gregárias possuem mecanismos neurais, hormonais e celulares que evoluíram como sistemas dedicados à manutenção da prole e do comportamento social. Embora a criação dos filhos e as relações sociais estejam entre as principais atividades dos seres humanos, os mecanismos cerebrais envolvidos permanecem em grande parte desconhecidos. Não obstante, existe um amplo consenso que o isolamento social tenha efeitos negativos para a saúde humana (Heinrich e Gullone, 2006; Shahr-Gold *et al.*, 2013). Porém, os mecanismos biológicos subjacentes aos efeitos do isolamento social na saúde humana ainda são objeto de estudo.

Estudos sugerem que o isolamento social possa ser um fator de risco para transtornos psiquiátricos, incluindo a depressão. Sharp e Lipsky (2002) mostraram num estudo de *follow-up* de longo prazo que pacientes depressivos socialmente

isolados apresentam alto risco de recorrência de episódios depressivos. Por sua vez, Riise e Lund (2001) mostraram que a interação social promove a recuperação mais rápida de pacientes com depressão.

O interesse inicial pelos efeitos do isolamento social foi motivado pela observação dos comportamentos de crianças internadas separadas dos seus progenitores (Spitz, 1946; Bowlby, 1973, 1980, 1982) e pelo comportamento de primatas em cativeiro (Harlow *et al.*, 1971). Em ratos, o modelo de isolamento social adulto (ISA) potencializa as respostas duradouras da função cerebral e da atividade do HPA ao estresse (Murínová *et al.*, 2017; Burke *et al.*, 2017). Ratos são animais altamente sociáveis que exibem uma rica variedade de comportamentos interativos. Frequentemente, eles atacam as costas um do outro como se estivessem solicitando interação vigorosa; esses "contatos dorsais" podem ser facilmente quantificados e têm sido comumente usados como uma medida explícita de solicitações de brincadeira. Estas interações recreativas são denominadas de *rough-and-tumble play* (pega-pega) (Fig. 19) (Panksepp, 2005). A partir da segunda semana de vida os filhotes adquirem movimentação independente e começam a interagir ludicamente. Essas interações aumentam em complexidade durante o período pós-desmame. Na vida adulta, eles continuam a exibir atividades sociais e passam a apresentar uma preferência acentuada pelo contato físico com os seus pares. Vivem e dormem em grupos, estabelecem hierarquias de dominância e exibem comportamentos cooperativos. Essas relações sociais são importantes não só para o funcionamento da colônia, mas também para o bem-estar dos animais individuais (Rutte, Taborsky, 2007; Neumann, 2009).

O protocolo de ISA é um modelo de estresse que está associado a alterações comportamentais, incluindo tanto aumentos da atividade locomotora, do comportamento de conflito e agressão, do déficit no aprendizado e da perda de peso (Fone and Porkess, 2008) quanto de comportamentos depressivos e ansiosos (Robbins, 2016). Além disso, alguns estudos relatam alterações moleculares, tais como sinalização dopaminérgica reduzida (Heidbreder *et al.*, 2000), alterações da neurogênese (Famitafreshi *et al.*, 2015) e redução da atividade metabólica (medida pela citocromo oxidase e c-fos) na região CA1 do hipocampo (Zorzo *et al.*, 2019). Os efeitos do ISA também parecem estar relacionados à auto-administração de

drogas de abuso. Por exemplo, ratos isolados consumiram maior quantidade de etanol do que ratos controles que permaneceram junto aos seus pares (Schenk *et al.*, 1990).

Embora os mecanismos moleculares subjacentes aos efeitos do ISA permanecem amplamente obscuros, Brodin e colaboradores (1994) conduziram estudos pioneiros de radioimunoensaio sobre a neuroquímica do ISA. Estes pesquisadores mostraram que ratos isolados por 1 ou 7 dias, apresentavam aumentos significativos (~25%) da SP da MCPD. Mais notavelmente, eles mostraram que até mesmo uma separação aguda causava aumentos significativos dos níveis de somatostatina (~70%) da amígdala dos ratos remanescentes. Como forma de complementar nosso trabalho, replicamos os experimentos de Brodin e colaboradores (1994) com rt-PCR para comparar a expressão do RNAm da SP da MCPD dos ratos submetidos ao ISN e àquela da PM de 3 horas diárias de PN2 a PN21. Adicionalmente, também foram avaliadas as expressões dos receptores serotoninérgicos, do BDNF e da Δ FosB.



Figura 19. Comportamento de *rough-and-tumble play* (pega-pega). Duas principais posturas que são usadas para quantificar o comportamento de *rough-and-tumble play* (pega-pega) entre os ratos nos seus momentos de interação social (Jaak Panksepp, 2005, p. 284).

Desta forma, acreditamos que o presente estudo poderá contribuir no esclarecimento dos mecanismos neuromoleculares subjacentes tanto ao estresse de separação de neonatos (ISN e PM) como do estresse da separação de ratos adultos (ISA), ambos apontados como fatores de risco da ansiedade, pânico e

depressão.

2. REFERÊNCIAS

Aguiar MS, Brandão ML (1994) Conditioned place aversion produced by microinjection of substance P into the periaqueductal gray of rats. *Behav. Pharmacol.* 5: 369-373.

Aguiar MS, Brandão ML (1996) Effects of microinjections of the neuropeptide substance P in the dorsal periaqueductal gray on the behaviour of rats in the plus-maze test. *Physiol. Behav.* 60: 1183-1186.

Aid T, Kazantseva A, Piirsoo M, Palm K, Timmusk T (2007) Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited. *J. Neurosci. Res.* 85: 525-35.

Angst J, Wicki (1993) The epidemiology of frequent and less frequent panic attacks. Em Montgomery, S. A. (ed), *Psychopharmacology of Panic*. Oxford University Press, New York, 7-24.

Anier K, Malinovskaja K, Aonurm-Helm A, Zharkovsky A, Kalda A (2010) DNA methylation regulates cocaine-induced behavioral sensitization in mice. *Neuropsychopharmacol.* 35: 2450–2461.

Ansorge MS, Hen R, Gingrich JA (2007) Neurodevelopmental origins of depressive disorders. *Curr. Opin. Pharmacol.* 7 (1): 8–17.

APA (1980). *DSM III: Diagnostic and Statistical Manual for Mental Disorders*. Third Edition, American Psychiatric Association. Washington, DC.

APA (2000). *DSM IV-TR: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. Fourth Edition, American Psychiatric Association. Washington, DC.

APA (2013). *DSM V: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. Fifth Edition, American Psychiatric Association. Washington, DC.

Arborelius L, Hawks BW, Owens MJ, Plotsky PM, and Nemeroff CB (2004) Increased

responsiveness of presumed 5-HT cells to citalopram in adult rats subjected to prolonged maternal separation relative to brief separation. *Psychopharmacology (Berl.)* 176: 248–255.

Azmitia EC (1999) Serotonin neurons, neuroplasticity, and homeostasis of neural tissue. *Neuropsychopharmacology* 21 (2 Suppl): 33-45.

Ballenger JC (1998) Comorbidity of panic and depression: implications for clinical management. *Int. Clin. Psychopharmacol.* 13 (Suppl 4): 13-7.

Bandler R, Carrive P, Depaulis A (1991) Emerging principles of organization in the midbrain periaqueductal gray matter. In A. Depaulis and R. Bandler (Eds.). *The midbrain periaqueductal gray matter: functional, anatomical and neurochemical organization*. Plenum, New York: 1-8.

Bandler R, Keay KA (1996) Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray in the integration of emotional expression. *Prog Brain Res* 107: 285-300

Bandler R, Shipley MT (1994) Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? *Trends Neuroscience* 17 (9) : 379-89.

Barden N, Daigle M, Picard V, Di Paolo T (1983) Perturbation of Rat Brain Serotonergic Systems Results in an Inverse Relation Between Substance P and Serotonin Concentrations Measured in Discrete Nuclei. *Journal of Neurochemistry* 41: 834-840.

Barbaresi P (1998) Immunocytochemical localization of substance P receptor in rat periaqueductal gray matter: a light and electron microscopic study. *J Comp Neurol* 398: 473– 490.

Bathina S, Das UM (2015) Brain-derived neurotrophic factor and its clinical implications. *Archives of Medical Science* 6: 1164-1178.

Beery AK, Kaufer D (2015) Stress, social behavior, and resilience: insights from rodents. *Neurobiol Stress.* 1:116-27.

Benekareddy M, Goodfellow NM, Lambe EK, Vaidya VA (2010) Enhanced Function

of Prefrontal Serotonin 5-HT₂ Receptors in a Rat Model of Psychiatric Vulnerability. *The Journal of Neuroscience* 30 (36) : 12138 –12150.

Bernstein GA, Borchardt CM, Perwien AR, Crosby RD, Kushner MG, Thuras PD, Last CG (2000) Imipramine plus cognitive-behavioral therapy in the treatment of school refusal. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 39: 276-283.

Berton O, Covington HE, Ebner K, Tsankova NM, Carle TL, Ulery P, Bhonsle A, Barrot M, Krishnan V, Singewald GM, Singewald N, Birnbaum S, Neve RL, Nestler EJ (2007) Induction of deltaFosB in the periaqueductal gray by stress promotes active coping responses. *Neuron* 19, 55: 289-300.

Berry A, Bellisario V, Capoccia S, Tirassa P, Calza A, Alleva E, Cirulli F (2012) Social deprivation stress is a triggering factor for the emergence of anxiety- and depression-like behaviours and leads to reduced brain BDNF levels in C57BL/6J mice. *Psychoneuroendocrinology* 37: 762-772.

Bittencourt AS, Carobrez AP, Zamprogno LP, Tufik S, Schenberg LC (2004) Organization of single components of defensive behaviors within distinct columns of periaqueductal gray matter of the rat: role of N-methyl-D-aspartic acid glutamate receptors. *Neuroscience* 125: 71-89.

Blanchard R, Flannelly KJ, Blanchard C (1986) Defensive behavior of laboratory and wild *Rattus norvegicus*. *J Comp Psychol.* 100: 101-107.

Blandin N, Parquet PJ, Bailly D (1994) Separation anxiety. Theoretical considerations. *Encephale.* 20: 121-129.

Blakely RD, De Felice LJ, *et al.* (1994) Molecular physiology of norepinephrine and serotonin transporters. *J Exp Biol* 196: 263-81.

Blundell JE (1992) Serotonin and the biology of feeding. *Am J Clin Nutr* 55 (1 Suppl) 155-159.

Bjorklund AJ, Emson PC, Gilbert RFT, Skagerberg G (1979) Further evidence for the possible coexistence of 5-hydroxytryptamine and substance P in medullary raphe neurones of rat brain. *Br. J. Pharmacol.* 66: 112-113.

- Bock J, Rether K, Groger N, Xie L, Braun K (2014) Perinatal programming of emotional brain circuits: An integrative view from systems to molecules. *Frontiers in Neuroscience*: 8: 11.
- Bondy B, Baghai TC, Minov C, Schüle C, Schwarz MJ, Zwanzger P, Rupprecht R, Möller HJ (2003) Substance P serum levels are increased in major depression, preliminar results. *Biol Psychiatry* 536: 538-542.
- Bonner T, Affolter UM, Young AC, Yong WSA (1987) cDNA encoding the precursors of the rat neuropeptide neurokinin B. *Mol. Brain. Res.* 2: 243-249.
- Borges-Aguiar AC, Schaffer LZ, de Kloet ER, Schenberg LC (2018) Daily maternal separations during stress hyporesponsive period decrease the thresholds of panic-like behaviors to electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray of the adult rat. *Behavioural Brain Research* 344: 132–144.
- Boundy VA, Chen J, Nestler EJ (1998) Regulation of cAMP-dependent protein kinase subunit expression in CATH and SH-SY5Y cells. *J Pharmacol Exp Ther* 286:1058–1065.
- Bowlby J (1973) *Attachment and Loss: Volume II: Separation, Anxiety and Anger.* The International Psycho-Analytical Library 95: 1-429.
- Bowlby J (1980) *By ethology out of psycho-analysis: an experiment in interbreeding.* *Anim Behav.* 28 (3): 649-56.
- Bowlby J (1982) *Attachment and Loss: Attachment (2nd Edition).* New York: Basic Books.
- Bowlby J (1983) *Attachment and Loss. 2nd Edition,* New York: Basic Books.
- Bowlby J (1988) *A secure base: Clinical applications of attachment theory.* London: Routledge.
- Borowsky B and Hoffman BJ (1995) Neurotransmitter transporters: molecular biology, function, and regulation. *Int Rev Neurobiol* 38: 139-99.

- Boyce S, Smith D, Carlson E, Hewson L, Rigby M, O'Donnell R, Harrison T, Rupniak NM (2001) Intra-amygdala injection of the substance P [NK (1) receptor] antagonist L-760735 inhibits neonatal vocalisations in guinea-pigs. *Neuropharmacology* 41 (1) : 130-7.
- Bozzi Y, Pizzorusso T, Cremisi F, Rossi FM, Barsacchi G, Maffei L (1995) Monocular deprivation decreases the expression of messenger RNA for brain-derived neurotrophic factor in the rat visual cortex. *Neuroscience*. 69 (4) : 1133-44.
- Brandão ML, Lopez-Garcia JA, Graeff FG, Roberts MH (1991) Electrophysiological evidence for excitatory 5-HT₂ and depressant 5-HT_{1A} receptors on neurones of the rat midbrain tectum. *Brain Res*. 556 (2) : 259-66.
- Bramham CR, Messaoudi E (2005) BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis. *Prog Neurobiol*. 76: 99–125.
- Brandão ML, Zanoveli JM, Ruiz-Martinez RC, Oliveira LC, Landeira-Fernandez J (2008) Different patterns of freezing behavior organized in the periaqueductal gray of rats, association with different types of anxiety. *Behav. Brain Res*. 89: 76-84.
- Bravo JA, Dinan TG, Cryan JF (2014) Early-life stress induces persistent alterations in 5-HT_{1A} receptor and serotonin transporter mRNA expression in the adult rat brain. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 7: 1-9.
- Brodin E, Ogren SO, Theodorsson-Norheim E (1987) Effects of subchronic treatment with imipramine, zimelidine and alaproclate on regional tissue levels of substance P- and neurokinin A/neurokinin B-like immunoreactivity in the brain and spinal cord of the rat. *Neuropharmacology* 26 (6) : 581-90.
- Brodin E, Rosén A, Schött E, Brodin K (1994) Effects of sequential removal of rats from a group cage, and of individual housing of rats, on substance P, cholecystokinin and somatostatin levels in the periaqueductal grey and limbic regions. *Neuropeptides* 26: 253-260.
- Broiz AC, Bassi GS, de Souza Silva MA, Brandão ML (2012) Effects of neurokinin-1 and 3-receptor antagonists on the defensive behavior induced by electrical

- stimulation of the dorsal periaqueductal gray. *Neuroscience* 201: 134-145.
- Burke NN, Finn DP, McGuire BE, Roche M (2017) Psychological stress in early life as a predisposing factor for the development of chronic pain: clinical and preclinical evidence and neurobiological mechanisms. *J. Neurosci. Res.* 95 (6) : 1257-1270.
- Bus BA, Molendijk ML, Penninx BJ, e colaboradores (2011) Determinants of serum brain-derived neurotrophic factor. *Psychoneuroendocrinology* 36:228–39.
- Cacioppo JT, Cacioppo S, Capitanio JP, Cole SW (2015) The neuroendocrinology of social isolation. *Annu Rev Psychol.* 66: 733-67.
- Caldeira MV, Melo CV, Pereira DB, Carvalho RF, Carvalho AL, Duarte CB (2007) BDNF regulates the expression and traffic of NMDA receptors in cultured hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci.* 35: 208–19.
- Cameron OG, Lee MA, Curtis GC, McCann DS (1987) Endocrine and physiological changes during "spontaneous" panic attacks. *Psychoneuroendocrinology* 12: 321-331.
- Canteras NS, Graeff FG (2014) Executive and modulatory neural circuits of defensive reactions: Implications for panic disorder. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 46: 352-364.
- Carrive P (1993) The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. *Behavioral Brain Research* 58: 27-47.
- Carvalho MC, Albrecht-Souza L, Masson S; Brandão ML (2005) Changes in the biogenic amine content of the prefrontal cortex, amygdale, dorsal hippocampus and nucleus accumbens of rats submitted to single and repeated sessions of the elevated plus-maze test. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 38 (12): 1857-1866.
- Carvalho MC, Masson S, Brandão ML, De Souza Silva MA (2008) Anxiolytic-like effects of substance P administration into de dorsal, but not ventral, hippocampus and its influence on serotonin. *Peptides* 29: 1191-1200.

- Casanova JP, Contreras M, Moya EA, Torrealba F, Iturriaga R (2013) Effect of insular cortex inactivation on autonomic and behavioral responses to acute hypoxia in conscious rats. *Behav. Brain Res.* 253: 60–67.
- Casarotto PC, de Bortoli VC, Corrêa FMA, Resstel LBM, Zangrossi HJr (2010) Panicolytic-like effect of BDNF in the rat dorsal periaqueductal grey matter: the role of 5-HT and GABA. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 13: 573–582.
- Casarotto PC, dos Santos PC, Lucas GA, Biojone C, Pobbe RLH, Vilela-Costa LH, Joca SRL, Guimarães FS, Zangrossi HJr (2015) BDNF-TRKB signaling system of the dorsal periaqueductal gray matter is implicated in the panicolytic-like effect of antidepressant drugs. *European Journal of Neuropsychopharmacology* 25: 913–922.
- Cassano GB, Perugi G, Musetti L, Akiskal HS (1989) The nature of depression presenting concomitantly with panic disorder. *Compr. Psychiatry.* 30: 473-482.
- Celada P, Siuciak JA, Tran TM, Altar CA, Tepper JM (1996) Local infusion of brain-derived neurotrophic factor modifies the firing pattern of dorsal raph serotonergic neurons. *Brain Research* 712: 293-298.
- Chahl LA (2006) Tachykinins and neuropsychiatric disorders. *Curr Drug Targets* 78: 993–1003.
- Chan-Palay V, Jonsson G, Palay SL (1978) On the coexistence of serotonin and substance P in neurons of the rat's central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 1582-1586.
- Champagne FA, Curley JP (2009) Epigenetic mechanisms mediating the long-term effects of maternal care on development. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 33: 593–600.
- Charney DS, Heninger GR, Breier A (1984) Noradrenergic function in panic anxiety. Effects of yohimbine in healthy subjects and patients with agoraphobia and panic disorder. *Arch Gen Psychiatry* 41 (8) : 751-63.

- Chen J, Nye HE, Kelz MB, Hiroi N, Nakabeppu Y, Hope BT, Nestler EJ (1995) Regulation of delta FosB and FosB-like proteins by electroconvulsive seizure and cocaine treatments. *Mol Pharmacol.* 48: 880–889.
- Cirulli F, Francia N, Berry A, Aloe L, Alleva E, Suomi SJ (2009) Early life stress as a risk factor for mental health: role of neurotrophins from rodents to non-human primates. *Neurosci Biobehav Rev* 33 (4) : 573-85.
- Cohen ME, White PD (1951) Life situations, emotions, and neurocirculatory asthenia (anxiety neurosis, neurasthenia, effort syndrome. *Psychosom. Med.* 13 (6) : 335-57.
- Commons KG, Valentino RJ (2002) Cellular basis for the effects of substance P in the periaqueductal gray and dorsal raphe nucleus. *J Comp Neurol.* 447: 82–97.
- Conner JM, Lauterborn JC, Yan Q, Gall CM, *et al.* (1997) Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport. *Journal of Neuroscience* 17: 2295–2313.
- Cooper J, Bloom F, Roth R (1991) *The Biochemical Basis of Neuropharmacology.* 6 edition.
- Cowansage KK, LeDoux JE, Monfils MH (2010) Brain-derived neurotrophic factor: a dynamic gatekeeper of neural plasticity. *Curr Mol Pharmacol.* 3 (1) : 12-29.
- Dableh LJ, Yashpal K, Rochford J, Henry JL (2005) Antidepressant like-effects of neurokinin receptor antagonists in the forced swim test in the rat. *Eur J Pharmacol.* 507: 99-105.
- Dam TV, Escher E, Quirion R (1988) Evidence for the existence of three classes of neurokinin receptors in brain. Differential ontogeny of neurokinin-1, neurokinin-2 and neurokinin-3 binding sites in rat cerebral cortex *Brain Res.* 453: 372–376.
- Daskalakis NP, Claessens SE, Laboyrie JJ, Enthoven L, Oitzl MS, Champagne DL, de Kloet ER (2011) The newborn rat's stress system readily habituates to repeated and prolonged maternal separation, while continuing to respond to stressors in

context dependent fashion. *Horm. Behav.* 60: 165-176.

Deakin JFW, Graeff FG (1991) 5-HT and mechanisms of defence. *J Psychopharmacol.* 5: 305-315.

De Araújo JE, Huston JP, Brandão ML (2001a) Opposite effects of substance P fragments C anxiogenic and N anxiolytic injected into dorsal periaqueductal gray. *Eur J Pharmacol.* 432: 43-51.

De Araújo JE, Huston JP, Brandão ML (2001b) Place aversion induced by microinjections of C-fragment of substance P into the dorsal periaqueductal gray of rats is mediated by tachykinin NK1 receptors. *Peptides* 22: 1447-1452.

De Lima MN, Presti-Torres J, Vedana G, Alcalde LA, Stertz L, Fries GR, Roesler R, Andersen ML, Quevedo J, Kapczinski F, Schröder N (2011) Early life stress decreases hippocampal BDNF content and exacerbates recognition memory deficits induced by repeated D-amphetamine exposure. *Behav Brain Res* 224: 100–106.

De Souza Armini R, Bernabé CS, Rosa CA, Siller CA, Schimitel FG, Tufik S, Klein DF, Schenberg LC (2015) In a rat model of panic, corticotropin responses to dorsal periaqueductal gray stimulation depend on physical exertion. *Psychoneuroendocrinology.* 53: 136-147.

Dornan WA, Wink KL, Molen P, Short K, Struthers W, Barret C (1993) Site-specific effects in intracerebral infusions of three neurokinins (neurokinin A, neurokinin B and neurokinin) on the expression of male rat sexual behavior. *Physiol. Behav* 54: 249-258.

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

Drew GM, Mitchell VA, Vaughan CW (2005) Postsynaptic actions of substance P on rat periaqueductal grey neurons in vitro. *Neuropharmacology* 49: 587–595.

Duarte FS, Testolin R, De Lima TC (2004) Further evidence on the anxiogenic-like effects of substance P evaluated in the elevated-plus-maze in rats. *Behav Brain*

Res. 154: 501-510.

Duman RS, Heninger GR, Nestler EJ (1997) A molecular and cellular theory of depression. *Arch. Gen. Psychiatry* 54: 597–606.

Dumont FS, Kinkead R (2010) 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: 1279-1289.

Dunner DL (1998) The issue of comorbidity in the treatment of panic. *Int. Clin. Psychopharmacol.* 13 (4): 19-24.

Ebner K, Rupniak NM, Saria A, Singewald N (2004) Substance P in the medial amygdala: emotional stress-sensitive release and modulation of anxiety-related behavior in rats. *Acad Sci USA* 101: 4280-4285.

Ebner K, Singewald GM, Whittle N, Ferraguti F, Singewald N (2008) Neurokinin I receptor antagonism promotes active stress coping via enhanced septal 5-HT transmission. *Neuropsychopharmacology* 33: 1929-1941.

Eaton MJ, Gudehithlu KP *et al.* (1993) Distribution of aromatic L-amino acid decarboxylase mRNA in mouse brain by in situ hybridization histology. *J Comp Neurol* 337 (4): 640-54.

Eisenberger NI (2012) The pain of social disconnection: examining the shared neural underpinnings of physical and social pain. *Nat Rev Neurosci.* 13: 421–34.

Ernfors P, Lee KF, Jaenisch R (1994) Mice lacking brain-derived neurotrophic factor develop with sensory deficits. *Nature* 368: 147–50.

Enthoven L, de Kloet ER, Oitzl MS (2008) Differential development of stress system (re) activity at weaning dependent on time of disruption of maternal care. *Brain Res.* 1217: 62-69.

Ellenbroek BA, de Bruin NMWJ, van Den Keonenburg PTJM, van Luijtelaar ELJM, Cools AR (2004) The effects of early maternal deprivation on auditory information processing in adult wistar rats. *Biological Psychiatry* 55 (7) : 701–707.

- Famitafreshi H, Karimian M, Fanaei H, Attari F and Fatima S (2015) Social isolation is associated with reduced neurogenesis, impaired spatial working memory performance and altered anxiety levels in male rats. *Open Access Anim. Physiol.* 7: 87–95.
- Farhadi HF, Mowla SJ, Petrecca K, Morris SJ, Seidah NG and Murphy RA (2000) Neurotrophin-3 sorts to the constitutive secretory pathway of hippocampal neurons and is diverted to the regulated secretory pathway by coexpression with brain-derived neurotrophic factor. *J. Neurosci.* 20: 4059–4068.
- Feinstein JS, Buzza C, Hurlemann R, Follmer RL, Dahdaleh NS, CoryellWH, Welsh MJ, Tranel D, Wemmie JA (2013) Fear and panic in humans with bilateral amygdala damage. *Nat. Neurosci.* 16: 270–272.
- Fone KCF, Porkess MV (2008) Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents-Relevance to developmental neuropsychiatric disorders. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 32: 1087–1102.
- Francis DD, Meaney MJ (1999) Maternal care and the development of stress response. *Curr Opin Neurobiol.* 9: 128-134.
- Franklin TB, Russig H, Weiss IC, Gräff J, Linder N, Michalon A, Vizi S, Mansuy IM (2010) Epigenetic transmission of the impact of early stress across generations. *Biol Psychiatry* 68 (5) : 408-15.
- Freud S (1896) On the right to separate from neurasthenia a definite symptom-complex as “anxiety neurosis”. In: R. M. Hutchins (Editor-in-Chief), *Great Books of the Western World*, vol. 54, *Selected Papers on Hysteria*. Chicago: The Encyclopaedia Britannica, Inc. , 1978, p. 25-118.
- Fu W, Maitre EL, Fabre V, Bernard JF, Xu ZQD, Hokfelt T (2010) Chemical Neuroanatomy of the Dorsal Raphe Nucleus and Adjacent Structures of the Mouse Brain. *The Journal of Comparative Neurology* 518:3464–3494.
- Fujimura Y, Yasunoa F, Farrisa A, Liowa JS, Geracib M, Drevetsb W, Pineb DS, Ghosec S, Lerner A, Hargreavesd R, Burnsd HD, Morse C, Pikea VW, Innis RB

- (2009) Decreased Neurokinin-1 (Substance P) Receptor Binding in Patients with Panic Disorder: Positron Emission Tomographic Study with [18F]SPA-RQ. *Biological Psychiatry* 66: 94-97.
- Gentil V (1988) The aversive System, 5-HT and panic attacks. In: P Simon, P Soubrié and D Wildlocher (Eds), *Animal Models of Psychiatric Disorders*. Karger: Basel, p. 142-145.
- Gilbert RFT, Emson PC, Hunt SP, Bennett GW, Marsden CA, Sandberg BEB, Steinbusch HWM, Verhofstad AAJ (1982) The effects of neurotoxins on peptides in the rat spinal cord. *Neuroscience* 7: 69-87.
- Gittelman-Klein R, Klein DF (1973) School phobia: diagnostic considerations in the light of imipramine effects. *J Nerv Ment Dis.* 156: 199-215.
- Goetz RR, Klein DF, Gorman JM (1994) Consistencies between recalled panic and lactate-induced panic. *Anxiety* 1: 31-36.
- Gonul AS, Akdeniz F, Taneli F, Donat O, Eker C, Vahip S (2005) Effect of treatment on serum brain- derived neurotrophic factor levels in depressed patients. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 255: 381-386.
- Goodfellow NM, Benekareddy M, Vaydia VA, Lambe EK (2009) Layer II/III of the Prefrontal Cortex: Inhibition by the Serotonin 5-HT_{1A} Receptor in Development and Stress. *The Journal of Neuroscience* 29 (32) : 10094 –10103.
- Goodman LJ, Valverde J, Lim F, Geschwind MD, Federoff HJ, Geller AI and Hefti F (1996) Regulated release and polarized localization of brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 7: 222–238.
- Gorman JM, Coplan JD (1996) Comorbidity of depression and panic disorder. *J. Clin. Psychiatry.* 57 (10): 34-41.
- Graeff FG (2003) 5-HT, matéria cinzenta periaquedutal e transtorno do pânico. *Revista Brasileira de Psiquiatria* 25 (Supl II) 42-5.
- Graeff FG (2004) Serotonin, the periaqueductal gray and panic. *Neuroscience and*

Biobehavioral Reviews 28: 239-259.

Graeff FG, Garcia-Leal C, Del-Ben CM, Guimaraes FS (2005) Does the panic attack activate the hypothalamic-pituitary-adrenal axis? *An Acad Bras Cienc.* 77: 477-491.

Graeff, Mansuy IM (2008) Epigenetic codes in cognition and behaviour. *Behav. Brain Res.* 192: 70–87.

Graeff FG (2012) New perspective on the pathophysiology of panic: merging serotonin and opioids in the periaqueductal gray. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 45: 1-10.

Graeff FG, Schoenfeld RI (1970) Tryptaminergic mechanisms in punished and nonpunished behavior. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 173: 277-283.

Graeff FG e Guimarães FS (1999) *Fundamentos de Psicofarmacologia*. São Paulo, Editora Atheneu.

Graeff FG, Zangrossi HJ (2010) The dual role of serotonin in defense and the mode of action of antidepressants on generalized anxiety and panic disorders. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry* 10: 207-217.

Graeff FG (2017) Translational approach to the pathophysiology of panic disorder: Focus on serotonin and endogenous opioids. *Neurosci Biobehav* 76: 48-55.

Griez E, Schruers K (1998) Experimental pathophysiology of panic. *J Psychosom Res.* 45 (6): 493-503.

Gross C, Hen R (2004) The developmental origins of anxiety. *Nat. Rev. Neurosci.* 5 (7): 545–552.

Guard S, Watson SP (1991) Neurokinin receptor types: classification and membrane signalling mechanisms. *Neurochem. Int* 18: 149-165.

Harding A, Paxinos G, Halliday G (2004) The Serotonin and Tachykinin Systems. In: *The Rat Nervous System* (Paxinos G, ed), pp 1205-1256. San Diego: Elsevier.

- Harlow HF, Harlow MK, Suomi SJ (1971) From thought to therapy: lessons from a primate laboratory. *Am Sci.* 59(5): 538-49.
- Hasenohrl RU, Souza-Silva MA, Nikolaus S, Tomaz C, Brandão ML, Schwarting RK, Huston JP (2000) Substance P and its role in neural mechanisms governing learning, anxiety and functional recovery. *Neuropeptides* 34: 272–280.
- Hebert H, Saper CB (1992) Organization of medullary adrenergic and noradrenergic projections to the periaqueductal gray matter in the rat. *J Comp Neurol.* 315 (1): 34-52.
- Heinrichs M, Baumgartner T, Kirschbaum C, Ehlert U (2003) Social support and oxytocin interact to suppress cortisol and subjective responses to psychosocial stress. *Biol Psychiatry* 54: 1389-98.
- Heinrich LM, Gullone E (2006) The clinical significance of loneliness: A literature review. *Clinical Psychology Review* 26 (6): 695–718.
- Hennessy MB, Deak T, Schiml-Webb PA (2010) Early attachment-figure separation and increased risk for later depression: potential mediation by proinflammatory processes. *Neurosci Biobehav Rev* 34: 782–90.
- Heidbreder CA, Weiss IC, Domeney AM, Pryce C, Homberg J, Hedou G *et al.* (2000) Behavioral, neurochemical and endocrinological characterization of the early social isolation syndrome. *Neuroscience* 100: 749–768.
- Hietala J, Nyman MJ, Eskola O, Laakso A, Grönroos T, Oikonen V, Bergman J, Haaparanta M, Forsback S, Marjamäki P, Lehtikainen P, Goldberg M, Burns D, Hamill T, Eng WS, Coimbra A, Hargreaves R, Solin O (2005) Visualization and quantification of neurokinin-1 (NK1) receptors in the human brain. *Mol Imaging Biol* 7: 262–272.
- Hock E, Schirzinger M. B. (1992) Maternal separation anxiety: its developmental course and relation to maternal mental health. *Child Dev.* 63 (1): 93-102.
- Hofer MM, Barde YA (1988) Brain-derived neurotrophic factor prevents neuronal death in vivo. *Nature.* 331: 261–2.

- Hofer MA (1996) Multiple regulators of ultrasonic vocalization in the infant rat. *Psychoneuroendocrinology* 21: 203-217.
- Hokfelt T, Ljungdahl A, Steinbusch H, Verhofstad A, Nilsson G, Brodin E, Pernow B and Goldstein M (1978) Immunohistochemical evidence of substance P-like immunoreactivity in some 5 - hydroxytryptamine - containing neurons in the rat central nervous system. *Neuroscience* 3: 517-538.
- Hokfelt T, Bartfai T, Bloom F (2003) Neuropeptides, opportunities for drug Discovery. *Lancet Neurol* 28: 463-472.
- Holt-Lunstad J, Smith TB, Layton JB (2010) Social Relationships and Mortality Risk: A Meta-analytic Review. *PLoS Medicine* 7(7): 1-21.
- Horn EM, Kramer JM, Waldrop TG (2000) Development of hypoxia induced Fos expression in rat caudal hypothalamic neurons. *Neuroscience* 99: 711–720.
- Houwing DJ, Ramsteijn AS, Riemersma IW, Olivier JD (2019) Maternal separation induces anhedonia in female heterozygous serotonin transporter knockout rats. *Behavioural Brain Research* 356: 204-207.
- Hoyer D, Hannon JP, Martin GR (2002) Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav.* 71 (4): 533-554.
- Hulshof HJ, Novati A, Sgoifo A, Luiten PG, Den Boer JA, Meerlo P (2011) Maternal separation decreases adult hippocampal cell proliferation and impairs cognitive performance but has little effect on stress sensitivity and anxiety in adult Wistar rats. *Behav Brain Res.* 20 (216): 552-560.
- Huot RL, Plotsky PM, Lenox RH, McNamara RK (2002) Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long Evans rats. *Brain Research* 950: 52–63.
- Huston JP, Hasenohrl RU (1995) The role of neuropeptides in learning: focus on the neurokinin substance P. *Behav Brain Res* 66: 117–127.
- Husum H, Wortwein G, Andersson W, Bolwig TG, Mathe AA (2008) Gene-

environment interaction affects substance P and neurokinin A in the entorhinal cortex and periaqueductal grey in a genetic animal model of depression: implications for the pathophysiology of depression. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 11 (1): 93-101.

Ito H, Nakajima A, Nomoto H, Furukawa S (2003) Neurotrophins facilitate neuronal differentiation of cultured neural stem cells via induction of mRNA expression of basic helix-loop-helix transcription factors Mash 1 and Math 1. *J Neurosci Res.* 71: 648–58.

Jenck F, Moreau JL, Martin JR (1995) Dorsal periaqueductal gray-induced aversion as a simulation of panic anxiety; elements of face and predictive validity. *Psychiatry Res.* 57: 181-191.

Johnson MR, Lydiard RB (1998) Comorbidity of major depression and panic disorder. *J. Clin. Psychol.* 54: 201-210.

Jorissen HJ, Ulery PG, Henry L, Gourneni S, Nestler EJ, Rudenko G (2007) Dimerization and DNA-binding properties of the transcription factor DeltaFosB. *Biochemistry* 46: 8360–8372.

Jovanovic JN, Thomas P, Kittler JT, Smart TG, *et al.* (2004). Brain-derived neurotrophic factor modulates fast synaptic inhibition by regulating GABA (A) receptor phosphorylation, activity, and cell-surface stability. *Journal of Neuroscience* 24: 522–530.

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

Kaffman A, Meaney MJ (2007) Neurodevelopmental sequelae of postnatal maternal care in rodents: clinical and research implications of molecular insight. *J Child Psychol Psychiatry* 48: 224–44.

Kaufman J, Charney D (2000) Comorbidity of mood and anxiety disorders. *Depress Anxiety* 12: 69-76.

- Keay KA, Bandler R (2004) Periaqueductal Gray. In G. Paxinos (Ed.) The rat nervous system (pp. 243–257). San Diego, CA: Elsevier.
- Keesom SM, Morningstar MD, Sandlain R, Wise BM, Hurley LM (2018) Social isolation reduces serotonergic fiber density in the inferior colliculus of female, but not male, mice. *1964*: 94-103.
- Kingsbury MA, Aubrey MK, Sara ES, James LG (2011) Mammal-Like Organization of the Avian Midbrain Central Gray and a Reappraisal of the Intercollicular Nucleus. *Plos One* 6 (6): e20720.
- Kiser RS, Lebovitz RM (1975) Monoaminergic mechanisms in aversive brain stimulation. *Physiol Behav.* 15: 47-53.
- Kiser RS, German DC, Lebovitz RM (1978) Serotonergic reduction of dorsal central gray area stimulation-produced aversion. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 9: 27-31.
- Kiser RS, Brown CA, Sanghera MK, German DC (1980) Dorsal raphe nucleus stimulation reduces centrally-elicited fear like behavior. *Brain Res.* 191 (1): 265-272.
- Klein DF (1964) Delineation of two drug-responsive anxiety syndromes. *Psychopharmacology* 5: 397-408.
- Klein DF (1993) False suffocation alarms, spontaneous panics, and related conditions. An integrative hypothesis. *Arch Gen Psychiatry* 50: 306-317.
- Klein RG (1995) Is panic disorder associated with childhood separation anxiety disorder. *Clinical Neuropharmacology* 18 (2): 7-14.
- Kosofsky BE, Molliver ME (1987) The serotonergic innervation of cerebral cortex: different classes of axon terminals arise from dorsal and median raphe nuclei. *Synapse* 1:153-168.
- Kotani M, Moshimaru M, Nawa M, Nakanishi S (1986) Structure and gene organization of bovine neuromedin K precursor. *Proc. Natl. Acad. Sei. USA*

83:7074-7078.

- Kramar EA, Chen LY, Lauterborn JC, Simmons DA, Gall CM, Lynch G (2010) BDNF upregulation rescues synaptic plasticity in middle-aged ovariectomized rats. *Neurobiol Aging*. 33: 708–19.
- Kramer MS, Cutler N, Feighner J, Shrivastava R, Carman J, Sramek JJ, Reines AS, Liu G, Snively D, Wyatt-Knowles E, Hale JJ, Mills SG, MacCoss M, Swai CJ, Harrison T, Hill RG, Hefti FF, Scolnick EM, Cascieri MA, Chicchi GG, Sadowski S, Williams AR, Hewson L, Smith D, Carlson EJ, Hargreaves RJ and Rupniak NMJ (1998) Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central substance P receptors. *Science* 281: 1640-1645.
- Kramer JM, Nolan PC, Waldrop TG (1999) In vitro responses of neurons in the periaqueductal gray to hypoxia and hypercapnia. *Brain Res*. 835: 197–203.
- Krause JE, Chirgwin JM, Carter MS, Xu ZS, Hershey AD (1987) Three rat preprotochikinin mRNAs encode the neuropeptides substance P and neurokinin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 881-885.
- Ku YH, Tan L, Li LS, Ding X (1998) Role of corticotropin-releasing factor and Substance P in pressor responses of nuclei controlling emotion and stress. *Peptides* 19: 677–682.
- Kundakovic M, Lim, S, Gudsruk K; Champagne, FA (2013) Sex-specific and strain-dependent effects of early life adversity on behavioral and epigenetic outcomes. *Front. Psychiatry* 4 (78): 1-13.
- Laine MA, Sokolowska E, Dudek M, Callan SA, Hyytiä P, Hovatta I (2017) Brain activation induced by chronic psychosocial stress in mice. *Sci Rep*. 7 (1): 15061.
- Lauterborn JC, Lynch G, Vanderklish P, Arai A, Gall CM (2000) Positive modulation of AMPA receptors increases neurotrophin expression by hippocampal and cortical neurons. *J Neurosci*. 20 (1): 8-21.
- Lehmann J, Feldon J (2000) Long-term biobehavioral effects of maternal separation in the rat: consistent or confusing? *Rev neurosci*. 11: 383-408.

- Lehmann ML, Herkenham M (2011) Environmental enrichment confers stress resiliency to social defeat through an infralimbic cortex-dependent neuroanatomical pathway. *J. Neurosci.* 31: 6159–6173.
- Leigh-Hunt N, Bagguley D, Bash K, Turner V, Turnbull S, Valtorta N, *et al.* (2017) An overview of systematic reviews on the public health consequences of social isolation and loneliness. *Public Health* 152: 157–71.
- Lesch KP, Waider J (2012) Serotonin in the modulation of neural plasticity and networks: implications for neurodevelopmental disorders. *Neuron* 76 (1): 175–191.
- Levine S, Huchton DM, Wiener SG, Rosenfeld P (1991) Time course of the effect of maternal deprivation on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the infant rat. *Dev Psychobiol.* 24 (8): 547-58.
- Levine S (2001) Primary social relationships influence the development of the hypothalamic--pituitary--adrenal axis in the rat. *Physiol Behav.* 73 (3): 255-60.
- Levine S (2002) Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the neonatal rats: the role of maternal behavior. *Neurotoxicity Research.* 4: 557.
- Li YQ, Jia HG, Rao ZR, Shi JW (1990) Serotonin-, substance P- or leucine-enkephalin-containing neurons in the midbrain periaqueductal gray and nucleus raphe dorsalis send projection fibers to the central amygdaloid nucleus in the rat. *Neurosci Lett.* 120: 124 –127.
- Li M, Du W, Shao F, Wang W (2016) Cognitive dysfunction and epigenetic alterations of the BDNF gene are induced by social isolation during early adolescence. *Behav Brain Res.* (15) 313: 177-83.
- Liebowitz MR, Fyer AJ, Gorman JM, Dillon D, Appleby IL, Levy G, Anderson S, Levitt M, Palij M, Davies SO (1984) Lactate provocation of panic attacks. I. Clinical and behavioral findings. *Arch. Gen. Psychiatry* 41: 764-770.
- Liebowitz MR, Gorman JM, Fyer AJ, Levitt M, Dillon D, Levy G, Appleby IL, Anderson S, Palij M, Davies SO (1985) Lactate provocation of panic attacks. II. Biochemical and physiological findings. *Arch. Gen. Psychiatry* 42: 709-719.

- Liu D, Diorio J, Tannenbaum B, Caldji C, Francis D, Freedman A, Sharma S, Pearson D, Plotsky PM, Meaney MJ (1997) Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science* 277: 1659–1662.
- Lonsdorf TB, Weike AI, Golkar A, Schalling M, Hamm AO, Ohman A (2010) Amygdala-dependent fear conditioning in humans is modulated by the BDNFval66met polymorphism. *Behav Neurosci*. 124: 9-15.
- Lopes DA, Souza TMO, de Andrade JS, Silva MFS, Antunes HKM, Sueur-Maluf LL, Céspedes IC, Viana MB (2018) Environmental enrichment decreases avoidance responses in the elevated T-maze and delta FosB immunoreactivity in anxiety-related brain regions. *Behav Brain Res*. 344: 65-72.
- Llorente R, O'shea E, Gutierrez-Lopez MD, Llorente-Berzal A, Colado MI, Viveros MP (2010) Sex-dependent maternal deprivation effects on brain monoamine content in adolescent rats. *Neuroscience Letters* 479 (2): 112–117.
- Lupien SJ, McEwen BS, Gunnar MR, Heim C (2009) Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nat. Rev. Neurosci*. 10: 434–445.
- Lutz PE, Turecki G (2014) DNA methylation and childhood maltreatment: from animal models to human studies. *Neuroscience*. 264: 142-56.
- Maeno H, Kiyama H, Tohyama M (1993) Distribution of the substance P receptor (NK-1 receptor) in the central nervous system. *Brain Res Mol Brain Res*. 18: 43–58.
- Maggi CA, Patacchini R, Rovero P, Giachetti A (1993) Tachykinin receptors and tachykinin antagonists. *J. Auton. Pharmacol*. 13: 23-93.
- Maggio JE (1988) Tachykinins. *Ann. Rev. Neurosci*. 11: 13-28.
- Mamounas LA, Blue ME, Siuciak JA, Altar CA (1995) BDNF promotes the survival and sprouting of serotonergic axons in the rat brain. *J Neurosci* 15: 7929-7939.
- Marco EM, Llorente R, Lopez-Galardo M, Mela V, Llorente-Berzal A, Prada C,

- Viveros MP (2015) The maternal deprivation animal model revisited. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 51: 151–163.
- Maren S (2007) Neuroscience: The threatened brain. *Science* 317 (5841): 1043-1044.
- Maron E, Kuikka JT, Shlik J, Vasar V, Vanninen E, Tiihonen J (2004) Reduced brain serotonin transporter binding in patients with panic disorder. *Psychiatry Res.* 132: 173-181.
- Massi M, Panocka I, de Caro G (2000) The psychopharmacology of tachykinin NK-3 receptors in laboratory animals. *Peptides* 21 (11): 1597-609.
- McClung CA, Nestler EJ (2003) Regulation of gene expression and cocaine reward by CREB and DeltaFosB. *Nat Neurosci.* 6: 1208–1215.
- McLean S (2005) Do substance P and NK1 receptor have a role in depression and anxiety? *Curr Pharm Des.* 1112: 1529-1547.
- Meaney MJ, Aitken DH, Sharma S, Viau V (1992) Basal ACTH, corticosterone and corticosterone-binding globulin levels over the diurnal cycle, and age-related changes in hippocampal type I and type II corticosteroid receptor binding capacity in young and aged, handled and nonhandled rats. *Neuroendocrinology* 55:204-213.
- Meaney MJ, Diorio J, Francis D, Widdowson J, La Plante P, Caldji C, Sharma S, Seckl JR, Plotsky PM (1996) Early environmental regulation of forebrain glucocorticoid receptor gene expression: implications for adrenocortical responses to stress. *Dev Neurosci* 18: 49-72.
- Meaney MJ (2001) Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annu Rev Neurosci* 24: 1161-1192.
- Mobbs D, Petrovic P, Marchant JL, Hassabis D, Weiskopf N, Seymour B, DolanRJ, Frith CD (2007) When fear is near: threat imminence elicits prefrontal-periaqueductal gray shifts in humans. *Science* 317: 1079-1083.

- Mongeau R, Marsden CA, De Oca BM, Fanselow MS (1998) Differential effects of neurokinin-1 receptor activation in subregions of the periaqueductal gray matter on conditional and unconditional fear behaviors in rats. *Behav Neurosci.* 1125: 1125-1135.
- Morgan MM, Carrive P (2001) Activation of the ventrolateral periaqueductal gray reduces locomotion but not mean arterial pressure in awake, freely moving rats. *Neuroscience* 102: 905-910.
- Morgan JI, Curran T (1995) Immediate-early genes: ten years on. *Trends Neurosci.* 18: 66–67.
- Murínová I, Hlavacová N, Chmelová M, Riečanský I (2017) The evidence for altered BDNF expression in the brain of rats reared or housed in social isolation: a systematic review *Front. Behav. Neurosci.* 11 p. 101.
- Nagano M, Saitow F, Haneda E, Konishi S, Hayashi M, Suzuki H (2006) Distribution and pharmacological characterization of primate NK-1 and NK-3 tachykinin receptors in the central nervous system of the rhesus monkey. *Br J Pharmacol.* 147: 316 –323.
- Nakabeppu Y, Nathans D (1991) A naturally occurring truncated form of FosB that inhibits Fos/Jun transcriptional activity. *Cell* 64: 751–759.
- Nashold BS Jr, Wilson WP, Slaughter DG (1969) Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. *J Neurosurg.* 30: 14-24.
- Nawa M, Mirose T, Takashima M, Inoyama S, Nakanishi S (1983) Nucleotide sequences of cloned cDNAs for two types of bovine substance P precursor. *Nature* 306: 32-36.
- Neeper SA, Gómez-Pinilla F, Choi J, Cotman C (1995) Exercise and brain neurotrophins. *Nature.* 373 (6510): 109.
- Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ e colaboradores (2002) Neurobiology of depression. *Neuron* 34: 13-25.

- Nestler EJ (2015) Δ FosB: A transcriptional regulator of stress and antidepressant responses. *European Journal of Pharmacology* 753: 66–72.
- Neumann ID (2009) The advantage of social living: brain neuropeptides mediate the beneficial consequences of sex and motherhood. *Front. Neuroendocrinol.* 30 (4) : 483–496.
- Neumeister A, Bain E, Nugent AC, Carson RE, Bonne O, Luckenbaugh D. A, Eckelman W, Herscovitch P, Charney DS, Drevets W. C (2004) Reduced serotonin type 1A receptor binding in panic disorder. *J Neuroscience* 24: 589-591.
- Nibuya M, Morinobu S, Duman RS (1995) Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J Neurosci* 15: 7539-7547.
- Nibuya M, Nestler EJ, Duman RS (1996) Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element-binding protein (CREB) in rat hippocampus. *J Neurosci* 16: 2365-2372.
- Noble EE, Billington CJ, Kotz CM, Wang C (2011) The lighter side of BDNF. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 300: 1053–69
- Nogueira RL, Graeff FG (1995) Role of 5-HT receptor subtypes in the modulation of aversion generated in the dorsal periaqueductal gray. *Pharmacol Biochem Behav.* 52:1-6.
- Numan S, Seroogy KB (1999) Expression of trkB and trkC mRNAs by adult midbrain dopamine neurons: a double-label in situ hybridization study. *Journal of Comparative Neurology* 403: 295–308.
- Ohta K, Miki T, Warita K, Suzuki S, Kusaka T, Yakura T, *et al.* (2014) Prolonged maternal separation disturbs the serotonergic system during early brain development. *International Journal of Developmental Neuroscience* 33: 15–21.
- O'Mahony S, Chua AS, Quigley EM, Clarke G, Shanahan F, Keeling PW *et al.* (2008) Evidence of an enhanced central 5HT response in irritable bowel syndrome and in the rat maternal separation model. *Neurogastroenterol. Motil.* 20: 680–688.

- OMS (2017) Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates. Geneva: World Health Organization. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Onstott D, Mayer B, Beitz A (1993) Nitric oxide synthase immunoreactive neurons anatomically define a longitudinal dorsolateral column within the midbrain periaqueductal gray of the rat: analysis using laser confocal microscopy. *Brain Research* 610: 317: 324.
- Otsuka M, Yoshioka L (1993) Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. *Physiol. Rev.* 73: 229-308.
- Panksepp J (2005) *Affective Neuroscience: the foundations of human and animal emotions*. Oxford University Press, New York.
- Parent A, Descanies L, Beaudet A (1981) Organization of ascending serotonin systems in the adult rat brain. A radioautographic study after intraventricular administration of [3H]-5-hydroxytryptamine. *Neuroscience* 6: 115-138.
- Patterson SL, Grover LM, Schwartzkroin PA, Bothwell M (1992) Neurotrophin expression in rat hippocampal slices: a stimulus paradigm inducing LTP in CA1 evokes increases in BDNF and NT-3 mRNAs. *Neuron*. 9 (6): 1081-8.
- Perez-Otano I, Mandelzys A, Morgan JI (1998) MPTP-Parkinsonism is accompanied by persistent expression of a delta-FosB-like protein in dopaminergic pathways. *Brain Res Mol Brain Res.* 53: 41–52.
- Perrotti LI, Hadeishi Y, Ulery P, Barrot M, Monteggia L, Duman RS, Nestler EJ (2004) Induction of Δ FosB in reward-related brain regions after chronic stress. *J. Neurosci.* 24: 10594–10602.
- Pillai AK, Bruno D, Sarreal AS, *et al.* (2012) Plasma BDNF levels vary in relation to body weight in females. *PLoS One*7: e-39358.
- Pinheiro SN, Del-Ben CM, Zangrossi HJr, Graeff FG (2008) Anxiolytic and panicolytic effects of escitalopram in the elevated T-maze. *Journal of Psychopharmacology* 22: 132-137.

- Pinheiro RM, de Lima MN, Fries GR, Garcia VA, Presti-Torres J, Hallmenschlager LH, Alcalde LA, Roesler R, Andersen ML, Quevedo J, Kapczinski F, Schröder N (2012) Early life stress exacerbates cognitive dysfunction induced by d-amphetamine: amelioration by valproic acid. *J. Neural. Transm.* 119: 627–637.
- Pinheiro RM, de Lima MN, Portal BC, Busato SB, Falavigna L, Ferreira RD, Paz AC, de Aguiar BW, Kapczinski F, Schröder N (2015) Long-lasting recognition memory impairment and alterations in brain levels of cytokines and BDNF induced by maternal deprivation: effects of valproic acid and topiramate. *J. Neural. Transm.* 122: 709–719.
- Pitts FN, McClure JN (1967) Lactate metabolism in anxiety neurosis. *New Engl. J. Med.* 277: 1329-1336.
- Plotsky PM, Meaney MJ (1993). Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Brain Research* 18: 195–200.
- Plotsky PM, Sánchez MM, Levine S (2001) Intrinsic and extrinsic factors modulating physiological coping systems during development. In: Broom, D. M. (Ed.), *Coping with Challenge*. Dahlem University Press, Berlin, pp. 169–196.
- Pobbe RL, Zangrossi HJr (2005) 5-HT (1A) and 5-HT (2A) receptors in the rat dorsal periaqueductal gray mediate the antipanic-like effect induced by the stimulation of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. *Psychopharmacology* 183 (3): 314-21.
- Pobbe RL, Zangrossi HJr, Blanchard CD, Blanchard RJ (2010) Involvement of dorsal raphe nucleus and dorsal periaqueductal gray 5-HT receptors in the modulation of mouse defensive behaviors. *European Neuropsychopharmacology* 21 (4): 306-15.
- Pollano A, Trujillo V, Suárez MM (2017) How does early maternal separation and chronic stress in adult rats affect the immunoreactivity of serotonergic neurons within the dorsal raphe nucleus? *The International Journal on the Biology of Stress* 21 (1): 59-68.

- Preter M, Klein DF (2008) Panic, suffocation false alarms, separation anxiety and endogenous opioids. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol Psychiatry* 32: 603-612.
- Preter M, Lee SH, Petkova E, Vannuci M, Kim S, Klein DF (2011) Controlled cross over study in normal subjects of naloxone-preceding-lactate infusions, respiratory and subjective responses: relationship to endogenous opioid system, suffocation false alarm theory and childhood parental loss. *Psychol Med* 41: 385-393.
- Quintino-dos-Santos JW, Muller CJT, Bernabe CS, Rosa CA, Tufik S, Schenberg LC (2014) Evidence that the periaqueductal gray matter mediates the facilitation of panic-like reactions in neonatally-isolated adult rats. *Plos One* 9: 1-9.
- Rappaport LM, Carney DM, Brotman MA, Leibenluft E, Pine DS, Roberson-Nay R, Hettema JM (2018) A Population-Based Twin Study of Childhood Irritability and Internalizing Syndromes. *Journal of Clinical Child, Adolescent Psychology* 30: 1-11.
- Raymond JR, Mukhin YV, Gelasco A, Turner J, Collinsworth G, Gettys TW, Grewal JS, Garnovskaya MN (2001) Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. *Pharmacol Ther.* 92 (2-3) :179-212.
- Récamier-Carballo S, Estrada Camarena E, López-Rubalcava C (2017) Maternal separation induces long-term effects on monoamines and brain-derived neurotrophic factor levels on the frontal cortex, amygdala, and hippocampus: differential effects after a stress challenge. *Behavioural Pharmacology* 28 (7): 545-557.
- Regoli D, Drapeau G, Dion S, Orleans-Juste PD (1987) Pharmacological receptors for substance P and neurokinins. *Life Sci.* 40: 109–117.
- Regoli D, Boundon A, Fauchere JC (1994) Receptors and antagonists for substance P and related peptides. *Phannacological Rev.* 46: 551-589.
- Reiman EM, Raichle ME, Robins E, Mintun MA, Fusselman MJ, Fox PT, Price JL, Hackman KA (1989) Neuroanatomical correlates of a lactate-induced anxiety attack. *Arch. Gen. Psych.* 46: 493-500.

- Rentesi G, Antoniou K, Marcelos M, Fotopoulos A, Alboycharali J, Konstandi M (2010) Long-term consequences of early maternal deprivation in serotonergic activity and HPA function in adult rat. *Neuroscience Lett* 480: 7-11.
- Rentesi G, Antoniou K, Marcelos M, Syrrou M, Papadopoulou-Daifoti Z, Konstandi M (2013) Early maternal deprivation induced modifications in the neurobiological, neurochemical and behavioral profile of adult rats. *Behavioural Brain Research*. 244: 29–37.
- Renthal W, Maze I, Krishnan V, Covington 3rd HE, Xiao G, Kumar A, Russo SJ, *et al.* (2007) Histone deacetylase 5 epigenetically controls behavioral adaptations to chronic emotional stimuli. *Neuron* 56: 517–529.
- Ribeiro SJ, Teixeira RM, Calixto JB and Lima TV (1999) Tachykinin NK3 receptor involvement in anxiety. *Neuropeptides* 33 (2): 181-188.
- Ribeiro DE, Casarotto PC, Spiacci AJ, Fernandes GG, Pinheiro LC, Tanus-Santos JE, Zangrossi HJr, Guimarães FS, Joca SRL, Biojone C (2019) Activation of the TRKB receptor mediates the panicolytic-like effect of the NOS inhibitor aminoguanidine. *Progress in Neuropsychopharmacology, Biological Psychiatry* 93: 232–239.
- Rifkin A, Klein DF, Dillon D, Levitt M (1981) Blockade by imipramine or desipramine of panic induced by sodium lactate. *Am. J. Psychiatry* 138: 676-677.
- Rigby M, O'Donnell R, Rupniak NM (2005) Species differences in tachykinin receptor distribution: further evidence that the substance P (NK1) receptor predominates in human brain. *J. Comp. Neurol.* 490: 335–353.
- Riise T and Lund A (2001) Prognostic factors in major depression: a long-term follow-up study of 323 patients. *J. Affect. Disord.* 65: 297–306.
- Riley LA, Hart RP, Jonakait GM (1991) Both zimelidine and clorgyline decrease preprotachykinin mRNA in adult medullary raphe nuclei. *Mol Cell Neurosci.* 2 (2): 139-44.

- Rimon R, Le Grevés P, Nyberg F, Heikkilä L, Salmela L, Terenius L (1984) Elevation of substance P-like peptides in the CSF of psychiatric patients. *Biol Psychiatry* 19 (4): 509-16.
- Robbins TW (2016) Neurobehavioural sequelae of social deprivation in rodents revisited: Modelling social adversity for developmental neuropsychiatric disorders. *Psychopharmacology* 30 (11): 1082–1089.
- Roberson-Nay R, Eaves LJ, Hettema JM, Kendler KS, Silberg JL (2012a) Childhood separation anxiety disorder and adult onset panic attacks share a common genetic diathesis. *Depress. Anxiety* 29: 320-327.
- Roberson-Nay R, Latendresse SJ, Kendler KS (2012b) A latent class approach to the external validation of respiratory and non-respiratory panic subtypes. *Psychol Med.* 42: 461-74. b
- Roman E, Gustafsson L, Berg M, Nylander I (2006) Behavioral profiles and stress-induced corticosteroid secretion in male Wistar rats subjected to short and prolonged periods of maternal separation. *Horm Behav.* 50: 736-747.
- Roncon CM, Biesdorf C, Santana RG, Zangrossi H Jr, Graeff FG, Audi EA (2012) The panicolytic-like effect of fluoxetine in the elevated T-maze is mediated by serotonin-induced activation of endogenous opioids in the dorsal periaqueductal grey. *J. Psychopharmacol.* 26: 525-531.
- Roncon CM, Biesdorf C, Coimbra NC, Audi EA, Zangrossi H Jr, Graeff FG (2013) Cooperative regulation of anxiety and panic-related defensive behaviors in the rat periaqueductal grey matter by 5-HT_{1A} and mu-receptors. *J. Psychopharmacol.* 27: 1141-1148.
- Rosén A, Brodin K, Eneroth P, Brodin E (1992) Short-term restraint stress and s. c. saline injection alter the tissue levels of substance P and cholecystokinin in the periaqueductal grey and limbic regions of rat brain. *Acta Physiologica Scandinavica* 146 (3): 341-348.
- Roth TL, Lubin FD, Funk AJ, Sweatt JD (2009) Lasting Epigenetic Influence of Early-

- Life Adversity on the BDNF Gene. *Biological Psychiatry* 65: 760 –769.
- Ruffle JK (2014) Molecular neurobiology of addiction: what's all the (D) FosB about? *Am J Drug Alcohol Abuse* 40 (6): 428-437.
- Rupniak NM, Carlson EC, Harrison TOates B, Seward E, Owen S, Felipe C, Hunt S, Wheeldon A (2000) Pharmacological blockade or genetic deletion of substance P (NK (1)) receptors attenuates neonatal vocalisation in guinea-pigs and mice. *Neuropharmacology* 39 (8): 1413-1421.
- Rutte C, Taborsky M (2007) Generalized reciprocity in rats. *PLoS Biol.* 5 (7) e196.
- Santarelli L, Gobbi G, Debs PC, Sibille ET, Blier P, Hen R, Heath MJ (2001) Genetic and pharmacological disruption of neurokinin 1 receptor function decreases anxiety-related behaviors and increases serotonergic functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 1912-1917.
- Schenberg LC e Graeff FG (1978) Role of the periaqueductal gray substance in the antianxiety action of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav.* 9: 287-295.
- Schenberg LC, Vasquez EC, Costa MB (1993) Cardiac baroreflex dynamics during the defence reaction in freely moving rats. *Brain Res* 621: 50-58.
- Schenberg LC, Bittencourt AS, Sudré EC, Vargas LC (2001) Modeling panic attacks. *Neurosci Biobehav Rev* 25: 647-659.
- Schenberg LC, Capucho LB, Vatanabe RO, Vargas LC (2002) Acute effects of clomipramine and fluoxetine on dorsal periaqueductal grey-evoked unconditioned defensive behaviours of the rat. *Psychopharmacology* 159: 138-144.
- Schenberg LC, Dos Reis AM, Ferreira Pova RM, Tufik S, Silva SR (2008) A panic attack-like unusual stress reaction. *Horm. Behav.* 54: 584-591.
- Schenberg LC (2010) Towards a translational model of panic attack. *Psychol Neurosci.* 3: 9-37.
- Schenberg LC, Schimitel FG, Armini RS, Bernabe CS, Rosa CA, Tufik S, Muller CJ,

- Quintino-Dos-Santos JW (2014) Translational approach to studying panic disorder in rats: hits and misses. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 46: 472-496.
- Schenk S, Gorman K, Amit Z (1990) Age-dependent effects of isolation housing on the self-administration of ethanol in laboratory rats. *Alcohol* 7 (4): 321–326.
- Schmitel FG, de Almeida GM, Pitol DN, Armini RS, Tufik S, Schenberg LC (2012) Evidence of a suffocation alarm system within the periaqueductal gray matter of the rat. *Neuroscience* 200: 59-73.
- Schmitel FG, Muller CJ, Tufik S, Schenberg LC (2014) Evidence of a suffocation alarm system sensitive to clinically-effective treatments with the panicolytics clonazepam and fluoxetine. *J. Psychopharmacol.* 28: 1184-1188.
- Schütz MT, de Aguiar JC, Graeff FG (1985) Anti-aversive role of serotonin in the dorsal periaqueductal gray matter. *Psychopharmacology* 85: 340-5.
- Shahar-Gold H, Gur R, Wagner S (2013) Rapid and Reversible Impairments of Short- and Long-Term Social Recognition Memory Are Caused by Acute Isolation of Adult Rats via Distinct Mechanisms. *PLoS ONE* 8 (5): 1-10.
- Sharp LK, Lipsky MS (2002) Screening for depression across the lifespan: a review of measures for use in primary care settings. *Am. Fam. Physician* 66: 1001–1008.
- Shavitt RG, Gentil V, Mandetta R (1992) The association of panic/agoraphobia and asthma. Contributing factors and clinical implications. *Gen. Hosp. Psychiatry* 14: 420-423.
- Shirayama Y, Hiroshi M, Mizuo T, Hironobu I, Kiyohisa T (1996) Reduction of substance P after chronic antidepressants treatment in the striatum, substantia nigra and amygdala of the rat. *Brain Research* 739: 70-78.
- Shirayama Y, Chen ACH, Nakagawa S, Russell DS, Duman RS (2002) Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *The Journal of Neuroscience* 22 (8): 3251–3261.
- Silove D, Manicavasagar V, Curtis J, Blaszczynski A (1996) Is early separation

anxiety a risk factor for adult panic disorder?: a critical review. *Compr Psychiatry* 37: 167-179.

Singer E, Sperk G, Placheta P, Leeman SE (1979) Reduction of substance P levels in the ventral cervical spinal cord of the rat after intracisternal 5,7-dihydroxytryptamine injection. *Bruin Res.* 174: 362-365.

Siuciak JA, Altar CA, Wiegand SJ, Lindsay RM (1994) Antinociceptive effect of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Brain Research* 633: 326–330.

Siuciak JA, Boylan C, Fritsche M, Altar CA, Lindsay RM (1996) BDNF increases monoaminergic activity in rat brain following intracerebroventricular or intraparenchymal administration. *Brain Research* 71: 11-20.

Siuciak JA, Lewis DR, Wiegand SJ, Lindsay RM (1997). Antidepressant-like effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 56: 131–137.

Siuciak JA, Clark MS, Rind HB, Whittemore SR, *et al.* (1998) BDNF induction of tryptophan hydroxylase mRNA levels in the rat brain. *Journal of Neuroscience Research* 52: 149–158.

Slotten HA, Kalinichev M, Hagan JJ, Marsden CA, Fone KC (2006) Long-lasting changes in behavioural and neuroendocrine indices in the rat following neonatal maternal separation: gender-dependent effects. *Brain Res.* 1097: 123-132.

Soares VP, Zangrossi H Jr (2004) Involvement of 5-HT1A 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.

Soares VP, Zangrossi H Jr (2009) Stimulation of 5-HT1A e 5-HT2A receptors in the ventrolateral periaqueductal gray causes anxiolytic-, but not panicolytic-like effect in rats. *Behav. Brain Res.* 197 (1): 178-85.

Soliman F, Glatt CE, Bath KG, Levita L, Jones RM, Pattwell SS, Jing D, Tottenham N, Amso D, Somerville LH, Voss HU, Glover G, Ballon DJ, Liston C, Teslovich T, Van Kempen T, Lee FS, Casey BJ (2010) A genetic variant BDNF polymorphism

alters extinction learning in both mouse and human. *Science* 327: 863-866.

Spitz RA (1946) Anaclitic depression: an inquiry into the genesis of psychiatric conditions in early childhood. *Psychoanal Study Child.* 2: 313-42.

Stables JM, Beresford IJM, Arkinstall S, Ireland SJ, Walsh DM, Seale PW, Ward P, Hagan RM (1994) GR 138676, a novel peptidic tachykinin antagonist which is potent at NKs receptors. *Neuropeptides* 27: 333-341.

Steinberg R, Alonso R, Griebel G, Bert L, Jung M, Oury-Donat F, Poncelet M, Gueudet C, Desvignes C, Le FG, Soubrie P (2001) Selective blockade of neurokinin-2 receptors produces antidepressant-like effects associated with reduced corticotropin-releasing factor function. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 299 (2): 449-458.

Stephoe A, Shankar A, Demakakos P, Wardle J (2013) Social isolation, loneliness, and all cause mortality in older men and women. *Proc Natl Acad Sci USA.* 110(15) :5797-801.

Suárez J, Llorente R, Romero-Zerbp SY, Mateos B, Bermúdez-Silva FJ, de Fonseca FR, Viveros P (2009) Early maternal deprivation induces gender-dependent changes on the expression of hippocampal CB1 and CB2 cannabinoid receptors of neonatal rats. *Hippocampus* 19 (7): 623–632.

Suchecki D, Mozaffarian D, Gross G, Rosenfeld P, Levine S (1993a) Effects of Maternal Deprivation on the ACTH Stress Response in the Infant Rat. *Neuroendocrinology.* 57: 204–212.

Suchecki D, Rosenfeld P, Levine S (1993b) Maternal regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the infant rat: the roles of feeding and stroking. *Brain Res Dev Brain Res.* 75 (2): 185-92.

Suchecki D, Nelson DY, Oers HV, Levine S (1995) Activation and inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of the neonatal rat: Effects of maternal deprivation. *Psychoneuroendocrinology* 20 (6): 677.

Suri D, Veenit V, Sarkar A, Thiagarajan D, Kumar, A, Nestler EJ *et al.* (2013) Early

stress evokes age-dependent Biphasic changes in Hippocampal neurogenesis, Bdnf expression, and cognition *Biol. Psychiatry* 73: 658–666.

Thomas K, Davies A (2005) Neurotrophins: A Ticket to Ride for BDNF. *Current Biology* 15 (7): 262-264.

Thompson AH, Bland RC, Orn HT (1989) Relationship and chronology of depression, agoraphobia, and panic disorder in the general population. *Journal of Nervous and Mental Disease* 177: 456-463.

Thorsteinsson EB, James JE, Gregg ME (1998) Effects of video-relayed social support on hemodynamic reactivity and salivary cortisol during laboratory-based behavioral challenge. *Health Psychol.* 17(5): 436-44.

Tsankova N, Renthal W, Kumar A, Nestler EJ (2007) Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci* 8: 355–367.

Unger T, Carolus S, Demmert G, Ganten D, Lang RE, Maser-Gluth C, Steinberg H, Veelken R (1988) Substance P induces a cardiovascular defense reaction in the rat: pharmacological characterization. *Circ Res.* 63 (4): 812-20.

Van Oers HJ, de Kloet ER, Levine S (1998) Early vs. late maternal deprivation differentially alters the endocrine and hypothalamic responses to stress. *Brain Res Dev Brain Res.* 111: 245-252.

Van der Meij A, Comijs HC, Dols A, Janzing JG, Oude Voshaar RC (2014) BDNF in late-life depression: effect of SSRI usage and interaction with childhood abuse. *Psychoneuroendocrinology* 43: 81–89.

Vargas LC, Schenberg LC (2001) Long-term effects of clomipramine and fluoxetine on dorsal periaqueductal grey-evoked innate defensive behaviours of the rat. *Psychopharmacology (Berl.)* 155: 260-268.

Vaz SH, Cristovao-Ferreira S, Ribeiro JA, Sebastiao AM (2008) Brain-derived neurotrophic factor inhibits GABA uptake by the rat hippocampal nerve terminals. *Brain Research* 1219: 19–25.

- Vázquez DM, Eskandari R, Zimmer CA, Levine S, López JF (2002) Brain 5-HT receptor system in the stressed infant rat: implications for vulnerability to substance abuse. *Psychoneuroendocrinology*. 27 (1-2): 245-72.
- Vázquez DM, Bailey C, Dent GW, Okimoto DK, Steffek A, López JF, Levine S (2006) Brain corticotropin releasing hormone (CRH) circuits in the developing rat: effect of maternal deprivation. *Brain Res*. 22: 83-94.
- Veenema AH (2009) Early life stress, the development of aggression and neuroendocrine and neurobiological correlates: what can we learn from animal models? *Front Neuroendocrinol*. 30: 497–518.
- Vialou V, Robison AJ, LaPlant QC, Covington HE, Dietz DM, Ohnishi YN, Mouzon E, Rush AJ, Watts EL, Wallace DL, Iñiguez SD, Ohnishi YH, Steiner MA, Warren B, Krishnan V, Neve RL, Ghose S, Berton O, Tamminga CA, Nestler EJ (2010) Δ FosB in brain reward circuits mediates resilience to stress and antidepressant responses. *Nat. Neurosci*. 13: 745–752.
- Von Euler V, Gaddum J (1931) An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J. Physiol*. 72: 74-87.
- Walz C, Jungling K, Lessmann V, Gottmann K (2006) Presynaptic plasticity in an immature neocortical network requires NMDA receptor activation and BDNF release. *J Neurophysiol*. 96: 3512–16.
- Walsh DM, Stratton SC, Harvey FJ, Beresford IJ, Hagan RM (1995) The anxiolytic-like activity of GR159897, a non-peptide NK2 receptor antagonist, in rodent and primate models of anxiety. *Psychopharmacology* 121 (2): 186-91.
- Wang Q, Shao F, Wang W (2015) Maternal separation produces alterations of forebrain brain-derived neurotrophic factor expression in differently aged rats. *Front Mol Neurosci* 8: 49.
- Weaver ICG, Cervoni N, D'Alessio AC, Champagne FA, Seckl JR, Szyf M, Meaney MJ (2004) Epigenetic programming through maternal behavior. *Nature (Neuroscience)* 7: 847–854.

- Wertheime GSO, Giradi CEN, Oliveira ASM, Longo BM, Suchecki D (2016) Maternal deprivation alters growth, food intake, and neuropeptide Y in the hypothalamus of adolescent male and female rats. *Dev Psychobiol* 58: 1066–1075.
- Wigger A, Neumann ID (1999) Periodic maternal deprivation induces gender-dependent alterations in behavioral and neuroendocrine responses to emotional stress in adult rats. *Physiol Behav.* 66: 293-302.
- Winstanley CA, LaPlant Q, Theobald DE, Green TA, Bachtell RK, Perrotti LI, DiLeone RJ, *et al.* (2007) DeltaFosB induction in orbitofrontal cortex mediates tolerance to cocaine-induced cognitive dysfunction. *J Neurosci* 27:10497–10507.
- Wise CD, Berger BD, Stein L (1972) Benzodiazepines: anxiety-reducing activity by reduction of serotonin turnover in the brain. *Science* 177: 180-183.
- Wise CD, Berger BD, Stein L (1973) Evidence of α -noradrenergic reward receptors and serotonergic punishment receptors in the rat brain. *Biol Psychiatry* 6: 3-21.
- Woods SW, Charney DS, McPherson CA, Gradman AH, Heninger GR (1987) Situational panic attacks. Behavioral, physiologic, and biochemical characterization. *Arch. Gen. Psychiatry* 44: 365-375.
- Woods SW, Charney DS, Goodman WK, Heninger GR (1988) Carbon dioxide-induced anxiety. Behavioral, physiologic, and biochemical effects of carbon dioxide in patients with panic disorders and healthy subjects. *Arch. Gen. Psychiatry.* 45: 43-52.
- Woods SW, Charney DS, Delgado PL, Heninger GR (1990) The effect of long-term imipramine treatment on carbon dioxide-induced anxiety in panic disorder patients. *J. Clin. Psychiatry.* 51: 505-507.
- Yamashita PS, de Bortoli VC, Zangrossi H Jr (2011) 5HT_{2c} receptor regulation of defensive responses in the rat dorsal periaqueductal gray. *Neuropharmacology* 60 (2-3): 216-222.
- Yan Q, Radeke MJ, Matheson CR, Talvenheimo J, *et al.* (1997) Immunocytochemical

localization of TrkB in the central nervous system of the adult rat. *Journal of Comparative Neurology* 378: 135–157.

Yeragani VK, Pohl R, Balon R, Rainey JM, Berchou R, Ortiz A (1988) Sodium lactate infusion after treatment with tricyclic antidepressants: behavioral and physiological findings. *Biol. Psychiat.* 24: 767-774.

Zafra F, Hengerer B, Leibrock J, Thoenen H, Lindholm D (1990) Activity dependent regulation of BDNF and NGF mRNAs in the rat hippocampus is mediated by non-NMDA glutamate receptors. *EMBO J.* 9 (11): 3545-50.

Zafra F, Castrén E, Thoenen H, Lindholm D (1991) Interplay between glutamate and gamma-aminobutyric acid transmitter systems in the physiological regulation of brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor synthesis in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci* 88 (22): 10037-41.

Zafra F, Lindholm D, Castrén E, Hartikka J, Thoenen H (1992) Regulation of brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor mRNA in primary cultures of hippocampal neurons and astrocytes. *J Neurosci.* 12 (12): 4793-9.

Zawadzki JV, Furchgott RF, Cherry P (1981) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by substance P. *Fed. Proc.* 40:689.

Zorzo C, Méndez-López M, Méndez M, Arias JL (2019) Adult social isolation leads to anxiety and spatial memory impairment: brain activity pattern of COx and c-Fos. *Behavioural Brain Research.* 365: 170-177.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Esta tese amplia investigações anteriores do nosso laboratório sobre os efeitos comportamentais da SM (Quintino-dos-Santos, *et al.*, 2014; Borges-Aguiar *et al.*, 2018). Para isto, no Estudo I examinaremos as alterações tanto comportamentais

quanto neuroquímicas da MCPD de ratos adultos submetidos ao ISN e a PM. Enquanto no Estudo II examinaremos as alterações bioquímicas na MCPD de ratos submetidos ao ISA.

3. 2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar os níveis de ansiedade no labirinto-em-cruz elevado (LCE) e campo aberto (CA), bem como os níveis de depressão no teste de preferência por sacarose (TPS) e apetite (peso) em ratos adultos que foram submetidos ao ISN e à PM;
2. Avaliar a expressão genômica dos receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} na MCPD de ratos adultos submetidos ao ISN e à PM
3. Avaliar a expressão genômica dos neuropeptídeos SP, Δ FosB e BDNF na MCPD de ratos adultos submetidos ao ISN e à PM;
4. Avaliar a expressão genômica dos receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} de ratos adultos submetidos ao ISA de 1 e 7 dias;
5. Avaliar a expressão genômica dos neuropeptídeos SP, Δ FosB e BDNF na MCPD de ratos adultos submetidos ao ISA de 1 e 7 dias.

4. ESTUDO I

EFEITOS DA SEPARAÇÃO MATERNA NEONATAL NOS COMPORTAMENTOS DO RATO ADULTO, NOS NÍVEIS DE SEROTONINA E NA EXPRESSÃO GÊNÔMICA DOS RECEPTORES SEROTONÉRGICOS E DE NEUROPEPTÍDEOS DA MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL

Colaboradores:

Fabíola Donato Rosa Chioato (PPGCF-UFES)

Tamara Andrea Alarcon Ferreira (PPGCF-UFES)

Hugo Sanches Moreira de Rezende (PPGCF-UFES)

Alexandre Martins Costa Santos (PPGBF-UFES)

Angela Maria Ribeiro (PGBIQ, UFMG)

Fábio Antonio Borges Vigil (PGBIQ, UFMG)

Cristian Setubal Bernabé (PPGCF, UFES)

Sérgio Tufik (EPM, UNIFESP)

Rubia de Souza Armini (PPGCF, UFES)

Rita Gomes Wanderley Pires (PPGBF-UFES)

RESUMO

Estudos abundantes sugerem que a ansiedade de separação da infância (ASI) predisponha o indivíduo ao pânico e à depressão. Similarmente, mostramos que o pânico experimental à estimulação da matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPD) está facilitado em ratos adultos que foram submetidos ao isolamento social neonatal (ISN), um modelo de ASI. Portanto, este estudo analisou os níveis de serotonina (5-HT) e a expressão dos receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} e dos neuropeptídeos SP, Δ FosB e BDNF na MCPD de ratos adultos submetidos à privação materna (PM) em que a ninhada era coletivamente separada da mãe por 24 h no 9º dia pós-natal (PN9) ou ao ISN em que os filhotes foram individualmente separados da mãe e dos irmãos por 3 h diárias de PN2 a PN21. Estes grupos foram comparados a controles virgens e ratos brevemente manipulados por 10-15 s (BM). O efeito do cuidado materno foi avaliado reunindo-se os filhotes a mães conscientes (MC) ou anestesiadas (MA). Em PN60, os ratos foram testados para ansiedade e depressão, pesados e sacrificados para análises neuroquímica (HPLC) e genômica (rt-PCR) da MCPD. Os resultados mostraram que enquanto o peso dos ratos foi reduzido principalmente nos grupos ISN, a anedonia somente foi observada nos ratos PM (MC ou MA) e BM-MA (ISN ou PM). A ansiedade foi reduzida no primeiro grupo. Embora a expressão dos receptores e dos neuropeptídeos não tenham alterado, os níveis de 5-HT foram acentuadamente aumentados na MCPD. Embora o aumento de 5-HT na MCPD não possa explicar a facilitação, pela separação materna, do pânico e da depressão em ratos adultos, pode contribuir para o aumento da resiliência induzido pelo manuseio diário e/ou privação materna durante a lactação.

Palavras-chave: estresse neonatal; matéria cinzenta periaquedutal; 5-HT; BDNF;

SP; Δ FosB.

4.1 INTRODUÇÃO

Embora a ansiedade de separação seja um fator fundamental no desenvolvimento psicológico da criança, contribuindo para o estabelecimento do vínculo apropriado entre mãe e filho (Bowlby, 1988; Hock e Schirtzinger, 1992), a ansiedade de separação da infância (ASI) é uma condição clínica na qual a separação da criança de sua figura de apego (mãe ou substituta) é acompanhada por ansiedade excessiva, protestos, choro e recusa em ir à escola ou a qualquer lugar distante da figura de apego (APA, 2013). Estes comportamentos parecem ser devidos à ativação anormal de um sistema biológico de alarme que protege a criança de rupturas reais, ou potenciais, dos laços familiares (Bowlby, 1983; Klein RG, 1995).

Por outro lado, evidências abundantes sugerem que a ASI predisponha o indivíduo ao transtorno do pânico (TP) (Klein, 1964, 1993; Klein R.G., 1995). Em particular, estudos epidemiológicos em 1743 pares de gêmeos, monozigóticos e dizigóticos, sugerem que o mesmo grupo de genes seja responsável por 39% e 34,8% dos casos de ASI e TP, respectivamente (Roberson-Nay *et al.*, 2012a). Contrariamente, os genes associados ao transtorno superansioso da infância (*children overanxious disorder*) não apresentaram correlação alguma com os ataques de pânico (AP) da vida adulta (Roberson-Nay *et al.*, 2012a). A ASI também tem sido considerada um fator de risco importante na etiologia da depressão maior (DM) (Kendler *et al.*, 1992). Não surpreendentemente, o TP apresenta alta comorbidade com DM e, principalmente, depressão breve recorrente (Angst e Wicki, 1993). Estas observações são consoantes com o único estudo duplo-cego baseado em entrevistas clínicas que acompanhou 60 crianças saudáveis e 54 crianças com grave “recusa escolar” ao longo de 15 anos (12 a 27 anos de idade) (Klein RG, 1995). Os resultados mostraram que enquanto os diagnósticos de DM foram aumentados apenas marginalmente ($P < 0,10$), a incidência dos AP e das internações devidas a crises depressivas apresentou aumentos estatisticamente significantes em adultos que sofreram de ASI. No mesmo sentido, crianças com ASI cujos pais são portadores de TP apresentam respostas respiratórias exageradas ao CO₂ que são similares às daquelas dos pacientes portadores de “pânico respiratório” (Battaglia *et al.*, 1995; Roberson-Nay *et al.*, 2012b).

Embora o estresse do ambiente infantil também seja amplamente reconhecido como um fator de risco importante do TP e da DM (Klein, 1995; Kendler *et al.*, 1992; Battaglia *et al.*, 1995), Roberson-Nay e colaboradores (2012a) relataram que enquanto o ambiente adulto é responsável por 64% da variância dos AP, o ambiente infantil responde por apenas 1,2%.

Contrariamente, no entanto, estudos pré-clínicos do nosso laboratório mostraram que os AP à estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPD) foram facilitados nos ratos adultos que foram submetidos a um isolamento social neonatal (ISN) no qual os filhotes eram individualmente separados da mãe e dos irmãos por 3 h diárias ao longo de toda a lactação, qual seja, do 2º ao 21º dia pós-natal (PN2-PN21) (Quintino-dos-Santos *et al.*, 2014). Surpreendentemente, no entanto, o último estudo não encontrou nenhuma alteração nos níveis de ansiedade e depressão. O pânico à estimulação da MCPD também foi facilitado em ratos submetidos a uma privação materna (PM) em que os filhotes eram coletivamente separados da mãe por 3 h diárias (Borges-Aguiar *et al.*, 2018). Contudo, este efeito somente foi observado nos ratos submetidos à PM no “período hiporresponsivo ao estresse” (PN2-PN11) no qual a mãe exerce um papel crucial na proteção da prole contra os efeitos nocivos dos estressores ambientais (Suchecki *et al.*, 1993a,b, 1995). Em contraste, a PM ao longo de toda a lactação (PN2-PN21) não teve efeito algum nem na ansiedade, nem no pânico, ou na depressão, e até aumentou a resiliência dos ratos no teste da natação forçada (TNF) (Borges-Aguiar *et al.*, 2018). Por outro lado, a reunião dos filhotes isolados a mães conscientes (MC) ou anestesiadas (MA) mostrou que o cuidado materno tem um papel menor, porém importante, nos efeitos facilitadores do pânico e da depressão (Borges-Aguiar *et al.*, 2018). No conjunto, estes resultados sugerem que os efeitos tardios da PM e, possivelmente, do ISN, sejam devidos à interação do período de separação com o cuidado materno.

Embora os estudos acima ressaltem os efeitos específicos da separação materna no pânico experimental, não ficou claro se a facilitação dos AP foi devida à separação materna, ao excesso de atenção materna dedicada ao filhote no momento da reunião, ou à interação dos estresses da infância (separação materna)

e da vida adulta (cirurgia de implantação dos eletrodos, etc). Enquanto os ratos implantados com eletrodo eram permitidos se recuperar por apenas uma semana (Quintino-dos-Santos *et al.*, 2014; Borges-Aguiar *et al.*, 2018), ratos do primeiro estudo se recuperaram em gaiolas individuais com paredes de vidro, assim como no protocolo de isolamento social de adultos (Hall, 1998). Adicionalmente, Stewart e colaboradores (2004) mostraram que apenas os ratos separados maternalmente (24 h, PN3) e que também foram estressados quando adultos apresentaram ativação elevada das células granulares à estimulação elétrica da via perfurante do hipocampo. Como resultado, os últimos autores sugeriram que os efeitos da separação materna na infância permanecem latentes até serem revelados pelo estresse da vida adulta.

Tal como na sociedade humana (Bowlby, 1982; Rutter, 1991, 1997), a heterogeneidade das condições da separação materna coloca dificuldades enormes para a interpretação dos resultados. Além dos procedimentos já discutidos de ISN (separação individual da mãe e dos irmãos) e PM (separação coletiva da mãe), existem vários estudos de isolamento social adulto (ISA), nos quais espécimes adultos são alojados individualmente (*isolation-housing*), em crescimento, no qual os animais são isolados durante parte ou toda a adolescência (*isolation-reared animals*) e, mais raramente, em orfanade experimental, na qual os filhotes são separados da mãe e artificialmente alimentados a partir de PN2. Também não está claro se os melhores controles são ratos virgens (VRG) criados em condições normais, filhotes brevemente manipulados (BM) por apenas 10 ou 15 s e devolvidos imediatamente à mãe, ou filhotes brevemente separados (BS) por aproximadamente 15 min (este grupo tem sido inadequadamente chamado de *'handling'*). Adicionalmente, este e outros estudos empregam o protocolo de ninhada-dividida (*splitter litter*) onde metade da ninhada é submetida à separação materna e a outra metade ao protocolo dos controles. Por fim, a duração do período da separação também é uma variável crucial na determinação dos efeitos no rato adulto (para revisão ver Hall, 1998 e Levine; 2002, 2005).

Estas dificuldades são ao mesmo tempo um obstáculo e um forte ensejo para o estudo das bases moleculares destes fenômenos. Como os AP à estimulação elétrica da MCPD foram facilitados nos ratos submetidos ao ISN e à

PM (Quintino-dos-Santos *et al.*, 2014; Borges-Aguiar *et al.*, 2018), o presente estudo examinou os níveis de serotonina (5-HT) e a expressão de receptores serotoninérgicos (5-HT_{1A} e 5-HT_{2A}) e neuropeptídeos selecionados (SP, Δ FosB e BDNF) na MCPD de ratos adultos que foram submetidos ao ISN (3 h, PN2-PN21) ou à PM (24 h, PN9) e reunidos a MCs ou MAs. A SP foi selecionada devido à sua alta concentração na MCPD (Harding *et al.*, 2004) e seu aumento em ratos adultos socialmente isolados (Brodin *et al.*, 1994). Adicional a isto, evidências convincentes sugerem que a Δ FosB está implicada na expressão de SP e de ratos resilientes a choques inescapáveis (Berton *et al.*, 2007). BDNF foi escolhido devido ao seu estabelecido papel no desenvolvimento cerebral e, provavelmente, nos efeitos depressivos da separação materna (Recamier-Carballo *et al.*, 2017). Por fim, décadas de experiência clínica mostram o papel importante da 5-HT no envolvimento de transtornos psiquiátricos (Deakin e Graeff, 1991). Os efeitos da separação materna no peso e nos comportamentos dos ratos adultos (PN60) também foram examinados.

4.2 OBJETIVO

Avaliar os efeitos do ISN, da PM e da atenção materna no momento da reunião do filhote separado, sobre os comportamentos de ansiedade e depressão, sobre os níveis de 5-HT e 5-HIAA e sobre a expressão genômica dos receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} e dos neuropeptídeos SP, Δ FosB e BDNF na MCPD do rato adulto.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1 Animais

Ratas fêmeas primíparas (n=75) e ratos machos (n=15) da linhagem Wistar foram fornecidos pelo Biotério Central do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo e foram mantidos numa sala de circulação restrita do Laboratório de Neurobiologia dos Transtornos do Humor e da Ansiedade. A sala era dotada de renovação periódica do ar e controles de som (ruído branco de 46 dB), temperatura (23°C) e luminosidade (ciclo de 12 horas, luzes acesas às 6:00 h). Após o acasalamento, as ratas eram alojadas individualmente em caixas-ninho

de polipropileno (30 cm x 20 cm x 13 cm) com água e comida *ad libitum* e assoalho coberto de maravalha, até o desmame (PN21). As caixas eram limpas 2 vezes por semana. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética sobre Uso dos Animais em pesquisa científica (CEUA-UFES 41/2017) e está de acordo com as normas brasileiras do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, resoluções 30, 32 e 37) e do Instituto Nacional de Saúde dos EUA (*National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH Publications No. 80-23, 1996*).

4.3.2 Protocolos experimentais

Experimento 1: Efeitos do ISN de 3 h diárias por 20 dias (PN2-PN21) sobre os níveis de 5-HT e 5-HIAA das regiões dorsal e ventral da MCPA.

A data do nascimento foi designada como PN0. Após a sexagem dos filhotes e sacrifício das fêmeas em PN1, os machos eram separados de suas mães por 3 h diárias de PN2 a PN21. Para isso, os filhotes eram alojados individualmente em caixas de polipropileno (30 cm x 20 cm x 13 cm) e transferidos para sala distinta daquela da mãe. A separação materna era realizada segundo um desenho balanceado (partição da ninhada) em que metade da ninhada era isolada (ISN) e a outra metade era brevemente manipulada (BM) por aproximadamente 10 s e devolvida à mãe que fora alojada numa caixa de separação distinta da caixa-ninho.

Os grupos ISN e BM também foram comparados a um grupo virgem (VRG) que não foi nem manipulado, nem separado durante a amamentação. Quando adultos (PN60), os ratos eram sacrificados para remoção do cérebro para análise dos níveis de 5-HT e 5-HIAA das regiões dorsal e ventral da MCPA. Estes grupos estão ilustrados na Tabela 2.

Experimento 2: Efeito do ISN de 3 h diárias por 20 dias (PN2-PN21) e da reunião dos filhotes isolados a mães conscientes ou anestesiadas sobre a expressão genômica de receptores serotoninérgicos e de neuropeptídeos selecionados da MCPD.

Os procedimentos da separação foram idênticos ao do estudo anterior. Contudo, neste protocolo os filhotes foram separados em caixas de polipropileno e transferidos para um “armário de separação” situado em sala própria, que tinha 24 compartimentos (24 cm x 26 cm x 33 cm) munidos de portas individuais, sistema de renovação de ar e controles de luz (10 *lux*) e temperatura (23-26°C). Adicionalmente, os efeitos da atenção materna foram avaliados reunindo os filhotes separados a MC (zelosas) ou MA (negligentes). Para isso, metade das mães de cada grupo era administrada com hidrato de cloral (400 mg/kg, i. p) 20 minutos antes da reunião.

Quando adultos (PN60), os ratos eram submetidos aos testes de campo aberto (CA) e, em seguida ao labirinto-em-cruz elevado (LCE), para avaliação da ansiedade basal. No outro dia, eram submetidos ao teste da preferência por sacarose (TPS) e à pesagem para avaliação de traços depressivos. Em seguida, eles eram sacrificados para remoção do cérebro para análise da expressão genômica dos receptores serotoninérgicos e dos peptídeos na MCPD. Estes grupos estão ilustrados na Tabela 3.

Tabela 2. Grupos utilizados para ensaios bioquímicos dos níveis tissulares de 5-HT e 5-HIAA. Abreviaturas: ISN, isolamento social neonatal de 3 horas diárias por 20 dias (PN2-PN21); BM, controles brevemente manipulados; VRG, ratos virgens que não foram nem separados, nem manipulados.

Grupos	Número de animais
VRG	13
BM	13
ISN	12
TOTAL	38

Tabela 3. Grupos utilizados para ensaios da expressão de receptores serotoninérgicos e de neuropeptídeos. Abreviaturas: PM, privação materna de 24 h (PN9); MC, reunião a mães conscientes; MA, reunião a mães anestesiadas; SM, separação materna. Demais abreviaturas como na Tabela 1. Além dos grupos abaixo, foi realizado um grupo de ratos virgens (VRG) com 47 animais que não foram nem separados, nem manipulados.

Grupo	ISN		PM	
	MC	MA	MC	MA
SM	22	19	25	24
BM	20	19	23	24
TOTAL	42	38	48	48

Experimento 3: Efeitos da PM de 24 h em PN9 e da reunião dos filhotes privados a mães conscientes ou anestesiadas sobre a expressão genômica de receptores

serotonérgicos e de neuropeptídeos selecionados da MCPD.

Neste protocolo, metade da ninhada era submetida à privação materna de 24 h (PM) no mesmo compartimento do “armário de separação” e a outra metade era brevemente manipulada (BM) por aproximadamente 10 s e devolvida à mãe, permanecendo com a mesma por 24 horas numa caixa de separação distinta da caixa-ninho. Estes ratos (PM, BM) também foram comparados aos ratos VRG. Os demais procedimentos, incluindo a reunião às MCs ou MAs, foram idênticos aos do Experimento 2. Estes grupos estão ilustrados na Tabela 3.

4.3.3 Testes comportamentais

Teste do labirinto-em-cruz-elevado (LCE)

A ansiedade basal dos ratos foi avaliada num LCE feito de madeira revestida com fórmica. O LCE era montado 56 cm acima do assoalho e tinha 4 braços perpendiculares de 50 cm de comprimento e 10 cm de largura, dos quais 2 braços opostos tinham paredes de 40 cm de altura (braços fechados) e os outros 2 uma borda de 1 cm de altura (braços abertos). Os braços se comunicavam por uma plataforma central (10 x 10 cm). Os testes eram realizados numa sala com atenuação sonora munida de um exaustor que produzia um ruído branco de 48 dB. Durante os testes, a iluminação no centro do LCE era de 44 lux e os ratos podiam ser monitorados por um observador externo através de uma janela opaca ao rato. Para isso, o rato era colocado na plataforma central voltado para o braço fechado e filmados durante 5 min com uma câmera digital fixada ao teto (Samsung, Modelo HMX-QF30). O tempo de exploração dos braços abertos (TBA), dos braços fechados (TBF) e da plataforma central (TPC), bem como o número de entradas nos braços abertos (EBA) e braços fechados (EBF) foram quantificados por video-análise. As porcentagens das entradas (%EBA) e do tempo (%TBA) no braço aberto foram calculadas como $EBA \times 100 / (EBA + EBF)$ e $TBA \times 100 / (TBA + TBF)$, respectivamente.

Teste do campo aberto (CA)

O teste do CA foi realizado num equipamento retangular com aresta de 1 m e paredes de 0,6 m de altura. O CA situava-se na mesma sala do LCE e possuía um

assoalho dividido em 49 quadrados de 14 cm de aresta, dos quais 9 compunham a região central e 40 a região periférica. Durante as sessões, o rato era colocado no centro do CA e filmado por 5 min. Os comportamentos de defecação (número de bolos fecais), locomoção periférica (peritaxia) e central (centrotaxia) foram quantificados por video-análise.

Teste de Preferência à Sacarose (TPS)

Para a realização deste teste, os ratos eram colocados em gaiolas individuais e privados de água por 24 h. Em seguida eram expostos a bebedouros contendo água ou solução de sacarose 1% por 24 h (Willner *et al.*, 1992). Foram avaliados o consumo percentual de sacarose (%CS) e a preferência por sacarose (PPS). O %CS foi calculado como $\text{ingesta de sacarose} \times 100 / (\text{ingesta de sacarose} + \text{ingesta de água})$. A PPS foi calculada pela diferença entre os volumes ingeridos de sacarose e água (sacarose-menos-água).

4.3.4 Ensaios bioquímicos

Coleta das amostras da MCPA

Aproximadamente 24 horas após os testes comportamentais (PN60), os ratos eram gentilmente conduzidos a uma guilhotina e decapitados sem utilização de anestésico. Imediatamente após, o cérebro era removido para a coleta das amostras da MCPA. Para isto, o cérebro era colocado num suporte de fabricação própria que permitia a realização de seções coronais de aproximadamente 1 mm de espessura (Fig. 20). Foram feitas 3 a 4 seções da MCPA entre as coordenadas aproximadas de 7,3 mm e 8,3 mm posteriores ao bregma (Paxinos e Watson, 1998). As seções eram então estendidas num papel de filtro colocado sobre uma lâmina de plástico preto que aumentava o contraste das estruturas cerebrais. O conjunto apoiava-se numa placa de Petri resfriada em gelo. Durante a picotagem (*punching*) da MCPA, as seções eram continuamente umedecidas com solução salina (NaCl 0,9%). A MCPV (Experimento 1), compreendendo apenas a coluna ventrolateral da MCPA, e a MCPD (Experimentos 1, 2 e 3), compreendendo as colunas dorsomedial, dorsolateral e lateral da MCPA (Fig. 21), eram totalmente removidas com o auxílio

de

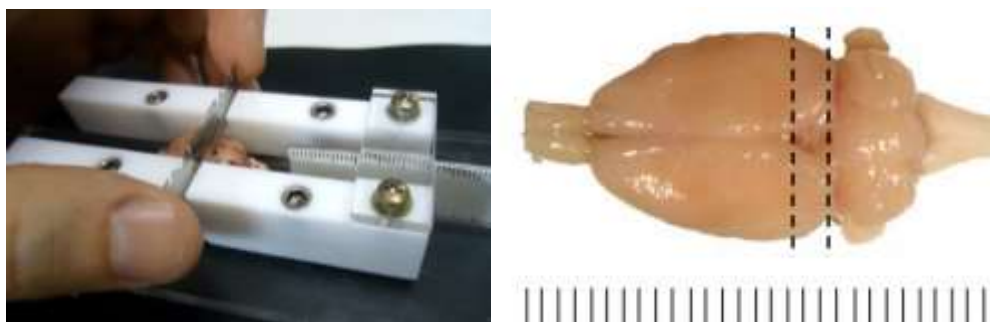


Figura 20. Fatiador de cérebro e limites da região da qual foram coletadas as seções da MCPA (escala em milímetros).

A



B



C

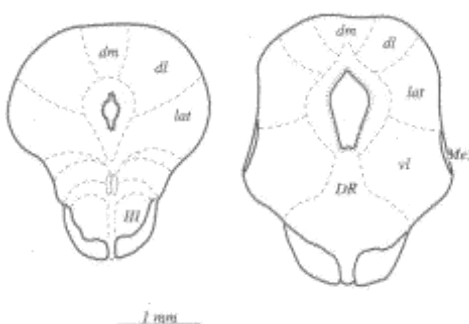


Figura 21. Procedimento de picotagem (*punching*) das regiões da MCPA. A) Picotador com tecido removido na ponta do mandril; B) Seções coronais do tronco cerebral (1 mm de espessura) com picotagem parcial; C) diagrama de seções coronais das regiões rostral e intermediária da MCPD (Paxinos e Watson, 1998). Abreviaturas: III, n. oculomotor; dm, dl, lat, vl, colunas dorsomedial, dorsolateral, lateral e ventrolateral da MCPA, respectivamente; DR, n. dorsal da rafe; Me5, n. mesencefálico do trigêmeo.

uma lupa e de um perfurador de aço inoxidável feito com um segmento de agulha de anestesia epidural com diâmetros externo e interno de 1,4 e 1 mm, respectivamente (Embramac, 17G, Itajaí, Brasil). O bordo da extremidade da cânula foi desbastado e polido até atingir uma espessura de aproximadamente 0,2 mm, facilitando a picotagem e reduzindo a maceração do tecido. O mandril da própria agulha auxiliava na expulsão do material coletado em seu interior. As amostras eram pesadas (somente para os ensaios de HPLC), armazenadas em gelo seco e congeladas num *ultrafreezer* a -80°C (para os ensaios de HPLC e rt-PCR).

Ensaio em cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC)

As amostras eram homogeneizadas em tubo “potter” com 290 μl de ácido perclórico (HClO_4 0,1 M), 5 μl de ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA 0,1 mM) e 5 μl de metabisulfito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 0,4 mM). A seguir, elas eram centrifugadas a 10.000 rpm, 30 min, 4°C . O sobrenadante (200 μl) era mantido entre 0°C e 4°C até ser analisado num equipamento de HPLC (Shimadzu LC-10AD, Tokyo, Japão) acoplado a um detector eletroquímico com eletrodo de carbono vítreo (Shimadzu L-ECD-6A) (Apêndice A).

A cromatografia foi feita com uma coluna analítica C18 (Hibar-Futigsanle RT) com partículas de 3 μm (150 mm X 4,6 mm, ID). Os dados cromatográficos foram analisados num integrador (Shimadzu C-R7 Ae plus). A fase móvel consistiu de uma solução de 0,194 M de ácido cítrico monohidratado, 0,243 M de acetato de sódio trihidratado e $2,95 \times 10^{-4}\text{M}$ de EDTA, resultando num volume final de 500 ml. O fluxo da bomba foi fixado em 1,0 ml/min e o potencial do eletrodo em 0,85 V. As concentrações tissulares de 5-HT e do seu principal metabólito (5-HIAA) foram calculadas por interpolação das respectivas curvas-padrão. Os valores obtidos foram expressos em ng/g de tecido úmido. O cociente 5-HIAA/5-HT foi usado como índice da taxa de renovação de 5-HT (TR, *turnover*).

Ensaio em tempo real da reação em cadeia da polimerase (rt-PCR)

Preparação do material: Estudos preliminares mostraram que os ensaios de rt-PCR requereriam amostras da MCPD de, no mínimo, 5 a 6 ratos para compor

cada dado amostral. Conseqüentemente, foram necessários 20 a 24 ratos para formar cada grupo (ISN-MC, BM-MC; ISN-MA, BM-MA; PM-MC, BM-MC; PM-MA, BM-MA) com 4 dados amostrais, cada ($n=4$) (Fig. 22). O grupo VRG utilizou um número maior de ratos (47) porque tinha 9 dados amostrais ($n=9$). Portanto, cada dado amostral corresponde a uma mistura dos tecidos (*pool*) de 5 a 6 ratos que foram submetidos ao mesmo protocolo experimental.

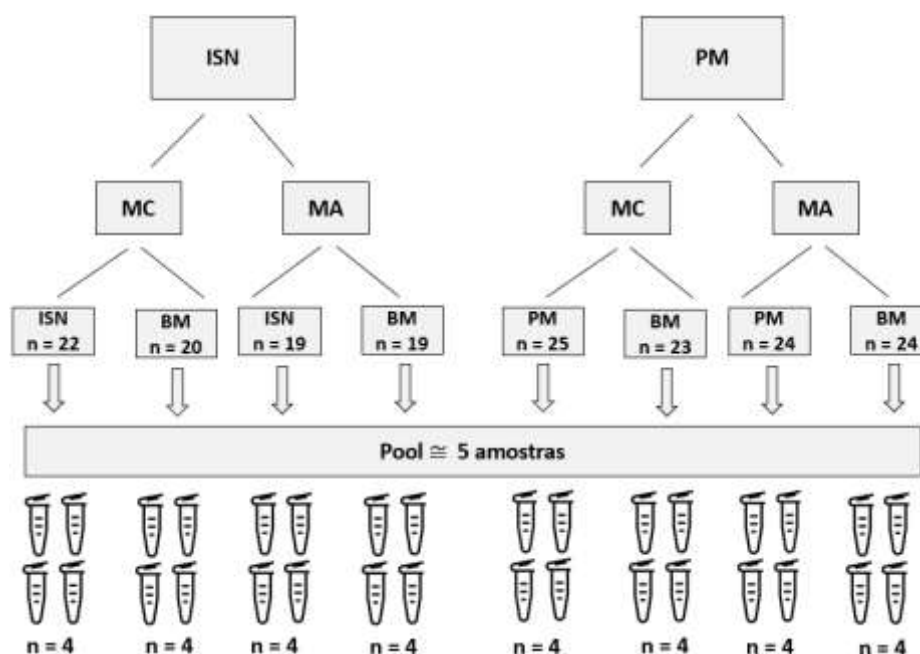


Figura 22. Representação esquemática dos grupos experimentais e os números dos dados amostrais.

Extração de RNA: O material de cada amostra (*pool* de 5 a 6 ratos) foi solubilizado em Trizol (500 μ L, Sigma-Aldrich, EUA) e homogeneizado por 30 segundos (Pellet Pestle® Motor, Kontes). Em seguida, o homogenato era centrifugado por 10 min a 12.000 g e 4°C (Eppendorf 5415 R, Hamburgo, Alemanha) e o sobrenadante era adicionado a 200 μ L de clorofórmio PA (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), agitado levemente, incubado à temperatura ambiente por 5 minutos e submetido a uma nova centrifugação (15 min, 12.000 g, 4°C). Para procedermos à precipitação do RNA, a fase aquosa era recuperada em 500 μ L de isopropanol PA (Sigma-Aldrich) e submetida a uma nova centrifugação (10 min, 12.000 g, 4°C). Após isto, o precipitado era lavado em etanol 75% (1 mL) e submetido a uma centrifugação mais branda (8.000 g, 5 min, 4°C). Por fim, o RNA era ressuspendido em 15 μ L de água deionizada com dietilpirocarbonato (0,1%, DEPC, Sigma-Aldrich) (Apêndice B). A concentração e a qualidade do RNA foram verificadas por

espectrometria (260/280 nm) num equipamento NanoDrop™ (ThermoScientific, Wilmington, EUA), e por eletroforese (Biorad, CA, USA) em gel de agarose a 80 V, por 30 minutos, em tampão de ácido 3-[N-morfolino]propanosulfônico (MOPS), respectivamente (Apêndice C). As bandas foram observadas em um transluminador UV (302 nm, Biorad ChemiDoc™XRS+) (Fig. 23).

Síntese de DNA complementar (cDNA): A síntese do cDNA foi realizada com o kit iScript cDNA Synthesis (BioRad, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante, usando o equipamento PCR S1000 Thermal Cycler (BioRad, Irvine, EUA). As amostras de RNA (1 µL com 2 µg de RNA) foram submetidas ao seguinte protocolo: 5 minutos a 25°C (anelamento), 30 minutos a 42°C (transcrição reversa) e 5 minutos a 85°C (inativação da transcriptase reversa) (Apêndice D).



Figura 23. Eletroforese do RNA extraído em gel de agarose.

Reação em cadeia da polimerase em tempo real (rt-PCR): Após a transcrição reversa, as amostras de cDNA foram amplificadas por rt-PCR utilizando-se o kit iQ SYBR Green Supermix (Biorad, Irvine, EUA) e com o equipamento CFX96 Real Time PCR (Biorad, Irvine, EUA). As reações foram realizadas num volume total de 10 µL contendo 0,5 µL de cDNA, 5 µL de SYBR Green Supermix 2x, 3,5 µL de água purificada e 0,5 µL de cada iniciador (10 µM). Foram realizados 40 ciclos após a desnaturação inicial de acordo com os seguintes parâmetros: 95°C (desnaturação, 15 s); 60°C (anelamento, 30 s) e 72°C (amplificação, 30 s). Para garantir a qualidade da reação, as amostras foram preparadas em triplicata. A expressão genômica relativa foi quantificada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ utilizando o gene da desidrogenase do gliceraldeído 3-fosfato (GAPDH, Exxtend, Paulínia, BR) para normalização dos

dados (Campos *et al.*, 2013). A sequência dos *primers* (5HT_{1A}, 5HT_{2A}, SP, BDNF, ΔFosB e GAPDH), foi desenhada utilizando o site da Integrated DNA Technologies (IDT, <http://www.idtdna.com/scitools/Applications/RealTimePCR/>) e confirmada para homologia e especificidade por BLAST (GeneBank, U. S. National Library Medicine, EUA) (Tabela 4).

Tabela 4. Sequência dos iniciadores (*primers*) da Exxtend Biotecnologia, Paulínia, Brasil utilizados na rt-PCR.

Gene	Amplicon (bp)	T _m (°C)	Sequência 5' – 3'
5HT _{1A} – F	76	62	CCGTGAAAGGAAGACGGTGA
5HT _{1A} – R		60	AATGAAAAACGGCAGCCAGC
5HT _{2A} – F	83	64	CCAACGGTCCATCCACAGAG
5HT _{2A} – R		60	TGCACGCCTTTTGCTCATTG
SP – F	105	62	TGAAAATCCTCGTGGCGGTG
SP – R		62	CGGACCAGTCGGACCAATAA
ΔFosB – F	81	64	CGCATCCTCTCACAGAGGTC
ΔFosB – R		64	ATATCGAGGGTAGGGGAGCC
BDNF – F	124	58	TTACACGAAGGAAGGCTGC
BDNF – R		54	TATGAACCGCCAGCCAAT
GAPDH – F	83	58	TGCCCCCATGTTTGTGATG
GAPDH – R		58	TGGTGGTGCAGGATGCATT

F, sentido 5'-3' (*forward*); R, sentido 3'-5' (*reverse*); T_m, *melting temperature*.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Concentrações de 5-HT e 5-HIAA do rato adulto: As concentrações (ng/g) dos analitos foram convertidas para logaritmos. A TR da 5-HT foi calculada como Log[5-HIAA]/Log[5-HT]. Após exclusão dos valores extremos (*outliers*) para o nível descritivo de P<0,05, pelo método do resíduo normalizado máximo de Grubbs (Snedecor and Cochran, 1982), os valores foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de duas vias (separação versus região da MCPA) seguida de comparações múltiplas para o nível descritivo de 5% de Bonferroni.

Receptores serotoninérgicos, neuropeptídeos do rato adulto: Os dados de rt-PCR foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida de comparações

múltiplas para o nível descritivo de 5% de Bonferroni. Como a atenção materna não foi analisada no grupo VRG, este grupo foi comparado aos demais por ANOVA de uma via. A contribuição específica da separação e atenção materna, bem como a interação destes fatores, foi avaliada por ANOVA de duas vias dos grupos ISN e BM que foram expostos às MCs ou MAs. A expressão dos receptores serotoninérgicos e dos neuropeptídeos também foi examinada por análise de correlação (Pearson) e análises multivariadas dos componentes e fatores principais.

Pesos e comportamentos do rato adulto: Os procedimentos ANOVA foram similares aos utilizados para os receptores serotoninérgicos e neuropeptídeos. Contudo, como o mesmo rato foi exposto a ambos os bebedouros de água e sacarose, a PPS (diferença sacarose-menos-água) foi examinada por ANOVA para medidas repetidas seguida por testes-t pareados ($P < 0,05$).

As análises estatísticas foram realizadas com o programa *Statistical Analysis System* (SAS[®], Cary, EUA).

4.5 RESULTADOS

4.5.1 Efeitos comportamentais

Efeitos do isolamento social, da privação materna e da atenção materna durante a reunião do filhote separado à ninhada, sobre o peso do rato adulto. Os grupos submetidos ao protocolo do ISN apresentaram pesos significativamente diferentes ($F_{4,102} = 7,51$; $P < 0,0001$). Este efeito foi primariamente devido aos pesos maiores dos ratos VRG relativamente aos grupos ISN-MC ($t = 4,38$; $P < 0,0001$), BM-MA ($t = 4,01$; $P < 0,0001$) e ISN-MA ($t = 3,55$; $P < 0,001$) e dos ratos BM-MC relativamente aos grupos ISN-MC ($t = 3,0$, $P < 0,005$) (Fig. 24, esq.).

A ANOVA de 2 vias dos ratos reunidos às MCs ou às MAs também indicou diferenças significantes entre grupos ($F_{3,76} = 3,82$, $P < 0,01$). Este efeito foi principalmente devido à interação da separação e atenção materna ($F_{1,76} = 5,79$, $P < 0,02$) e, marginalmente, à contribuição isolada da separação ($F_{1,76} = 3,50$; $P < 0,07$).

Os grupos submetidos ao protocolo da PM também apresentaram pesos significativamente diferentes ($F_{4,122}=3,15$; $P<0,05$). As diferenças foram devidas aos pesos maiores dos ratos VRG relativamente aos grupos BM-MA ($t=2,62$; $P<0,01$) e ISN-MA ($t=3,12$; $P<0,005$). Contudo, não foram observados efeitos significantes da atenção materna.

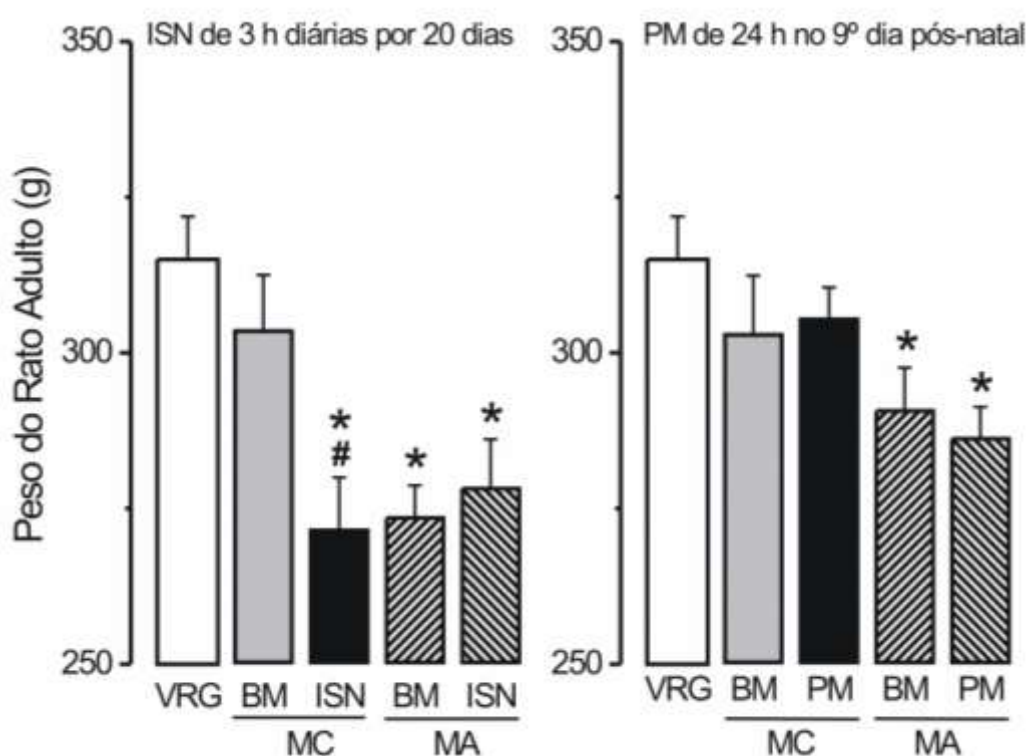


Figura 24. Efeitos do ISN, da PM e da atenção materna durante a reunião do filhote separado à ninhada, sobre o peso do rato adulto. Abreviaturas: VRG, ratos virgens ($n=20$); BM, ratos brevemente manipulados (~ 10 s); ISN, isolamento social neonatal por 3 h diárias ao longo da lactação; PM, privação materna por 24 h no 9º dia pós-natal; MC, reunião a mães conscientes; MA, reunião a mães anestesiadas. * $P<0,05$, estatisticamente diferente dos ratos VRG, # $P<0,05$, estatisticamente diferente dos ratos BM (ANOVA de uma via seguida de testes *post hoc* de Bonferroni para 4 comparações com VRG ou BM).

Efeitos do isolamento social neonatal, da privação materna e da atenção materna sobre os comportamentos no CA e no LCE. Os grupos expostos ao CA somente diferiram quanto à PTX ($F_{4,101}=3,11$; $P<0,02$) (Figs. 25-26). Estas diferenças foram devidas tanto ao aumento significativo da atividade dos ratos BM-MA ($t=3,31$; $P<0,001$) quanto aos aumentos marginais dos ratos BM-MC ($t=2,13$; $P<0,04$) e ISN-MC ($t=2,36$; $P<0,02$) relativamente aos ratos VRG.

Em contraste, os grupos submetidos ao ISN apresentaram diferenças altamente significantes para EBF ($F_{4,101}=5,18$; $P<0,001$), %EBA ($F_{4,101}=4,20$; $P<0,005$) e, em menor grau, %TBA ($F_{4,101}=3,72$; $P<0,01$). Estas diferenças foram basicamente devidas à atividade exploratória reduzida do grupo VRG (Fig. 27). Em particular, a EBF dos ratos VRG foi menor que aquela dos ratos BM-MC ($t=3,30$; $P<0,001$), ISN-MC ($t=3,4$; $P<0,001$), BM-MA ($t=3,92$; $P<0,0005$) e, marginalmente, ISN-MA ($t=2,43$; $P<0,02$) (Fig. 27). No mesmo sentido, a %EBA dos ratos VRG também foi menor que a dos ratos ISN-MC ($t=3,48$; $P<0,001$), BM-MA ($t=3,3$; $P<0,001$), ISN-MA ($t=2,62$; $P<0,01$) e, marginalmente, BM-MC ($t=1,95$; $P<0,05$). O grupo VRG também apresentou %TBA marcadamente inferior ao grupo BM-MA ($t=3,70$; $P<0,0005$) e, marginalmente, ao grupo ISN-MC ($t=2,4$; $P<0,02$).

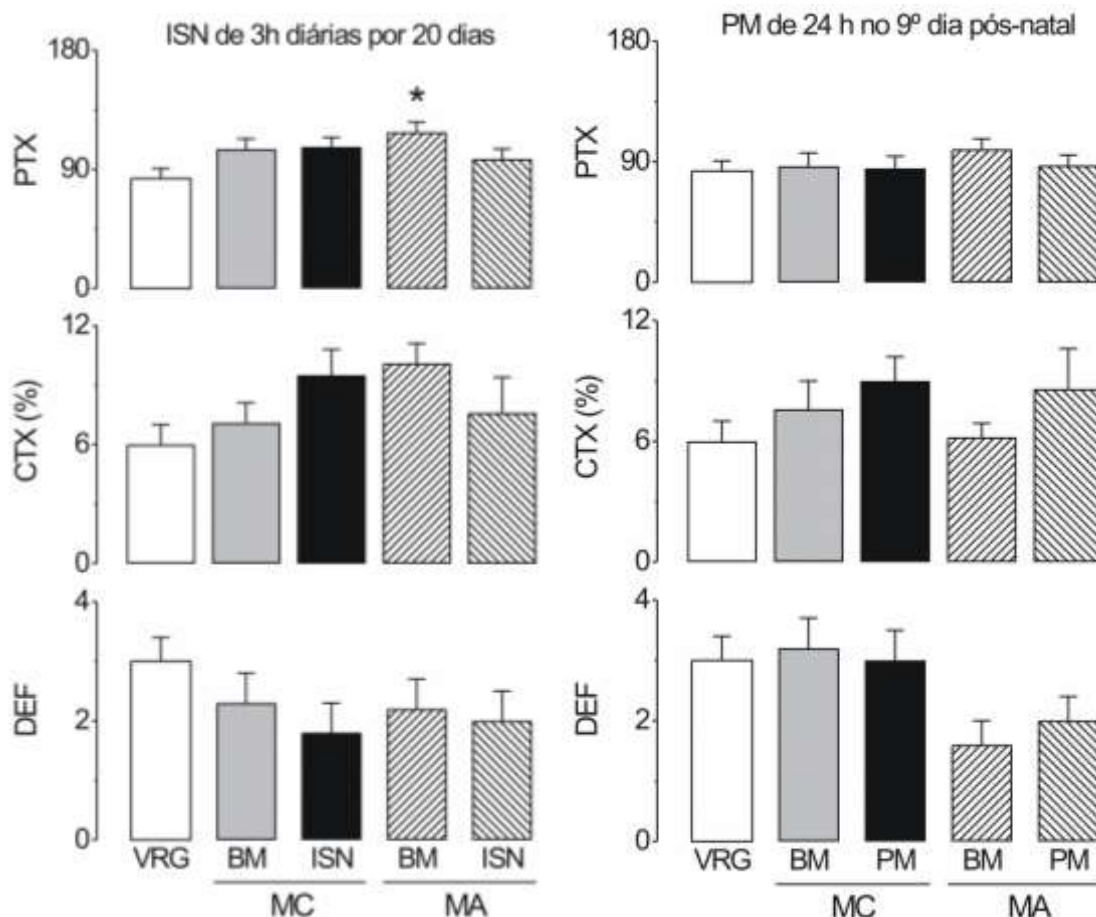


Figura 25. Efeitos do ISN e da atenção materna durante a reunião do filhote isolado à ninhada, sobre o comportamento do rato adulto no campo aberto (CA). PTX – atividade na periferia do CA (peritaxia), CTX – atividade no centro do CA (centrotaxia), DEF – defecação (número de bolos fecais). Demais detalhes como na Figura 24.

Figura 26. Efeitos da PM e da atenção materna durante a reunião do filhote isolado à ninhada, sobre o comportamento do rato adulto no campo aberto (CA). Demais detalhes ver na Figura 24.

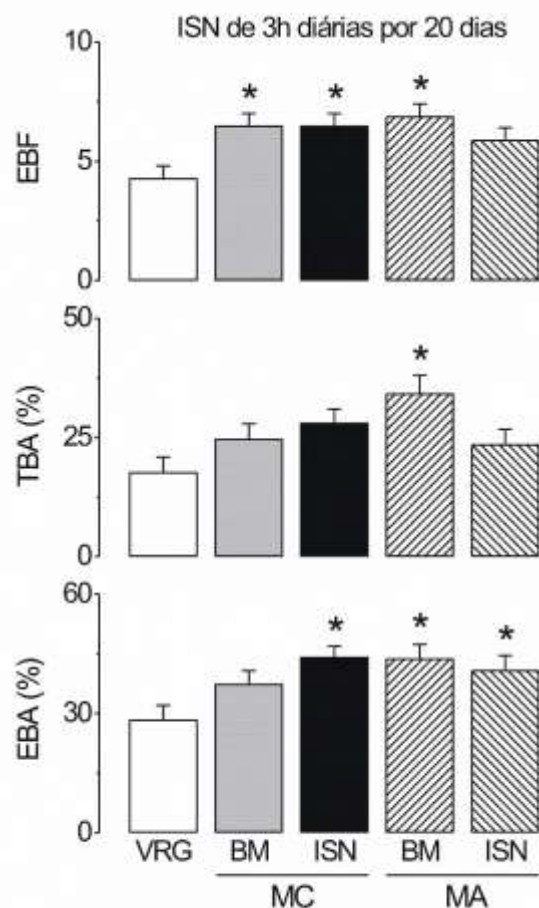


Figura 27. Efeitos do ISN e da atenção materna durante a reunião do filhote isolado à ninhada, sobre o comportamento do rato adulto no labirinto-em-cruz elevado (LCE). EBF – número de entrada no braço fechado, TBA (%) – porcentagem do tempo no braço aberto, EBA (%) - porcentagem da entrada no braço aberto. Demais detalhes como na Figura 24.

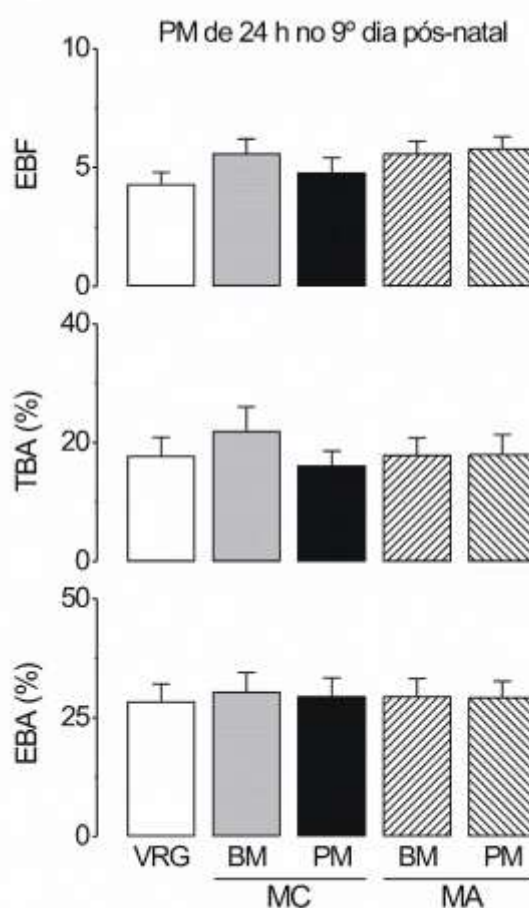


Figura 28. Efeitos da PM e da atenção materna durante a reunião do filhote isolado à ninhada, sobre o comportamento do rato adulto no labirinto-em-cruz elevado (LCE). EBF – número de entrada no braço fechado, TBA (%) – porcentagem do tempo no braço aberto, EBA (%) - porcentagem da entrada no braço aberto. Demais detalhes como na Figura 24.

Em contraste, o grupo BM-MA apresentou %TBA maior que todos os demais. Além de serem mais ativos que os ratos VRG para todas as variáveis do LCE, os ratos BM-MA apresentaram %TBA marginalmente superior aos ratos BM-MC ($t=2,0$; $P<0,05$) e ISN-MA ($t=2,2$; $P<0,02$) (Fig. 27). Não foram observados efeitos significantes da PM em nenhuma variável do LCE (Fig. 28).

Efeitos do isolamento social, da privação materna e da atenção materna durante a reunião do filhote isolado, sobre as variáveis do TPS. Grupos submetidos ao ISN apresentaram diferenças estatisticamente significantes da ingestão de sacarose ($F_{4,102}=3,52$; $P<0,01$) (Tabela 5), do %CS ($F_{4,102}=3,31$; $P<0,01$) (Fig. 29,

esq) e da PPS ($F_{4,102}=3,40$; $P<0,01$) (Fig. 29, esq). Estas diferenças foram devidas à redução da ingesta de sacarose dos ratos BM-MA em relação aos ratos VRG ($t=3,37$; $P<0,001$) e BM-MC ($t=2,96$; $P<0,005$), à redução da %CS dos ratos BM-MA em relação aos ratos VRG ($t=3,03$; $P<0,005$) e à redução acentuada da PPS do mesmo grupo em relação aos grupos VRG ($t=3,38$; $P<0,001$) e BM-MC ($t=3,03$; $P<0,005$) (Tab. 5, Fig. 29, esq.). A comparação entre os volumes ingeridos de sacarose e água (teste-t pareado) mostrou, no entanto, que a ingesta de sacarose foi significativamente maior que a de água em todos os grupos exceto BM-MA (Tabela 5, Fig. 30, esq.).

Os grupos submetidos à PM de 24 h somente apresentaram diferenças significantes na ingesta de sacarose ($F_{4,118}=3,71$; $P<0,01$) e, marginalmente, na PPS ($F_{4,118}=2,44$; $P<0,05$). Em particular, ratos VRG ingeriram volumes de sacarose maiores que aqueles dos grupos PM-MC ($t=2,7$; $P<0,01$) e BM-MA ($t=2,7$; $P<0,01$) (Tabela 4). Adicionalmente, a ingesta de sacarose do grupo BM-MC foi maior que a de água ($t=2,95$; $P<0,01$) (Tabela 5, Fig. 30). Em contraste, as diferenças na PPS não alcançaram o critério Bonferroni (Figs. 29-30, dir.).

Tabela 5. Efeitos da separação e da atenção maternas no teste de preferência por sacarose (TPS). Os valores representam as médias (\pm EPM) dos volumes ingeridos de água e sacarose, e as respectivas diferenças (Δ). ** $P<0,01$, *** $P<0,005$, diferente do grupo VRG; #### $P<0,005$, diferente do grupo BM-MC (testes *post-hoc* de Bonferroni); + $P<0,05$, ++ $P<0,01$, +++ $P<0,005$, diferenças significantes entre os volumes ingeridos de sacarose e água (teste-t pareado de Student). Demais abreviaturas como na Fig. 24.

Grupos	<i>n</i>	Água (ml)	Sacarose (ml)	Δ (S-A)
VRG	27	30,3 \pm 3,2	61,5 \pm 5,8	31,2 \pm 7,6+++
ISN BM-MC	20	30,3 \pm 4,3	59,9 \pm 6,1	29,6 \pm 8,6+++
ISN-MC	22	34,4 \pm 6,1	56,3 \pm 5,0	21,9 \pm 8,7+
BM-MA	19	44,4 \pm 5,1	35,1 \pm 5,8#####	-9,3 \pm 10,6#####
ISN-MA	19	31,6 \pm 5,2	48,4 \pm 5,1	16,7 \pm 7,9+
PM BM-MC	23	32,1 \pm 4,1	61,4 \pm 7,6	29,3 \pm 9,9++
PM-MC	25	34,3 \pm 5,8	39,9 \pm 5,7**	5,7 \pm 9,6
BM-MA	24	30,4 \pm 3,8	39,5 \pm 3,5**	9,0 \pm 6,0
PM-MA	24	40,3 \pm 4,7	44,0 \pm 6,2	3,7 \pm 9,4

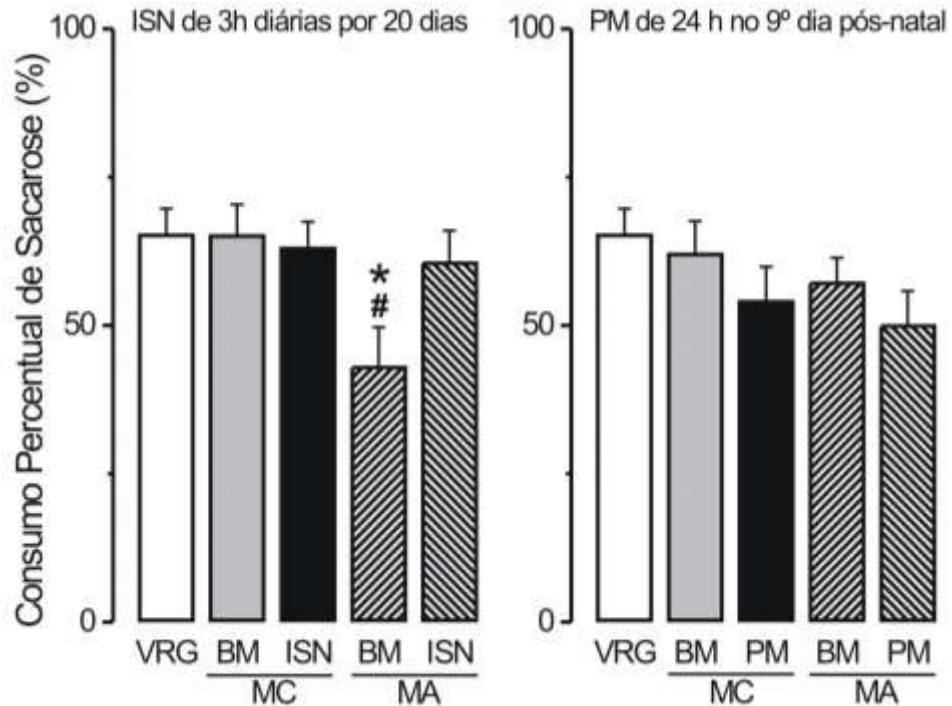


Figura 29. Efeitos do ISN, da PM e da atenção materna durante a reunião do filhote separado à ninhada, no consumo percentual por sacarose do rato adulto. Demais detalhes como na Fig. 24.

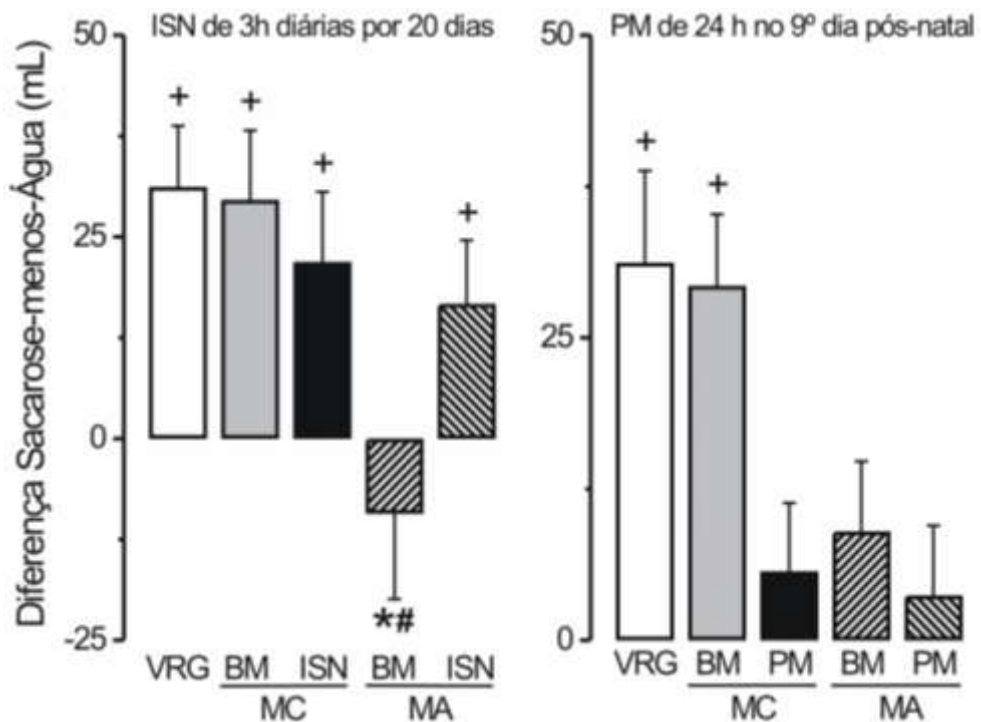


Figura 30. Efeitos do ISN, da PM e da atenção materna durante a reunião do filhote separado à ninhada, sobre a preferência por sacarose dos ratos adultos. Note que a PPS foi nula no grupo BM-MA submetido do protocolo ISN e nos grupos PM-MC, BM-MA e PM-MA do protocolo PM. + $P < 0,05$, consumo de sacarose maior que o de água (teste-t pareado de Student); * $P < 0,05$, estatisticamente diferente do grupo VRG, # $P < 0,05$, estatisticamente diferente do grupo BM (teste *post-hoc* de Bonferroni).

4.5.2 Efeitos Bioquímicos

Efeitos do isolamento social nos níveis de 5-HT e de 5-HIAA e na taxa de renovação da 5-HT das regiões dorsal e ventral da matéria cinzenta periaquedutal do rato adulto. Os grupos apresentaram diferenças altamente significativas nos níveis de 5-HT da MCPD ($F_{5,58} = 5,22$; $P < 0,0005$). Estas diferenças foram devidas tanto à região da MCPA ($F_{1,58} = 6,87$; $P < 0,01$) quanto ao estresse neonatal ($F_{2,58} = 7,76$; $P < 0,001$). Em particular, os níveis de 5-HT da MCPD dos ratos VRG foram significativamente menores que aqueles dos ratos ISN ($t = 3,86$; $P < 0,0005$) e BM ($t = 3,47$; $P < 0,001$).

Em contraste, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de 5-HT da MCPV. Os níveis de 5-HT da MCPD do grupo VRG também foram significativamente menores que aqueles do grupo correspondente da MCPV ($t = 4,38$; $P < 0,0001$) (Tabela 6, Fig. 31). Como não foram observadas diferenças significativas nos níveis do metabólito 5-HIAA, a TR de 5-HT apresentou reduções significativas ($F_{5,41} = 2,92$; $P < 0,02$) devidas principalmente ao isolamento neonatal ($F_{2,41} = 3,79$; $P < 0,03$) e, marginalmente, à interação entre o ISN e a região da MCPA ($F_{2,41} = 2,82$; $P < 0,07$). Em particular, a TR do grupo VRG foi maior que aquela dos grupos BM ($t = 3,27$; $P < 0,002$) e ISN ($t = 3,05$; $P < 0,004$) da MCPD e aquela do grupo VRG da MCPV ($t = 2,76$; $P < 0,01$). (Tabela 6, Fig. 31).

Tabela 6. Concentrações de 5-HT, 5-HIAA, 5-HIAA/5-HT, das regiões dorsal e ventral da MCPA de ratos virgens (VRG), brevemente manipulados quando neonatos (BM) e ratos submetidos ao isolamento social neonatal (ISN) de 3 h diárias de PN2-PN21. Os dados representam a média \pm EPM. * $P < 0,05$, diferente do grupo VRG da mesma região da MCPA; # $P < 0,05$, diferente do mesmo grupo da MCPD (ANOVA seguida de comparações pareadas para o critério de 5% de Bonferroni).

MCPA	Grupo	N	5-HT	5-HIAA	5-HIAA/5-HT
Dorsal	VRG	10	252,0 \pm 17,9	453,9 \pm 62,3	1,95 \pm 0,30
	BM	13	742,9 \pm 86,4*	247,6 \pm 47,6	0,36 \pm 0,08*
	ISN	12	860,7 \pm 113,4*	251,2 \pm 56,8	0,38 \pm 0,11*
Ventral	VRG	12	891,2 \pm 220,8#	682,5 \pm 186,2	0,92 \pm 0,36#
	BM	13	1109,8 \pm 191,4	580,3 \pm 165,1	0,56 \pm 0,17
	ISN	9	1375,6 \pm 326,3	319,9 \pm 21,3	0,35 \pm 0,11

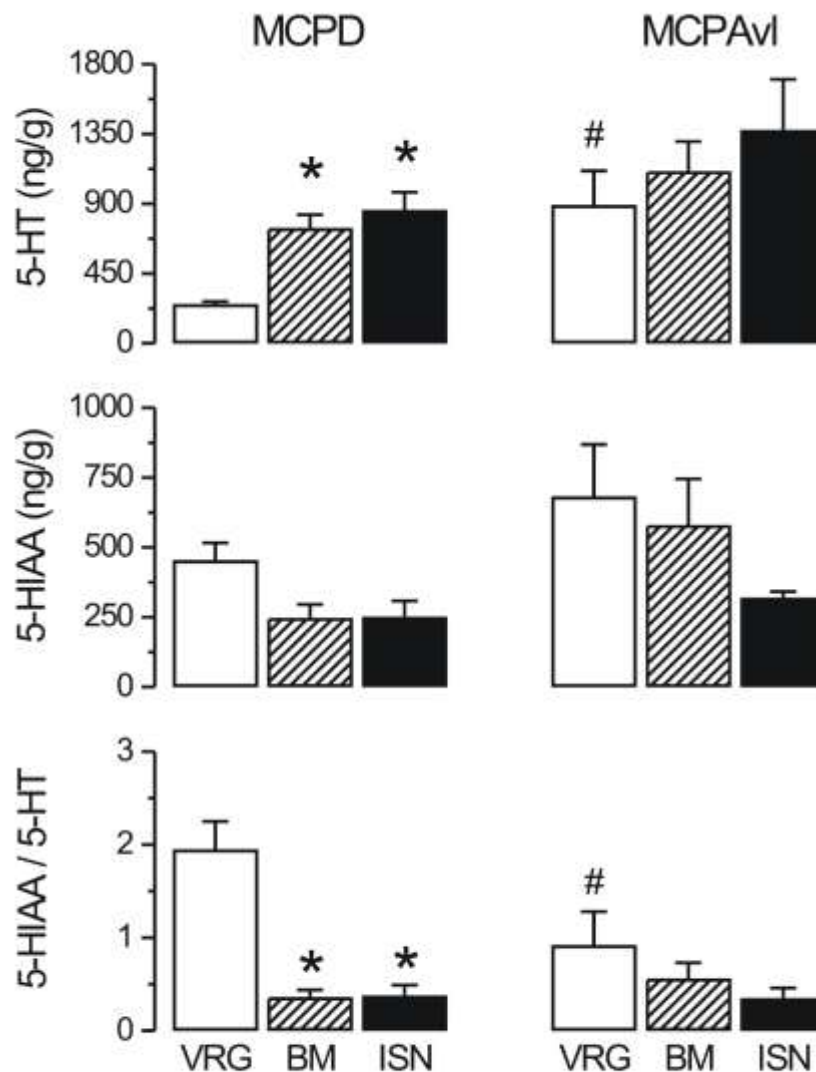


Figura 31. Concentrações de 5-HT, 5-HIAA e 5-HIAA/5-HT, das regiões dorsal e ventral da matéria cinzenta periaquedutal (MCPA) de ratos virgens (VRG), brevemente manipulados (BM) e ratos submetidos ao isolamento social neonatal (ISN) de 3 h diárias de PN2-PN21. Os dados representam a média \pm EPM. * $P < 0,05$, diferente do grupo VRG da mesma região da MCPA; # $P < 0,05$, diferente do grupo VRG da MCPD (comparações *post hoc* corrigidas para o critério de 5% de Bonferroni).

Efeitos do isolamento social, da privação materna e da atenção materna durante a reunião do filhote separado à ninhada, sobre a expressão dos receptores serotoninérgicos e dos neuropeptídeos na MCPD. Embora os grupos não tenham diferido quanto à expressão dos receptores serotoninérgicos e dos neuropeptídeos da MCPD (Figs. 32-33), a análise de correlação de todas as amostras ($n=42$) mostrou que enquanto a expressão da Δ FosB correlacionou-se com a dos receptores 5-HT_{1A} ($r = 0,36$, 40 g. l., $P < 0,02$) e 5-HT_{2A} ($r = 0,32$, 40 g. l., $P < 0,04$), a expressão do

BDNF correlacionou-se com a expressão da SP ($r = 0,44$, 40 g. l., $P < 0,003$) (Fig. 34). Em contraste, não houve correlação entre BDNF e Δ FosB. As correlações BDNF/SP e Δ FosB/5-HT_{1A/2A} foram conservadas para cada tipo separação (ISN ou PM) e respectivos controles (VRG e BM). A única exceção foi a notável correlação entre BDNF e 5-HT_{2A} do grupo ISN ($r = 0,63$, 18 g. l., $P < 0,003$). Ao contrário, BDNF se correlacionou fracamente e negativamente com o receptor 5-HT_{2A} do grupo PM ($r = -0,30$, 20 g. l., $P < 0,17$) (Fig. 35).

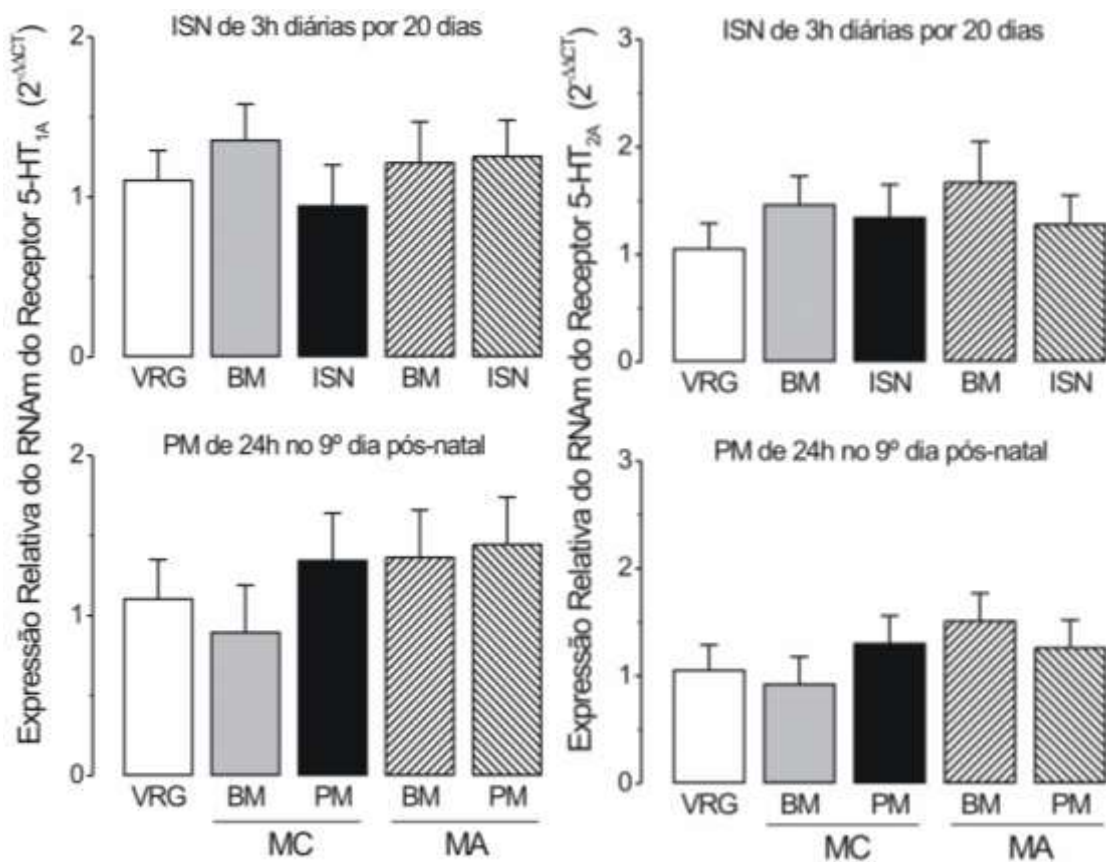


Figura 32. Expressão relativa do RNAm dos receptores 5-HT_{1A} (esquerda) e 5-HT_{2A} (direita) na MCPD de ratos submetidos ao ISN de 3 h diárias por 20 dias ou à PM de 24 h no 9º dia pós-natal, reunidos a mães conscientes ou anestesiadas. As colunas indicam a expressão relativa do RNAm ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) do receptor 5-HT_{1A} dos grupos BM, PM e ISN relativamente ao grupo VRG, normalizada para o gene de referência da desidrogenase do gliceraldeído-3-fosfato. Demais detalhes como na Fig. 24.

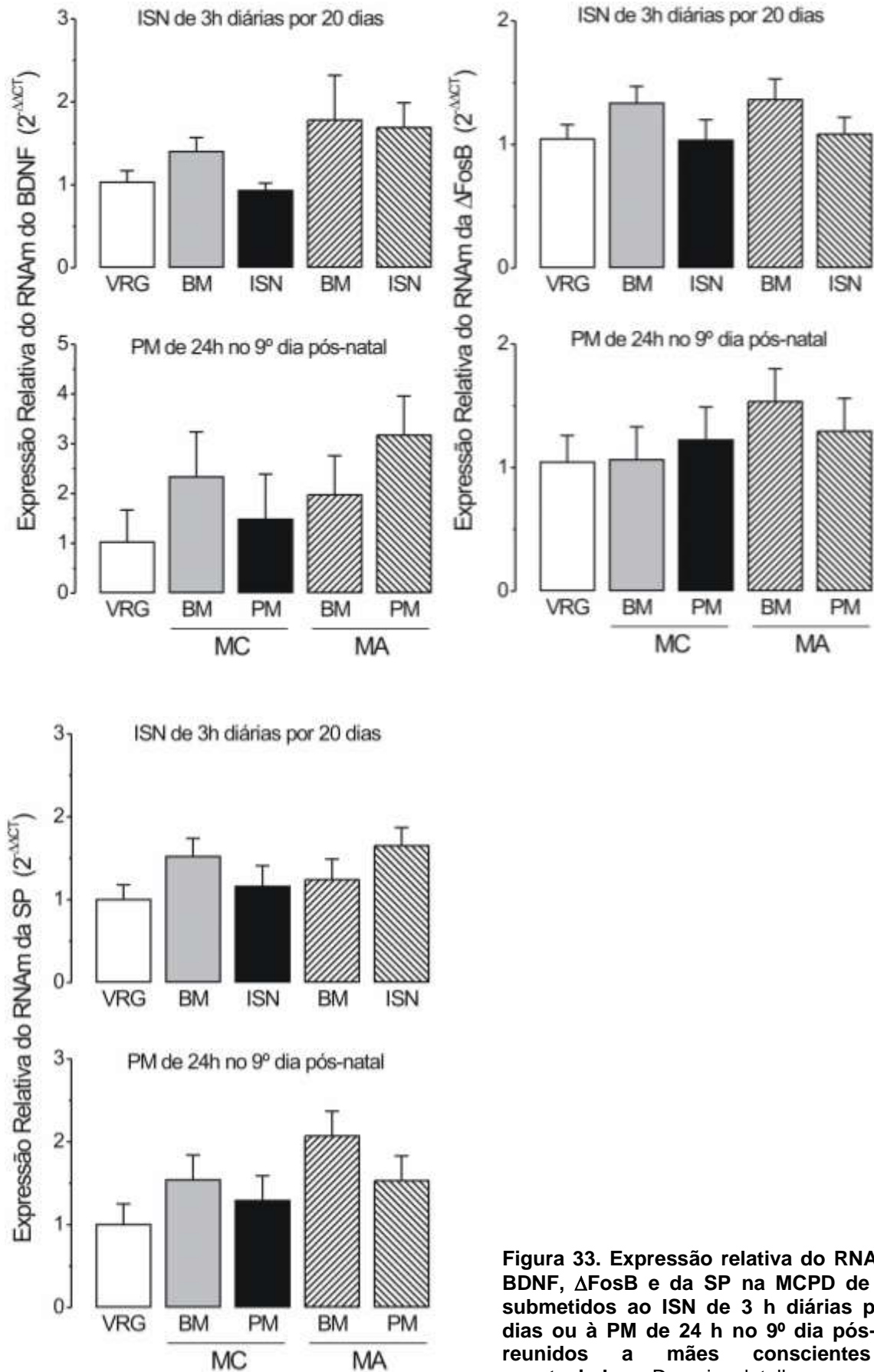


Figura 33. Expressão relativa do RNAm do BDNF, Δ FosB e da SP na MCPD de ratos submetidos ao ISN de 3 h diárias por 20 dias ou à PM de 24 h no 9º dia pós-natal, reunidos a mães conscientes ou anestesiadas. Demais detalhes como nas Figs. 24 e 32.

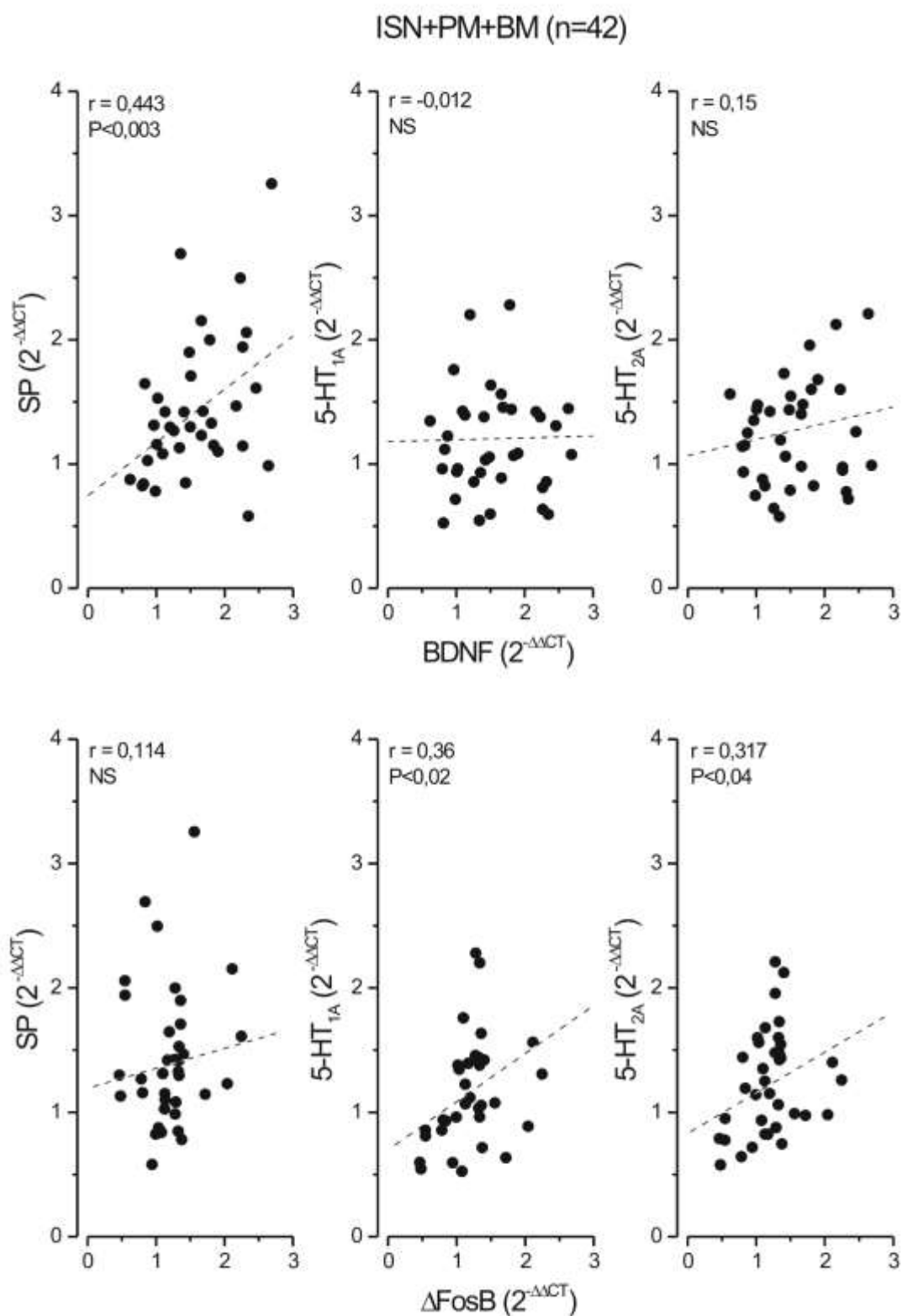


Figura 34. Correlações entre a expressão relativa (2^{-ΔΔCT}) de BDNF (acima) ou do ΔFosB (abaixo) com as da SP (esquerda) ou dos receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} da matéria cinzenta periaquedutal de ratos adultos virgens, brevemente manipulados e submetidos à PM ou ISN.

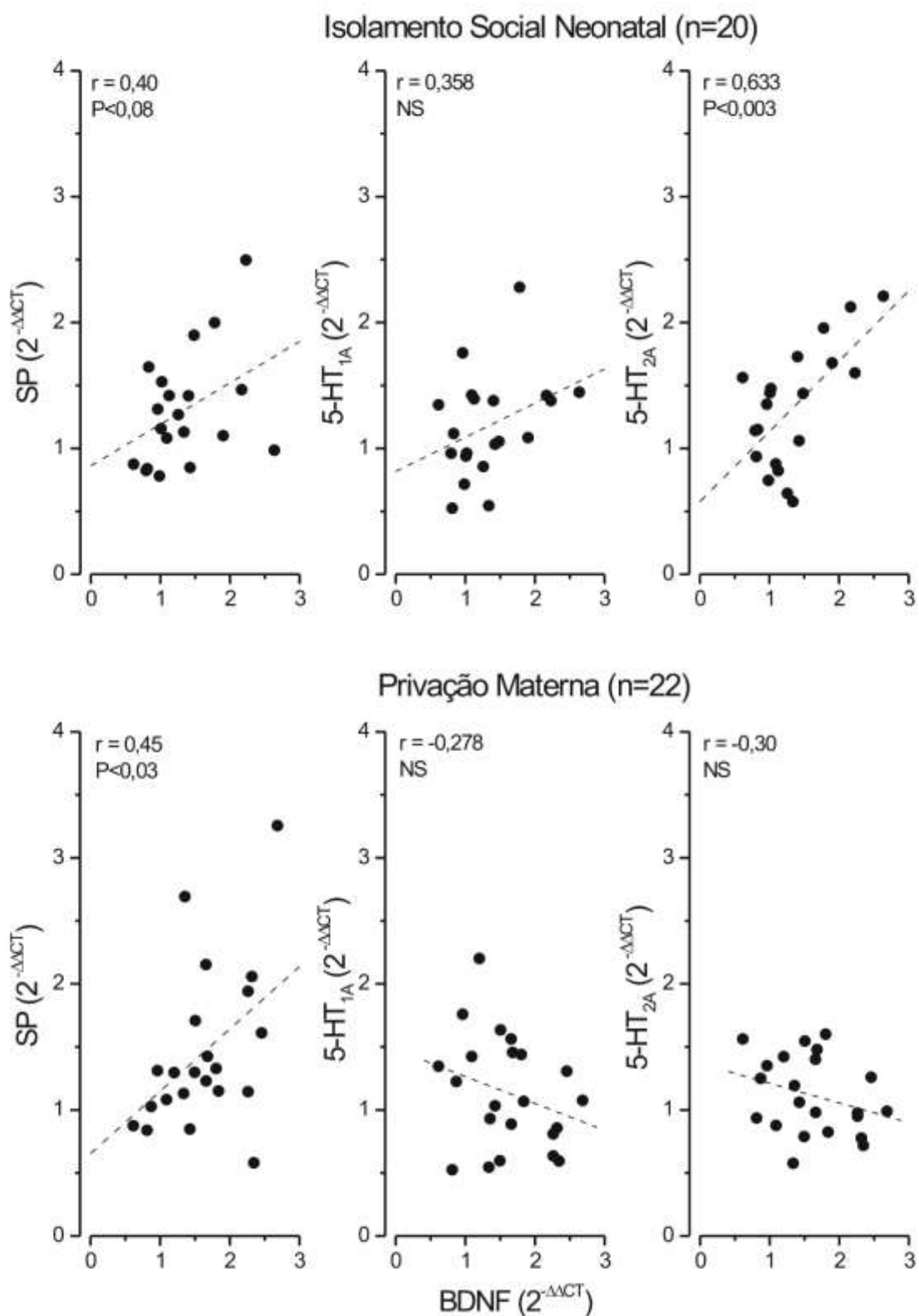


Figura 35. Correlações entre a expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$) de BDNF da MCPD dos grupos ISN (acima) e PM (abaixo) com as da SP (esquerda) ou dos receptores 5-HT_{1A} (centro) e 5-HT_{2A} (direita).

Estas correlações foram corroboradas por análise multivariada dos componentes e fatores principais. A análise de componente principal de todas as amostras (n=42) mostrou que 2 componentes explicam 67,4% da variância (Tabela 7). De forma similar, 2 fatores foram responsáveis por 48% da variância na análise de fator principal (Tabela 8). Estes fatores mostram que enquanto os receptores serotoninérgicos e a Δ FosB carregam fortemente no Fator 1, o BDNF e a SP fazem-no no Fator 2 (Fig. 36). A rotação ortogonal dos fatores (Varimax) sugere que a SP/BDNF e Δ FosB/5-HT_{1A/2A} são controlados por mecanismos virtualmente independentes (Tabela 8, Fig. 36).

Tabela 7. Análise de componente principal da expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$) dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} e dos neuropeptídeos SP, BDNF, Δ FosB da matéria cinzenta periaquedutal de ratos virgens, brevemente manipulados e ratos submetidos à PM e ISN.

Componentes	1	2	3	4	5
Eigenvalue	2,086524	1,281996	0,791893	0,554679	0,284908
Diferença	0,804528	0,490103	0,237214	0,269771	
Variância (%)	41,73	25,64	15,84	11,09	5,70
Variância Acumulada (%)	41,73	67,37	83,21	94,30	100

Tabela 8. Análise de fator principal da expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$) dos neuropeptídeos (SP, BDNF, Δ FosB) e dos receptores serotoninérgicos (5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}). Correlações > |0,45| em negrito.

$2^{-\Delta\Delta CT}$	Método Fator Principal		Rotação Varimax	
	Fator 1	Fator 2	Fator 1	Fator 2
5-HT _{1A}	0,76	-0,30	0,82	0,03
5-HT _{2A}	0,76	-0,22	0,78	0,10
Δ FosB	0,48	0,01	0,45	0,21
BDNF	0,32	0,61	0,04	0,68
SP	0,40	0,51	0,16	0,63
Variância (%)	32,99	15,39	30,41	18,33
Variância Acumulada (%)	32,99	48,37	30,41	48,37

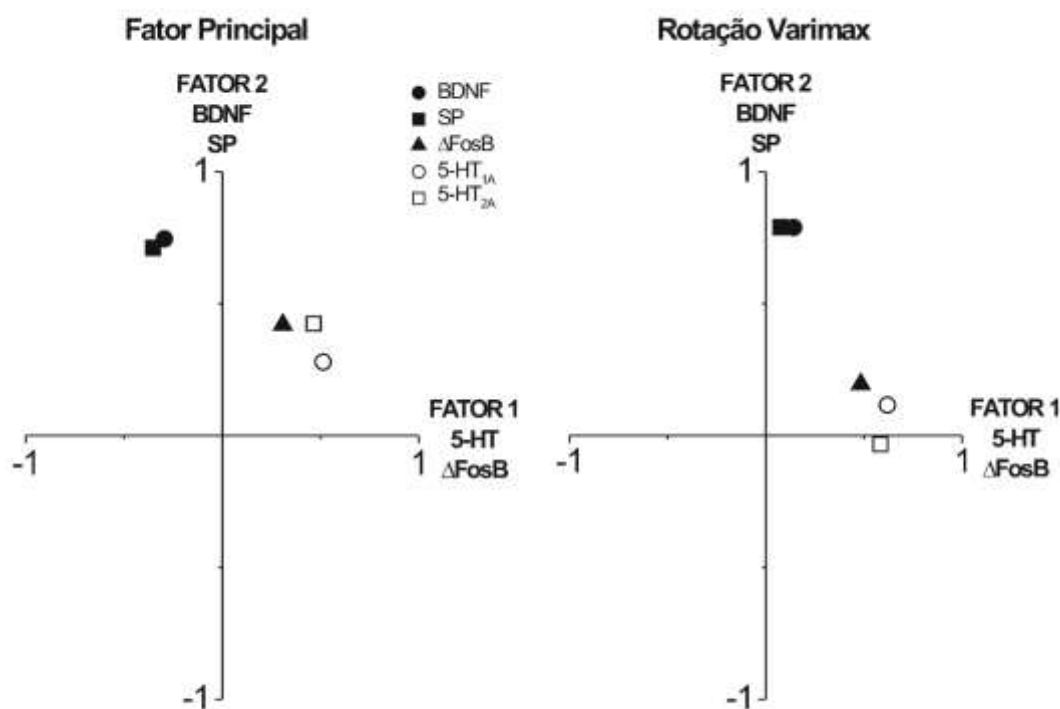


Figura 36. Fatores principais e respectiva rotação ortogonal (Varimax) da expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$) dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} e 5HT_{2A} e dos neuropeptídeos SP e Δ FosB.

4.6 DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que tanto ratos ISN reunidos às MCs quanto ratos BM, ISN e PM reunidos às MAs apresentaram pesos significativamente menores que os ratos VRG. Os ratos ISN-MC também ganharam menos peso que os ratos BM-MC. Em contraste, não foi observada nenhuma diferença significativa entre ratos VRG e BM-MC em ambos os protocolos de separação. Estes resultados sugerem que ratos submetidos à separação materna e/ou carentes de cuidado materno quando neonatos apresentam reduções significantes do apetite. Embora os índices de ansiedade do CA e do LCE não tenham sido aumentados por nenhum tipo de separação, a PPS foi suprimida nos grupos PM reunidos a MCs ou MAs e nos grupos BM-MA dos protocolos ISN ou PM, sugerindo o desenvolvimento de anedonia. Contudo, os grupos não apresentaram diferença alguma nem em relação aos níveis de 5-HT, nem em relação à expressão dos receptores serotoninérgicos e dos neuropeptídeos da MCPD. Estas observações sugerem que os efeitos tardios da separação materna, incluindo os efeitos pró-depressão do presente estudo e os

efeitos pró-pânico de estudos anteriores (Quintino-dos-Santos *et al.*, 2014; Borges-Aguiar *et al.*, 2018) sejam devidos a mecanismos moleculares distintos dos examinados neste estudo.

Efeitos da separação materna sobre o peso e desenvolvimento de anedonia nos ratos adultos

Embora o peso adulto tenha sido robustamente reduzido nos grupos ISN-MC (-16%) e ISN-MA (-13%) relativamente ao grupo VRG, o peso adulto dos ratos PM-MC não diferiu daquele dos ratos VRG e BM-MC. Em realidade, um estudo recente do nosso laboratório mostrou que ratos adultos submetidos a PM-MC (3 h, PN2-PN21) apresentaram pesos significativamente maiores que os controles BM-MC (Borges-Aguiar *et al.*, 2018). A comparação das variações percentuais do peso adulto de ambos os estudos está ilustrada na Figura 37. Como o grupo ISN do presente estudo foi separado por período (PN2-PN21) e duração (3 h) idêntico ao do grupo PM do estudo anterior, os resultados opostos parecem ter sido devidos às separações maternas individuais ou coletivas destes procedimentos, respectivamente. Adicionalmente, estes resultados são consoantes com estudos anteriores mostrando que ratos submetidos à PM (6 h, 10 períodos entre PN5 e PN20) apresentaram pesos maiores que os ratos BM a despeito do tempo maior de separação (Matthews *et al.*, 1996).

Mais notavelmente, no entanto, Borges-Aguiar e colaboradores (2018) mostraram que os ratos PM-MC (3 h, PN2-PN21) apresentaram limiares mais elevados do pânico à estimulação elétrica da MCPD e desempenho igual ou superior no TNF e TPS que os ratos BM-MC. No conjunto, estes estudos sugerem que ratos submetidos a PMs repetidas ao longo da lactação e reunidos a MCs desenvolvem resiliência comportamental. Estas observações também sugerem que a presença dos irmãos no protocolo da PM torna-o bastante similar aos procedimentos de desenvolvimento de resiliência em ratos BM (15 s) (Levine *et al.*, 1957) ou BS (15 min) quando neonatos (Levine *et al.*, 2005; Ladd *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2000; Meaney *et al.*, 1985, 1988; Plotsky e Meaney, 1993; Hellstrom *et al.*, 2012; Champagne, 2013). Interessantemente, estudos anteriores (Matthews *et al.*, 1996; Borges-Aguiar *et al.*, 2018) mostraram aumentos do peso dos ratos PM-MC a

despeito da dramática mudança do metabolismo do filhote separado de um padrão de crescimento controlado pelos estímulos maternos para um padrão de conservação de energia na ausência destes estímulos. Mais especificamente, os aumentos de peso ocorreram a despeito dos relatos mostrando a redução acentuada da secreção de prolactina, do hormônio do crescimento e da ornitina-decarboxilase (ODC) durante a separação materna (Kuhn *et al.*, 1978; Wang *et al.*, 1996; Schanberg *et al.*, 2003). Embora o aumento de peso dos ratos adultos submetidos à PMs tenha sido associado a um aumento 'compensatório' da atividade da ODC após a reunião do filhote à mãe (Hall, 1998), os ratos ISN-MC do presente estudo apresentaram redução de peso apesar de terem sido submetidos a separações maternas da mesma duração e período dos ratos PM-MC do estudo anterior (Borges-Aguiar *et al.*, 2018). Estes resultados sugerem que a presença dos irmãos durante a PM seja um fator fundamental na evolução do peso do neonato.

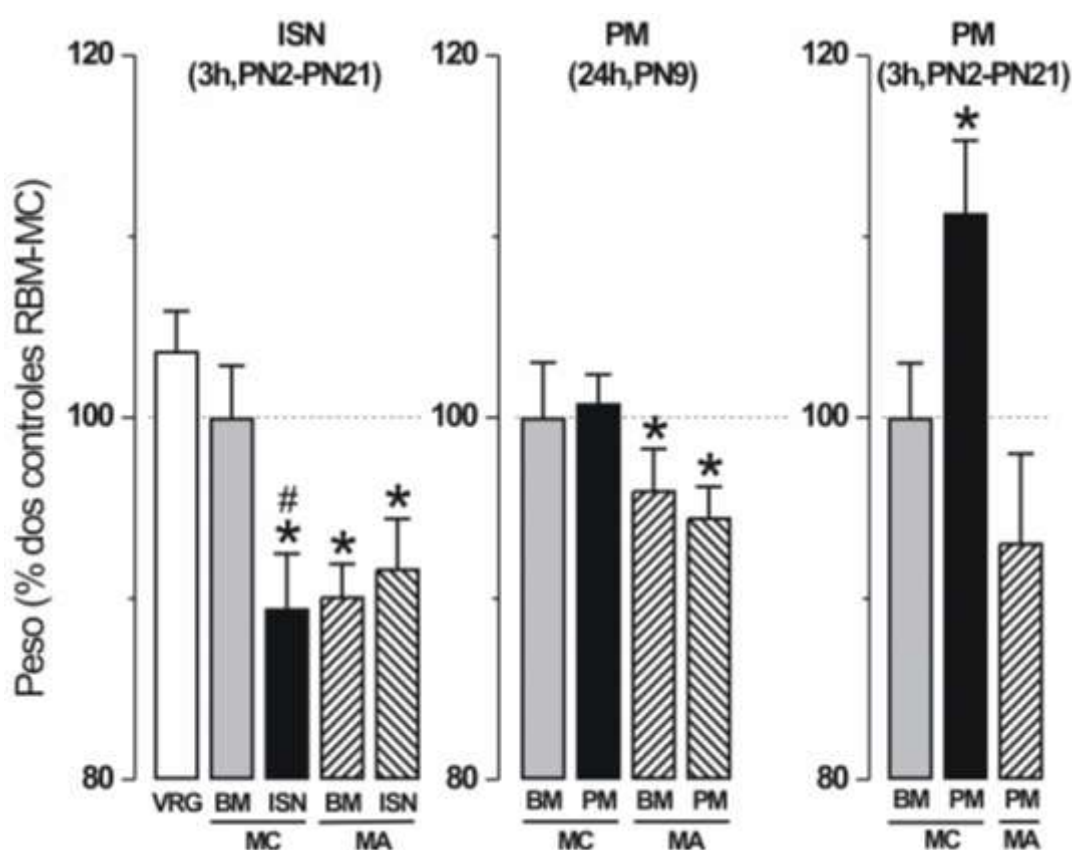


Figura 37. Comparação dos efeitos do tipo de separação materna (ISN vs PM), da duração da separação (3h vs 24h) e do cuidado materno no momento da reunião (MC vs MA) no peso do rato adulto. As colunas representam o valor percentual do peso médio (\pm EPM) de cada grupo em relação ao grupo BM-MC de cada tipo de separação. O gráfico da direita foi modificado de um estudo recente do nosso laboratório (Borges-Aguiar *et al.*, 2018) em que os ratos foram submetidos à PM de mesma duração e período do grupo ISN do presente estudo.

O peso dos ratos BM-MA do presente estudo também foi significativamente menor que aquele dos ratos VRG em ambos os protocolos de separação (ISN, -15%; PM, -8%). Como os ratos BM-MA não foram submetidos à separação materna, as reduções do peso parecem ter sido devidas à ausência do cuidado materno dos filhotes reunidos a mães anestesiadas.

Por outro lado, embora os ratos ISN-MC, ISN-MA e BM-MA tenham apresentado reduções significativas do peso adulto, a PPS somente foi reduzida no último grupo. Vice-versa, embora o peso adulto do grupo PM-MC tenha sido similar àquele do VRG, ele apresentou uma redução acentuada da PPS. A ausência de correlação entre peso e PPS corrobora os resultados de Borges-Aguiar e colaboradores (2018) mostrando que estas variáveis carregam em fatores independentes. Conseqüentemente, embora a redução do peso e a anedonia sejam sintomas característicos da DM (Kendler, 2017), estes efeitos não estão necessariamente correlacionados. Não obstante, a redução acentuada da PPS nos ratos submetidos à PM de 24 h em PN9 (MA ou MC) é consistente com a maior vulnerabilidade do filhote no período hiporresponsivo ao estresse (PN2-PN11) em que a presença da mãe protege o filhote dos efeitos nocivos do estresse (Levine, 1994; Rosenfeld *et al.*, 1992).

Por fim, é importante notar que enquanto a PPS foi virtualmente suprimida nos ratos PM (MC ou MA) e BM-MA (ISN ou PM), a %CS somente foi reduzida nos ratos BM-MA do protocolo ISN. A sensibilidade superior da PPS deve-se à remoção da variabilidade individual do desenho pareado.

Os resultados dos experimentos com mães anestesiadas devem ser analisados com cautela devido ao risco de recirculação do anestésico ao filhote via leite materno. Embora a anestesia barbitúrica já tenha sido utilizada para discriminar os efeitos dos estímulos passivos (contato, calor, odor) e ativos (carícias, lambe, amamentar) da mãe (Stanton *et al.*, 1987; Stanton e Levine, 1990; Kacsoh *et al.*, 1990), os estudos em seres humanos mostram que tanto o cloral como o seu metabólito ativo (tricloroetanol) podem ser detectados no leite materno horas após a administração do primeiro (Bernstine *et al.*, 1952; Beland *et al.*, 1998). Estudos em ratos mostram, no entanto, que os níveis plasmáticos do tricloroetanol aproximam-se

do limite de detecção 1 a 3 h após a administração do anestésico (Beland *et al.*, 1998). Portanto, não parece haver risco de acumulação do anestésico devido às administrações diárias. Adicionalmente, o risco de recirculação é marcadamente diminuído pela postura menos propícia à amamentação e, principalmente, pela dificuldade de ejeção do leite das mães anestesiadas (Kacsoh *et al.*, 1990). De fato, Diamantopoulou e colaboradores (2018) obtiveram resultados similares com um procedimento de interdição do cuidado materno que não utiliza anestésico, denominado “negação da gratificação esperada” (DER, *denied expected reward*). Neste protocolo, neonatos (PN10-PN13) que foram separados da mãe em um labirinto em T são impedidos de fazer contato com a mesma após sua localização. Embora este método não utilize anestésico, os neonatos submetidos a 10 sessões de DER em 3 dias consecutivos entre PN10 e PN13 desenvolveram traços acentuados de depressão quando adultos (redução da %CS e aumento da imobilidade no CA e no TNF). Embora este procedimento suprima os estímulos maternos tanto passivos (contato, calor) como ativos (lamber, acariciar), ele corrobora a importância do cuidado materno no momento da reunião.

Em resumo, estes resultados sugerem que enquanto a anedonia dos grupos PM foi devida principalmente à separação materna, a anedonia dos grupos BM-MA foi devida à ausência do cuidado materno após a reunião. Além disso, o desenvolvimento da anedonia não depende somente do período e da duração da separação materna, mas também da presença dos irmãos durante a separação e no cuidado materno após a reunião.

Ratos adultos submetidos a separações maternas quando neonatos apresentam níveis reduzidos de ansiedade.

Embora o único efeito significativo no CA tenha sido o aumento (43%) da PTX nos ratos BM-MA do protocolo ISN, a PTX também foi marginalmente aumentada nos ratos BM-MC (27%) e ISN-MC (29%). Contrariamente, não foi observado efeito algum nem na CTX%, nem na defecação. Ao invés de hiperatividade, estes resultados são similares à ‘hiper-reatividade’ dos ratos que foram submetidos ao isolamento social durante o crescimento ou na vida adulta expostos a um ambiente estranho (Hall, 1998). Por sua vez, a PM não teve qualquer efeito na exploração do

CA.

A exposição ao LCE mostrou que os ratos ISN-MC, ISN-MA e BM-MA apresentam níveis basais de ansiedade inferiores àqueles dos ratos VRG. No mesmo sentido, não houve alteração alguma nos níveis de ansiedade dos ratos submetidos à PM (MC ou MA). Estes dados corroboram observações anteriores do nosso grupo (Quintino-dos-Santos *et al.*, 2014; Borges-Aguiar *et al.*, 2018) e de outros pesquisadores que avaliaram os efeitos da separação materna em vários modelos de ansiedade (LCE, medo condicionado, odor do predador, estresse de contenção, interação social) (McIntosh *et al.*, 1999; Caldji *et al.*, 2000; Greisen *et al.*, 2005; Hulshof *et al.*, 2011; Savignac *et al.*, 2011). Não obstante, também existem estudos relatando aumentos de ansiedade em ratos adultos submetidos à separação materna quando neonatos (Wigger e Neumann, 1999; Huot *et al.*, 2002; Daniels *et al.*, 2004; Pascual e Zamora-León, 2007). Os resultados conflitantes podem ter sido devidos à enorme variabilidade dos protocolos de separação materna (Lehmann e Feldon; 2000) e/ou à utilização de critérios menos rigorosos nas comparações estatísticas. Em particular, existem evidências abundantes que sugerem que os efeitos endócrinos e comportamentais dependam tanto da duração como do período da separação (Levine, 1994; Rosenfeld *et al.*, 1992). Por exemplo, enquanto as separações breves (3-15 min) dos neonatos aumentaram a exploração e a ingestão de alimentos num ambiente estranho e reduziram as respostas comportamentais e neuroendócrinas ao estresse da vida adulta (Caldji *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2000; Meaney *et al.*, 1992; 1996), as separações prolongadas (3-6 h) tiveram efeitos opostos (Plotsky e Meaney, 1993; Van Oers *et al.*, 1998; Hall, 1998; Francis e Meaney, 1999; Liu *et al.*, 2000). Os últimos estudos também mostraram que os ratos BS (15 min) apresentam níveis aumentados de receptores GABA-A e benzodiazepínicos na amígdala, córtex prefrontal e locus ceruleus, e de receptores α_2 -adrenérgicos no locus ceruleus relativamente tanto aos controles como aos ratos separados (Caldji *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2000). Os últimos efeitos foram relacionados à ansiedade diminuída dos grupos BS.

Mais notavelmente, no entanto, a ausência de efeitos ansiogênicos no presente estudo contrasta com a facilitação dos ataques de pânico à estimulação da MCPD (Quintino-dos-Santos *et al.*, 2014; Borges-Aguiar *et al.*, 2018), ressaltando a

especificidade dos últimos efeitos.

Ausência de efeitos da separação materna nos níveis de 5-HT da MCPD

Adicionalmente, o presente estudo mostrou que os níveis de 5-HT da MCPD foram igualmente aumentados nos grupos ISN-MC e BM-MC relativamente aos ratos VRG. Estes efeitos foram observados na ausência de alterações significativas do 5-HIAA, resultando, portanto, na redução acentuada da TR do neurotransmissor em ambos os grupos. Mais importantemente, estas observações indicam que o aumento da concentração de 5-HT na MCPD tenha sido devido às manipulações diárias dos filhotes entre PN2 e PN21, e não à separação materna propriamente dita. No mesmo sentido, ratos adultos que foram ‘manipulados’ quando neonatos (separações breves de 15 min) apresentaram aumentos paralelos da resiliência e dos níveis cerebrais de 5-HT (Levine *et al.*, 2005; Ladd *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2000; Meaney *et al.*, 1985, 1988; Plotsky e Meaney, 1993; Hellstrom *et al.*, 2012; Champagne, 2013). Embora os estudos anteriores do nosso laboratório tenham mostrado que a resiliência (teste de natação forçada) também pode estar aumentada em ratos adultos submetidos a separações maternas de 3 h diárias (ISN ou PM) ao longo da lactação (Quintino-dos-Santos *et al.*, 2014; Borges-Aguiar *et al.*, 2018), os resultados do presente estudo sugerem que o aumento dos níveis de 5-HT da MCPD pode estar implicado no desenvolvimento de resiliência nos filhotes submetidos a separações repetidas breves (15 min) ou até mesmo relativamente longas (3 h).

Em contraste, não foram observadas alterações significativas dos níveis de 5-HT da MCPAvl a despeito das concentrações mais elevadas do neurotransmissor nesta área, neste e em outros estudos (Harding *et al.*, 2004). A ausência de alterações dos níveis de 5-HT da MCPAvl está provavelmente associada à organização dos neurônios e aferências serotoninérgicas da MCPA. Em particular, enquanto a MCPD carece de neurônios serotoninérgicos e recebe aferências dos núcleos dorsal (NDR), mediano (NMR), pontino (NPR) e obscuro (NOR) da rafe, a MCPAvl abriga os neurônios da ‘asa lateral’ do NDR e recebe o maior contingente de aferências serotoninérgicas do núcleo magno da rafe (NMgR) e dos núcleos reticulares do bulbo (B3) (Loewy *et al.*, 1981; Beitz *et al.*, 1982, 1986; Clements *et*

al., 1985; Keay e Bandler, 2004). Estes resultados tornam improvável a participação dos últimos sistemas (NMgR e B3 para MCPAvl) no desenvolvimento da resiliência dos ratos submetidos a manipulações diárias ao longo da lactação.

Portanto, o desenvolvimento de resiliência deve ser atribuído ao aumento da atividade das projeções serotoninérgicas do NMR e do NDR ao hipocampo e/ou à MCPD. Em particular, existem evidências convincentes que sugerem que o aumento tiroxina-dependente dos níveis de 5-HT seja um elemento crucial para a sobre-regulação dos receptores glicocorticóides (GR) do hipocampo de ratos resilientes que foram tanto criados por mães zelosas (comportamentos intensos de lambar e acariciar) como artificialmente acariciados com um pincel quando neonatos (Smythe *et al.*, 1994; Weaver *et al.*, 2001; Laplante *et al.*, 2002; Hellstrom *et al.*, 2012).

Os efeitos da separação materna nos núcleos da rafe são, no entanto, bastante complexos. Em particular, enquanto a atividade dos neurônios 5-HT é inibida pelos autorreceptores 5-HT_{1A}, ela é aumentada pela ativação dos receptores α_1 -adrenérgicos (Blier e El Mansari, 2013). Conseqüentemente, os níveis de 5-HT do NDR e NMR são inversamente proporcionais à frequência de disparos destes núcleos e à liberação de 5-HT em suas áreas de projeção. Embora a grande maioria de estudos sobre os efeitos moleculares da separação materna tenha utilizado PMs de 3 h diárias entre PN2 e PN14, impossibilitando comparações com o presente estudo, Gartside e colaboradores (2003) mostraram que a sensibilidade dos receptores α_1 -adrenérgicos foi aumentada, enquanto a sensibilidade dos autorreceptores 5-HT_{1A} foi reduzida no NDR de ratos adultos submetidos a PMs repetidas (6 h, 10 ocasiões entre PN5-PN20). Estes efeitos também resultaram no aumento das concentrações de 5-HT no CPF e, curiosamente, foram independentes dos mecanismos de transcrição. Efeitos similares poderiam explicar o aumento das concentrações de 5-HT na MCPD dos ratos do presente estudo. Com efeito, Ohta e colaboradores (2014) relataram que os níveis de 5-HT (HPLC) do NDR estão reduzidos uma semana após o término do ISN idêntico ao do nosso estudo (3 h, PN2-PN20). A especificidade destes efeitos foi ressaltada pela ausência de alterações dos níveis de 5-HT do NMR, amígdala, hipocampo e córtex prefrontal medial. Embora os últimos autores não tenham analisado ratos adultos (PN60) e

somente tenham utilizado controles VRG, a redução dos níveis de 5-HT do NDR poderia resultar no aumento da liberação de 5-HT na MCPD.

Por outro lado, estudos recentes com o protocolo DER mostraram que ratos adultos que foram impedidos de fazer contato e/ou receber carícias da mãe quando neonatos apresentam traços depressivos e reduções dos níveis hipocampais de 5-HT associados à sobre-regulação, possivelmente compensatória, dos receptores 5-HT_{1A} (Diamantopoulou *et al.*, 2018). Embora a redução dos níveis hipocampais de 5-HT seja consoante com as teorias monoaminérgicas de depressão (Blier e El Mansari, 2013), a sobre-regulação dos receptores 5-HT_{1A} conflita com teorias anteriores que propuseram que a depressão seja devida à sub-regulação dos receptores 5-HT_{1A} do hipocampo pelos níveis elevados de corticosteróides do estresse (Deakin e Graeff, 1991). Contudo, o efeito pró-depressivo dos corticosteróides poderia ser unicamente devido ao bloqueio da sobre-regulação compensatória dos receptores 5-HT_{1A}. Com efeito, embora os ratos submetidos ao DER apresentem níveis normais de glicocorticóides, eles têm respostas neuroendócrinas exageradas ao estresse (Diamantopoulou *et al.*, 2013). Estas respostas poderiam antagonizar a sobre-regulação compensatória 5-HT_{1A}, perpetuando o desequilíbrio neuroquímico original.

Por fim, embora a maioria dos estudos de PM no período hiporresponsivo ao estresse (3 h, PN2-PN14) tenha relatado o desenvolvimento de traços depressivos e alterações dos níveis e/ou da atividade serotoninérgica no hipocampo, CPF, amígdala e núcleo accumbens (Huot *et al.*, 2001; Arborelius *et al.*, 2004; Arborelius e Eklund, 2007, Lee *et al.*, 2007; Goodfellow *et al.*, 2009; Benekareddy *et al.*, 2010; Jahng *et al.*, 2010), o presente estudo é a primeira demonstração de que as manipulações diárias dos neonatos ao longo da lactação aumentam os níveis de 5-HT da MCPD, mas não da MCPAvl.

Ausência de efeitos da separação materna na expressão dos receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} da MCPD.

O presente estudo também mostrou que nem a separação materna, nem a ausência de cuidado materno produziram quaisquer alterações na expressão do

RNA_m dos receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} da MCPD relativamente aos grupos BM e VRG. Estudos similares mostraram que as alterações da expressão dos receptores 5-HT dependem tanto da duração e do período da separação materna quanto da idade em que os animais foram sacrificados (Sibug *et al.*, 2001; Vázquez *et al.*, 2002; Goodfellow *et al.*, 2009; Ohta *et al.*, 2014; Rebello *et al.*, 2014). Em particular, Ohta e colaboradores (2014) relataram que as expressões dos receptores 5-HT_{1A} (hipocampo e córtex prefrontal medial) e 5-HT_{2A} (córtex prefrontal medial) somente foram reduzidas no curso da separação materna, retornando aos níveis normais logo após o desmame (PN28). Em contraste, Sibug e colaboradores (2001) relataram que a expressão do receptor 5-HT_{1A} do hipocampo (CA1 e CA3) de ratos submetidos à PM de 24 h em PN3 que apresentaram déficits de aprendizado somente foi aumentada na senescência (30 a 32 meses de idade). No conjunto, os resultados deste e dos últimos estudos sugerem que os efeitos do ISN e da PM nos receptores serotoninérgicos não perduram até a fase adulta.

As alterações da expressão dos receptores serotoninérgicos também poderiam ter sido mascaradas pelo estresse dos testes comportamentais conduzidos imediatamente antes do sacrifício dos animais. Com efeito, enquanto os estresses crônicos e/ou graves reduzem a expressão dos receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A}, estresses agudos e/ou leves aumentam a expressão destes receptores em várias regiões do cérebro adulto (Jiang *et al.*, 2009; Lopez *et al.*, 1998; Raghupathi e McGonigle, 1997; Watanabe *et al.*, 1993). No entanto, é importante notar que os controles BM e VRG foram submetidos aos mesmos testes comportamentais que os grupos separados, validando as comparações realizadas.

Conseqüentemente, nossos resultados sugerem que nem os níveis de 5-HT, nem a expressão dos receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} da MCPD são alterados pela separação materna.

Ausência de efeitos da separação materna na expressão de SP, Δ FosB e BDNF da MCPD

Nossos resultados mostraram que não houve alteração alguma da expressão do RNA_m de SP, Δ FosB ou BDNF na MCPD dos grupos BM, ISN ou PM, reunidos a

MCs ou MAs, relativamente àquela dos ratos VRG.

Estes resultados são consoantes com estudos anteriores que não encontraram alteração alguma dos níveis tissulares de Δ FosB do córtex, núcleo acumbens, estriado, área ventral tegumentar e amígdala de ratos submetidos a períodos curtos (15 min) ou relativamente longos (3 h) de ISN (PN2-PN14) (Lippmann *et al.*, 2007). As evidências existentes sugerem que a proteína Δ FosB aja como um 'comutador molecular' (*molecular switch*) que converte respostas agudas intermitentes em adaptações estáveis, tal como ocorre na dependência química (Kelz e Nestler, 2000; Ruffle, 2014). Embora a Δ FosB seja induzida tanto pelo estresse agudo quanto crônico, e persiste no cérebro por várias semanas após o término do estímulo (Carle *et al.*, 2007), seu RNAm é relativamente instável e se degrada de forma relativamente rápida, tal como aquele das outras proteínas da família Fos (Hope *et al.*, 1994; Kelz e Nestler, 2000). Embora a degradação do RNAm possa explicar os resultados negativos do presente estudo, os níveis tissulares de Δ FosB também permaneceram inalterados nos estudos de imunensaio (*western blot*) de Lippmann e colaboradores (2007). O conjunto das evidências sugere, portanto, que os níveis de Δ FosB da MCPD dos ratos adultos não são afetados pela separação neonatal. Não obstante, alguns efeitos da dependência química, tais como a recaída à reexposição da droga, podem ser observados anos após a interrupção do seu consumo. Estes efeitos podem ser devidos a mecanismos de neuroplasticidade mediados por alterações da expressão de Δ FosB durante o uso da droga. Por conseguinte, resta examinar se a expressão da Δ FosB foi afetada durante ou no período subsequente à separação, normalizando-se posteriormente. Adicionalmente, é possível que os efeitos da separação materna na expressão da Δ FosB somente sejam observados na vigência de algum tipo de estresse na vida adulta. Em particular, Berton e colaboradores (2007) mostraram que ratos resilientes a choques inescapáveis apresentam aumentos da imunoreatividade de Δ FosB da MCPAvl.

Como a indução de Δ FosB é bastante seletiva (embora não exclusiva) de neurônios ricos em SP (Ruffle, 2014), a ausência de alterações na expressão de SP não foi surpreendente. Estes resultados são consistentes com relatos anteriores mostrando que nem a SP, nem o receptor NK-1 estão alterados no tronco cerebral

de ratos submetidos a PMs repetidas (3 h, PN2-PN21) (Teng *et al.*, 2016). Mais notavelmente, no entanto, Berton e colaboradores (2007) mostraram que os aumentos da imunoreatividade de Δ FosB nos neurônios da MCPAvI dos ratos resilientes são inversamente relacionados com a expressão da SP nos mesmos neurônios, reduzindo sua liberação nas áreas envolvidas com o estresse. Contudo, as análises de correlação e fator principal do presente estudo sugerem que os mecanismos de resiliência aos choques inescapáveis descritos para a MCPAvI (Berton *et al.*, 2007) não se aplicam à MCPD. Em realidade, os resultados destas análises sugerem que enquanto a expressão de Δ FosB está correlacionada com os receptores serotoninérgicos, a expressão de SP correlaciona-se com a expressão de BDNF. Contudo, é importante notar que a análise de fator principal deste estudo explica apenas 48% da variância dos nossos resultados.

De forma similar, a ausência de alteração da expressão do BDNF torna improvável a participação deste neuropeptídeo nos efeitos pró-depressivos e pró-pânico deste e dos estudos anteriores, respectivamente (Quintino-dos-Santos *et al.*, 2014; Borges-Aguiar *et al.*, 2018). Estes resultados também são consoantes com as observações de Dalle Molle e colaboradores (2012) de que os níveis de BDNF permanecem inalterados na MCPA de ratos adultos que foram submetidos ao estresse de troca de maravalha por pedaços de papel entre PN2 a PN9. Embora os níveis plasmáticos de BDNF sejam bastante inespecíficos, estudos clínicos de Kobayashi e colaboradores (2005) não encontraram diferença alguma entre os níveis plasmáticos de BDNF de pacientes de pânico e controles sadios. No mesmo sentido, Maron e colaboradores (2009) não observaram correlação alguma entre os níveis plasmáticos de BDNF e a ocorrência de ataques de pânico à administração do tetrapeptídeo da colecistocinina (CCK-4) em voluntários sadios. Por fim, estudos mais recentes de Ribeiro e colaboradores (2019) mostraram que os níveis de BDNF não foram alterados por administrações agudas e crônicas de aminoguanidina, um inibidor da NOS que apresentou efeitos panicolíticos no labirinto em T elevado.

Os efeitos da separação materna nos níveis tissulares de BDNF são, no entanto, bastante variáveis, e até mesmo inconsistentes, nos estudos de imunoensaio. Por exemplo, enquanto alguns autores relataram que a PM (3 h, PN1-PN14) aumentou os níveis hipocâmpais de BDNF (Greisen *et al.*, 2005; Faure *et al.*,

2007), outros relataram que este protocolo não teve efeito algum nem nos níveis do hipocampo, nem naqueles do CPF (Reus *et al.*, 2011). Em contraste, Ognibene e colaboradores (2008) observaram apenas reduções no CPF, no hipocampo e no estriado dos camundongos mutantes (*reeler*) submetidos à PM (5 h, PN2-PN6). Estas discrepâncias podem ser devidas às diferenças de espécie, de procedimento ou de idade do animal no momento do sacrifício. Com efeito, Kuma e colaboradores (2004) relataram que embora a expressão do RNAm do BDNF do hipocampo dos ratos submetidos à PM (3 h) não tenha sido alterada em PN10, ela foi reduzida em PN16 e voltou a aumentar em PN30 e PN60.

A ausência de efeitos da separação materna na expressão dos receptores cerebrais do rato adulto não é inédita. Em particular, Ploj e colaboradores (2003a,b) não encontraram alteração alguma nem nos receptores opióides (δ, κ), nem nos receptores dopaminérgicos (D1, D2) em mais de 40 áreas cerebrais dos ratos que foram submetidos à PM (6 h, PN2-PN21). Por sua vez, a ausência de efeitos ansiogênicos da separação neonatal neste e em outros estudos ressalta o caráter específico da facilitação dos ataques de pânico à estimulação da MCPD do rato adulto (Quintino-dos-Santos *et al.*, 2014; Borges-Aguiar *et al.*, 2018).

Notavelmente, no entanto, Ploj e colaboradores (2003c) mostraram que os níveis de dinorfina (mas não os de encefalina) são seletivamente aumentados na MCPA dos ratos que foram submetidos ao mesmo protocolo de PM. Estudos de imunistoquímica mostram que os neurônios dinorfinérgicos do NDR projetam-se para a região caudoventrolateral da MCPA (ver Figs. 5c,d de Fu *et al.*, 2010) que é o alvo específico das projeções do núcleo do trato solitário na MCPA (Herbert e Saper, 1992). Esta região também é especificamente ativada durante as respostas de pânico (fuga) induzidas pela administração endovenosa de cianeto de potássio (Müller *et al.*, 2017). No conjunto, nossos resultados e os anteriores de Ploj e colaboradores (2003c) sugerem que a dinorfina poderia estar implicada na facilitação dos ataques de pânico em ratos submetidos à separação materna quando neonatos.

4.7 CONCLUSÕES

Nossos resultados sugerem 1) que o aumento dos níveis de 5-HT da MCPD estaria implicado no desenvolvimento de resiliência e 2) que nem os efeitos pró-depressivos do presente estudo, nem os efeitos pró-pânico dos estudos anteriores (Quintino-dos-Santos *et al.*, 2014; Borges-Aguiar *et al.*, 2018) podem ser explicados pelos mecanismos moleculares aqui examinados.

4.8 REFERÊNCIAS

Angst J, Wicki W (1993) The epidemiology of frequent and less frequent panic attacks. In: Psychopharmacology of Panic (Montgomery SA, ed), pp 7-24. New York: Oxford University Press.

APA (2013) American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. Arlington, VA: American Psychiatric Association.

Arborelius L, Eklund MB (2007) Both long and brief maternal separation produces persistent changes in tissue levels of brain monoamines in middle-aged female rats. *Neuroscience* 145: 738-750.

Arborelius L, Hawks BW, Owens MJ, Plotsky PM, Nemeroff CB (2004) Increased responsiveness of presumed 5-HT cells to citalopram in adult rats subjected to prolonged maternal separation relative to brief separation. *Psychopharmacology (Berl)* 176: 248-255.

Battaglia M, Bernardeschi L, Politi E, Bertella S, Bellodi L (1995) Comorbidity of panic and somatization disorder: a genetic-epidemiological approach. *Compr Psychiatry* 36:411-420.

Beitz AJ (1982) The organization of afferent projections to the midbrain periaqueductal gray of the rat. *Neuroscience* 7: 133-159.

Beitz AJ, Clements JR, Mullett MA, Eklund LJ (1986) Differential origin of brainstem serotonergic projections to the midbrain periaqueductal gray and superior colliculus of the rat. *J Comp Neurol* 250: 498-509.

- Beland FA, Schmitt TC, Fullerton NF, Young JF (1998) Metabolism of chloral hydrate in mice and rats after single and multiple doses. *J Toxicol Environ Health A* 54: 209-226.
- Benekareddy M, Goodfellow NM, Lambe EK, Vaidya VA (2010) Enhanced function of prefrontal serotonin 5-HT (2) receptors in a rat model of psychiatric vulnerability. *J Neurosci* 30: 12138-12150.
- Bernstine JB, Meyer AE, Bernstine RL (1956) Maternal blood and breast milk estimation following the administration of chloral hydrate during the puerperium. *J Obstet Gynaecol Br Emp* 63: 228-231.
- Berton O, Covington HE, III, Ebner K, Tsankova NM, Carle TL, Ulery P, Bhonsle A, Barrot M, Krishnan V, Singewald GM, Singewald N, Birnbaum S, Neve RL, Nestler EJ (2007) Induction of deltaFosB in the periaqueductal gray by stress promotes active coping responses. *Neuron* 55: 289-300.
- Blier P, El Mansari M (2013) Serotonin and beyond: therapeutics for major depression. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 368: 20120536.
- Borges-Aguiar AC, Schaffer LZ, de Kloet ER, Schenberg LC (2018) Daily maternal separations during stress hyporesponsive period decrease the thresholds of panic-like behaviors to electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray of the adult rat. *Behav Brain Res* 344:132-144.
- Bowlby J (1982) *Attachment and Loss: Attachment* (2nd Edition). New York: Basic Books.
- Bowlby J (1983) *Attachment and Loss*. 2nd Edition, New York: Basic Books.
- Bowlby J (1988) *A secure base: parent-child attachment and healthy human development*. New York: Basic Books.
- Caldji C, Francis D, Sharma S, Plotsky PM, Meaney MJ (2000) The effects of early rearing environment on the development of GABA-A and central benzodiazepine receptor levels and novelty-induced fearfulness in the rat. *Neuropsychopharmacology* 22: 219-229.

- Campos AC, de PS, V, Carvalho MC, Ferreira FR, Vicente MA, Brandao ML, Zuardi AW, Zangrossi H, Jr., Guimaraes FS (2013) Involvement of serotonin-mediated neurotransmission in the dorsal periaqueductal gray matter on cannabidiol chronic effects in panic-like responses in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 226: 13-24.
- Carle TL, Ohnishi YN, Ohnishi YH, Alibhai IN, Wilkinson MB, Kumar A, Nestler EJ (2007) Proteasome-dependent and -independent mechanisms for FosB destabilization: identification of FosB degron domains and implications for DeltaFosB stability. *Eur J Neurosci* 25: 3009-3019.
- Champagne FA (2013) Early environments, glucocorticoid receptors, and behavioral epigenetics. *Behav Neurosci* 127: 628-636.
- Clements JR, Beitz AJ, Fletcher TF, Mullett MA (1985) Immunocytochemical localization of serotonin in the rat periaqueductal gray: a quantitative light and electron microscopic study. *J Comp Neurol* 236: 60-70.
- Dalle Molle R, Portella AK, Goldani MZ, Kapczinski FP, Leistner-Segal S, Salum GA, Manfro GG, Silveira PP (2012) Associations between parenting behavior and anxiety in a rodent model and a clinical sample: relationship to peripheral BDNF levels. *Transl Psychiatry* 2, 2: e195.
- Daniels WM, Pietersen CY, Carstens ME, Stein DJ (2004) Maternal separation in rats leads to anxiety-like behavior and a blunted ACTH response and altered neurotransmitter levels in response to a subsequent stressor. *Metab Brain Dis* 19: 3-14.
- Deakin JF, Graeff FG (1991) 5-HT and mechanisms of defence. Author's response. *J Psychopharmacol* 5: 339-341.
- Diamantopoulou A, Raftogianni A, Stamatakis A, Oitzl MS, Stylianopoulou F (2013) Effects of denial of reward through maternal contact in the neonatal period on adult hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in the rat. *Psychoneuroendocrinology* 38: 830-841.

- Diamantopoulou A, Kalpachidou T, Aspiotis G, Gampierakis I, Stylianopoulou F, Stamatakis A (2018) An early experience of mild adversity involving temporary denial of maternal contact affects the serotonergic system of adult male rats and leads to a depressive-like phenotype and inability to adapt to a chronic social stress. *Physiol Behav* 184: 46-54.
- Faure J, Uys JD, Marais L, Stein DJ, Daniels WM (2007) Early maternal separation alters the response to traumatization: resulting in increased levels of hippocampal neurotrophic factors. *Metab Brain Dis* 22: 183-195.
- Francis DD, Meaney MJ (1999) Maternal care and the development of stress responses. *Curr Opin Neurobiol* 9: 128-134.
- Fu W, Le Maitre E, Fabre V, Bernard JF, vid Xu ZQ, Hokfelt T (2010) Chemical neuroanatomy of the dorsal raphe nucleus and adjacent structures of the mouse brain. *J Comp Neurol* 518: 3464-3494.
- Gartside SE, Johnson DA, Leitch MM, Troakes C, Ingram CD (2003) Early life adversity programs changes in central 5-HT neuronal function in adulthood. *Eur J Neurosci* 17: 2401-2408.
- Goodfellow NM, Benekareddy M, Vaidya VA, Lambe EK (2009) Layer II/III of the prefrontal cortex: Inhibition by the serotonin 5-HT_{1A} receptor in development and stress. *J Neurosci* 29: 10094-10103.
- Greisen MH, Altar CA, Bolwig TG, Whitehead R, Wortwein G (2005) Increased adult hippocampal brain-derived neurotrophic factor and normal levels of neurogenesis in maternal separation rats. *J Neurosci Res* 79: 772-778.
- Hall FS (1998) Social deprivation of neonatal, adolescent, and adult rats has distinct neurochemical and behavioral consequences. *Crit Rev Neurobiol* 12:129-162.
- Harding A, Paxinos G, Halliday G (2004) The Serotonin and Tachykinin Systems. In: *The Rat Nervous System* (Paxinos G, ed), pp 1205-1256. San Diego: Elsevier.
- Herbert H, Saper CB (1992) Organization of medullary adrenergic and noradrenergic projections to the periaqueductal gray matter in the rat. *J Comp Neurol* 315: 3452.

- Hellstrom IC, Dhir SK, Diorio JC, Meaney MJ (2012) Maternal licking regulates hippocampal glucocorticoid receptor transcription through a thyroid hormoneserotonin-NGFI-A signalling cascade. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 367: 2495-2510.
- Hock E, Schirtzinger MB (1992) Maternal separation anxiety: its developmental course and relation to maternal mental health. *Child Dev* 63: 93-102.
- Hope BT, Nye HE, Kelz MB, Self DW, Iadarola MJ, Nakabeppu Y, Duman RS, Nestler EJ (1994) Induction of a long-lasting AP-1 complex composed of altered Fos-like proteins in brain by chronic cocaine and other chronic treatments. *Neuron* 13: 1235-1244.
- Hulshof HJ, Novati A, Sgoifo A, Luiten PG, Den Boer JA, Meerlo P (2011) Maternal separation decreases adult hippocampal cell proliferation and impairs cognitive performance but has little effect on stress sensitivity and anxiety in adult Wistar rats. *Behav Brain Res* 216: 552-560.
- Huot RL, Thirivikraman KV, Meaney MJ, Plotsky PM (2001) Development of adult ethanol preference and anxiety as a consequence of neonatal maternal separation in Long Evans rats and reversal with antidepressant treatment. *Psychopharmacology (Berl)* 158: 366-373.
- Huot RL, Plotsky PM, Lenox RH, McNamara RK (2002) Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long Evans rats. *Brain Res* 950: 52-63.
- Jahng JW, Ryu V, Yoo SB, Noh SJ, Kim JY, Lee JH (2010) Mesolimbic dopaminergic activity responding to acute stress is blunted in adolescent rats that experienced neonatal maternal separation. *Neuroscience* 171: 144-152.
- Jiang X, Xing G, Yang C, Verma A, Zhang L, Li H (2009) Stress impairs 5-HT_{2A} receptor-mediated serotonergic facilitation of GABA release in juvenile rat basolateral amygdala. *Neuropsychopharmacology* 34: 410-423.
- Kacsóh B, Meyers JS, Crowley WR, Grosvenor CE (1990) Maternal modulation of

growth hormone secretion in the neonatal rat: involvement of mother-offspring interactions. *J Endocrinol* 124: 233-240.

Keay KA, Bandler R (2004) Periaqueductal Gray. In: *The Rat Nervous System* (Paxinos G, ed), pp 243-257. San Diego: Elsevier.

Kelz MB, Nestler EJ (2000) FosB: a molecular switch underlying long-term neural plasticity. *Curr Opin Neurol* 13: 715-720.

Kendler KS, Neale MC, Kessler RC, Heath AC, Eaves LJ (1992) Childhood parental loss and adult psychopathology in women. A twin study perspective. *Arch Gen Psychiatry* 49:109-116.

Kendler KS (2017) The genealogy of major depression: symptoms and signs of melancholia from 1880 to 1900. *Mol Psychiatry* 10.

Klein RG (1995) Is panic disorder associated with childhood separation anxiety disorder? *Clin Neuropharmacol* 18: S7-S14.

Klein DF (1964) Delineation of two drug-responsive anxiety syndromes. *Psychopharmacologia* 5:397-408.

Klein DF (1993) False suffocation alarms, spontaneous panics, and related conditions. An integrative hypothesis. *Arch Gen Psychiatry* 50:306-318.

Kobayashi K, Shimizu E, Hashimoto K, Mitsumori M, Koike K, Okamura N, Koizumi H, Ohgake S, Matsuzawa D, Zhang L, Nakazato M, Iyo M (2005) Serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in patients with panic disorder: as a biological predictor of response to group cognitive behavioral therapy. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29: 658-663.

Kuhn CM, Butler SR, Schanberg SM (1978) Selective depression of serum growth hormone during maternal deprivation in rat pups. *Science* 201: 1034-1036.

Kuma H, Miki T, Matsumoto Y, Gu H, Li HP, Kusaka T, Satriotomo I, Okamoto H, Yokoyama T, Bedi KS, Onishi S, Suwaki H, Takeuchi Y (2004) Early maternal deprivation induces alterations in brain-derived neurotrophic factor expression in

the developing rat hippocampus. *Neurosci Lett* 372: 68-73.

Ladd CO, Huot RL, Thiruvikraman KV, Nemeroff CB, Meaney MJ, Plotsky PM (2000) Long-term behavioral and neuroendocrine adaptations to adverse early experience. *Prog Brain Res* 122:81-103.

Laplante P, Diorio J, Meaney MJ (2002) Serotonin regulates hippocampal glucocorticoid receptor expression via a 5-HT7 receptor. *Brain Res Dev Brain Res* 139: 199-203.

Lee JH, Kim HJ, Kim JG, Ryu V, Kim BT, Kang DW, Jahng JW (2007) Depressive behaviors and decreased expression of serotonin reuptake transporter in rats that experienced neonatal maternal separation. *Neurosci Res* 58: 32-39.

Lehmann J, Feldon J (2000) Long-term biobehavioral effects of maternal separation in the rat: consistent or confusing? *Rev Neurosci* 11: 383-408.

Levine S, Alpert M, Lewis GW (1957) Infantile experience and the maturation of the pituitary adrenal axis. *Science* 126:1347.

Levine S (1994) The ontogeny of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The influence of maternal factors. *Ann N Y Acad Sci* 746: 275-288.

Levine S (2002) Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the neonatal rat: the role of maternal behavior. *Neurotox Res* 4:557-564.

Levine S (2005) Developmental determinants of sensitivity and resistance to stress. *Psychoneuroendocrinology* 30:939-946.

Lippmann M, Bress A, Nemeroff CB, Plotsky PM, Monteggia LM (2007) Long-term behavioural and molecular alterations associated with maternal separation in rats. *Eur J Neurosci* 25: 3091-3098.

Liu D, Diorio J, Day JC, Francis DD, Meaney MJ (2000) Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. *Nat Neurosci* 3: 799-806.

Loewy AD, Wallach JH, Kellar S (1981) Efferent connections of the ventral medulla

oblongata in the rat. *Brain Res Rev* 3: 63-80.

Lopez JF, Chalmers DT, Little KY, Watson SJ (1998) A. E. Bennett Research Award. Regulation of serotonin_{1A}, glucocorticoid, and mineralocorticoid receptor in rat and human hippocampus: implications for the neurobiology of depression. *Biol Psychiatry* 43: 547-573.

Maron E, Toru I, Maemets K, Sepp S, Vasar V, Shlik J, Zharkovsky A (2009) CCK-4-induced anxiety but not panic is associated with serum brain-derived neurotrophic factor in healthy subjects. *J Psychopharmacol* 23: 460-464.

Matthews K, Wilkinson LS, Robbins TW (1996) Repeated maternal separation of preweanling rats attenuates behavioral responses to primary and conditioned incentives in adulthood. *Physiol Behav* 59:99-107.

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

Meaney MJ, Aitken DH, Bodnoff SR, Iny LJ, Sapolsky RM (1985) The effects of postnatal handling on the development of the glucocorticoid receptorsystems and stress recovery in the rat. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 9: 731–734.

Meaney MJ, Aitken DH, Berkel C van, Bhatnagar S, Sapolsky RM (1988). Effect of neonatal handling on age-related impairments associated with the hippocampus. *Science* 239: 766–768.

Meaney MJ, Aitken DH, Sharma S, Viau V (1992) Basal ACTH, corticosterone and corticosterone-binding globulin levels over the diurnal cycle, and age-related changes in hippocampal type I and type II corticosteroid receptor binding capacity in young and aged, handled and non handled rats. *Neuroendocrinology* 55:204-213.

Meaney MJ, Diorio J, Francis D, Widdowson J, Laplante P, Caldji C, Sharma S, Seckl JR, Plotsky PM (1996) Early environmental regulation of forebrain

glucocorticoid receptor gene expression: implications for adrenocortical responses to stress. *Dev Neurosci* 18: 49-72.

Müller CJ, Quintino-Dos-Santos JW, Schimitel FG, Tufik S, Bejamini V, Canteras NS, Schenberg LC (2017) On the verge of a respiratory-type panic attack: Selective activations of rostromedial and caudomedial periaqueductal gray matter following short-lasting escape to a low dose of potassium cyanide. *Neuroscience* 348: 228-240.

Ognibene E, Adriani W, Caprioli A, Ghirardi O, Ali SF, Aloe L, Laviola G (2008) The effect of early maternal separation on brain derived neurotrophic factor and monoamine levels in adult heterozygous reeler mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32: 1269-1276.

Ohta K, Miki T, Warita K, Suzuki S, Kusaka T, Yakura T, Liu JQ, Tamai M, Takeuchi Y (2014) Prolonged maternal separation disturbs the serotonergic system during early brain development. *Int J Dev Neurosci* 33: 15-21.

Pascual R, Zamora-Leon SP (2007) Effects of neonatal maternal deprivation and postweaning environmental complexity on dendritic morphology of prefrontal pyramidal neurons in the rat. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 67: 471-479.

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

Ploj K, Roman E, Nylander I (2003a) Long-term effects of maternal separation on ethanol intake and brain opioid and dopamine receptors in male Wistar rats. *Neuroscience* 121: 787-799.

Ploj K, Nylander I (2003b) Long-term effects on brain opioid and opioid receptor like-1 receptors after short periods of maternal separation in rats. *Neuroscience Letters* 345: 195–197.

Ploj K, Roman E, Nylander I (2003c) Long-term effects of short and long periods of maternal separation on brain opioid peptide levels in male Wistar rats. *Neuropeptides* 37: 149-156.

- Plotsky PM, Meaney MJ (1993) Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Brain Res Mol Brain Res* 18: 195-200.
- Quintino-Dos-Santos JW, Muller CJ, Bernabe CS, Rosa CA, Tufik S, Schenberg LC (2014) Evidence that the periaqueductal gray matter mediates the facilitation of panic-like reactions in neonatally-isolated adult rats. *PLoS ONE* 9:e90726.
- Raghupathi RK, McGonigle P (1997) Differential effects of three acute stressors on the serotonin 5-HT_{1A} receptor system in rat brain. *Neuroendocrinology* 65: 246-258.
- Rebello TJ, Yu Q, Goodfellow NM, Caffrey Cagliostro MK, Teissier A, Morelli E, Demireva EY, Chemiakine A, Rosoklija GB, Dwork AJ, Lambe EK, Gingrich JA, Ansorge MS (2014) Postnatal day 2 to 11 constitutes a 5-HT-sensitive period impacting adult mPFC function. *J Neurosci* 34: 12379-12393.
- Reus GZ, Stringari RB, Ribeiro KF, Cipriano AL, Panizzutti BS, Stertz L, Lersch C, Kapczinski F, Quevedo J (2011) Maternal deprivation induces depressive-like behaviour and alters neurotrophin levels in the rat brain. *Neurochem Res* 36: 460-466.
- Ribeiro DE, Casarotto PC, Spiacci AJ, Fernandes GG, Pinheiro LC, Tanus-Santos JE, Zangrossi HJ, Guimaraes FS, Joca SRL, Biojone C (2019) Activation of the TRKB receptor mediates the panicolytic-like effect of the NOS inhibitor aminoguanidine. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 93: 232-239.
- Recamier-Carballo S, Estrada-Camarena E, Lopez-Rubalcava C (2017) Maternal separation induces long-term effects on monoamines and brain-derived neurotrophic factor levels on the frontal cortex, amygdala, and hippocampus: differential effects after a stress challenge. *Behav Pharmacol* 28:545-557.
- Roberson-Nay R, Eaves LJ, Hettema JM, Kendler KS, Silberg JL (2012a) Childhood separation anxiety disorder and adult onset panic attacks share a common genetic diathesis. *Depress Anxiety* 29:320-327.

- Roberson-Nay R, Latendresse SJ, Kendler KS (2012b) A latent class approach to the external validation of respiratory and non-respiratory panic subtypes. *Psychol Med* 42:461-474.
- Rosenfeld P, Wetmore JB, Levine S (1992) Effects of repeated maternal separations on the adrenocortical response to stress of pre-weanling rats. *Physiol Behav* 52: 787-791.
- Ruffle JK (2014) Molecular neurobiology of addiction: What's all the FosB about? *Am J Drug Alcohol Abuse* 40: 428-437.
- Rutter M (1991) A fresh look at 'maternal deprivation'. In: *The development and Integration of Behavior: Essays in Honour of Robert Hinde* (Bateson P, ed), pp 331-374. New York: Cambridge University Press.
- Rutter M, Dunn J, Plomin R, Simonoff E, Pickles A, Maughan B, Ormel J, Meyer J, Eaves L (1997) Integrating nature and nurture: implications of person environment correlations and interactions for developmental psychopathology. *Dev Psychopathol* 9:335-364.
- Savignac HM, Dinan TG, Cryan JF (2011) Resistance to early-life stress in mice: effects of genetic background and stress duration. *Front Behav Neurosci* 5: 13.
- Schanberg SM, Ingledue VF, Lee JY, Hannun YA, Bartolome JV (2003) PKC alpha mediates maternal touch regulation of growth-related gene expression in infant rats. *Neuropsychopharmacology* 28: 1026-1030.
- Sibug RM, Oitzl MS, Workel JO, de Kloet ER (2001) Maternal deprivation increases 5-HT (1A) receptor expression in the CA1 and CA3 areas of senescent Brown Norway rats. *Brain Res* 912: 95-98.
- Smythe JW, Rowe WB, Meaney MJ (1994) Neonatal handling alters serotonin (5-HT) turnover and 5-HT₂ receptor binding in selected brain regions: relationship to the handling effect on glucocorticoid receptor expression. *Brain Res Dev Brain Res* 80: 183-189.
- Snedecor GW, Cochran WG (1980) *Statistical Methods*. Ames: The Iowa State

University Press.

- Stanton ME, Levine S (1990) Inhibition of infant glucocorticoid stress response: specific role of maternal cues. *Dev Psychobiol* 23:411-426.
- Stanton ME, Wallstrom J, Levine S (1987) Maternal contact inhibits pituitary-adrenal stress responses in pre-weanling rats. *Dev Psychobiol* 20: 131-145.
- Stewart CA, Petrie RX, Balfour DJ, Matthews K, Reid IC (2004) Enhanced evoked responses after early adversity and repeated platform exposure: the neurobiology of vulnerability? *Biol Psychiatry* 55: 868-870.
- Suchecki D, Rosenfeld P, Levine S (1993a) Maternal regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the infant rat: the roles of feeding and stroking. *Brain Res Dev Brain Res* 75: 185-192.
- Suchecki D, Mozaffarian D, Gross G, Rosenfeld P, Levine S (1993b) Effects of maternal deprivation on the ACTH stress response in the infant rat. *Neuroendocrinology* 57: 204-212.
- Suchecki D, Nelson DY, Van OH, Levine S (1995) Activation and inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of the neonatal rat: effects of maternal deprivation. *Psychoneuroendocrinology* 20: 169-182.
- Teng W, Chen H, Guo F, Du X, Fu X, Fang Y, Zhang H, Fang M, Ding M (2016) Expression and distribution of SP and its NK1 receptor in the brain-gut axis in neonatal maternally separated rat model with visceral hypersensitivity. *Genet Mol Res* 15: 8999.
- Van Oers HJ, de Kloet ER, Levine S (1998) Early vs. late maternal deprivation differentially alters the endocrine and hypothalamic responses to stress. *Brain Res Dev Brain Res*. 111: 245-252.
- Vázquez DM, Eskandari R, Zimmer CA, Levine S, Lopez JF (2002) Brain 5-HT receptor system in the stressed infant rat: implications for vulnerability to substance abuse. *Psychoneuroendocrinology* 27: 245-272.

- Wang S, Bartolome JV, Schanberg SM (1996) Neonatal deprivation of maternal touch may suppress ornithine decarboxylase via downregulation of the protooncogenes c-myc and max. *J Neurosci* 16: 836-842.
- Watanabe Y, Sakai RR, McEwen BS, Mendelson S (1993) Stress and antidepressant effects on hippocampal and cortical 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors and transport sites for serotonin. *Brain Res* 615: 87-94.
- Weaver IC, La Plante P, Weaver S, Parent A, Sharma S, Diorio J, Chapman KE, Seckl JR, Szyf M, Meaney MJ (2001) Early environmental regulation of hippocampal glucocorticoid receptor gene expression: characterization of intracellular mediators and potential genomic target sites. *Mol Cell Endocrinol* 20, 185: 205-218.
- Wigger A, Neumann ID (1999) Periodic maternal deprivation induces gender dependent alterations in behavioral and neuroendocrine responses to emotional stress in adult rats. *Physiol Behav* 66: 293-302.
- Willner P, Muscat R, Papp M (1992) Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. *Neurosci Biobehav Rev* 16: 525-534.

5. ESTUDO II

EFEITOS DO ISOLAMENTO SOCIAL DE RATOS ADULTOS SOBRE A EXPRESSÃO DE RECEPTORES SEROTONÉRGICOS E DE NEUROPEPTÍDEOS SELECIONADOS NA MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL DORSAL

Colaboradores:

Fabíola Donato Rosa Chioato (PPGCF-UFES)

Tamara Andrea Alarcon Ferreira (PPGCF-UFES)

Sarah Martins Presti da Silva (PGBIQ-UFMG)

Rafael Moraes Aguiar (PPGBF-UFES)

Rúbia de Souza Armini (PPGCF-UFES)

Rita Gomes Wanderley Pires (PPGBF-UFES)

RESUMO

Evidências abundantes sugerem que a matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPD) seja o principal substrato dos ataques de pânico (AP). Estudos epidemiológicos em gêmeos mostraram, por outro lado, que enquanto o ambiente infantil determina apenas 1,2% dos AP da vida adulta, o ambiente adulto determinaria 60%. De fato, morte ou distanciamento dos pais e perda de pessoa significativa são antecedentes freqüentes dos AP. No mesmo sentido, enquanto o isolamento social neonatal não teve efeito algum na expressão dos receptores serotoninérgicos e de neuropeptídeos relevantes da MCPD do rato adulto (Estudo I), o isolamento social do ratos adulto (ISA) causou aumentos robustos dos níveis de substância P (SP) da MCPD (Brodin et al., *Neuropeptides* 26: 253, 1994). Dando seqüência a estas observações, este estudo examinou a expressão genômica relativa (RT-PCR) dos receptores serotoninérgicos (5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5HT_{2C}) e de neuropeptídeos relevantes (SP, BDNF, Δ FosB) da MCPD de ratos adultos isolados por 1 ou 7 dias. Os resultados mostraram que o ISA causa aumentos robustos, seletivos e altamente correlacionados das expressões da SP e do BDNF da MCPD. Em contraste, não houve alteração alguma na expressão dos receptores serotoninérgicos e Δ FosB. Além de sugerir a relação causal das expressões de SP e BDNF da MCPD, estes dados também sugerem que estes neuropeptídeos sejam marcadores moleculares da solidão que podem estar envolvidos na facilitação dos AP.

Palavras-chave: isolamento social adulto; matéria cinzenta periaquedutal dorsal; serotonina; substância P; Δ FosB; BDNF.

5.1 INTRODUÇÃO

Evidências abundantes sugerem que a matéria cinzenta periaquedutal (MCPA) seja o principal efector dos ataques de pânico (AP) (Deakin e Graeff, 1991; Graeff, 2004; Schenberg *et al.*, 2001, 2014, Schenberg, 2016; Maren, 2007; Mobbs *et al.*, 2007). Em particular, observações pioneiras de Nashold e colaboradores (1969, 1974) mostraram que a estimulação elétrica da MCPA de humanos produz medo, pânico e sentimentos de morte iminente acompanhados de taquicardia, dispnéia e/ou taquipnéia, hipertensão, sudorese, piloereção, rubor da face e do pescoço, tremores e ondas de frio ou calor, dentre outros sintomas dos AP. Notavelmente, ainda, Amano e colaboradores (1978) relataram que um paciente estimulado na MCPA sentiu como se ele estivesse fugindo de uma perseguição. Estas observações foram corroboradas por estudos de neuroimagem mostrando que a MCPA é intensamente ativada na iminência do ataque de um predador virtual capaz, no entanto, de desferir choques reais ao dedo do participante (Mobbs *et al.*, 2007). Em animais, estimulações elétricas, químicas e optogenéticas da metade dorsal da MCPA (MCPD) produzem comportamentos robustos de “congelamento” e fuga acompanhados de intensa ativação autonômica (Schenberg *et al.*, 1993, 1995, 2001; Bittencourt *et al.*, 2004; Tovote *et al.*, 2016). Contudo, o eixo HPA permanece inativo, reproduzindo a ausência de respostas do pânico clínico (de Souza Armini *et al.*, 2015). Notavelmente, ainda, a resposta de fuga à estimulação da MCPD foi seletivamente atenuada por panicolíticos (mas não ansiolíticos) administrados em doses e regimes similares àqueles da terapia do pânico (Schenberg *et al.*, 2001). Por fim, existem fortes evidências de que a MCPA abrigue um sensor de hipóxia cuja ativação poderia tanto aumentar a sensibilidade do indivíduo ao dióxido de carbono (CO₂) quanto deflagrar um AP do tipo respiratório (Schimitel *et al.*, 2012, 2014; Spiacci *et al.*, 2015; Fernandes *et al.*, 2019). Estas observações fornecem validação ampla e sólida à utilização das respostas de defesa à estimulação da MCPD como um modelo translacional de AP tanto respiratórios quanto não respiratórios.

Por outro lado, o estresse é amplamente aceito como um fator de risco de vários transtornos psiquiátricos, incluindo o transtorno do pânico (TP) (Ladd *et al.*, 2000). Com efeito, estudos clínicos em 712 pares de gêmeos mostraram que os AP

à inalação de CO₂ 35% estão facilitados nos indivíduos que vivenciaram episódios estressantes durante a adolescência (Spatola *et al.*, 2010). Falecimento ou distanciamento dos pais, perda de pessoa significativa e mudança de cidade também são antecedentes bastante freqüentes dos AP (Roy-Byrne *et al.*, 1986; Horesh *et al.*, 1997; Milrod *et al.*, 2004; Batinic *et al.*, 2009; Choe *et al.*, 2013). Em particular, Milrod e colaboradores (2004) relataram que 47% de 51 pacientes com transtorno de pânico (TP) sofreram o primeiro ataque 6 semanas após a perda de uma pessoa próxima. Mais notadamente, estudos epidemiológicos em 1018 pares de mulheres gêmeas mostraram que enquanto a depressão relaciona-se à separação (mas não à perda) do paciente de ambos os progenitores, a ansiedade relaciona-se à sua separação da mãe ou do pai, e o pânico à separação da mãe (mas não do pai) e à perda de progenitores (Kendler *et al.*, 1992). Estes resultados sugerem que os AP sejam facilitados pela “solidão” (sentir-se só, abandonado ou rejeitado).

O estresse da infância também tem sido considerado como um fator de risco dos transtornos de ansiedade desde os primórdios da psiquiatria. Em particular, os AP à estimulação da MCPD estão facilitados em ratos adultos que foram submetidos a condições específicas de separação materna quando neonatos (Quintino-dos-Santos *et al.*, 2014; Borges-Aguiar *et al.*, 2018). Não obstante, estudos epidemiológicos em 1437 pares de gêmeos sugerem que enquanto o ambiente infantil determina apenas 1,2% dos AP de jovens adultos, o ambiente adulto seria responsável por 60% destes ataques (Roberson-Nay *et al.*, 2012). No mesmo sentido, estudos pré-clínicos em ratos mostraram que nem a privação materna no 9º dia pós-natal (PM, 24 h, PN9) nem o isolamento social neonatal por 3 h diárias ao longo da lactação (ISN, 3 h, PN2-PN21) tiveram qualquer efeito nos níveis de serotonina (5-HT) ou na expressão dos receptores serotoninérgicos e neuropeptídeos relevantes da MCPD do rato maduro (ver Estudo I). Em contraste, experimentos pioneiros mostraram que o isolamento social adulto por 1 ou 7 dias (ISA-1 e ISA-7) produziu aumentos robustos (~25%) dos níveis de substância P (SP) da MCPD que foram abolidos pelo pré-tratamento com diazepam (Brodin *et al.*, 1994). No mesmo sentido, Maisonnète e colaboradores (1993) já haviam mostrado que ratos adultos isolados por períodos com durações entre 2 h e 2 semanas apresentavam níveis mais elevados de ansiedade no labirinto-em-cruz elevado (LCE) que os controles alojados em grupo. Adicionalmente, enquanto os efeitos ansiogênicos do isolamento

de 2 h foram revertidos pelo pré-tratamento com midazolam ou pela ressocialização, os efeitos do isolamento de 2 semanas foram revertidos pelo tratamento crônico (mas não agudo) com gepirona, um agonista parcial do receptor 5-HT_{1A}. Além de sugerir que ISN, PM e ISA envolvem mecanismos distintos, estes estudos são um forte ensejo para uma investigação mais ampla dos efeitos moleculares do ISA na MCPD.

Portanto, o presente estudo examinou a expressão relativa (RT-PCR) dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} e dos neuropeptídeos SP, Δ FosB e BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro) na MCPD de ratos submetidos ao ISA por 1 ou 7 dias (ISA-1, ISA-7).

Além de revalidar os estudos pioneiros de Brodin e colaboradores (1994), a análise da expressão genômica da SP também foi motivada pela alta concentração deste neuropeptídeo na MCPA (Gray e Magnuson, 1992; Barbaresi et al., 1998; Harding et al., 2004) e pelos efeitos ansiogênicos de sua microinjeção (ou dos seus fragmentos e agonistas) na MCPD (Aguilar e Brandão, 1994, 1996; De Araujo et al., 1998, 1999, 2001a,b; Mongeau et al., 1998). Adicionalmente, embora a administração intracerebroventricular (ICV) de SP tenha produzido todas as respostas cardiovasculares da reação de defesa, o eixo HPA permaneceu inativo (Unger et al., 1988), uma característica idiossincrásica dos AP. No mesmo sentido, a administração ICV de um agonista do receptor NK-1 (GR73632) produziu respostas de vocalização que foram inibidas pelos panicolíticos imipramina e fluoxetina, mas não pelos ansiolíticos diazepam ou buspirona (Kramer et al., 1998; Rupniak et al., 2000). Vice-versa, enquanto o pré-tratamento com um antagonista do receptor NK1 (L-760735) bloqueou a aquisição do medo condicionado em gerbils, mimetizando os efeitos do diazepam e da lesão da amígdala, os antidepressivos apresentaram o efeito oposto (Rupniak et al., 2003). Curiosamente, no entanto, Bassi e colaboradores (2007) mostraram que enquanto o isolamento de ratos por 1 dia causa o aumento da vocalização ultrassônica associada às ameaças (22 kHz), o isolamento por 14 dias reduz este tipo de vocalização.

Por sua vez, a Δ FosB foi incluída devido à sua estreita relação com a expressão da SP em várias regiões do cérebro (Ruffle, 2014). Em particular, Berton

e colaboradores (2007) mostraram que os ratos resilientes a choques inescapáveis apresentam reduções significativas dos níveis de SP da MCPD que foram inversamente correlacionadas ao aumento da expressão de Δ FosB dos mesmos neurônios. Estes resultados sugerem que o eventual aumento da concentração de SP nos ratos submetidos ao ISA deve ser acompanhado pela redução da expressão de Δ FosB.

Dentre outras razões, a inclusão do BDNF foi devida à concentração elevada deste neuropeptídeo na MCPD (Conner *et al.*, 1997; Yan *et al.*, 1997; Numan e Seroogy, 1999) e à observação de que sua microinjeção nesta estrutura atenua as respostas de pânico à estimulação elétrica contígua ao sítio da microinjeção (Casarotto *et al.*, 2010, 2015). Como corolário, Casarotto e colaboradores (2015) mostraram que enquanto os panicolíticos (antidepressivos tricíclicos e ISRS) aumentam os níveis do BDNF e do receptor fosforilado de TrkB (forma ativa) da MCPD, os ansiolíticos (diazepam, clonazepam e buspirona) não tiveram efeito.

Por fim, a análise da expressão dos receptores serotoninérgicos é amplamente justificada pela sua reconhecida importância na terapia da ansiedade, do pânico e depressão (Deakin e Graeff, 1991; Graeff, 2004; Nemeroff and Owens, 2009).

5.2 OBJETIVO

Avaliar os efeitos do ISA por 1 e 7 dias sobre a expressão genômica dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} e dos neuropeptídeos SP, Δ FosB e BDNF na MCPD de ratos.

5.3 METODOLOGIA

5.3.1 Animais

Ratas fêmeas primíparas (n=8) e ratos machos (n=4) da linhagem Wistar fornecidos pelo biotério central do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo foram mantidos numa sala de circulação restrita do Laboratório de Neurobiologia dos Transtornos do Humor e da Ansiedade. A sala era

dotada de renovação periódica do ar e controles de som (46 dB), temperatura (23°C) e luminosidade (ciclo de 12 horas, luzes acesas às 6:00 h). Após o acasalamento, as ratas grávidas eram alojadas individualmente em caixas-ninho de polipropileno (30 cm x 20 cm x 13 cm) com água e comida *ad libitum* e assoalho coberto de maravalha. Os filhotes machos permaneceram com a mãe até o desmame (PN21). Após o desmame, os ratos foram criados em grupos de 3 a 5 animais em caixas de polietileno (60 cm x 50 cm x 22 cm), que eram limpas 2 vezes por semana, até atingirem a maturidade (PN60). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética sobre Uso dos Animais em pesquisa científica (CEUA-UFES 41/2017) e está de acordo com as normas brasileiras do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, resoluções 30, 32 e 37) e do Instituto Nacional de Saúde dos EUA (*National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, NIH Publications No. 80–23, 1996).

5.3.2 Protocolos Experimentais

Isolamento Social Adulto de 1 (ISA-1) ou 7 dias (ISA-7)

Os ratos adultos (250-300 g) foram alojados individualmente em caixas de polipropileno (30 cm x 20 cm x 13 cm) que foram alocadas numa estante de separação situada numa sala separada dos demais animais. A estante era dotada de 24 compartimentos (24 cm x 26 cm x 33 cm) com portas individuais e paredes de MDF (15 mm), sistema de exaustão, atenuação sonora (ruído branco de 35 dB) e controles de temperatura (22-25°C) e luminosidade (10 lux, ciclo de 12 h, luzes acesas às 6 h). O isolamento durou 1 (ISA-1; n=25) ou 7 (ISA-7; n=24) dias nos quais os ratos tiveram água e comida *ad libitum* mas foram totalmente privados dos estímulos tácteis, visuais, olfativos e, virtualmente, sonoros dos outros ratos. Ao término do isolamento, os ratos foram sacrificados para remoção dos cérebros e análise da expressão genômica dos receptores serotoninérgicos (5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}) e neuropeptídeos (SP, ΔFosB e BDNF) na MCPD. Os grupos ISA-1 e ISA-7 foram comparados a um grupo virgem (VRG) que foi criado sob as mesmas condições que os grupos experimentais, porém, sem isolamento.

5.3.3 Ensaios bioquímicos

Coleta das amostras da MCPD

Após o ISA, os ratos eram gentilmente conduzidos a uma guilhotina e decapitados sem utilização de anestésico. Imediatamente após, o cérebro era removido para a coleta das amostras da MCPD. Para isto, o cérebro era colocado num suporte de fabricação própria que permitia a realização de seções coronais de aproximadamente 1 mm de espessura. Foram feitas 3 a 4 seções da MCPA entre as coordenadas aproximadas de 7,3 mm e 8,3 mm posteriores ao bregma (Paxinos e Watson, 2007). As seções eram então estendidas num papel de filtro colocado sobre uma lâmina de plástico preto que aumentava o contraste das estruturas cerebrais. O conjunto apoiava-se numa placa de Petri resfriada em gelo. Durante a picotagem (*punching*), as seções eram continuamente umedecidas com solução salina (NaCl 0,9%). A picotagem foi realizada com o auxílio de uma lupa e de um perfurador de aço inoxidável (agulha de anestesia epidural com diâmetros externo e interno de 1,4 e 1 mm, respectivamente, Embramac, 17G, Itajaí, Brasil) e removeu todo o tecido das colunas dorsomedial (MCPAdm), dorsolateral (MCPAl) e lateral (MCPAl) da MCPA. Para isso, o bordo da cânula foi polido até atingir uma espessura de aproximadamente 0,2 mm, facilitando a picotagem e reduzindo a maceração do tecido. O mandril da própria agulha auxiliava na expulsão do material coletado em seu interior. Em seguida, as amostras foram armazenadas em gelo seco e congeladas num *ultrafreezer* a -80°C para os ensaios de rt-PCR.

Ensaio em tempo real da reação em cadeia da polimerase (rt-PCR)

Preparação do material: Estudos preliminares mostraram que os ensaios de rt-PCR requereriam amostras da MCPD de, no mínimo, 5 ratos para compor cada dado amostral. Conseqüentemente, foram necessários 49 ratos para formar 2 grupos de ISA (ISA-1 e ISA-7) com 5 dados amostrais ($n=5$). O grupo VRG utilizou um número maior de ratos ($n=36$) porque tinha 6 dados amostrais ($n=6$). Portanto, cada dado amostral corresponde a uma mistura de tecido (*pool*) de 5 a 6 ratos que foram submetidos ao mesmo protocolo experimental.

Extração de RNA: O material de cada amostra (*pool* de 5 ratos) foi solubilizado em Trizol (500 μ L, Sigma-Aldrich, EUA) e homogeneizado por 30

segundos (Pellet Pestle® Motor, Kontes). Em seguida, o homogenato era centrifugado por 10 min a 12.000 g e 4°C (Eppendorf 5415 R, Hamburgo, Alemanha) e o sobrenadante era adicionado a 200 µL de clorofórmio PA (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), agitado levemente, incubado à temperatura ambiente por 5 minutos e submetido a uma nova centrifugação (15 min a 12.000 g e 4°C). Para procedermos à precipitação do RNA, a fase aquosa era recuperada em 500 µL de isopropanol PA (Sigma-Aldrich) e submetida a nova centrifugação (10 min a 12.000 g e 4°C). Após isto, o precipitado era lavado em etanol 75% (1 mL) e submetido a uma centrifugação mais branda (8.000 g, 5 min, 4°C). Por fim, o RNA era ressuspendido em 15 µL de água deionizada com dietilpirocarbonato (0,1%, DEPC, Sigma-Aldrich). A concentração e a qualidade do RNA foram verificadas por espectrometria (260/280 nm) num equipamento NanoDrop™ (ThermoScientific, Wilmington, EUA), e por eletroforese (Biorad, CA, USA) em gel de agarose a 80 V, por 30 minutos, em tampão de ácido 3-[N-morfolino]propanosulfônico (MOPS), respectivamente. As bandas foram observadas em um transluminador UV (302 nm, Biorad ChemiDoc™XRS+).

Síntese de DNA complementar (cDNA): A síntese do cDNA foi realizada com o kit iScript cDNA Synthesis (BioRad, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante, usando o equipamento PCR S1000 Thermal Cycler (BioRad, Irvine, EUA). As amostras de RNA (1 µL com 2 µg de RNA) foram submetidas ao seguinte protocolo: 5 minutos em 25°C (anelamento), 30 minutos em 42°C (transcrição reversa) e 5 minutos em 85°C (inativação da transcriptase reversa).

Reação em cadeia da polimerase em tempo real (rt-PCR): Após a transcrição reversa, as amostras de cDNA foram amplificadas por rt-PCR utilizando-se o kit iQ SYBR Green Supermix (Biorad, Irvine, EUA) e com o equipamento CFX96 Real Time PCR (Biorad, Irvine, EUA). As reações foram realizadas num volume total de 10 µL contendo 0,5 µL de cDNA, 5 µL de SYBR Green Supermix 2x, 3,5 µL de água purificada e 0,5 µL de cada iniciador (10 µM). Foram realizados 40 ciclos após a desnaturação inicial de acordo com os seguintes parâmetros: 95°C (desnaturação, 15 s); 60°C (anelamento, 30 s) e 72°C (amplificação, 30 s). Para garantir a qualidade da reação, as amostras foram preparadas em triplicata. A quantificação relativa da expressão genômica foi feita pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ utilizando o gene da desidrogenase

do gliceraldeído 3-fosfato (GAPDH, Exxtend, Paulínia, BR) para normalização dos dados (Campos *et al.*, 2013). A sequência dos *primers* (5HT_{1A}, 5HT_{2A}, 5HT_{2C}, SP, BDNF, Δ FosB e GAPDH), foi desenhada utilizando o site da Integrated DNA Technologies (IDT, <http://www.idtdna.com/scitools/Applications/RealTimePCR/>) e confirmada para homologia e especificidade por BLAST (GeneBank, U. S. National Library Medicine, EUA) (Tabela 9).

Tabela 9. Sequência dos iniciadores (*primers*) da Exxtend Biotecnologia, Paulínia, Brasil utilizados na rt-PCR.

Gene	Amplicon (bp)	Tm (°C)	Sequência 5' – 3'
5HT _{1A} – F	76	62	CCGTGAAAGGAAGACGGTGA
5HT _{1A} – R		60	AATGAAAACGGCAGCCAGC
5HT _{2A} – F	83	64	CCAACGGTCCATCCACAGAG
5HT _{2A} – R		60	TGCACGCCTTTTGCTCATTG
5HT _{2c} – F	242	64	GTCACACCGAGGAGGAAGCTG
5HT _{2c} – R		62	GGTGATGAAAACGGGCACC
SP – F	105	62	TGAAAATCCTCGTGCGGTG
SP – R		62	CGGACCAGTCGGACCAATAA
Δ FosB – F	81	64	CGCATCCTCTCACAGAGGTC
Δ FosB – R		64	ATATCGAGGGTAGGGGAGCC
BDNF – F	124	58	TTACACGAAGGAAGGCTGC
BDNF – R		54	TATGAACCGCCAGCCAAT
GAPDH – F	83	58	TGCCCCCATGTTTGTGATG
GAPDH – R		58	TGGTGGTGCAGGATGCATT

F, sentido 5'-3' (*forward*); R, sentido 3'-5' (*reverse*); Tm, *melting temperature*.

5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de rt-PCR foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de 1 via seguida de comparações múltiplas para o nível descritivo de 5% de Bonferroni. A exclusão dos valores extremos (*outliers*) foi realizada pelo método do resíduo normalizado máximo de Grubbs (Snedecor and Cochran, 1982) para o nível descritivo de P<0,05. A expressão dos receptores serotoninérgicos e dos neuropeptídeos também foi examinada por análise de correlação (Pearson). As análises estatísticas foram realizadas com o programa Statistical Analysis System

(SAS®, Cary, EUA).

5.5 RESULTADOS

Efeitos do isolamento social adulto sobre a expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) do RNAm dos receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} e dos neuropeptídeos SP, BDNF e Δ FosB da MCPD.

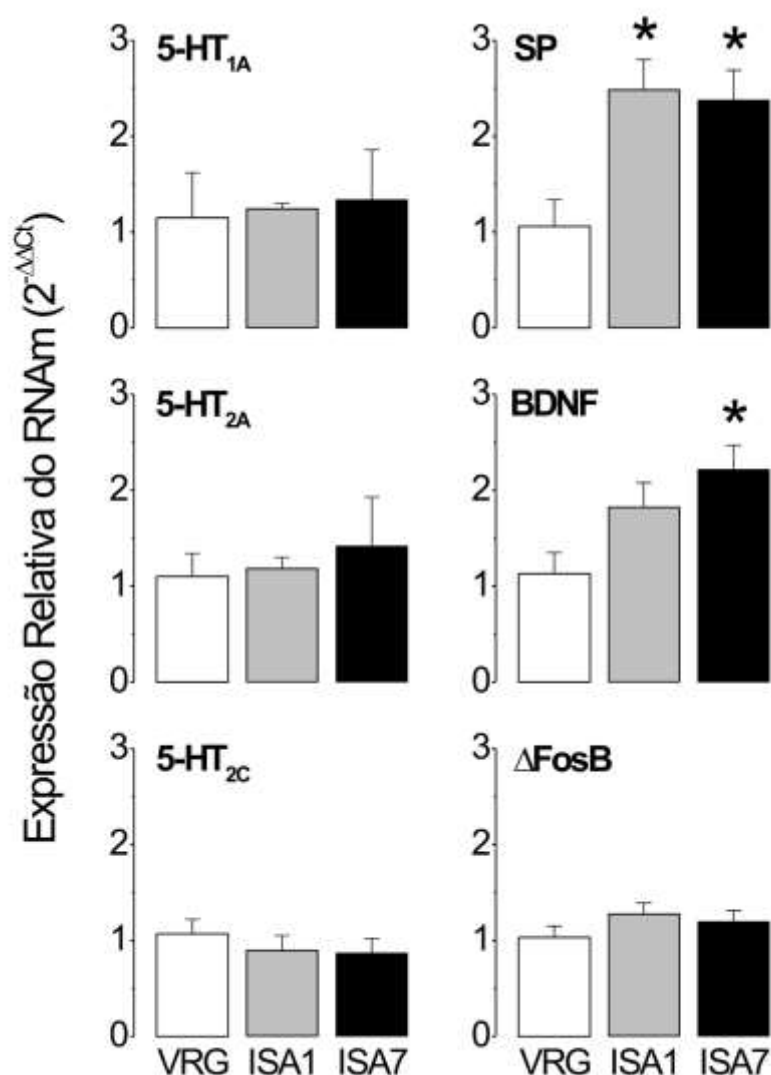


Figura 38. Expressão relativa do RNAm dos receptores 5HT_{1A}, 5HT_{2A} e 5HT_{2C} e dos neuropeptídeos SP, BDNF e Δ FosB na MCPD de ratos submetidos ao isolamento social adulto de 1 (ISA-1) ou 7 dias (ISA-7), e respectivos controles (VRG). As colunas indicam a expressão relativa do RNAm ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) dos receptores serotoninérgicos e dos neuropeptídeos dos grupos ISA-1, ISA-7 e controles (VRG), normalizada para o gene de referência da desidrogenase do gliceraldeído-3-fosfato. * $p < 0,05$, estatisticamente diferente do grupo VRG (ANOVA de 1 via seguida de testes *post hoc* de Bonferroni para 3 comparações).

Não houve diferença alguma entre grupos na expressão genômica dos receptores serotoninérgicos e do neuropeptídeo Δ FosB. Em contraste, os ratos isolados apresentaram aumentos acentuados da expressão do RNAm da SP ($F_{2,13}=7,40$; $P<0,01$) e do BDNF ($F_{2,13}=5,37$; $P<0,02$) relativamente ao grupo VRG. Estas diferenças foram basicamente devidas aos aumentos da expressão relativa do RNAm da SP nos grupos ISA-1 ($t=3,40$; $P<0,005$) e ISA-7 ($t=3,14$; $P<0,01$) e ao aumento na expressão do BDNF do grupo ISA-7 ($t=3,20$; $P<0,01$), relativamente ao grupo VRG. A expressão relativa do BDNF também foi marginalmente aumentada no grupo ISA-1 ($t=2,06$; $P<0,06$).

A análise de correlação do conjunto das amostras ($n=16$) revelou uma correlação altamente significativa da expressão de BDNF e SP ($r = 0,879, 14$ g.l., $P<0,0001$). Em contraste, não foi observada nenhuma correlação entre a expressão do BDNF e aquela dos receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} (Fig. 39).

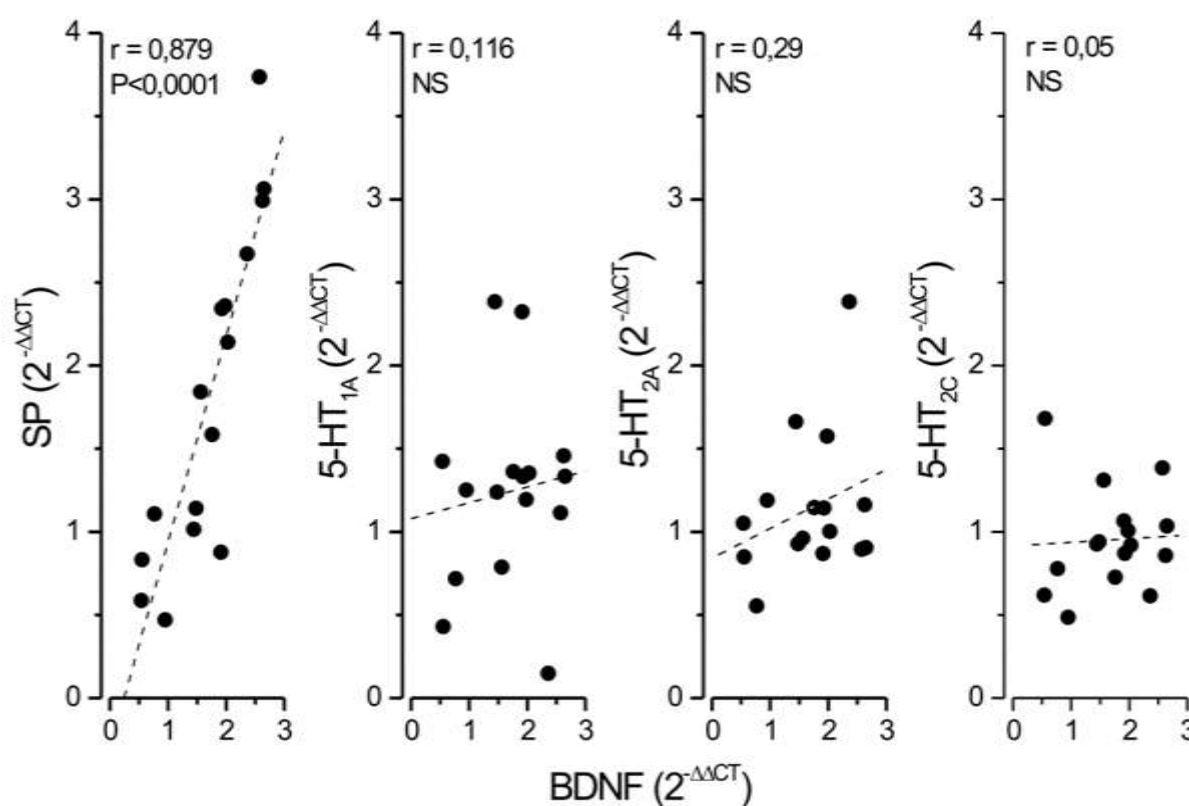


Figura 39. Correlações entre a expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$) de BDNF com aquelas da SP e dos receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} da MCPD dos ratos isolados e respectivos controles.

Tampouco foram observadas quaisquer correlações entre SP e Δ FosB ou entre esta proteína e os receptores serotoninérgicos (Fig. 40).

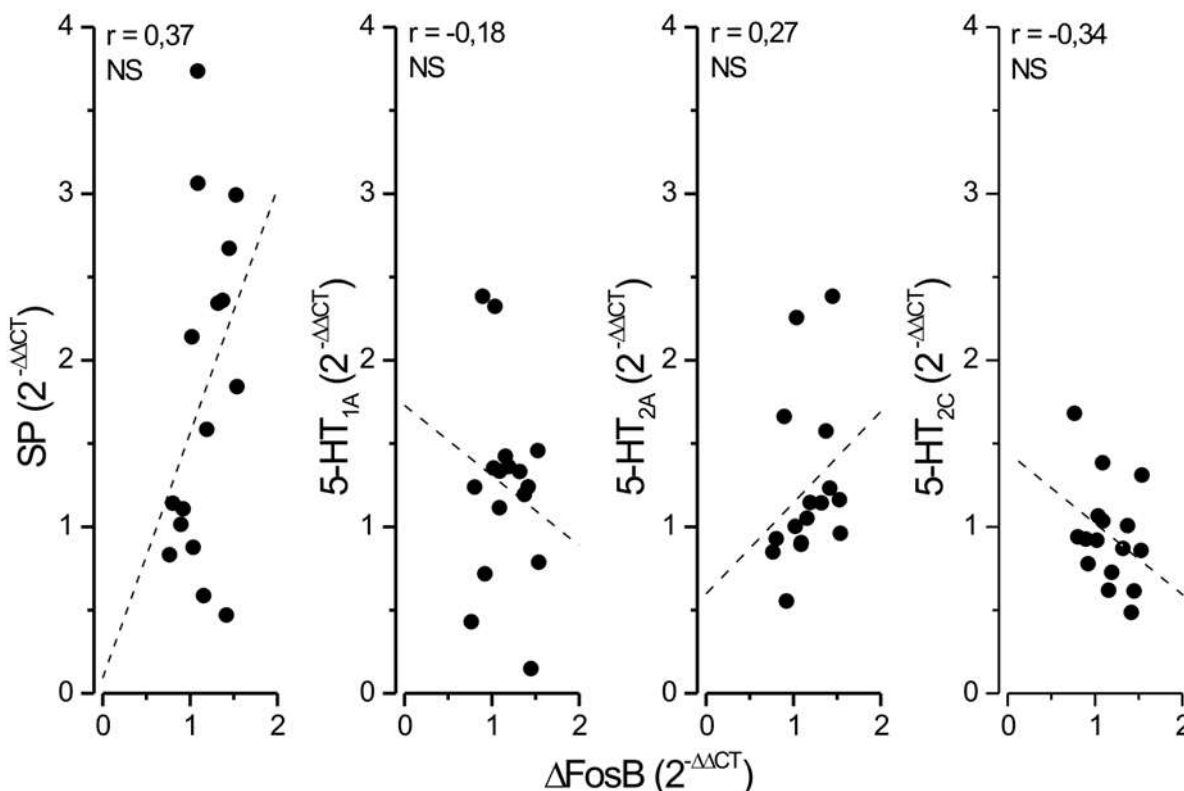


Figura 40. Correlações entre a expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$) de Δ FosB com aquelas da SP e dos receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} da MCPD dos ratos isolados e respectivos controles.

5.6 DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que ratos submetidos ao ISA apresentam aumentos significativos da expressão gênica de SP nos grupos ISA-1 e ISA-7 e do BDNF no grupo ISA-7. Embora estes resultados sugiram uma cinética distinta da sobreexpressão do BDNF e da SP, a qual já alcança o valor máximo no primeiro dia de isolamento, eles não excluem a possibilidade de uma relação causal entre estes fenômenos. De fato, a expressão do BDNF também apresentou um aumento marginal ($P < 0,06$) no grupo ISA-1. Mais importante, no entanto, a relação causal é fortemente apoiada pela correlação altamente significativa entre as expressões de SP e BDNF. Em contraste, não houve alteração alguma nem na expressão dos receptores serotoninérgicos nem naquela da Δ FosB. Tampouco foram observadas quaisquer correlações entre as expressões do BDNF ou Δ FosB e aquelas dos

receptores serotoninérgicos. Estes resultados sugerem que o isolamento dos ratos adultos produz aumentos seletivos e altamente correlacionados das expressões de SP e BDNF da MCPD.

Efeitos do isolamento social do rato adulto sobre a expressão do RNAm dos receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} da MCPD

Embora a maioria dos estudos sobre os efeitos do isolamento social nos receptores serotoninérgicos tenha utilizado separação materna de neonatos (ISN ou PM) (ver Estudo I) ou criação em isolamento (*isolation-rearing* ou *post-weaning isolation*) (para revisão ver Hall, 1998; Robbins, 2016), também existem alguns estudos que examinaram os efeitos do ISA na expressão destes receptores em ratos (Bjørnebekk *et al.*, 2007, Goodfellow *et al.*, 2009) e camundongos (Rilke *et al.*, 1998; Schiller *et al.*, 2006a, 2006b; Gunther *et al.*, 2008). Mais notadamente, Schiller e colaboradores (2006b) realizaram o único estudo sobre os efeitos do ISA de 6 semanas na densidade dos receptores 5-HT_{1A} da MCPA do camundongo. Conseqüentemente, até onde sabemos este estudo é a primeira análise dos efeitos do ISA sobre a expressão do RNAm dos receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} na MCPD do rato.

Surpreendentemente, no entanto, a ausência de efeitos na expressão dos receptores serotoninérgicos da MCPD contrasta com a estonteante diversidade de efeitos na transmissão serotoninérgica de outras áreas do cérebro em ratos ou camundongos submetidos a períodos mais longos de isolamento (4, 6 e 12 semanas). De fato, evidências abundantes mostram que os efeitos do ISA dependem da espécie, linhagem, sexo (Rilke *et al.*, 1998; Schiller *et al.*, 2006b; Bjørnebekk *et al.*, 2007) e, sobretudo, duração do isolamento (Schiller *et al.*, 2003). Por exemplo, estudos de autoradiografia em camundongos machos mostraram que enquanto o ISA de 4 semanas reduziu a densidade de ambos os receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} no córtex, hipocampo, amígdala e hipotálamo e do receptor 5-HT_{2A} no estriado e núcleo acumbens, o ISA de 12 semanas somente reduziu a expressão dos receptores 5-HT_{1A} do hipocampo (Schiller *et al.*, 2003). Contrariamente, no entanto, Gunther e colaboradores (2008) mostraram que camundongos machos isolados por 6 semanas apresentam aumentos da densidade dos receptores 5-HT_{1A}

nos córtices parietal e piriforme, no giro denteado, no hipotálamo dorsomedial, no núcleo cortical da amígdala e no núcleo mediano da rafe (NMR), mas não no núcleo dorsal da rafe (NDR). Estudos similares de Schiller e colaboradores (2006b) relataram aumentos adicionais dos receptores 5-HT_{1A} nos córtices motor e somestésico, no hipocampo (CA1), septo lateral, giro cingulado e MCPA. Mais notavelmente, os aumentos pronunciados da densidade de receptores 5-HT_{1A} no núcleo cortical da amígdala (25%), septo lateral (77%), giro cingulado (72%) e MCPA (67%) somente foram observados nos camundongos machos. Conseqüentemente, os autores sugeriram que estes efeitos estão associados ao aumento de agressividade de machos submetidos ao isolamento (Schiller et al., 2006b). Embora os últimos resultados discordem dos nossos achados, é importante notar que este estudo utilizou camundongos e isolamento mais prolongado que o do presente estudo. Gunther e colaboradores (2008) também mostraram que os receptores 5-HT_{2A} foram tanto aumentados (córtices motor, cingulado e insular, estriado rostral e cerne do núcleo acumbens) quanto reduzidos (córtices somestésico e estriado posterior). Em resumo, os estudos acima sugerem que o ISA de camundongos machos por 4, 6 ou 12 semanas produz redução, aumento ou nenhuma alteração dos receptores 5-HT_{1A} de inúmeras estruturas do cérebro, respectivamente.

Por outro lado, embora as evidências eletrofisiológicas sugiram que períodos mais curtos de isolamento (< 1 semana) não tenham efeito algum na expressão dos receptores 5-HT_{1A} do córtex pré-frontal, a corrente induzida pela estimulação destes receptores foi abolida nos ratos que foram submetidos tanto à PM nas duas primeiras semanas de vida quanto ao isolamento (< 1 semana) na vida adulta. Estes resultados sugerem a interação entre os estresses da infância e da vida adulta (Goodfellow et al., 2009; Sargin et al., 2019).

De forma similar, o presente estudo sugere que o ISA de 1 a 7 dias não tem efeito algum na expressão do RNAm dos receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} da MCPD de ratos criados em condições normais. Portanto, os efeitos ansiogênicos do ISA de curta duração (Maisonnette et al., 1993; Brodin et al., 1994) parecem ser devidos a outros mediadores que não a 5-HT.

Efeitos do isolamento social do rato adulto sobre a expressão do RNAm da SP, do BDNF e da Δ FosB da MCPD

Mais notadamente, o presente estudo mostrou que tanto ratos ISA-1 quanto ratos ISA-7 apresentaram aumentos robustos (~140%) da expressão relativa de RNAm da SP da MCPD. Estes resultados são a primeira corroboração de estudos pioneiros com radioimunoensaio relatando aumentos menores (~25%), porém significantes, das concentrações tissulares de SP da MCPD em ratos isolados por 1 ou 7 dias (Brodin *et al.*, 1994). Mais notavelmente, tanto os valores máximos da concentração tissular (Brodin *et al.*, 1994) quanto aqueles da expressão de SP (presente estudo) foram atingidos no primeiro dia de isolamento e mantiveram-se praticamente inalterados por uma semana. Em contraste, estudos mais recentes mostraram que os níveis de SP e NKA estão reduzidos no hipotálamo de ratos submetidos ao ISA (Thorsell *et al.*, 2005).

Nossos resultados também são consoantes com estudos mais recentes mostrando que as concentrações cerebrais de SP estão marcadamente aumentadas (~130%) em camundongos submetidos a 4 semanas de isolamento (Shigematsu *et al.*, 2008). Estes aumentos foram observados tanto nos camundongos controles (CatE+/+) como naqueles com nocaute do gene da protease lisossômica catepsina E (CatE-/-) nos quais os níveis basais de SP já eram 140% maiores que os primeiros. Mais importante, no entanto, estes autores mostraram que embora os camundongos CatE-/- mantidos em caixas coletivas tenham apresentado comportamentos de exploração (campo aberto), locomoção (caixa de atividade) e ansiedade (LCE) equivalentes àqueles dos camundongos CatE+/, os camundongos CatE-/- tornaram-se muito mais agressivos que os camundongos CatE+/+ quando foram isolados por 4 semanas e expostos a um intruso do mesmo genótipo (paradigma residente-intruso). A relação entre os aumentos da agressividade e da SP nos camundongos isolados foi demonstrada pelo bloqueio da agressividade pelo pré-tratamento com um antagonista específico de receptores NK-1 (L-733,060) (Shigematsu *et al.*, 2008). Ainda, os aumentos das concentrações de SP nos camundongos CatE-/- isolados por 4 semanas foram observados principalmente na amígdala (71%), hipotálamo (125%) e, notavelmente, MCPA (170%). No conjunto, os resultados nossos e do último estudo sugerem que o aumento da expressão e

liberação de SP deve ser atribuído ao isolamento. Com efeito, os neurônios de SP da MCPD parecem estar envolvidos em vários tipos de estresse. Por exemplo, ratos derrotados no modelo residente-intruso (*social defeat stress*) apresentam aumentos da expressão de pré-pró-taquicinina na MCPD (Nikulina *et al.*, 1997).

Drew e colaboradores (2005) mostraram que a SP age na MCPA através dos receptores NK1, NK2 e NK3 excitando subpopulações de neurônios tanto sensíveis quanto insensíveis aos opióides mediante o aumento da condutância aos cátions e a redução da condutância ao potássio. No entanto, a maioria dos neurônios da MCPD com receptores NK1 contém glutamato em vez do GABA (Commons e Valentino, 2002), sugerindo que a ação predominante da SP na MCPA possa ser o aumento da transmissão glutamatérgica. Os últimos autores também mostraram que a imunorreatividade ao receptor NK1 isoladamente ou associada ao glutamato somente foi observada na coluna dorsomedial, no limite entre as colunas lateral e ventrolateral e na coluna ventrolateral dos níveis rostral, intermediário e caudal da MCPA, respectivamente. A imunorreatividade NK1 também foi detectada no NDR. Mais notavelmente, no entanto, não foi observada imunorreatividade alguma na MCPAdl. Como a MCPAdl é uma estrutura crucial no comportamento de fuga (Bittencourt *et al.*, 2004; Schenberg *et al.*, 2005), a ausência de receptores NK1 pode explicar porque microinjeções volumosas (250 nL) de um agonista do receptor NK1 (GR73632) que abrangeram tanto a MCPAdm como a MCPAdl inibiram as respostas de fuga à estimulação da MCPAdl e ao choque nas patas (Mongeau *et al.*, 1998).

Tal como os ratos submetidos à separação materna neonatal (Estudo I), os ratos submetidos ao ISA não apresentaram alteração alguma da expressão relativa do RNAm da proteína Δ FosB. A ausência de efeitos é surpreendente visto que a indução de Δ FosB é bastante seletiva (embora não exclusiva) para neurônios ricos em SP (Ruffle, 2014). Com efeito, Berton e colaboradores (2007) mostraram que ratos resilientes a choques inescapáveis apresentaram aumentos significantes dos níveis de Δ FosB da MCPAvl que foram inversamente correlacionados à expressão de SP nos mesmos neurônios. Contrariamente, as concentrações de FosB e Δ FosB da MCPD não foram alteradas por outras formas de estresse. Por exemplo, embora as exposições repetidas ao odor de um gato tenham causado aumentos transientes

(1 dia) ou persistentes (7 dias) da imunoreatividade FosB/ Δ FosB da MCPAvl, núcleo pré-mamilar dorsal, hipotálamo medial, núcleo accumbens e estriado, elas não tiveram efeito algum na imunoreatividade da MCPAdl (Staples *et al.*, 2009). No mesmo sentido, Laine e colaboradores (2017) mostraram que ratos adultos submetidos ao estresse crônico de derrota social também não apresentaram alteração alguma da imunoreatividade Δ FosB da MCPAdl. Como a Δ FosB inibe a expressão de SP na MCPAvl (Berton *et al.*, 2007), a ausência de efeitos do ISA na expressão relativa da Δ FosB na MCPD pode ser uma condição necessária para o aumento da expressão de SP. Em todo caso, estes resultados sugerem que a SP esteja mais associada à ansiedade de separação do que ao pânico. Em contraste, Vialou e colaboradores (2010) relataram que a Δ FosB do núcleo accumbens está reduzida tanto em ratos adultos isolados por 8 semanas quanto em pacientes depressivos (50% menor que os controles).

Nossos resultados também mostraram que a expressão do BDNF foi sensivelmente aumentada no grupo ISA-1 e, significativamente, no grupo ISA-7. Embora estes resultados sugiram que a sobreexpressão do BDNF apresente cinética distinta da expressão da SP, a correlação altamente significativa entre as expressões de BDNF e SP sugere a relação causal destes eventos. Os efeitos do ISA sobre a expressão de BDNF foram principalmente estudados no hipocampo. Contudo, enquanto Meng e colaboradores (2011) observaram aumentos robustos do BDNF do hipocampo (aproximadamente 900% em CA1, 800% em CA2/3 e 100% no giro denteado) e do córtex prefrontal medial (114%) em ratos adolescentes isolados por 4 semanas, a maioria dos autores somente observou reduções da expressão e níveis tissulares do BDNF do hipocampo de ratos adultos isolados (Scaccianoce *et al.*, 2006; Bjørnebekk *et al.*, 2007; Ieraci *et al.*, 2016; Zaletel *et al.*, 2017; Borges *et al.*, 2019). Estes resultados ressaltam a especificidade do aumento da expressão do BDNF na MCPD.

A redução dos níveis hipocámpais de BDNF tem sido associada a anormalidades da plasticidade sináptica, neurogênese e sobrevivência neuronal que seriam subjacentes à perda de memória e desenvolvimento de ansiedade e depressão (Duman *et al.*, 1997, 2014; Zaletel *et al.*, 2017). Mais importante para o presente estudo, Siuciak e colaboradores (1997) mostraram que a microinjeção de

BDNF na MCPA (e NDR) diminui o déficit comportamental (falha de escape) causado pela exposição de ratos a choques inescapáveis, diminui o tempo de imobilidade no teste de natação forçada e aumenta a expressão da triptofano hidroxilase (Siuciak *et al.*, 1998). Mais notavelmente, no entanto, Casarotto e colaboradores (2010, 2015) mostraram que enquanto a administração sistêmica de antidepressivos tricíclicos e ISRS aumentam os níveis de BDNF e do receptor fosforilado de TrkB (forma ativa) da MCPD, a administração de BDNF na MCPD produziu uma inibição dose-dependente das respostas de pânico à estimulação elétrica do sítio injetado. O efeito panicolítico demonstrado por Casarotto e colaboradores (2010) foi dependente de GABA-A, o que está de acordo com os estudos de Vaz e colaboradores (2008), que revelaram que o BDNF inibe a recaptura de GABA via ativação de TrkB. Os aumentos pronunciados de BDNF após 7 dias de isolamento poderiam, portanto, inibir os efeitos ansiogênicos da SP.

5.7 CONCLUSÕES

Em todo caso, os resultados deste estudo mostraram que o ISA produz aumentos seletivos robustos e altamente correlacionados das expressões relativas da SP e do BDNF na MCPD. Embora o estresse de separação da infância possa interagir com o estresse da vida adulta (Goodfellow *et al.*, 2009; Stewart *et al.*, 2004), nossos resultados sugerem que os efeitos moleculares do ISA sejam distintos daqueles do ISN (Estudo I). Além de sugerirem a relação causal das expressões da SP e do BDNF, nossos resultados também sugerem que a expressão aumentada destes neuropeptídeos na MCPD seja um marcador molecular da solidão e de seus efeitos facilitadores dos AP.

5.8 REFERÊNCIAS

- Aguiar MS, Brandão ML (1994) Conditioned place aversion produced by microinjections of substance P into the periaqueductal gray of rats. *Behav Pharmacol* 5:369-373.
- Aguiar MS, Brandão ML (1996) Effects of microinjections of the neuropeptide substance P in the dorsal periaqueductal gray on the behaviour of rats in the

plus-maze test. *Physiol.Behav.* 60:1183-1186.

Amano K, Tanikawa T, Iseki H, Kawabatake H, Notani M, Kawamura H, Kitamura K (1978) Single neuron analysis of the human midbrain tegmentum. *Applied Neurophysiology* 41:66-78.

Barbaresi P (1998) Immunocytochemical localization of substance P receptor in rat periaqueductal gray matter: a light and electron microscopic study. *J.Comp Neurol.* 398:473-490.

Bassi GS, Nobre MJ, Carvalho MC, Brandão ML (2007) Substance P injected into the dorsal periaqueductal gray causes anxiogenic effects similar to the long-term isolation as assessed by ultrasound vocalizations measurements. *Behavioral Brain Research* 182:301-307.

Batinić B, Trajković G, Duisin D, Nikolić-Balkoski G (2009) Life events and social support in a 1-year preceding panic disorder. *Psychiatria Danubina* 21 (1): 33–40.

Berton O, Covington HE, III, Ebner K, Tsankova NM, Carle TL, Ulery P, Bhonsle A, Barrot M, Krishnan V, Singewald GM, Singewald N, Birnbaum S, Neve RL, Nestler EJ (2007) Induction of deltaFosB in the periaqueductal gray by stress promotes active coping responses. *Neuron.* 55:289-300.

Bittencourt AS, Carobrez AP, Zamprogno LP, Tufik S, Schenberg LC (2004) Organization of single components of defensive behaviors within distinct columns of periaqueductal gray matter of the rat: role of N-methyl-D-aspartic acid glutamate receptors. *Neuroscience* 125:71-89.

Bjørnebekk A, Mathé AA, Gruber SHM, Brené S (2007) Social isolation increases number of newly proliferated cells in hippocampus in female flinders sensitive line rats. *Hippocampus* 17: 1193–1200.

Borges JV, de Freitas BS, Antoniazzi V, de Souza dos Santos C, Vedovelli K, Pires VN, Bromberg E (2019) Social isolation and social support at adulthood affect epigenetic mechanisms, brain-derived neurotrophic factor levels and behavior of

chronically stressed rats. *Behavioural Brain Research* 366: 36-44.

Borges-Aguiar AC, Schauffer LZ, de Kloet ER, Schenberg LC (2018) Daily maternal separations during stress hyporesponsive period decrease the thresholds of panic-like behaviors to electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray of the adult rat. *Behavioral Brain Research* 344:132-144.

Brodin E, Rosén A, Schött E, Brodin K (1994) Effects of sequential removal of rats from a group cage, and of individual housing of rats, on substance P, cholecystokin and somatostatin levels in the periaqueductal grey and limbic regions. *Neuropeptides* 26: 253-260.

Casarotto PC, de B, V, Correa FM, Resstel LB, Zangrossi H, Jr. (2010) Panicolytic-like effect of BDNF in the rat dorsal periaqueductal grey matter: the role of 5-HT and GABA. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 13:573-582.

Casarotto PC, Santos PC, Lucas GA, Biojone C, Pobbe RL, Vilela-Costa HH, Joca SR, Guimaraes FS, Zangrossi H, Jr. (2015) BDNF-TRKB signaling system of the dorsal periaqueductal gray matter is implicated in the panicolytic-like effect of antidepressant drugs. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 25:913-922.

Choe AY, Kim B, Lee KS, Lee JE, Lee JY, Choi TK, Lee SH (2013) Serotonergic Genes (5-HTT and HTR1A) and Separation Life Events: Gene-by-Environment Interaction for Panic Disorder. *Neuropsychobiology* 67 (4) : 192–200.

Commons KG, Valentino RJ (2002) Cellular basis for the effects of substance P in the periaqueductal gray and dorsal raphe nucleus. *J Comp Neurol.* 20, 447: 82-97.

Conner JM, Lauterborn JC, Yan Q, Gall CM, Varon S (1997) Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport. *J Neurosci* 17: 2295-2313.

De Araujo JE, Huston JP, Brandao ML (1998) Aversive effects of the C-fragment of Substance P in the dorsal periaqueductal gray matter. *Experimental Brain Research* 123: 84-89.

- De Araujo JE, Silva RC, Huston JP, Brandao ML (1999) Anxiogenic effects of substance P and its 7-11 C terminal, but not the 1-7 N terminal, injected into the dorsal periaqueductal gray. *Peptides*. 20: 1437-1443.
- De Araujo JE, Huston JP, Brandao ML (2001a) Opposite effects of substance P fragments C (anxiogenic) and N (anxiolytic) injected into dorsal periaqueductal gray. *European Journal of Pharmacology* 432: 43-51.
- De Araujo JE, Huston JP, Brandao ML (2001b) Place aversion induced by microinjections of C-fragment of substance P into the dorsal periaqueductal gray of rats is mediated by tachykinin NK1 receptors. *Peptides*. 22: 1447-1452.
- De Souza Armini R, Bernabe CS, Rosa CA, Siller CA, Schimitel FG, Tufik S, Klein DF, Schenberg LC (2015) In a rat model of panic, corticotropin responses to dorsal periaqueductal gray stimulation depend on physical exertion. *Psychoneuroendocrinology*. 53: 136-147.
- Deakin JFW, Graeff FG (1991) 5-HT and mechanisms of defence. *J Psychopharmacol*. 5: 305-315.
- Drew GM, Mitchell VA, Vaughan CW (2005) Postsynaptic actions of substance P on rat periaqueductal grey neurons in vitro. *Neuropharmacology*. 49: 587-595.
- Duman RS (2014) Pathophysiology of depression and innovative treatments: remodeling glutamatergic synaptic connections. *Dialogues. Clin. Neurosci*. 16: 11-27.
- Duman RS, Heninger GR, Nestler EJ (1997) A molecular and cellular theory of depression. *Arch. Gen. Psychiatry* 54: 597-606.
- Fernandes GG, Frias AT, Spiacci A, Jr., Pinheiro LC, Tanus-Santos JE, Zangrossi H, Jr. (2019) Nitric oxide in the dorsal periaqueductal gray mediates the panic-like escape response evoked by exposure to hypoxia. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*. 92: 321-327.
- Goodfellow NM, Benekareddy M, Vaydia VA, Lambe EK (2009) Layer II/III of the Prefrontal Cortex: Inhibition by the Serotonin 5-HT_{1A} Receptor in Development

and Stress. *The Journal of Neuroscience* 29 (32): 10094 –10103.

Graeff FG (2004) Serotonin, the periaqueductal gray and panic. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 28: 239-259.

Gray TS, Magnuson DJ (1992) Peptide immunoreactive neurons in the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis project to the midbrain central gray in the rat. *Peptides*. 13: 451-460.

Günther L, Liebscher S, Jähkel M, Oehler J (2008) Effects of chronic citalopram treatment on 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in group- and isolation-housed mice. *Eur J Pharmacol*. 28;593 (1-3): 49-61.

Hall FS (1998) Social deprivation of neonatal, adolescent, and adult rats has distinct neurochemical and behavioral consequences. *Critical Reviews in Neurobiology* 12 (1&2): 129-162.

Harding A, Paxinos G, Halliday G (2004) The Serotonin and Tachykinin Systems. In: Paxinos G (ed) *The Rat Nervous System*. Elsevier, San Diego, pp 1205-1256.

Horesh N, Amir M, Kedem P, Goldberger Y, Kotler M (1997) Life events in childhood, adolescence and adulthood and the relationship to panic disorder. *Acta Psychiatr Scand* 96: 373–378.

Ieraci A, Mallei A, Popoli M (2016) Social isolation stress induces anxious-depressive-like behavior and alterations of neuroplasticity-related genes in adult male mice. *Neural Plast*. 6212983.

Kendler KS, Neale MC, Kessler RC, Heath AC, Eaves LJ (1992) Childhood parental loss and adult psychopathology in women. A twin study perspective. *Arch Gen Psychiatry* 49: 109-116.

Ladd CO, Huot RL, Thiruvikraman KV, Nemeroff CB, Meaney MJ, Plotsky PM (2000) Long-term behavioral and neuroendocrine adaptations to adverse early experience. *Prog Brain Res* 122: 81-103.

Laine MA, Sokolowska E, Dudek M, Callan SA, Hyytiä P, Hovatta I (2017) Brain

activation induced by chronic psychosocial stress in mice. *Scientific Reports* 7 (1): 15061.

Maisonnette S, Morato S, Brandao ML (1993) Role of resocialization and of 5-HT_{1A} receptor activation on the anxiogenic effects induced by isolation in the elevated plus-maze test. *Physiol Behav.* 54: 753-758.

Maren S (2007) The threatened brain. *Science.* 317: 1043-1044.

Meng Q, Li N, Han X, Shao F, Wang W (2011) Effects of adolescent social isolation on the expression of brain-derived neurotrophic factors in the forebrain. *European Journal of Pharmacology* 650 (1): 229–232.

Milrod B, Leon AC, Shear MK (2004) Can interpersonal loss precipitate panic disorder? *Am J Psychiatry* 161: 758–759.

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.

Mongeau R, De Oca BM, Fanselow MS, Marsden CA (1998) Differential effects of neurokinin-1 receptor activation in subregions of the periaqueductal gray matter on conditional and unconditional fear behaviors in rats. *Behavioral Neuroscience* 112: 1125-1135.

Nashold Jr. BS, Wilson WP, Slaughter DG (1969) Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. *Journal of Neurosurgery* 30: 14-24.

Nashold Jr. BS, Wilson WP, Slaughter GS (1974) The midbrain and pain. In: Bonica JJ (ed) *International Symposium on Pain*. Raven Press, New York, pp 191-196.

Nemeroff CB, Owens MJ (2009) The role of serotonin in the pathophysiology of depression: as important as ever. *Clin.Chem.* 55: 1578-1579.

Nikulina EM, Marchand JE, Miczek KA and Kream RM (1997) *Soc Neurosci Abstr* 23, 126.

- Numan S, Seroogy KB (1999) Expression of trkB and trkC mRNAs by adult midbrain dopamine neurons: a double-label in situ hybridization study. *Journal of Comparative Neurology* 403: 295–308.
- Paxinos G, Watson C (2007) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, San Diego.
- Quintino-dos-Santos JW, Muller CJT, Bernabe CS, Rosa CA, Tufik S, Schenberg LC (2014) Evidence that the periaqueductal gray matter mediates the facilitation of panic-like reactions in neonatally-isolated adult rats. *Plos One* 9: 1-9.
- Rilke O, Jahkel M, Oehler J (1998) Dopaminergic parameters during social isolation in low- and high-active mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 60:499-505.
- Robbins TW (2016) Neurobehavioural sequelae of social deprivation in rodents revisited: Modelling social adversity for developmental neuropsychiatric disorders. *J Psychopharmacol.* 30: 1082-1089.
- Roberson-Nay R, Eaves LJ, Hettema JM, Kendler KS, Silberg JL (2012) Childhood separation anxiety disorder and adult onset panic attacks share a common genetic diathesis. *Depress.Anxiety.* 29: 320-327.
- Roy-Byrne PP, Geraci M, Uhde TW (1986) Life events and the onset of panic disorder. *Am J Psychiatry* 143: 1424–1427.
- Ruffle JK (2014) Molecular neurobiology of addiction: What's all the (D)FosB about? *Am J Drug Alcohol Abuse.* 40: 428-437.
- Rupniak NM, Carlson EC, Harrison T, Oates B, Seward E, Owen S, de FC, Hunt S, Wheeldon A (2000) Pharmacological blockade or genetic deletion of substance P (NK(1)) receptors attenuates neonatal vocalisation in guinea-pigs and mice. *Neuropharmacology.* 39: 1413-1421.
- Rupniak NM, Webb JK, Fisher A, Smith D, Boyce S (2003) The substance P (NK1) receptor antagonist L-760735 inhibits fear conditioning in gerbils. *Neuropharmacology.* 44: 516-523.

- Sargin D, Jeoung HS, Goodfellow NM, Lambe EK (2019) Serotonin Regulation of the Prefrontal Cortex: Cognitive Relevance and the Impact of Developmental Perturbation. *ACS Chemical Neuroscience* 10 (7): 3078–3093.
- Scaccianoce S, Del Bianco P, Paolone G, Caprioli D, Modafferi AM, Nencini P, Badiani A (2006) Social isolation selectively reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor without altering plasma corticosterone. *Behav Brain Res* 168: 323–325.
- Schenberg LC (2016) A neural systems approach to the study of respiratory-type panic disorder. In: Nardi AE, Freire RC (eds) *Panic Disorder*. Springer International, Basel, pp 9-77.
- Schenberg LC, Vasquez EC, da Costa MB (1993) Cardiac baroreflex dynamics during the defence reaction in freely moving rats. *Brain Research* 621: 50-58.
- Schenberg LC, Lovick TA (1995) Attenuation of the midbrain-evoked defense reaction by selective stimulation of medullary raphe neurons in rats. *American Journal of Physiology* 269: R1378-R1389.
- Schenberg LC, Bittencourt AS, Sudré EC, Vargas LC (2001) Modeling panic attacks. *Neurosci Biobehav Rev* 25: 647-659.
- Schenberg LC, Póvoa RMF, Costa AL, Caldellas AV, Tufik S, Bittencourt AS (2005) Functional specializations within the tectum defense systems of the rat. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 29: 1279-1298.
- Schenberg LC, Schimitel FG, Armini RS, Bernabe CS, Rosa CA, Tufik S, Muller CJ, Quintino-Dos-Santos JW (2014) Translational approach to studying panic disorder in rats: hits and misses. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 46: 472-496.
- Schiller L, Donix M, Jähkel M, Oehler J (2006a) Serotonin 1A and 2A receptor densities, neurochemical and behavioural characteristics in two closely related mice strains after long-term isolation. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 30: 492-503.
- Schiller L, Jähkel M, Kretzschmar M, Brust P, Oehler J (2003) Autoradiographic

analyses of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors after social isolation in mice. *Brain Research* 980: 169–178.

Schiller L, Jähkel M, Oehler J (2006b) The influence of sex and social isolation housing on pre- and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors. *Brain Res.* 1103 (1): 76-87.

Schimitel FG, de Almeida GM, Pitol DN, Armini RS, Tufik S, Schenberg LC (2012) Evidence of a suffocation alarm system within the periaqueductal gray matter of the rat. *Neuroscience*. 200: 59-73.

Schimitel FG, Muller CJ, Tufik S, Schenberg LC (2014) Evidence of a suffocation alarm system sensitive to clinically-effective treatments with the panicolytics clonazepam and fluoxetine. *Journal of Psychopharmacology* 28: 1184-1188.

Shigematsu N, Fukuda T, Yamamoto T, Nishioku T, Yamaguchi T, Himeno M, Yamamoto K (2008) Association of cathepsin E deficiency with the increased territorial aggressive response of mice. *Journal of Neurochemistry* 105 (4): 1394–1404.

Siuciak JA, Clark MS, Rind HB, Whittemore SR, *et al.* (1998) BDNF induction of tryptophan hydroxylase mRNA levels in the rat brain. *Journal of Neuroscience Research* 52: 149–158.

Siuciak JA, Lewis DR, Wiegand SJ, Lindsay RM (1997) Antidepressant-like effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *Pharmacol.Biochem. Behav.* 56:131-137.

Snedecor GW, Cochran WG (1980) *Statistical Methods*. The Iowa State University Press, Ames

Spatola CAM, Scaini S, Pesenti-Gritti P, Medland SE, Moruzzi S, Ogliari A, Battaglia M (2010) Gene-environment interactions in panic disorder and CO₂ sensitivity: Effects of events occurring early in life. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 156 (1): 79–88.

Spiacci A, Jr., de Oliveira ST, da Silva GS, Glass ML, Schenberg LC, Garcia-Cairasco N, Zangrossi H, Jr. (2015) Serotonin in the dorsal periaqueductal gray

inhibits panic-like defensive behaviors in rats exposed to acute hypoxia. *Neuroscience*. 307: 191-198.

Staples LG, McGregor IS, Hunt GE (2009) Long-lasting FosB/ Δ FosB immunoreactivity in the rat brain after repeated cat odor exposure. *Neuroscience Letters* 462: 157–161.

Stewart CA, Petrie RX, Balfour DJ, Matthews K, Reid IC (2004) Enhanced evoked responses after early adversity and repeated platform exposure: the neurobiology of vulnerability? *Biol Psychiatry* 55: 868-870.

Thorsell A, Slawecki CJ, Khoury A, Mathe AA, Ehlers CL (2005) Effect of social isolation on ethanol consumption and substance P/neurokinin expression in Wistar rats. *Alcohol* 36: 91–97.

Tovote P, Fadok JP, Luthi A (2015) Neuronal circuits for fear and anxiety. *Nat. Rev. Neurosci.* 16: 317-331.

Unger T, Rascher W, Schuster C, Pavlovitch R, Schomig A, Dietz R, Ganten D (1981) Central blood pressure effects of substance P and angiotensin II: role of the sympathetic nervous system and vasopressin. *Eur.J Pharmacol.* 71: 33-42

Vaz SH, Cristovao-Ferreira S, Ribeiro JA, Sebastiao AM (2008) Brain-derived neurotrophic factor inhibits GABA uptake by the rat hippocampal nerve terminals. *Brain Research* 1219: 19–25.

Vialou V, Robison AJ, LaPlant QC, Covington HE, Dietz DM, Ohnishi YN, Mouzon E, Rush AJ, Watts EL, Wallace DL, Iñiguez SD, Ohnishi YH, Steiner MA, Warren B, Krishnan V, Neve RL, Ghose S, Berton O, Tamminga CA, Nestler EJ (2010) Δ FosB in brain reward circuits mediates resilience to stress and antidepressant responses. *Nat. Neurosci.* 13: 745–752.

Yan Q, Radeke MJ, Matheson CR, Talvenheimo J, *et al.* (1997) Immunocytochemical localization of TrkB in the central nervous system of the adult rat. *Journal of Comparative Neurology* 378: 135–157.

Zaletel I, Filipović D, Puškaš N (2017) Hippocampal BDNF in physiological conditions

and social isolation. *Rev Neurosci.* 28 (6): 675-92.

6. APÊNDICES

Apêndice A – Protocolo de dosagem de serotonina na HPLC



Universidade Federal do Espírito Santo
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia
Laboratório de Neurobiologia dos Transtornos do Humor e da Ansiedade

Protocolo de dosagem de Serotonina

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – HPLC

➤ PREPARO DOS REAGENTES PARA ANÁLISE:

FASE MÓVEL:

- Pesar **10,5g de ácido cítrico mono hidratado** (0,194 M), **8,3 g de acetato de sódio tri hidratado** (0,243 M) e **0,0275 g de EDTA** ($2,95 \times 10^{-4} \text{M}$) e dissolver em **250 mL** de água milli-Q (no balão volumétrico). Homogeneizar em agitador magnético e sonicar por 2 minutos. Aferir para **pH 4,0**;
- Adicionar **45 mL de metanol** e completar ao volume de **500 mL** com água milli-Q (balão volumétrico);
- Após a preparação da fase móvel, a mesma deve ser filtrada a vácuo e desgazeificada em ultrassom por 20 minutos;
- Preparar no dia do uso;
- 500 mL de fase móvel são suficientes para aproximadamente 15 amostras (1 dia de análise).

REAGENTES PARA O PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS:

→ **Ácido Perclórico 0,1 M**

- Mistura-se **86µL de HClO₄** em água q. s. p. 10mL;
- OBS: é bom fazer mais (1000 ml) porque o usa-se também para fazer os padrões (8,58 ml do ác. 70% diluído em 1000 ml de água MilliQ).

→ **Metabissulfito de sódio 0,4mM**

- Dissolver **0,0076g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$** em água q. s. p. 100mL

→ **EDTA 0,1mM**

- Dissolver **0,00074g de EDTA diidratado** em água q. s. p. 20MI

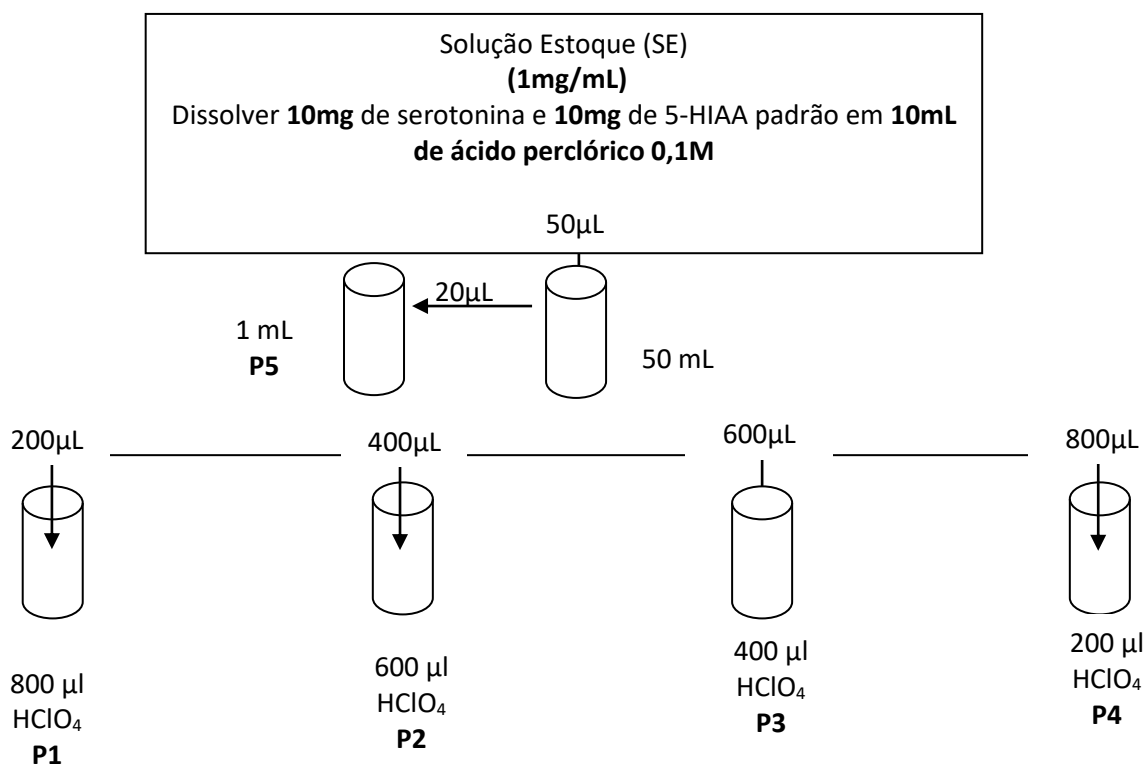
➤ **CURVA DE CALIBRAÇÃO – SEROTONINA E 5-HIAA**

SOLUÇÕES PADRÃO

- SE: Pesar 10 (ou 1) mg de serotonina e 10 (ou 1) mg de 5HIAA e dissolver cuidadosamente em ácido perclórico 0,1M 10 mL (1mg/mL) (em um béquer de ± 50 ml);
- SE': Aliquotar 50 μL e diluir em ácido perclórico 0,1M q. s. p. 50 mL (homogeneizar muito bem);
- Em seguida 20 μL (ou 200 μl) da solução anterior em ácido perclórico 0,1M q. s. p. 1 ml (ou 10 mL);

OBS: na pipeta colocar 980 μl de ácido (se for usar 1 ml) (homogeneizar muito bem);

- Fazer diluição seriada de P5 em ácido perclórico 0,1M q. s. p. 1 mL.



OBS: fazer vários *ependorfs* de P5, ou seja, colocar 980 μl de ácido nos

ependorfs e depois colocar 20 µl do SE' em cada. É sempre bom ter P5 como reserva!

OBS': quando for fazer a diluição seriada, primeiro colocar o ácido em todos os *ependorfs* e depois adicionar o P5, assim diminui os erros.

Concentrações finais:

P₅ (0,02 ng/ µl)

P₄ (0,016 ng/µl)

P₃ (0,012 ng/µl)

P₂ (0,008 ng/µl)

P₁ (0,004 ng/µl)

*Cálculos feitos à partir de $C_1V_1 = C_2V_2$, lembrando sempre das unidades: 1L = 10³ mL = 10⁶ µl = 10⁹ nmol

Ex: 0,02ng/ µl x V = 0,016ng/ µl x 1000 µl = 800 µl de P₅ em P₄ (+ os 200 de HClO₄)

Algumas considerações:

- A concentração de P₁ tem que ser menor do que o valor mínimo da minha amostra e a concentração de P₅ tem que ser maior do que o valor máximo da minha amostra.
- Injetar na HPLC: 200 µl (com a seringa de vidro) em triplicata de cada padrão (P₅ a P₁)
- É bom começar por P₁. Caso for iniciar injetando P₅, lavar bem a coluna entre uma corrida e outra, pois o P₅ é o mais concentrado.
- A concentração pode ser calculada pela área ou pela altura do pico da substância.

➤ PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS:

- Preparar as soluções de **HClO₄ 0,1M**; **NA₂S₂O₅ 0,4mM** e **EDTA 0,1Mm**

**Ver preparo dos reagentes*

- Adicionar as três soluções acima às amostras de tecido na proporção exemplificada na tabela (se o peso da amostra for próximo de 20,0 mg usar o exemplo 01. Se o peso da amostra for próximo de 5,0 mg usar o exemplo 02)

:

-

	TECIDO	HClO₄	EDTA	NA₂S₂O₅	VOL. TOTAL
Ex. 01	20 mg	980 µL	10 µL	10 µL	1000 µL
Ex. 02	5 mg	290 µL	5 µL	5 µL	300 µL

- Homogeneizar cada amostra de tecido pesada com solução de homogeneização na proporção em tubo Potter 4 a 5x com intervalos de 3s.

Este processo deve ser realizado por meio do homogeneizador automático em gelo

Não esquecer de lavar o homogeneizador e a pinça entre cada amostra (ter ao lado água destilada).

- Centrifugar as amostras, já homogeneizadas, por **30 minutos** em temperatura aproximada de **4° C** e a uma velocidade de **10. 000 rpm**.
- Após o processamento na centrífuga, retirar cuidadosamente o **sobrenadante** e acondicioná-lo no gelo e em abrigo de luz.
- Injetar na HPLC 200 µl do sobrenadante com a seringa Hamilton.

Apêndice B – Protocolo de extração de RNA



Universidade Federal do Espírito Santo
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia
Laboratório de Neurobiologia Molecular e Comportamental

Protocolo de extração de RNA Método Trizol (T9424, Sigma-Aldrich, EUA)

➤ Preparo do ambiente:

1. Limpar a superfície da cabine de esterilização UV e os objetos utilizados com álcool 70% e posteriormente com RNase ZAP;
2. Ligar Exaustão e UV por aproximadamente 20 min;
3. Retirar o pistilo (do homogeneizador) da água DEPC (0,1%) e limpar com RNase ZAP;
4. Ligar a centrifuga refrigerada (4°C);

➤ Procedimento de extração:

1. Adicionar 500uL de Trizol ao tubo contendo amostra;
2. Deixar a amostra com Trizol no gelo durante 10 min;
3. Homogeneizar (com pistilo) no tubo *ependorf* por aproximadamente 30s;
4. Deixar 10 min no gelo;
5. Homogeneizar manualmente por 15s;
6. Centrifugar a 12. 000 G por 10 minutos a 4°C;
7. Transferir o sobrenadante para um tubo limpo (*ependorf* de 1,5 mL);
8. Adicionar 200uL de clorofórmio PA no sobrenadante;
9. Agitar manualmente por 15 seg e deixar 5 min à temperatura ambiente;
10. Centrifugar a 12. 000 G por 15 min a 4°C;
11. Transferir a fase aquosa para um tubo limpo (*ependorf* de 1,5 mL);
12. Adicionar 500uL de 2-propanol PA (na fase transparente) e homogeneizar suavemente;
13. Deixar 5 min à temperatura ambiente;
14. Centrifugar a 12. 000 G por 10 min a 4°C;

15. Remover e descartar o sobrenadante;
16. Adicionar ao pellet 1 mL de etanol 75% (gelado);
17. Vortex por 15 seg;
18. Centrifugar a 8.000 G por 5 minutos a 4°C;
19. Remover o etanol;
20. Dar um spin de 15seg na centrífuga para concentrar o restante de etanol no fundo do tubo;
21. Retirar o restante de etanol e deixar secar os tubos inclinados para baixo;
22. Adicionar 15 uL de água tratada com DEPC (0,1%) para ressuspensão;
23. Colocar os tubos no banho seco 60°C durante 15 min;
24. Homogeneizar com a pipeta e retirar uma alíquota de 4uL para ser utilizada na eletroforese;
25. A concentração do RNA foi verificada por espectrometria (260/280 nm) num equipamento NanoDrop™;
26. Armazenar em freezer a -80°C.

Preparo de H₂O DEPC

Para 0,1%:

Diluir 10 mL de água MilliQ para 1 uL de DEPC (dietil pirocarbonato, Sigma-Aldrich).

Homogeneizar, aguardar 24 horas e autoclavar em seguida.

Apêndice C – Protocolo de eletroforese de RNA em gel de agarose desnaturante



Universidade Federal do Espírito Santo
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia
Laboratório de Neurobiologia Molecular e Comportamental

Protocolo de eletroforese de RNA em gel de agarose desnaturante

- 1 Ligar o banho-maria (ou banho-seco) à 80°C e limpar todo o aparato de eletroforese com RNase ZAP;
- 2 Preparar o gel de agarose:
 Pesar 0,5 g de agarose, dissolver em 36 ml de água tratada com DEPC (0,1%);
 Levá-lo ao microondas de 10 em 10 segundos até dissolver completamente;
 Aguardar esfriar um pouco e adicionar 5 ml de tampão 10X MOPS e 9 ml de formaldeído PA;
 Verter sobre o aparato e encaixar o pente.
- 3 Diluir tampão 10X MOPS para 1X.
 Adicionar 25 ml de 10X MOPS a uma proveta e completar com água tratada com DEPC (0,1%) para 250 ml.
- 4 Após completa polimerização do gel, posicioná-lo na cuba e adicionar o tampão 1X MOPS até submergir totalmente o gel;
- 5 Fazer uma corrida prévia (sem as amostras) por 5 minutos a 50V;
- 6 Preparar as amostras:
 Adicionar a cada tubo:

10X MOPS	2µl
Formaldeído	4 µl
Formamida	10 µl
Brometo de etídeo	1 ou 0,5 µl
Amostra	

Obs: adicionar 16,5 µl do Mix acima em cada tubo com a amostra.

- 7 Dar um spin de 15 seg nas amostras na centrífuga;
- 8 Incubar as amostras em banho-maria (ou banho-seco) a 80°C por 10 min;
- 9 Resfriar no gelo;
- 10 Dar outro spin de 15s na centrífuga;
- 11 Adicionar 2 µl de 10X *formaldehyde loading buffer* em cada tubo homogeneizando com a pipeta;
- 12 Aplicar as amostras no gel;
- 13 Correr a 80 V por aproximadamente 1:30 h;
- 14 Ao final da corrida, desligar a fonte e levar o gel ao transluminador UV (302 nm) para observar as bandas.

Obs: Descartar o gel no isopor localizado abaixo da cabine e limpar o transluminador
Obs: SEMPRE usar LUVAS ao manusear o gel e o transluminador.

Solução Tampão MOPS (para eletroforese)

0,2 M MOPS (ácido 3-[N-morfolino]propanosulfônico; pH 7,0)
20 mM acetato de sódio
10 mM EDTA dissódico (pH 8,0)

Dissolver 41,8 g de MOPS em 700 mL de H₂O DEPC estéril. Ajustar o pH para 7,0 com NaOH 2 N. Adicionar 20 mL de 1 M de acetato de sódio tratado com H₂O DEPC e 20 mL de EDTA 0,5 M tratado com H₂O DEPC (pH 8,0). Ajustar o volume com H₂O DEPC para 1 L. Esterilizar a solução por filtração com filtro Millipore de 0,45 µm e armazenar em recipiente protegido de luz. O tampão amarela com o tempo se for exposto à luz ou se for autoclavado.

Obs: O EDTA é muito difícil de solubilizar. Recomenda-se fazer a solução no tubo Falcon e analisar o pH concomitante à dissolução.

Apêndice D - Protocolo de síntese de cDNA (rt-PCR)



Universidade Federal do Espírito Santo
 Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia
 Laboratório de Neurobiologia Molecular e Comportamental

Protocolo de síntese de cDNA (rt-PCR) Kit iScript cDNA Synthesis (#1708891, BioRad, CA, EUA)

Adicionar a um tubo Strip (0,5mL) limpo e autoclavado:

5x iScript reaction mix	4 μ l / 8 μ l
iScript reverse transcriptase	1 μ l / 2 μ l
RNA	1 μ g / 2 μ g (calcular volume)
Água mili-Q tratada com DEPC	X μ l (completar para 40 μ L)

Levar as amostras ao Termociclador e programar a reação:

5 min. a 25°C (anelamento);

30 min. a 42°C (transcrição reversa);

5 min. a 85°C (inativação da transcriptase reversa)

Hold a 4°C (essa função