

MATHEUS FITIPALDI BATISTELA

**ATIVAÇÃO SEROTONÉRGICA E NÃO-SEROTONÉRGICA NOS
NÚCLEOS MEDIANO E DORSAL DA RAFE, NAS DIFERENTES
FASES DO CICLO ESTRAL DE RATAS E APÓS OVARIECTOMIA**

ASSIS

2018

MATHEUS FITIPALDI BATISTELA

**ATIVAÇÃO SEROTONÉRGICA E NÃO-SEROTONÉRGICA NOS
NÚCLEOS MEDIANO E DORSAL DA RAFE, NAS DIFERENTES
FASES DO CICLO ESTRAL DE RATAS E APÓS OVARIECTOMIA**

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual Paulista
(UNESP), Faculdade de Ciências e
Letras, Assis, para a obtenção do título
de Mestre em Biociências (Área de
Conhecimento: Caracterização e
Aplicação da Diversidade Biológica)

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Telma
Gonçalves Carneiro Spera de Andrade

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Isabel
Cristina Cherici Camargo

Bolsista: CAPES

ASSIS

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca da F.C.L. – Assis – Unesp

B326e Batistela, Matheus Fitipaldi
Ativação serotoninérgica e não-serotoninérgica nos núcleos
mediano e dorsal da rafe, nas diferentes fases do ciclo estral de
ratas e após ovariectomia/ Matheus Fitipaldi Batistela Assis,
2018.
88 f. : il.

Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual Paulista
(UNESP), Faculdade de Ciências e Letras, Assis
Orientador: Dr^a Telma Gonçalves C.Spera de Andrade

1. Ansiedade. 2. Neurônios. 3. Fêmea. 4. Estrógeno. 5. Ci-
clo estral.

CDD 612.8

Matheus Fitipaldi Batistela

ENVOLVIMENTO DE DIFERENTES SUB-POPULAÇÕES DE NEURÔNIOS
SEROTONÉRGICOS E NÃO-SEROTONÉRGICOS NOS NÚCLEOS
MEDIANO E DORSAL DA RAFE, EM RATAS OVARECTOMIZADAS E NAS
DIFERENTES FASES DO CICLO ESTRAL

Dissertação apresentada à Universidade Estadual
Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras,
Assis, para obtenção do título de Mestrado
Acadêmico em BIOCÊNCIAS.
(Área de Conhecimento: Caracterização e
Aplicação da Diversidade Biológica)

Data da Aprovação: 07/03/2018

COMISSÃO EXAMINADORA



PRESIDENTE: PROFA. DRA. Telma Gonçalves Carneiro Spera de Andrade - UNESP/ASSIS



MEMBROS. PROFA. DRA. Miriam Mendonça Morato de Andrade - UNESP/ASSIS

PROF. DR. Rafael Carvalho Almada - USP/RIBEIRÃO PRETO

DEDICATÓRIA

Dedico

*À minha orientadora, mãe e amiga,
Telma, por toda a confiança e por
acreditar em mim, mesmo quando eu
mesmo não acreditava.*

Amo você

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me sustentado até aqui e por me abençoar grandemente em cada passo que dei e me amparar nos momentos mais difíceis.

Agradeço aos meus pais, Sydney e Regina, que são minha fonte de inspiração e de amor incondicional. Por tudo que vocês deixaram de ter ou de fazer para que os meus sonhos fossem realizados, por cada bronca, por cada briga, por cada gesto de carinho...eu amo vocês mais que a mim mesmo! Vocês são os melhores do mundo!

À minha irmã, Giovana, que desde que nasci tem cuidado de mim e tem sido excepcional. Sei que temos nossos momentos de desafetos e às vezes até você pode não me compreender, mas o amor que sinto por você é gigantesco e sem seu apoio, não vivo.

Agradeço igualmente a todas as outras pessoas da minha família pelo suporte emocional e por tanto carinho proporcionado.

Aos meus amigos que me acompanharam em toda essa jornada: Kroko, Macu, Ugolavo, Mari, Ana, Contreras, Lia, Carina, Fabi, Joyce, Sapucci, Lana, entre outros tantos. Vocês foram essenciais para o meu crescimento como pessoa e como amigo. De alguma forma, guardo um pouquinho de vocês dentro de mim, com muita alegria! Amo muito cada um de vocês!

Aos amigos de ensino médio que até hoje fazem parte do meu dia: Ana Clara, Dri, Andressa, Vitor, Cary...obrigado por tantos anos de amizade que permaneçam!

Agradeço aos membros da banca de qualificação e defesa por contribuírem de maneira excepcional para o desenvolvimento do projeto.

Aos meus colegas de Pós-Graduação, especialmente a Celine e a Hellen, que são duas pessoas maravilhosas que tive o prazer de estar ao lado. Não tenho dúvidas que serão duas mestras incríveis!

Aos colegas de laboratório, aos quais pude estar ao lado nesses cinco anos: Rafut, Amarylis, Yara, João, Luiz, Vinicius, Ariela, Mariane, Hiago, Maria Eulália, Jô, Victor, Luana, Isa, Diego, Rafael, Moisés e especialmente a Marina, Sérgio e a Camila Roncon, que me ajudaram imensamente e contribuíram para a realização do projeto. Sem vocês nada disso seria possível, muito obrigado!!

Agradeço à Flaviane, que é uma amiga maravilhosa, e que me ensinou muita coisa do que hoje eu sei. Sua dedicação, seu conhecimento, sua maneira doce e carinhosa de ser são notáveis. Foi uma honra conhecê-la e poder trabalhar com você! Aprendi muito e a tenho como um espelho, chefe!

Agradeço ao pessoal de Ribeirão Preto, o Professor Dr. Hélio Zangrossi pela parceria, ao Dr. Ailton Spiacci pelo conhecimento transmitido e pela ajuda em todo o procedimento para realização do projeto, à Alana e Helô, duas pessoas incríveis e maravilhosas que me ajudaram imensamente em todo o percurso e que são/serão duas incríveis colegas de laboratório! Ao técnico Afonso, pelas ajudas imensuráveis! Vocês são incríveis.

À Paloma, minha amiga, irmã, tata, sem você meus dias não teriam sido incríveis como foram. Mesmo pensando em desistir de tudo, sempre permaneceu ao meu lado, me ajudando com seus conselhos! O meu amor é seu e o seu é meu, você foi o melhor presente que Deus pôde me dar e eu sou muito grato todos os dias pela sua amizade! Tu sei il mio regalo più grande, te amo!

Agradeço a professora Isabel Camargo, por toda ajuda e por ter cedido o seu laboratório para que eu pudesse realizar parte dos experimentos, muito obrigado!

Aos professores da Faculdade de Ciências e Letras de Assis, por todo conhecimento transmitido e por colaborarem de maneira grandiosa para a minha formação! E também aos funcionários da instituição, que mesmo de maneira indireta puderam contribuir valorosamente para eu chegar onde estou. Meu muito obrigado a cada um de vocês.

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado, fundamental para a completa dedicação e execução do presente projeto.

E por fim, mas não menos importante, agradeço a minha orientadora professora Dr. Telma, por toda orientação, ensinamentos e apoio nesses cinco anos que estamos juntos. Já não a vejo mais como apenas uma orientadora, mas também como uma amiga, uma mãe. Uma pessoa que me apoiou nos momentos mais difíceis e que com seu jeito maravilhoso e alegre de ser, me trouxe muita felicidade ao longo dessa caminhada. Sem você, talvez hoje eu nem estivesse onde estou. Sou muito grato por todas as oportunidades e por cada momento que passei junto a você. Amo muito você!

BATISTELA, Matheus Fitipaldi. **Ativação serotoninérgica e não-serotoninérgica nos núcleos mediano e dorsal da rafe, nas diferentes fases do ciclo estral de ratas e após ovariectomia.** 2018. 87 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras, Assis, 2018.

RESUMO

Deakin e Graeff propuseram que ansiedade e o pânico seriam regulados pela serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT), possuindo mais de um mecanismo de controle. Ambos os mecanismos têm sua origem nos núcleos Dorsal da Rafe (NDR) e Mediano da Rafe (NMR). O NDR possui ainda, cinco diferentes subnúcleos ao longo do eixo rostrocaudal: dorsal (DRD), ventral (DRV), lateral/asas laterais (lwDR), caudal (DRC) e interfascicular (DRI), sendo que os subnúcleos DRC, DRD e DRI originam a via modulatória do transtorno de ansiedade generalizada e o subnúcleo lwDR origina a via modulatória do transtorno do pânico. Sabe-se que as mulheres são mais suscetíveis à manifestação dos transtornos de ansiedade e de pânico do que os homens. Estudos com modelos animais de ansiedade mostram que nas fases do ciclo hormonal onde ocorre maior liberação de estrógeno, proestro e estro, é constatada ansiólise. De maneira oposta em animais na fase de metaestro e diestro, nas quais há baixa concentração sérica de estradiol, os comportamentos defensivos observados apontam para o aumento da ansiedade. Receptores para estrógeno, alfa ($ER\alpha$) e beta ($ER\beta$), foram encontrados em estruturas encefálicas descritas por Deakin e Graeff como relacionadas com a manifestação dos transtornos de ansiedade e co-localizadas em receptores serotoninérgicos. Assim, esse estudo teve por objetivo avaliar a expressão de neurônios serotoninérgicos e não-serotoninérgicos no NMR e nos diferentes subnúcleos do NDR em relação a fase do ciclo estral de ratas e após a ovariectomia bilateral. As fêmeas foram perfundidas e os encéfalos foram processados a fim de se realizar o processo de imunohistoquímica de dupla-marcação para a proteína c-Fos (marcador indireto de ativação celular) e da enzima triptofano hidroxilase (TPH – presente somente em neurônios serotoninérgicos). Não se constatou qualquer diferença quando se analisou o NMR. Os resultados encontrados mostraram um maior número de neurônios serotoninérgicos e não-serotoninérgicos ativados na fase de proestro, principalmente nos subnúcleos Dorsal (DRD) e Caudal (DRC). Enquanto que na fase de diestro e após ovariectomia bilateral os resultados apontaram um menor número na expressão de TPH nos subnúcleos DRD, Ventral (DRV) e DRC. Os resultados encontrados são compatíveis com achados anteriores que indicam que os subnúcleos dorsal e caudal são responsáveis pela modulação de comportamentos defensivos relacionados à ansiedade. Como houve diferença na ativação das estruturas ao longo do ciclo estral conclui-se que a presença de hormônios sexuais, principalmente o estradiol, é responsável por essas alterações observadas.

Palavras-chave: Ansiedade. Fêmeas. Neurônios. Núcleo Dorsal da Rafe. Núcleo Mediano da Rafe. Estrógeno. Ciclo Estral. Imunohistoquímica. c-Fos. Triptofano Hidroxilase.

BATISTELA, Matheus Fitipaldi. **Serotonergic and non-serotonergic activation in the median and dorsal raphe nuclei, in the different phases of the estral rat cycle and after ovariectomy**. 2018. 87 p. Dissertation (Master in Biosciences) – São Paulo State University (UNESP), School of Sciences, Humanities and Languages, Assis, 2018.

ABSTRACT

Deakin and Graeff proposed that anxiety and panic would be regulated by serotonin or 5-hydroxytryptamine (5-HT), having more than one control mechanism. Both mechanisms have their origin in Dorsal Raphe Nucleus (DRN) and Median Raphe Nucleus (MRN). The DRN also has five sub-regions along the rostrocaudal axis: dorsal (DRD), ventral (DRV), lateral / lateral wings (lwDR), caudal (DRC) and interfascicular (DRI), being that the DRC, DRD and DRI subnuclei originate the modulatory pathway of generalized anxiety disorder and the subnucleus lwDR originates the modulatory pathway of panic disorder. It is known that women are more susceptible to the manifestation of anxiety and panic disorders than men. Studies with animal models of anxiety show that in the phases of the hormonal cycle where estrogen release occurs, like proestrus and estrus, anxiolysis is observed. On the other hand, animals in the metaestrus and diestrus phase, in which there is a low concentration of estradiol, the observed defensive behaviors point to an increase in anxiety. Receptors for estrogen, alpha ($ER\alpha$) and beta ($ER\beta$) were found in structures described by Deakin and Graeff as related to a manifestation of anxiety disorders and co-localized in serotonergic receptors. Thus, this study aimed to evaluate the expression of serotonergic and non-serotonergic neurons in the MRN and in the different DRN subnuclei in relation to the phases of estrus cycle of rats and after a bilateral ovariectomy. The females were perfused and the brains were processed in order to perform the double-label immunohistochemistry process for c-Fos protein (cellular activation indirect marker) and tryptophan hydroxylase (TPH - present only in serotonergic neurons). No difference was found when MRN was analyzed. The results showed a higher number of serotonergic and non-serotonergic neurons activated in the proestrus phase, mainly in the Dorsal (DRD) and Caudal (DRC) subnuclei. While in the late diestrus phase and after bilateral ovariectomy the results indicated a lower number of TPH expression in the sub-nuclei DRD, Ventral (DRV) and DRC. The results are compatible with previous findings that have shown the responsible of dorsal and caudal subnuclei in the modulation of defensive behaviors related to anxiety. As there was a difference in the activation of the structures during the estrus cycle it was concluded that the presence of sex hormones, mainly estradiol, is responsible for these observed changes.

KEYWORDS: Anxiety. Females. Neurons. Dorsal Raphe Nucleus. Median Raphe Nucleus. Estrogen. Estral Cycle. Immunohistochemistry. c-Fos. Tryptophan Hydroxylase

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC - Complexo Avidina-Biotina
BSA - Albumina Sérica Bovina
BZD – Benzodiazepínico
DAB - 3,3-diaminobenzidina
DRC – Subnúcleo Caudal do Núcleo Dorsal da Rafe
DRD – Subnúcleo Dorsal do Núcleo Dorsal da Rafe
DRI – Subnúcleo Interfascicular do Núcleo Dorsal da Rafe
DRV – Subnúcleo Ventral do Núcleo Dorsal da Rafe
DSM – Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, ou Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais
EC – Estímulo Condicionado
EI – Estímulo Incondicionado
ER α – Receptor de Estrógeno Alfa
ER β – Receptor de Estrógeno Beta
FG-7142 – N-methyl-beta-carboline-3-carboxamide
FSH – Hormônio Folículo Estimulante
GABA – Ácido Gama-AminoButírico
GnRH – Hormônio Liberador de Gonadotrofinas
HHG – Eixo Hipotálamo-Hipófise-Gônadas
IgG - Imunoglobulina G
ISRS – Inibidor Seletivo de Recaptação de Serotonina
LCE – Labirinto em Cruz Elevado
LH – Hormônio Luteinizante
LTE – Labirinto em T Elevado
LWDR – Asas Laterais do Núcleo Dorsal da Rafe
mCPP - m-chlorophenyl piperazine
NDR – Núcleo Dorsal da Rafe
NMR – Núcleo Mediano da Rafe
OMS – Organização Mundial da Saúde
PB – Solução Tampão Fosfato
PBS – Solução Salina Tamponada
PFA – Paraformaldeído

PVPI – PoliVinilPirrolidona-Iodo

RI – Resposta Incondicionada

SCP – Substância Cinzenta Periaquedutal

SCPd – Substância Cinzenta Periaquedutal dorsal

TAG – Transtorno de Ansiedade Generalizada

TAS – Transtorno de Ansiedade Social

TEP – Teste de Evitação Passiva

TLCEED – Teste do Labirinto em Cruz Elevado de Evasão discriminatória

TP – Transtorno do Pânico

TPH – Triptofano Hidroxilase

5-HT – 5-hidroxitriptamina ou Serotonina

5,7-DHT – 5,7-dihydroxytryptamine

8-OH-DPAT – 8-hydroxy-2(di-n-propylamino) tetralin

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
REFERÊNCIAS	31
ARTIGO - Ativação serotonérgica e não-serotonérgica nos núcleos mediano e dorsal da rafe, nas diferentes fases do ciclo estral de ratas e após ovariectomia	42
Resumo	43
Introdução	44
Materiais e Métodos	49
Animais	49
Cirurgias	50
Histologia	51
Imunohistoquímica – Dupla-marcação (c-Fos e TPH)	52
Análise e quantificação neuronal	53
Análise Estatística	54
Resultados	55
Núcleo Mediano da Rafe	55
Núcleo Dorsal da Rafe	56
Eixo Rostral	56
Eixo Médio-Rostral	57
Eixo Médio-Caudal	60
Eixo Caudal	63
Discussão	68
Núcleo Mediano da Rafe	68
Núcleo Dorsal da Rafe	70
Subnúcleos Dorsal, Caudal e Interfascicular	70
Subnúcleos Ventral e Asas Laterais	72
Conclusões	75
Referências	75

ANEXO I – Normas da Revista Plos One	82
---	----

ANEXO II – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).....	87
--	----

INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), entre 1990 e 2013 houve um aumento de aproximadamente 50% no número de pessoas com transtornos de ansiedade, passando de 416 para 615 milhões de pessoas afetadas por todo o globo, sendo quase 10% do mundo acometido por essas desordens (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

No Brasil este quadro não é muito diferente da realidade mundial, sendo que nas grandes metrópoles como São Paulo, Rio de Janeiro, Fortaleza e Porto Alegre os dados apontaram uma grande concentração de pessoas com transtornos mentais, principalmente em cuidados primários de saúde (GONÇALVES et al., 2014). Andrade e colaboradores (2012) realizaram um estudo mais específico na região da grande São Paulo apontando haver uma prevalência muito grande e comum dos transtornos de ansiedade (19,9%). A exposição ao crime e a alta urbanização em que os habitantes vivem, contribuem significativamente para a corroboração dos dados encontrados. Neste mesmo estudo, os dados atestam que pessoas migrantes possuem uma menor porcentagem da manifestação desses distúrbios em relação aos residentes estáveis.

A ansiedade é uma parte normal da experiência humana, sendo caracterizada como um estado emocional subjetivo com sensação de tensão ou apreensão, vindo acompanhada de diversas alterações, estas podendo ser comportamentais, fisiológicas ou cognitivas (BRANDÃO, 2012; GRAEFF, 2014). Porém a ansiedade excessiva ou inapropriada pode se tornar uma doença (GROSS E HEN, 2004). Assim, vê-se a necessidade premente de se realizar novos estudos sobre o tema na busca de alternativas profiláticas e terapêuticas.

Segundo Graeff (2007), a ansiedade, o medo e o pânico são emoções relacionadas à presença de uma ameaça. Tanto o medo quanto a ansiedade teriam a função de preparar o indivíduo para enfrentar situações de perigo, evocando no mesmo, comportamentos defensivos (VIANA, 2010). Alguns trabalhos comportamentais realizados demonstraram que frente a um estímulo de ameaça, os animais podem expressar padrões distintos de comportamento,

tais como: avaliação de risco, esquiva, imobilidade, fuga, ataque defensivo (ADAMS, 2006; BLANCHARD E BLANCHARD 2008). O padrão da resposta adotada pelo animal depende do nível de ameaça apresentado pelo estímulo.

De acordo com Blanchard e Blanchard (1988), a ansiedade está relacionada a um comportamento de avaliação de risco, evocado em situações em que o perigo não é real (ameaça potencial), ou em que haja um contexto novo ou quando o estímulo do perigo tenha ocorrido no passado, mas não deixou de ser real. Já o medo se relaciona a uma estratégia defensiva que ocorre em resposta a um perigo real (neste caso, a ameaça está presente). Por fim, o pânico corresponde a uma reação muito forte de fuga evocada por um perigo muito próximo (ou se aproximando). Gray e McNaughton (2000) complementam a visão do casal Blanchard, relatando que para a ansiedade ocorrer, é necessário haver um estímulo que se assemelhe ao de perigo, gerando um conflito entre aproximação e evitação. O medo é expresso quando somente existe a motivação para evitação ou fuga.

Nessas circunstâncias, é perceptível que a ansiedade é essencial para a sobrevivência dos indivíduos, uma vez que alerta para um perigo que pode acontecer. A ansiedade se tornaria patológica quando desproporcional ao estímulo ou à situação que a desencadeia, ou quando não existe motivo específico para o seu aparecimento (ANDRADE E GORENSTEIN, 1998; CORREIA E LINHARES, 2007), ou ainda, quando é uma resposta inadequada à determinada ameaça, em virtude de sua intensidade ou duração (CORREIA E LINHARES, 2007; KAPLAN et al., 2007). E é nessa ansiedade patológica que se enquadram os transtornos de ansiedade, nos quais os sentimentos de preocupação persistem e podem piorar com o tempo, interferindo no trabalho, rendimento escolar e relacionamentos interpessoais.

Descrições dos transtornos de ansiedade começaram a ser feitas desde muito tempo, na Grécia antiga. Hipócrates (460 a.C a 370 a.C) descreveu em alguns de seus diversos textos sobre Nicanor e sua fobia: “Nicanor quando foi a uma festa de bebidas teve medo da garota da flauta. Sempre que ouvia o som da flauta começar a tocar em um simpósio durante a noite, massas de terrores se erguiam, o que não acontecia de dia. Tais sintomas persistiram por

um longo período de tempo” (CROCCQ, 2015). Hipócrates também discriminava sistematicamente mania, melancolia e a paranóia (CAMPOS et al., 2010).

Charles Darwin (1809 - 1882) em seu livro “*A expressão das emoções no homem e nos animais*” (1872), escreve que a expressão da emoção em humanos e em outros mamíferos é evolutivamente preservada durante as gerações, ou seja, somos resultados da adaptação dos processos comportamentais e psicológicos no decorrer dos séculos por uma questão de sobrevivência, contribuindo assim, para uma melhor perspectiva sobre ansiedade (CAMPOS et al., 2013; DARWIN, 1998).

Os aspectos clínicos dos transtornos de ansiedade só começaram a ser considerados quando George Miller Beard em 1869 descreveu pacientes com graus menores de transtorno de ansiedade e depressivos leves com o termo “Neurastenia”. Neste termo eram inclusos pacientes que apresentavam hipocondria, histeria, obsessões e ansiedade, os quais eram tratados com eletroterapia e tendo um resultado eficaz, segundo o critério de Beard, não possuindo mais qualquer um desses comportamentos (VIANA, 2010).

Ivan Pavlov (1849 - 1936) foi um fisiologista que também colaborou com a compreensão atual dos transtornos de ansiedade. Diversas tentativas de desenvolver modelos animais de “neurose” foram realizadas após sua descoberta com cães que tinham dificuldade na discriminação entre estímulos excitatórios e inibitórios gerando nos mesmos uma agitação frenética e até as vezes o sono. Estudos comportamentais posteriores levaram à teoria da aprendizagem, que sustenta que a ansiedade é a parte condicionada do medo, servindo como um impulso secundário. Mowrer (1907 – 1982) formulou um modelo que pudesse corroborar com as ideias de Pavlov. Nesse modelo, um estímulo incondicionado (EI), como o choque, causa respostas incondicionadas (RI), por exemplo, medo, que leva a um comportamento de fuga. A diminuição do medo, produzida pela fuga bem-sucedida, reforça este comportamento. Os estímulos que precedem regularmente os EI se tornam estímulos condicionados (EC), que servem como sinais da próxima EI / RI, causando uma resposta condicionada de ansiedade (KLEIN, 2002).

Em 1895, Sigmund Freud separou a neurastenia de “neurose de angústia” e as fobias das obsessões, colocando-as mais próximo da neurose de angústia. Para ele, os conflitos intrapsíquicos gerariam a ansiedade, que seria a base de todas as neuroses. Freud dividia ainda, em duas formas de ansiedade: a crônica, que hoje é denominada transtorno da ansiedade generalizada (TAG), caracterizada por ele como preocupação excessiva e medo, a qual acreditava ter causas psicológicas com origem em um pensamento ou desejo reprimido; e a outra, a ansiedade aguda, atualmente denominada transtorno do pânico (TP), caracterizada por sensações catastróficas e sensações subjetivas de terror, que Freud considerava ser resultado de impulsos sexuais perturbados, resistentes à psicoterapia. (BRANDÃO E GRAEFF, 2014; GABBARD, 2016; HETEM E GRAEFF, 2012; KLEIN, 2002; OBAID, 2014).

A categorização dos transtornos de ansiedade surge muito tempo depois dentro das classificações de transtornos mentais. Em 1952, a American Psychiatric Association (APA) publicou o primeiro *Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais*, DSM-I. Nesta classificação, os transtornos de ansiedade aparecem dentro da categoria de psiconeuroses, usando nomes “reação ansiosa”, “reação fóbica” e “reação obsessivo-compulsiva” (HETEM E GRAEFF, 2012). A versão mais atual, o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais – Quinta Edição (DSM-V), divide os transtornos de ansiedade em alguns grupos, dentre eles o TAG, TP, Transtorno de Ansiedade Social (TAS), Agorafobia, transtorno de ansiedade de separação, mutismo seletivo, fobia específica, transtorno de ansiedade induzido por substância ou medicamento, transtorno de ansiedade devido a outra condição médica e outro transtorno de ansiedade especificado (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

O presente estudo tem como foco duas das divisões dos transtornos de ansiedade: o Transtorno de Ansiedade Generalizada e o Transtorno do Pânico.

O TAG é caracterizado por ansiedade e preocupações excessivas apreensivas, ocorrendo na maioria dos dias por pelo menos seis meses, interferindo em diversos eventos ou atividades (tais como desempenho escolar ou profissional). A intensidade, duração ou frequência da ansiedade e

preocupação é desproporcional à probabilidade real ou ao impacto do evento antecipado. O indivíduo não consegue controlar a preocupação e evitar ter suas tarefas atrapalhadas por pensamentos preocupantes. Os adultos com esse transtorno, frequentemente se preocupam com circunstâncias diárias da rotina de vida (Ex: responsabilidades no trabalho, saúde e finanças, a saúde dos membros da família, desgraças com seus filhos, etc). As crianças com o transtorno tendem a se preocupar excessivamente com sua competência ou a qualidade de seu desempenho. O TAG pode ser distinguido da ansiedade não-patológica, pois no caso do primeiro, as preocupações associadas a ele são excessivas (em intensidade e tempo), angústiantes e interferem significativamente o funcionamento psicossocial, enquanto que as preocupações da segunda não são excessivas, são perceptíveis e manejáveis, além de terem muito menos sintomas físicos (Ex: inquietação ou sensação de nervos à flor da pele) (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

O TP é definido como ataques de pânico recorrentes (mais de um ataque de pânico) e inesperados (sem indício ou desencadeamento lógico), sendo esse ataque de pânico um surto abrupto de medo ou desconforto intenso que alcança um pico em minutos, sendo acompanhada de pelo menos quatro dos seguintes sintomas: palpitações, taquicardia, sudorese, tremores, falta de ar, sensação de asfixia, dor torácica, náusea, calafrios, tonturas, medo de “enlouquecer”, medo de morrer, etc (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

Em um ambiente onde a ameaça é potencial (perigo é incerto), os animais, se utilizam da estratégia de avaliação de risco (vigilância, nos animais de campo). Essa estratégia se refere a um padrão de atividades envolvidas na detecção e análise dessa ameaça potencial, sendo um processo central na escolha de defesas específicas, como exemplo o congelamento, para tentar avaliar e minimizar a representação do perigo (BLANCHARD et al., 2011). Esse padrão de resposta é utilizado por diversas abordagens experimentais como se relacionando a um índice de ansiedade, já que drogas utilizadas como ansiolíticos alteram o comportamento de avaliação de risco (BLANCHARD et al., 1997; 2003; GRAY E MCNAUGHTON, 2000).

Quando no ambiente um perigo é real e se encontra próximo ao animal, os comportamentos de fuga ou ataque defensivo são os expressos pelo indivíduo (BLANCHARD E BLANCHARD, 1988). Segundo a hipótese de Graeff (1981), existe um sistema que está envolvido com o comando de comportamentos defensivos relacionados a estados motivacionais aversivos, o qual denominou de sistema cerebral aversivo. Esse sistema está estritamente relacionado ao TP, já que comportamentos relacionados a ele são sensíveis a drogas que são clinicamente eficazes no tratamento do mesmo (RANGEL et al., 2014; SOARES et al., 2010; SPIACCI JR et al., 2015).

Assim, Deakin e Graeff (1991) propuseram que o neurotransmissor serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) desempenharia um papel na modulação de respostas defensivas associadas à ansiedade e ao pânico, devido sua ação em estruturas prosencefálicas e na Substância Cinzenta Periaquedutal Dorsal (SCPd). Essa hipótese vem sendo amplamente estudada em trabalhos que comprovam que medicamentos antidepressivos inibidores seletivos de recaptação de serotonina (ISRS) e benzodiazepínicos têm sido eficazes no tratamento de pessoas com a TAG e o TP (BALLENGER, 2001; FRAMPTON, 2014; LOCKE et al., 2015; WETHERELL et al., 2013; Zangrossi JR E GRAEFF, 2014).

A serotonina é uma indolamina que é sintetizada a partir de uma hidroxilação do aminoácido essencial triptofano pela enzima Triptofano Hidroxilase (TPH), originando a 5-Hidroxitriptofano que passa por uma descarboxilação pela enzima Dopa descarboxilase, formando então a 5-Hidroxitriptamina (CLARK et al., 1954; RANG E DALE, 2012; ROBERTS E FITZPATRICK, 2013; TYCE, 1990). A sua síntese ocorre apenas em células que contêm a TPH, principalmente em neurônios localizados nos núcleos da rafe (CLARK et al., 2006; FUXE, 1965; KLOMP et al., 2014; TYCE, 1990).

A serotonina é um neurotransmissor que atua em diversos mecanismos fisiológicos tendo sua ação sobre 14 subtipos de receptores (RANG E DALE, 2012), tanto pré quanto pós-sinapticamente. Graeff e Schoenfeld (1970), em um trabalho com pombos, utilizaram Methysergide, antagonista de receptores 5-HT, em um teste de conflito. Nesse teste, o comportamento operante é suprimido através de punição (no caso, após a apresentação da comida o

comportamento alimentar era suprimido através de choques nas patas). Foi observado que houve uma diminuição da supressão do comportamento, havendo então um quadro de ansiólise. Da mesma maneira, quando foram utilizadas drogas inibidoras da enzima TPH ou administração de benzodiazepínicos, ocorreu o mesmo (GRAEFF E SCHOENFELD, 1970; GRAEFF, 2002; HODGES et al., 1987; WUTTKE E KELLEHER, 1970).

Em 1972, Wise e colaboradores propuseram que o neurotransmissor noradrenalina estaria relacionado com o sistema de recompensa, enquanto que vias ascendentes serotoninérgicas partindo do Núcleo Dorsal da Rafe (NDR) e Núcleo Mediano da Rafe (NMR), tanto para regiões de córtex quanto para regiões mesencefálicas, facilitariam o efeito da punição. Essa suposição foi corroborada por Tye e colaboradores em 1977, utilizando a 5,7-dihydroxytryptamine (5,7-DHT), uma neurotoxina que destrói neurônios serotoninérgicos, sendo observado uma depleção de 5-HT cortical após a sua microinjeção no tegmentum ventromedial no mesencéfalo de ratos. Comportamentalmente houve um impedimento de aquisição de supressão de resposta induzida por choque. O trabalho de Petersen e Scheel-Krüger (1984), sugeriu que amígdala também tinha envolvimento no sistema de punição, uma vez que a administração de antagonista de 5-HT na amígdala basolateral causou um aumento no comportamento de beber água suprimido por choques. Quando microinjetado o 8-hydroxy-2(di-n-propylamino) tetralin (8-OH-DPAT), um agonista de receptores 5-HT_{1A}, nessa mesma estrutura, houve diminuição desse comportamento (HODGES et al. 1987), confirmando o envolvimento da amígdala na aprendizagem, no condicionamento operante e na ansiedade.

Por outro lado, a estimulação elétrica na SCPd em animais de laboratório levava a um quadro de expressão de luta ou de fuga, sendo evocadas como reações de defesa. Essa estimulação provocava nos mesmos, sintomas de pânico (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013), sugerindo então, o envolvimento da SCPd no Transtorno do Pânico (DEAKIN E GRAEFF, 1991; DEL-BEN E GRAEFF, 2009; JENCK et al., 1995). Em animais de laboratório que aprendem a desligar a estimulação elétrica na SCPd, quando há a aplicação de para-chlorophenylalanine (PCPA), que depleta 5-HT, ocorreu um aumento nesse comportamento (KISER E LEBOVITZ, 1975). De

maneira oposta, quando se administrou 5-Hidroxitriptofano, precursor da serotonina, ou quando se estimulou o NDR que envia projeções para a SCPd, o comportamento de desligar a estimulação elétrica foi diminuído (KISER et al. 1978; 1980). Dessa maneira, a depleção de serotonina resulta numa facilitação da fuga da estimulação elétrica da SCPd (GRAEFF, 2002) e ao mesmo tempo, no aumentar do comportamento operante, efeitos esses considerados como ansiogênicos.

Para ajudar na compreensão dessa dualidade, Deakin e Graeff (1991) ressaltaram que existem dois mecanismos que controlam os transtornos de ansiedade e de pânico, e que ambos teriam o NDR como origem (ver Figura 1).

No primeiro mecanismo, a via serotoninérgica prosencefálica que se inicia no NDR se projeta para o córtex pré-frontal, hipocampo ventral, amígdala e a Substância Cinzenta Periaquedutal (SCP), facilitaria a resposta à aproximação de uma ameaça, a um perigo distal, provocando comportamentos como a esquiva inibitória (DEAKIN E GRAEFF, 1991; GRAEFF, 2014). O segundo mecanismo sugere que a via periventricular do NDR, que se projeta ao córtex pré-frontal, amígdala, hipotálamo medial e SCP seria responsável pela esquiva defensiva, relacionada a ameaças próximas ou imediatas, o que ocasionaria comportamentos do tipo de fuga (DEAKIN E GRAEFF, 1991; GRAEFF, 2014). O mau funcionamento dessas duas vias serotoninérgicas ocasionaria transtornos específicos de ansiedade, sendo que distúrbios na primeira seriam responsáveis pela manifestação do Transtorno de Ansiedade Generalizada e na segunda causaria o transtorno de pânico (DEAKIN E GRAEFF, 1991; GRAEFF, 2014).

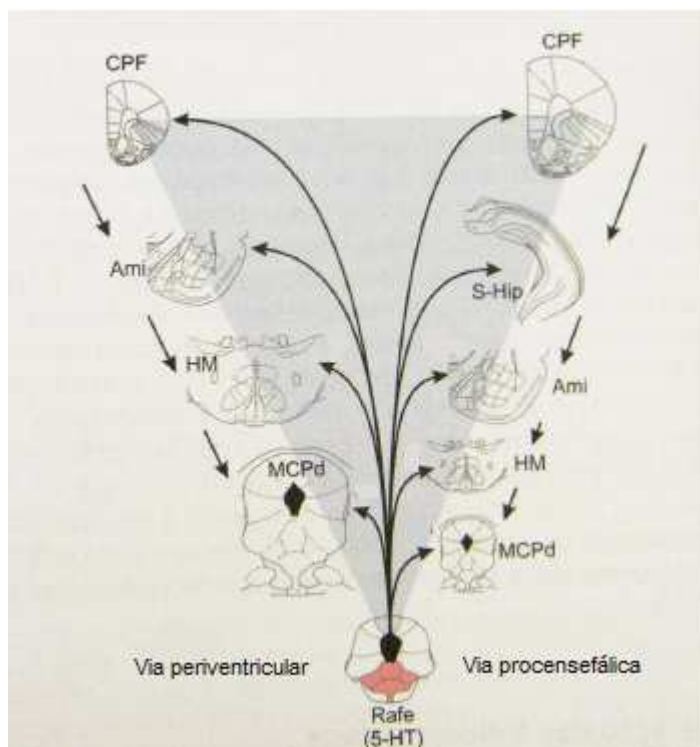


Figura 1: Hipótese proposta por Deakin e Graeff (1991) ressaltando as duas vias de controle do Sistema Nervoso Central sobre a ansiedade e o pânico (adaptado de BRANDÃO; GRAEFF, 2014). CPF: córtex pré-frontal; Ami: amígdala, S-Hip: sistema septo-hipocampal; HM: hipotálamo medial; MCPd: matéria cinzenta periaquedutal dorsal; 5-HT: serotonina

O NDR é uma estrutura mesencefálica com grande densidade de corpos celulares de neurônios serotonérgicos (JOH et al., 1975; STEINBUSCH et al., 1978). Essa estrutura não tem apenas neurônios serotonérgicos como também aqueles não-serotonérgicos (CALIZO et al., 2011; ROMPRÉ E MILIARESSIS, 1987). Esses estão na proporção de um terço a um décimo em comparação aos serotonérgicos (CALIZO et al., 2011). Dentre os neurônios não-serotonérgicos estão presentes os dopaminérgicos, GABAérgicos, glutamatérgicos, de óxido nítrico e peptídeos transmissores (MICHELSEN et al., 2007).

Steinbusch (1981), através de um trabalho utilizando a técnica de imunohistoquímica para detecção de neurônios serotonérgicos, demonstrou que existem cinco agrupamentos de corpos celulares desses neurônios no NDR: o Dorsal (DRD), Ventral (DRV), Lateral (Asas Laterais), Caudal (DRC) e Interfascicular (DRI). Imai e colaboradores em 1986, utilizando a técnica de Golgi e injeções de Horseradish peroxidase para neurotraçamento,

encontraram diferenças na organização do eixo rostro-caudal do NDR entre as vias ascendentes de neurônios serotoninérgicos. Segundo os autores, a região rostral, teria vias ascendentes que alcançariam regiões mais relacionadas com a parte motora, como por exemplo, os gânglios da base (caudado, putamen e a substância nigra), enquanto que a região caudal se relacionaria a regiões do sistema límbico (principalmente Hipocampo) e o *Locus Coeruleus*. As vias ascendentes que chegariam na amígdala estariam numa região mais intermediária, tendo sua correlação tanto com o sistema motor, quanto com o sistema límbico, mostrando assim, a existência de diferentes áreas funcionais na mesma (IMAI et al., 1986). Anos mais tarde, esses achados do grupo de Imai foram corroborados por experimentos de imunohistoquímica para detecção da proteína c-Fos.

A proteína c-Fos é pertencente ao grupo das proteínas Fos. É transcrita a partir do gene c-Fos, um proto-oncogene pertencente a uma família de fatores de transcrição induzíveis conhecidos como *Immediate early genes*. A proteína funciona pela alteração muito rápida do gene, positiva ou negativamente, em respostas aos sinais de superfície celular (através de receptores) (HOFFMAN et al., 1993). Estudos envolvendo estímulos específicos, principalmente àqueles de ativação neural e hormônios, demonstraram que os mesmos são capazes de desencadear a transcrição rápida da proteína c-Fos (ABRAMS et al., 2005; PIZZO et al., 2017; SPIACCI JR. et al., 2012; WSCIEKLICA et al., 2017).

Abrams e colaboradores (2005) realizaram um estudo de imunohistoquímica de dupla-marcação (c-Fos e Triptofano Hidroxilase) no NDR após a administração de quatro drogas conhecidas por induzirem comportamentos ansiosos em humanos: cafeína, m-chlorophenyl piperazine (mCPP), yohimbine e N-methyl-beta-carboline-3-carboxamide (FG-7142). Os resultados desse experimento mostraram que após a administração de todas as drogas, com exceção da yohimbine, houve um aumento no número de neurônios serotoninérgicos ativados, principalmente no DRD. Um trabalho realizado com dupla-marcação para neurônios serotoninérgicos (c-Fos e Triptofano hidroxilase) no NDR, no qual ratos foram expostos a choques inescapáveis nas caudas, mostrou como resultado um aumento na ativação em

neurônios localizados nas regiões caudal e média (GRAHN et al., 1999). Ainda assim, o trabalho de Lopes e colaboradores (2016) utilizando um modelo de estresse crônico foi realizado também empregando o protocolo de dupla-marcação no NDR. O estresse crônico contava com uma bateria de estressores (restrição, privação de água e comida, inversão do ciclo claro/escuro, etc) durante 14 dias consecutivos. Para a avaliação comportamental, foi aplicado o teste do claro/escuro, tendo como resultado um comportamento ansiogênico dos ratos estressados em relação ao grupo controle. Paralelamente, houve um aumento na ativação de neurônios no DRC, na região médio-rostral do DRD e na região médio-caudal do LWDR. Nas duas últimas regiões, essas células eram serotoninérgicas.

Esses trabalhos confirmaram a heterogeneidade do NDR descrita por Steinbusch (1981) e Imai e colaboradores (1986), mostrando também a presença de neurônios não-serotoninérgicos nessa estrutura. Além disso, os autores fortaleceram a ideia de que além das 5 sub-regiões definidas por Steinbusch (1981), sendo DRD, DRV, asas laterais, DRC e DRI, os estudos posteriores deveriam considerar três partes ao longo do eixo rostro-caudal: rostral, medial e caudal (ABRAMS et al., 2004).

Por outro lado, estudos mostram que a região Asas Laterais/Substância Cinzenta Periaquedutal Ventrolateral (SCPvl) enviam projeções para estruturas que controlam a resposta de luta/fuga, que tem sido associado ao pânico (HALE et al., 2012). O trabalho realizado por Johnson e colaboradores (2005) demonstrou que a exposição de ratos a ambientes com altas concentrações de CO₂, estímulo que provoca ataques de pânico em pacientes com o TP (GRIEZ et al., 1987), ativou neurônios serotoninérgicos dessas duas estruturas anteriormente mencionadas. Posteriormente, Johnson et al. (2008) mostraram que houve um aumento na ativação de neurônios serotoninérgicos nessas mesmas estruturas após a administração de lactato de sódio, um agente panicogênico.

Basicamente, os neurônios serotoninérgicos nas regiões média e caudal do NDR, principalmente dos subnúcleos DRD e DRC do NDR, formariam o trato prosencefálico e estariam mais envolvidos em comportamentos relacionados com a expressão da ansiedade (ABRAMS et al., 2005; HALE et

al., 2012), enquanto que os neurônios serotoninérgicos localizados nas Asas Laterais do NDR e da Substância Cinzenta Periaquedutal ventrolateral, originariam o trato periventricular, relacionado com a inibição do pânico (HALE et al., 2012; JOHNSON et al., 2005; JOHNSON et al., 2008).

Grande parte dos estudos até aqui relatados foram realizados em machos. No entanto, as mulheres são muito mais suscetíveis a desenvolver os transtornos de ansiedade, pânico depressão durante a sua vida, quando comparadas aos homens (Catuzzi E BECK, 2014; DONNER E LOWRY, 2013; KESSLER et al., 2012). De acordo com McLean e colaboradores (2011), uma a cada três mulheres apresentam predisposição para desenvolver qualquer um dos transtornos de ansiedade durante a sua vida, comparado a 22% entre os homens.

Com exceção do TAS, em que não existem diferenças significativas entre os dois sexos, em todos os outros distúrbios mencionados, as mulheres são acometidas praticamente o dobro em comparação aos homens (BANDELOW E MICHAELIS, 2015; MCLEAN et al., 2011). Além disso, as mulheres tendem a ter o TAG quase duas vezes mais do que os homens (7,7% contra 4,1%) (MCLEAN et al., 2011). Elas apresentam uma tendência a apresentar uma idade mais baixa no início da doença do que eles (STEINER et al., 2005). Piggot (2003) evidenciou em seu estudo que mulheres com TAG relataram frequentemente a piora dos sintomas no período pré-menstrual.

Para entender as diferenças sexuais existentes na manifestação dos transtornos de ansiedade faz-se necessário olhar aspectos biológicos e culturais, bem como o estilo de vida e a pressão social (RUTTER et al., 2003). Diferenças que promovem o sucesso reprodutivo, que no caso das mulheres é o ciclo hormonal sexual, podem aumentar a vulnerabilidade das mulheres para transtornos emocionais e de humor, incluindo os distúrbios de ansiedade (ALTEMUS et al., 2014). O ambiente hormonal do encéfalo, bem como a ação de alguns hormônios durante a formação e desenvolvimento encefálico podem contribuir para a manifestação desses distúrbios (PALANZA, 2001). As fêmeas possuem uma alta resposta ao estresse e conseqüentemente uma alta quantidade de corticosterona plasmática quando comparadas com os machos. Essa corticosterona transita por toda a corrente sanguínea, indo inclusive para

a circulação encefálica e no caso de gestantes, na circulação placentária e em seguida fetal, podendo alterar o desenvolvimento cerebral e posteriormente modificar estruturas cuja função está ligada à mediação da manifestação de comportamentos relacionados à ansiedade (ALTEMUS et al., 2014; GIUDICE, 2012; LUO et al., 2013).

As fêmeas de mamíferos possuem um ciclo hormonal sexual conhecido como ciclo estral. Mais especificamente o ciclo estral de ratas é constituído por quatro fases: proestro (12 a 14 horas), Estro (25 a 27 horas), Diestro I (Metaestro - 10 a 14 horas) e Diestro II (55 a 57 horas) (FREEMAN, 1993). Durante o ciclo hormonal sexual há uma oscilação dos hormônios hipofisários e ovarianos. A liberação dos hormônios gonadais é regulada pelo eixo Hipotálamo-Hipófise-Gonadal (HHG). A hipófise é responsável pela secreção de Hormônio Folículo Estimulante (FSH) e Hormônio Luteinizante (LH) em resposta ao hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). Nas fêmeas, o LH age como um estimulador nas células intersticiais da camada teca dos folículos ovarianos, resultando na secreção de androstenediona e testosterona (androgênios) e aumentando a recaptação de colesterol. O FSH é responsável pela regulação da produção de estrógeno e o crescimento folicular. Ao ocorrer a ovulação, o FSH e o LH agem sobre o corpo lúteo, aumentando os níveis de estrógeno e progesterona, regulando por retroalimentação negativa a secreção do GnRH, FSH e LH (IGNACIO et al., 2009).

Não somente o ambiente hormonal, como também o ambiente social em que a mulher se insere contribui de maneira ampla para a diferença sexual na manifestação dos distúrbios de ansiedade.

Nessa abordagem, um aspecto a se destacar são as experiências que caracterizam a história da pessoa. O abuso sexual infantil tem um grande impacto na desregulação de sistemas relacionados ao estresse e consequentemente no desenvolvimento de estruturas cerebrais que podem estar relacionadas à mediação dos transtornos de comportamento afetivo na adolescência e na vida adulta (DEBELLIS et al., 2011). Estudos demonstraram que as meninas sofrem muito mais o abuso sexual infantil do que os meninos (AL-FAYEZ et al., 2012; BRENNER E BEN-AMITAY, 2015; GOREY E LESLIE, 1997; KLOPPEN et al., 2016). Além disso, outros eventos ocorridos na infância,

como por exemplo, abuso físico, disfunções familiares e negligência, que contribuem com o mesmo efeito adverso do abuso sexual na infância, ocorrem em maior porcentagem no caso das meninas (15,2%) comparado aos meninos (9,2%) (CDC, 2010). Outros fatores adversos também reforçam essa diferença, como demonstra o achado de Gonçalves e colaboradores (2014), no qual a maior porcentagem de pessoas com transtornos mentais encontrados no estado de São Paulo foram mulheres desempregadas, com baixa educação e baixa renda.

Vários estudos experimentais com animais de laboratório têm sido conduzidos visando a compreensão dos mecanismos neurobiológicos relacionados com a ansiedade em fêmeas.

Para revisão, na Tabela 1 foram relacionadas algumas dessas investigações com fêmeas intactas (e as respectivas fases do ciclo estral) e ovariectomizadas, em relação à ansiedade e ao Transtorno do Pânico:

Tabela 1: Principais trabalhos realizados com ratas em modelos comportamentais de ansiedade e de pânico.

Fase do Ciclo Estral de Ratas ou Ovariectomia		Teste	Resposta relacionada à ansiedade	Resposta relacionada ao Pânico	Referências
Ovariectomia	17 β -E2(10 μ g/kg)	TEP	-	NM	MORA et al., 1996.
	Progesterona (25 mg/kg)	TEP	-	NM	MORA et al., 1996.
	17 β -E2(10 μ g/kg) + Progesterona (25 mg/kg)	TEP	-	NM	MORA et al., 1996.
	17 β -E2(90 μ g/kg)	Transição Claro/Escuro	-	NM	WALF E FRYE, 2009.
	17 β -E2 (10 μ g/kg)	LTE	-	+	KALANDAKANOND-THONGSONG et al., 2012.
	Fluoxetina (10mg/kg) + 17 β -E2 (10 μ g/kg)	LTE/LCE	-	0	CHAROENPHANDHU et al., 2011.
	8-OH-DPAT (0.05 mg/kg)	LCE	-	NM	SAPRONOV et al., 2004.
	Ketanserina (3mg/kg)	LCE	+	NM	DÍAZ-VELÍZ et al., 1997.
	Ketanserina (3mg/kg) + BE (10 μ g/kg)	LCE	-	NM	DÍAZ-VELÍZ et al., 1997.
Proestro	Nenhum Fármaco	LCE	-	NM	DÍAZ-VELÍZ et al., 1997; FRYE et al., 2000; MARCONDES et al., 2001.
	Nenhum Fármaco	LTE	0	0	GOUVEIA JR. et al., 2004.
	Nenhum Fármaco	TEP	-	NM	MORA et al., 1996.
	Diazepam (4mg/kg)	TLCEED	0	NM	SILVA et al., 2016.
	MIF (30mg/kg) + Diazepam (2mg/kg)	TLCEED	-	NM	SILVA et al., 2016.
	Sibutramina (10mg/kg)	LTE	0	-	SANTOS et al., 2014.
	Ketanserina (3mg/kg)	LCE	+	NM	DÍAZ-VELÍZ et al., 1997.
	Nenhum Fármaco	Interação Social	-	NM	FRYE et al., 2000.
Estro	Nenhum Fármaco	LCE	-	NM	DÍAZ-VELÍZ et al., 1997; FRYE et al., 2000; MARCONDES et al., 2001.
	Nenhum Fármaco	LTE	0	0	GOUVEIA JR. et al., 2004.
	Nenhum Fármaco	TEP	-	NM	MORA et al., 1996.
	Diazepam (4mg/kg)	TLCEED	0	NM	SILVA et al., 2016.
	Sibutramina (10mg/kg)	LTE	0	-	SANTOS et al., 2014.
	Ketanserina (3mg/kg)	LCE	+	NM	DÍAZ-VELÍZ et al., 1997.
Metaestro	Nenhum fármaco	LCE	+	NM	DÍAZ-VELÍZ et al., 1997; MARCONDES et al., 2001.
	Nenhum fármaco	LTE	0	0	GOUVEIA JR. et al., 2004.
	Nenhum Fármaco	TEP	+	NM	MORA ET AL., 1996.
	Diazepam (4mg/kg)	TLCEED	-	NM	SILVA ET AL., 2016.
	Sibutramina (10mg/kg)	LTE	0	-	SANTOS ET AL., 2014.
	Ketanserina (3mg/kg)	LCE	+	NM	DÍAZ-VELÍZ et al., 1997.
Diestro II	Nenhum fármaco	LCE	+	NM	DÍAZ-VELÍZ et al., 1997; FRYE et al., 2000; MARCONDES et al., 2001.
	17 β -E2 (50 μ g/kg)	LCE	-	NM	MARCONDES et al., 2001.
	Nenhum fármaco	LTE	+	0	GOUVEIA Jr. et al., 2004.
	Nenhum Fármaco	TEP	+	NM	MORA et al., 1996.
	Diazepam (4mg/kg)	TLCEED	-	NM	SILVA et al., 2016.
	Sibutramina (10mg/kg)	LTE	0	0	SANTOS et al., 2014.
	Ketanserina (3mg/kg)	LCE	-	NM	DÍAZ-VELÍZ et al., 1997.

+ aumento; - diminuição; 0 sem alteração; LCE = Labirinto em Cruz Elevado; LTE = Labirinto em T-Elevado; TLCEED = Teste do LCE de Evasão discriminatória; TEP = Teste da Evasão Passiva; NM = Esse tipo de modelo Não Mede esse índice; MIF = Mifepristona (antagonista de receptor de progesterona); 17 β -E2 = 17- β -Estradiol; BE = Benzoato de Estradiol.

Um dos testes utilizados nos trabalhos mencionados na Tabela 1, o Labirinto em Cruz Elevado (LCE), que é um aparato comportamental feito de madeira e é constituído por dois braços abertos e dois fechados opostos e uma plataforma central, além de ser elevado acima do solo, trabalhando com o medo inato que ratos de laboratório têm de lugares abertos, altos e iluminados. Dessa maneira, quanto mais tempo eles permanecem nos braços fechados, maior é o comportamento ansioso apresentado. De maneira geral, as ratas na fase de proestro e estro testadas no LCE gastaram mais tempo nos braços abertos, demonstrando um comportamento ansiolítico, enquanto que nas outras duas fases, metaestro e diestro, constatou-se ansiogênese, devido a um tempo maior gasto nos braços fechados (DÍAZ-VELÍZ et al., 1997; FRYE et al., 2000; MARCONDES et al., 2001).

O trabalho realizado por Gouveia Jr. e colaboradores (2004) utilizou o Labirinto em T-Elevado (LTE), um modelo derivado do LCE que discrimina dois tipos de ansiedade, o TAG e o TP. No caso desse aparato, há a retirada de um dos braços fechados, e o teste tem início pela tomada da esquiva inibitória (Relacionado ao TAG). Nessa avaliação, cada animal é colocado na extremidade distal do braço fechado, registrando por 3 vezes a medida de latência gasta pelo mesmo para sair deste braço (Linha de base, Esquiva 1 e 2). Posteriormente é avaliado o comportamento de fuga (Relacionado ao TP), no qual os ratos são colocados na extremidade de um dos braços abertos e é registrado por três vezes o tempo de latência de saída de um dos braços abertos (Fuga 1, Fuga 2 e Fuga 3). (GRAEFF et al., 1993; ZANGROSSI E GRAEFF, 1997). Como resultado, não foi encontrado nenhum efeito relacionado ao pânico, porém houve uma demonstração que apenas ratas em diestro apresentaram um comportamento ansiogênico, não havendo diferença nas outras fases (GOUVEIA JR. et al., 2004).

Ratas ovariectomizadas bilateralmente, condição em que há depleção de progesterona e estrógeno, foram tratadas com administração sistêmica de 17 β - Estradiol e posteriormente submetidas ao LCE, Teste da Evitação Passiva (TEP) e ao LTE e como resultado, houve uma diminuição dos níveis de ansiedade, de maneira similar ao que se observou em ratas nas fases de estro e proestro, nas quais a concentração de estrógeno se encontra em altas

concentrações séricas (FREEMAN, 1993). No entanto, houve um efeito panicogênico quando testadas no LTE (KALANDAKANOND-THONGSONG et al., 2012; MORA et al., 1996; WALF E FRYE, 2009). O mesmo resultado foi encontrado em ratas ovariectomizadas tratadas com progesterona (MORA et al., 1996).

Em estudo realizado avaliando o efeito do diazepam ao longo das diferentes fases do ciclo estral, utilizando o LCE e o Teste do Labirinto em Cruz Elevado de Evasão Discriminatória (TLCEE) observou-se que os resultados encontrados foram que a maior dose do diazepam (4mg/kg) produziu um efeito ansiolítico em ratas nas fases de metaestro e diestro, não havendo mudanças comportamentais na fase de proestro e estro nesse quesito (SILVA et al., 2016). Em trabalho anterior com mapeamento de receptores GABAérgicos em fêmeas houve a demonstração que a presença de esteróides na circulação alterou a expressão de receptores e que a baixa concentração de hormônios que caracteriza a fase de diestro resultou num aumento desses receptores na SCPD (LOVICK, 2008). Já se conhece que o Diazepam é um benzodiazepínico (BZD), uma classe de ansiolíticos que são moduladores alostéricos de receptores de Ácido Gama-amino-butírico (GABA) do tipo A. O GABA é um neurotransmissor potente inibidor do sistema nervoso central, por isso drogas que atuam nessa via são utilizados no tratamento de transtornos de ansiedade.

Ainda assim, existem estudos que tentam entender a relação entre a ação da serotonina e hormônios sexuais na manifestação dos transtornos de ansiedade. Mora e colaboradores (1996) avaliaram a influência da luminosidade sobre a manifestação da ansiedade utilizando o LCE. Os resultados obtidos mostraram que ratas em Metaestro exploravam muito mais os braços abertos em elevada luminosidade, enquanto que os animais na fase de estro e proestro passavam mais tempo neste braço quando em luminosidade baixa. Tais evidências demonstram que há relação entre as atividades dos hormônios sexuais e serotonina sobre receptores 5-HT_{1A}, já que estes são modulados pelas variações de iluminação do ambiente, conforme corroborado por Handley e colaboradores (1993). Para fortificar o ideal dessa relação, outros trabalhos realizados já demonstraram que a reposição de estrógeno afeta a sensibilidade a estressores, diminuindo a ansiedade, por

atuar em vias serotoninérgicas (BORROW E CAMERON, 2014; MCEWEN, 2002; MORA et al., 1996; WALF E FRYE, 2008; WARTHON et al., 2012).

Receptores para estrógeno dos tipos alfa (ER α) e beta (ER β) foram encontrados nos encéfalos de machos e de fêmeas em estruturas como amígdala, córtex cerebral, cerebelo, hipocampo e hipotálamo (SHUGHRUE E MERCHENTHALER, 2001), algumas delas sendo estruturas relacionadas com a manifestação desses transtornos conforme já mencionado. Também foram encontrados receptores para estrógeno em corpos celulares de neurônios no NDR (ALVES et al., 1998), também na SCP e NMR (NOMURA et al., 2005).

Nomura e colaboradores (2005) ao realizar um estudo de imunohistoquímica de dupla-marcação de receptores de estrógeno e TPH observaram que os receptores ER β estão presentes em maior quantidade no NDR, principalmente nas sub-regiões dorsal e ventral, e que receptores do tipo ER α estariam em maior abundância na SCP. Além disso, observaram que mais de 90% das células que apresentavam ER β também continham a enzima TPH, enquanto que outras com maior concentração de ER α , esse valor caía para 23%. Ao comparar camundongos *knockout* para cada tipo de receptor, constatou-se que em camundongos *knockout* para ER β houve uma diminuição da expressão da enzima na porção ventral do NDR. Esse estudo suporta a hipótese que receptores de estrógeno beta estão de alguma forma envolvidos na regulação endócrina e comportamental das funções serotoninérgicas do encéfalo (NOMURA et al., 2005).

Krezel e colaboradores (2001), em estudo experimental utilizando camundongos *Knockout* para ER β , demonstraram que esses animais apresentaram um comportamento ansiogênico durante a avaliação no LCE, quando comparados com o tipo selvagem e com fêmeas *Knockout* ER α . Isto sugere que o estrógeno atua, não apenas sobre os receptores serotoninérgicos, mas também na regulação da transcrição gênica da enzima Triptofano Hidroxilase.

Com base nesses achados, e conhecendo que nas diferentes fases do ciclo estral as fêmeas apresentam respostas distintas em relação aos comportamentos defensivos associados à ansiedade e ao pânico e que estes

são modulados por neurônios serotoninérgicos originados nos Núcleos Mediano e Dorsal da Rafe que se projetam para estruturas prosencefálicas e mesencefálicas, a hipótese do presente estudo foi a de que existem diferenças no padrão de recrutamento de neurônios serotoninérgicos e não-serotoninérgicos no NMR e nos diferentes subnúcleos do NDR entre as fases do ciclo estral de ratas e após o procedimento de ovariectomia bilateral, visando testar esta hipótese, o objetivo deste projeto de pesquisa foi avaliar a ativação de neurônios serotoninérgicos e não-serotoninérgicos no NMR e nos subnúcleos do NDR através da técnica de imunohistoquímica de dupla-marcação para proteína c-Fos e Triptofano Hidroxilase, em cada uma das fases do ciclo estral das ratas e após a realização da ovariectomia bilateral.

REFERÊNCIAS

ABRAMS, J.K. et al. Anatomic and Functional Topography of the Dorsal Raphe Nucleus. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1018, p. 46-57, 2004.

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

ADAMS, D.B. Brain mechanisms of aggressive behavior: an updated review. **Neurosci. Biobehav. Rev**, v. 30, p. 304-318, 2006.

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

ALTEMUS, M.; SARVAIYA, N.; EPPERSON, C.N. Sex differences in anxiety and depression clinical perspectives. **Front. Neuroendocrinol**, v. 35, p.320-330, 2014.

ALVES, S.E. et al. Immunocytochemical localization of nuclear estrogen receptors and progestin receptors within the rat dorsal raphe nucleus. **J. Comp. Neurol**, v. 391, p. 322-334, 1998.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: DSM-5**. 5 ed. Washington, DC, 2013.

ANDRADE, L. H. S. G.; GORENSTEIN, C. Aspectos gerais das escalas de avaliação de ansiedade. **Rev Psiquiatr Clín**, v. 25, 285-290, 1998.

ANDRADE, L.H. et al. Mental Disorders in Megacities: Findings from the São Paulo Megacity Mental Health Survey, Brazil. **PLoS ONE**, v. 7, p. 1-11, 2012.

ANDRADE, T.G.C.S.; ZANGROSSI Jr., H.; GRAEFF, F.G. The median raphe nucleus revisited. **J. Psychopharmacol**, v. 27, p. 1107-1115, 2013.

BALLENGER J.C. Overview of different pharmacotherapies for attaining remission in generalized anxiety disorder. **J Clin Psychiatry**, v. 62, p. 11-19, 2001.

BANDELOW, B.; MICHAELIS, S. Epidemiology of anxiety disorders in the 21st century. **Dialogues Clin Neurosci**, v. 17, p. 327-335, 2015.

BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. **Annu Rev Psychol.**, v. 39, p. 43-68, 1988.

BLANCHARD, D.C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R.J. Conditioning and residual emotionality effects of predator stimuli: some reflections on stress and emotion. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 27, p. 1177-1185, 2003

BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J. Defensive behaviors, fear and anxiety. In: BLANCHARD, R.J. et al. **Handbook of Anxiety and Fear**. 1. Ed. Elsevier Science Publishers, 2008.

BLANCHARD, D.C. et al. Risk assessment as an evolved threat detection and analysis process. **Neurosci. Biobehav. Rev**, v. 35, p. 991-998, 2011.

BLANCHARD, R.J. et al. Differentiation of anxiolytic and panicolytic drugs effects on rat and mouse defense test batteries. **Neurosci. Biobehav. Rev**, v. 21, p. 123-136, 1997.

BORROW, A.P.; CAMERON, N.M. Estrogenic mediation of serotonergic and neurotrophic systems: Implications for female mood disorders. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 54, p. 13-25, 2014.

BRANDÃO, M.L. **Psicofisiologia: as bases fisiológicas do comportamento**. 3 Ed., São Paulo: Atheneu, 2012.

BRANDÃO, M.L.; GRAEFF, F.G. **Neurobiologia dos Transtornos Mentais**. 1. Ed. São Paulo: Atheneu, 2014.

BRENNER, I.; BEN-AMITAY, G. Sexual revictimization: the impact of attachment anxiety, accumulated trauma, and response to childhood sexual abuse disclosure. **Violence Vict**, v. 30, p. 49-65, 2015.

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

CAMPOS, R.N.; CAMPOS, J.A.O.; SANCHES, M. A evolução histórica dos conceitos de transtorno de humor e transtorno de personalidade: problemas no diagnóstico diferencial. **Rev Psiquiatr Clín**, v. 37, p. 162-166, 2010.

CAMPOS, A.C. et al. Animal models of anxiety disorders and stress. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 35, p. 101-111, 2013.

CATUZZI, J.E.; BECK, K.D. Anxiety vulnerability in women: A two-hit hypothesis. **Exp. Neurol**, v. 259, p. 75-80, 2014.

CDC. Adverse childhood experiences reported by adults—five states 2009. **MMWR**, v. 59, p. 1609–1613, 2010.

CHAROENPHANDHU, J. et al. Anxiety-like behaviors and expression of SERT and TPH in the dorsal raphe of estrogen- and fluoxetine-treated ovariectomized rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 98, p. 503-510, 2011.

CLARK, C.T.; WEISSBACH, H.; UDENFRIEND, S. 5-Hydroxytryptophan decarboxylase: preparation and properties. **J Biol Chem**, v. 210, p. 139-148, 1954.

CLARK, M.S.; MCDEVITT, R.A.; NEUMAIER, J.F. Quantitative mapping of tryptophan hydroxylase-2, 5-HT1A, 5-HT1B, and serotonin transporter expression across the anteroposterior axis of the rat dorsal and median raphe nuclei. **J. Comp. Neurol**, v. 10, p. 611-623, 2006.

COOLS R.; ROBERTS A.C.; ROBBINS T.W. Serotonergic regulation of emotional and behavioural control processes. **Trends Cogn Sci**, v.12, p.31-40, 2008.

CORREIA, L.L.; LINHARES, M.B.M. Ansiedade materna nos períodos pré e pós-natal: revisão da literatura. **Rev Lat Am Enfermagem**, v. 15, p. 1-8, 2007

CROCQ, M.A.. A history of anxiety: from Hippocrates to DSM. **Dialogues Clin Neurosci**, v.17, p. 319-325, 2015.

DARWIN, C.; PRODGER, P.; EKMAN, P. **The expression of the emotions in man and animals**. 3^a. Ed. London: Harper Collins; 1998.

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

DEBELLIS, M., SPRATT, E., HOOPER, S. Neurodevelopmental biology associated with childhood sexual abuse. **J Child Sex Abus**, v. 20, p. 548–587, 2011.

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

DÍAZ-VÉLIZ, G. et al. Ketanserin and anxiety levels: influence of gender, estrous cycle, ovariectomy and ovarian hormones in females rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 58, p. 637-642, 1997.

DONNER, N.C.; LOWRY, C.A. Sex differences in anxiety and emotional behavior. **Pflugers Arch**, v. 465, p. 601-626, 2013.

FRAMPTON, J.E. Pregabalin: a review of its use in adults with generalized anxiety disorder. **CNS Drugs**, v. 28, p. 835-854, 2014.

FREEMAN, M.E. The Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Rat. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. **The Physiology of Reproduction**. 2.ed. New York: Raven Press, 1993. p. 613-658.

FRYE, C.A.; PETRALIA, S.M.; RHODES, M.E. Estrous cycle and sex differences in performance on anxiety tasks coincide with increases in hippocampal progesterone and 3alpha,5alpha-THP. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 67, p. 587-596, 2000.

FUXE, K. Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system. **Cell Tissue Res**, v. 65, p. 573-596, 1965.

GABBARD, G.O. **Psiquiatria Psicodinâmica na Prática Clínica**. 5ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

GARDNER, K.L. et al. Early life experience alters behavior during social defeat: focus on serotonergic systems. **Neuroscience**. 136, 181-191, 2005.

GIUDICE, M.D. Fetal programming by maternal stress: insights from a conflict perspective. **Psychoneuroendocrinology**, v. 37, p. 1614–1629, 2012.

GONÇALVES, D.A. et al. Brazilian multicentre study of common mental disorders in primary care: rates and related social and demographic factors. **Cad Saude Publica**, v. 30, p. 623-632, 2014.

GOREY, K., LESLIE, D. The prevalence of child sexual abuse: integrative review adjustment for potential response and measurement biases. **Child Abuse Negl**, v. 21, p. 391–398, 1997.

GOUVEIA JR., A. et al. Influence of the estrous cycle on the behavior of rats in the elevated T-maze. **Behav Process**, v. 67, p. 167-171, 2004.

GRAEFF, F.G.; SCHOENFELD, R.I. Tryptaminergic mechanisms in punished and nonpunished behavior. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 173, p. 277-283, 1970.

GRAEFF, F.G.; VIANA, M.G.; TOMAZ, C. The elevated T maze, a new experimental model of anxiety and memory: effect of diazepam. **Braz J Med Biol Res**, v. 26, p. 67-70, 1993.

GRAEFF, F.G. Ansiedade. In: GRAEFF, F.G., BRANDÃO, M.L. **Neurobiologia das doenças mentais**. São Paulo: Atheneu, 2014.

GRAEFF, F.G. Minor tranquilizers and brain defense systems. **Braz J Med Biol Res**, v. 14, p. 239-265, 1981.

GRAEFF, F.G. On Serotonin And Experimental Anxiety. **Psychopharmacology**, v. 163, p. 467-476, 2002.

GRAEFF, F.G. Ansiedade, pânico e o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 29, p. 3-6, 2007.

GRAEFF, F.G. Transtornos de Ansiedade. In: Brandão, M.L.; Graeff, F.G. **Neurobiologia dos Transtornos Mentais**. 1ª. Ed. São Paulo: Atheneu, 2014. p. 131-163.

GRAHN, R.E. et al. Activation of serotonin-immunoreactive cells in the dorsal raphe nucleus in rats exposed to an uncontrollable stressor. **Brain Res**, v. 826, p. 35-43, 1999.

GRAY J.A.; MCNAUGHTON N. **The neuropsychology of anxiety**. 2nd edition. Oxford: Oxford University Press; 2000.

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

GRIEZ, E.J. et al. CO2 vulnerability in panic disorder. **Psychiatry Res**, v. 20, p. 87-95, 1987.

GROSS, C.; HEN R. The developmental origins of anxiety. **Nat Rev Neurosci**, v. 5, p. 545–552, 2004.

HALE, M.W.; SHEKHAR, A.; LOWRY, C.A. Stress-related serotonergic systems: implications for symptomatology of anxiety and affective disorders. **Cell Mol Neurobiol**, v. 32, p. 695-708, 2012.

HANDLEY, S.L. et al. Multiple serotonin mechanism in animal models of anxiety: environmental, emotional and cognitive factors. **Behav. Brain Res**, v. 58, p. 203-210, 1993.

HETEM, L.A.; GRAEFF, F. G. **Transtornos de ansiedade**. 2ª. Ed. São Paulo: Atheneu, 2012.

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

HOFFMAN, G.E.; SMITH, M.S.; VERBALIS, J.G. c-Fos and Related Immediate Early Gene Products as Markers of Activity in Neuroendocrine Systems. **Front. Neuroendocrinol**, v. 14, p. 173-213, 1993.

IGNACIO, D.L. et al. Regulação da massa corpórea pelo estrógeno e pela atividade física. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, V. 53, p. 310–317, 2009.

IMAI, H. et al. The morphology and divergent axonal organization of midbrain raphe projection neurons in the rat. **BRAIN DEV**, v. 8, p. 343-354, 1986.

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

JOH, T.H. et al. Brain tryptophan hydroxylase: purification of, production of antibodies to, and cellular and ultrastructural localization in serotonergic neurons of rat midbrain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 72, p. 3575-3579, 1975.

JOHNSON, P.L. et al. Disruption of GABAergic tone in the dorsomedial hypothalamus attenuates responses in a subset of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus following lactate-induced panic. **J. Psychopharmacol**, v. 22, p. 642-652, 2008.

KALANDAKANOND-THONGSONG, S.; DAENDEE, S.; SRIKIATKHACHORN, A. Effect of the acute and chronic estrogen on anxiety in the elevated T-maze. **Physiol. Behav**, v. 105, p. 357-363, 2012.

KAPLAN, H.I.; SADOCK, B.J.; GREB, J.A. **Compêndio de Psiquiatria: Ciências do Comportamento e Psiquiatria Clínica**. 9ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

KESSLER, R.C. et al. Twelvemonth and lifetime prevalence and lifetime morbid risk of anxiety and mood disorders in the United States. **Int J Methods Psychiatr Res**, v. 21, p. 169–184, 2012.

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

KISER, R.S.; GERMAN, D.C.; LEOVITZ, R.M. Serotonergic reduction of dorsal central gray area stimulation-produced aversion. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 9, p. 27–31, 1978.

KISER, R.S. et al. Dorsal raphe nucleus stimulation reduces centrally-elicited fearlike behavior. **Brain Res**, v.191, p. 265–72, 1980.

KLEIN, D.F. Historical aspects of anxiety. **Dialogues Clin Neurosci**, v. 4, p. 295-304, 2002.

KLOMP, A. et al. Effects of Chronic Fluoxetine Treatment on Neurogenesis and Tryptophan Hydroxylase Expression in Adolescent and Adult Rats. **PLoS One**, v. 9, p. 1-10, 2014.

KLOPPEN, K. et al. Prevalence of Child Sexual Abuse in the Nordic Countries: A Literature Review. **J Child Sex Abus**, v. 25, p. 37-55, 2016.

KREZEL, W. et al. Increased anxiety and synaptic plasticity in estrogen receptor β -deficient mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, p. 12278-12282, 2001.

LOCKE, A.B.; KIRST, N.; SHULTZ, C.G. Diagnosis and management of generalized anxiety disorder and panic disorder in adults. **Am Fam Physician**, v. 91, p. 617-624, 2015.

LOPES, D.A. et al. Unpredictable chronic mild stress exerts anxiogenic-like effects and activates neurons in the dorsal and caudal region and in the lateral wings of the dorsal raphe nucleus. **Behav. Brain Res**, v. 297, p. 180-186, 2016.

LOVICK, T.A. GABA in the female brain — Oestrous cycle-related changes in GABAergic function in the periaqueductal grey matter. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 90, p. 43–50, 2008.

LUO, J. et al. Experimental gastritis leads to anxiety- and depression-like behaviors in female but not male rats. **Behav Brain Funct**, v. 9, no. 1, article 46, 2013.

MARCONDES, F.K. et al. Estrous cycle influences in the response of female rats in the elevated plus-maze test. **Physiol. Behav**, v. 74, p. 435-440, 2001.

MCEWEN, B. Estrogen actions throughout the brain. **Recent Prog Horm Res**, v. 57, p. 357-384, 2002.

MCLEAN, C.P. et al. Gender differences in anxiety disorders: Prevalence, course of illness, comorbidity and burden of illness. **J Psychiatry Res**, v.45, p. 1027-1035, 2011.

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

MORA, S.; DUSSAUBAT N.; DÍAZ-VÉLIZ, G. Effects of the estrous cycle and ovarian hormones on behavioral indices of anxiety in female rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 21, p. 609-620, 1996.

NOMURA, M. et al. Differential distribution of estrogen receptor (ER)- α and ER- β in the midbrain raphe nuclei and periaqueductal gray in male mouse: predominant role of ER- β in midbrain serotonergic systems. **Neuroscience**, v. 130, p. 445-456, 2005.

OBAID, F.P. The incidence of Freudian self-analysis in the construction of the psychoanalytic theory of anxiety. **Int. J. Psychoanal**, v. 95, p. 15-41, 2014.

PALANZA, P. Animal models of anxiety and depression: how are females different? **Neurosci. Biobehav. Rev**, v. 25, p. 219–233, 2001.

PETERSEN, E.N; SCHEEL-KRÜGER, J. Anticonflict effects of 5-HT antagonists by intraamygdaloid injection. **Abstracts of the 14th CINP Congress**, p. 654, 1984.

PIGOTT, T.A. Anxiety disorders in women. **Psychiatr Clin North Am**, v. 26, p. 621-672, 2003.

PIZZO, R.; O'LEARY, O.F.; CRYAN, J.F. Elucidation of the neural circuits activated by a GABAB receptor positive modulator: Relevance to anxiety. **Neuropharmacology**, v. xxx, p. 1-17, 2017.

RANG, H.P. et al. **Farmacologia**. 7^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

RANGEL, M.P. et al. Interaction between μ -opioid and 5-HT_{1A} receptors in the regulation of panic-related defensive responses in the rat dorsal periaqueductal grey. **J. Psychopharmacol**, v. 28, p. 1155-1160, 2014.

ROBERTS, K.M.; Fitzpatrick, P.F. Mechanisms of tryptophan and tyrosine hydroxylase. **IUBMB Life**, v. 65, p. 350-357, 2013.

ROMPRÉ, P.P; MILIARESSIS, E. Behavioral determination of refractory periods of the brainstem substrates of self-stimulation. **Behav Brain Res**, v. 23, p. 205-219, 1987.

RUTTER, M., CASPI, A., MOFITT, T. Using sex differences in psychopathology to study causal mechanisms: unifying issues and research strategies. **Journal of J Child Psychol Psychiatry**, v. 44, p. 1092–1115, 2003.

SANTOS, R.O. et al. Evaluation of the effect of acute sibutramine in female rats in the elevated T-maze and elevated plus-maze tests. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 114, p. 181-187, 2014.

SAPRONOV, N.S.; FEDOTOVA, Y.O.; MALYGINA, E.I. Modulatory effect of 8-OH-DPAT on behavior of ovariectomized female rats. **Bull Exp Biol Med**, v. 137, p. 43-46, 2004.

SHUGHRUE, P.J.; MERCHENTHALER, I. Distribution of estrogen receptor beta immunoreactivity in the rat central nervous system. **J. Comp. Neurol**, V. 436, p. 64-81, 2001.

SILVA, A.F et al. Sex and estrous cycle influence diazepam effects on anxiety and memory: Possible role of ne. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 70, p. 68-76, 2016.

SILVEIRA, M.C. et al. Differential expression of Fos protein in rat brain induced by performance of avoidance or escape in the elevated T-maze. **Behav Brain Res**, v. 126, p. 13-21, 2001.

SOARES, V.P. et al. Intra-dorsal periaqueductal gray administration of cannabidiol blocks panic-like response by activating 5-HT_{1A} receptors. **Behav Brain Res**, v. 213, p. 225-229, 2010.

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

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

STEIN, L.; WISE, C.D.; BELLUZZI, J.D. Effects of benzodiazepines on central serotonergic mechanisms. **Adv Biochem Psychopharmacol**, v. 14, p. 29-44, 1975.

STEINER, M. et al. Gender differences in clinical presentation and response to sertraline treatment of generalized anxiety disorder. **Hum Psychopharmacol**, v. 20, p. 3-13, 2005.

STEINBUSCH, H.W.; VERHOFSTAD, A.A.; JOOSTEN, H.W. Localization of serotonin in the central nervous system by immunohistochemistry: description of a specific and sensitive technique and some applications. **Neuroscience**, v. 3, p. 811-819, 1978.

TYCE, G.M. Origin and Metabolism of Serotonin. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 16, p. 1-7, 1990.

TYE, N.C.; EVERITT, B.J.; IVERSEN, S.D. 5-Hydroxytryptamine and punishment. **Nature**, v. 268, p. 741-742, 1977.

VIANA, M. B. **Mudanças nos conceitos de ansiedade nos séculos XIX e XX: da "Angstneurose" ao DSM-IV**. Tese de Doutorado. Centro de educação e ciências humanas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

WALF, A.A.; FRYE, C.A. Parity and estrogen-administration alter affective behavior of ovariectomized rats. **Physiol. Behav**, v.93, p. 351-356, 2008.

WALF, A.A.; PARIS, J.J.; FRYE, C.A. Chronic estradiol replacement to aged females rats reduces anxiety-like and depression-like behavior and enhances cognitive performance. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, p. 909-916, 2009.

WETHERELL, J.L. et al. Antidepressant medication augmented with cognitive-behavioral therapy for generalized anxiety disorder in older adults. **Am J Psychiatry**, v. 170, p. 782-789, 2013.

WHARTON, W. et al. Neurobiological Underpinnings of the Estrogen – Mood Relationship. **Curr Psychiatry Rev**, v. 8, p. 247-256, 2012.

WISE, C.D.; BERGER, B.D.; STEIN, L. Benzodiazepines: Anxiety reducing activity by reduction of serotonin turnover in the brain. **Science**, v. 177, p. 180-183, 1972.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Investing in treatment for depression and anxiety leads to fourfold return**. Washington DC, EUA: WHO, 2016.

WSCIEKLICA, T. et al. Deep brain stimulation of the dorsal raphe inhibits avoidance and escape reactions and activates forebrain regions related to the modulation of anxiety/panic. **Behav Brain Res**, v. 321, p. 193-200, 2017.

WUTTKE, W.; KELLEHER, R.T. Effects of Some Benzodiazepines on Punished and Unpunished Behavior in the Pigeon. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 172, p. 397-405, 1970.

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

ZANGROSSI JR, H.; GRAEFF, F.G. Serotonin in anxiety and panic: Contributions of the elevated T-maze. **Neurosci. Biobehav. Rev**, v. 46, p. 397-406, 2014.

Artigo: ATIVAÇÃO SEROTONÉRGICA E NÃO-SEROTONÉRGICA NOS NÚCLEOS MEDIANO E DORSAL DA RAFE, NAS DIFERENTES FASES DO CICLO ESTRAL DE RATAS E APÓS OVARIECTOMIA.

O artigo escrito para esta dissertação foi redigido conforme as normas da revista *PLOS ONE*, exceto pelo posicionamento das figuras. De acordo com as normas da revista, para a submissão, todas devem ser em anexo ao artigo, mas, para este momento, visando um melhor entendimento do mesmo, as dispusemos na sequência textual, conforme orientação da coordenação da Pós-Graduação. Ao submeter o artigo, serão colocadas conforme exigência do periódico.

RESEARCH REPORT

ATIVACÃO SEROTONÉRGICA E NÃO-SEROTONÉRGICA NOS NÚCLEOS MEDIANO E DORSAL DA RAFE, NAS DIFERENTES FASES DO CICLO ESTRAL DE RATAS E APÓS OVARIECTOMIA

Matheus Fitipaldi Batistela^{a¶&}, Sergio Romeo Biasi Filho^{a¶}, Marina Miguel Ferreira^{a¶}, Camila Marroni Roncon^{a¶}, Ailton Spiacci Júnior^{b¶}, Hélio Zangrossi Júnior^{b¶}, Telma Gonçalves Carneiro Spera de Andrade^{c*¶&}

^a Laboratório de Fisiologia, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade do Estado de São Paulo (UNESP), Faculdade de ciências e Letras, Assis, SP, Brasil

^b USP – Univ. de São Paulo, FMRP – Ribeirão Preto – São Paulo - Brasil

^c UNESP – Univ do Estado de São Paulo, FCL, Departamento de Ciências Biológicas - Avenida Dom Antonio, 2100 – 19.806-900 – Assis – SP – Brasil

*Autor Correspondente

Endereço de e-mail: raica@assis.unesp.com

¶ Esses autores contribuíram igualmente na execução desse trabalho.

¶& Esses autores contribuíram igualmente na idealização, organização, execução, escrita e revisão deste trabalho.

Resumo

Deakin e Graeff propuseram que a ansiedade e o pânico são regulados pela serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT), possuindo mais de um mecanismo de controle. Ambos os mecanismos de controle têm sua origem no Núcleo Dorsal da Rafe (NDR) e no Núcleo Mediano da Rafe (NMR). O NDR possui ainda, cinco diferentes subnúcleos ao longo do eixo rostrocaudal: dorsal (DRD), ventral (DRV), lateral/asas laterais (lwDR), caudal (DRC) e interfascicular (DRI), sendo que os subnúcleos DRC, DRD e DRI originam a via modulatória do transtorno de ansiedade generalizada e o subnúcleo lwDR origina a via modulatória do transtorno do pânico. Sabe-se que as mulheres são mais suscetíveis à manifestação dos transtornos de ansiedade e de pânico do que os homens. Estudos com modelos animais de ansiedade mostraram que nas fases do ciclo hormonal onde ocorre maior liberação de estrógeno, proestro e estro, foi constatada ansiólise. De maneira oposta, animais na fase de metaestro e diestro, nas quais há baixa concentração sérica de estrógeno, os comportamentos defensivos observados foram no sentido da ansiogênese. Receptores para estrógeno, alfa ($ER\alpha$) e beta ($ER\beta$), foram encontrados em estruturas encefálicas relacionadas com a manifestação dos transtornos de ansiedade e co-localizadas em receptores serotoninérgicos. Assim, esse estudo teve por objetivo avaliar a ativação de neurônios serotoninérgicos e não-serotoninérgicos no NMR e nos diferentes subnúcleos do NDR em relação à fase do ciclo estral de ratas e após a ovariectomia bilateral. As fêmeas foram perfundidas e os encéfalos foram processados a fim de se realizar o processo de imunohistoquímica de dupla-marcação para a proteína c-Fos (marcador indireto de ativação celular) e da enzima triptofano hidroxilase (TPH – presente

somente em neurônios serotoninérgicos). Não se constatou qualquer diferença quando se analisou o NMR. Constatou-se um maior número de neurônios serotoninérgicos e não-serotoninérgicos ativados na fase de proestro, principalmente nos subnúcleos Dorsal (DRD) e Caudal (DRC). Enquanto que na fase de diestro e após ovariectomia bilateral os resultados apontaram um menor número na expressão de TPH nos subnúcleos DRD, Ventral (DRV) e DRC. Os resultados encontrados são compatíveis com achados anteriores que indicam que os subnúcleos dorsal e caudal são responsáveis pela modulação de comportamentos defensivos relacionados à ansiedade. Como houve diferença na ativação das estruturas ao longo do ciclo estral conclui-se que a presença de hormônios sexuais, principalmente o estrógeno, é responsável por essas alterações observadas.

Introdução

Deakin e Graeff (1991) propuseram que tanto a ansiedade como o pânico são regulados pela serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT), ressaltando que esses transtornos possuem mais de um mecanismo de controle. Distúrbios ocorridos na via Núcleo Dorsal da Rafe (NDR)/Córtex Pré-Frontal/Hipocampo/Amígdala/ seriam responsáveis pela manifestação do Transtorno de Ansiedade Generalizada (TAG), e na via NDR/Substância Cinzenta Periaquedutal dorsal (SCPd) causariam o Transtorno do Pânico (TP). Além disso, o mau funcionamento das projeções do Núcleo Mediano da Rafe (NMR) a receptores 5-HT_{1A} localizados no Hipocampo estariam relacionadas com a resistência ao estresse crônico e com o surgimento de sintomas

depressivos, e também com a manifestação da ansiedade (Andrade et al., 2013 para revisão).

Sabe-se que as mulheres são mais suscetíveis à manifestação dos transtornos de ansiedade e de pânico do que os homens (Donner e Lowry, 2013; Kessler et al., 2012), chegando ao dobro em alguns tipos de desordens, como é o caso do TAG (Bandelow & Michaelis, 2015; McLean, et al., 2011). Estudos recentes realizados em roedores em modelos animais de ansiedade mostraram que nas fases do ciclo hormonal onde ocorre maior liberação de estrógeno (fases de proestro e estro), ou em decorrência da própria reposição estrogênica após ovariectomia bilateral, constatou-se ansiólise (Díaz-Velíz et al., 1997; Marcondes et al., 2001; Mora et al., 1996; Walf e Frye, 2009). De maneira oposta, animais na fase de diestro (baixa concentração sérica de estrógeno) apresentaram comportamentos defensivos na direção da ansiogênese no Labirinto em Cruz Elevado (LCE), enquanto que nas fases de proestro e estro os níveis de ansiedade foram bem mais baixos (Frye et al., 2000; Marcondes et al., 2001). Quando houve análise da influência da luminosidade, um fator que afeta consideravelmente o comportamento que envolve as vias serotoninérgicas (Handley et al., 1993), ratas em metaestro apresentaram uma exploração maior dos braços abertos sob elevada intensidade luminosa. Por outro lado, ratas em proestro e estro tiveram uma exploração maior dos braços abertos somente em baixa luminosidade (Mora et al., 1996). Tais evidências sugerem que existe uma interação entre atividade dos hormônios sexuais e atividade serotoninérgica sobre receptores 5-HT_{1A}, já que estes são modulados pelas variações de iluminação do ambiente, conforme já ressaltado (Handley et al., 1993). No teste do Labirinto em T-

Elevado (LTE) (Gouveia Jr et al., 2004), Interação Social e Condicionamento Contextual (Frye et al., 2000) e Campo Aberto (Frye e Walf, 2002) os resultados encontrados foram similares, sendo que ratas em proestro apresentam comportamentos relacionados com a diminuição da ansiedade, enquanto que ratas em diestro apresentam um comportamento oposto.

Shughrue e Merchenthaler (2012) utilizando imunoreatividade e com base na análise da expressão de RNAm identificaram receptores para estrógeno, alfa ($ER\alpha$) e beta ($ER\beta$), em estruturas encefálicas relacionadas com a manifestação dos transtornos de ansiedade, como por exemplo amígdala, córtex cerebral e hipocampo. Também foram encontrados esses receptores em corpos celulares de neurônios no NDR e NMR, e também na Substância Cinzenta Periaquedutal (SCP) (Alves et al., 1998), verificou-se que os $ER\beta$ estavam mais concentrados nas subdivisões dorsal e ventral do NDR e no NMR (Nomura et al., 2005).

O Estudo morfológico *in situ* realizado por Nomura e colaboradores (2005) com marcação neuronal dupla para $ER\alpha$ e $ER\beta$ e também para triptofano hidroxilase (TPH), enzima presente em neurônios serotoninérgicos permitindo a síntese desse neurotransmissor a partir do aminoácido triptofano, encontraram que mais de 90% das células que apresentavam $ER\beta$ também continham a TrpOH, e que quando analisadas as células que continham $ER\alpha$, esse valor caía para 23%. Nesse âmbito, Solomon e Herman (2009), argumentaram que os $ER\beta$ estariam mais envolvidos com a modulação das emoções e que os $ER\alpha$ com estruturas ou sistemas relacionados à reprodução e metabolismo geral. Esses achados apontam que o estrógeno atua sobre receptores de serotonina e que há uma estreita relação de ambos na

manifestação de comportamentos relacionados aos transtornos de ansiedade e que essa influência hormonal poderia justificar as diferenças encontradas ao longo do ciclo estral em relação a esses comportamentos.

Em um aspecto molecular, além da administração central no NMR de Benzoato de Estradiol (BE) ter alterado a morfologia do hipocampo, levando a um aumento da densidade das sinapses nessa estrutura (Prange-Kiel et al., 2003), a reposição hormonal realizada com BE aumentou a expressão de mRNA da enzima TPH tanto no NMR quanto no NDR. Quando comparado, observou-se que fêmeas ovariectomizadas bilateralmente, tratadas com estradiol, tiveram um aumento ainda maior na expressão de mRNA da mesma enzima. Isso exprime que o estrógeno é capaz de aumentar a capacidade de síntese de serotonina em estruturas relacionadas com a ansiedade (Hiroi et al., 2006). Essa reposição diminuiu a expressão de mRNA de receptores do tipo 5-HT_{1B} no NDR de ratas ovariectomizadas, não alterando a expressão do tipo 5-HT_{1A}. Essa diminuição causou uma associação inversa, mostrando uma tendência de aumento nos níveis de mRNA da TPH nas sub-regiões ventro-medial e dorso-medial do NDR. É possível que o acréscimo na expressão de TPH, levando a um aumento da disponibilidade de serotonina, tenha ocasionado um quadro de ansiólise (Hiroi & Neumaier, 2009).

Trabalhos com análise de c-Fos, uma proteína da classe das *immediate early genes*, que são capazes de alterar sua transcrição gênica rapidamente mediante a um estímulo (Hoffman et al., 1993), foram realizados em fêmeas. No trabalho de Sayin e colaboradores (2014) com a administração de citalopram, um antidepressivo inibidor seletivo de recaptação de serotonina (ISRS), a expressão da proteína c-Fos em ratas avaliadas no LCE, foi

suprimida em relação ao grupo controle no Córtex Cingulado, Amígdala e Núcleo Talâmico Paraventricular. Apesar de fêmeas em proestro apresentarem um comportamento do tipo ansiolítico em relação às outras fases, não houve diferenças na expressão da proteína entre as fases do ciclo no grupo controle. Diferentemente, no trabalho de Figueiredo e colaboradores (2002) verificou-se que ratas em proestro e estro têm uma ativação neuronal menor em regiões corticais e no Hipocampo que aquelas em diestro ou em machos, ao serem submetidas previamente a um estressor agudo.

Estudo com dupla-marcação neuronal realizado em machos, tanto para proteína c-Fos quanto para TPH foi realizado por Spiacci Jr. e colaboradores (2012) em machos. Os resultados encontrados demonstraram que a esquia no LTE, relacionada com o TAG, aumenta a ativação serotoninérgica de neurônios localizados nos subnúcleos dorsal, caudal e interfascicular do NDR, e no NMR. Também demonstraram que a fuga, relacionada com o TP, eleva a ativação de neurônios não-serotoninérgicos nas subdivisões dorsolateral e dorsomedial da SCP, e nas asas laterais do NDR.

Considerando que nas diferentes fases do ciclo estral as fêmeas possuem comportamentos distintos em relação à manifestação dos transtornos de ansiedade e do pânico e visto que não há se identificou relatos de pesquisas que tenham avaliado a ativação de neurônios serotoninérgicos no NMR e nos diferentes subnúcleos do NDR, em relação às diferentes fases do ciclo de fêmeas e em ratas menopausadas cirurgicamente, formulou-se a hipótese de que existem diferenças no recrutamento de neurônios serotoninérgicos e não-serotoninérgicos no NMR e nos diferentes subnúcleos do

NDR entre as fases do ciclo estral de ratas e após o procedimento de ovariectomia bilateral.

Assim, esse estudo teve por objetivo analisar a ativação de neurônios serotoninérgicos e não-serotoninérgicos através do protocolo de Imunohistoquímica de dupla-marcação (Triptofano Hidroxilase e proteína c-Fos) em cada uma das fases do ciclo estral e após ovariectomia bilateral no NMR e nas seguintes sub-regiões do NDR ao longo do eixo rostrocaudal: Caudal (DRC), Interfascicular (DRI), Ventral (DRV), Dorsal (DRD) e Asas Laterais, tendo como parâmetro o estudo realizado em machos por Spiacci Jr. et al. (2012).

Materiais e Métodos

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências e Letras da UNESP – Assis (Registro 001/2016). Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com as normas da Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento, visando minimizar o sofrimento animal.

Animais

Foram utilizadas ratas (*Rattus norvegicus*) da linhagem *Wistar* advindas do biotério central da UNESP – Botucatu, com peso entre 200-250 gramas e 2 meses de idade no início das sessões experimentais. Os animais foram alocados no biotério de fêmeas, 5 animais em caixas de polipropileno (38 x 32 x 18 cm), forradas com serragem, com ciclo claro/escuro de vinte e quatro horas (luzes se acendendo as 7h e apagando as 19h), 50 lux no centro da sala,

temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, recebendo comida e água *ad libitum*. Após a chegada dos animais e agrupamento dos mesmos, estes permaneceram em ambientação no biotério por um período mínimo de 1 semana, sendo submetidos à manipulação somente 3 vezes por semana durante as trocas das caixas.

Cirurgias

OVARIECTOMIA BILATERAL - Esse procedimento foi desenvolvido em ratas anestesiadas com tribromoethanol (sigma, EUA) – 250mg/Kg por via intraperitoneal. Após tricotomia na região dorsal, entre a borda inferior das costelas e a porção mais alta da cintura pélvica, e anti-sepsia com polivinilpirrolidona-iodo a 1% (PVPI), foi feita uma incisão na linha mediana, separando, através de divulsão, a pele do dorso em relação ao plano muscular. Após divulsão da parede muscular, localizou-se o ovário na massa gordurosa peri-renal logo abaixo do rim. Após pinçamento da porção superior do útero, foi realizada uma ligadura e logo em seguida a dissecação total do ovário. O mesmo procedimento foi realizado do outro lado, fechando-se a seguir as paredes musculares e a pele.

PERFUSÃO - Os animais foram anestesiados com Thiopental sódico (Thiopentax – Cristália) em dose letal. Na sequência as ratas foram perfundidas (perfusão intracardíaca) com Solução Salina Tamponada (PBS 0,01M, pH: 7,4; 4°C), seguida de solução de Paraformaldeído 4% (PFA - pH: 7,4, 1000 mL/Kg; 4°C). A perfusão foi realizada com o auxílio de uma bomba de perfusão, e mantida a uma taxa de 22 mL/min. Após a perfusão, os encéfalos foram cuidadosamente removidos e armazenados por 2 horas em PFA 4% para

fixação. Posteriormente, os encéfalos foram crioprotégidos em solução de sacarose 30% em tampão fosfato (PB 0,2M, 4°C /3 dias). Após estes procedimentos, os encéfalos foram cuidadosamente congelados em Isopentano (mantido em gelo seco) e estocados em Freezer (-80°C) até serem processados.

Histologia

ESFREGAÇO VAGINAL - Para verificação e separação das ratas em suas fases do ciclo e confirmação da ausência de ciclagem em ratas ovariectomizadas, foi realizado o esfregaço vaginal entre as 8 e as 11 horas da manhã. Esse procedimento foi feito através de “swab” vaginal. Para isso, foi utilizado um cotonete umidificado e introduzido no canal vaginal do animal. Esse cotonete foi girado gentilmente dentro do canal para agregar as células da parede, e sequencialmente retirado de dentro do canal e passado em uma lâmina de vidro para microscópio para que houvesse a transferência das células do cotonete para a lâmina. A fixação e coloração do tecido foram feitas através do método de Hematoxilina-Shorr. A rotina para coloração consiste em deixar as lâminas mergulhadas por 5 minutos em uma solução de álcool etílico absoluto e éter etílico na proporção de 95:5; 5 minutos em álcool etílico 70%; 5 minutos em álcool etílico 50%; lavagem das lâminas em água de torneira; lavagem das lâminas em água destilada; 3 minutos em Hematoxilina de Harris; lavagem durante 5 minutos em água de torneira; lavagem em água destilada; 6 minutos em Shorr; lavagem das lâminas em água de torneira para retirar o excesso de corante; e deixar as lâminas secarem ao ar livre.

CORTES ENCEFÁLICOS - Com auxílio de um criostato (LEICA CM1850, Alemanha), os encéfalos foram cortados em secções coronais de 40 µm de espessura. As secções contendo o NDR foram coletadas e armazenadas em solução de PBS.

Imunohistoquímica – Dupla-Marcação (c-Fos e TPH)

As reações de imunohistoquímica para detecção da proteína c-Fos e da enzima Triptofano Hidroxilase (TPH) foram realizadas utilizando o método de *free-floating*.

Primeiramente, foi realizada a técnica de imunohistoquímica para detecção da proteína c-Fos, conforme descrito a seguir. As secções foram lavadas 3 vezes em solução de PBS, permaneceram imersas em solução de peróxido de hidrogênio 1% em PBS por 10 minutos e foram lavadas 4 vezes em PBS. Os tecidos foram imersos em solução de albumina bovina sérica (BSA 1% em PBS) por 30 minutos, seguida pela incubação “*overnight*” com o anticorpo primário anti-Fos (IgG de coelho, 1:900, Santa Cruz Biotechnology, cat nº SC-52, Estados Unidos) diluído em solução de PBS+ (PBS 0,01M, BSA 0,3%, triton x-100 0,2%). Após a incubação com o anticorpo primário, as secções foram lavadas 4 vezes em PBS e incubadas por 2 horas com anticorpo secundário biotinelado, anti-IgG de coelho (1:900, Vector, cat nº BA-1000, Estados Unidos). As secções foram então lavadas 4 vezes em PBS e incubadas por duas horas com complexo avidina-biotina-peroxidase (1:900, reagente ABC elite, Vector, Estados Unidos). A reação imunohistoquímica foi revelada com solução de PBS contendo 3,3-diaminobenzidina (DAB 0,02%), peróxido de hidrogênio (0,0015%) e sulfato de níquel (0,05%).

Após os ensaios imunohistoquímicos para proteína c-Fos, as secções foram lavadas 4 vezes em PBS, seguido pelo ensaio imunohistoquímico para detecção da enzima TPH, conforme descrito adiante. Inicialmente, os tecidos foram encubados “*overnight*” com o anticorpo primário anti-TPH (IgG de ovelha, 1:1000, Santa Cruz Biotechnology, cat. nº SC-52, Estados Unidos) diluído em solução de PBS+ (PBS 0,01M, BSA 0,3%, triton x-100 0,2%). Após a incubação com o anticorpo primário, as secções foram lavadas quatro vezes em PBS e incubadas por duas horas com o anticorpo secundário biotinelado, anti-IgG de ovelha (1:1000, Vector, cat nº BA-6000, Estados Unidos). A reação de imunohistoquímica foi revelada com solução de PBS contendo 3,3-diaminobenzidina (DAB 0,02%) e peróxido de hidrogênio (0,0015%).

As secções coronais foram montadas em lâminas brancas (Knittel Glaser, Alemanha), desidratadas, diafanizadas e cobertas com lamínulas (Knittel Glaser, Alemanha) usando-se Permount® (Fisher Scientific, UK).

Análise e Quantificação Neuronal

As reações imunohistoquímicas foram visualizadas com o auxílio de microscópio (Olympus DX50). O NMR e o NDR foram fotografados e as imagens foram analisadas através do software Image Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, USA).

Os neurônios Fos positivos puderam ser identificados pela presença de pigmentação preta restrita ao núcleo neuronal, enquanto que os neurônios TPH positivos foram identificados pela presença de pigmentação marrom-alaranjada restrita ao citoplasma neuronal (Ver Fig 1). Foram mensurados o número total de células Fos-imunorreativas (Fos-IR), o número total de neurônios TPH-

imunorreativos (TPH-IR) e o número total de dupla-marcações (Fos/TPH-IR) em apenas um nível do eixo rostro-caudal (-7,92 e -8,28mm do bregma) do NMR, de acordo com Silveira et al. (2001). As mesmas quantificações foram realizadas no NDR em suas diferentes sub-regiões, em quatro diferentes níveis do eixo rostro-caudal, de acordo com Gardner et al (2005). As sub-regiões avaliadas foram: no nível rostral (-6.84 a -7.08mm bregma) foi analisado o DRD. Nos níveis médio-rostral (-7.20 a -7.80mm bregma) e médio-caudal (-7.92 a -8.28mm bregma) foram analisadas as sub-regiões DRD, DRV e asas laterais. Ao nível caudal (-8.52 a -9.00mm bregma) foram analisados o DRC e o DRI.

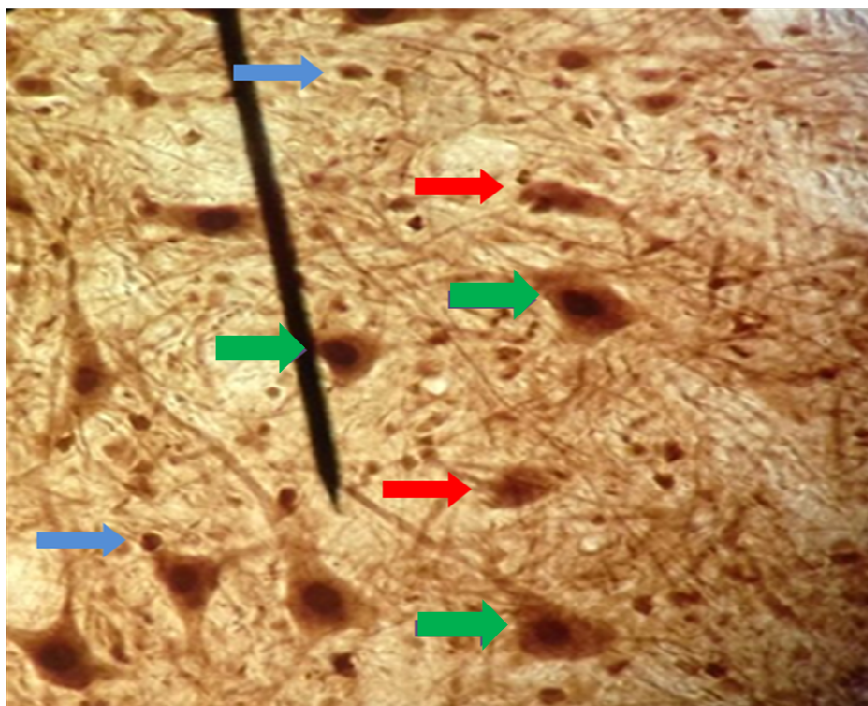


Fig 1. Fotomicrografia em microscópio com aumento de 40x de uma subregião do NDR processada pelo método imunoistoquímico para detecção da proteína c-Fos e TPH. Na figura observa-se células c-Fos imunorreativas (setas azuis), células TPH imunorreativas (setas vermelhas) e duplas-marcações (neurônios c-Fos e TPH imunorreativos, setas verdes)

Análise Estatística

O número de neurônios c-Fos-imunorreativos (c-Fos+), duplamente marcados (c-Fos + / TPH +) e células TPH-imunorreativas (TPH +) medidos no

NMR e nas diferentes subdivisões do NDR foram analisados separadamente usando Análise de Variância (ANOVA) de uma via. Foi aplicado o teste *post hoc* de Duncan para comparação entre as fases do ciclo. As diferenças nos resultados foram consideradas significativas quando o valor de p foi menor que 0,05.

Resultados

Foram avaliadas fêmeas nas diferentes fases: Proestro (n=3), Estro (n=7), Metaestro (n=5) e Diestro (n=4) e após ovariectomia bilateral (n=4). As fases do ciclo foram constatadas através do esfregaço vaginal. Nesta avaliação foi analisada a presença de três tipos celulares: células nucleadas, células queratinizadas e leucócitos. O proestro foi definido por conter os 3 tipos celulares, porém com maior presença de células nucleadas; no estro há predominância de células queratinizadas e ausência de leucócitos; no metaestro também há presença das três tipos celulares porém em proporções iguais. Já o diestro foi caracterizado por conter predominantemente leucócitos. Para constatação do sucesso da ovariectomia, foi observada a fase de anestro, na qual não há nenhum dos três tipos celulares, apenas muco vaginal.

Núcleo Mediano da Rafe (NMR)

A ANOVA de uma via mostrou não haver diferenças no efeito dos grupos e a expressão de c-Fos [$F(4,18) = 0,29$; $p = 0,880$], TPH [$F(4,18) = 1,23$; $p = 0,335$] e dupla-marcação [$F(4,18) = 0,95$; $p = 0,460$] neste núcleo. Em nenhum

dos casos houve diferença estatística entre as fases do ciclo, mostrado pelo teste *post-hoc* de Duncan (Fig 2).

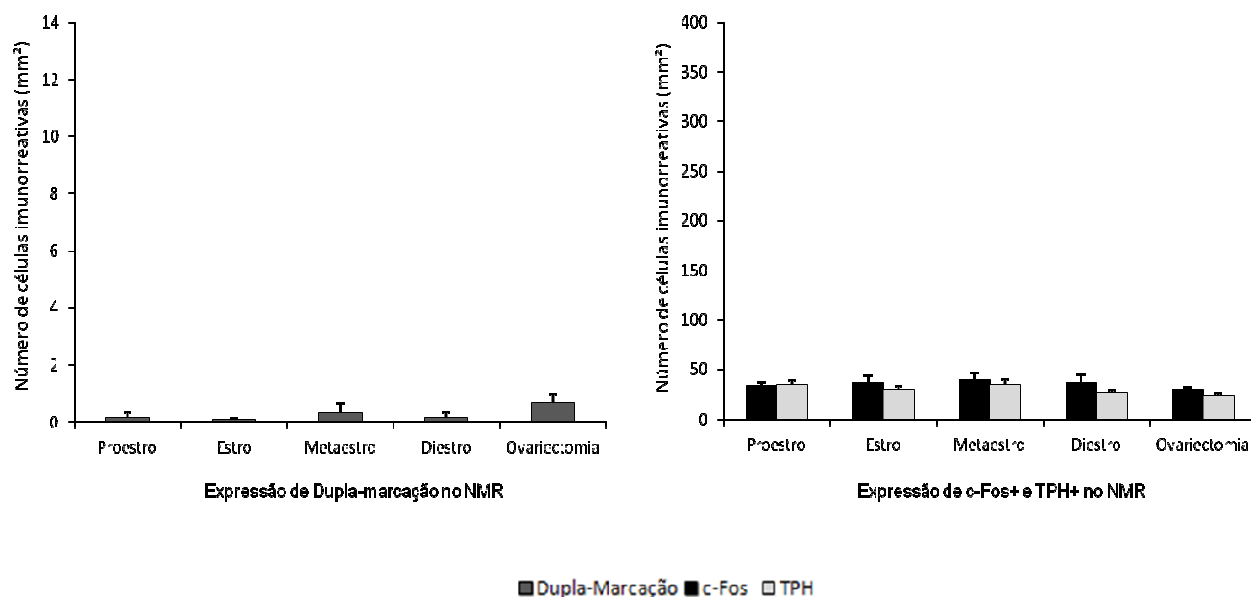


Fig 2. Média + EPM da presença de dupla-marcação, ativação da proteína c-Fos e presença da enzima triptofano hidroxilase no NMR, nas 4 fases do ciclo estral e no grupo de ratas ovariectomizadas. ANOVA de uma via seguida pelo teste de Duncan

Núcleo Dorsal da Rafe (NDR)

Eixo Rostral

A ANOVA apontou que não houve diferença entre as fases do ciclo quanto à dupla-marcação [$F(4,18) = 1,71$; $p = 0,192$], porém houve diferenças quanto à ativação da TPH [$F(4,18) = 1,67$; $p < 0,001$] e ativação da proteína c-Fos [$F(4,18) = 10,31$; $p < 0,001$] no subnúcleo dorsal do eixo rostral. O teste *post hoc* de Duncan mostrou que em relação à ativação não-serotonérgica (pela ativação da proteína c-Fos, apenas), ratas na fase do proestro obtiveram uma maior expressão da proteína c-Fos em comparação aos outros grupos ($p < 0,001$), na fase de diestro houve maior expressão da proteína c-Fos em relação as as fases de estro e metaestro ($p < 0,01$), não diferindo em relação ao

grupo de ratas ovariectomizadas ($p = 0,25$), e este último grupo com maior expressão de c-Fos que ratas em estro ($p < 0,05$). Quanto à presença da TPH, ratas em proestro obtiveram maior número de células imunorreativas em comparação a fase de diestro ($p < 0,05$) e ao grupo de ratas ovariectomizadas ($p < 0,05$), podendo ser observado na Fig 3.

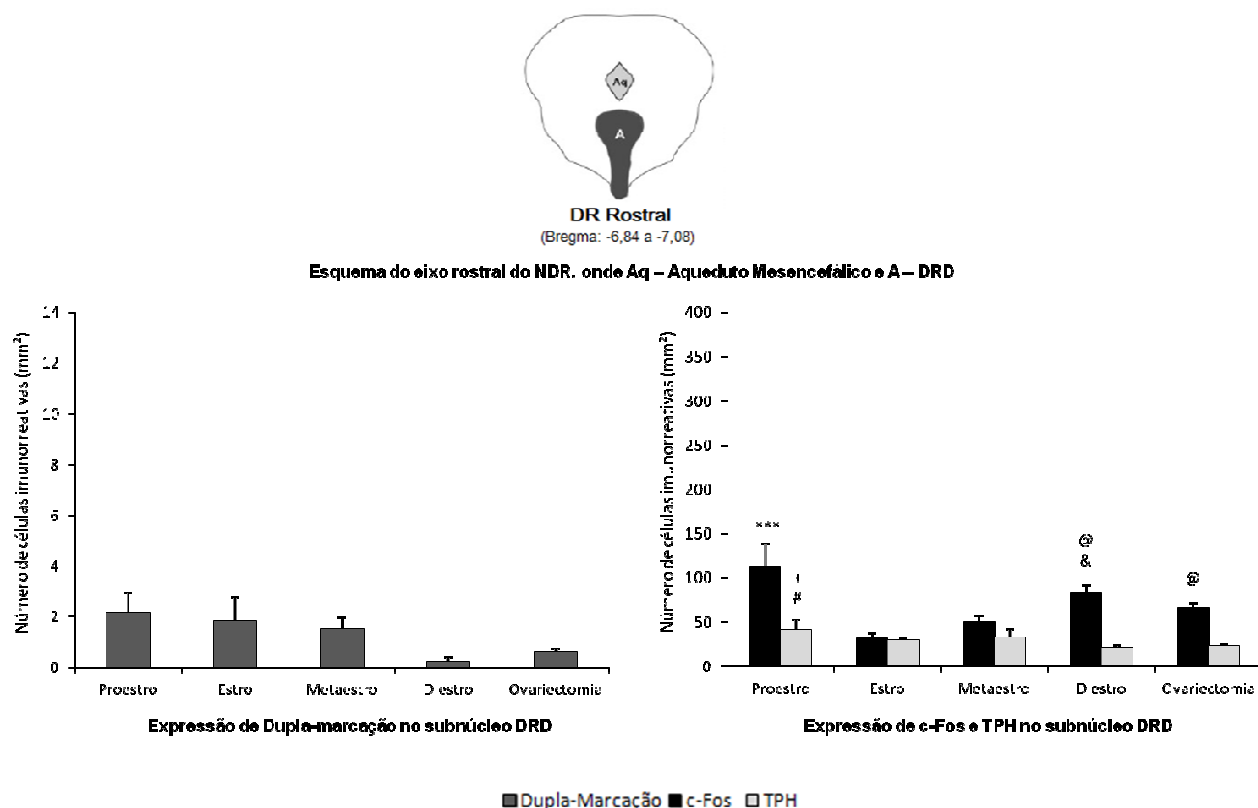


Fig 2. Média + EPM da presença de dupla-marcação, ativação da proteína c-Fos e presença da enzima triptofano hidroxilase no eixo rostral do NDR nas 4 fases do ciclo estral e no grupo de ratas ovariectomizadas. ANOVA de uma via seguida pelo teste de Duncan: *** $p < 0,001$ em comparação a todos os grupos; + $p < 0,05$ em relação à fase de diestro; # $p < 0,05$ em relação ao grupo de ovariectomia; @ $p < 0,05$ em relação à fase de estro; & $p < 0,05$ em relação à fase de metaestro

Eixo Médio-Rostral

Quanto ao DRD do eixo Médio-rostral, a ANOVA mostrou não haver diferença entre as fases do ciclo quanto à dupla-marcação [$F(4,18) = 0,86$; $p = 0,505$] tendo diferenças tanto para células imunorreativas para TPH [$F(4,18) = 1,01$; $p = 0,042$] quanto para ativação de c-Fos [$F(4,18) = 8,77$; $p < 0,001$]. O

teste *post hoc* de Duncan apontou uma maior ativação da c-Fos na fase de proestro em comparação as outras fases ($p < 0,001$) e um menor valor dessa mesma expressão na fase de metaestro em comparação a fase de diestro ($p < 0,001$) e à ratas ovariectomizadas ($p < 0,05$).

A ANOVA de uma via apontou diferenças das fases do ciclo em relação à ativação da c-Fos [$F(4,18) = 27,90$; $p < 0,001$] e da TPH [$F(4,18) = 6,64$; $p < 0,001$], não demonstrando diferença quanto as duplas-marcações [$F(4,18) = 0,95$; $p = 0,456$] em relação ao subnúcleo DRV. O teste *post-hoc* de Duncan mostrou um maior valor na expressão de c-Fos ($p < 0,001$) e menor valor ($p < 0,001$) dessa mesma expressão nas fases de proestro e metaestro, respectivamente. Na fase de Diestro foi observada uma diminuição em relação as células imunorreativas para TPH entre as outras fases ($p < 0,001$), não mostrando diferença em relação ao grupo ovariectomizado ($p = 0,064$).

Os resultados da última subregião analisada deste eixo, as asas laterais, A ANOVA demonstrou não haver diferenças na dupla-marcação [$F(4,18) = 0,84$; $p = 0,51$] em relação os grupos. Opostamente, houve diferença na expressão de c-Fos [$F(4,18) = 29,62$; $p < 0,001$] e TPH [$F(4,18) = 10,96$; $p < 0,001$]. Nessa estrutura, o *post-hoc* de Duncan demonstrou uma maior expressão de c-Fos em ratas no proestro ($p < 0,001$) e diestro ($p < 0,001$), esta última não diferenciando do grupo de ratas ovariectomizadas ($p = 0,103$), além uma menor expressão na fase de metaestro comparada ao grupo ovariectomia ($p < 0,01$) e maior expressão de TPH na fase de estro em comparação aos outros grupos ($p < 0,001$), além de maior expressão no grupo de ratas no metaestro em comparação ao diestro ($p < 0,001$). Os resultados para o eixo médio-rostral podem ser visualizados na Fig 4.

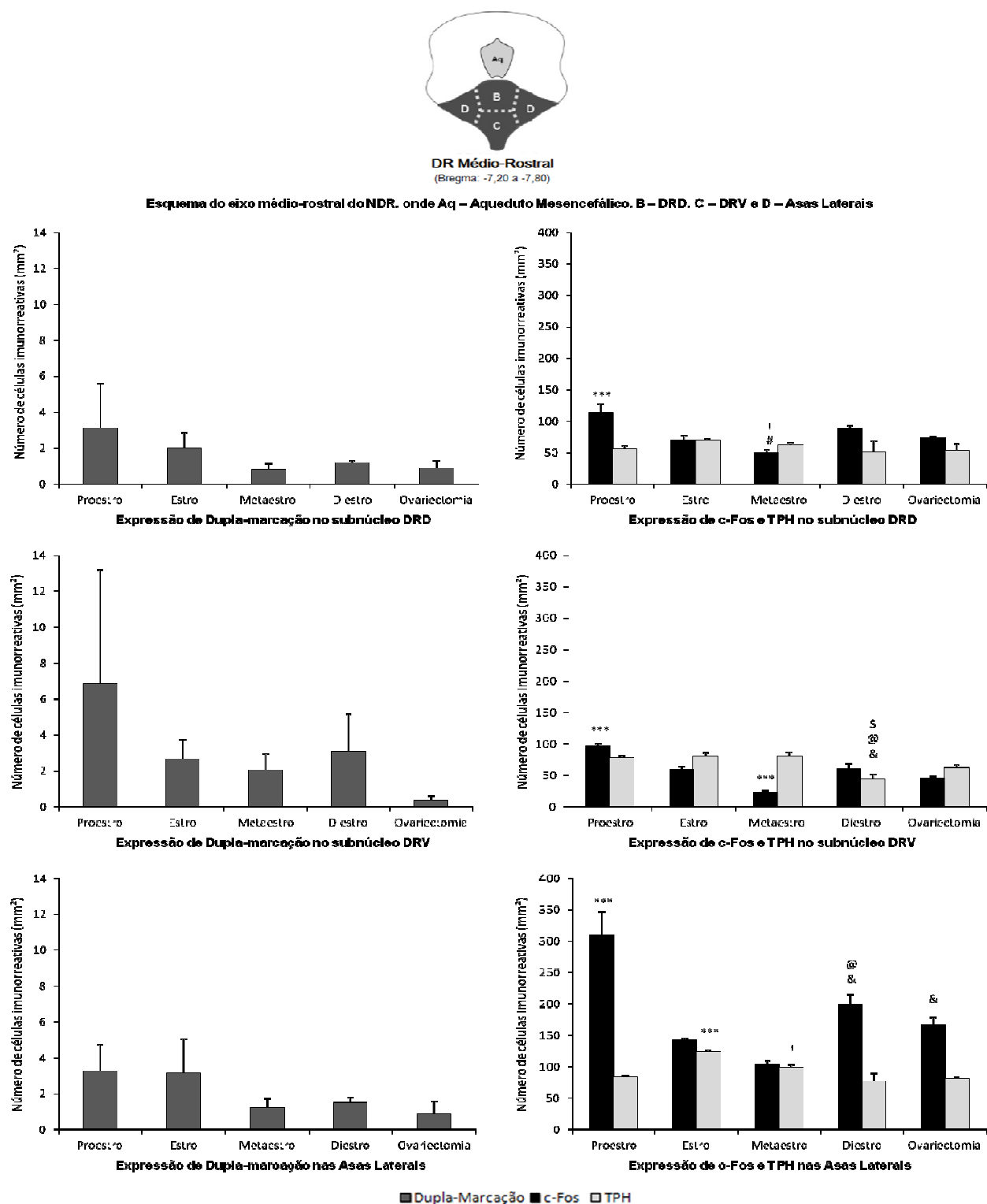


Fig 4. Média + EPM da presença de dupla-marcação, ativação da proteína c-Fos e presença da enzima triptofano hidroxilase no eixo médio-rostral do NDR, nos subnúcleos dorsal, ventral e asas laterais, nas 4 fases do ciclo estral e no grupo de ratas ovariectomizadas. ANOVA de uma via seguida pelo teste de Duncan: *** $p < 0,001$ em relação a todos os grupos; + $p < 0,05$ em relação à fase de diestro; # $p < 0,05$ em relação ao grupo de ovariectomia; @ $p < 0,05$ em relação à fase de estro; & $p < 0,05$ em relação à fase de metaestro; \$ $p < 0,05$ em relação à fase de proestro

Eixo Médio-Caudal

A ANOVA de uma via mostrou que, para o subnúcleo DRD (Fig 5), não houve diferença entre as fases do ciclo quanto à dupla-marcação [$F(4,18) = 0,81$; $p = 0,533$], porém mostrou haver diferenças tanto para ativação da TPH [$F(4,18) = 5,75$; $p = 0,003$] quanto para ativação de c-Fos [$F(4,18) = 3,96$; $p = 0,018$]. O *post-hoc* de Duncan apontou uma menor expressão de c-Fos na fase de metaestro ($p < 0,05$) em comparação a todos os outros grupos. Quanto à presença de células imunorreativas para TPH, na fase de diestro ($p < 0,05$) e no grupo de ratas ovariectomizadas ($p < 0,01$) houve um menor número em relação aos outros grupos, não diferindo entre si ($p = 0,664$).

Quanto ao DRV, novamente a ANOVA mostrou não haver diferença dos grupos quanto à dupla-marcação [$F(4,18) = 0,60$; $p = 0,671$], porém havendo diferenças tanto para ativação da c-Fos [$F(4,18) = 5,93$; $p = 0,003$] quanto para ativação da TPH [$F(4,18) = 2,97$; $p = 0,048$]. O teste *post-hoc* de Duncan mostrou que na fase de proestro há uma maior expressão de c-Fos em comparação as fases de estro ($p < 0,01$) e metaestro ($p < 0,001$) e ao grupo ovariectomizado ($p < 0,05$), enquanto que na fase de metaestro há uma menor expressão dessa mesma ativação em comparação ao diestro ($p < 0,01$). O teste mostrou que na fase de diestro há uma menor expressão de células imunorreativas para TPH em relação à fase de estro ($p < 0,05$).

As asas laterais do eixo rostro-caudal foram analisadas pela ANOVA de uma via e os resultados encontrados mostram que não houve diferenças dos grupos em relação à dupla-marcação [$F(4,18) = 0,84$; $p = 0,515$], mostrando diferença em relação à ativação de c-Fos [$F(4,18) = 29,62$; $p < 0,001$] e da TPH

[$F(4,18) = 10,96$; $p < 0,001$]. O teste *post-hoc* de Duncan indicou maior expressão de TPH na fase de estro ($p < 0,05$) em comparação aos outros grupos e uma menor expressão dessa mesma enzima na fase de diestro comparada ao metaestro ($p < 0,05$). Quanto à ativação de proteína c-Fos, houve maior expressão na fase de proestro em comparação aos outros grupos ($p < 0,05$), havendo também uma maior expressão na fase de diestro em comparação as fases de estro ($p < 0,05$) e metaestro ($p < 0,001$). O grupo ovariectomizado mostrou também um maior número de células TPH reativas em comparação ao grupo de ratas em metaestro ($p < 0,01$).

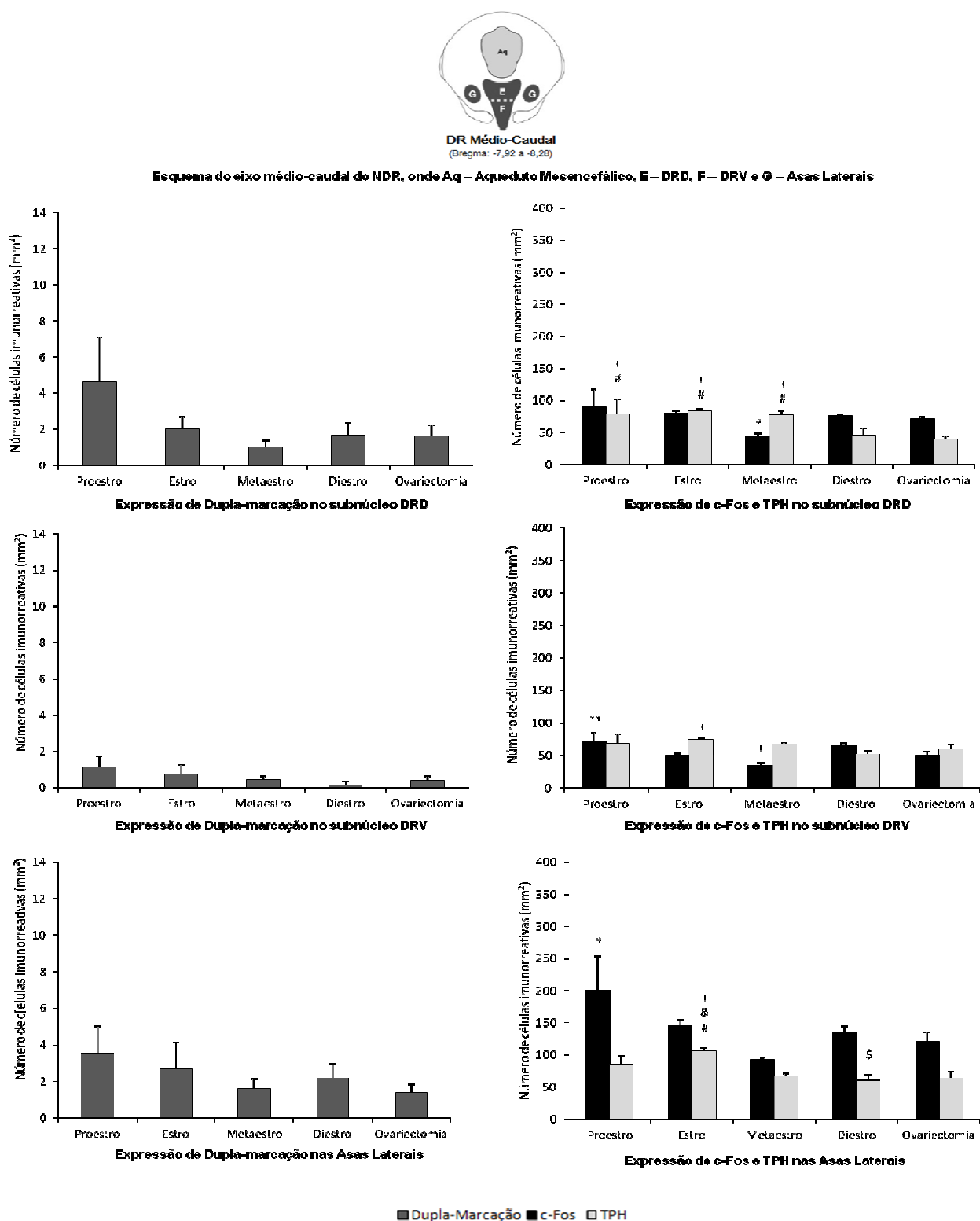


Fig 5. Média + EPM da presença de dupla-marcação, ativação da proteína c-Fos e presença da enzima triptofano hidroxilase no eixo médio-caudal do NDR, nos subnúcleos dorsal, ventral e asas laterais, nas 4 fases do ciclo estral e no grupo de ratas ovariectomizadas. ANOVA de uma via seguida pelo teste de Duncan: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em relação a todos os grupos; + $p < 0,05$ em relação à fase de diestro; # $p < 0,05$ em relação ao grupo de ovariectomia; & $p < 0,05$ em relação à fase de metaestro; \$ $p < 0,05$ em relação à fase de proestro

Eixo Caudal

Os resultados para o eixo caudal podem ser observados na Fig 6.

A ANOVA de uma via apontou diferenças no efeito dos grupos e a expressão de TPH [$F(4,18) = 17,11$; $p < 0,001$] e c-Fos [$F(4,18) = 11,69$; $p < 0,001$] no subnúcleo DRC. De maneira oposta, não constatou-se essa diferença quanto a dupla-marcação [$F(4,18) = 1,31$; $p = 0,302$]. Sobre o número de células imunorreativas para TPH, o teste *post-hoc* de Duncan apontou uma maior expressão na fase de proestro ($p < 0,05$) em relação a todos os grupos e maior expressão na fase de estro em comparação aos grupos de diestro ($p < 0,05$) e ovariectomizados ($p < 0,05$). Na fase de metaestro houve uma menor expressão de c-Fos ($p < 0,05$) quando comparada as outras fases e maior ($p < 0,05$) quando comparada ao grupo de ratas ovariectomizadas, tendo este último grupo menor expressão da proteína ($p < 0,01$) quando comparada aos outros grupos.

Para o DRI, a ANOVA indicou diferenças entre os grupos e a expressão de TPH [$F(4,18) = 3,06$; $p = 0,043$], duplas-marcações [$F(4,18) = 1,97$; $p = 0,014$] e células imunorreativas para c-Fos [$F(4,18) = 7,70$; $p = 0,008$]. O teste *post-hoc* de Duncan demonstrou uma maior número de duplas-marcações na fase de proestro em comparação ao diestro ($p < 0,05$) e metaestro ($p < 0,05$). Da mesma maneira, neste subnúcleo, há uma maior expressão de células imunorreativas para c-Fos ($p < 0,001$) na fase de proestro em relação a todos os grupos. Em relação à TPH+, as fêmeas na fase de metaestro mostraram um número menor na expressão da enzima em comparação ao grupo de fêmeas em diestro ($p < 0,05$) e ovariectomizadas ($p < 0,05$).

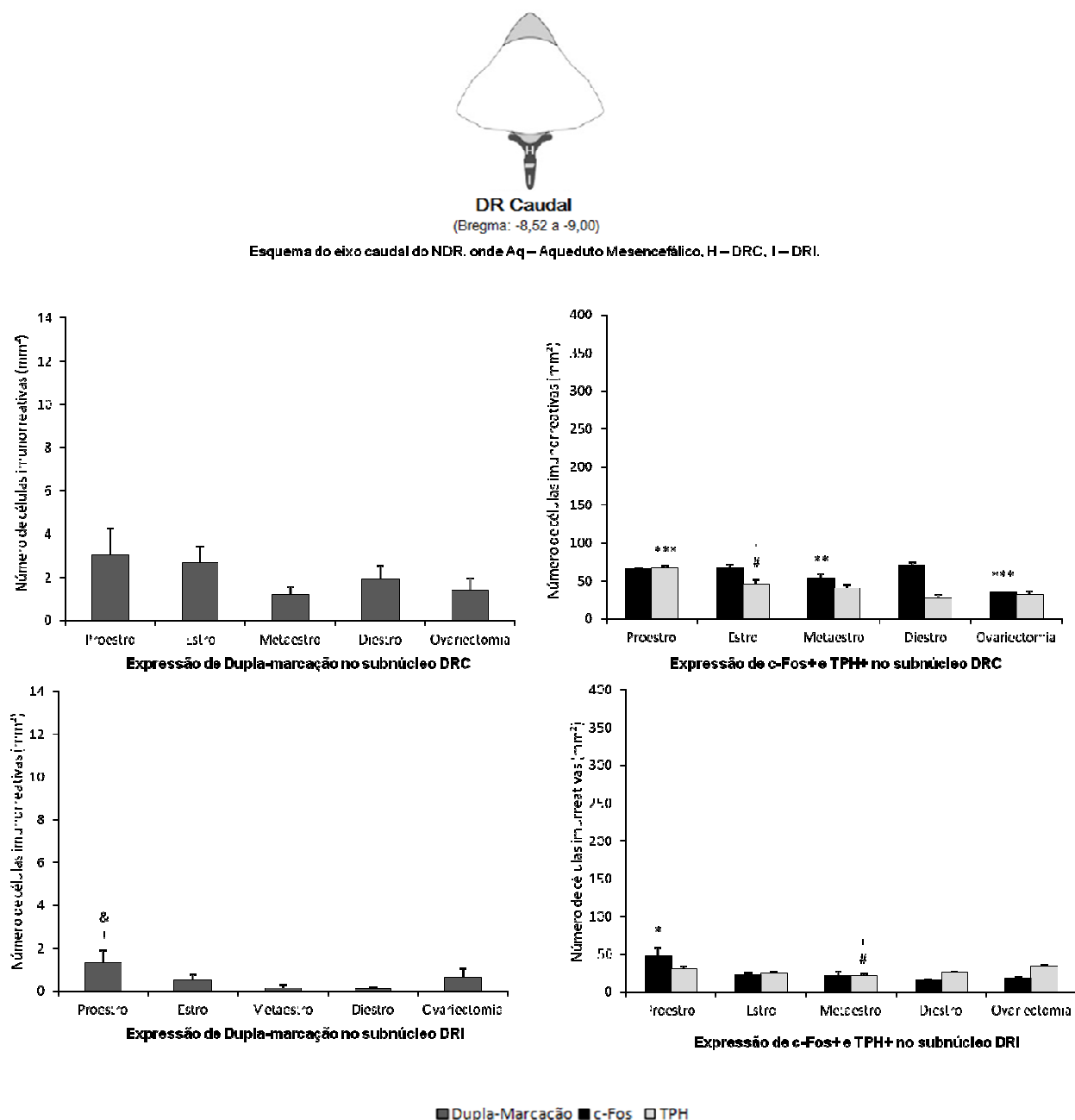


Fig 5. Média + EPM da presença de dupla-marcação, ativação da proteína c-Fos e presença da enzima triptofano hidroxilase no eixo caudal do NDR, nos subnúcleos caudal e interfascicular, nas 4 fases do ciclo estral e no grupo de ratas ovariectomizadas. ANOVA de uma via seguida pelo teste de Duncan: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação a todos os grupos; + $p < 0,05$ em relação à fase de diestro; # $p < 0,05$ em relação ao grupo de ovariectomia; & $p < 0,05$ em relação à fase de metaestro

Visando compreender melhor a expressão da proteína c-Fos, TPH e dupla-marcação ao longo do eixo rostro-caudal do NDR, foi idealizada uma

figura que ilustra a disposição dessa ativação nas várias fases do ciclo e em ratas ovariectomizadas (Fig 7). É possível observar que há um maior número de duplas-marcações e ativação da proteína c-Fos na fase de Proestro, sendo que a c-Fos é ativada em maior número no subnúcleo asas laterais do NDR. Houve um número menor de células imunorreativas para a enzima Triptofano Hidroxilase, especialmente nos subnúcleos DRD, DRV e DRC nas ratas que estavam na fase de diestro e nas que passaram pelo procedimento de ovariectomia bilateral.

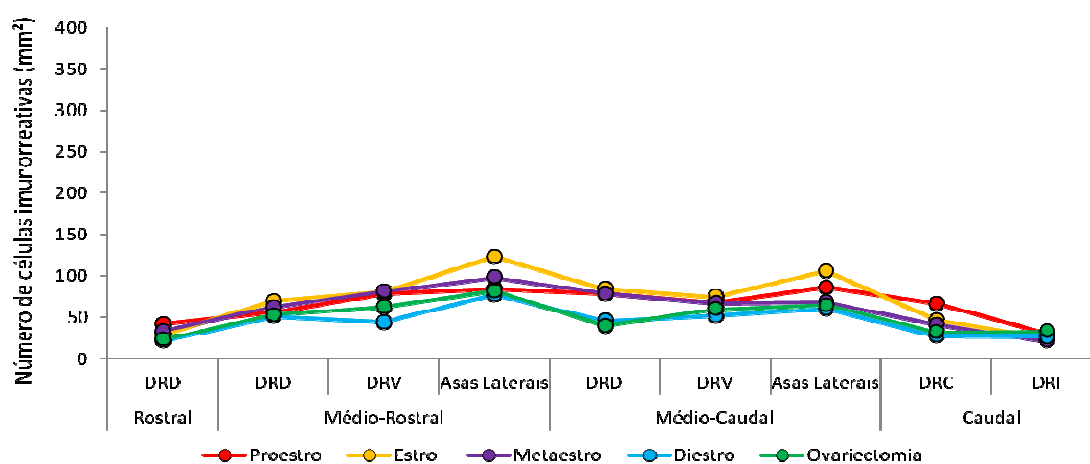
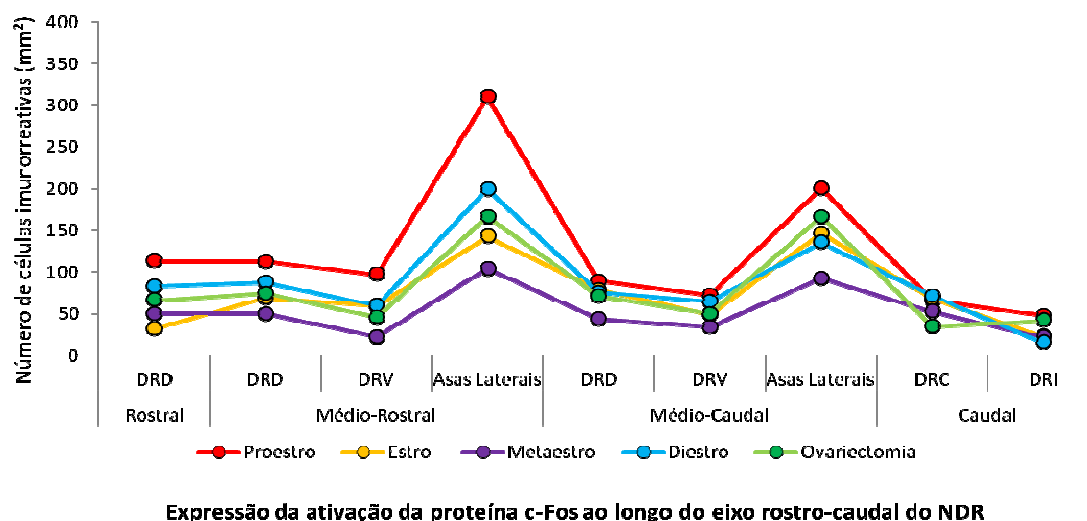
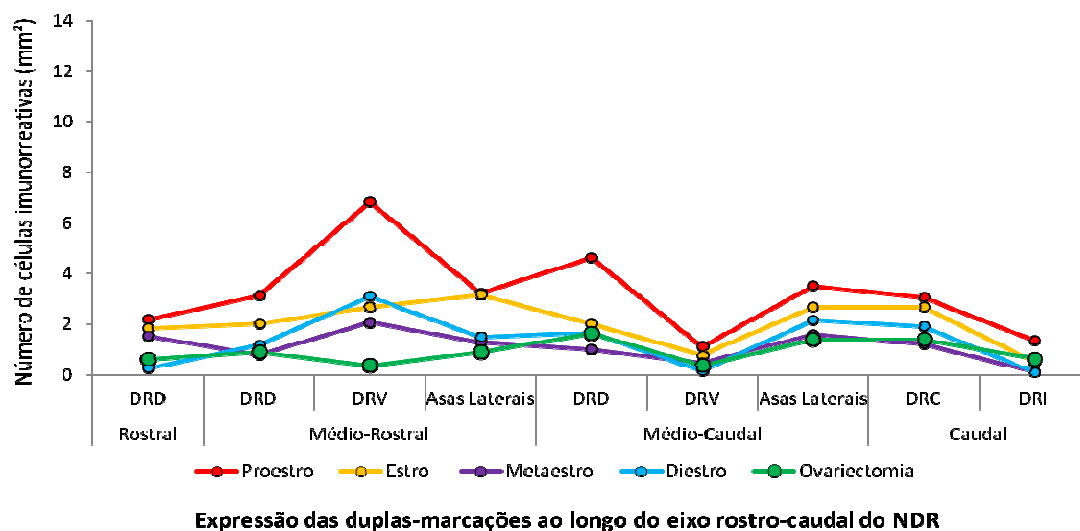


Fig 7. Número de células imunorreativas para dupla-marcação, c-Fos e TPH ao longo do eixo rostro-caudal no NDR, em cada uma das fases do ciclo e no grupo de ratas ovariectomizadas

Na Tabela 1 são sintetizados os achados significativos da expressão da proteína c-Fos, TPH e das duplas-marcações no NMR e nos subnúcleos do NDR das fases do ciclo estral em relação às ratas ovariectomizadas.

Tabela 1: Comparação da expressão de duplas-marcações, c-Fos e TPH nos subnúcleos do NDR e no NMR com o grupo de ratas ovariectomizadas

Regiões			Proestro			Estro			Metaestro			Diestro		
			Dupla	c-Fos	TPH	Dupla	c-Fos	TPH	Dupla	c-Fos	TPH	Dupla	c-Fos	TPH
NDR	Rostral	DRD	-	↑	↑	-	↓	-	-	-	-	-	-	-
	Médio-Rostral	DRD		↑						↓				
		DRV		↑						↓				
		Asas laterais	-	↑	-	-	-	↑	-	↓	-	-	-	-
	Médio-Caudal	DRD	-	-	↑	-	-	↑	-	↓	↑	-	-	-
		DRV	-	↑	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Asas laterais	-	↑	-	-	-	↑	-	-	-	-	-	-
	Caudal	DRC	-	↑	↑	-	↑	↑	-	↑	-	-	↑	-
		DRI	-	↑	-	-	-	-	-	-	↓	-	-	-
NMIF			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

↑ = maior expressão em comparação ao mesmo subnúcleo do grupo de ratas ovariectomizadas; ↓ = menor expressão em comparação ao mesmo subnúcleo do grupo de ratas ovariectomizadas; - = Não há diferenças em comparação ao mesmo subnúcleo do grupo de ratas ovariectomizadas.

Observa-se que ao comparar ratas em proestro com o grupo de animais ovariectomizados, há uma maior ativação em praticamente todos os subnúcleos do NDR da proteína c-Fos, havendo também um aumento de células imunorreativas para a enzima TPH nos subnúcleos DRD e DRC. De maneira oposta, quando se compara ratas em metaestro, há uma menor ativação quando comparado ao grupo ovariectomia, nos subnúcleos do eixo médio-rostral e no subnúcleo DRD do eixo médio-caudal. Não há diferença ao se comparar os grupos ovariectomia e ratas na fase de diestro, com exceção

do subnúcleo DRC. Não se constatou qualquer diferença no NMR ao se comparar as fases do ciclo com o grupo de ratas ovariectomizadas.

Discussão

De acordo com os resultados obtidos, sintetizados no parágrafo anterior na seção dos resultados, a hipótese de haver diferenças entre as fases do ciclo estral em relação à ativação serotoninérgica e não-serotoninérgica no NMR e nos diferentes subnúcleos do NDR foi parcialmente corroborada.

Núcleo Mediano da Rafe

Como não se constatou diferenças em relação a ativação de neurônios serotoninérgicos e não serotoninérgicos ao longo do ciclo estral e em ratas ovariectomizadas restou o questionamento sobre a possível explicação para esta observação. Para isto foram tecidas algumas considerações sobre esta estrutura mesencefálica.

O Núcleo Mediano da Rafe envia projeções serotoninérgicas para o Hipocampo Dorsal, sendo essa via responsável pelo “Sistema de Inibição Comportamental” e consequentemente sendo um substrato-chave neural relacionado com a manifestação da ansiedade (Gray, 1982, 1987; Gray e McNaughton, 2000). O hipocampo, nesta via, funcionaria como um comparador entre estímulos ambientais esperados e reais. Ao ocorrer, uma perturbação entre essas duas representações, o Sistema de Inibição Comportamental seria ativado (Gray, 1987).

Estudos com lesões eletrolíticas no NMR mostram uma diminuição dos índices de ansiedade em diferentes modelos animais de ansiedade, como o labirinto em cruz elevado (Andrade e Graeff, 2001), o teste de transição luz-escuro (Andrade et al., 1999; Andrade e Graeff, 2001) e condicionamento contextual (Avanzi et al., 1998; Silva et al., 2002, 2004). De maneira oposta, quando se estimula este mesmo núcleo eletricamente, os resultados apontam para uma resposta angiogênica, quando testado no Paradigma de supressão condicionada de Estes-Skinner (Graeff e Silveira Filho, 1978). É descrito na literatura que a ativação da via NMR-hipocampo acontece em resposta ao estresse, tanto agudo (retirada de diazepam) quanto crônico (14 dias de separação social), e que ambos os procedimentos aumentam seletivamente o turnover da serotonina no hipocampo e no núcleo mediano da rafe (Andrade et al., 2013).

Os achados do presente estudo demonstram não haver diferença quando se compara as fases do ciclo estral entre si e o grupo de ratas ovariectomizadas, em relação aos três tipos de células imunorreativas (Fig 2). De fato, como as ratas testadas não foram expostas a nenhum tipo de estressor, tenha sido ele agudo ou crônico, não houve nenhuma estimulação diferenciada do NMR, e consequentemente não havendo diferenças entre os grupos estudados.

Núcleo Dorsal da Rafe

Ao comparar o grupo de ratas ovariectomizadas com ratas em diestro, observa-se uma similaridade nos achados em quase todos os subnúcleos, com exceção da expressão de c-Fos no DRC (ver Tabela 1). Essa semelhança ocorre, pois os animais ovariectomizados bilateralmente passam pela retirada dos ovários e conseqüentemente perdem a sua ciclagem hormonal, tendo ínfimas quantidades séricas dos hormônios sexuais, da mesma maneira que ocorre quando os animais estão na fase de diestro.

Subnúcleos Dorsal, Caudal e Interfascicular

Com exceção do subnúcleo interfascicular, nos outros subnúcleos não houve diferenças estatísticas entre os grupos quanto as duplas-marcações, que representam a ativação dos neurônios serotoninérgicos (pelo marcador indireto – a proteína c-Fos). No entanto, constatou-se tendência ao aumento no número de células serotoninérgicas ativas na fase de proestro, principalmente no DRD do eixo médio-rostral (Fig 4) e médio-caudal (Fig 5). No subnúcleo interfascicular (Fig 6) é observado aumento nessa ativação serotoninérgica na fase de proestro em comparação as fases de metaestro e diestro.

Quanto à ativação da enzima TPH, é observado uma maior ativação no proestro nos subnúcleos DRD no eixo rostral (Fig 3) e no DRC (Fig 6). Já a fase de Diestro tem menor ativação de TPH no DRD do eixo médio-caudal. No DRI ratas na fase de Metaestro possuem uma menor ativação da enzima em comparação ao grupo ovariectomia e ratas em diestro (Fig 6). Já a ativação da

proteína c-Fos acontece majoritariamente nos subnúcleos DRD do eixo rostral (Fig 3) e médio-rostral (Fig 4) e no DRI (Fig 6) na fase de proestro.

Spiacci Jr. e colaboradores (2012) expuseram ratos machos ao Labirinto em T-Elevado, avaliando separadamente os dois comportamentos operantes neste aparato, a esquiva inibitória e a fuga. Ao se realizar o procedimento de imunohistoquímica de dupla-marcação (C-fos e TPH) com esses animais após a esquiva inibitória, pôde-se observar que houve um aumento na ativação de neurônios serotoninérgicos nos subnúcleos dorsal e caudal, sendo mostrado o envolvimento dessas duas estruturas com a gênese de comportamentos defensivos relacionados à ansiedade. Da mesma maneira, Lowry e colaboradores (2005), descrevem que os subnúcleos DRC e DRD são fonte de projeções serotoninérgicas que ascendem para estruturas límbicas relacionadas à regulação de reações comportamentais ligadas à ansiedade. Como demonstrado, há uma maior ativação serotoninérgica e não-serotoninérgica nos subnúcleos dorsal e caudal na fase de proestro, demonstrando uma maior resposta nessa fase em relação as outras associadas à ansiedade.

O trabalho de Nomura e Colaboradores (2005) mostrou que 90% de neurônios que possuem a enzima triptofano hidroxilase (TPH), que é somente encontrada em neurônios serotoninérgicos, também possuem receptores para estrógeno do tipo β . Freeman (1988) descreve sobre a secreção de hormônios sexuais ao longo do ciclo estral, mostrando que o maior pico na concentração sérica do estrógeno acontece na fase de proestro. A diminuição desse esteróide propicia uma diminuição na ação do gene ER- β que tem a capacidade de alterar a transcrição da TPH, diminuindo pouco, porém significativamente os valores do mRNA da TPH (Nomura et al., 2005). Dessa

maneira, quando há o aumento na concentração de estrógeno, que ocorre na fase de proestro, há aumento da enzima triptofano hidroxilase e serotonina e consequentemente aumento na ativação de neurônios serotoninérgicos, podendo explicar os resultados encontrados nestes subnúcleos.

Ratas e fêmeas de macacos que passaram por ovariectomia bilateral, ou seja, retirada de ambos os ovários e consequentemente perda do ciclo hormonal, quando feita à reposição com estrógeno, constatou-se um aumento na expressão da TPH no NDR através da técnica de hibridização *in situ* (Hiroi et al., 2006; Sanchez et al., 2005). Particularmente, no trabalho de Hiroi e colaboradores (2006) foi mostrado que o aumento na expressão dessa enzima em ratas ocorreu apenas no eixo caudal do NDR e essa expressão foi acompanhada por um efeito ansiolítico obtido no teste do campo aberto. Diversos estudos mostram que em modelos comportamentais de ansiedade, ratas em diestro apresentam um comportamento defensivo no sentido da ansiogênese, enquanto que fêmeas em proestro demonstram um efeito oposto, no sentido da ansiólise (Díaz-Velíz et al., 1997; Frye et al., 2000; Gouveia Jr. et al., 2004; Marcondes et al., 2001; Mora et al., 1996).

Subnúcleos Ventral e Asas Laterais

Ao se analisar as o subnúcleo ventral do NDR observou-se aumento da ativação de c-Fos no grupo de ratas na fase de proestro tanto no eixo médio-rostral (Fig 4) quanto no eixo médio-caudal (Fig 5), não havendo diferenças tanto na expressão da TPH ou de duplas-marcações. No caso do subnúcleo asas laterais foi possível observar um aumento da TPH na fase de estro em

relação aos outros grupos (Figs 4 e 5). Quanto à ativação da proteína c-Fos nesse subnúcleo, em ambos os eixos houve um aumento exacerbado das células imunorreativas na fase de proestro em comparação aos outros grupos (Figs 4 e 5).

Quando machos foram expostos às fugas do LTE, observou-se um aumento de neurônios não serotoninérgicos (medidos pela ativação somente da proteína c-Fos) nas asas laterais, demonstrando que esse subnúcleo é primordial para a neurobiologia das respostas defensivas relacionadas ao transtorno do pânico (Spiacci Jr. et al., 2012). No presente estudo observou-se nas fêmeas um aumento similar na fase de proestro (Ver Fig 7).

O NDR é uma estrutura mesencefálica com grande densidade de corpos celulares de neurônios serotoninérgicos (Joh et al., 1975; Steinbusch et al., 1978) e também não-serotoninérgicos (Calizo et al., 2011). Dentre estes últimos neurônios estão presentes os de ácido gama-aminobutírico (GABAérgicos), de dopamina (dopaminérgicos), de glutamato (glutamatérgicos), de óxido nítrico e peptídeos transmissores (Michelsen et al., 2007). A maior ativação não-serotoninérgica acontece no proestro, em comparação às outras fases na maioria dos subnúcleos, com exceção do DRD no eixo caudal e o DRC. A expressão de c-Fos demonstra uma ativação de neurônios não-serotoninérgicos, uma vez que nestes neurônios não havia a presença de marcação para TPH. O aumento que ocorre na fase de proestro também pode estar relacionado à ação do estrógeno. Alves e colaboradores (2000) demonstraram através da técnica de imunohistoquímica, que ratas tratadas com estrógeno após ovariectomia bilateral, tiveram um aumento no número de receptores para progesterona em células tanto no NDR quanto no NMR. A progesterona é um

hormônio presente em altas concentrações séricas na fase de proestro (Freeman, 1988), e mais especificamente, Lovick (2014) ressalta que o seu metabólito neuroativo, a alopregnanolona (allo), é o responsável pelo papel na regulação de comportamentos relacionados à ansiedade. Trabalhos mostraram que o aumento de allo através da sua administração exógenamente, altera a neurotransmissão relacionada ao GABA, o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central (Griffiths e Lovick, 2005; Kaura et al., 2007; Lovick et al., 2005; Lovick, 2006). Dessa maneira, o número alto na expressão de células não-serotonérgicas obtidas nessa fase do ciclo, pode estar sendo representada por neurônios GABAérgicos que foram alterados devido ao aumento de receptores de progesterona e consequentemente da allo que está presente em altas concentrações nessa fase, após a estimulação pelo estrógeno. No entanto, a especificidade da ativação não-serotonérgica é inconclusiva, já que não foram realizadas outras marcações na imunohistoquímica.

Apesar de não haver estímulos externos para alteração dessa neurobiologia entre as fases do ciclo, existe o estímulo endógeno responsável por essa modificação, o ciclo hormonal sexual. Mais especificamente, é possível devido ao estrógeno, que está em altas concentrações séricas na fase de proestro e também devido à presença de seus receptores em estruturas relacionadas à neurogênese dos transtornos de ansiedade e pânico co-localizados em neurônios serotonérgicos.

Conclusões

A hipótese foi parcialmente corroborada. Não se identificou nenhuma modificação no NMR ao se comparar as fases do ciclo ou o grupo de ratas ovariectomizadas, pois essa via é responsável por respostas ao estresse tanto agudo como crônico e no presente trabalho os animais não passaram por nenhum tipo de estressor. O maior recrutamento de neurônios serotoninérgicos e não-serotoninérgicos ocorreu na fase de proestro. O aumento na ativação de neurônios serotoninérgicos foi identificado principalmente nos subnúcleos dorsal e caudal, que são responsáveis pela modulação de comportamentos defensivos relacionados à ansiedade. Enquanto que o aumento na ativação de neurônios não-serotoninérgicos aconteceu nas asas laterais, uma região que tem sido apontada como responsável pela modulação de comportamentos defensivos relacionados ao transtorno no pânico. Esse aumento de células imunorreativas evidenciada no proestro se deveu ao hormônio sexual estrógeno, que se apresenta em altas concentrações séricas durante essa fase.

Referências

Alves SE, Weiland NG, Hayashi S, McEwen BS. Immunocytochemical localization of nuclear estrogen receptors and progestin receptors within the rat dorsal raphe nucleus. J. Comp. Neurol. 1998;391: 322-334.

Alves SE, McEwen BS, Hayashi S, Korach KS, Pfaff DW, Ogawa S. Estrogen-Regulated progestin receptors are found in the midbrain raphe but not

hippocampus of estrogen receptor alpha (eralfa) gene-disrupted mice. *J. Comp. Neurol.* 2000;427: 185-195.

Andrade TGCS, Silva AM, Silva CL, Graeff FG. Effect of electrolytic lesion of the median raphe nucleus on behavioral and physiological measures of stress. *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam.* 1999;49: 279–289.

Andrade TGCS, Graeff FG. Effect of electrolytic and neurotoxic lesions of the median raphe nucleus on anxiety and stress. *Pharmacol Biochem Behav.* 2001;70: 1–14.

Andrade TGCS, Zangrossi Jr. H, Graeff FG. The median raphe nucleus revisited. *J Psychopharmacol.* 2013; 27: 1107-1115.

Avanzi V, Castilho VM, Andrade TGCS, Brandão ML. Regulation of contextual conditioning by median raphe nucleus. *Brain Res.* 1988;790: 178–184.

Bandelow B, Michaelis S. Epidemiology of anxiety disorders in the 21st century. *Dialogues Clin Neurosci.* 2015;17: 327–335.

Calizo LH, Akanwa A, Ma X, Pan YZ, Lemos JC, Craige C, Heemstra LA, Beck SG. Raphe serotonin neurons are not homogenous: electrophysiological, morphological and neurochemical evidence. *Neuropharmacology.* 2011;61: 524-543.

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

Donner NC, Lowry CA. Sex differences in anxiety and emotional behavior. *Pflugers Arch.* 2013;465: 601-626.

Díaz-véliz G, Alarcón T, Espinoza C, Dussaubat N, Mora S. Ketanserin and anxiety levels: influence of gender, estrous cycle, ovariectomy and ovarian hormones in females rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1997;58: 637-642.

Figueiredo HF, Dolgas CM, Herman JP. Stress activation of cortex and hippocampus is modulated by sex and stage of estrus. *Endocrinology.* 2002;143: 2534-2540.

Freeman ME. The Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Rat. In: Knobil E, Neill JD. *The Physiology of Reproduction.* 2.ed. New York: Raven Press, 1993. p. 613-658.

Frye CA, Petralia SM, Rhodes ME. Estrous cycle and sex differences in performance on anxiety tasks coincide with increases in hippocampal progesterone and 3alpha,5alpha-THP. *Pharmacol Biochem Behav.* 2000;67: 587-596.

Frye CA, Walf AA. Changes in progesterone metabolites in the hippocampus can modulate open Field and forced swim test behavior of proestrous rats. *Horm. Behav.* 2002;41: 306-315.

Gouveia Jr. A, Santos UD, Felisbino FE, Afonseca TL, Antunes G, Morato S. Influence of the estrous cycle on the behavior of rats in the elevated T-maze. *Behav Processes.* 2004;67: 167-171.

Griffiths JL, Lovick TA. GABAergic neurones in the rat periaqueductal grey matter express alpha4, beta1 and delta GABAA receptor subunits: plasticity of expression during the estrous cycle. *Neuroscience.* 2005;136: 457–466.

Gray JA. *The Neuropsychology of Anxiety: an Enquiry into the Function of the Septo-Hippocampal System.* Oxford: Oxford University Press, 1982.

Gray JA. The Psychology of Fear and Stress. Cambridge: Cambridge University Press, 1987.

Gray JA, McNaughton N. The Neuropsychology of Anxiety. 2nd ed. Oxford: University Press, 2000.

Graeff FG, Silveira Filho G. Behavioral inhibition induced by electrical stimulation of the median raphe nucleus of the rat. *Physiol Behav.* 1978;71: 477–484.

Handley SL, McBlane JW, Critchley MA, Njung'e K. Multiple serotonin mechanism in animal models of anxiety: environmental, emotional and cognitive factors. *Behav Brain Res.* 1993;58: 203-210.

Hiroi R, McDevitt RA, Neumaier JF. Estrogen selectively increases tryptophan hydroxylase-2 mRNA expression in distinct subregions of rat midbrain raphe nucleus: association between gene expression and anxiety behavior in the open field. *Biol Psychiatry.* 2006;60: 288-295.

Hiroi R, Neumaier JF. Estrogen decreases 5-HT_{1B} autoreceptor mRNA in selective subregion of rat dorsal raphe nucleus: inverse association between gene expression and anxiety behavior in the open field. *Neuroscience.* 2009;158: 456-464.

Joh TH, Shikimi T, Pickel VM, Reis DJ. Brain tryptophan hydroxylase: purification of, production of antibodies to, and cellular and ultrastructural localization in serotonergic neurons of rat midbrain. *Proc Natl Acad Sci.* 1975;72: 3575-3579.

Kaura V, Ingram CD, Gartside SE, Young AH, Judge SJ. The progesterone metabolite allopregnanolone potentiates GABA(A) receptor-mediated inhibition of 5-HT neuronal activity. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2007;17:108–111.

- Kessler RC, Petukhova M, Sampson NA, Zaslavsky AM, Wittchen HU. Twelvemonth and lifetime prevalence and lifetime morbid risk of anxiety and mood disorders in the United States. *Int J Methods Psychiatr Res.* 2012;21: 169–184.
- Lovick TA, Griffiths JL, Dunn SM, Martin IL. Changes in GABA(A) receptor subunit expression in the midbrain during the oestrous cycle in Wistar rats. *Neuroscience.* 2005;131: 397-405.
- Lovick TA. Plasticity of GABAA receptor subunit expression during the oestrous cycle of the rat: implications for premenstrual syndrome in women. *Exp. Physiol.* 2006;91: 655–660.
- Lovick TA. Sex determinants of experimental panic attacks. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2014;46: 465–471.
- Lowry CA, Johnson PL, Hay-Schmidt A, Mikkelsen J, Shekhar A. Modulation of anxiety circuits by serotonergic systems. *Stress.* 2005; 8:233–246.
- Marcondes FK, Miguel KJ, Melo LL, Spadari-bratfisch RC. Estrous cycle influences in the response of female rats in the elevated plus-maze test. *Physiol. Behav.* 2001;74: 435-440.
- McLean CP, Asnaani A, Litz BT, Hofmann SG. Gender differences in anxiety disorders: Prevalence, course of illness, comorbidity and burden of illness. *J Psychiatr Res.* 2011;45: 1027-1035.
- Michelsen KA, Schmitz C, Steinbusch HWM. The dorsal raphe nucleus—From silver stainings to a role in depression. *Brain Res Rev.* 2007;55: 329-342.
- Mora S, Dussaubat N, Díaz-véliz G. Effects of the estrous cycle and ovarian hormones on behavioral indices of anxiety in female rats. *Psychoneuroendocrinology.* 1996;21: 609-620.

- Prange-Kiel J, Wehrenberg U, Jarry H, Rune GM. Para/autocrine regulation of estrogen receptors in hippocampal neurons. *Hippocampus*. 2003;13: 226-234.
- Nomura M, Akama KT, Alves SE, Korach KS, Gustafsson JA, Pfaff DW, Ogawa S. Differential distribution of estrogen receptor (ER)- α and ER- β in the midbrain raphe nuclei and periaqueductal gray in male mouse: predominant role of ER- β in midbrain serotonergic systems. *Neuroscience*. 2005;130: 445-456.
- Sanchez RL, Reddy AP, Centeno ML, Henderson JA, Bethea CL. A second tryptophan hydroxylase isoform, TPH-2 mRNA, is increased by ovarian steroids in the raphe region of macaques. *Brain Res Mol Brain Res*. 2005;135:194–203.
- Sayin A, Derinöz O, Yüksel N, Şahin S, Bolay H. The effects of the estrus cycle and citalopram on anxiety-like behaviors and c-fos expression in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2014;124: 180-187.
- Shughrue PJ, Merchenthaler I. Distribution of estrogen receptor beta immunoreactivity in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol*. 2001;436: 64-81.
- Silva RCB, Cruz APM, Avanzi V, Landeira-Fernandez J, Brandão ML. Distinct contributions of median raphe nucleus to contextual fear conditioning and fear-potentiated startle. *Neural Plast*. 2002;9: 233–247.
- Silva RCB, Gárgaro AC, Brandão ML. Differential regulation of the expression of contextual freezing and fear-potentiated startle by 5-HT mechanisms of the median raphe nucleus. *Behav Brain Res*. 2004;151: 93–101.
- Silveira MC, Zangrossi Jr H, De Barros Viana M, Silveira R, Graeff FG. Differential expression of Fos protein in the rat brain induced by performance of avoidance or escape in the elevated T-maze. *Behav Brain Res*. 2001;126: 13-21.

Solomon MB, Herman JP. Sex differences in psychopathology: Of gonads, adrenals and mental illness. *Physiol. Behav.* 2009;97: 250-258.

Spiacci Jr. A, Coimbra NC, Zangrossi Jr. H. Differential involvement of dorsal raphe subnuclei in the regulation of anxiety- and panic-related defensive behaviors. *Neuroscience.* 2012;227: 350-360.

Steinbusch HW, Verhofstad AA, Joosten HW. Localization of serotonin in the central nervous system by immunohistochemistry: description of a specific and sensitive technique and some applications. *Neuroscience.* 1978;3: 811-819.

Walf AA, Paris JJ, Frye CA. Chronic estradiol replacement to aged females rats reduces anxiety-like and depression-like behavior and enhances cognitive performance. *Psychoneuroendocrinology.* 2009;34: 909-916.

ANEXO I – NORMAS DA REVISTA PLOS ONE



TITLE, AUTHOR, AFFILIATIONS FORMATTING GUIDELINES

1

2

3

4

This is the article title

5

6

7 John Doe^{1¶}, Antonie Data^{1¶}, Johannes van Stats^{1¶}, Marie Testperson^{2*}, David8 Ribosome Jr.^{3,5}, Gregory H.T. McBio^{4,¶}, Angela Reviewerson^{1,2&}, Marina9 Measure^{1&}, on behalf of The Bunny Genome Sequencing Consortium[^]

10

11

12

13 ¹ Department, Institution, City, State, Country14 ² Department of Dermatology, Division of Rabbit Health, Section of Veterinary
15 Medicine, St. Hare Hospital, San Francisco, California, United States of America16 ³ Department of Libraries and Archives, National Contemporary Bunny Museum,
17 Lagomorph, Connecticut, United States of America18 ⁴ Department of Restoration, National Contemporary Bunny Museum, Lagomorph,
19 Connecticut, United States of America20 ⁵ Department of Archaeology, Bunny University, Lagomorph, Connecticut, United
21 States of America22 [¶]Current Address: Department of Carrot Science, Bunny University, Lagomorph,
23 Connecticut, United States of America24 [¶]Current Address: Department of Canine Evasion, Bunny University, Lagomorph,
25 Connecticut, United States of America

26

27

28 * Corresponding author

29 E-mail: testperson@university.ed (MT)

30

31

32 [¶]These authors contributed equally to this work.33 [¶]These authors also contributed equally to this work.

34

35

36 [^]Membership of the Bunny Genome Sequencing Consortium is provided in the

37 Acknowledgments.

38

39

40

41

42

Symbol Legend

Symbol	Name	Definition
¶	Pilcrow (paragraph symbol)	1st set of equal contributors
&	Ampersand	2nd set of equal contributors
*	Asterisk	Corresponding author(s)
#a	Pound/number sign	First Current address
#b	Pound/number sign	Second Current address
†	Dagger/Cross	Deceased
^	Caret	Consortium/Group Authorship

Article Title

- Italics, bold type, symbols, and other text formatting will all be reproduced in the published article as submitted.
- Titles should be written in sentence case (capitalize only the first word of the title, the first word of the subtitle, and any proper nouns and genus names).

Author Byline

- Author names will be published exactly as they appear in the accepted manuscript.
- Indicate affiliations by number only.
- Affiliation footnotes should appear in numerical order at first mention.
- Please use the symbols provided in this document for other designations.
- Numbers and symbols should be in superscript.
- Do not include titles (Dr., PhD, Professor, etc.).

Affiliations

- Affiliations will be published as they appear in the accepted manuscript.
- Include each component in order of small to large (Department, Division, Section, Institution, City, State, Country).
- Do not include ZIP or Postal Codes, street addresses, or building/office numbers.
- Do not use abbreviations (e.g. Dept.).
- Do not list positions within an institution (e.g. Department Chair, Professor, etc.).
- List each affiliation individually and in full.

Corresponding Authorship

- Do not include physical addresses; only email addresses are required.
- List corresponding author's initials in parentheses after the email address.

Contributorship

- Use the symbols provided here to indicate equal contributions.
- If you would like the equal contributions notes to read differently, please specify in your manuscript (e.g., "AR and MM are Joint Senior Authors").

Consortia or other Group Authors

- If there is a consortium or group author on your manuscript, please provide a note that describes where the full membership list is available for the readers.
- The membership list can be listed in the Acknowledgments, in Supporting Information, or on the internet.
- Consortia/Group authors can have affiliations, but it is not required.

1 Abstract

2 Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit.
 3 Vestibulum adipiscing una ut lectus gravida, vitae blandit tortor
 4 interdum. Donec tincidunt porta sem nec hendrerit. Vestibulum nec
 5 pharetra quam, vitae convallis nunc. Mauris in mattis sapien. Fusce
 6 sodales vulputate auctor. Nam lacus felis, fermentum sit amet nulla
 7 ac, tristique ultrices tellus. Integer rutrum aliquet sapien, eu
 8 fermentum magna pellentesque vitae. Integer semper viverra mauris
 9 vel pulvinar. Suspendisse sagittis malesuada una. Praesent mauris
 10 diam, fringilla id fringilla ac, posuere non lorem. Vestibulum mauris
 11 ante, fringilla quis tortor sit amet, accumsan fermentum quam. Nulla
 12 dictum consectetur leo. Ut vulputate ipsum purus, a interdum nibh
 13 viverra et. Praesent aliquam sapien vel massa sodales bibendum.
 14 Nulla interdum accumsan lectus, sed auctor elit accumsan a.
 15 Suspendisse quis rhoncus nibh. The verum est de illic.

16

17 Introduction

18 Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit.
 19 Vestibulum adipiscing una ut lectus gravida, vitae blandit tortor
 20 interdum. Donec tincidunt porta sem nec hendrerit. Vestibulum nec
 21 pharetra quam, vitae convallis nunc.

22 Materials and methods

23 Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit.
 24 Vestibulum adipiscing una ut lectus gravida, vitae (Fig 1)
 25 interdum. Donec tincidunt porta sem nec hendrerit. Vestibulum nec
 26 pharetra quam, vitae convallis nunc. Mauris in mattis sapien. Fusce
 27 sodales vulputate auctor. Nam sit amet nulla lacus a, (Figs 1 and 2)
 28 ultrices tellus. Integer rutrum aliquet sapien, eu fermentum magna
 29 pellentesque vitae.

30

31 Fig 1. This is the Fig 1 Title. This is the Fig 1 legend.

32 Fig 2. This is the Fig 2 Title. This is the Fig 2 legend.

33

34

File Naming for Figures

- Figure files should be saved as "Fig1.tif", "Fig2.eps", etc.
- Acceptable file formats for figures are ".tif", ".tiff", and ".eps"
- Figures should be uploaded separately as individual files.
- PLOS ONE guidelines for figures can be found here:
<http://journals.plos.org/plosone/s/figures>

Level 1 Heading

- Use Level 1 heading for all major sections (Abstract, Introduction, Materials and methods, Results, Discussion, etc.).
- Bold type, 18pt font.
- Only use italics and text formatting where needed (e.g. genus and species names, genes, etc.).
- Headings should be written in sentence case (capitalize only the first word of the heading, the first word of the subheading, and any proper nouns and genus names).

NOTE: Do not cite figures, tables, supporting information, or references in the Abstract.

Figure Citations

- Cite figures as "Fig 1", "Fig 2", etc.
- Cite figures and tables in order.
- Do not cite "Fig 2" before "Fig 1".
- Cite multiple figures as "Figs 1 and 2", "Figs 1-3", etc.

Figure Captions

- Each figure caption should appear directly after the paragraph in which they are first cited.
- Do not include tables within captions.
- Use bold type for the figure titles.

35

36

37 Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit.
38 Vestibulum adipiscing uma ut lectus gravida, vitae blandit tortor
39 interdum. Donec p^2 et q^2 tincidunt porta sem nec hendrerit.

40

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1 \quad (1)$$

41

42 Vestibulum nec pharetra quam, vitae convallis nunc. Mauris
43 in mattis sapien. Fusce sodales vulputate auctor. Nam lacus felis,
44 fermentum sit amet nulla ac, tristique ultrices tellus. Integer rutrum
45 aliquet sapien, eu fermentum magna pellentesque vitae. Integer
semper viverra mauris vel pulvinar dolor sit amet en $(p+q)^2 = 1$.

46

47 Genotyping

48

49 Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit.
50 Vestibulum adipiscing uma ut lectus gravida, vitae blandit tortor
51 interdum. Donec tincidunt porta sem nec hendrerit. Omnes tuum
52 basi sunt pertinent ad nos. Mauris in mattis sapien. Fusce sodales
53 vulputate auctor. Nam lacus felis, fermentum sit amet nulla ac,
54 tristique ultrices tellus. Integer rutrum aliquet sapien, eu fermentum
55 magna pellentesque vitae. Integer semper viverra mauris vel
pulvinar et alst.

56

Whole genome RFLP analysis

57

58 Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit.
59 Vestibulum adipiscing uma ut lectus gravida, vitae blandit tortor
interdum. Donec tincidunt porta sem nec hendrerit. Vestibulum nec
60 pharetra quam, vitae convallis nunc. Mauris in mattis sapien. Fusce
61 sodales vulputate auctor. Numquam iens dare tibi up.

62

NOTE: This document is presented in single-space paragraph format for ease of use. Please submit your manuscript in double-space paragraph format.

63

64

Display/Numbered Equation

- Format display equations in Mathtype or Equation Tools.
- Do not use Graphic Objects.

Inline Equation

- Format in regular text or as an inline equation in Mathtype or Equation Tools.
- Do not use Symbol Font.
- Do not use Graphic Objects.

Level 2 Heading

- Use Level 2 headings for sub-sections of major sections.
- Bold type, 16pt font.
- Only use italics and text formatting where needed.
- Use sentence case.

Level 3 heading

- Use Level 3 headings for sub-sections within Level 2 headings.
- Bold type, 14pt font.
- Only use italics and text formatting where needed.
- Use sentence case.

65 Results and discussion

66 Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit.
67 Vestibulum adipiscing urna ut lectus gravida, et bland **Table 1**
68 Donec tincidunt porta sem nec hendrerit. Vestibulum nec pharetra
69 quam, vitae convalli. Fido nemo.

70 **Table 1. This is the Table 1 Title.**

	Chemical W	Chemical X	Chemical Y	Chemical Z
Chemical 1	Reaction 1W	Reaction 1X	Reaction 1Y	Reaction 1Z
Chemical 2	Reaction 2W	Reaction 2X	Reaction 2Y	Reaction 2Z
Chemical 3	Reaction 3W ^a	Reaction 3X	Reaction 3Y ^b	Reaction 3Z
Chemical 4	Reaction 4W	Reaction 4X	Reaction 4Y	Reaction 4Z
Chemical 5	Reaction 5W	Reaction 5X	Reaction 5Y	Reaction 5Z

71 This is the Table 1 legend.

72 ^aTable footnotes belong here.

73 ^bFootnotes should have corresponding symbols in the table.

74

76 Conclusions

77 Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing **[1-5]**
78 Vestibulum adipiscing urna ut lectus gravida, vitae blandit tortor
79 interdum. Donec tincidunt porta sem nec hendrerit. Vestibulum nec
80 pharetra quam, vitae convallis nunc. Mauris in mattis sapien. Fusce
81 sodales vulputate auctor **S1 Fig**. Dolor sit amet **S1 and S2 Tables**.

82

83

Supporting Information Citations

- Format Supporting Information Citations as "S1 Fig", "S1 Table", etc.
- Cite multiple files as "S1 and S2 Figs", "S1-S3 Figs", etc.
- It is not required to cite each Supporting Information file.
- Supporting information should be uploaded separately as individual files.

3

Tables and Table Citations

- Tables should be cited as "Table 1", "Table 2", etc.
- Cite multiple tables as "Tables 1 and 2", "Tables 1-3", etc.
- Tables should be included directly after the paragraph in which they are first cited.
- Tables must be cell-based in Microsoft Word or embedded with Microsoft Excel.
- Do not use empty rows to create spacing.
- Do not include graphic objects, images, or colored text.
- See PLOS ONE Table Guidelines for more complete instructions: <http://journals.plos.org/plosone/s/tables>

Reference Citations

- Cite references in brackets (for example, "[1]" or "[2-5]" or "[3,7,9]").
- References must be cited in order at first mention.

84

85 Acknowledgments

86 Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit.
87 Vestibulum adipiscing urna ut lectus gravida, vitae blandit tortor
88 interdum.

89

90

91 References

- 92 1. Doe J, Data A, van Stats J, Testperson M, Ribosome D Jr,
93 McBio GHT, et al. This is the article title. PLoS ONE.
94 2017;12(12):e000000. doi: 10.1371/journal.pone.0000000
95 2. Doe J, Data A, van Stats J, Testperson M, Ribosome D Jr,
96 McBio GHT, et al. Bunny dynamics in cartoon landscapes.
97 PLoS ONE. Forthcoming 2017.

98

99

100 Supporting information

101 **S1 Fig.** This is the S1 Fig Title. This is the S1 Fig legend.

102 **S2 Fig.** This is the S2 Fig Title. This is the S2 Fig legend.

103 **S1 Table.** This is the S1 Table Title. This is the S1 Table legend.

104 **S2 Table.** This is the S2 Table Title. This is the S2 Table legend.

105 **S1 File.** This is the S1 File Title. This is the S1 File legend.

File Naming for Supporting Information

- Supporting Information files should be saved as "S1_Fig.tif", "S1_File.pdf", etc.
- All file types are supported.
- Please see the PLOS ONE guidelines for Supporting Information here: <http://journals.plos.org/plosone/s/supporting-information>

Acknowledgments

- Do not include funding or competing interests information in Acknowledgments.

References

- References should be listed after the main text, before the supporting information.
- References with more than six authors should list the first six author names, followed by "et al."
- Please see the PLOS ONE guidelines for References here: <http://journals.plos.org/plosone/s/submission-guidelines#loc-references>

Supporting Information Captions

- List Supporting Information captions at the end of the manuscript in a section titled "Supporting information".
- Use a Level 1 heading.
- Use bold type for the titles.
- Supporting Information files do not require full captions; only labels ("S1 Fig") are fully required.

Please also see the PLOS ONE Submission Guidelines which can be found here: <http://journals.plos.org/plosone/s/submission-guidelines>

4

For assistance preparing figures, please contact figures@plos.org

For assistance with other formatting requirements, contact plosone@plos.org

ANEXO II – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Faculdade de Ciências e Letras de Assis
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS que o Projeto de Pesquisa **“ATIVÇÃO DE NEURÔNIO SEROTONÉRGICO NOS NÚCLEOS MEDIANO E DORSAL DA RAFE, SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL E HIPOCAMPO, NAS DIFERENTES FASES DO CICLO ESTRAL DE RATAS”**, Registro nº 001/2016, sob a responsabilidade da pesquisadora **Telma Gonçalves Carneiro Spera de Andrade** e colaboração de Matheus Fitipaldi Batistela, Marina Miguel Ferreira, Sergio Romeo Biasi Filho, Camila Marroni Roncon e Thiago Ferreira Dias Kantack, conforme registrado, atende à legislação vigente em relação ao respeito aos princípios éticos na experimentação animal.

Animais utilizados: Ratos Wistar, fêmeas

Número de animais solicitados e autorizados: 500 (quinhentos)

CERTIFICAMOS, ainda, que o referido projeto será desenvolvido em 24 meses, no período de abril/2017 a março/2019, sendo que os Relatórios Parciais deverão ser entregues em **novembro/2017 e julho/2018**, e o Relatório final deverá ser entregue em maio/2019.

Assis, 10 de março de 2017.

EDISLANE BARREIROS DE SOUZA
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais