

JORGE RENNER CARDOSO DE ALMEIDA

“Padrões de funcionamento cerebral em voluntários saudáveis antes e após o uso de antidepressivo: estudo de ressonância magnética funcional durante indução emocional através de estimulação visual”

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências
Área de concentração: Psiquiatria
Orientador: Prof. Dr. Geraldo Busatto Filho

São Paulo - 2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Almeida, Jorge Renner Cardoso de

Padrões de funcionamento cerebral em voluntários saudáveis antes e após o uso de antidepressivo : estudo de ressonância magnética funcional durante indução emocional através de estimulação visual / Jorge Renner Cardoso de Almeida. -- São Paulo, 2009.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Departamento de Psiquiatria.

Área de concentração: Psiquiatria.

Orientador: Geraldo Busatto Filho.

Descritores: 1.Imagem por ressonância magnética funcional 2.Emoções manifestas 3.Clomipramina 4.Humanos 5.Gânglios da base 6.Sistema límbico

USP/FM/SBD-153/09

Dedicatória

*Per Teresa,
tu mi ispiri a vivere e ad essere*

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Geraldo Busatto Filho, por saber apertar quando preciso e relaxar quando necessário. Pela oportunidade de trabalhar no LIM-21 que coordena com exímio. Pela orientação, amizade, pelas valiosas discussões, ensinamentos e pelos conselhos substanciais durante toda a elaboração deste trabalho. Por ensinar o que poucos mestres ensinam, o pensar crítico.

A Sra. Eliza Fukushima, pela ajuda com documentações, essencial para administrar os diversos obstáculos burocráticos.

A Profa.Dra.Tânia Corrêa de Toledo Ferraz Alves, por dividir dados de seu trabalho que iniciaram meu aprendizado em neuroimagem. Seus conselhos guardo e uso até o presente momento.

Aos colegas do LIM-23 por realizar toda parte relacionada ao ensaio clínico. Em especial ao Prof.Dr.Valentim Gentil, Profa.Dra.Clarice Gorenstein, Profa.Dra.Monica Zilberman, Dr.Elaine Henna, Profa.Dra.Daniela Lobo. Sem vocês não teria conseguido. Não esqueço dos “almoços de quarta”.

Ao Prof.Dr.Edson Amaro pela valiosa orientação na aplicação e desenvolvimento do protocolo de ressonância magnética funcional.

Ao Prof.Dr.Hermano Tavares por permitir o uso do paradigma que desenvolveu durante sua livre docência.

Aos companheiros do protocolo “Sol da Meia Noite”. Angela Barreiros e Antonio Cesário Cruz, sem vocês não teria adquirido dados. Em especial ao Dr.Carlos Toledo Cerqueira, colega, amigo e parceiro na coleta de dados. Não esqueço dos jantares da equipe após os exames.

Aos colegas e amigos do LIM-21 que fazem o ambiente de trabalho estimulante. Em especial ao Prof.Dr.Fabio Duran por me iniciar no SPM e sempre ajudar quando precisei.

Aos professores do Departamento de Psiquiatria da Faculdade de Medicina do ABC pela sólida formação em psiquiatria recebida. Em especial aos Prof.Dr.Arthur Guerra e Profa.Dra.Cintia Azevedo Marques Périco pela apresentação ao orientador.

Aos Prof.Dr.Rodrigo Bressan, Prof.Dr.Hermano Tavares e Prof.Dr.Beny Lafer pelas questões e críticas levantadas durante o exame de qualificação.

A Profa.Dra.Mary Phillips pela essencial orientação na análise e interpretação dos dados. Aos colegas de Pittsburgh, pelo apoio e

cooperação. Aos amigos Alberto Sardinha, Luciana Barbosa, Daniel e Priscila Prevedello por ajudar a “tocar a bola para frente”.

Aos amigos e colegas da Liga da Gastro que sempre apoiaram e incentivaram minhas escolhas.

Aos meus avós Hilda (*in memorian*) e Eugênio (*in memorian*) por mostrar que para andar basta levantar e por ensinar muito mais do que jogar cartas.

Aos meus avós Cilú e Plínio por mostrar que uma situação sempre tem um lado positivo e por ensinar a paciência necessária para perseverar.

A minha mãe Helena pelo amor incondicional. Ao meu pai Marcos pela liberdade de escolher meu caminho e por sempre apoiar minhas decisões.

A Sonia por estar sempre sorrindo, mesmo nas situações mais complexas.

As minhas irmãs Cassia e Estela, sei que sempre posso contar com vocês.

A irmã Adriana e ao irmão Andre pelo apoio nas horas difíceis.

A minha família e a todos meus amigos que sempre me apoiaram desde o início.

A Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo por ter fornecido toda a infra-estrutura para que o trabalho pudesse ser desenvolvido.

A todos aqueles que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

E principalmente, aos voluntários que generosamente ofereceram o seu precioso tempo e participaram neste trabalho, o meu muito obrigado.

“O ótimo é inimigo do bom”

Voltaire (1694-1778)

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2^a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de figuras	xi
Lista de tabelas	xii
Lista de abreviaturas e siglas	xiii
Resumo	xvi
Summary	xix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Princípios básicos das técnicas de neuroimagem funcional.....	2
1.2. Estudos de neuroimagem funcional durante estimulação emocional em voluntários saudáveis.....	5
1.3. Modelo contemporâneo de processamento emocional em voluntários saudáveis	10
1.4. Neuroimagem funcional e estimulação emocional: o emprego de estímulos visuais do Sistema Internacional de Figuras Afetivas	13
1.5. Estudos de neuroimagem funcional avaliando mudanças de atividade cerebral em resposta à ação dos antidepressivos na vigência de Transtorno Depressivo Maior	18
1.6. Estudos de neuroimagem durante o uso de antidepressivos em voluntários saudáveis: uma área pouco explorada.	22
1.7. Efeito extraterapêutico dos antidepressivos	24
2. OBJETIVOS	27
2.1. Objetivos gerais.....	27
2.2. Objetivos específicos.....	28
3. HIPÓTESES	30
4. MÉTODOS	31
4.1. Seleção de indivíduos	31
4.1.1. Aspectos éticos	31
4.1.2. Recrutamento dos voluntários e pré-seleção	32
4.1.3. Critérios de Inclusão.....	33
4.1.4. Critérios de Exclusão.....	33
4.2. Avaliação da resposta clínica ao tratamento com clomipramina.	35
4.3. Ensaio farmacológico	37
4.3.1. Indivíduos não respondedores ao tratamento com clomipramina	38
4.3.2. Indivíduos respondedores ao tratamento com clomipramina	38
4.4. Procedimentos realizados no presente estudo de RMf	39

4.4.1. Indivíduos não respondedores ao tratamento com clomipramina	39
4.4.2. Indivíduos respondedores ao tratamento com clomipramina	40
4.4.3. Diferenças e semelhanças entre os respondedores e não respondedores em relação ao fluxo no estudo.....	40
4.5. Fluxo geral do estudo	42
4.5.1. Seleção de indivíduos	42
4.5.2. Etapa 1 do ensaio farmacológico	42
4.5.3. Visita de simulação.....	43
4.5.4. Visita I - RMf.....	43
4.5.5. Etapa 3 do ensaio farmacológico	44
4.5.6. Visita II - RMf.....	44
4.6. Paradigma experimental.....	45
4.6.1. Seleção de estímulos visuais a partir do banco de fotografias do IAPS	45
4.6.2. Paradigma de indução emocional por fotografias durante o experimento de RMf	48
4.7. Aquisição dos dados de neuroimagem.....	54
4.8. Análise dos dados	55
4.8.1. Análise de dados comportamentais.....	55
4.8.1.1. Indivíduos sem resposta clínica à clomipramina	55
4.8.1.2. Comparação entre indivíduos com e sem resposta clínica à clomipramina	55
4.8.2. Processamento e análise estatística das imagens	56
4.8.2.1. Análise dos dados de neuroimagem nos indivíduos não respondedores à clomipramina	57
4.8.2.2. Análise dos dados de neuroimagem comparando os indivíduos respondedores e os não respondedores à clomipramina.....	58
4.8.2.3. Análise por regiões de interesse	58
4.8.2.4. Nível de significância estatística.....	59
5. RESULTADOS	60
5.1. Caracterização demográfica da amostra.....	60
5.2. Resultados comportamentais das escalas de avaliação subjetiva durante a visualização de fotografias com conteúdo emocional e neutro ...	62
5.2.1. Indivíduos não-respondedores à clomipramina.....	62
5.2.1.1. Paradigma de Felicidade.....	62
5.2.1.2. Paradigma de Medo	63
5.2.1.3. Paradigma de Raiva	63
5.2.2. Comparação entre os indivíduos respondedores e não-respondedores à clomipramina	65
5.2.2.1. Paradigma de Felicidade.....	65
5.2.2.2. Paradigma de Medo	65
5.2.2.3. Paradigma de Raiva.....	65
5.3. Resultados obtidos na análise da atividade cerebral através de RMf ..	68
5.3.1. Padrões de atividade cerebral durante apresentação de fotografias de conteúdo emocional e neutro em indivíduos não-respondedores à clomipramina	68

5.3.1.1. Paradigma de Felicidade.....	68
5.3.1.2. Paradigma de Medo.....	70
5.3.1.3. Paradigma de Raiva.....	72
5.3.2. Comparação entre indivíduos respondedores e não-respondedores à clomipramina.....	76
5.3.2.1. Paradigma de Felicidade.....	76
5.3.2.2. Paradigma de Medo.....	78
5.3.2.3. Paradigma de Raiva.....	79
6. DISCUSSÃO.....	82
6.1. Achados comportamentais nos indivíduos não respondedores à clomipramina.....	82
6.2. Diferenças dos achados comportamentais nos indivíduos não respondedores e respondedores à clomipramina.....	84
6.3. Achados de neuroimagem nos indivíduos não respondedores à clomipramina.....	86
6.4. Diferenças de achados entre os indivíduos respondedores e não respondedores à clomipramina.....	97
6.5. A escolha da clomipramina.....	104
6.6. Limitações metodológicas.....	106
6.7. Implicações neurofisiológicas e clínicas dos achados.....	111
7. Conclusões.....	113
8. ANEXOS.....	117
Anexo - A.....	118
Anexo - B.....	122
Anexo - C.....	126
Anexo - D.....	130
9. REFERÊNCIAS.....	136
APÊNDICE.....	159

Lista de figuras

- Figura 1. - Regulação automática do processamento emocional através do sistema de transmissão de informação no sentido adiante (anterógrado) .. 11
- Figura 2. - Regulação automática do processamento emocional através do sistema de transmissão de informação no sentido inverso (retrógrado) 12
- Figura 3. - Categorização dos critérios de resposta clínica a clomipramina 36
- Figura 4. - Fluxograma dos participantes no estudo de neuroimagem e ensaio clínico..... 41
- Figura 5. - Modelo de escala visuo-analógica utilizada no paradigma de indução emocional para avaliar o sentimento subjetivo 50
- Figura 6. - Modelo de um bloco de fotografias com conteúdo emocional utilizado no paradigma felicidade 51
- Figura 7. - Diminuição de atividade amigdalar em indivíduos não respondedores quando medicados com baixas doses repetidas de clomipramina nos paradigmas de Medo e Raiva..... 74
- Figura 8. - Diminuição de atividade comum aos três paradigmas em indivíduos não respondedores quando medicados com baixas doses repetidas de clomipramina nas regiões da ínsula, cíngulo anterior e putâmen 75
- Figura 9. - Aumento de atividade insular comum aos três paradigmas em indivíduos respondedores comparados com indivíduos não respondedores quando medicados com baixas doses repetidas de clomipramina..... 81

Lista de tabelas

Tabela 1. – Dados demográficos do grupo de indivíduos respondedores e não-respondedores à clomipramina	61
Tabela 2. - Avaliação subjetiva após a apresentação de blocos de fotografias com conteúdo emocional e neutro nos indivíduos não-respondedores à clomipramina	64
Tabela 3. - Avaliação subjetiva após a apresentação de blocos de fotografias de conteúdo emocional e neutro entre os indivíduos respondedores e não-respondedores a doses repetidas de clomipramina .	67
Tabela 4. - Resultados do efeito BOLD durante as comparações planejadas (t-teste pareado) em indivíduos não-respondedores a clomipramina quando sob efeito da medicação e sem efeito da medicação durante o paradigma de Felicidade	69
Tabela 5. - Resultados do efeito BOLD durante as comparações planejadas (t-teste pareado) em indivíduos não-respondedores a clomipramina quando sob efeito da medicação e sem efeito da medicação durante o paradigma de Medo	71
Tabela 6. - Resultados do efeito BOLD durante as comparações planejadas (t-teste pareado) em indivíduos não-respondedores a clomipramina quando sob efeito da medicação e sem efeito da medicação durante o paradigma de Raiva	73
Tabela 7. - Diferenças de efeito BOLD evidenciadas na comparação entre sujeitos respondedores e não-respondedores à Clomipramina durante o paradigma de Felicidade	77
Tabela 8. - Diferenças de efeito BOLD evidenciadas na comparação entre sujeitos respondedores e não-respondedores à Clomipramina durante o paradigma de Medo	78
Tabela 9. - Diferenças de efeito BOLD evidenciadas na comparação entre sujeitos respondedores e não-respondedores à clomipramina durante o paradigma de Raiva	80

Lista de abreviaturas e siglas

BA – *Brodman* Área (Área de Brodmann)

BOLD - *blood oxygenation level dependent*

CPF DL - córtex pré-frontal dorsolateral

CPF DM - córtex pré-frontal dorsomedial

CPF VL - córtex pré-frontal ventrolateral

CPF VM - córtex pré-frontal ventromedial

D - lado direito do cérebro

DICOM - *Digital Imaging Communications in Medicine*

DP – Desvio-padrão

DSM-IV-TR - Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders- 4th edition-
Text Revision (Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais - 4^a
edição-texto revisado)

E - lado esquerdo do cérebro

EEG – eletroencefalografia

FAPESP – Fundação de Amparo a Pesquisa e Ensino do Estado de São
Paulo

FLAIR – *fluid attenuated inversion recovery*

FOV - *field of view*

FSCr - fluxo sanguíneo cerebral regional

g.l. – graus de liberdade

GCA - giro do cíngulo anterior

GE – General Electric

HC-FMUSP - Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP)

HPC - hipocampo

IAPS – *International Affective Pictures System*

IPQ – Instituto de Psiquiatria

IR – *inversion recovery*

ISRN - inibidor seletivo da recaptação de noradrenalina

ISRS - inibidor seletivo da recaptação de serotonina

k - número de voxels em uma região

L - lateralidade cerebral

Mg – miligrama

mm – Milímetro

mm³ - Milímetro cúbico

MNI – *Montreal Neurological Institute*

ms – Milissegundo

NIFTI -1 – *Neuroimaging Informatics Technology Initiative*

PANAS – *Positive and Negative Affect Scale*

paraHPC - parahipocampo

PET - *Positron Emission Tomography* (tomografia por emissão de pósitrons)

RMf – Ressonância Magnética funcional

s – segundos

SCID – Entrevista Clínica Estruturada para o DSM-IV, transtornos do eixo I (Structured Clinical Interview for DSM-IV – axis I disorders)

SPECT - *Single Photon Emission Computed Tomography* (tomografia por emissão de fóton único)

SPGR – *spoiled-gradient-echo*

SPM5 - *Statistical Parametric Mapping*, versão 5

SRQ - *Self Report Questionere*

T - Tesla

TCI - *Temperament and Character Inventory*

TE - *time echo*

TOC – transtorno obsessivo compulsivo

TR – *relaxation time*

USA – *United States of America*

USP – Universidade de São Paulo

Voxel - *Volume Element* ou *Volume cell*

Resumo

Almeida JRC. *Padrões de funcionamento cerebral em voluntários saudáveis antes e após o uso de antidepressivo: estudo de ressonância magnética funcional durante indução emocional através de estimulação visual* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 158p.

INTRODUÇÃO: O processamento emocional pelo cérebro humano tem sido atualmente investigado através do uso de ressonância magnética funcional (RMf). A RMf possibilita o estudo *in vivo* e não invasivo de mudanças na atividade cerebral regional em voluntários humanos saudáveis. O processamento emocional pode ser modulado através do uso de antidepressivos que influenciam sistemas neurais relacionados ao processamento emocional, através da modulação da ação de neurotransmissores como a serotonina e a noradrenalina. A clomipramina, um antidepressivo tricíclico, tem sido relacionada com efeitos de resposta clínica mesmo em voluntários saudáveis. Estudos utilizando a RMf permitem a investigação do efeito de antidepressivos nos sistemas neurais envolvidos no processamento emocional em indivíduos saudáveis que apresentam resposta ao uso destes medicamentos comparados a sujeitos que não apresentam resposta ao tratamento. **MÉTODOS:** Nesta tese, dezoito voluntários saudáveis foram investigados em relação a mudanças de atividade neural em resposta à indução emocional através da apresentação de fotografias do *International Affective Pictures System* (IAPS). Foram

estudadas particularmente as emoções de raiva, felicidade e medo. Os voluntários foram submetidos ao tratamento prolongado com doses baixas de clomipramina por quatro semanas. A amostra foi subdividida em respondedores (n=6) e não respondedores (n=12) ao tratamento com clomipramina. A atividade neural foi estimada com o uso da RMf, através da mensuração do efeito *blood oxygenation level dependent* (BOLD). As imagens foram processadas e analisadas usando o programa *Statistical Parametric Mapping* (SPM). Indivíduos não respondedores foram comparados sob o efeito e na ausência de efeito da clomipramina, através de comparações planejadas utilizando t-teste pareado. Indivíduos respondedores foram comparados com os não respondedores sob o efeito da clomipramina através de t-teste não pareado. **RESULTADOS:** Nos voluntários não respondedores à clomipramina, a comparação entre os estados medicado *versus* não medicado evidenciou menor atividade neural na região da amígdala quando sob efeito da clomipramina em resposta a estímulos de valência negativa. Demonstramos ainda, em paradigmas de valência positiva e negativa, diminuição da atividade neural no giro do cíngulo anterior, na ínsula e no putâmen na vigência da medicação. Quando foram comparados os indivíduos respondedores com os não respondedores sob efeito de clomipramina, um aumento consistente de atividade cerebral foi observado nos voluntários respondedores na região da ínsula. **CONCLUSÕES:** O uso prolongado de doses baixas de clomipramina apresentou ação em regiões cerebrais envolvidas com o processamento emocional. Quando indivíduos não respondedores foram comparados sob o

efeito e sem o efeito da clomipramina, foi observada menor atividade amígdala durante o tratamento em resposta a estímulos de valência negativa, possivelmente devido à menor demanda neural na avaliação inicial do estímulo de valência negativa. Também foi observada menor ativação no giro do cíngulo anterior, na ínsula e no putâmen na vigência do uso da clomipramina, possivelmente em associação a uma diminuição do mapeamento cortical de funções interoceptivas em resposta a estímulos emocionais positivos e negativos. Quando indivíduos respondedores foram comparados com os não respondedores ao tratamento prolongado com doses baixas de clomipramina, foi observada maior ativação insular nos indivíduos respondedores quando estavam sob efeito de clomipramina; estes resultados indicam que possivelmente os indivíduos que respondem ao tratamento antidepressivo são os que percebem mais as alterações de seu estado corporal durante o processamento emocional.

Descritores: 1. Imagem por ressonância magnética funcional; 2. Emoções manifestas; 3. Clomipramina; 4. Humanos; 5. Gânglios da base; 6. Sistema límbico.

Summary

Almeida JRC. *Patterns of brain functioning in healthy volunteers before and after the use of antidepressant: a study of functional magnetic resonance imaging during emotional induction through visual stimulation* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2009. 158p.

INTRODUCTION: The emotional processing by the human brain has now been investigated through the use of functional magnetic resonance imaging (fMRI). The fMRI technique allows the noninvasive study of *in vivo* changes in regional brain activity in healthy human volunteers. The emotional processing may be modulated through the use of antidepressants that influence neural systems linked to emotional processing, by modulating the action of neurotransmitters such as serotonin and norepinephrine. Clomipramine, a tricyclic antidepressant, has been reported to elicit clinical response even in healthy volunteers. Studies using fMRI allow the investigation of the effect of antidepressants on neural systems involved in emotional processing in healthy subjects showing response to the use of antidepressant drugs compared to subjects who do not respond to treatment. **METHODS:** In this thesis, eighteen healthy volunteers were investigated in relation to changes in neural activity in response to emotional induction through the presentation of photos of the International Affective Picture System (IAPS). We studied especially the emotions of anger, happiness and fear. The volunteers were subjected to prolonged treatment

with low doses of clomipramine for four weeks. The sample was divided into responders ($n = 6$) and non-responders ($n = 12$) to treatment with clomipramine. The neural activity was estimated by using fMRI, by measuring the blood oxygenation level dependent effect (BOLD). Images were processed and analyzed using the Statistical Parametric Mapping (SPM) program. Non-responders were compared under two conditions: when using clomipramine, and after drug washout, using paired t-tests. Individuals who responded to clomipramine treatment were compared with non-responders under the effect of the drug by independent t-test.

RESULTS: In volunteers not responding to clomipramine, a comparison between the non-medicated versus medicated states showed less neural activity in the region of the amygdala when under effect of clomipramine in response to stimuli of negative valence. We also demonstrated, both in the paradigms of positive and negative valence, decreased neural activity in the anterior cingulate gyrus, insula and putamen during the medicated state. When responders were compared with non-responders under the effect of clomipramine, a consistent increase in brain activity was observed in the former group in the insula.

CONCLUSIONS: The prolonged use of low doses of clomipramine induced activity changes in brain regions involved in emotional processing. When non-responders were compared under the influence and without the effect of clomipramine, the amygdala displayed lower activity during treatment in response to stimuli of negative valence, possibly due to lower demand in the initial evaluation of stimuli of negative valence. There was less activation in the anterior cingulate gyrus, insula and

putamen during the use of clomipramine, possibly in association with a decrease in the cortical mapping of interoceptive changes in response to positive and negative emotional stimuli. When responders were compared with non-responders after prolonged treatment with low doses of clomipramine, insular activation was greater in responders when individuals were under the effect of clomipramine. These results indicate that individuals who respond to antidepressant treatment are those who perceive more changes in their bodily state during emotional processing.

Keywords: 1. Functional magnetic resonance imaging; 2. Emotional processing; 3. Clomipramine; 4. Human; 5. Basal ganglia; 6. Limbic system.

1. INTRODUÇÃO

Há várias décadas, muitos pesquisadores têm estudado os correlatos anatômico-funcionais das emoções. Baseando-se em estudos de lesões cerebrais e modelos animais, as primeiras hipóteses levantadas sobre o envolvimento do sistema límbico foram construídas (Papez, 1937; Maclean, 1952; Ledoux, 1996). Em anos recentes, as hipóteses geradas nestes estudos vêm sendo corroboradas e ampliadas através do uso de técnicas de neuroimagem funcional. Uma vez que o fluxo sanguíneo ao cérebro varia em função de aumentos da demanda de glicose e oxigênio em resposta a mudanças de atividade local, técnicas de neuroimagem capazes de detectar alterações do fluxo sanguíneo cerebral regional (FSCr) proporcionam medidas fidedignas do funcionamento cerebral regional. Usando este princípio geral, as técnicas de neuroimagem tornaram-se o meio mais válido e confiável hoje para se avaliar padrões de funcionamento cerebral regional em seres humanos vivos, e investigar anormalidades funcionais associadas a transtornos neuropsiquiátricos.

As técnicas mais novas e modernas que vem sendo utilizadas para estimar a ativação de regiões cerebrais específicas através do FSCr são as Tomografias por Emissão de Pósitrons (*Positron Emission Tomography*, PET), a Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único (*Single Photon Emission Computed Tomography*, SPECT) e a Ressonância Magnética Funcional (RMf) (Busatto e Pilowsky, 1995). Entre suas várias

finalidades de uso, estas técnicas permitiram o desenvolvimento de uma área de pesquisa muito bem-sucedida nos últimos quinze anos, qual seja, a de estudos de neuroimagem durante tarefas de estimulação mental em seres humanos.

Em estudos com voluntários saudáveis, este tipo de metodologia tem gerado novos conhecimentos a respeito dos circuitos cerebrais envolvidos nos diferentes tipos de operações mentais humanas. Já em Psiquiatria, o uso de estímulos cognitivos e emocionais em estudos de neuroimagem tem permitido estudar a fisiopatologia *in vivo* de diversos transtornos psiquiátricos, como transtorno depressivo maior, esquizofrenia, fobias social e específicas, transtorno obsessivo-compulsivo, abuso/dependência de substâncias, transtornos alimentares, entre outros.

1.1. Princípios básicos das técnicas de neuroimagem funcional

Os métodos de PET e SPECT utilizam a construção de mapas tridimensionais da atividade cerebral a partir da detecção de raios-gama emitidos por traçadores marcados com isótopos radioativos, que são captados pelo cérebro após sua administração venosa ou inalatória, permitindo detectar alterações no metabolismo de glicose ou FSCr.

Os isótopos utilizados com PET são de produção complexa e têm meia-vida curta, tornando esta técnica cara e pouco acessível. Por outro

lado, os traçadores marcados para SPECT são de fácil aquisição e manuseio, fazendo desta técnica um recurso mais barato e disponível, apesar de menos sensível e de menor resolução espacial em comparação com o PET.

Estas técnicas encontram-se limitadas pelo número de vezes que podem ser repetidas em um mesmo sujeito, em determinado período de tempo, pelo efeito deletério dos componentes radioativos sobre tecidos *in vivo*, pela baixa resolução temporal e também pela baixa resolução espacial das imagens obtidas (Busatto e Pilowsky, 1995).

Nos últimos anos, a RMf tem substituído o SPECT e PET nos estudos que procuram avaliar aspectos do funcionamento cerebral durante a execução de tarefas mentais. A técnica de RMf utiliza o nível de oxigenação do sangue para estimar a ativação cerebral regional através do princípio BOLD (*blood oxygenation level dependent*) (Howard et al., 1995). Aumentos de fluxo e volume sanguíneo cerebral ocorrem em resposta a aumentos na demanda funcional regional, trazendo consigo um aumento no aporte de oxigênio, embora o aumento na extração de oxigênio pelo tecido cerebral seja bastante discreto (Fox e Raichle, 1986). O excesso de oxigênio sanguíneo leva a uma diminuição relativa da concentração de desoxi-hemoglobina (que contém ferro paramagnético) em capilares e vênulas que drenam o sangue do tecido, e esta mudança é detectada como aumento do sinal em imagens pesadas em T2. Obtém-se, assim, uma

mudança de sinal que reflete de forma confiável variações do FSCr, que, por sua vez, representam correlatos fiéis de mudanças na atividade cerebral regional (Ogawa et al., 1990).

A RMf apresenta diversas vantagens sobre o PET e o SPECT, começando pelo fato de ser totalmente não invasiva, permitindo, assim, número ilimitado de estudos em uma mesma visita ou em diferentes períodos no mesmo sujeito. Sua resolução temporal é capaz de detectar alterações em quaisquer regiões cerebrais da ordem de 1 a 6 segundos, e sua resolução espacial é da ordem de 1 a 3 mm. Além disso, é possível a obtenção de imagens de ressonância magnética estrutural de alta resolução espacial na mesma visita sem mudar o posicionamento do sujeito, o que permite o corregristo das informações funcionais e estruturais do cérebro do mesmo indivíduo.

A técnica de RMf tem sido usada para realizar estudos de ativação cerebral em voluntários saudáveis, contribuindo para uma maior elucidação dos circuitos cerebrais envolvidos nos mais diferentes tipos de operações mentais. Além disso, estudos de RMf em indivíduos portadores de transtornos psiquiátricos têm auxiliado na detecção de anormalidades do funcionamento cerebral associadas aos sintomas dos diferentes tipos de transtornos (Lanius et al., 2002; Mataix-Cols et al., 2004; Fu et al., 2007; Hassel et al., 2009).

Os estudos que utilizam a técnica de RMf têm não só replicado achados anteriores da literatura de PET e SPECT com maior resolução espacial e temporal, mas também descrito novos achados não acessíveis com as técnicas convencionais. Estes resultados têm permitido gerar novas hipóteses sobre o funcionamento cerebral humano durante operações mentais específicas em sujeitos normais, bem como sobre a fisiopatologia dos transtornos mentais.

1.2. Estudos de neuroimagem funcional durante estimulação emocional em voluntários saudáveis

A avaliação dos circuitos cerebrais envolvidos no processamento emocional, em estudos usando as diferentes técnicas de neuroimagem funcional, tem sido uma das áreas mais pesquisadas na atualidade. Utilizando PET, SPECT e RMf, tais estudos são baseados no princípio de que durante a apresentação de um estímulo emocional, áreas cerebrais específicas sofrerão mudanças na demanda funcional que podem ser detectadas através do uso das diferentes técnicas de neuroimagem funcional. Os estímulos utilizados com maior frequência são os visuais e os auditivos. Nos estudos de estimulação visual, durante os períodos de aquisição de imagens, são apresentadas cenas (Hariri et al., 2002), fotografias (Hariri et al., 2003) ou expressões faciais de pessoas (Surguladze et al., 2003) com conteúdos emocionais evidentes. Já os estímulos auditivos mais comumente usados são gravações, por exemplo,

de relatos autobiográficos de conteúdo emocional (Lanius et al., 2002; Cerqueira et al., 2008).

O grande número de estudos em voluntários saudáveis, usando PET ou RMf, ampliou o conhecimento a respeito dos circuitos cerebrais engajados durante o processamento de emoções distintas, tais como tristeza, irritabilidade, felicidade, medo, raiva e culpa (Hariri et al., 2002; Phan et al., 2002; Lange et al., 2003; Phillips et al., 2003; Cerqueira et al., 2008; Phillips et al., 2008).

Uma meta-análise de cinquenta e cinco destes estudos de neuroimagem funcional durante estimulação emocional nos últimos dez anos, reportada por Phan et al. (2002), permitiu as seguintes conclusões:

- (1) De forma geral, o uso de paradigmas de estimulação emocional engaja regiões límbicas, paralímbicas, núcleos subcorticais e o córtex pré-frontal;
- (2) Entre estas regiões, o córtex pré-frontal medial é aquela que apresenta uma função mais geral no processamento das emoções, sendo consistentemente engajada durante diferentes tipos de estimulação;
- (3) Algumas outras regiões cerebrais são engajadas mais seletivamente durante o processamento de emoções específicas, tais como a emoção medo, ativando

especificamente a amígdala, e a emoção tristeza, ativando especificamente o cíngulo subcaloso;

- (4) Há algumas diferenças nos padrões de ativação, dependendo da forma de indução de emoções; assim, emoções induzidas por estímulos visuais ativam o córtex occipital e amígdala, enquanto que emoções induzidas por lembrança e imaginação de eventos autobiográficos recrutam mais o cíngulo anterior e a ínsula;
- (5) Estímulos emocionais que apresentam uma demanda cognitiva também ativam o cíngulo anterior e ínsula (Phan et al., 2002).

Em uma meta-análise mais recente de neuroimagem, focando especificamente na ativação amidalar, Sergerie et al. (2008) observaram que a amígdala responde a todos os estímulos visuais emocionais, independentemente da valência do estímulo. Observaram também maior ativação da amígdala em resposta a estímulos faciais. Estes resultados dão suporte ao modelo de detecção de relevância, que postula um papel geral, independentemente da valência, da amígdala na detecção de informações biologicamente e socialmente pertinentes. Os autores não observaram efeitos importantes que sustentam a teoria da lateralização baseada na valência (hemisfério direito teria maior relevância no processamento emocional e de valência negativa), ou no gênero do indivíduo (ativação bilateral seria mais frequente nas mulheres). Entretanto, os resultados desta

meta-análise dão suporte para o modelo de lateralização hemisférica baseado na dinâmica temporal, no qual a amígdala direita estaria mais envolvida na resposta de curta duração e a esquerda em uma resposta sustentada no tempo (Sergeyev et al., 2008).

Outra meta-análise recente de estudos de neuroimagem focou especificamente no processamento emocional explícito (ao invés de implícito/automático), isto é, quando o indivíduo deve pensar sobre a emoção (Lee e Siegle, 2009). Os autores perceberam sistemas neurais comuns e específicos no processamento emocional, dependendo se os indivíduos deveriam apenas categorizar o estímulo, sentir as próprias emoções ou sentir a emoção de outros indivíduos (Lee e Siegle, 2009). No sistema neural comum à avaliação emocional explícita, os autores observaram envolvimento da amígdala, do córtex pré-frontal lateral e dorsomedial, envolvendo as áreas de Brodmann (*Brodmann areas*; BA) 10 e 32. Potencialmente, a amígdala estaria envolvida na avaliação inicial do processamento emocional explícito, enquanto que o córtex pré-frontal ventrolateral estaria envolvido mais especificamente nos aspectos cognitivos do processamento emocional. Estas regiões poderiam interagir através do córtex pré-frontal dorsomedial, que estaria envolvido na integração e decodificação do estímulo emocional (Lee e Siegle, 2009).

Nos sistemas específicos, a instrução para avaliação cognitiva de estímulos emocionais recrutariam áreas de processamento sensorial (como

os córtices occipital e temporal) e áreas regulatórias como o córtex pré-frontal ventrolateral (BA47), envolvidos na categorização emocional, possivelmente pertencente a um nível superior de processamento emocional conceptual. Estar consciente e avaliar a própria emoção poderia recrutar a ínsula e o giro do cíngulo anterior (BA24), áreas envolvidas na percepção de alterações internas (interocepção), possivelmente mediando a experiência emocional consciente. E, finalmente, sentir a emoção de outras pessoas recrutaria áreas como o córtex temporal e a transição parieto-temporal (BA39); regiões envolvidas no processamento afetivo de informações de origem social (Lee e Siegle, 2009).

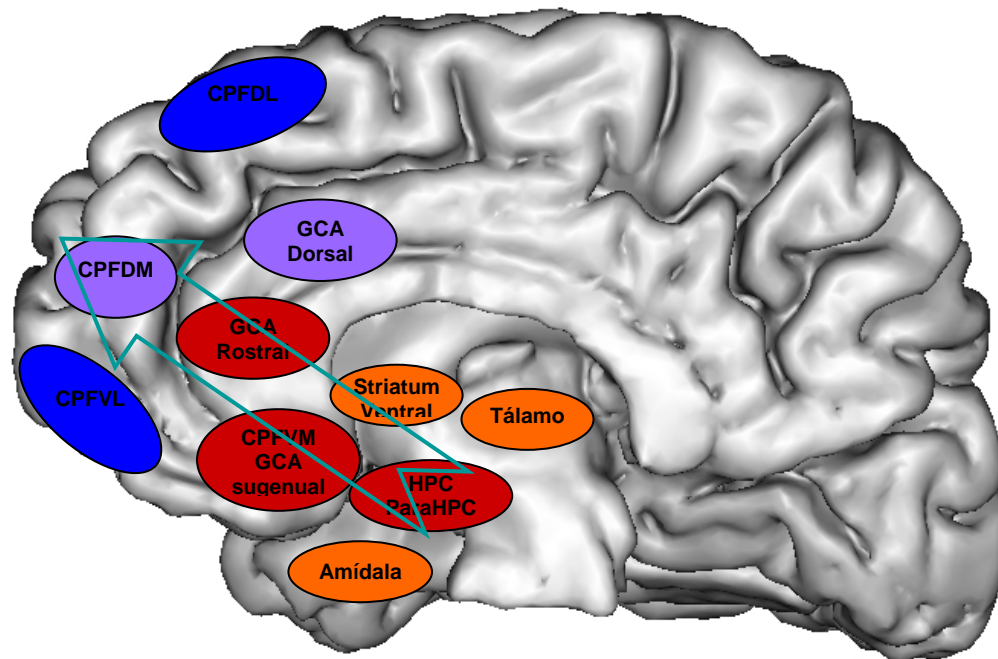
Numa outra revisão da literatura sobre o processamento emocional, Phillips et al. (2003) discutem as bases neurobiológicas do processamento de emoções. Esta revisão aproveita a grande quantidade de dados gerados em estudos de neuroimagem funcional durante o processamento emocional, os achados anteriores de estudos em animais e também os estudos sobre as consequências de lesões cerebrais em seres humanos (Phillips et al., 2003). Estes autores propuseram a existência de dois sistemas cerebrais básicos, um ventral e outro dorsal. O sistema ventral estaria envolvido com a identificação do significado de um estímulo emocional e consequente resposta afetiva; este sistema incluiria amígdala, ínsula, corpo estriado ventral e regiões ventrais do cíngulo anterior e do córtex pré-frontal. Já o sistema dorsal estaria envolvido com a regulação do estado afetivo,

incluindo o hipocampo e regiões dorsais do cíngulo anterior e do córtex pré-frontal (Phillips et al., 2003).

1.3. Modelo contemporâneo de processamento emocional em voluntários saudáveis

O grupo liderado por Mary Phillips recentemente atualizou o modelo de processamento emocional citado no item anterior, especialmente em relação a uma subdivisão dos circuitos envolvidos na regulação emocional em dois sistemas neurais que podem ativar e trabalhar simultaneamente (Phillips et al., 2008). O sistema neural ventromedial seria responsável por avaliar inicialmente e codificar a informação com significado emocional durante a regulação automática da resposta comportamental ao estímulo emocional. Já o sistema dorsal e lateral seria responsável pela regulação voluntária da resposta comportamental ao estímulo emocional. Incluídas neste modelo de processamento emocional estariam estruturas subcorticais límbicas responsáveis pela identificação e geração do comportamento emocional. Pertencem ao sistema neural ventromedial estruturas paralímbicas, como o parahipocampo e o hipocampo, e também as regiões dorsomedial e ventromedial do córtex pré-frontal. Ao sistema lateral e dorsal, pertencem regiões dorsolaterais e ventrolaterais do córtex pré-frontal. As regiões responsáveis pela identificação do estímulo emocional e geração da resposta comportamental seriam a amígdala, a ínsula, o tálamo e o corpo estriado ventral (Phillips et al., 2008)(Figura 1 e 2).

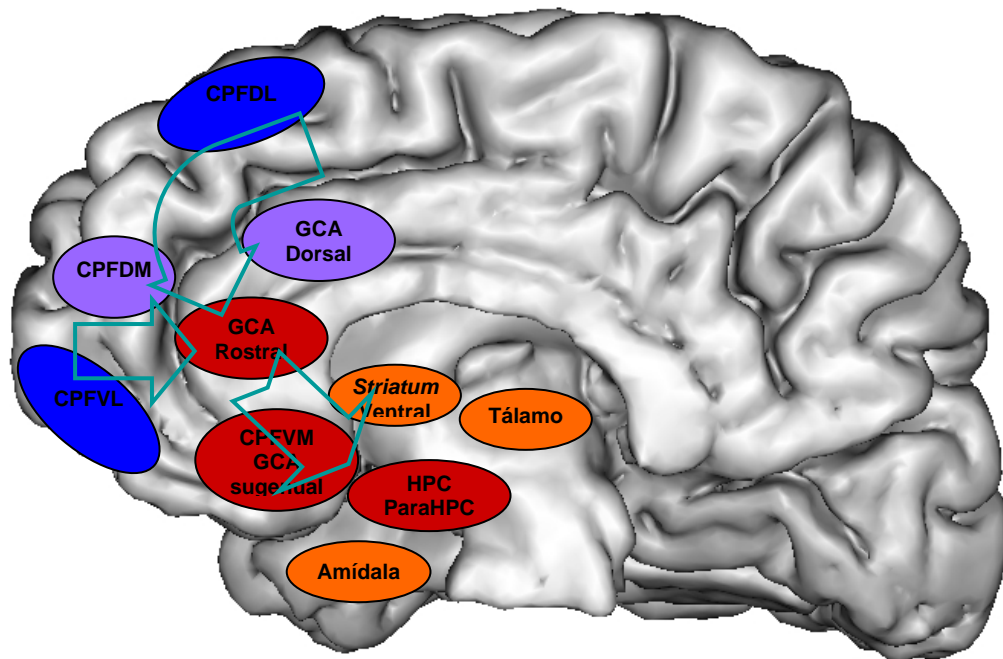
Figura 1. - Regulação automática do processamento emocional através do sistema de transmissão de informação no sentido adiante (anterógrado)



Identificação e orientação emocional
 Regulação emocional automática
 Regulação emocional voluntária
 Regiões implicadas na regulação emocional automática e voluntária

A regulação emocional automática transmite informações no sentido adiante, utilizando o sistema neural ventromedial. O sistema neural ventromedial seria responsável por avaliar inicialmente e codificar a informação com significado emocional durante a regulação automática da resposta comportamental ao estímulo emocional. Pertencem ao sistema neural ventromedial estruturas paralímbicas, como o parahipocampo e o hipocampo, e também o córtex pré-frontal ventromedial, giro do cíngulo subgenual e genual (regiões em vermelho na figura). Seta indica a transmissão anterógrada de informações.

Figura 2. - Regulação automática do processamento emocional através do sistema de transmissão de informação no sentido inverso (retrógrado)



Identificação e orientação emocional
 Regulação emocional automática
 Regulação emocional voluntária
 Regiões implicadas na regulação emocional automática e voluntária

A regulação emocional voluntária transmite informações no sentido inverso, utilizando o sistema neural dorsal e lateral. O sistema neural dorsal e lateral seria responsável pela regulação voluntária da resposta comportamental ao estímulo emocional. Pertencem ao sistema neural dorsal e lateral estruturas do córtex pré-frontal ventrolateral e dorsolateral (regiões em azul na figura). Setas indicam a transmissão retrógrada de informações.

1.4. Neuroimagem funcional e estimulação emocional: o emprego de estímulos visuais do Sistema Internacional de Figuras Afetivas

O Sistema Internacional de Figuras Afetivas (*International Affective Pictures System* – IAPS) foi desenvolvido por Lang et al. há mais de vinte anos (Lang et al., 1988), e vem sendo amplamente empregado em estudos envolvendo a provocação de emoções em voluntários saudáveis e em pacientes com transtornos psiquiátricos como depressão, transtorno obsessivo compulsivo, transtorno de personalidade antisocial, fobia social, fobia específica, pânico, transtorno do estresse pós-traumático, transtornos alimentares, entre outros.

O IAPS tem sido utilizado internacionalmente e também no Brasil, onde foi validado recentemente por Ribeiro (2003)(Ribeiro, 2003). Este sistema compreende uma amostra de mais de 500 fotografias, todas classificadas de acordo com duas escalas não-verbais, representando as dimensões prazer-desprazer e alerta-relaxado, tanto em mulheres como em homens (Lang et al., 1997; Lang et al., 1998; Bradley e Lang, 2000).

Devido a esta classificação e validação internacional, o IAPS tem sido utilizado em diversas modalidades de estudos, tanto em voluntários saudáveis quanto em portadores de doenças psiquiátricas. Os tipos de estudos que utilizam o IAPS variam desde investigações subjetivas da afetividade, avaliações de eletromiografia facial, eletroencefalografia (EEG)

e medidas psicofisiológicas (frequência cardíaca, resposta galvânica da pele e glicemia), até estudos de neuroimagem funcional, usando PET ou RMf (Davis et al., 1995; Aftanas et al., 2002; Hermanns et al., 2003; Amrhein et al., 2004; Northoff et al., 2004).

Especificamente em estudos de RMf, o IAPS vem sendo utilizado no estudo de indução de emoções como medo, prazer, ansiedade e julgamento moral. Tais estudos vêm sendo realizados tanto em voluntários saudáveis como em pacientes com transtorno obsessivo compulsivo (TOC), esquizofrenia, transtornos depressivos e outros (Hariri et al., 2002; Hariri et al., 2003; Banks et al., 2007; Iaria et al., 2008; Mériaux et al., 2009).

Num exemplo recente destes estudos, Hariri et al. (2003) encontraram importante ativação da amígdala quando realizaram estimulação emocional através da apresentação de fotografias do IAPS com conteúdo de medo, utilizando-se da técnica de RMf (Hariri et al., 2003). Este achado replica os resultados de diversos outros estudos de neuroimagem utilizando diferentes estímulos para indução de medo (Phan et al., 2002). Em outro estudo do mesmo grupo, utilizando as mesmas técnicas (Hariri et al., 2002), os autores evidenciaram que a amígdala não só se mostra envolvida com estímulos de medo, mas também em cenas que induzem raiva; por outro lado, evidenciou-se maior ativação da amígdala quando as fotografias continham imagens de faces de pessoas, mostrando a importância da expressão facial no processamento de emoções (Hariri et al., 2002). Banks

et al. (2007), utilizando um paradigma de processamento emocional com fotografias do IAPS e análise de conectividade, observaram maior correlação entre a amígdala e áreas do córtex pré-frontal durante a reavaliação cognitiva de estímulos negativos. Também observaram que o tamanho desta correlação poderia prever a capacidade do indivíduo regular com sucesso um estímulo negativo (Banks et al., 2007). Iaria et al. (2008), utilizando um paradigma de processamento emocional explícito com fotografias do IAPS, observaram que a atividade da ínsula encontrava-se aumentada em indivíduos saudáveis, mas com maior suscetibilidade individual de sentir desconforto e inadequação em resposta a um estímulo afetivo (Iaria et al., 2008). Mériau et al. (2009), utilizando um paradigma com fotografias do IAPS aversivas, observaram maior atividade da ínsula durante a visualização de fotografias negativas em indivíduos saudáveis. Os autores avaliaram a presença de sintomas negativos nesta amostra de voluntários saudáveis utilizando a PANAS e observaram que altos valores de sintomas negativos estavam associados com maior atividade insular, indicando maior processamento de sintomas interoceptivos (Mériau et al., 2009).

No Brasil, Moll et al. (2002) estudaram o estímulo de emoções com conteúdo moral através do uso de fotografias do IAPS, utilizando RMf. Os autores observaram ativação de regiões do córtex pré-frontal e do sulco temporal superior, áreas que têm sido relacionadas, na literatura, com o comportamento social (Moll et al., 2002).

Além dos estudos em voluntários saudáveis, as fotografias do IAPS têm sido usadas também em investigações de RMf em sujeitos com transtornos psiquiátricos. Por exemplo, diversos estudos utilizaram fotografias do IAPS em estudos de RMf envolvendo indução de desgosto em portadores de TOC (Phillips et al., 2000; Shapira et al., 2003; Gilbert et al., 2009). Nestes estudos, observaram-se diferenças nos padrões de ativação cerebral nos pacientes quando comparados a voluntários saudáveis, sobretudo nas regiões da ínsula, do giro parahipocampal e do córtex pré-frontal (Phillips et al., 2000; Shapira et al., 2003). Já em estudos com pacientes portadores de esquizofrenia, como o de Fahim et al. (2004), a técnica de RMf e os estímulos do IAPS foram usados para diferenciar padrões de ativação cerebral em regiões envolvidas com o processamento de emoções, dependendo ou não da presença de sintomas negativos como embotamento afetivo (*flat affect*). Os pesquisadores observaram uma menor ativação na região do córtex pré-frontal, particularmente do cíngulo anterior e órbita-frontal, especificamente nos pacientes com esquizofrenia com embotamento afetivo significativo (Fahim et al., 2004). Em estudos com pacientes portadores de transtorno depressivo maior, Lee et al. (2007), através de um paradigma emocional de visualização passiva de fotografias do IAPS, observaram menor ativação no hipocampo direito e na ínsula esquerda em resposta a estímulos negativos em pacientes deprimidos quando comparados com controles normais, possivelmente devido à menor capacidade do grupo deprimido em processar emoções, principalmente as de valência negativa (Lee et al., 2007). Já Hamilton e Gotlib (2008), através

de um paradigma emocional utilizando fotografias do IAPS, observaram maior atividade na amígdala direita de pacientes deprimidos quando comparados com controles normais em resposta a estímulos negativos, mas não a positivos ou neutros (Hamilton e Gotlib, 2008). Por fim, Whalley et al. (2009), utilizando fotografias do IAPS em um paradigma de memória, observaram maior ativação na amígdala esquerda e no corpo estriado ventral em pacientes com transtorno do estresse pós-traumático, possivelmente indicando sensibilidade aumentada dos pacientes durante a realização de um paradigma que antecipa a visualização de estímulo emocional (Whalley et al., 2009).

As formas de uso de estímulos visuais em estudos de RMf durante estimulação emocional vêm tornando-se, gradualmente, sofisticadas. O grupo liderado por Phillips (2004), em estudo de RMf com voluntários saudáveis, evidenciaram uma otimização da ativação da amígdala em resposta a apresentação de expressões faciais de medo quando os indivíduos conseguiam perceber diferenças na intensidade das expressões faciais em comparação com uma apresentação mascarada (Phillips et al., 2004). Seguindo o mesmo princípio de otimizar a resposta emocional, diversos outros estudos fizeram uso de fotografias do IAPS em investigações com voluntários saudáveis e pacientes com transtorno obsessivo compulsivo, e incluíram, no paradigma, uma instrução verbal, antes da apresentação das fotografias, para que os indivíduos se “imaginassem tocando os objetos” que seriam mostrados nas imagens

apresentadas a seguir (Lange et al., 2003; Mataix-Cols et al., 2003; Mataix-Cols et al., 2004; Gilbert et al., 2009). O uso desta estratégia evidenciou uma maximização da ativação cerebral em regiões relevantes para o processamento das emoções sob investigação, tanto em voluntários saudáveis como em pacientes com TOC (Lange et al., 2003; Mataix-Cols et al., 2003; Mataix-Cols et al., 2004; Gilbert et al., 2009).

1.5. Estudos de neuroimagem funcional avaliando mudanças de atividade cerebral em resposta à ação dos antidepressivos na vigência de Transtorno Depressivo Maior

Alguns estudos de PET e SPECT investigaram mudanças nos padrões de ativação cerebral em pacientes portadores de transtornos psiquiátricos avaliados antes e após tratamento antidepressivo (Miguel-Hidalgo e Rajkowska, 2002; Saxena et al., 2002). Com o desenvolvimento recente da técnica de RMf, é hoje possível avaliar também como os antidepressivos modificam a função dos sistemas neurais relevantes com alta resolução espacial e temporal, e durante a performance de tarefas de estimulação emocional, como aquelas que fazem uso das fotografias do IAPS. Num dos primeiros estudos usando este tipo de desenho experimental, Kalin et al. (1997) fizeram uso da técnica de RMf durante um ensaio clínico em pacientes deprimidos tratados com venlafaxina, usando estímulos visuais do IAPS. Neste estudo, os autores encontraram uma diminuição da ativação cerebral global após o tratamento durante

estimulação com fotografias que despertavam emoções negativas, assim como uma ativação significativa na região de córtex visual secundário (Kalin et al., 1997). Quando ampliaram a amostra, evidenciou-se também uma maior ativação do cíngulo anterior esquerdo e da ínsula esquerda após o tratamento com venlafaxina (Davidson et al., 2003).

Em outro estudo semelhante, mas com avaliação da atividade cerebral usando um paradigma de memória, Walsh et al. (2007) investigaram pacientes deprimidos antes e depois de tratamento com fluoxetina e detectaram que uma menor atividade em regiões dorsais do cíngulo anterior e do córtex pré-frontal estava associada a uma resposta melhor ao antidepressivo (Walsh et al., 2007). Neste mesmo ensaio clínico, os autores avaliaram o processamento de faces felizes e evidenciaram aumento da atividade cerebral em regiões como o cíngulo posterior, o precúneo e o cúneo com o uso do antidepressivo e melhora da sintomatologia (Fu et al., 2007). Numa outra investigação usando a mesma amostra, os autores avaliaram o processamento de faces de tristeza e evidenciaram que, após oito semanas de tratamento antidepressivo, ocorreu uma diminuição de atividade em regiões envolvidas com o processamento emocional como a amígdala, ínsula e o corpo estriado ventral; além disso, observou-se que a melhora da sintomatologia depressiva estava relacionada com diminuição de atividade no giro do cíngulo pregenual, no corpo estriado e no cerebelo (Fu et al., 2004).

Em outro estudo, Chen et al. (2007) demonstraram que maior volume de substância cinzenta e maior atividade funcional durante o processamento de tristeza no giro do cíngulo anterior na avaliação inicial predizia a melhora dos sintomas depressivos após tratamento farmacológico com fluoxetina (Chen et al., 2007).

Usando uma tarefa de controle inibitório, Langenecker et al. (2007) evidenciaram que maior atividade neural nas regiões frontais inferiores bilaterais, bem como em amígdala, ínsula e núcleo *accumbens* em pacientes deprimidos predizia melhora sintomatológica dos sintomas depressivos após tratamento farmacológico por dez semanas com citalopram (Langenecker et al., 2007).

Robertson et al. (2007) estudaram dez pacientes deprimidos pré e pós-tratamento com o antidepressivo bupropiona XL, e observaram diminuição de atividade neural em áreas cerebrais ligadas ao processamento emocional quando realizando uma tarefa de controle executivo na presença de fotografias de conteúdo negativo. Áreas como o córtex frontal orbital, dorsomedial e ventromedial, giro do cíngulo anterior, amígdala e núcleo caudado encontravam-se com atividade aumentada antes do início do tratamento (Robertson et al., 2007).

Utilizando análise de conectividade, que permite inferir se a atividade funcional de uma região cerebral está relacionada com a atividade de outra

região, Anand et al. (2007) evidenciaram diminuição de conectividade basal em pacientes deprimidos antes de receber tratamento farmacológico com sertralina entre regiões cortico-limbicas. Após o tratamento farmacológico nos pacientes, além de diminuição regional de atividade, ocorreu um aumento de conectividade entre o giro do cíngulo anterior e regiões como a amígdala, corpo estriado e tálamo. Estes achados são consistentes com a hipótese de que o aumento da regulação de áreas pré-frontais sobre áreas límbicas estaria associado com os antidepressivos (Anand et al., 2007).

Num outro estudo, usando conectividade e processamento de faces com conteúdo de tristeza, Chen et al. (2008) evidenciaram que pacientes deprimidos tratados por oito semanas com fluoxetina apresentaram aumento da interrelação funcional entre a amígdala e o córtex frontal, o giro do cíngulo anterior, a ínsula, o tálamo e o corpo estriado (Chen et al., 2008).

Apesar de algumas discrepâncias, estudos diferentes demonstraram resultados semelhantes de diminuição de atividade neural após o tratamento farmacológico com diferentes tipos de antidepressivos em regiões cerebrais ligadas ao processamento emocional. Em particular, a amígdala, a ínsula e o giro do cíngulo anterior subgenual foram consistentemente salientados como potenciais candidatos a marcadores neurais de resposta ao tratamento antidepressivo.

1.6. Estudos de neuroimagem durante o uso de antidepressivos em voluntários saudáveis: uma área pouco explorada.

Compreender os efeitos antidepressivos na atividade neural das regiões envolvidas no processamento emocional pode ser facilitado estudando indivíduos saudáveis (sem história pessoal ou familiar de doenças psiquiátricas) e o impacto de medicações antidepressivas como os inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ISRS) e os inibidores seletivos da recaptção de noradrenalina (ISRN). Em indivíduos saudáveis, a administração aguda e intravenosa de um ISRS como o citalopram está associada a um aumento do reconhecimento de expressões faciais de medo e de felicidade (Harmer et al., 2002). Em outro estudo com administração oral subaguda (sete dias) de citalopram ou de reboxetina (ISRN), encontrou-se diminuição do reconhecimento de medo e raiva, bem como aumento da recordação de estímulos positivos (Harmer et al., 2004).

Num estudo psicofisiológico, o efeito direto na atividade neural após a administração aguda de citalopram foi associado com aumento do potencial evocado visual em áreas parieto-occipital em resposta à visualização de cenas agradáveis, e em supressão de respostas a cenas desagradáveis em regiões frontais e occipitais (Kemp et al., 2004).

Estudos recentes de RMf mostraram que a administração aguda do citalopram está associada a um aumento do “estado de repouso” na amígdala, no corpo estriado, no tálamo e no hipocampo (McKie et al., 2005), bem como diminuição da resposta no córtex pré-frontal ventrolateral e na amígdala a faces de nojo (Del-Ben et al., 2005). Num outro estudo, foi verificado aumento de atividade na amígdala quando os indivíduos processavam expressões faciais (Bigos et al., 2008). Já a administração aguda de fluvoxamina (ISRS) foi associada com diminuição da resposta neural na amígdala quando um estímulo aversivo foi comparado com um neutro (Takahashi et al., 2005). Em outro estudo, a administração subaguda de citalopram foi associada com diminuição da atividade frontal (medial), amígdala e hipocampal a faces de medo (Harmer et al., 2006). Finalmente, um estudo similar com administração de reboxetina evidenciou diminuição da atividade neural na amígdala em resposta a faces de medo (Norbury et al., 2007). Entretanto, outro estudo utilizando apenas uma única dose de reboxetina, durante o processamento de faces de medo, evidenciou aumento na atividade da amígdala (Onur et al., 2009). Recentemente, em um estudo com escitalopram, durante 21 dias, observou-se diminuição de atividade neural na amígdala e ínsula bilateral durante o processamento de faces de medo, mas não durante o processamento de faces de felicidade (Arce et al., 2008).

Estes achados evidenciam diminuição de atividade em regiões límbicas subcorticais (como a amígdala), mas também em regiões

paralímbicas e pré-frontais, principalmente a estímulos negativos (e não positivos) após a administração de antidepressivos ISRS e ISRN.

1.7. Efeito extraterapêutico dos antidepressivos

Nos últimos anos, vários autores têm chamado a atenção para determinados efeitos “extraterapêuticos” dos antidepressivos que vão além da esperada remissão dos sintomas ou síndromes clínicas para os quais são prescritos (Gentil et al., 1993; Kramer, 1993; Andrews et al., 1998; Knutson et al., 1998). Melhoras são descritas em relação à irritabilidade, sociabilidade, paciência e tolerância em situações desagradáveis ou provocações. Muitos indivíduos, de fato, descrevem-se como emocionalmente mais estáveis do que antes do tratamento, ou mesmo antes do início da doença ou disfunção (Gentil et al., 1993).

Este efeito é visto em diferentes áreas do comportamento e é compatível com o fato de os medicamentos denominados, genericamente, “antidepressivos” exercerem diversas ações além dos seus efeitos principais nos transtornos depressivos, obsessivo-compulsivos e de pânico/agorafobia. Em particular, existem evidências de que eles são capazes de diminuir hostilidade, irritabilidade e ira (George et al., 1989; Fava et al., 1990; Fava et al., 1993; Fava et al., 1993; Salzman et al., 1995), além de melhorar a irritabilidade e a disforia na fase pré-menstrual (Sundblad et al., 1992).

Os efeitos observados sobre o humor, estado subjetivo em geral, desempenho e conduta social das pessoas tratadas com esses medicamentos, estão, provavelmente, associados ao sucesso de antiga prática clínica, comum inclusive no Brasil (Gentil e De Lucia, 1979), de tratar pacientes com transtornos leves do humor, submetido à psicoterapia ou atendido por clínicos gerais, com doses baixas desses medicamentos, consideradas “subterapêuticas” (por exemplo, 12,5 Mg de amitriptilina associada a doses baixas de um benzodiazepínico).

Alguns desses efeitos “extraterapêuticos” dos antidepressivos foram descritos no livro “Listening to Prozac” (Kramer, 1993). Kramer (1993) utilizou o termo “psicofarmacologia cosmética”, para descrever o efeito que torna as pessoas “melhor que bem” (*better than well*), ou seja, que faz com que as pessoas adquiram uma energia extra e tornem-se socialmente atraentes, mencionando com destaque a tranilcipromina como o protótipo de “cosmético”. Kramer (1993) sugeriu que essas pessoas não apenas estavam respondendo ao efeito antidepressivo e antipânico, mas que, principalmente depois da remissão da sintomatologia principal, esses medicamentos continuariam agindo sobre variáveis relacionadas a aspectos do temperamento (Kramer, 1993).

Em um estudo usando reboxetina, Tse et al. (2003) evidenciaram aumento da cooperação social e maior sociabilidade em uma população de

voluntários saudáveis após administração de duas semanas de reboxetina (Tse e Bond, 2003). Já Gorenstein et al. (1998) observaram melhora de irritabilidade e ansiedade em voluntários saudáveis após uso de doses baixas de clomipramina por cinco semanas (Gorenstein et al., 1998).

Em vista dos dados revisados acima, pode-se inferir que a compreensão dos efeitos de antidepressivos nos sistemas neurais tem o potencial de permitir um maior entendimento das ações desta classe de medicação não só nos transtornos psiquiátricos, como a depressão maior, mas também os efeitos “extraterapêuticos” destas drogas. Esta linha de inferência justifica a realização de estudos investigando os efeitos de antidepressivos em voluntários não portadores de transtornos psiquiátricos, incluindo o uso de técnicas de neuroimagem.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Esta tese teve como objetivo utilizar a técnica de RMf para avaliar o engajamento de circuitos cerebrais específicos durante indução emocional em voluntários saudáveis, envolvendo particularmente medo, raiva e felicidade.

Estas emoções foram induzidas através da apresentação de fotografias com conteúdo emocional do IAPS, em comparação com fotografias neutras. As fotografias foram apresentadas durante imageamento cerebral por RMf, para permitir comparações entre os padrões de ativação cerebral regional obtido durante os diferentes tipos de estados emocionais. Com o objetivo de otimizar a resposta emocional durante a apresentação das fotografias, utilizamos a técnica desenvolvida por Phillips et al. (2004), na qual o indivíduo é instruído, antes da apresentação das fotografias, a se imaginar na situação apresentada nas fotografias (Mataix-Cols et al., 2003). Este princípio foi utilizado em estudos anteriores de estimulação emocional e RMf com sucesso em voluntários saudáveis e portadores de transtornos psiquiátricos (Lange et al., 2003; Mataix-Cols et al., 2003; Mataix-Cols et al., 2004; Gilbert et al., 2009).

Os participantes do presente projeto foram voluntários saudáveis, estudados com RMf para cada uma das emoções pesquisadas. Tais voluntários foram recrutados a partir de um ensaio clínico farmacológico que objetivou testar os efeitos da droga antidepressiva clomipramina em doses suficientes para modificar padrões de resposta emocional, e receberam doses padronizadas deste antidepressivo por um tempo determinado. Cada voluntário foi submetido a duas sessões de RMf durante indução emocional: uma delas na vigência do uso de clomipramina, e a outra após a suspensão da medicação (*wash-out*).

2.2. Objetivos específicos

A estratégia de pesquisa acima teve os seguintes objetivos específicos:

(a) Contribuir para uma melhor compreensão das ações cerebrais da clomipramina nos sistemas neurais envolvidos com o processamento emocional (Phillips et al., 2008). Previmos que durante a vigência do uso do antidepressivo, ocorreriam mudanças no padrão da ativação destes sistemas neurais. Estas mudanças poderiam envolver uma menor ativação de algumas regiões cerebrais específicas, como amígdala, ínsula, cíngulo anterior, córtex pré-frontal, e tálamo.

(b) Através de uma classificação da amostra de acordo com a presença de resposta ou não ao uso da clomipramina, investigar diferenças nos

padrões de ativação cerebral entre os sujeitos respondedores e não-respondedores a esta medicação antidepressiva.

3. HIPÓTESES

Com base na literatura revisada no primeiro capítulo, foi previsto que indivíduos saudáveis apresentariam:

(a) Durante o uso de clomipramina comparado ao *wash-out*, atividade diminuída em regiões cerebrais pertencentes ao sistema neural implicado na avaliação e geração de respostas comportamentais a estímulos emocionais de valência negativa;

(b) Nenhuma diferença significativa entre os estados medicado e não medicado em relação aos padrões de atividade neural nos circuitos cerebrais acima, durante a apresentação de estímulos de valência positiva;

(c) Diferenças de atividade funcional entre indivíduos respondedores à clomipramina comparados com os não respondedores a esta droga antidepressiva, especificamente em regiões cerebrais relevantes para o processamento emocional.

4. MÉTODOS

4.1. Seleção de indivíduos

4.1.1. Aspectos éticos

Os participantes assinaram termo de consentimento informado antes de serem submetidos a qualquer tipo de procedimento, incluindo entrevistas de avaliação. O estudo obedeceu às recomendações adotadas pela 18^a Assembléia Médica Mundial, Helsinque, Finlândia, 1964, bem como suas subseqüentes revisões nas 29^a, 35^a, 41^a Assembléias (Tóquio, Veneza, Hong Kong, respectivamente).

Os indivíduos que não foram selecionados para entrar no estudo por apresentarem diagnósticos ou sintomas indicativos de algum transtorno psiquiátrico maior ou condição médica geral foram orientados a procurar atendimento específico. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (protocolo no. 048/01 em 02 de março de 2001).

4.1.2. Recrutamento dos voluntários e pré-seleção

Para os estudos de RMf, foram incluídos 18 voluntários saudáveis, recrutados a partir de um grupo maior de sujeitos que participaram de um ensaio clínico farmacológico controlado com placebo, duplo-cego, que fez parte do Projeto Temático: Estudo Psicobiológico da Regulação Emocional a Partir Dos Efeitos de Antidepressivos – Protocolo IPQ-VOL-NL-01.04, coordenado pelo Prof. Valentim Gentil Filho, pela Profa. Clarice Gorenstein e pelo Prof. Geraldo Busatto Filho, e com financiamento pela FAPESP (processo 01/00189-9) até 2008, e que objetivou testar os efeitos da clomipramina em doses suficientes para modificar padrões de resposta emocional em voluntários sem história pessoal ou familiar de transtornos psiquiátricos.

O processo de recrutamento dos voluntários para o projeto temático como um todo foi realizado através de cartazes, palestras, anúncios na imprensa, chamadas de rádio e TV, encaminhamento por outros participantes e pesquisadores, cartas a indivíduos que participaram de estudos anteriores, etc. Foram divulgadas as características dos voluntários procurados, bem como a natureza geral do estudo. Os indivíduos interessados foram submetidos a uma entrevista telefônica para triagem inicial e demais procedimentos de seleção.

Além dos experimentos de neuroimagem, os sujeitos recrutados para o ensaio clínico foram também avaliados quanto ao ciclo sono-vigília, padrão alimentar, personalidade, humor e processamento de informações cognitivas.

4.1.3. Critérios de Inclusão

- a) Voluntários sadios com idades entre 21 e 50 anos;
- b) Primeiro grau completo de escolaridade mínima;
- c) Residência na cidade de São Paulo;
- d) Escore no questionário *Self Report* (SRQ-20) abaixo ou igual ao ponto de corte (5, para homens e 7, para mulheres) (Almeida, 1999);
- e) Ausência de diagnóstico de transtorno psiquiátrico através da entrevista clínica estruturada (*Structured Clinical Interview – SCID - DSM-IV* (First et al., 1995);
- f) Classificação como destro de acordo com o inventário estruturado de lateralidade cerebral (Annett, 1970);
- g) Assinatura de consentimento informado.

4.1.4. Critérios de Exclusão

- a) Presença de condições clínicas crônicas ou agudas que possam interferir com os procedimentos do estudo ou prejudicar o voluntário;

- b) História prévia ou presença atual de abuso/dependência de álcool ou outras drogas psicoativas;
- c) História de tentativas de suicídio;
- d) Resultado no rastreamento de transtornos de personalidade indicando escore menor ou igual a 20 no item de auto-direcionamento (*self-directness*), ou escore maior ou igual a 56 na soma dos itens auto-direcionamento (*self-directness*) mais cooperatividade (*cooperativeness*) (Inventário de Temperamento e Caráter - *Temperament and Character Inventory* - TCI, (Cloninger et al., 1994; Fuentes et al., 1999));
- e) Indivíduos com história familiar de primeiro grau ou em avós de doenças mentais psiquiátricas, conforme avaliação pelo rastreamento de história familiar (*Family History Screen*)(Weissman et al., 2000);
- f) Presença de gravidez ou amamentação, ou história de parto nos últimos 6 meses;
- g) História de tratamento com medicamentos psicoativos nos 6 meses anteriores à seleção;
- h) Início de psicoterapia em período inferior aos 6 meses anteriores à seleção;
- i) Contra-indicação para realização de ressonância magnética de crânio, como próteses metálicas e cliques metálicos.

4.2. Avaliação da resposta clínica ao tratamento com clomipramina.

A avaliação da resposta à clomipramina dos participantes do ensaio farmacológico pela equipe clínica do projeto temático foi realizada através de uma entrevista qualitativas e incluíram 4 domínios (Figura 3):

- a) Tolerância interpessoal (diminuição de irritabilidade e tensão na interação social)
- b) Eficiência (melhora na habilidade em decidir, em priorizar demandas e autoconfiança)
- c) Bem estar (sentir-se melhor, melhora do humor)
- d) Mudança substancial no sentimento de *self* usual.

Critério de Resposta: para atribuição do critério de resposta era necessário que houvesse alteração para melhor em no mínimo três das quatro áreas identificadas nas respostas dos participantes, constatada por dois entrevistadores independentes.

Figura 3. - Categorização dos critérios de resposta clínica a clomipramina

Área 1: tolerância	irritação tolerância tensão ansiedade
Área 2: eficiência	segurança eficiência priorização de tarefas capacidade de tomar decisões
Área 3: bem estar	sensação de bem estar disposição
Área 4: estar diferente	estado diferente do normal artificial não se reconhece

A avaliação da resposta à clomipramina foi realizada através de entrevista qualitativa que incluía quatro domínios (tolerância, eficiência, bem estar e estar diferente). O participante era considerado respondedor caso dois pesquisadores independentes concordassem que o participante apresentou alteração para melhor em no mínimo três dos quatro domínios da entrevista.

4.3. Ensaio farmacológico

O ensaio farmacológico com doses repetidas de clomipramina em baixas doses, conduzido pela equipe liderada pelos Profs, Valentim Gentil Filho e Clarice Gorenstein, consistiu de três etapas:

Etapa 1: simples cego, com duração de quatro semanas, na qual os indivíduos eram avaliados semanalmente, e faziam uso de doses baixas repetidas de clomipramina (até 40Mg/dia); ao final do tratamento determinava-se resposta ou não resposta clínica à clomipramina.

Etapa 2: fase duplo-cega, de tratamento cruzado, na qual os indivíduos que foram considerados respondedores na etapa 1 receberam clomipramina e propantelina, com ordem de tratamento balanceada. Foram usadas doses flexíveis de 10 a 40 Mg clomipramina ou placebo (propantelina). Previu-se que durante a fase com propantelina os sujeitos passem a não responder e durante a fase clomipramina mantivessem o critério.

Etapa 3: quatro semanas de *wash-out* de clomipramina. Retirada total e gradual da medicação.

Dos 18 indivíduos que seriam recrutados para o estudo de RMf a partir da amostra selecionada para o ensaio clínico acima, estimou-se que aproximadamente 30% apresentariam resposta clínica à clomipramina, conforme determinado através de uma entrevista qualitativa e aplicação de escalas padronizadas (vide item 4.2. acima).

4.3.1. Indivíduos não respondedores ao tratamento com clomipramina

Os indivíduos não respondedores a clomipramina participaram somente da primeira etapa do ensaio clínico (simples cego – quatro semanas de clomipramina), e em seguida entraram na etapa três do ensaio clínico (*wash-out*).

4.3.2. Indivíduos respondedores ao tratamento com clomipramina

Os indivíduos respondedores a clomipramina entraram na segunda etapa do ensaio clínico após completarem a primeira etapa. Nesta segunda etapa os indivíduos participaram de um estudo clínico duplo cego controlado por placebo durante quatro semanas. Ao término da segunda etapa, os indivíduos respondedores iniciaram a etapa três do estudo clínico (*wash-out*).

4.4. Procedimentos realizados no presente estudo de RMf

No presente projeto de neuroimagem, os voluntários participaram de três procedimentos relacionados à obtenção de imagens de RMf (Figura 4):

- I. Uma sessão de simulação destinada a propiciar o treinamento e familiarização com a tecnologia a ser utilizada no dia do exame propriamente dito,
- II. Uma sessão experimental de RMf durante estimulação emocional através da visualização de fotografias do IAPS, enquanto estiveram sob o uso de medicação (Visita I),
- III. Uma sessão de RMf nos mesmos moldes acima, enquanto estiveram sem efeito de medicação (Visita II).

4.4.1. Indivíduos não respondedores ao tratamento com clomipramina

Indivíduos não respondedores à clomipramina participaram apenas das etapas 1 e 3 do ensaio farmacológico, tendo sido realizada aquisição de imagens de ressonância magnética ao final de cada uma das duas etapas: visita I - durante o estado medicado (após 4 semanas de clomipramina); e visita II - durante o estado não medicado (após 4 semanas de *wash-out*) (Figura 4).

4.4.2. Indivíduos respondedores ao tratamento com clomipramina

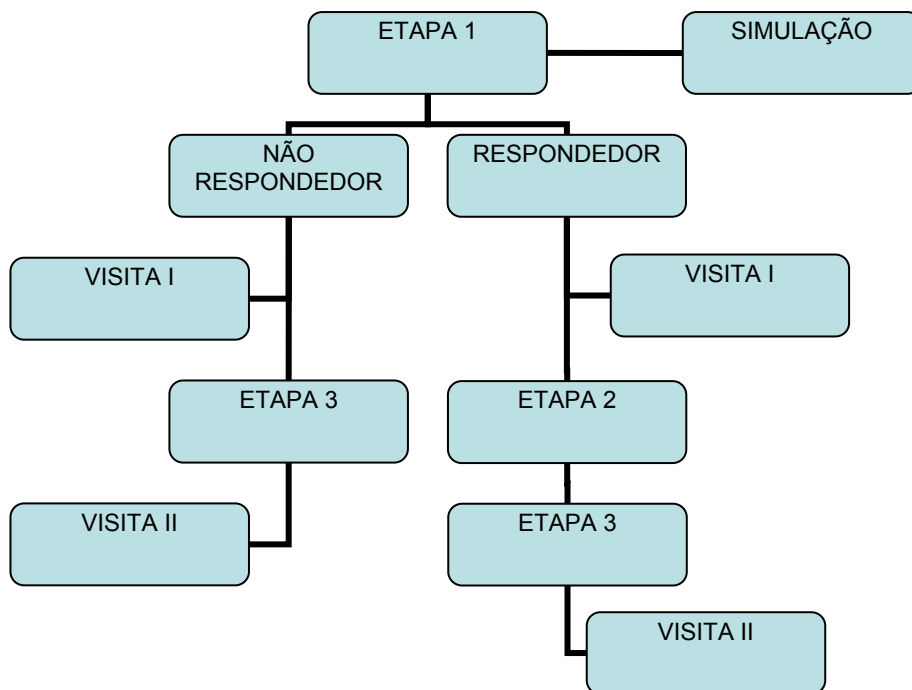
Os indivíduos respondedores à clomipramina realizaram as três etapas do ensaio farmacológico descrito acima, e as duas visitas de RMf (a primeira no final da etapa 1 do ensaio farmacológico e a segunda no final da etapa 3, Figura 4).

4.4.3. Diferenças e semelhanças entre os respondedores e não respondedores em relação ao fluxo no estudo

Indivíduos respondedores e não respondedores diferiram na presença ou ausência de resposta farmacológica, nas etapas do ensaio farmacológico realizadas (etapas um e dois ou etapas um, dois e três) e no intervalo de tempo entre as visitas realizadas à RMf. O intervalo de tempo para os não respondedores foi em média 4 semanas; e para os respondedores foi em média 8 semanas.

Na presente tese apenas reportamos os achados da visita I dos respondedores e das visitas I e II dos não respondedores.

Figura 4. - Fluxograma dos participantes no estudo de neuroimagem e ensaio clínico



Os voluntários não respondedores participaram da etapa 1 e 3 do ensaio farmacológico e, também, da simulação e da visita I e II de RMf. Os voluntários respondedores participaram da etapa 1, 2 e 3 do ensaio farmacológico e, também, da simulação e da visita I e II de RMf. Desta maneira, voluntários respondedores e não respondedores diferiram na presença ou ausência de alteração comportamental após uso de baixas doses repetidas de clomipramina; no intervalo de tempo entre a visita I e II; e na participação da etapa 2 do ensaio farmacológico.

ETAPA 1: Ensaio farmacológico simples cego, quatro semanas;

ETAPA 2: Ensaio farmacológico duplo cego controlado por placebo, quatro semanas;

ETAPA 3: Ensaio farmacológico fase de *wash-out*, quatro semanas;

SIMULAÇÃO: ambientação e treinamento dos indivíduos;

VISITA I: Neuroimagem: indivíduos medicados com doses baixas repetidas de clomipramina por quatro semanas;

VISITA II: Neuroimagem: indivíduos não medicados, após o término do *wash-out*.

4.5. Fluxo geral do estudo

4.5.1. Seleção de indivíduos

Nesta fase os voluntários participavam de uma entrevista clínica com a equipe para determinar sua elegibilidade para tomar parte do estudo. Foram realizados testes laboratoriais, exame físico, preenchimento de escalas e formulários. Para ser considerado apto a participar do estudo, o indivíduo deveria preencher os critérios de inclusão e exclusão descritos anteriormente (4.1.3. e 4.1.4.). Caso o voluntário fosse considerado elegível, o mesmo passaria à fase seguinte.

4.5.2. Etapa 1 do ensaio farmacológico

Nesta fase todos os indivíduos recebiam baixas doses orais repetidas diariamente de clomipramina durante quatro semanas. Uma vez por semana necessariamente os indivíduos passavam por avaliação clínica com a equipe do ensaio farmacológico, determinando possíveis efeitos colaterais, reações inesperadas e complicações ao medicamento. Além disso, os indivíduos eram avaliados quanto aos possíveis efeitos da medicação na percepção subjetiva, cognição e emoção. Ao final das quatro semanas, a equipe do ensaio clínico determinava a presença ou ausência de resposta clínica à clomipramina segundo o critério descrito no item (4.2.).

4.5.3. Visita de simulação

A visita de simulação foi executada na mesma semana da primeira visita à RMf (normalmente entre três e quatro dias antes), isto é, quando os indivíduos estavam sob medicação. Através de um simulador, especialmente construído para o projeto, o participante pôde experimentar a replica do aparelho de RMf, o ambiente de RMf, e os equipamentos utilizados durante a aquisição de dados. Além disso, cada um dos indivíduos foi treinado e exposto a uma versão diferente das fotografias contidas no paradigma que iria experimentar no dia de aquisição de dados na RMf. Desta maneira, o participante tornou-se acostumado com a projeção do paradigma, ao ruído do aparelho de ressonância magnética e à temperatura do ambiente de RMf.

4.5.4. Visita I - RMf

Nesta visita o voluntário participava de uma entrevista com a equipe de enfermagem na qual realizava-se a triagem e a retirada de objetos metálicos; em seguida, o voluntário participava de uma entrevista com o pesquisador aonde eram realizados os preparativos e instruções sobre a realização da sessão experimental de RMf. O indivíduo então era posicionado no equipamento de RMf e medidas preventivas para evitar movimentos da cabeça eram adotadas como inserir elementos almofadados entre a cabeça do participante e o local aonde a cabeça do participante era

posicionada no equipamento de RMf. Neste momento todos equipamentos eram testados e instruções finais eram passadas ao participante. Com toda a equipe posicionada e todos os equipamentos prontos e sincronizados, a aquisição de dados de imagem propriamente dita iniciava. Após o final da aquisição de imagens, o participante passava por uma segunda avaliação com o pesquisador com o objetivo de captar possíveis problemas ocorridos durante a aquisição de imagens, percepção do paradigma e reações subjetivas.

Esta visita era realizada ao final da primeira etapa do ensaio clínico e, portanto, o participante encontrava-se sob efeito de doses baixas repetidas de clomipramina (simples cego, quatro semanas de medicação).

4.5.5. Etapa 3 do ensaio farmacológico

Esta etapa do ensaio farmacológico consistiu da retirada total e gradual do antidepressivo clomipramina. Os participantes eram constantemente avaliados para possíveis reações adversas e inesperadas pela equipe do ensaio clínico farmacológico.

4.5.6. Visita II - RMf

Esta visita compreendeu procedimentos semelhantes aos realizados na primeira visita. Atenção especial foi tomada para as duas visitas serem o

mais semelhantes possível. Desta maneira, a maior diferença entre as duas visitas era a etapa do ensaio clínico em que o participante se encontrava.

Esta visita foi realizada ao final da etapa três do ensaio clínico e, portanto, os indivíduos encontravam-se sem efeito de doses baixas repetidas de clomipramina.

4.6. Paradigma experimental

4.6.1. Seleção de estímulos visuais a partir do banco de fotografias do IAPS

Para selecionar as fotografias do IAPS utilizadas no estudo, foi estabelecida uma cooperação com o Prof. Dr. Hermano Tavares, que coordenou um estudo-piloto com 41 voluntários entre alunos de graduação de Psicologia da USP e alunos de pós-graduação do Instituto de Ciências Biomédicas da USP. Nesta avaliação-piloto, foram apresentadas numa tela de computador fotografias do IAPS destinadas a provocar respostas emocionais condizentes com o objetivo deste projeto (medo, raiva, felicidade, e neutralidade emocional). Na mesma tela de computador, foram apresentadas, em seguida às fotografias, escalas de auto-avaliação visual-analógicas para classificação e seleção das fotografias que mais despertaram as emoções procuradas para o estudo.

Na tentativa de aumentar a especificidade da resposta emocional e reduzir a interferência de preferências e suscetibilidades individuais às fotografias, as mesmas foram precedidas de uma instrução apresentada visualmente na tela do computador, solicitando que os indivíduos procurassem se sentir como participantes das situações apresentadas nas fotografias. Esta estratégia já foi utilizada com sucesso em estudos de RMf realizados com grupos de voluntários saudáveis (Mataix-Cols et al., 2003) e pacientes com transtornos psiquiátricos (Mataix-Cols et al., 2004).

Além disto, ao invés da apresentação de apenas uma fotografia por vez, as mesmas foram apresentadas em sequências de três, com temática relacionada entre si. Desta forma, pretendeu-se aumentar a chance de obtenção da resposta emocional desejada. Após a visualização das fotografias, o teor da resposta emocional foi avaliado através de escalas visual- analógicas.

Nas fotografias selecionadas para provocar emoções de felicidade, uma categorização em dois tipos de felicidade foi determinada pela presença de altos valores na escala de alerta; por exemplo, uma fotografia de um pai abraçando seu filho foi categorizada como felicidade “relaxada”, enquanto uma fotografia de pessoas descendo um rio em um bote foi categorizada como felicidade “ativada”.

Neste estudo-piloto, as fotografias selecionadas do IAPS para cada temática, para posterior utilização no experimento de RMf, foram as seguintes:

Grupo “Felicidade-Ativada”: fotografias de temática relacionada a modalidades esportivas e situações de aventura em contexto positivo (anexo A).

Grupo “Medo”: fotografias explorando temor a fenômenos da natureza, sangue e ferimentos, predadores potenciais e animais peçonhentos (anexo B).

Grupo “Raiva”: fotografias mostrando cenas de maus tratos, violência, agressão indireta e guerra (anexo C).

Grupo “Neutro”: fotografias de objetos pessoais, utensílios domésticos, etc (anexo D).

A partir do estudo preliminar acima com as fotografias, foram selecionadas para o experimento de RMf os grupos raiva, medo, felicidade ativada e neutro. As sequências selecionadas para o experimento de RMf foram aquelas que obtiveram maior resposta em relação à emoção alvo; por exemplo, nos grupos de medo, foram selecionadas as fotografias que obtiveram maiores escores nas escalas analógico-visuais no estudo-piloto.

4.6.2. Paradigma de indução emocional por fotografias durante o experimento de RMf

O experimento de RMf consistiu na aquisição de imagens durante a visualização de cada um dos grupos de fotografias do IAPS, num desenho convencional de aquisição de dados “em blocos”. Cada emoção a ser testada (felicidade ativada – a partir deste momento denominada apenas felicidade, medo e raiva) foi estudada em um paradigma intercalados por blocos de conteúdo neutro. Desta maneira três paradigmas de aquisição de imagens no total em cada uma das duas visitas: paradigma de Felicidade, paradigma de Medo e paradigma de Raiva. Cada paradigma foi composto por oito blocos (três de conteúdo neutro e cinco de conteúdo emocional), e cada bloco foi constituído da seguinte forma: uma instrução visual (5 segundos), três fotografias do IAPS selecionadas no estudo piloto acima (sete segundos e meio cada), e quatro escalas visuo-analógicas (5 segundos cada, avaliando respectivamente medo, raiva, alerta e felicidade). As instruções, fotografias e escalas foram apresentadas através de um jogo de espelhos montados dentro do aparelho de ressonância magnética em uma tela branca de projeção. As respostas às escalas visual-analógicas foram fornecidas pelo indivíduo através de uma luva adaptada na mão do voluntário que permite a seleção da resposta apenas encostando o polegar em qualquer outro dedo (por exemplo: dedo mínimo resposta 1, dedo anelar resposta 2 e assim por diante) preparada especialmente para o projeto. O

treinamento para uso da projeção e da luva foi feito durante a visita de simulação mencionada acima.

Dentro de cada um dos três paradigmas (Felicidade, Medo e Raiva), os blocos foram distribuídos de forma a otimizar o tempo durante o qual o voluntário ficou dentro do aparelho de ressonância magnética, sem prejuízo do poder estatístico da análise das imagens de RMf. Assim, a sequência de blocos emocionais e neutros em cada paradigma foi:

A – B – A – B – A – A – B – A

Na sequência acima, a letra “A” corresponde a um bloco de conteúdo emocional e a letra “B” a um bloco com conteúdo neutro.

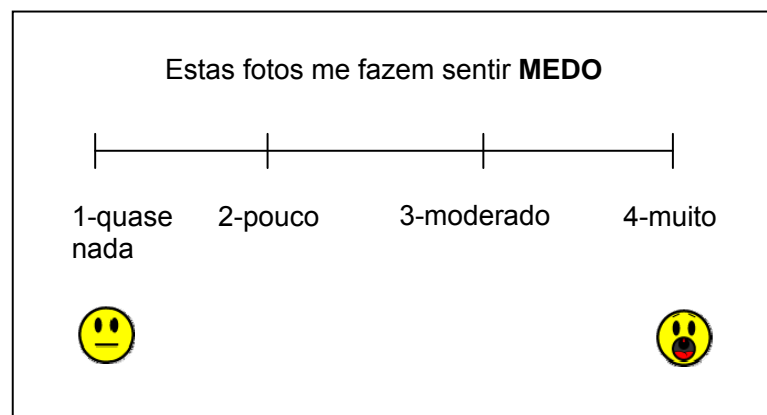
Cada escala visuo-analógica (alerta, felicidade, raiva e medo) foi composta de quatro opções de resposta para diferentes intensidades da emoção questionada (1-quase nada, 2-pouco, 3-moderado e 4-muito). A fim de facilitar o rápido entendimento da emoção questionada, a legenda da escala foi complementada com um emoticon (representação ilustrativa de uma determinada emoção) nos extremos de opção (Figura 5).

Desta maneira, cada bloco seguiu o esquema a seguir:

Instrução → Fotografia → Fotografia → Fotografia → Escala → Escala →
Escala → Escala

Um exemplo final de um bloco do paradigma de Felicidade (“viagem”) pode ser visto na Figura 6, da forma como foi apresentado durante o exame de RMf.

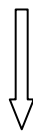
Figura 5. - Modelo de escala visuo-analógica utilizada no paradigma de indução emocional para avaliar o sentimento subjetivo



Ao final de cada bloco e após visualizar as fotografias o voluntário respondeu quatro escalas visuo-analógicas (medo, raiva, alerta e feliz). Cada escala determinou quanto as fotografias fizeram o voluntário sentir determinada emoção. Através de uma luva demagnetizada especialmente projetada para o estudo, o voluntário encostou o polegar contra a segunda falange caso sentisse muita emoção, ou contra a terceira falange caso sentisse moderada emoção, ou contra a quarta falange caso sentisse pouca emoção, ou contra a quinta falange caso sentisse quase nada de emoção. Para cada escala, o voluntário teve cinco segundos para responder.

Figura 6. - Modelo de um bloco de fotografias com conteúdo emocional utilizado no paradigma felicidade



**PREPARE-SE PARA A
MAIOR VIAGEM
DA SUA VIDA**





Estas fotos me fazem sentir **MEDO**

1-quase nada 2-pouco 3-moderado 4-muito





Modelo de um bloco de fotografias com conteúdo emocional do paradigma de Felicidade. A instrução textual foi apresentada por cinco segundos, cada uma das três fotografias de temática relacionada por sete segundo e meio. Cada escala visuo-analógica (alerta, medo, raiva e feliz) foi apresentada por cinco segundos e permitiu que o voluntário informasse quanta indução de sentimento foi produzida após a visualização das fotografias.

4.7. Aquisição dos dados de neuroimagem

Imagens para análise do efeito BOLD foram adquiridas utilizando equipamento de 1,5 T GE LX-MR (General Electric, Milwaukee WI, USA), no Instituto de Radiologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP. Foram adquiridas, alternadamente, 25 fatias do cérebro com intervalos de 0,3 mm entre si, a cada 2,5 segundos (TR=2,5s), totalizando 152 volumes cerebrais para cada sessão de aquisição. Foram realizadas 3 séries por sujeito participante. Os parâmetros de aquisição foram: *rise time* de 125 ms, matriz 64x64, tempo de eco de 40 ms, *flip angle* 90°, gradiente de eco, eco-planar. A apresentação do estímulo foi sincronizada com a aquisição de imagens via relê óptico, através de pulso de radiofrequência. Um software foi produzido especialmente para o propósito de sincronizar a aquisição de imagens com a apresentação do estímulo, das escalas visuais e suas respostas.

Em seguida à sessão de RMf, foram adquiridas imagens de RM estrutural de alta resolução, para interpolação dos dados de RMf, usando a sequência de aquisição SPGR-3D, com os parâmetros: 124 cortes com 1.5 mm de espessura, TR=20s, TE=3s, matriz 256x192, FOV=220mm, *flip-angle*=20; bem como a sequência FLAIR, para verificações de lesões do encéfalo, com os seguintes parâmetros: 20 cortes de 5mm de espessura, TR=10s, TE=140ms, IR=2,2s e FOV=240mm).

4.8. Análise dos dados

4.8.1. Análise de dados comportamentais

4.8.1.1. Indivíduos sem resposta clínica à clomipramina

Os dados comportamentais foram analisados usando os escores das escalas subjetivas referentes a cada um dos três paradigmas para cada uma das quatro escalas (alerta, felicidade, medo e raiva) através de comparações planejadas através de t-teste pareado entre os escores de cada escala na visita I (sem medicação) e na visita II (sob medicação).

4.8.1.2. Comparação entre indivíduos com e sem resposta clínica à clomipramina

A comparação entre os indivíduos respondedores e os não respondedores foi realizada utilizando t-testes não pareados em cada uma das categorias de escalas para cada tipo de bloco (emocional ou neutro).

A comparação entre respondedores e não respondedores apenas foi realizada na Visita I.

4.8.2. Processamento e análise estatística das imagens

Os dados foram processados e analisados usando o programa *Statiscal Parametric Mapping* versão 5 (SPM5; <http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm>). Primeiramente as imagens foram convertidas de DICOM para o formato NIFTI-1. Em seguida as imagens de cada participante foram realinhadas inicialmente usando o primeiro volume do cérebro adquirido como referência, e modificadas para corrigir a não homogeneidade estática do campo magnético e para a não homogeneidade de interações de movimento. Em seguida as imagens foram co-registradas com a imagem de ressonância magnética estrutural do mesmo sujeito, segmentadas e normalizadas espacialmente usando o modelo do Instituto Neurológico de Montreal (MNI) (Ashburner e Friston, 2005; Friston, 2007). Por fim, estas imagens foram interpoladas tri-linearmente para um voxel de tamanho final $2 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$ e suavizadas espacialmente com filtro Gaussiano de 6-mm. As séries temporais em cada voxel foram filtradas altamente à $1/128$ de Hertz. As imagens de um voluntário durante o paradigma de indução de medo não puderam ser usadas devido a problemas técnicos durante a aquisição de dados. A série de dados estrutural foi co-registrada sempre com as imagens funcionais adquiridas durante a mesma sessão.

Análises a nível individual foram realizadas utilizando o *fixed effect model* nas duas condições (fotografias emocionais e fotografias neutras) em uma análise em bloco. Como medida basal, foi utilizado o período no qual o

individuo visualizava as instruções e respondia às escalas subjetivas. Os parâmetros de movimento provenientes do estágio do realinhamento foram incorporados como uma covariável de confusão. Os eventos foram modelados usando a Função de Resposta Hemodinâmica Canônica (Friston, 2007). As duas condições foram então incorporadas na análise de grupo usando a imagem do t-contraste relevante (fotografias emocionais > basal e fotografias neutras > basal).

4.8.2.1. Análise dos dados de neuroimagem nos indivíduos não respondedores à clomipramina

A análise de grupo nos indivíduos não respondedores foi realizada nas imagens do t-contraste do nível individual para examinar a atividade neural usando t-teste pareado (contrastos planejados) entre cada emoção (1- fotografias emocionais no estado medicamentoso com fotografias emocionais do estado não medicamentoso; e 2- fotografias neutras do estado medicamentoso com fotografias neutras do estado não medicamentoso).

4.8.2.2. Análise dos dados de neuroimagem comparando os indivíduos respondedores e os não respondedores à clomipramina

A comparação entre os indivíduos respondedores e os não respondedores foi realizada utilizando t-testes não pareados em cada um dos paradigmas para cada tipo de bloco (emocional ou neutro).

A comparação entre respondedores e não respondedores apenas foi realizada na Visita I.

4.8.2.3. Análise por regiões de interesse

Em estudos de neuroimagem existem dois tipos básicos de análise: análise do cérebro como um todo e análise do cérebro em regiões específicas. Quando se utiliza a análise do cérebro como um todo, têm-se a vantagem de explorar o cérebro na sua totalidade; entretanto, devido a múltiplas comparações realizadas, perde-se em poder estatístico aumentando a chance de falso positivo. Quando se utiliza a análise em regiões específicas, têm-se a vantagem de explorar regiões determinadas do cérebro nas quais o pesquisador apresenta hipóteses *a priori*, desta maneira, diminuí a chance de falso positivo. No presente estudo optamos por utilizar a análise por regiões de interesse devido a específica hipótese *a priori* de alteração da atividade cerebral em regiões envolvidas com o processamento emocional tal como a amídala.

As seguintes regiões de interesse foram estudadas utilizando máscaras anatômicas criadas com o *Wake Forest University Pick Atlas* (Maldjian et al., 2003): amígdala, córtex pré-frontal ventrolateral (CPFVL - BA47), córtex pré-frontal dorsolateral (CPFDL - BA9 e 46), córtex pré-frontal ventromedial (CPFVM - BA11), córtex pré-frontal dorsomedial (CPFDM - região medial da BA 10), giro do cíngulo anterior (GCA - BA24, 25 e 32), hipocampo, giro parahippocampal, ínsula, caudado, putâmen e tálamo.

4.8.2.4. Nível de significância estatística

Para corrigir múltiplos testes estatísticos mantivemos um limiar de falso positivo conservador com uma detecção de falso positivo de $p < 0.05$ ao nível de cluster, acrescido de um número mínimo de voxels (k) determinado empiricamente por simulação de Monte Carlo implementada utilizando o programa *AlphaSim* (<http://afni.nimh.nih.gov/pu/dis/d/manual/AlphaSim.pdf>), que representam correlações espaciais entre voxels ativados na mesma vizinhança (Forman et al., 1995; Gianaros et al., 2008).

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização demográfica da amostra

A amostra caracterizou-se por dezoito voluntários saudáveis, 77,8% do sexo feminino, com média de 34,3 anos de idade (DP = 6,3) e com média de 11 anos de escolaridade (DP = 0,6). Esta amostra de voluntários saudáveis foi subdividida em dois grupos de acordo com a presença de resposta (n=6) ou não-resposta (n=12) ao uso repetido de baixas doses de clomipramina na primeira etapa do ensaio clínico descrito no item 4.3. desta tese (quatro semanas, simples cego). Os dois grupos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao gênero, idade e escolaridade (Tabela 1).

Tabela 1. – Dados demográficos do grupo de indivíduos respondedores e não-respondedores à clomipramina

Gênero	Não-respondedores (n=12)		Respondedores (n=6)		t-teste	p
	número	%	número	%		
Masculino	3	25	1	16,7	$\chi^2_1=0,16$	0,6
Feminino	9	75	5	83,3		
	média	DP ¹	média	DP ¹		
Idade (anos)	33,5	6,9	35,83	5,11	$t_{16}=0,73$	0,48
Escolaridade (anos)	11,1	0,7	10,83	0,4	$t_{16}=0,83$	0,42

¹DP= desvio padrão; χ^2 = qui quadrado; t=t-teste

5.2. Resultados comportamentais das escalas de avaliação subjetiva durante a visualização de fotografias com conteúdo emocional e neutro

5.2.1. Indivíduos não-respondedores à clomipramina

5.2.1.1. Paradigma de Felicidade

Na análise utilizando t-teste pareado, os indivíduos não-respondedores à clomipramina não apresentaram diferença significativa na média de pontuação nas escalas (alerta, felicidade, medo e raiva) entre a visita I (sob medicação) e a visita II (sem medicação) durante o paradigma de Felicidade. Esta ausência de diferenças foi verificada tanto no bloco com fotografias de conteúdo emocional como no bloco com fotografias de conteúdo neutro (Tabela 2).

Entretanto, os indivíduos não-respondedores apresentaram uma tendência para pontuação maior de alerta na visita I durante o bloco de fotografias com conteúdo neutro, quando comparados com a visita II durante o paradigma de Felicidade ($t(11)=1,91$; $p=0.08$; Tabela 2).

5.2.1.2. Paradigma de Medo

Na análise utilizando t-teste pareado, os indivíduos não-respondedores à clomipramina não apresentaram diferença significativa na média de pontuação nas escalas (alerta, felicidade, medo e raiva) entre a visita I (sob medicação) e a visita II (sem medicação) durante o paradigma de Medo no bloco com fotografias de conteúdo emocional e no bloco com fotografias de conteúdo neutro (Tabela 2).

5.2.1.3. Paradigma de Raiva

Na análise utilizando t-teste pareado, os indivíduos não-respondedores à clomipramina não apresentaram diferença significativa na média de pontuação nas escalas (alerta, felicidade, medo e raiva) entre a visita I (sob medicação) e a visita II (sem medicação) durante o paradigma de Raiva no bloco com fotografias de conteúdo emocional e no bloco com fotografias de conteúdo neutro (Tabela 2).

Entretanto, os indivíduos não-respondedores apresentaram tendência para pontuação maior na escala de raiva na visita I durante o bloco de fotografias emocionais, quando comparados com a visita II durante o paradigma de Raiva ($t(11)=2.06$; $p=0.065$; Tabela 2).

Tabela 2. - Avaliação subjetiva após a apresentação de blocos de fotografias com conteúdo emocional e neutro nos indivíduos não-respondedores à clomipramina

Escalas	Visita I - sob medicação		Visita II - sem medicação		Comparação Planejada			
	Emoção [DP] ¹	Neutro [DP] ¹	Emoção [DP] ¹	Neutro [DP] ¹	Emoção		Neutro	
					t ²	p	t ²	p
					g.l. ³ =11		g.l. ³ =11	
Paradigma de Felicidade								
Raiva	1,05 [0,12]	1,03 [0,09]	1,07 [0,18]	1,11 [0,36]	(0,27)	0,79	(0,9)	0,39
Alerta	2,83 [0,82]	1,97 [0,85]	2,77 [0,73]	1,64 [0,95]	0,37	0,72	1,91	0,08
Medo	1,82 [0,49]	1,03 [0,09]	1,82 [0,7]	1,05 [0,13]	(0,05)	0,96	(1,0)	0,34
Felicidade	2,72 [0,86]	1,75 [0,79]	2,87 [0,87]	1,75 [0,96]	(1,06)	0,31	<0,01	1,00
Paradigma de Medo								
Raiva	2,08 [0,58]	1,05 [0,13]	1,97 [0,65]	1,17 [0,3]	0,54	0,60	(1,5)	0,17
Alerta	3,12 [0,78]	1,86 [0,96]	3,17 [0,82]	1,58 [0,83]	(0,37)	0,72	1,82	0,10
Medo	3,05 [0,8]	1,03 [0,09]	3,08 [0,75]	1,03 [0,09]	(0,30)	0,77	<0,01	1,00
Felicidade	1,13 [0,27]	1,44 [0,64]	1,15 [0,23]	1,47 [0,72]	(0,17)	0,87	(0,1)	0,90
Paradigma de Raiva								
Raiva	2,72 [0,48]	1,36 [0,39]	2,68 [0,76]	1,08 [0,21]	0,16	0,87	2,06	0,06
Alerta	3,23 [0,73]	2,11 [0,88]	3,23 [0,85]	1,92 [0,88]	(0,03)	0,98	0,69	0,51
Medo	2,66 [0,83]	1,28 [0,4]	2,61 [0,74]	1,22 [0,29]	0,44	0,67	1,00	0,34
Felicidade	1,02 [0,06]	1,53 [0,48]	1,08 [0,2]	1,64 [0,63]	(1,08)	0,30	(0,6)	0,58

Os valores são médias; ¹DP = desvio padrão; ²t: t-teste; ³grau de liberdade

5.2.2. Comparação entre os indivíduos respondedores e não-respondedores à clomipramina

5.2.2.1. Paradigma de Felicidade

Utilizando t-teste não pareado, não houve diferença significativa na média de pontuação nas escalas (alerta, felicidade, medo e raiva) entre os indivíduos respondedores e não-respondedores durante o paradigma de Felicidade, tanto no bloco com fotografias de conteúdo emocional quanto no bloco de fotografias de conteúdo neutro, ambos os grupos de indivíduos utilizando baixas doses repetidas de clomipramina (Tabela 3).

5.2.2.2. Paradigma de Medo

Utilizando t-teste não pareado, no paradigma de Medo, os indivíduos respondedores apresentaram aumento significativo na escala de raiva durante os blocos de fotografias de conteúdo emocional e neutro, quando comparados aos indivíduos não-respondedores, ambos os grupos de indivíduos utilizando baixas doses repetidas de clomipramina ($t(16)=2,3$; $p = 0,04$ e $t(6)=3,01$; $p = 0,03$ respectivamente; Tabela 3). Todas as outras comparações não foram estatisticamente significativas.

5.2.2.3. Paradigma de Raiva

Utilizando t-teste não pareado, durante o paradigma de Raiva, os indivíduos respondedores apresentaram aumento significativo na escala de raiva durante o bloco de fotografias de conteúdo emocional, quando comparados aos indivíduos não-respondedores, ambos os grupos de indivíduos utilizando baixas doses repetidas de clomipramina ($t(16)=2,23$; $p = 0,04$; Tabela 3). Todas as outras comparações não foram estatisticamente significativas.

Tabela 3. - Avaliação subjetiva após a apresentação de blocos de fotografias de conteúdo emocional e neutro entre os indivíduos respondedores e não-respondedores a doses repetidas de clomipramina

Visita I – sob medicação														
Escalas	Emoção							Neutro						
	Respondedor				teste			Respondedor				teste		
	sim		não					sim		não				
	Média	DP ¹	Média	DP ¹	t-teste	gl. ²	p	Média	DP ¹	Média	DP ¹	t-teste	gl. ²	p
Paradigma de Felicidade														
Raiva	1,07	0,2	1,05	0,1	0,24	16	0,81	1	0	1,03	0,1	(0,7)	16	0,5
Alerta	2,6	0,5	2,83	0,8	(0,6)	16	0,54	1,50	0,2	1,97	0,8	(1,8)	13	0,09
Medo	2,13	0,5	1,82	0,5	1,27	16	0,22	1,06	0,1	1,03	0,1	0,5	16	0,62
Felicidade	3,3	0,5	2,73	0,9	1,49	16	0,16	1,67	0,6	1,75	0,8	(0,2)	16	0,82
Paradigma de Medo														
Raiva	2,88	0,9	2,08	0,6	2,3	16	0,04³	1,50	0,4	1,06	0,1	3,01	6	0,03³
Alerta	3,3	0,9	3,12	0,8	0,45	16	0,66	1,50	0,5	1,86	1	(0,9)	16	0,4
Medo	3,42	0,7	3,05	0,8	0,97	16	0,35	1	0	1,03	0,1	(0,7)	16	0,5
Felicidade	1,333	0,5	1,13	0,3	1,18	16	0,26	1,28	0,4	1,44	0,6	(0,6)	16	0,57
Paradigma de Raiva														
Raiva	3,3	0,6	2,72	0,5	2,23	16	0,04³	1,50	0,5	1,36	0,4	0,62	16	0,54
Alerta	3,4	0,9	3,23	0,7	0,43	16	0,68	2,45	0,7	2,11	0,9	0,81	16	0,43
Medo	2,87	0,9	2,66	0,8	0,47	16	0,64	1,39	0,6	1,28	0,4	0,46	16	0,65
Felicidade	1	0	1,02	0,1	(0,7)	16	0,5	1,50	0,5	1,52	0,5	(0,1)	16	0,91

¹DP= desvio padrão; ²gl. = graus de liberdade; ³p<0.05

5.3. Resultados obtidos na análise da atividade cerebral através de RMf

5.3.1. Padrões de atividade cerebral durante apresentação de fotografias de conteúdo emocional e neutro em indivíduos não-respondedores à clomipramina

5.3.1.1. Paradigma de Felicidade

Utilizando t-teste pareado, detectou-se significativa redução de atividade cerebral no estado medicado *versus* não medicado, durante o bloco de conteúdo emocional, no paradigma de Felicidade, nas seguintes regiões: ínsula direita, corpo caudado bilateral, giro do cíngulo anterior esquerdo (BA32) e direito (BA24), córtex pré-frontal ventromedial direito (BA11), córtex pré-frontal medial esquerdo (BA10) e putâmen esquerdo (Tabela 4, Figura 7).

Durante a apresentação do bloco de fotografias com conteúdo neutro, não houve diminuição significativa na atividade cerebral no estado medicado *versus* não medicado.

Não houve aumento significativo de atividade cerebral, durante a visualização de ambos os blocos, no paradigma de Felicidade, quando os indivíduos estavam sob medicação.

Tabela 4. - Resultados do efeito BOLD durante as comparações planejadas (t-teste pareado) em indivíduos não-respondedores a clomipramina quando sob efeito da medicação e sem efeito da medicação durante o paradigma de Felicidade

Região	L ¹	Coordenadas MNI ⁴			K ⁵	F ⁶	Z ⁷	P ⁸
		X	Y	Z				
Fotografias com conteúdo feliz								
Sob medicação < sem medicação								
CPFVM ¹⁰ (BA ⁹ 11)	D ²	28	42	(8)	26	3,38	2,74	0,003
Ínsula	D	40	14	8	77	3,43	2,77	0,003
	D	32	(26)	10	67	2,76	2,35	0,009
Cíngulo Anterior (BA24)	D	4	28	22	29	3,05	2,54	0,005
Cíngulo Anterior (BA32)	E ³	(8)	42	14	80	3,85	3	0,001
Corpo do Caudado	E	(16)	(14)	26	157	4,11	3,13	0,001
	D	16	(14)	24	132	5,5	3,74	<0,001
CPFDM ¹¹ (BA10)	E	(16)	42	14	32	3,19	2,63	0,004
Putâmen	E	(14)	2	10	66	2,34	2,07	0,019

¹L: lateralidade; ²D, direito; ³E, esquerdo; ⁴As coordenadas correspondem à disposição estereotática do *Montreal Neurologic Institute* (MNI); ⁵K, número de voxels no cluster; ⁶F: valor do escore F para o voxel de maior significância estatística dentro do *cluster*; ⁷z: valor do escore z para o voxel de maior significância estatística dentro do *cluster*; ⁸ valor de p corrigido para comparações múltiplas; ⁹BA, área de Brodmann; ¹⁰CPFVM: córtex pré-frontal ventromedial; ¹¹CPFDM: córtex pré-frontal dorsomedial

5.3.1.2. Paradigma de Medo

Utilizando t-teste pareado, detectou-se significativa redução de atividade cerebral no estado medicado *versus* não medicado, durante o bloco de conteúdo emocional no paradigma de Medo, nas seguintes regiões: córtex pré-frontal ventrolateral esquerdo (BA47), córtex pré-frontal dorsolateral esquerdo (BA46) e bilateral (BA9), amígdala esquerda, ínsula bilateral, giro parahipocampal esquerdo, tálamo esquerdo e putâmen direito (Tabela 5 e Figura 7 e 8). Não observamos aumento de atividade cerebral durante o bloco emocional.

Durante a visualização do bloco de conteúdo neutro, diminuição de atividade cerebral foi observada no giro do cíngulo anterior esquerdo (BA24) e amígdala direita no estado medicado *versus* não medicado (Tabela 5). Observou-se apenas uma região com aumento de atividade cerebral durante o bloco neutro no paradigma de Medo: córtex pré-frontal ventromedial esquerdo (BA11) no estado medicado *versus* não medicado (Tabela 5).

Tabela 5. - Resultados do efeito BOLD durante as comparações planejadas (t-teste pareado) em indivíduos não-respondedores a clomipramina quando sob efeito da medicação e sem efeito da medicação durante o paradigma de Medo

Região	L ¹	Coordenadas MNI ⁴			K ⁵	F ⁶	Z ⁷	P ⁸
		X	Y	Z				
Fotografias com conteúdo de medo								
Sob medicação < sem medicação								
CPFVL ¹⁰ (BA ⁹ 47)	E ³	(32)	16	(2)	24	3,22	2,61	0,005
CPFDL ¹¹ (BA46)	E	(46)	36	16	30	3,25	2,62	0,004
Amídala	E	(28)	(8)	(12)	12	2,83	2,37	0,009
Ínsula	E	(44)	(16)	18	97	5,06	3,49	<0,001
	D ²	38	0	14	186	6,46	3,97	<0,001
Giro Parahipocampal	D	20	(34)	(14)	184	6,2	3,89	<0,001
CPFDL (BA9)	D	42	22	36	47	2,69	2,28	0,011
	E	(52)	2	36	24	3,62	2,83	0,002
Tálamo	D	20	(14)	6	253	4,31	3,17	<0,001
Putâmen	D	28	(16)	(4)	114	4,65	3,32	<0,001
Fotografias com conteúdo neutro								
Sob medicação > sem medicação								
CPFVM ¹² (BA11)	E	(24)	44	(6)	8	2,22	1,96	0,025
Sob medicação < sem medicação								
Cíngulo Anterior (BA24)	E	(4)	22	22	24	2,55	2,19	0,014
Amídala	D	28	(8)	(14)	65	3,58	2,81	0,002

¹L: lateralidade; ²D, direito; ³E, esquerdo; ⁴As coordenadas correspondem à disposição estereotática da *Montreal Neurologic Institute* (MNI); ⁵K, número de voxels no cluster; ⁶F: valor do escore F para o voxel de maior significância estatística dentro do *cluster*; ⁷z: valor do escore z para o voxel de maior significância estatística dentro do *cluster*; ⁸ valor dep corrigido para comparações múltiplas; ⁹BA, área de Brodmann; ¹⁰CPFVL: córtex pré-frontal ventrolateral; ¹¹CPFDL: córtex pré-frontal dorsolateral; ¹²CPFVM: córtex pré-frontal ventromedial

5.3.1.3. Paradigma de Raiva

Utilizando t-teste pareado, detectou-se significativa redução de atividade cerebral no estado medicado *versus* não medicado, durante o bloco de conteúdo emocional, no paradigma de Raiva, nas seguintes regiões: córtex pré-frontal ventrolateral bilateral (BA47), córtex pré-frontal dorsolateral direito (BA46 e 9), amígdala direita, ínsula bilateral, giro do cíngulo anterior bilateral (BA24 e 32), giro parahipocampal bilateral, hipocampo esquerdo, tálamo bilateral, corpo do caudado direito e cabeça do caudado bilateral e putâmen bilateral (Tabela 6; Figura 7 e 8).

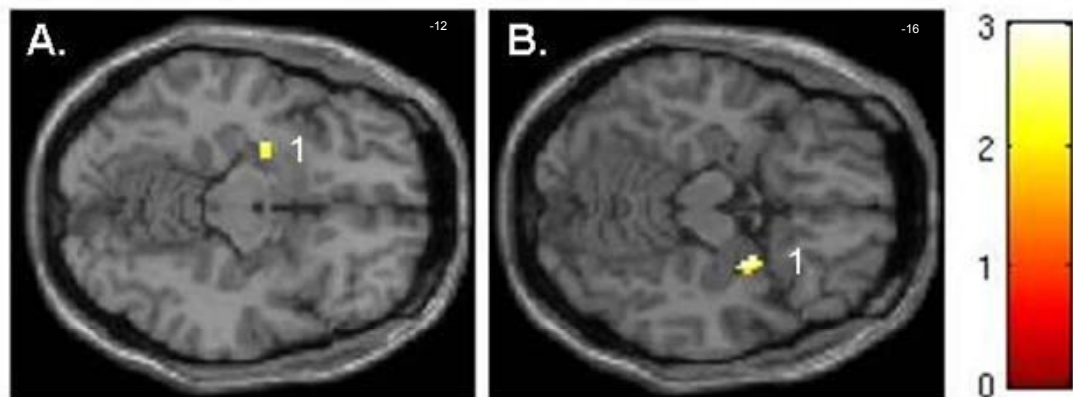
Durante a visualização do bloco neutro, diminuição de atividade cerebral foi observada na ínsula bilateral no estado medicado *versus* não medicado (Tabela 6).

Tabela 6. - Resultados do efeito BOLD durante as comparações planejadas (t-teste pareado) em indivíduos não-respondedores a clomipramina quando sob efeito da medicação e sem efeito da medicação durante o paradigma de Raiva

Região	L ¹	Coordenadas MNI ⁴			K ⁵	F ⁶	Z ⁷	P ⁸
		X	Y	Z				
Fotografias com conteúdo de Raiva								
Sob medicação < sem medicação								
CPFVL ¹⁰ (BA ⁹ 47)	D ²	36	30	(2)	22	3,5	2,8	0,003
	D	26	16	(12)	42	3,3	2,69	0,004
	D	44	18	2	47	3,0	2,53	0,006
	E ³	(32)	16	(12)	72	8,5	4,63	<0,001
CPFDL ¹¹ (BA46)	D	42	36	16	53	4,2	3,16	0,001
Amídala	D	28	(4)	(16)	61	3,0	2,52	0,006
Ínsula	E	(32)	16	(10)	529	6,6	4,12	<0,001
	E	(50)	(38)	20	66	2,7	2,33	0,01
	D	38	12	(10)	82	4,8	3,44	<0,001
	D	32	14	12	524	4,3	3,25	<0,001
Cíngulo Anterior (BA24)	D	42	(40)	18	86	3,8	2,98	0,001
	D	4	30	24	35	3,6	2,87	0,002
Cíngulo Anterior (BA32)	E	(2)	32	18	41	2,8	2,39	0,008
	D	6	32	26	35	4,4	3,26	0,001
Giro Parahipocampal	E	(2)	32	22	35	2,4	2,14	0,016
	D	16	(48)	2	143	3,1	2,57	0,005
Hipocampus	E	(20)	(34)	(8)	270	3	2,51	0,006
	E	(26)	(36)	(4)	9	2,7	2,33	0,01
CPFDL (BA9)	D	4	46	28	37	3,5	2,78	0,003
	D	34	20	34	129	3,3	2,7	0,003
CPFDL (BA44)	E	(56)	6	22	11	2,2	1,95	0,026
Tálamo	D	8	(22)	(2)	621	5,0	3,55	<0,001
	E	(18)	(22)	0	282	6,7	4,15	<0,001
Corpo do Caudado	D	8	12	8	173	6,0	3,92	<0,001
Cabeça do Caudado	D	8	18	6	169	6,3	4,02	<0,001
	E	(8)	6	0	64	2,7	2,28	0,011
Putâmen	D	22	(2)	0	552	5,4	3,7	<0,001
	E	(18)	4	(8)	256	4,3	3,24	0,001
Fotografias com conteúdo neutro								
Sob medicação < sem medicação								
Ínsula	E	(40)	(12)	6	122	4,7	3,42	<0,001
	D	40	(20)	6	72	4,6	3,35	<0,001

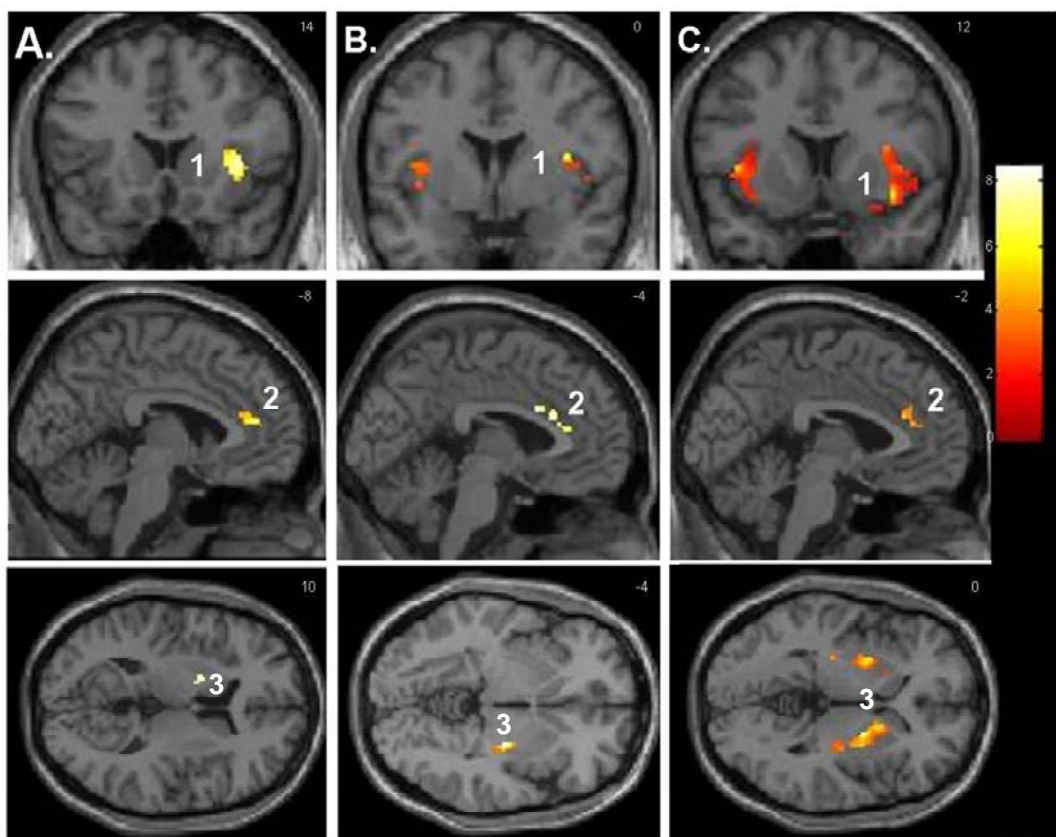
¹L: lateralidade; ²D, direito; ³E, esquerdo; ⁴As coordenadas correspondem à disposição estereotóxica do *Montreal Neurologic Institute* (MNI); ⁵K, número de voxels no cluster; ⁶F: valor do escore F para o voxel de maior significância estatística dentro do *cluster*; ⁷z: valor do escore z para o voxel de maior significância estatística dentro do *cluster*; ⁸ valor dep corrigido para comparações múltiplas; ⁹BA, área de Brodmann; ¹⁰CPFVL: córtex pré-frontal ventrolateral; ¹¹CPFDL: córtex pré-frontal dorsolateral

Figura 7. - Diminuição de atividade amigdalina em indivíduos não respondedores quando medicados com baixas doses repetidas de clomipramina nos paradigmas de Medo e Raiva



Região de interesse onde houve focos de atividade neural diminuída significativamente em voluntários saudáveis não respondedores ($n=12$) enquanto estavam medicados em comparação quando não medicados durante o paradigma de indução emocional (teste-t pareado $p<0,05$, corrigido para comparações múltiplas). Focos de significância foram sobrepostos sobre cortes cerebrais transaxiais normalizados para sistema de coordenadas do Instituto Neurológico de Montreal. A. Paradigma de Medo e B. Paradigma de Raiva. Durante os paradigmas de indução emocional de valência negativa, foi detectada diferença significativa entre o estado medicado e não medicado na amígdala (representada com o número 1). O lado esquerdo do cérebro corresponde ao lado esquerdo da imagem. Os números no canto superior direito, em cada corte cerebral representam as coordenadas no eixo z.

Figura 8. - Diminuição de atividade comum aos três paradigmas em indivíduos não respondedores quando medicados com baixas doses repetidas de clomipramina nas regiões da ínsula, cíngulo anterior e putâmen



Regiões de interesse selecionadas onde houve focos de atividade neural diminuída significativamente em voluntários saudáveis não respondedores ($n=12$) enquanto estavam medicados em comparação quando não medicados durante o paradigma de indução emocional (teste-t pareado $p<0,05$, corrigido para comparações múltiplas). Focos de significância foram sobrepostos sobre cortes cerebrais coronais, sagitais e transaxiais normalizados para sistema de coordenadas do Instituto Neurológico de Montreal. A. Paradigma de Felicidade; B. Paradigma de Medo e C. Paradigma de Raiva. Foram detectadas um padrão de diferenças significativas entre o estado medicado e não medicado durante os três paradigmas de indução emocional na ínsula (mostrada nas secções superiores da figura representada com o número 1 nos corte coronal), no giro do cíngulo anterior (mostrado na parte média e representado com o número 2 no corte sagital), e no putâmen (mostrado na parte inferior e representado com o número 3 no corte transaxial). O lado esquerdo do cérebro corresponde ao lado esquerdo da imagem. Os números no canto superior direito, em cada corte cerebral representam as coordenadas no eixo y (visão coronal), no eixo x (visão sagital) e no eixo z (visão transaxial).

5.3.2. Comparação entre indivíduos respondedores e não-respondedores à clomipramina

5.3.2.1. Paradigma de Felicidade

Utilizando t-teste não pareado, detectou-se significativo aumento de atividade cerebral, durante o bloco de conteúdo emocional, no paradigma de Felicidade, nos indivíduos respondedores, quando comparados com os não-respondedores (ambos os grupos utilizando baixas doses repetidas de clomipramina), nas seguintes regiões: giro do cíngulo anterior bilateral (BA24), córtex pré-frontal dorsolateral direito (BA46) e ínsula bilateral (Tabela 7; Figura 9). Entretanto, os indivíduos respondedores apresentaram diminuição significativa de atividade cerebral na ínsula esquerda e amígdala esquerda (Tabela 7).

Durante a visualização do bloco com conteúdo neutro, os indivíduos respondedores apresentaram redução significativa na atividade cerebral no hipocampo e giro parahipocampal bilateral (Tabela 7).

Tabela 7. - Diferenças de efeito BOLD evidenciadas na comparação entre sujeitos respondedores e não-respondedores à Clomipramina durante o paradigma de Felicidade

Região	L ¹	Coordenadas MNI ⁴			K ⁵	F ⁶	Z ⁷	P ⁸
		X	Y	Z				
<i>Visita I</i>								
<i>sob medicação</i>								
Fotografias com conteúdo emocional								
Respondedores > não-respondedores								
Cíngulo Anterior (BA ⁹ 24)	E ²	(2)	16	26	37	3,0	2,6	0,004
	D ¹	8	24	26	38	3,1	2,7	0,003
CPF ¹⁰ DL (BA46)	D	44	42	18	15	2,7	2,4	0,008
Ínsula	E	(28)	(30)	20	31	2,7	2,5	0,007
	D	32	20	10	34	3,1	2,7	0,004
Respondedores < não-respondedores								
Ínsula	E	(44)	0	(8)	37	4,6	3,6	<0,001
Amídala	E	(22)	(8)	(10)	14	3,4	2,8	0,002
Fotografias com conteúdo neutro								
Respondedores < não-respondedores								
Hipocampus	E	(28)	(26)	(10)	34	3,0	2,6	0,004
	D	34	(28)	(12)	13	2,3	2,1	0,016
Giro Parahipocampal	E	(20)	(32)	(4)	172	5,0	3,8	<0,001
	D	22	(38)	(6)	77	2,9	2,6	0,005

¹L: lateralidade; ²D, direito; ³E, esquerdo; ⁴As coordenadas correspondem à disposição estereotóxica do *Montreal Neurologic Institute* (MNI); ⁵K, número de voxels no cluster; ⁶F: valor do escore F para o voxel de maior significância estatística dentro do *cluster*; ⁷z: valor do escore z para o voxel de maior significância estatística dentro do *cluster*; ⁸ valor dep corrigido para comparações múltiplas; ⁹BA, área de Brodmann; ¹⁰CPF¹⁰DL: córtex pré-frontal dorsolateral

5.3.2.2. Paradigma de Medo

Utilizando t-teste não pareado, detectou-se significativo aumento de atividade cerebral, durante o bloco de conteúdo emocional, no paradigma de Medo, nos indivíduos respondedores, quando comparados com os não-respondedores (ambos grupos utilizando baixas doses repetidas de clomipramina), na seguinte região: ínsula direita (Tabela 8 e Figura 9).

Durante a visualização do bloco com conteúdo neutro, não houve diferença estatisticamente significativa na atividade cerebral entre os indivíduos respondedores e os não-respondedores.

Tabela 8. - Diferenças de efeito BOLD evidenciadas na comparação entre sujeitos respondedores e não-respondedores à Clomipramina durante o paradigma de Medo

Região	L ¹	Coordenadas MNI ³			K ⁴	F ⁵	Z ⁶	P ⁷
		X	Y	Z				
<i>Visita I</i>								
<i>sob medicação</i>								
Fotografias com conteúdo emocional								
Respondedores > não-respondedores								
Ínsula	D ²	44	(20)	4	39	3,01	2,62	0,004

¹L: lateralidade; ²D, direito; ³As coordenadas correspondem à disposição estereotática do *Montreal Neurologic Institute* (MNI); ⁴K, número de voxels no cluster; ⁵F: valor do escore F para o voxel de maior significância estatística dentro do *cluster*; ⁶z: valor do escore z para o voxel de maior significância estatística dentro do *cluster*; ⁷ valor dep corrigido para comparações múltiplas

5.3.2.3. Paradigma de Raiva

Utilizando t-teste não pareado, detectou-se significativo aumento de atividade cerebral, durante o bloco de conteúdo emocional, no paradigma de Raiva, nos indivíduos respondedores, quando comparados com os não-respondedores (ambos os grupos utilizando baixas doses repetidas de clomipramina), nas seguintes regiões: giro do cíngulo bilateral (BA24 e 32), ínsula esquerda, córtex pré-frontal dorsolateral bilateral (BA9) e ventrolateral bilateral (BA47; Tabela 9 e Figura 9).

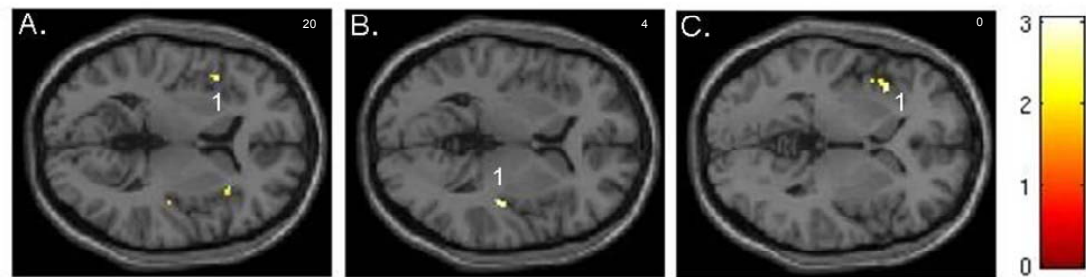
Durante a visualização do bloco com conteúdo neutro, os indivíduos respondedores apresentaram aumento significativo na atividade cerebral na ínsula esquerda, giro do cíngulo bilateral (BA24), córtex pré-frontal bilateral (BA9) e ventrolateral esquerdo (BA47), cabeça do caudado bilateral e corpo do caudado esquerdo, giro parahipocampal bilateral e tálamo esquerdo (Tabela 9).

Tabela 9. - Diferenças de efeito BOLD evidenciadas na comparação entre sujeitos respondedores e não-respondedores à clomipramina durante o paradigma de Raiva

Região	L ¹	Coordenadas MNI ⁴			K ⁵	F ⁶	Z ⁷	P ⁸
		X	Y	Z				
<i>Visita I</i>								
<i>sob medicação</i>								
Fotografias com conteúdo emocional								
Respondedores > não-respondedores								
Ínsula	E ³	(36)	16	0	46	2,51	2,26	0,012
Cíngulo Anterior (BA ⁹ 24)	E	(2)	26	24	51	3,54	2,97	0,001
	D ²	4	28	24	31	3,45	2,91	0,002
Cíngulo Anterior (BA32)	E	(2)	32	22	30	3,16	2,72	0,003
	D	4	34	22	53	3,08	2,67	0,004
CPF ¹⁰ DL (BA9)	E	(16)	26	34	40	5,5	4,01	<0,001
	D	38	24	36	31	3,03	2,63	0,004
CPF ¹¹ VL (BA47)	E	(38)	18	(2)	7	2,32	2,11	0,017
	D	46	18	0	13	2,06	1,91	0,028
Fotografias com conteúdo neutro								
Respondedores > não-respondedores								
Ínsula	E	(44)	(6)	14	162	3,13	2,7	0,003
Cíngulo Anterior (BA24)	E	(8)	20	26	20	2,35	2,14	0,016
	D	4	38	2	16	2,97	2,59	0,005
CPF ¹⁰ DL (BA9)	E	(6)	30	34	40	3,18	2,74	0,003
	D	14	28	34	74	3,64	3,03	0,001
CPF ¹¹ VL (BA47)	E	(34)	20	0	16	2,67	2,38	0,009
Cabeça do Caudado	E	(6)	6	6	12	3,52	2,96	0,002
	D	14	22	6	12	2,03	1,88	0,03
Corpo do Caudado	E	(6)	4	8	67	2,8	2,47	0,007
Giro Parahipocampal	E	(14)	(40)	(6)	74	3,77	3,11	0,001
	D	10	(42)	2	138	3,52	2,96	0,002
Tálamo	E	(12)	(26)	16	384	4,04	3,27	0,001

¹L: lateralidade; ²D, direito; ³E, esquerdo; ⁴As coordenadas correspondem à disposição estereotática do *Montreal Neurologic Institute* (MNI); ⁵K, número de voxels no cluster; ⁶F: valor do escore F para o voxel de maior significância estatística dentro do *cluster*; ⁷z: valor do escore z para o voxel de maior significância estatística dentro do *cluster*; ⁸ valor dep corrigido para comparações múltiplas; ⁹BA, área de Brodmann; ¹⁰CPF¹⁰DL: córtex pré-frontal dorsolateral; ¹¹CPF¹¹VL: córtex pré-frontal ventrolateral

Figura 9. - Aumento de atividade insular comum aos três paradigmas em indivíduos respondedores comparados com indivíduos não respondedores quando medicados com baixas doses repetidas de clomipramina



Região de interesse onde houve focos de atividade neural aumentada significativamente em voluntários saudáveis respondedores ($n=6$) enquanto estavam medicados com baixas doses repetidas de clomipramina em comparação com não respondedores ($n=12$) durante o paradigma de indução emocional (teste-t não pareado $p < 0,05$, corrigido para comparações múltiplas). Focos de significância foram sobrepostos sobre cortes cerebrais transaxiais normalizados para sistema de coordenadas do Instituto Neurológico de Montreal. A. Paradigma de Felicidade; B. Paradigma de Medo e C. Paradigma de Raiva. Durante os três paradigmas de indução emocional, um padrão de aumento significativo de atividade neural foi detectada nos respondedores medicados na ínsula (representada com o número 1). O lado esquerdo do cérebro corresponde ao lado esquerdo da imagem. Os números no canto superior direito, em cada corte cerebral representam as coordenadas no eixo z.

6. DISCUSSÃO

6.1. Achados comportamentais nos indivíduos não respondedores à clomipramina

Como era esperado, quando comparamos os indivíduos não respondedores, durante o uso de baixas doses de clomipramina, a eles mesmos, na ausência do antidepressivo, não evidenciamos diferenças significativas nas pontuações das escalas. Isto demonstra que os indivíduos não respondedores à clomipramina foram capazes de se engajar da mesma maneira na realização das tarefas nas duas ocasiões, com respostas emocionais equiparáveis, independentemente do uso ou não da clomipramina. Assim sendo, por não serem acompanhadas de alteração comportamental, as diferenças verificadas na ativação neural entre os dois exames de RMf neste grupo podem ser relacionadas ao efeito da clomipramina nas diferentes regiões cerebrais analisadas, não tendo sido confundidas por diferenças de engajamento na tarefa ou diferenças subjetivas da resposta emocional provocada pela apresentação das fotografias. Este é um aspecto relevante, visto que o objetivo da análise realizada com a amostra de sujeitos não respondedores à medicação era justamente o de mapear a ação neural da clomipramina, independentemente da resposta subjetiva dos sujeitos à medicação.

Entretanto, observamos tendência a pontuações maiores nos blocos de conteúdo neutro na escala de alerta durante o paradigma de felicidade e na escala de raiva, durante o paradigma de raiva, quando os indivíduos estavam medicados (visita I).

Apesar da amostra ser composta de voluntários saudáveis, e deste subgrupo não atingir critério de resposta à clomipramina, ainda assim notamos tendências estatísticas. Não era esperado encontrar diferenças neste subgrupo, entretanto, é interessante notar que ambos os resultados foram obtidos na comparação de blocos de conteúdo neutro e com maiores pontuações quando se encontravam medicados. O efeito do antidepressivo poderia, assim, atuar como “indutor/facilitador” emocional em situações de ambiguidade emocional, como as fotografias de conteúdo neutro no contexto do paradigma. Poderia se dizer que é melhor para os indivíduos considerarem situações neutras como apresentando valência. Desta maneira, o efeito do antidepressivo, no contexto de neutralidade, poderia ser visto como incentivador emocional, em que, mesmo em situações de neutralidade, o indivíduo sob efeito de antidepressivo vê a situação como emocional, especialmente negativa (como no caso do paradigma de raiva).

Outros estudos em voluntários normais observaram a ausência de alterações emocionais como as descritas. Por exemplo, Gelfin et al. (1998) não encontraram qualquer alteração, positiva ou negativa, nas escalas subjetivas de 15 sujeitos sem transtorno psiquiátrico que receberam 20

Mg/dia de fluoxetina por cinco semanas (Gelfin et al., 1998). Barr et al. (1997) também não observaram alterações mensuráveis nas escalas utilizadas após seis semanas de fluoxetina (20 Mg/dia) administrada a seis voluntários saudáveis (Barr et al., 1997).

6.2. Diferenças dos achados comportamentais nos indivíduos não respondedores e respondedores à clomipramina

Os indivíduos respondedores sob efeito de doses baixas de clomipramina apresentaram maiores pontuações do que os não respondedores, especificamente na escala de raiva durante os paradigmas de medo (fotografias de conteúdo emocional e neutro) e raiva (fotografias de conteúdo emocional), quando comparados aos indivíduos não respondedores também sob efeito de baixas doses de clomipramina.

Este padrão de resultados indica que os indivíduos respondedores sob efeito da clomipramina apresentaram uma sensibilidade particular a sensações de ameaça. De um ponto-de-vista evolutivo, os indivíduos com habilidade de distinguir situações de perigo apresentam maiores chances de sobrevivência. Assim, a capacidade da clomipramina de alterar a percepção emocional, a raiva, no caso do presente estudo, pode ser vista como vantajosa na perspectiva evolutiva.

Outros estudos em voluntários saudáveis observaram alterações comportamentais. Harmer et al. (2003) administraram uma dose única de reboxetina (4 Mg) a 24 sujeitos e verificaram maior reconhecimento de expressões faciais felizes, quando comparada ao grupo placebo, facilitando o processamento de estimulação emocional positiva (Harmer et al., 2003).

Harmer et al. (2004) ampliaram seus achados administrando reboxetina (8 Mg) e citalopram (20 Mg), durante uma semana, a 21 voluntários. Neste estudo, os autores não observaram alterações sobre humor, ansiedade ou hostilidade quando receberam reboxetina ou citalopram. Porém, encontraram diminuição do reconhecimento de medo e raiva e de aumento da recordação de estímulos positivos (Harmer et al., 2004).

No ensaio clínico ao qual esta tese está vinculada, foi realizada uma avaliação fenomenológica detalhada dos efeitos da clomipramina em voluntários saudáveis. Em sua tese, que objetivou investigar tais efeitos, Dra. Eliane Henna (2008) fez as seguintes observações (Henna, 2008):

“O efeito extraterapêutico (da clomipramina) manifestou-se como um aumento na capacidade de tolerar adversidades, diminuição da irritabilidade em situações outrora estressoras, diminuição da preocupação de uma forma geral, aumento do foco da atenção nas tarefas executadas, associados a uma sensação de bem-estar.”

“O efeito extraterapêutico, no entanto, não ocorreu em todos os sujeitos submetidos a tratamento com antidepressivos. O fato de apenas uma parcela o exibir é consistente com estudos prévios que estimam que essa alteração emocional desencadeada por antidepressivos ocorra em aproximadamente 30% dos sujeitos (Knutson et al., 1998). No presente estudo, estimamos em 26% a ocorrência do efeito extraterapêutico em voluntários sadios” (Henna, 2008).

Com base na nossa amostra de indivíduos saudáveis, subdivida em respondedores e não respondedores à clomipramina, a alteração da percepção emocional dos sujeitos em situações de perigo permite-nos especular a existência de sistemas neurais suscetíveis aos efeitos desta droga, efeitos estes diferentes em indivíduos respondedores, mesmo na ausência de psicopatologia que altere o processamento emocional de forma semelhante ao que ocorre em pacientes portadores de transtornos depressivos.

6.3. Achados de neuroimagem nos indivíduos não respondedores à clomipramina

De uma forma geral, encontramos uma diminuição de atividade neural, quando comparamos os indivíduos não respondedores sob efeito e na ausência da clomipramina, envolvendo diferentes regiões cerebrais

sabidamente relevantes para o processamento emocional (Phillips et al., 2008).

Nós replicamos achados anteriores de diminuição de atividade amígdala durante paradigmas de valência negativa (Del-Ben et al., 2005; Takahashi et al., 2005; Harmer et al., 2006; Norbury et al., 2007). Este achado poderia ser visto como consistente com a idéia de que os antidepressivos atuam na avaliação inicial das emoções e não na regulação do processamento emocional. No entanto, o nosso paradigma não permite que se distinga a relação entre regiões distintas, visto que o número reduzido de eventos não permite a implementação de análises de conectividade. Entretanto, outros estudos utilizando técnicas de investigação de conectividade funcional, permitindo avaliar a correlação da atividade neural entre uma região cerebral e outra, têm demonstrado que o tratamento antidepressivo tem de fato participação mais efetiva na regulação cortical sobre áreas límbicas (Anand et al., 2005; Chen et al., 2008).

Não encontramos nenhuma mudança significativa na atividade da amígdala em resposta ao bloco com fotografias de conteúdo positivo. Este achado vai ao encontro de uma das nossas hipóteses, prevendo que a ação da clomipramina iria modificar respostas neurais a estímulos emocionais negativos mas não aos positivos. Podemos, assim, especular um efeito específico do antidepressivo na resposta neural somente depois de estímulos negativos. Este tipo de seletividade da amígdala para emoções

negativas tem sido proposto em vários estudos de RMf (Phan et al., 2002). Entretanto, uma recente revisão da literatura salientou a noção de que a amígdala está envolvida no processamento de informações biologicamente relevantes *per se*, independentemente da valência do estímulo (Sergeje et al., 2008). Assim sendo, mais estudos usando estímulos positivos semelhantes aos que foram usados no presente estudo são necessários para replicar os achados aqui relatados.

Nossos resultados de atividade diminuída na amígdala após o uso repetido de clomipramina são paralelos aos achados de outros grupos utilizando paradigmas de valência negativa em voluntários saudáveis. O uso agudo do antidepressivo citalopram revelou resposta da amígdala diminuída às faces de nojo (Del-Ben et al., 2005). Além disso, diminuição da atividade da amígdala foi também demonstrada depois do uso agudo de fluvoxamina em resposta às faces de nojo (Takahashi et al., 2005). Finalmente, uma redução da atividade da amígdala, após o uso de sete dias de citalopram e reboxetina, foi demonstrada em resposta às faces de medo (Harmer et al., 2006; Norbury et al., 2007). A observação consistente de redução na atividade da amígdala no uso agudo, subagudo e repetido de antidepressivo é consistente com a ideia de efeitos antidepressivos na avaliação inicial da emoção e não na regulação emocional (Norbury et al., 2007). Entretanto, um estudo encontrou aumento de atividade na amígdala após o uso agudo de citalopram (Bigos et al., 2008). Nenhum destes estudos realizou análise de conectividade e, portanto, não avaliaram a relação entre a amígdala e

outras regiões envolvidas no processamento emocional como, por exemplo, o córtex pré-frontal envolvido na regulação do comportamento em resposta ao estímulo emocional.

A amígdala, localizada dentro do córtex temporal, está subdividida em vários núcleos, incluindo o complexo basolateral, contendo neurônios glutamatérgicos, e o núcleo centromedial, contendo neurônios ácido gama-aminobutírico (GABA) (McDonald, 2003; Sah et al., 2003; Swanson, 2003).

O complexo basolateral recebe informação do bulbo olfatório principal e acessório, córtex temporal e insular e do tálamo; e pode ser importante para a identificação de estímulos emocionais e associação de informações provenientes de diferentes modalidades sensoriais. O complexo basolateral tem ligações recíprocas com o córtex pré-frontal, perirhinal, entorhinal e hipocampo (McDonald, 2003; Sah et al., 2003; Swanson, 2003).

O núcleo centromedial é altamente interligado com o bulbo olfatório acessório e regiões subcorticais, incluindo o corpo estriado e hipotálamo. Pensa-se que é importante para a geração de respostas comportamentais, hormonais e autonômica a estímulos emocionalmente salientes (McDonald, 2003; Sah et al., 2003; Swanson, 2003).

A amígdala é, portanto, um espaço confinado de rede neural associada à identificação de, e resposta a, estímulos emocionalmente

relevantes. Nossos resultados de menor diminuição da amígdala nos paradigmas de valência negativa, após o uso de baixas doses repetidas de clomipramina, permitem especular a ocorrência de menor identificação e avaliação dos estímulos emocionais; talvez levando a um menor aporte emocional para ser regulado por estruturas ligadas à regulação emocional.

Também encontramos reduções na atividade cerebral em resposta aos estímulos negativos (paradigma de medo e de raiva), mas não aos estímulos positivos nas regiões do córtex pré-frontal ventrolateral e dorsolateral. Estas regiões estão implicadas com a regulação do comportamento e da emoção. Esta diminuição poderia estar associada a uma menor necessidade (demanda) de regulação emocional quando os indivíduos estão medicados durante o processamento de estímulos negativos. Entretanto, apenas métodos de análise mais sofisticados poderiam avaliar a relação entre a diminuição de atividade na amígdala com a diminuição de atividade no córtex pré-frontal para determinar se o efeito do antidepressivo é a diminuição do aporte emocional ou a regulação emocional, ou ambos.

Alguns achados foram comuns aos três paradigmas de provocação emocional: atividade neural reduzida no giro do cíngulo anterior, no putâmen e na ínsula, quando os indivíduos estavam medicados; regiões estas envolvidas com o processamento emocional e com a resposta comportamental.

O giro do cíngulo e as áreas anteriores da ínsula são relevantes no mapeamento cortical de respostas corporais que acompanham reações emocionais. Além disso, o giro do cíngulo anterior está implicado na geração de mudanças autonômicas, e a ínsula está envolvida na representação central de respostas viscerais internas durante o processamento emocional (Craig, 2002; Matthews et al., 2004; Critchley et al., 2005; Craig, 2009). O putâmen está envolvido com o comportamento da recompensa (Meredith et al., 2008). Desta maneira, uma redução de atividades nestas áreas estaria associada a uma percepção diminuída do estado corporal e menor produção de resposta autonômica.

O giro do cíngulo anterior é uma grande estrutura medial em torno do terço anterior do corpo caloso cerebral. Pode ser subdividido em duas grandes regiões altamente interconectadas entre si: uma rostral e uma dorsal (Bush et al., 2000; Critchley et al., 2003; Critchley et al., 2005; Vogt et al., 2005).

A região dorsal está mais envolvida com processos cognitivos e/ou com alta demanda atencional. A região dorsal/cognitiva faz parte da rede relacionada à atenção. Possui importantes interligações recíprocas com o córtex pré-frontal dorsolateral (BA 46 / 9), córtex parietal (BA 7), e áreas pré-motoras e motora suplementar. Várias funções tem sido atribuídas a esta região, incluindo a modulação da atenção e funções executivas através da

influência no processo sensorial e/ou na seleção de resposta; monitoramento de competição, controle motor complexo, motivação, busca por novidade, detecção de erro, memória processual e antecipação de trabalhos com alta demanda cognitiva (Bush et al., 2000; Critchley et al., 2003; Critchley et al., 2005; Vogt et al., 2005).

A região rostral está mais envolvida com processos afetivos e pode ser funcionalmente subdividida em três áreas: subgenual (BA25), genual ou ventral (BA24) e supragenual ou dorsal (BA32). Estas três áreas são altamente interconectadas entre si. Além disso, apresentam inter-relações com a amígdala, periaqueduto cinzento, núcleo *accumbens*, hipotálamo, ínsula anterior, hipocampo e córtex pré-frontal orbital. Possui também eferências para o sistema nervoso autônomo e endócrino. Está principalmente envolvida na avaliação da relevância emocional dos estímulos e informação motivacional, e na regulação da resposta emocional (Bush et al., 2000; Critchley et al., 2003; Critchley et al., 2005; Vogt et al., 2005).

A menor ativação do giro do cíngulo poderia ser consequência de uma menor necessidade de avaliar o estímulo emocional “inibido” pela amígdala; entretanto, somente análises mais complexas de conectividade poderiam informar sobre esta relação. Entretanto, Chen et al. (2008), em uma amostra de pacientes deprimidos, observou maior conectividade entre

a amígdala e giro do cíngulo anterior após o uso de antidepressivo (Chen et al., 2008).

A ínsula fica localizada no córtex cerebral, entre e em profundidade aos sulcos da fissura Silvana. A ínsula pode ser subdividida em duas grandes regiões baseadas em suas conexões anatômicas e características citoarquitetônicas: uma posterior e uma anterior (Craig, 2002; Simmons et al., 2006; Stein et al., 2007; Eckert et al., 2008; Iaria et al., 2008; Craig, 2009).

A região mais posterior, com neurônios granulados, recebe informação do tálamo e das áreas de associação dos córtices parietal, occipital e temporal. A região posterior da ínsula tem papel na integração somato-sensorial, vestibular e motora (Craig, 2002; Simmons et al., 2006; Stein et al., 2007; Eckert et al., 2008; Iaria et al., 2008; Craig, 2009).

A região mais anterior, com neurônios agranulares, tem ligações recíprocas com regiões límbicas, como o giro do cíngulo anterior, o córtex pré-frontal ventromedial, a amígdala e o corpo estriado ventral (núcleo accumbens). A região anterior da ínsula tem papel importante na integração das informações autonômicas e viscerais com funções emocionais e motivacionais (Craig, 2002; Simmons et al., 2006; Stein et al., 2007; Eckert et al., 2008; Iaria et al., 2008; Craig, 2009).

A interocepção pode ser definida como o sentir da condição fisiológicas de todo o corpo (Craig, 2002, 2009). Informações interoceptivas incluem sensações como a temperatura, dor, coceira, cócegas, toque sensual, sensação muscular e visceral, *flush* vasomotor, fome, sede, entre outros. A interocepção parece ser crítica para a autoconsciência, pois estabelece a ligação entre os processos cognitivos e afetivos, com o estado corporal atual.

O sistema neural que subjaz a interocepção pode ser conceituado como um sistema neural homeostático que transmite sinais de aferências primárias e cria uma representação interna de todo o corpo. Em particular, áreas cerebrais ascendentes envolvidas incluem a formação reticular do mesencéfalo, tálamo, região posterior da ínsula e a região anterior da ínsula dominante (hemisfério direito) (Craig, 2002, 2009).

Portanto, a ínsula é centralmente posicionada para receber informações sobre a relevância (tanto de atração como de aversão) e adicionar a este estímulo possíveis repercussões que o estímulo pode ter sobre estado corporal. Assim, as informações sobre o estado interoceptivo processadas na ínsula anterior é retransmitida para o giro do cíngulo anterior (Craig, 2009). O giro do cíngulo anterior, parte do sistema executivo central, pode gerar um sinal que é fundamental para alocar atenção em resposta a determinado estímulo (Craig, 2009).

Desta maneira, interocepção envolve o acompanhamento de sensações que são importantes para a integridade do estado do órgão interno e a ligação aos sistemas que são importantes para a atribuição de atenção, avaliação de contexto e planejamento de ações.

O putâmen junto ao caudado forma o corpo estriado. O corpo estriado localiza-se profundamente no cérebro entre a ínsula (que está mais lateral) e cápsula externa e ao globo pálido (que estão mais mediais) (Meredith et al., 2008). O corpo estriado tem sido implicado em várias funções, tanto motoras quanto cognitivas. Desempenha uma importante contribuição na codificação da motivação, de recompensas e punições. Entretanto, o corpo estriado também pode ser visto como importante na avaliação de qualquer estímulo relevante emocionalmente que demande alteração comportamental, principalmente quando imprevisíveis e que demandem atenção por parte do indivíduo (Forbes et al., 2008; Meredith et al., 2008).

As principais aferências do corpo estriado são o tálamo (vias tálamo-estriatais), a substância negra mesencefálica (vias nigro-estriatais) e o neo-córtex (vias cortico-estriatais). O córtex pré-frontal envia um grande número de aferências ao corpo estriado ventral, assim como a amígdala e hipocampo. A maior parte das vias eferentes são realizadas através do corpo estriado para o globo pálido, deste para o tálamo, e, finalmente, de

volta, principalmente, ao córtex pré-frontal e pré-motor (Meredith et al., 2008).

É interessante notar que a diminuição de atividade nestas três regiões (ínsula, putâmen e giro do cíngulo anterior) encontrou-se diminuída na vigência do tratamento com clomipramina durante não só a estimulação com fotografias nos paradigmas de valência negativa (como foi previsto numa das hipóteses da tese), mas também no paradigma de valência positiva. A menor ativação nestas regiões mesmo no paradigma de valência positiva sugere um efeito abrangente do antidepressivo nestas regiões cerebrais. Este padrão é possivelmente devido à ação antidepressiva não somente em regiões ligadas ao processamento automático de estímulos emocionais, mas também em áreas cerebrais que processam informações interoceptivas independentemente da valência dos estímulos emocionais que as geram.

Embora a duração do uso da clomipramina, neste estudo, seja próxima à latência para o início dos efeitos dos medicamentos antidepressivos na prática clínica, as baixas doses e a ausência de ansiedade ou de sintomas depressivos nos voluntários dificulta a extrapolação dos resultados atuais para transtornos psiquiátricos. Não obstante, poderíamos tomar nossos resultados como sugestivos que o uso repetido de clomipramina induziu modificações no processamento de informação corporal relacionadas ao estímulo emocional e que esta

modificação é relevante para a mediação da eficácia clínica dos antidepressivos. Isto é consistente com o papel proposto do giro do cíngulo anterior como um marcador biológico de resposta ao tratamento antidepressivo (Ledoux, 1996), como indicado em estudo de neuroimagem prévio de pacientes deprimidos avaliados antes e depois do tratamento com antidepressivo (Fraguas et al., 2007; Drevets e Savitz, 2008). Além disso, a intensidade de resposta autonômica, durante o processamento de estímulos de provocação em pacientes deprimidos não medicados, prevê a melhora dos sintomas depressivos após o tratamento crônico com antidepressivo (Fraguas et al., 2007).

Em síntese, redução de atividade na amígdala, giro do cíngulo anterior, ínsula e putâmen implicariam em menor produção emocional pelo indivíduo, menor percepção e resposta do estado autonômico quando o indivíduo está sob o efeito de antidepressivo. Explicando, possivelmente, os aumentos de pontuações vistas nas escalas durante o bloco de conteúdo neutro.

6.4. Diferenças de achados entre os indivíduos respondedores e não respondedores à clomipramina

De uma forma geral, os indivíduos respondedores apresentaram maior ativação neural, quando comparados com os não respondedores, ao estarem sob efeito da clomipramina. Nos três paradigmas, maior ativação

neural foi encontrada na ínsula; além disso, maior ativação neural também foi encontrada no giro do cíngulo anterior e córtex pré-frontal dorsolateral e ventrolateral nos paradigmas de felicidade e raiva.

Maior ativação na ínsula pode estar relacionada com maior percepção de estados vegetativos que decorrem em resposta a estímulos emocionais. Desta maneira, poderíamos especular que os indivíduos que respondem ao tratamento com antidepressivo são os que possuem maior percepção de seu estado vegetativo interno. Em outras palavras, a clomipramina provoca mudança na forma como o indivíduo processa visceralmente/somaticamente os estímulos emocionais, e os respondedores são os que apresentam maior ativação e percepção interoceptiva. Entretanto, não podemos saber se esta é uma característica dos indivíduos respondedores que pode prever a resposta antidepressiva, pois, neste estudo, não houve uma fase de aquisição de dados pré-tratamento.

A teoria de James-Lange sobre emoção, em particular, argumenta que as mudanças nas respostas corporais são necessárias para a experiência emocional, sem o processamento de estímulos corporais a resposta seria desprovida de “cor emocional”. Assim, a partir do choro, surge tristeza; da fuga, surge o medo. Lange enfatizou que a base do sentimento emocional ocorre ao provocar respostas corporais internas, particularmente as mediadas autonomicamente (James, 1884; Lange, 1922).

A teoria de James-Lange sobre emoção gera um número de previsões: primeiro, estímulos emotivos geram respostas corporais automaticamente, mesmo sem consciência. Em segundo lugar, diferentes emoções estão associadas a diferentes respostas corporais. Em terceiro, a sensibilidade a uma mudança interna corporal é importante para determinar a intensidade e diferença individual durante a experiência emocional .

Reações corporais específicas para cada tipo de emoção, tal como a vermelhidão facial com raiva, têm sido descritas há muito tempo e periodicamente detalhadas. Entretanto, esta visão parece simplista para alguns e, atualmente, psicólogos que estudam o processamento emocional tendem a aceitar o processamento emocional em duas fases: a mudanças na excitação corporal podem gerar emoção e determinar sua intensidade, mas a qualidade da emoção (por exemplo, raiva ou felicidade) é, em última instância, determinado pelo contexto cognitivo.

Não é possível estabelecer um paralelo direto entre nossos achados e a literatura prévia de RMf durante administração de drogas antidepressivas, visto que, até onde vai o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo no qual foram avaliadas mudanças de atividade neural em voluntários sem diagnóstico psiquiátrico que apresentaram resposta ao uso continuado, durante semanas, de uma droga antidepressiva. Estudos anteriores foram realizados utilizando amostras de portadores de

transtornos psiquiátricos ou voluntários saudáveis que utilizaram antidepressivo por períodos de tempo muito mais curtos do que os usados nos experimentos desta tese.

Apesar da dificuldade de comparação com estudos anteriores, algumas observações podem ser feitas. Por exemplo, alteração da atividade neural na região da ínsula foi observada em estudos com pacientes deprimidos que investigaram os efeitos antidepressivos nos sistemas neurais em pacientes com transtorno do humor, em particular transtorno depressivo maior. Davidson et al. (2003) observaram aumento de ativação da ínsula esquerda em pacientes deprimidos após o tratamento com venlafaxina quando avaliados por RMf através de visualização de fotografias emocionais (Davidson et al., 2003).

Já Fu et al. (2004) avaliaram o processamento de faces de tristeza em pacientes deprimidos através de RMf e evidenciaram diminuição de atividade na ínsula esquerda após o uso de fluoxetina (Fu et al., 2004).

Langenecker et al. (2007) observaram a maior atividade neural durante um paradigma de inibição. Este teste (Go/NoGo) exige que o participante realize uma resposta motora simples em um estímulo e, em outro estímulo, não realize a resposta motora (inibição). O teste é utilizado para medir a capacidade dos participantes em manter atenção e controlar resposta motora. Maior atividade foi evidenciada na região da ínsula

esquerda em pacientes deprimidos antes do início do tratamento, o que predizia a melhora sintomatológica dos sintomas depressivos após o uso de citalopram (Langenecker et al., 2007).

Chen et al. (2008), durante o processamento de faces tristes, observaram aumento da interrelação entre a amígdala e a ínsula direita após o tratamento com fluoxetina em pacientes deprimidos (Chen et al., 2008).

Os estudos acima, portanto, dão reforço à ideia de que a maior ativação na região da ínsula possivelmente está relacionada à resposta antidepressiva e não com alterações relacionadas à psicopatologia depressiva. Possivelmente, quanto maior a ativação ínsular, maior será a resposta clínica apresentada por pacientes deprimidos ao uso de medicações antidepressivas. Nossos resultados complementam os achados destes estudos, com a vantagem de que demonstram mudanças de atividade na ínsula em resposta à clomipramina em uma amostra de sujeitos cujos padrões de atividade neural não foram confundidos pela presença de diagnóstico psiquiátricos e características clínicas associadas.

Vale também ressaltar que estudos avaliando os efeitos do uso continuado de antidepressivos em portadores de síndromes depressivas têm mostrado mudanças nos padrões de atividade neural durante paradigmas de estimulação emocional em várias outras áreas cerebrais.

Por exemplo, o estudo de Davidson et al. (2003), acima, evidenciou maior ativação do cíngulo anterior após o tratamento com venlafaxina (Davidson et al., 2003).

Já Fu et al. (2004) avaliaram o processamento de faces de tristeza em pacientes deprimidos antes e após o uso de fluoxetina e evidenciaram diminuição de atividade na amígdala, e o corpo estriado ventral; assim como a melhora da sintomatologia estava relacionada com diminuição de atividade no giro do cíngulo pregenual, corpo estriado e cerebelo (Fu et al., 2004). Neste mesmo ensaio clínico, os autores avaliaram o processamento de faces felizes e evidenciaram aumento da atividade cerebral em regiões como o cíngulo posterior, o precuneus e o cuneus com o uso do antidepressivo e melhora da sintomatologia (Fu et al., 2007). Com um paradigma de memória, Walsh et al. (2007) observaram que uma menor atividade em regiões dorsais do cíngulo anterior e do córtex pré-frontal estava associada a uma resposta melhor ao antidepressivo (Walsh et al., 2007).

No estudo de Chen et al. (2007), a melhora dos sintomas depressivos após tratamento farmacológico com fluoxetina estava associada com maior volume de substância cinzenta e maior atividade funcional durante o processamento de tristeza no giro do cíngulo anterior na avaliação inicial, isto é, tinham menor atividade nesta região quando medicados (Chen et al., 2007).

Langenecker et al. (2007) observaram que, além da maior atividade da ínsula, maior atividade neural nas regiões frontais inferiores bilaterais, amígdala e núcleo *accumbens* em pacientes deprimidos também predizia melhora sintomatológica dos sintomas depressivos após o uso de citalopram (Langenecker et al., 2007).

Robertson et al. (2007) observaram diminuição de atividade neural no córtex frontal orbital, dorsomedial e ventromedial, giro do cíngulo anterior, amígdala e caudado, quando realizando uma tarefa de controle executivo na presença de fotografias de conteúdo negativo após o uso de bupropiona XL (Robertson et al., 2007).

Anand et al. (2007) observaram aumento de conectividade entre o giro do cíngulo anterior e regiões como a amígdala, corpo estriado e tálamo após o tratamento farmacológico com sertralina em pacientes deprimidos, colaborando para a hipótese de aumento de atividade em regiões de regulação emocional sobre regiões límbicas (Anand et al., 2007).

Chen et al. (2008), durante o processamento de faces tristes, observaram também o aumento da inter-relação entre a amígdala e o córtex frontal, o giro do cíngulo anterior, o tálamo e o corpo estriado após o tratamento com fluoxetina de pacientes deprimidos (Chen et al., 2008).

Em síntese, os estudos acima realizados em amostras de portadores de síndromes depressivas indicam que, após o tratamento antidepressivo, a maior atividade regional diminui em diversas áreas como ínsula, giro do cíngulo, córtex pré-frontal, amígdala e corpo estriado. Há considerável variabilidade de resultados, possivelmente relacionada a diferentes paradigmas usados, e amostras reduzidas de pacientes que sofrem de transtornos do humor, que sabidamente são clinicamente heterogêneos. Mesmo assim, há certa consistência ao demonstrar que a resposta bem-sucedida ao tratamento farmacológico com antidepressivos está associada com maior atividade neural em regiões de regulação emocional como o giro do cíngulo e ínsula, padrão este com o qual os resultados dos experimentos desta tese foram parcialmente concordantes, especificamente no que diz respeito à ínsula.

6.5. A escolha da clomipramina

A escolha da clomipramina para este estudo baseou-se na experiência precedente do grupo de pesquisadores colaboradores deste projeto que vêm conduzindo ensaios clínicos controlados usando a clomipramina nos últimos anos (Gentil et al., 1993; Gorenstein et al., 1998). Os pesquisadores evidenciaram que, após o uso prolongado de clomipramina, os voluntários saudáveis relataram melhora na irritabilidade e ansiedade (Gorenstein et al., 1998). Os voluntários também tornaram-se

menos hostis e aparentemente deixaram de interpretar, erroneamente, sinais ambientais inespecíficos como agressivos (Gorenstein et al., 1998).

Além disso, a clomipramina é considerada mais eficaz que outros antidepressivos no tratamento do transtorno do pânico e na depressão severa (Lotufo-Neto et al., 2001). Doses baixas de clomipramina, tais como 10Mg, ocupam aproximadamente 80% dos transportadores de serotonina. A mesma porcentagem é atingida com 20Mg de paroxetina e 50 Mg de fluvoxamina (Wong et al., 2009). Finalmente, estudos farmacológicos usando tecido animal ou receptores clonados humanos, mostraram que a clomipramina apresenta forte ação dual, atuando como inibidor de serotonina e da recaptção de noradrenalina. A clomipramina cumpre assim com os critérios de um antidepressivo de inibição da recaptção de serotonina/noradrenalina, até mesmo em maior conformidade do que a venlafaxina (Gillman, 2007; Wong et al., 2009).

Entretanto, a clomipramina apresenta também afinidade elevada por receptores histaminérgicos (H1), α 1-adrenérgicos, serotoninérgicos (2A) e aos receptores pós-sinápticos muscarínicos (Sadock et al., 2004). Conseqüentemente, as diferenças observadas na atividade neural durante o processamento emocional podem também ser devidas ao efeito da clomipramina em um ou vários destes receptores.

Estudos futuros poderiam ser realizados com outros antidepressivos para averiguar se o efeito encontrado nos experimentos aqui descritos é específico à clomipramina ou se deve a um efeito geral dos antidepressivos. Seria também relevante utilizar antidepressivos mais específicos e de diferentes classes. Por fim, seria interessante investigar o efeito dos antidepressivos nos sistemas neurais em uma amostra com indivíduos portadores de psicopatologia psiquiátrica, irmãos saudáveis e voluntários com baixo risco de desenvolver transtorno psiquiátrico. Desta maneira, poderíamos investigar, também, um possível marcador de resistência e/ou a possibilidade de um papel preventivo para medicações antidepressivas.

6.6. Limitações metodológicas

Nós optamos por usar uma ordem fixa de aquisição de dados durante a RMf, com a primeira visita quando os voluntários estavam medicados. Esta escolha baseou-se na otimização de recrutar e realizar RMf no maior número possível de indivíduos respondedores à clomipramina. Um desenho experimental ideal seria realizar a aquisição de dados antes de introduzir o antidepressivo e, após, randomizar os grupos em um ensaio clínico randomizado, cruzado, controlado por placebo. Ao final de cada braço do ensaio clínico, seria realizada nova aquisição de dados com RMf. Entretanto, este tipo de desenho experimental tem como desvantagem a possibilidade de um alto nível de desistência dos participantes, principalmente dos indivíduos saudáveis.

Consequentemente, é possível que os resultados de ativação cerebral relatados nesta tese tenham sido influenciados por efeitos não específicos de habituação ao experimento e não ao uso prolongado de clomipramina. O paradigma utilizado nesta tese solicitava que os participantes entrassem na situação do contexto temático das fotografias, e não exigia do participante demanda cognitiva, levando ao aprendizado de como avaliar emoções. Estudos que estudam habituação neural testam e retestam o mesmo indivíduo normalmente na mesma sessão após um treinamento explícito cognitivo. Os participantes neste estudo tiveram um intervalo de quatro semanas entre uma visita e outra. De forma geral, habituação está relacionada à melhora da acurácia do paradigma e menor ativação neural em regiões ligadas a processamento executivo, monitorar performance, memória processual como o córtex pré-frontal dorsolateral, ou, em alguns estudos, a amígdala (Wright et al., 2001; Feinstein et al., 2002; Fischer et al., 2003; Chein e Schneider, 2005).

Entretanto, como os dados da literatura citados acima demonstram, era de se esperar que a presença de efeitos de habituação iriam diminuir a atividade neural durante o processamento emocional após a exposição repetida aos estímulos de provocação de emoções empregados. Ao invés disto, no presente estudo, observamos diminuição de atividade neural na primeira visita e não na segunda visita. Consequentemente, pode-se inferir que as diferenças observadas estão muito mais provavelmente relacionadas

à ação direta da clomipramina, e não a efeitos resultantes da habituação com o experimento.

Além disso, tais efeitos de prática foram provavelmente minimizados nos experimentos desta tese, pois todos os indivíduos realizaram uma sessão de simulação antes da aquisição de dados com RMf. Os modernos equipamentos utilizados nesta tese podem para alguns indivíduos ser extremamente ameaçadores, desta forma, a sessão de simulação foi essencial em eliminar este viés dos resultados (Ball e Holland, 2009), além de identificar possíveis participantes que pudessem desenvolver sintomas claustrofóbicos (Eshed et al., 2007; McGlynn et al., 2007; Thorpe et al., 2008).

O protocolo utilizado para aquisição de dados de RMf empregado pode ter levado à perda de sinal e a distorções geométricas que eventualmente complicaram o acesso a áreas cerebrais relevantes para o processamento emocional, como o córtex órbito-frontal e a amígdala (Posse et al., 2003; Cusack et al., 2005). Entretanto, deve ser mencionado que foram detectadas em nosso estudo mudanças de sinal BOLD em áreas cerebrais igualmente susceptíveis a perdas de sinal durante aquisição de imagens de RMf, como os polos frontais e amígdala. Todavia, consideramos importante a replicação dos achados com protocolos de aquisição de dados de RMf otimizados, com o objetivo de melhorar a sensibilidade de sinal em regiões susceptíveis a artefatos dessa natureza.

O princípio utilizado para analisar o paradigma de indução emocional empregado neste estudo foi a especialização funcional. Técnicas mais sofisticadas baseadas no princípio de integração funcional exigem paradigmas com número maior de eventos e um paradigma planejado previamente por este princípio.

Especialização funcional pressupõe que os diferentes aspectos do processamento da informação envolvem regiões cerebrais distintas, e não pode revelar a forma como estas regiões podem ser funcionalmente integradas durante o desempenho da tarefa. Em neuroimagem, integração funcional dentro de uma rede neural pode ser caracterizada em termos de *functional connectivity* (conectividade funcional) e *effective connectivity* (conectividade eficaz) (Friston et al., 2003; Mechelli et al., 2003; Friston, 2007). Conectividade funcional não se baseia em um modelo cognitivo funcional e refere-se a uma correlação ao longo do tempo entre atividades neurais em diferentes regiões. Em contrapartida, a conectividade eficaz é baseada em um modelo de processamento funcional e se refere ao impacto que a atividade em uma região exerce sobre a atividade em outra região (Friston et al., 2003).

Apesar de resultados significativos, o número de voluntários participantes neste estudo, particularmente no subgrupo de indivíduos respondedores, era pequena; desta maneira, nossos resultados devem ser

interpretados com cautela. Entretanto, nossa amostra completa de 18 voluntários é compatível ou, em alguns casos, maior que estudos recentes de RMf e está acima do recomendado recentemente para estudos de neuroimagem funcional em análises por regiões de interesse (Carter et al., 2008). Além disso, nossa amostra participou de uma sessão de simulação e duas de RMf (sob efeito e na ausência de clomipramina), e, neste desenho longitudinal, aumenta-se o poder estatístico do estudo.

Apesar da nossa amostra não diferir estatisticamente na distribuição do gênero, a maior parte dos indivíduos era do sexo feminino e nós não controlamos para a possível influência da fase do ciclo menstrual e/ou hormonal. Por exemplo, nível diminuído de testosterona em mulheres de meia idade está relacionado com menor ativação da amígdala, quando comparado com mulheres jovens (van Wingen et al., 2009); ou, ainda, maior atividade no córtex pré-frontal ventromedial, menor assimetria cerebral e alteração no comportamento de risco estavam associadas com a fase folicular do ciclo menstrual (Roberts et al., 2008; Weis et al., 2008; Rupp et al., 2009). Estudos futuros devem controlar para este efeito, ou através de medidas plasmáticas hormonais, ou adquirir dados somente em uma fase do ciclo menstrual, principalmente se o paradigma a ser utilizado estiver em contexto de comportamento sexual. No paradigma utilizado nesta tese, a provocação emocional não tinha carácter sexual, portanto, este tipo de efeito pode ser minimizado.

6.7. Implicações neurofisiológicas e clínicas dos achados

Maior compreensão dos efeitos dos antidepressivos nos sistemas neurais proporciona melhor entendimento da psicopatofisiologia dos transtornos psiquiátricos, em particular dos transtornos depressivos, nos quais os antidepressivos são usados. Nossos achados replicam e amplificam estudos anteriores mostrando que os antidepressivos diminuem a atividade neural em regiões ligadas ao processamento emocional. Mais além, verificamos que os indivíduos respondedores à clomipramina possuem um padrão de aumento de atividade neural, quando comparados com os não respondedores, ambos sob efeito do antidepressivo. Em particular, observamos maior ativação da ínsula, possivelmente implicada no mapeamento cortical da interocepção, “o quanto estamos conscientes de nós mesmos”. Assim, poderíamos especular, baseados nos nossos achados, que os antidepressivos atuam diminuindo o aporte de emoção e melhorando a regulação emocional. Interessante notar que a expressão “estar consciente de si mesmo” é também utilizada em outros campos de conhecimento. Diferentes técnicas de psicoterapia utilizam esta expressão, assim como diferentes religiões e correntes filosóficas; entretanto, uma discussão aprofundada não é o objetivo da tese presente. Contudo, ainda estamos em fase de compreensão inicial dos papéis dos diferentes sistemas cerebrais, de como estes sistemas estão alterados nos diferentes transtornos psiquiátricos e como as medicações melhoram os sintomas. Além disso, ainda estamos sem saber com precisão as causas destes

transtornos. No futuro, talvez, encontre-se medicações que atuem em sistemas cerebrais específicos que se deseja influenciar; entretanto, este tipo de intervenção deve, necessariamente, ser realizada após o entendimento dos diferentes processos cerebrais e sua variação dentro da população geral, assim como a variação individual.

Devido ao desenho experimental do nosso estudo, não podemos prever quais os indivíduos apresentarão resposta ao antidepressivo. Entretanto, a ativação da ínsula aqui demonstrada provavelmente poderia ser um marcador biológico de resposta farmacológica aos antidepressivos. Encontrar um marcador biológico de resposta terapêutica é atualmente um dos grandes desafios em estudos de neuroimagem em Psiquiatria. As implicações práticas podem beneficiar tanto o paciente quanto seu médico, pois, no momento, tem-se que esperar um longo tempo antes de saber com certeza se determinado indivíduo não irá responder à determinada droga para, então, alterar sua prescrição. Um marcador biológico poderia guiar não só a escolha de determinado medicamento, mas também sua alteração mais precoce, caso não fosse evidenciada modificação deste marcador após a introdução da medicação. Talvez esta interface seja atingida no futuro próximo com técnicas de neuroimagem e genética, com prescrições individualizadas. Porém, ainda estamos entendendo a variabilidade normal da relação entre genética e atividade neural. Apesar de ser este um campo promissor de integração das neurociências, muito ainda falta saber antes de uma aplicação clínica imediata.

7. Conclusões

1. Indivíduos saudáveis que não responderam ao uso prolongado de baixas doses de clomipramina não apresentaram modificações subjetivas de estado emocional durante avaliação de fotografias com conteúdo emocional (felicidade, raiva e medo) e neutro. Estes achados sugerem que antidepressivos não necessariamente modificam a habilidade na percepção emocional em indivíduos saudáveis.
2. Indivíduos saudáveis que não responderam ao uso prolongado de baixas doses de clomipramina apresentaram um padrão de diminuição de atividade neural durante aquisição de imagens de RMf quando encontravam-se medicados nos paradigmas de felicidade, raiva e medo. Este achado sugere que antidepressivos possuem efeito na atividade neural em indivíduos saudáveis mesmo que estes não apresentem alterações na percepção emocional.
3. Especificamente, indivíduos saudáveis que não responderam ao uso prolongado de baixas doses de clomipramina apresentaram menor ativação da região amígdala durante os paradigmas de valência negativa, isto é, nos paradigmas de medo e raiva, quando estavam medicados. Entretanto, no paradigma de valência positiva não houve alteração de atividade neural da amígdala. A amígdala está implicada na detecção e

avaliação inicial do estímulo emocional para posterior processamento por regiões corticais. Este achado sugere que os antidepressivos poderiam atuar diminuindo a identificação e avaliação inicial das emoções mesmo quando o indivíduo não apresenta alterações da avaliação subjetiva do estímulo emocional.

4. Indivíduos não respondedores à clomipramina também apresentaram, durante os paradigmas de valência negativa, diminuição de atividade neural nas regiões do córtex pré-frontal dorsolateral e ventrolateral quando estavam medicados. Estas regiões estão implicadas na regulação comportamental em resposta ao estímulo emocional. Estes achados sugerem que os antidepressivos poderiam estar implicados na regulação comportamental em resposta a estímulos emocionais em indivíduos saudáveis, mesmo quando estes não demonstram alteração comportamental.
5. Indivíduos não respondedores à clomipramina também apresentaram diminuição de atividade neural no giro do cíngulo anterior, na ínsula e no putâmen em paradigmas de ambas valências, isto é, positiva e negativa, quando estavam medicados. A ínsula está ligada com o mapeamento cortical da interocepção. Este achado sugere que os antidepressivos poderiam ter um efeito geral na diminuição da capacidade do indivíduo se “auto-perceber” frente a estímulos positivos e negativos.

6. Indivíduos que responderam e os que não responderam ao uso prolongado de baixas doses de clomipramina apresentaram diferenças na avaliação subjetiva de fotografias com conteúdo emocional e neutro quando estavam sob efeito da clomipramina. Indivíduos respondedores apresentaram maior sentimento de raiva em resposta ao estímulo de valência negativa e neutra. Este achado sugere que voluntários saudáveis que respondem ao uso de antidepressivo apresentam diferenças comportamentais mesmo na ausência de psicopatologia.

7. Indivíduos saudáveis que responderam a doses baixas de clomipramina apresentaram padrão de atividade neural maior que os não respondedores quando encontravam-se sob efeito prolongado da clomipramina. Este resultado sugere que indivíduos que respondem ao uso de antidepressivos apresentam maior sensibilidade aos efeitos neurais destes medicamentos.

8. Indivíduos saudáveis que responderam ao uso de clomipramina apresentaram maior atividade neural na ínsula durante os paradigmas de valência positiva e negativa. Este resultado sugere que os indivíduos que respondem ao antidepressivo percebem mais as alterações de seu estado vegetativo corporal. Desta maneira, poderia se dizer que a possibilidade de resposta terapêutica seria determinada pela capacidade de avaliar as modificações internas iniciais do organismo.

9. Indivíduos saudáveis que respondem ao uso de clomipramina também apresentam maior atividade funcional nas regiões do giro do cíngulo anterior e do córtex pré-frontal dorsolateral e ventrolateral durante a realização dos paradigmas de raiva e felicidade. Estes achados sugerem que a resposta terapêutica aos antidepressivos pode estar relacionada a uma otimização da atividade funcional de circuitos cerebrais responsáveis pela capacidade de regulação do comportamento emocional humano.

8. ANEXOS

Blocos de fotografias com conteúdo emocional e neutro utilizados nos paradigmas de Felicidade, Medo e Raiva.

Anexo - A

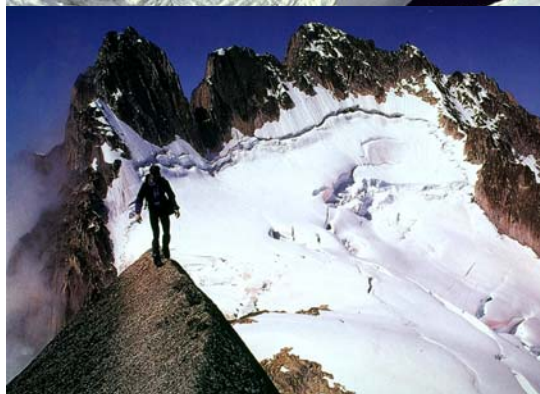
**Blocos de fotografias com conteúdo emocional utilizados durante o
paradigma de Felicidade**

**VOCÊ ESTÁ VENDO ESTAS
CENAS EM UM PROGRAMA
DE AVENTURA**

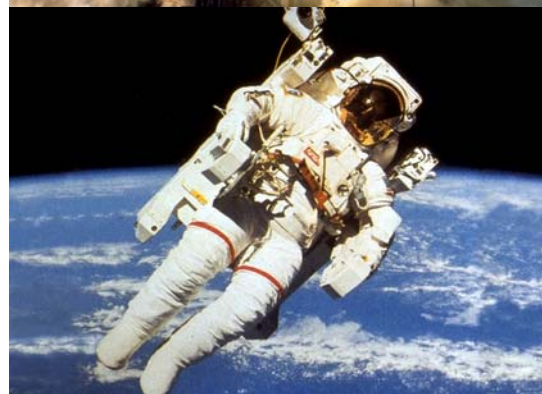
**ESTAS SÃO AS FOTOS
DO SEU FIM DE
SEMANA PASSADO**



**VOCÊ VENCEU
BARREIRAS E
CHEGOU AO TOPO**



**PREPARE-SE PARA A
MAIOR VIAGEM
DA SUA VIDA**



**VOCÊ TORCEU
MUITO E ELES
VENCERAM**



Anexo - B

**Blocos de fotografias com conteúdo emocional utilizados durante o
paradigma de Medo**

**DESASTRES DA NATUREZA
ACONTECERAM. ONDE VOCÊ
VAI SE ESCONDER?**



**VOCÊ
ESTA SENDO
ASSALTADO**



**VOCÊ FOI ACAMPAR
E FOI ISTO QUE
LHE ACONTECEU**



**ELES LHE DISSERAM
QUE DESTA VEZ
VAI DOER**



**IMAGINE-SE
NESTAS
SITUAÇÕES**



Anexo - C

**Blocos de fotografias com conteúdo emocional utilizados durante o
paradigma de Raiva**

**VOCÊ FOI À PRAIA PARA
RELAXAR E OLHA SÓ O
QUE LHE ACONTECEU**

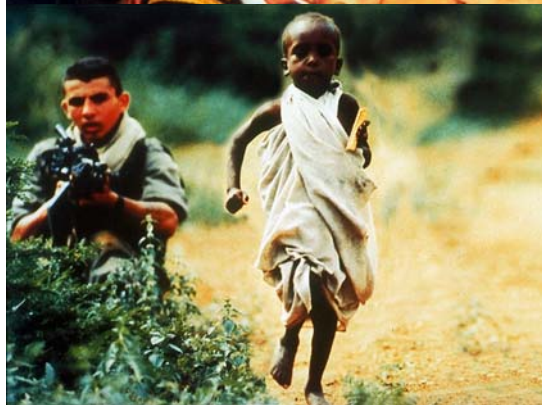


**ELES VÃO À GUERRA,
MAS QUEM PAGA
É VOCÊ**



**VOCÊ ABRIU O JORNAL E FOI
ISTO QUE VOCÊ VIU: MAUS
TRATOS E DESRESPEITO**

**É ISTO QUE VOCÊ
VÊ NA TELEVISÃO:
VIOLÊNCIA E REPRESSÃO**



**VOCÊ PERCEBEU QUE ESSAS
PESSOAS ESTÃO SE DIVERTINDO
ÀS CUSTAS DOS OUTROS**



Anexo - D

Blocos de fotografias com conteúdo neutro

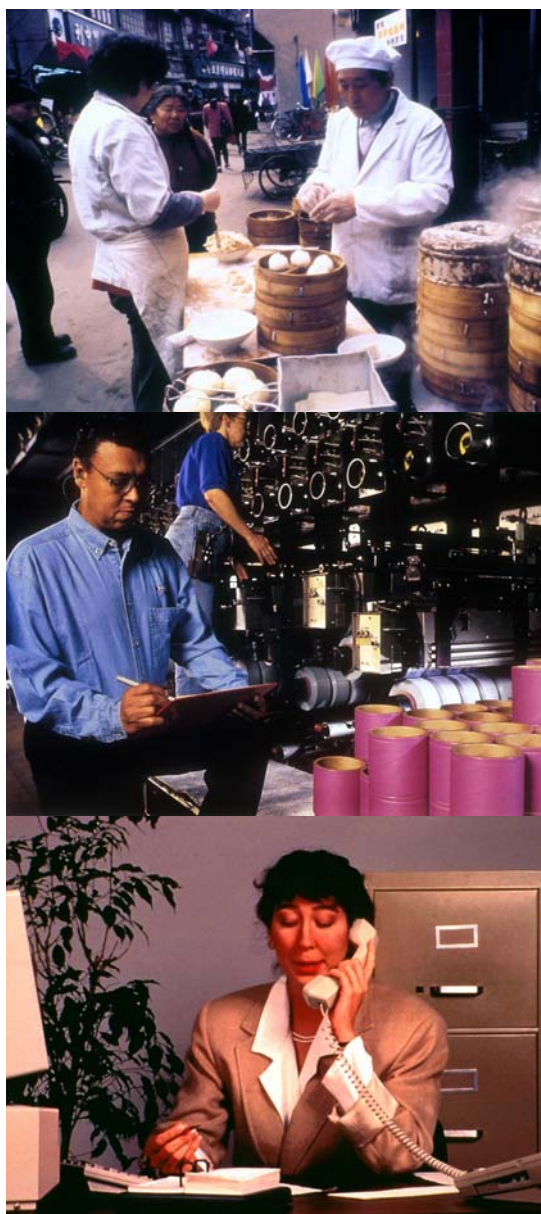
**VOCÊ
VAI POR
A MESA**



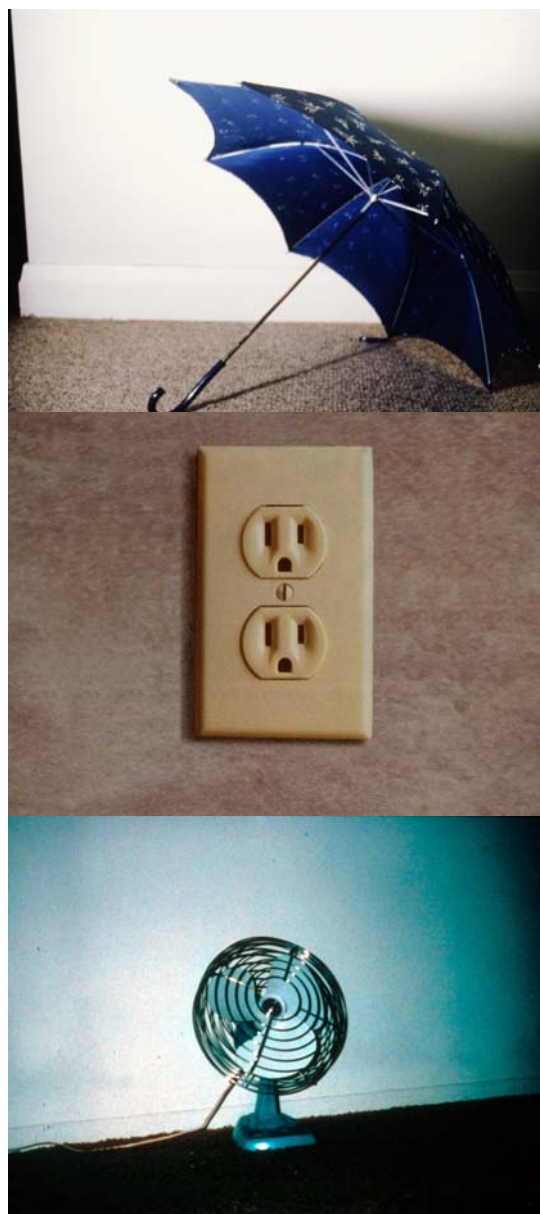
**VOCÊ ESTA
DENTRO DE
UMA CASA**



**MAIS UM
DIA NO SEU
TRABALHO**



**VOCÊ
USA ESTAS
COISAS**



**VOCÊ ESTA
NUMA
COZINHA**



**MAIS UM
DIA EM
SUA CASA**



**VOCÊ ESTA
SE DESLOCANDO
PELA CIDADE**



**VOCÊ SAIU
ANDANDO
PELA CIDADE**



**MAIS UM
DIA NA SUA
VIDA**



9. REFERÊNCIAS

Aftanas, LI, Varlamov, AA, Pavlov, SV, Makhnev, VP, Reva, NV. Time-dependent cortical asymmetries induced by emotional arousal: EEG analysis of event-related synchronization and desynchronization in individually defined frequency bands. *Int J Psychophysiol.* 2002; 44: 67-82.

Almeida, OP. [Psychiatric symptoms among patients with dementia seen in an ambulatory service]. *Arq Neuropsiquiatr.* 1999; 57: 937-43.

Amrhein, C, Muhlberger, A, Pauli, P, Wiedemann, G. Modulation of event-related brain potentials during affective picture processing: a complement to startle reflex and skin conductance response? *Int J Psychophysiol.* 2004; 54: 231-40.

Anand, A, Li, Y, Wang, Y, Gardner, K, Lowe, MJ. Reciprocal effects of antidepressant treatment on activity and connectivity of the mood regulating circuit: An fMRI study. *Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences.* 2007; 19: 274-82.

Anand, A, Li, Y, Wang, Y, Wu, J, Gao, S, Bukhari, L, Mathews, VP, Kalnin, A, Lowe, MJ. Antidepressant effect on connectivity of the mood-regulating circuit: an FMRI study. *Neuropsychopharmacology*. 2005; 30: 1334-44.

Andrews, W, Parker, G, Barrett, E. The SSRI antidepressants: exploring their "other" possible properties. *J Affect Disord*. 1998; 49: 141-4.

Annett, M. A classification of hand preference by association analysis. *Br J Psychol*. 1970; 61: 303-21.

Arce, E, Simmons, AN, Lovero, KL, Stein, MB, Paulus, MP. Escitalopram effects on insula and amygdala BOLD activation during emotional processing. *Psychopharmacology*. 2008; 196: 661-72.

Ashburner, J, Friston, KJ. Unified segmentation. *Neuroimage*. 2005; 26: 839-51.

Ball, W, Holland, S. The fear of new technology: a naturally occurring phenomenon. *Am J Bioeth*. 2009; 9: 14-6.

Banks, SJ, Eddy, KT, Angstadt, M, Nathan, PJ, Phan, KL. Amygdala-frontal connectivity during emotion regulation. *Soc Cogn Affect Neurosci*. 2007; 2: 303-12.

Barr, LC, Heninger, GR, Goodman, W, Charney, DS, Price, LH. Effects of fluoxetine administration on mood response to tryptophan depletion in healthy subjects. *Biol Psychiatry*. 1997; 41: 949-54.

Bigos, KL, Pollock, BG, Aizenstein, HJ, Fisher, PM, Bies, RR, Hariri, AR. Acute 5-HT reuptake blockade potentiates human amygdala reactivity. *Neuropsychopharmacology*. 2008; 33: 3221-5.

Bradley, MM, Lang, PJ. Measuring emotion: behavior, feeling, and physiology. In: Lane, R.D., Nadel, L., editors. *Cognitive Neuroscience of Emotion*. New York: Oxford University Press New York; 2000. p. 242-76.

Busatto, GF, Pilowsky, LS. Neuroreceptor mapping with in-vivo imaging techniques: principles and applications. *Br J Hosp Med*. 1995; 53: 309-13.

Bush, G, Luu, P, Posner, MI. Cognitive and emotional influences in anterior cingulate cortex. *Trends Cogn Sci*. 2000; 4: 215-22.

Carter, CS, Hecker, S, Nichols, T, Pine, DS, Strother, S. Optimizing the design and analysis of clinical functional magnetic resonance imaging research studies. *Biol Psychiatry*. 2008; 64: 842-9.

Cerqueira, CT, Almeida, JR, Gorenstein, C, Gentil, V, Leite, CC, Sato, JR, Amaro, E, Jr., Busatto, GF. Engagement of multifocal neural circuits during

recall of autobiographical happy events. *Braz J Med Biol Res.* 2008; 41: 1076-85.

Chein, JM, Schneider, W. Neuroimaging studies of practice-related change: fMRI and meta-analytic evidence of a domain-general control network for learning. *Cognitive Brain Research.* 2005; 25: 607-23.

Chen, CH, Ridler, K, Suckling, J, Williams, S, Fu, CHY, Merlo-Pich, E, Bullmore, E. Brain imaging correlates of depressive symptom severity and predictors of symptom improvement after antidepressant treatment. *Biological Psychiatry.* 2007; 62: 407-14.

Chen, CH, Suckling, J, Ooi, C, Fu, CH, Williams, SCR, Walsh, ND, Mitterschiffthaler, MT, Pich, EM, Bullmore, E. Functional coupling of the amygdala in depressed patients treated with antidepressant medication. *Neuropsychopharmacology.* 2008; 33: 1909-18.

Cloninger, CR, Przybeck, TR, Svrakic, DM, Wetzel, RD. The Temperament and Character Inventory (TCI). A guide to its development and use. St. Louis, MO: Center of Psychobiology of Personality, Washington University; 1994.

Craig, AD. How do you feel? Interoception: the sense of the physiological condition of the body. *Nat Rev Neurosci.* 2002; 3: 655-66.

Craig, AD. How do you feel -- now? The anterior insula and human awareness. *Nat Rev Neurosci*. 2009; 10: 59-70.

Critchley, HD, Mathias, CJ, Josephs, O, O'Doherty, J, Zanini, S, Dewar, BK, Cipolotti, L, Shallice, T, Dolan, RJ. Human cingulate cortex and autonomic control: converging neuroimaging and clinical evidence. *Brain*. 2003; 126: 2139-52.

Critchley, HD, Tang, J, Glaser, D, Butterworth, B, Dolan, RJ. Anterior cingulate activity during error and autonomic response. *Neuroimage*. 2005; 27: 885-95.

Cusack, R, Russell, B, Cox, SM, De Panfilis, C, Schwarzbauer, C, Ansorge, R. An evaluation of the use of passive shimming to improve frontal sensitivity in fMRI. *Neuroimage*. 2005; 24: 82-91.

Davidson, RJ, Irwin, W, Anderle, MJ, Kalin, NH. The Neural Substrates of Affective Processing in Depressed Patients Treated With Venlafaxine. *Am J Psychiatry*. 2003; 160: 64-75.

Davis, WJ, Rahman, MA, Smith, LJ, Burns, A, Senecal, L, McArthur, D, Halpern, JA, Perlmutter, A, Sickels, W, Wagner, W. Properties of human affect induced by static color slides (IAPS): dimensional, categorical and electromyographic analysis. *Biol Psychol*. 1995; 41: 229-53.

Del-Ben, CM, Deakin, JF, McKie, S, Delvai, NA, Williams, SR, Elliott, R, Dolan, M, Anderson, IM. The effect of citalopram pretreatment on neuronal responses to neuropsychological tasks in normal volunteers: an fMRI study. *Neuropsychopharmacology*. 2005; 30: 1724-34.

Drevets, WC, Savitz, J. The Subgenual Anterior Cingulate Cortex in Mood Disorders. *Cns Spectrums*. 2008; 13: 663-81.

Eckert, MA, Menon, V, Walczak, A, Ahlstrom, J, Denslow, S, Horwitz, A, Dubno, JR. At the heart of the ventral attention system: The right anterior insula. *Hum Brain Mapp*. 2008;

Eshed, I, Althoff, CE, Hamm, B, Hermann, KG. Claustrophobia and premature termination of magnetic resonance imaging examinations. *J Magn Reson Imaging*. 2007; 26: 401-4.

Fahim, C, Stip, E, Mancini-Marie, A, Boualem, M, Malaspina, D, Beauregard, M. Negative socio-emotional resonance in schizophrenia: a functional magnetic resonance imaging hypothesis. *Med Hypotheses*. 2004; 63: 467-75.

Fava, GA, Grandi, S, Rafanelli, C, Saviotti, FM, Ballin, M, Pesarin, F. Hostility and irritable mood in panic disorder with agoraphobia. *Journal of Affective Disorders*. 1993; 29: 213-7.

Fava, M, Anderson, K, Rosenbaum, JF. "Anger attacks": possible variants of panic and major depressive disorders. *Am J Psychiatry*. 1990; 147: 867-70.

Fava, M, Rosenbaum, JF, Pava, JA, McCarthy, MK, Steingard, RJ, Bouffides, E. Anger attacks in unipolar depression, Part 1: Clinical correlates and response to fluoxetine treatment. *Am J Psychiatry*. 1993; 150: 1158-63.

Feinstein, JS, Goldin, PR, Stein, MB, Brown, GG, Paulus, MP. Habituation of attentional networks during emotion processing. *Neuroreport*. 2002; 13: 1255-8.

First, MB, Spitzer, RL, Gibbon, M, Williams, JBW. Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders _ (SCID-, version 2.0). New York: Biometric research Department, New York State Psychiatric Institute; 1995.

Fischer, H, Wright, CI, Whalen, PJ, McInerney, SC, Shin, LM, Rauch, SL. Brain habituation during repeated exposure to fearful and neutral faces: a functional MRI study. *Brain Res Bull*. 2003; 59: 387-92.

Forbes, EE, Hariri, AR, Martin, SL, Silk, JS, Moyles, DL, Fisher, PM, Brown, SM, Ryan, ND, Birmaher, B, Axelson, DA, Dahl, RE. Altered Striatal Activation Predicting Real-World Positive Affect in Adolescent Major Depressive Disorder. *Am J Psychiatry*. 2008;

Forman, SD, Cohen, JD, Fitzgerald, M, Eddy, WF, Mintun, MA, Noll, DC. Improved assessment of significant activation in functional magnetic resonance imaging (fMRI): use of a cluster-size threshold. *Magn Reson Med.* 1995; 33: 636-47.

Fox, PT, Raichle, ME. Focal physiological uncoupling of cerebral blood flow and oxidative metabolism during somatosensory stimulation in human subjects. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986; 83: 1140-4.

Fraguas, R, Jr., Marci, C, Fava, M, Iosifescu, DV, Bankier, B, Loh, R, Dougherty, DD. Autonomic reactivity to induced emotion as potential predictor of response to antidepressant treatment. *Psychiatry Res.* 2007; 151: 169-72.

Friston, KJ. Statistical parametric mapping : the analysis of functional brain images. 1st ed. Amsterdam ; Boston: Elsevier/Academic Press; 2007.

Friston, KJ, Harrison, L, Penny, W. Dynamic causal modelling. *Neuroimage.* 2003; 19: 1273-302.

Fu, CHY, Williams, SCR, Brammer, MJ, Suckling, J, Kim, J, Cleare, AJ, Walsh, ND, Mitterschiffthaler, MT, Andrew, CM, Pich, EM, Bullmore, ET. Neural responses to happy facial expressions in major depression following antidepressant treatment. *American Journal of Psychiatry.* 2007; 164: 599-607.

Fu, CHY, Williams, SCR, Cleare, AJ, Brammer, MJ, Walsh, ND, Kim, J, Andrew, CM, Pich, EM, Williams, PM, Reed, LJ, Mitterschiffthaler, MT, Suckling, J, Bullmore, ET. Attenuation of the neural response to sad faces in major depression by antidepressant treatment - A prospective, event-related functional magnetic resonance imaging study. *Archives of General Psychiatry*. 2004; 61: 877-89.

Fuentes, D, Tavares, H, Camargo, CHP, Gorenstein, C. Inventário de Temperamento e Caráter de Cloninger - validação da versão em Português. *Rev Psiq Clínica*. 1999; 26: 363-76.

Gelfin, Y, Gorfine, M, Lerer, B. Effect of clinical doses of fluoxetine on psychological variables in healthy volunteers. *Am J Psychiatry*. 1998; 155: 290-2.

Gentil, V, De Lucia, R. Doses e custos comparativos em psicofarmacoterapia. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 1979; 25: 239-42.

Gentil, V, Lotufo-Neto, F, Andrade, L, Cordas, T, Bernik, M, Ramos, R, Maciel, L, Miyakawa, E, Gorenstein, C. Clomipramine, a better reference drug for panic/agoraphobia. Effectiveness comparison with imipramine. *Journal of Psychopharmacology*. 1993; 7: 316-24.

George, DJ, Anderson, P, Nutt, DJ, Linnoila, M. Aggressive thoughts and behavior: another symptom of panic disorder? *Acta Psychiatrica Scandinavica*. 1989; 79: 500-2.

Gianaros, PJ, Sheu, LK, Matthews, KA, Jennings, JR, Manuck, SB, Hariri, AR. Individual differences in stressor-evoked blood pressure reactivity vary with activation, volume, and functional connectivity of the amygdala. *J Neurosci*. 2008; 28: 990-9.

Gilbert, A, Akkal, D, Almeida, JR, Mataix-Cols, D, Kalas, C, Devlin, B, Birmaher, B, Phillips, ML. Neural Correlates of Symptom Dimensions in Pediatric Obsessive-Compulsive Disorder: A Functional Magnetic Resonance Imaging Study. *J Affect Disord*. 2009; in press:

Gillman, PK. Tricyclic antidepressant pharmacology and therapeutic drug interactions updated. *Br J Pharmacol*. 2007; 151: 737-48.

Gorenstein, C, Gentil, V, Melo, M, Lotufo-Neto, F, Lauriano, V. Mood improvement in 'normal' volunteers. *J Psychopharmacol*. 1998; 12: 246-51.

Hamilton, JP, Gotlib, IH. Neural substrates of increased memory sensitivity for negative stimuli in major depression. *Biol Psychiatry*. 2008; 63: 1155-62.

Hariri, AR, Mattay, VS, Tessitore, A, Fera, F, Weinberger, DR. Neocortical modulation of the amygdala response to fearful stimuli. *Biol Psychiatry*. 2003; 53: 494-501.

Hariri, AR, Tessitore, A, Mattay, VS, Fera, F, Weinberger, DR. The amygdala response to emotional stimuli: a comparison of faces and scenes. *Neuroimage*. 2002; 17: 317-23.

Harmer, CJ, Bhagwagar, Z, Perrett, DI, Vollm, BA, Cowen, PJ, Goodwin, GM. Acute SSRI Administration Affects the Processing of Social Cues in Healthy Volunteers. *Neuropsychopharmacology*. 2002; 28: 148.

Harmer, CJ, Hill, SA, Taylor, MJ, Cowen, PJ, Goodwin, GM. Toward a neuropsychological theory of antidepressant drug action: increase in positive emotional bias after potentiation of norepinephrine activity. *Am J Psychiatry*. 2003; 160: 990-2.

Harmer, CJ, Mackay, CE, Reid, CB, Cowen, PJ, Goodwin, GM. Antidepressant drug treatment modifies the neural processing of nonconscious threat cues. *Biol Psychiatry*. 2006; 59: 816-20.

Harmer, CJ, Shelley, NC, Cowen, PJ, Goodwin, GM. Increased positive versus negative affective perception and memory in healthy volunteers following selective serotonin and norepinephrine reuptake inhibition. *Am J Psychiatry*. 2004; 161: 1256-63.

Hassel, S, Almeida, JR, Frank, E, Versace, A, Nau, SA, Klein, CR, Kupfer, DJ, Phillips, ML. Prefrontal cortical and striatal activity to happy and fear faces in bipolar disorder is associated with comorbid substance abuse and eating disorder. *J Affect Disord.* 2009;

Henna, EAD. Aspectos fenomenológicos da alteração emocional induzida por antidepressivos [mestrado]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2008.

Hermanns, N, Kubiak, T, Kulzer, B, Haak, T. Emotional changes during experimentally induced hypoglycaemia in type 1 diabetes. *Biol Psychol.* 2003; 63: 15-44.

Howard, RJ, Bullmore, E, Brammer, M, Williams, SC, Mellers, J, Woodruff, P, David, A, Andrew, C, Allin, M, Simmons, A. Activation of area V5 by visual perception of motion demonstrated with echoplanar MR imaging. *Magn Reson Imaging.* 1995; 13: 907-9.

Iaria, G, Committeri, G, Pastorelli, C, Pizzamiglio, L, Watkins, KE, Carota, A. Neural activity of the anterior insula in emotional processing depends on the individuals' emotional susceptibility. *Hum Brain Mapp.* 2008; 29: 363-73.

James, W. What is emotion? *Mind.* 1884; 9: 188-205.

Kalin, NH, Davidson, RJ, Irwin, W, Warner, G, Orendi, JL, Sutton, SK, Mock, BJ, Sorenson, JA, Lowe, M, Turski, PA. Functional magnetic resonance imaging studies of emotional processing in normal and depressed patients: effects of venlafaxine. *J Clin Psychiatry*. 1997; 58 Suppl 16: 32-9.

Kemp, AH, Gray, MA, Silberstein, RB, Armstrong, SM, Nathan, PJ. Augmentation of serotonin enhances pleasant and suppresses unpleasant cortical electrophysiological responses to visual emotional stimuli in humans. *Neuroimage*. 2004; 22: 1084-96.

Knutson, B, Wolkowitz, OM, Cole, SW, Chan, T, Moore, EA, Johnson, RC, Terpstra, J, Turner, RA, Reus, VI. Selective alteration of personality and social behavior by serotonergic intervention. *Am J Psychiatry*. 1998; 155: 373-9.

Kramer, PD. Listening to Prozac. New York: Viking; 1993.

Lang, PJ, Bradley, MM, Cuthbert, BN. International Affective Picture System (IAPS): Technical Manual and Affective Ratings. Gainesville, FL: University of Florida, Center for Research in Psychophysiology; 1997.

Lang, PJ, Bradley, MM, Cuthbert, BN. Emotion and motivation: measuring affective perception. *J Clin Neurophysiol*. 1998; 15: 397-408.

Lang, PJ, Ohman, A, Vaitl, D. The International Affective Picture System (photographic slides). Gainesville, FL: Center for Research in Psychophysiology, University of Florida; 1988.

Lange, CG. The Emotions. Baltimore,: Williams & Wilkins Company; 1922.

Lange, K, Williams, LM, Young, AW, Bullmore, ET, Brammer, MJ, Williams, SC, Gray, JA, Phillips, ML. Task instructions modulate neural responses to fearful facial expressions. *Biol Psychiatry*. 2003; 53: 226-32.

Langenecker, SA, Kennedy, SE, Guidotti, LM, Briceno, EM, Own, LS, Hooven, T, Young, EA, Akil, H, Noll, DC, Zubieta, JK. Frontal and limbic activation during inhibitory control predicts treatment response in major depressive disorder. *Biological Psychiatry*. 2007; 62: 1272-80.

Lanius, RA, Williamson, PC, Boksman, K, Densmore, M, Gupta, M, Neufeld, RW, Gati, JS, Menon, RS. Brain activation during script-driven imagery induced dissociative responses in PTSD: a functional magnetic resonance imaging investigation. *Biol Psychiatry*. 2002; 52: 305-11.

Ledoux, JE. The Emotional Brain. New York: Simon & Schuster; 1996.

Lee, BT, Seong Whi, C, Hyung Soo, K, Lee, BC, Choi, IG, Lyoo, IK, Ham, BJ. The neural substrates of affective processing toward positive and

negative affective pictures in patients with major depressive disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2007; 31: 1487-92.

Lee, KH, Siegle, GJ. Common and distinct brain networks underlying explicit emotional evaluation: a meta-analytic study. *Soc Cogn Affect Neurosci*. 2009; nsp001.

Lotufo-Neto, F, Bernik, MA, Ramos, RT, Andrade, L, Gorenstein, C, Cordas, T, Melo, M, Gentil, V. A dose-finding and discontinuation study of clomipramine in panic disorder. *J Psychopharmacol*. 2001; 15: 13-7.

Maclean, PD. Some psychiatric implications of physiological studies on frontotemporal portion of limbic system (visceral brain). *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl*. 1952; 4: 407-18.

Maldjian, JA, Laurienti, PJ, Kraft, RA, Burdette, JH. An automated method for neuroanatomic and cytoarchitectonic atlas-based interrogation of fMRI data sets. *Neuroimage*. 2003; 19: 1233-9.

Mataix-Cols, D, Cullen, S, Lange, K, Zelaya, F, Andrew, C, Amaro, E, Brammer, MJ, Williams, SC, Speckens, A, Phillips, ML. Neural correlates of anxiety associated with obsessive-compulsive symptom dimensions in normal volunteers. *Biol Psychiatry*. 2003; 53: 482-93.

Mataix-Cols, D, Wooderson, S, Lawrence, N, Brammer, MJ, Speckens, A, Phillips, ML. Distinct neural correlates of washing, checking, and hoarding symptom dimensions in obsessive-compulsive disorder. *Arch Gen Psychiatry*. 2004; 61: 564-76.

Matthews, SC, Paulus, MP, Simmons, AN, Nelesen, RA, Dimsdale, JE. Functional subdivisions within anterior cingulate cortex and their relationship to autonomic nervous system function. *Neuroimage*. 2004; 22: 1151-6.

McDonald, AJ. Is there an amygdala and how far does it extend? An anatomical perspective. *Ann N Y Acad Sci*. 2003; 985: 1-21.

McGlynn, FD, Smitherman, TA, Hammel, JC, Lazarte, AA. Component fears of claustrophobia associated with mock magnetic resonance imaging. *J Anxiety Disord*. 2007; 21: 367-80.

McKie, S, Del-Ben, C, Elliott, R, Williams, S, del Vai, N, Anderson, I, Deakin, JF. Neuronal effects of acute citalopram detected by pharmacofMRI. *Psychopharmacology (Berl)*. 2005; 180: 680-6.

Mechelli, A, Price, CJ, Noppeney, U, Friston, KJ. A dynamic causal modeling study on category effects: bottom-up or top-down mediation? *J Cogn Neurosci*. 2003; 15: 925-34.

Meredith, GE, Baldo, BA, Andrezjewski, ME, Kelley, AE. The structural basis for mapping behavior onto the ventral striatum and its subdivisions. *Brain Struct Funct.* 2008; 213: 17-27.

Mériaux, K, Wartenburger, I, Kazzner, P, Prehn, K, Villringer, A, van der Meer, E, Heekeren, HR. Insular activity during passive viewing of aversive stimuli reflects individual differences in state negative affect. *Brain and Cognition.* 2009; 69: 73-80.

Miguel-Hidalgo, JJ, Rajkowska, G. Morphological brain changes in depression: can antidepressants reverse them? *CNS Drugs.* 2002; 16: 361-72.

Moll, J, de Oliveira-Souza, R, Eslinger, PJ, Bramati, IE, Mourao-Miranda, J, Andreiuolo, PA, Pessoa, L. The neural correlates of moral sensitivity: a functional magnetic resonance imaging investigation of basic and moral emotions. *J Neurosci.* 2002; 22: 2730-6.

Norbury, R, Mackay, CE, Cowen, PJ, Goodwin, GM, Harmer, CJ. The effects of reboxetine on emotional processing in healthy volunteers: an fMRI study. *Mol Psychiatry.* 2007;

Norbury, R, Mackay, CE, Cowen, PJ, Goodwin, GM, Harmer, CJ. Short-term antidepressant treatment and facial processing. Functional magnetic resonance imaging study. *Br J Psychiatry.* 2007; 190: 531-2.

Northoff, G, Heinzl, A, Bempohl, F, Niese, R, Pfennig, A, Pascual-Leone, A, Schlaug, G. Reciprocal modulation and attenuation in the prefrontal cortex: an fMRI study on emotional-cognitive interaction. *Hum Brain Mapp.* 2004; 21: 202-12.

Ogawa, S, Lee, TM, Kay, AR, Tank, DW. Brain magnetic resonance imaging with contrast dependent on blood oxygenation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87: 9868-72.

Onur, OA, Walter, H, Schlaepfer, TE, Rehme, AK, Schmidt, C, Keysers, C, Maier, W, Hurlmann, R. Noradrenergic enhancement of amygdala responses to fear. *Soc Cogn Affect Neurosci.* 2009; nsn049.

Papez, JW. A proposed mechanism of emotion. *Arch Neurol Psychiatry.* 1937; 38: 725-43.

Phan, KL, Wager, T, Taylor, SF, Liberzon, I. Functional neuroanatomy of emotion: a meta-analysis of emotion activation studies in PET and fMRI. *Neuroimage.* 2002; 16: 331-48.

Phillips, ML, Drevets, WC, Rauch, SL, Lane, R. Neurobiology of emotion perception I: The neural basis of normal emotion perception. *Biol Psychiatry.* 2003; 54: 504-14.

Phillips, ML, Ladouceur, CD, Drevets, WC. A neural model of voluntary and automatic emotion regulation: implications for understanding the pathophysiology and neurodevelopment of bipolar disorder. *Mol Psychiatry*. 2008; 13: 829, 33-57.

Phillips, ML, Marks, IM, Senior, C, Lythgoe, D, O'Dwyer, AM, Meehan, O, Williams, SC, Brammer, MJ, Bullmore, ET, McGuire, PK. A differential neural response in obsessive-compulsive disorder patients with washing compared with checking symptoms to disgust. *Psychol Med*. 2000; 30: 1037-50.

Phillips, ML, Williams, LM, Heining, M, Herba, CM, Russell, T, Andrew, C, Bullmore, ET, Brammer, MJ, Williams, SC, Morgan, M, Young, AW, Gray, JA. Differential neural responses to overt and covert presentations of facial expressions of fear and disgust. *Neuroimage*. 2004; 21: 1484-96.

Posse, S, Shen, Z, Kiselev, V, Kemna, LJ. Single-shot T(2)* mapping with 3D compensation of local susceptibility gradients in multiple regions. *Neuroimage*. 2003; 18: 390-400.

Ribeiro, RL. Avaliação de relatos subjetivos e de alterações fisiológicas a estímulos do "International Affective Picture System" (IAPS) em estudantes universitários brasileiros [Doutorado]. Sao Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2003.

Roberts, GM, Newell, F, Simoes-Franklin, C, Garavan, H. Menstrual cycle phase modulates cognitive control over male but not female stimuli. *Brain Res.* 2008; 1224: 79-87.

Robertson, B, Wang, LH, Diaz, MT, Aiello, M, Gersing, K, Beyer, J, Mukundan, S, McCarthy, G, Doraiswamy, PM. Effect of bupropion extended release on negative emotion processing in major depressive disorder: A pilot functional magnetic resonance imaging study. *Journal of Clinical Psychiatry.* 2007; 68: 261-7.

Rupp, HA, James, TW, Ketterson, ED, Sengelaub, DR, Janssen, E, Heiman, JR. Neural activation in the orbitofrontal cortex in response to male faces increases during the follicular phase. *Horm Behav.* 2009;

Sadock, BJ, Sadock, VA, Kaplan, HI. Kaplan & Sadock's comprehensive textbook of psychiatry editors, Benjamin J. Sadock, Virginia A. Sadock. 8th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2004.

Sah, P, Faber, ES, Lopez De Armentia, M, Power, J. The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiol Rev.* 2003; 83: 803-34.

Salzman, C, Wolfson, AN, Schatzberg, A, Looper, J, Henke, R, Albanese, M, Schwartz, J, Miyawaki, E. Effect of fluoxetine on anger in symptomatic volunteers with borderline personality disorder. *J Clin Psychopharmacol.* 1995; 15: 23-9.

Saxena, S, Brody, AL, Ho, ML, Alborzian, S, Maidment, KM, Zohrabi, N, Ho, MK, Huang, SC, Wu, HM, Baxter, LR, Jr. Differential cerebral metabolic changes with paroxetine treatment of obsessive-compulsive disorder vs major depression. *Arch Gen Psychiatry*. 2002; 59: 250-61.

Sergerie, K, Chochol, C, Armony, JL. The role of the amygdala in emotional processing: a quantitative meta-analysis of functional neuroimaging studies. *Neurosci Biobehav Rev*. 2008; 32: 811-30.

Shapira, NA, Liu, Y, He, AG, Bradley, MM, Lessig, MC, James, GA, Stein, DJ, Lang, PJ, Goodman, WK. Brain activation by disgust-inducing pictures in obsessive-compulsive disorder. *Biol Psychiatry*. 2003; 54: 751-6.

Simmons, A, Strigo, I, Matthews, SC, Paulus, MP, Stein, MB. Anticipation of aversive visual stimuli is associated with increased insula activation in anxiety-prone subjects. *Biol Psychiatry*. 2006; 60: 402-9.

Stein, MB, Simmons, AN, Feinstein, JS, Paulus, MP. Increased amygdala and insula activation during emotion processing in anxiety-prone subjects. *Am J Psychiatry*. 2007; 164: 318-27.

Sundblad, C, Modigh, K, Andersch, B, Eriksson, E. Clomipramine effectively reduces premenstrual irritability and dysphoria: a placebo-controlled trial. *Acta Psychiatr Scand*. 1992; 85: 39-47.

Surguladze, SA, Brammer, MJ, Young, AW, Andrew, C, Travis, MJ, Williams, SC, Phillips, ML. A preferential increase in the extrastriate response to signals of danger. *Neuroimage*. 2003; 19: 1317-28.

Swanson, LW. The amygdala and its place in the cerebral hemisphere. *Ann N Y Acad Sci*. 2003; 985: 174-84.

Takahashi, H, Yahata, N, Koeda, M, Takano, A, Asai, K, Suhara, T, Okubo, Y. Effects of dopaminergic and serotonergic manipulation on emotional processing: a pharmacological fMRI study. *Neuroimage*. 2005; 27: 991-1001.

Thorpe, S, Salkovskis, PM, Dittner, A. Claustrophobia in MRI: the role of cognitions. *Magn Reson Imaging*. 2008; 26: 1081-8.

Tse, WS, Bond, AJ. Reboxetine promotes social bonding in healthy volunteers. *J Psychopharmacol*. 2003; 17: 189-95.

van Wingen, GA, Zylicz, SA, Pieters, S, Mattern, C, Verkes, RJ, Buitelaar, JK, Fernandez, G. Testosterone increases amygdala reactivity in middle-aged women to a young adulthood level. *Neuropsychopharmacology*. 2009; 34: 539-47.

Vogt, BA, Vogt, L, Farber, NB, Bush, G. Architecture and neurocytology of monkey cingulate gyrus. *J Comp Neurol*. 2005; 485: 218-39.

Walsh, ND, Williams, SCR, Brammer, MJ, Bullmore, ET, Kim, J, Suckling, J, Mitterschiffthaler, MT, Cleare, AJ, Pich, EM, Mehta, MA, Fu, CHY. A longitudinal functional magnetic resonance imaging study of verbal working memory in depression after antidepressant therapy. *Biological Psychiatry*. 2007; 62: 1236-43.

Weis, S, Hausmann, M, Stoffers, B, Vohn, R, Kellermann, T, Sturm, W. Estradiol modulates functional brain organization during the menstrual cycle: an analysis of interhemispheric inhibition. *J Neurosci*. 2008; 28: 13401-10.

Weissman, MM, Wickramaratne, P, Adams, P, Wolk, S, Verdelli, H, Olfson, M. Brief screening for family psychiatric history: the family history screen. *Arch Gen Psychiatry*. 2000; 57: 675-82.

Whalley, MG, Rugg, MD, Smith, AP, Dolan, RJ, Brewin, CR. Incidental retrieval of emotional contexts in post-traumatic stress disorder and depression: an fMRI study. *Brain Cogn*. 2009; 69: 98-107.

Wong, DF, Tauscher, J, Grunder, G. The Role of Imaging in Proof of Concept for CNS Drug Discovery and Development. *Neuropsychopharmacology*. 2009; 34: 187-203.

Wright, CI, Fischer, H, Whalen, PJ, McInerney, SC, Shin, LM, Rauch, SL. Differential prefrontal cortex and amygdala habituation to repeatedly presented emotional stimuli. *Neuroreport*. 2001; 12: 379-83.

APÊNDICE

Artigo relacionado a tese aceito para publicação no *Journal of Psychopharmacology*.

Neural activity changes to emotional stimuli in healthy individuals under chronic use of clomipramine

Jorge Renner Cardoso de Almeida^{A,B}; MD

Mary L Phillips^B; MD

Carlos Toledo Cerqueira^A; MD

Monica Zilberman^A; MD

Daniela Lobo^A; MD

Elaine Henna^A; MD

Hermano Tavares^A; MD

Edson Amaro Junior^D; MD

Clarice Gorenstein^{A,C}; PhD

Valentim Gentil^A; MD

Geraldo F. Busatto^A; MD

Affiliation:

A= Departamento de Psiquiatria, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Brasil

B= Department of Psychiatry, University of Pittsburgh School of Medicine,
Pittsburgh, PA, USA

C= Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas,
Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

D= Departamento de Radiologia, Faculdade de Medicina, Universidade de
São Paulo, Brasil.

Running title: Clomipramine Trial in Healthy Volunteers using fMRI

Correspondent Author:

Name: Geraldo Busatto Filho
Address: Centro de Medicina Nuclear
Rua Ovídio Pires Campos, s/n
CEP 05403-903 - São Paulo - SP -Brazil
Phone/FAX: -55-11-3082 1015
Email address: geraldo.busatto@hcnet.usp.br

Keywords: MRI, Functional; Antidepressive Agents, Tricyclic;
Clomipramine; Emotions; healthy subjects

Disclosure/Conflict of Interest

This study was supported by a grant from the 'Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo' (FAPESP-Brazil; 01/00189-9).

JRCA was supported by "Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior"(CAPES-Brazil; 190105-2)

ABSTRACT:

Objective: Previous functional magnetic resonance imaging (fMRI) studies examined neural activity responses to emotive stimuli in healthy individuals after acute/subacute administration of antidepressants. We now report the effects of repeated use of the antidepressant clomipramine on fMRI data acquired during presentation of emotion-provoking and neutral stimuli on healthy volunteers.

Methods: Twelve volunteers were evaluated with fMRI after receiving low doses of clomipramine for four weeks, and again after four weeks of washout. Fear-, happiness-, anger-provoking and neutral pictures from the IAPS were used. Data analysis was conducted with statistical parametric mapping ($p < 0.05$).

Results: Paired t-test comparisons for each condition between medicated and unmedicated states showed, to negative valence paradigms, decrease brain activity in the amygdala when participants were medicated. We also demonstrated, across both positive and negative valence paradigms, consistent brain activity decreases in the medicated state in the anterior cingulate gyrus and insula.

Discussion: This is the first report of modulatory effects of repeated antidepressant use on the central representation of somatic states in response to emotions of both negative and positive valence in healthy individuals. Also, our results corroborate findings of antidepressant-induced temporolimbic activity changes to emotion-provoking stimuli obtained in studies of subjects treated acutely with such agents.

INTRODUCTION

The serotonin (5-HT) and noradrenaline (NA) transmitter systems are critical for the development of normal social behavior. Their efferent neurons project to several brain regions involved in emotional processing in healthy individuals: the amygdala, the ventral striatum, the orbitofrontal and visual cortical areas (implicated in the evaluation of emotionally-salient stimuli and generation of emotional states), the ventral anterior cingulate cortex and the insula (involved in the central mapping of autonomic and visceral reactions associated with emotions), the hippocampus, the dorsal anterior cingulate, and the dorsolateral prefrontal cortices (regulating emotional behaviors)(Phillips et al. 2003; Critchley 2005; Phillips et al. 2008).

To date, many studies have shown functional abnormalities in the brain regions involved in emotional processing of negative and positive emotionally-salient stimuli in unipolar depression (Siegle 1999; Sheline et al. 2001; Fu et al. 2004; Keedwell et al. 2005; Keedwell et al. 2005; Surguladze et al. 2005; Schaefer et al. 2006; Siegle et al. 2006). Subjects with unipolar depression have shown normalization of neural activity after response to antidepressant drugs acting as 5-HT reuptake inhibitors (SRIs) and/or NA reuptake inhibitors (NRIs)(Mayberg et al. 2000; Kennedy et al. 2001; Fu et al. 2004; Canli et al. 2005; Schaefer et al. 2006). In such studies, however, the detection of the direct neural mechanism by which SRIs/NRIs mediate their antidepressant effects was confounded by the significant changes in

mood which might influence activity of brain regions involved in emotional processing.

Understanding the effects of 5-HT/NA augmentation upon activity in the above neural system can be facilitated by examining the effect of such medication in healthy individuals without family history of psychiatric disorders. Acute, intravenous administration of a SRI (citalopram) to healthy individuals has been associated with increased recognition of fear and happy facial expressions (Harmer et al. 2002), whereas sub-acute (seven-day) oral administration of citalopram or a NRI (reboxetine) has been associated with reduced fear and anger recognition and enhanced positive stimuli recall (Harmer et al. 2004). Regarding direct effects upon neural activity, acute administration of a SRI (citalopram) has been associated with increased amplitude of visual evoked potentials in parieto-occipital areas to pleasant scenes and suppressed responses in frontal and occipital regions to unpleasant scenes (Kemp et al. 2004). In addition, in recent functional magnetic resonance imaging (fMRI) studies acute administration of a SRI (citalopram) has been associated with increased resting activity in amygdala, striatum, thalamus and hippocampus (McKie et al. 2005); with attenuated ventrolateral prefrontal cortical and amygdalar responses to aversive faces (Del-Ben et al. 2005), and, in one study, with increased amygdala activity when processing faces (Bigos et al. 2008). Acute administration of a SRI (fluvoxamine) has been associated with decreased amygdalar response to aversive compared with neutral stimuli (Takahashi et al. 2005). Also,

seven-day administration of citalopram has been associated with decreased amygdalar, hippocampal and medial frontal activity to fearful faces (Harmer et al. 2006). Similarly, seven-day administration of reboxetine has been shown to provoke reduced amygdalar responses to fear-provoking faces (Norbury et al. 2007). These findings suggest that 5-HT/NA reuptake inhibiting antidepressants may attenuate the activity in subcortical limbic neural regions to a higher degree when in presence of negative emotional stimuli compared to positive emotional stimuli.

The above findings need to be interpreted in the light of some limitations. First, the studies have not examined neural activity responses to emotive stimuli in healthy individuals after several weeks of sustained 5-HT and/or NA re-uptake inhibition, which more closely parallels the clinical uses of antidepressants in unipolar depression and anxiety disorders. Second, previous fMRI studies used paradigms requiring passive viewing or identification of emotion in emotional displays, rather than paradigms that more closely resemble the emotion and cognitive processes involved in social interactions, namely, the appraisal of, and empathic response to, more complex emotionally-salient stimuli. The latter paradigms may be more appropriate to examine the putative neural mechanisms mediating antidepressant response.

The present fMRI study sought to compare fMRI data acquired during presentation of emotion-provoking (happiness, fear and anger) and neutral

stimuli among healthy volunteers during 4-week administration of the 5HT/NE re-uptake inhibitor clomipramine (medicated status) and after 4-week of clomipramine washout (unmedicated status). We hypothesized that:

1. There would be decrease amygdala activity after repeated clomipramine use in response to negative stimuli;
2. There would be no change or increased neural response in the amygdala after repeated clomipramine use in response to positive stimuli;
3. Repeated clomipramine use would engage other brain regions involved in emotion processing in response to positive and negative stimuli.

METHODS

Subjects

Twelve healthy individuals [3 males and 9 females, mean age = 33.5 years (SD=6.9), mean education = 11.1 years (SD=0.7)] were selected from a larger sample included in a controlled drug trial conducted at the Institute of Psychiatry of São Paulo, Brazil. This study aimed at investigating whether low doses of clomipramine had an effect on mood improvement in healthy subjects (Gentil et al. 2007). Healthy subjects were recruited through newspaper and radio advertisements, and were screened by a team of experienced psychiatrists using the Structured Clinical Interview for Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (First et al. 1995).

Subjects did not have either first-degree family history of psychiatric disorders including psychosis, recurrent mood disorders and substance dependence, as assessed by the Family History Screen (Weissman et al. 2000). As part of the drug trial, clomipramine was gradually increased according to subject tolerance to up 40Mg/day over 2 weeks and maintained thereafter for an additional period of 2 weeks (mean clomipramine dose 37.5Mg/day – SD=4.5). Subjects were followed weekly for subjective changes in emotional response to every day stimuli. Side-effects (mainly constipation, dry mouth and sexual dysfunction) were present in few subjects and considered mild. No volunteer dropped-out due to any of these complains. ***Only subjects showing no subjective mood change to clomipramine*** (as assessed every week blindly by two psychiatrists) (Gentil et al. 2007), and who were right-handed according to the Edinburgh Handedness Inventory were included in this study. Exclusion criteria were: (a) current age greater than 50 or lower than 21 years; (b) current or previous history of neurological and/or general medical conditions, as assessed by non-structured clinical interviewing, physical examination, electrocardiogram and blood/urinary work-up; (c) current use of other drugs psychoactive effects; (d) and for female subjects, history of pregnancy or lactation during the past six months.

Local ethical committees approved the study and all participants signed a written informed consent forms.

Experimental Paradigm

We used the following stimuli: 45 pictures from the International Affective Picture System (IAPS)(Lang et al. 1997) added by 3 pictures obtained from internet versions of local newspapers, divided in three sets with different emotional content (fear, happiness or anger); and 27 pictures of neutral scenes from the IAPS. The selection of happiness-inducing pictures was restricted to the excited (rather than relaxed) kind, in order to minimize the possibility of major decrements in the level of arousal elicited by happiness-provoking stimuli compared to the fear- and anger-inducing pictures. All pictures were presented via a mirror mounted on the head coil of the fMRI scanner.

Three, 5-minute experiments (order counterbalanced across subjects) were carried out during fMRI acquisition, each consisting of a block design paradigm, with five blocks of one type of emotion (fear, anger or happiness) alternated with three blocks of neutral pictures. Before the experiments, subjects were instructed to imagine themselves in the situations while looking at the pictures. Each block comprised three pictures (each presented for 7.5s, with no inter-stimuli interval), all with the same emotional content (fear, anger, happiness or neutral). The themes for each picture set were the same, involving respectively: accidents, natural phenomena, dangerous animals and dentist for the fear blocks; adventure scenes and soccer for the happiness-aroused blocks; observational view of threatening situations or

revolting situations for the anger blocks; and personal objects and domestic utilities for the neutral blocks. Stimuli presentation was immediately preceded by a statement shown visually on a black background (for 5s); this strategy was aimed at directing the subject toward experiencing one of the three specific emotions, thus enhancing the desired emotional response. For example, for a block of three fear stimuli including a gun, a thief and a robbery, the instruction was “you are being robbed”.

After each 3-picture set, subjective self-ratings (for fear, anger, happiness and arousal) were obtained over a period of 20s using discretized scales presented visually, in pseudo-randomized order. For each scale, individuals quantified the intensity of the emotional experience as follows: 1. almost nothing, 2. a little, 3. moderate, 4.intense.

In order to confirm that each set of pictures and its associated cue sentence would elicit the desired emotion in a specific fashion, an off-scanner validation study was carried out previously with 156 undergraduate students (91 men and 65 women) at the same university where the current imaging study was conducted (Tavares et al, submitted). A larger pool of pictures were rated using the same four scales cited above. The final sets of three pictures selected for the fMRI study were matched across emotional conditions (happiness, fear or anger) with regard to the mean arousal scores and mean intensity of the key emotion obtained in the off-scanner study.

Also, the emotion-provoking sets of pictures were matched to the neutral pictures in regard to their degree of visual complexity.

Occasions of Data Acquisition

Each subject participated in the above imaging experiment on two occasions: (1 - medicated) after a 4-week repeated use of low doses of clomipramine (mean dose 37.5Mg/day) and (2 - unmedicated) after a 4-week period of washout. A simulated session was performed in the week prior to the medicated state scan using a mock scanner that replicated the MRI environment, in order to habituate each subject to the fMRI procedure. In this sham session, each subject was trained to use the response glove, and became used to the paradigm projection, gradient noise and room temperature. During the fMRI session, no subject presented side effects impeditive of successful realization of the scan.

Image Acquisition

Gradient-echo imaging was used to acquire T2*-weighted image volumes using a 1.5 Tesla GE (Milkwalkee, USA) signa LX v8.3 gradient of 23mT/m, in the Institute of Radiology at the FMUSP. For each of the 152 brain volumes, twenty-five axial planes parallel to the AC-PC plane were collected with the following parameters: TR 2500 ms, TE 40ms, slice thickness: 5 mm, 0.7 mm gap, FOV 240 mm and matrix 64X64. In addition, a high-resolution

three-dimensional structural axial SPGR sequence was acquired (TE: 4.2ms, TI: 400ms, TR: 10.5ms, flip angle 15°, FOV: 240mm, slice thickness: 1.6mm - zero filled to 0.8mm, matrix: 256x256, 232 slices). Image acquisition, stimulus presentation and subjects' response were synchronized via an optical-electrical trigger based on the RF signal used to excite each image slice.

Behavioral Data Analysis

Planned comparison using paired t-tests were calculated contrasting scale scores between the medicated and unmedicated states for each condition (emotional or neutral pictures) in each of the three paradigms.

Image Analysis

Data were pre-processed and analyzed using statistical parametric mapping software (SPM5; www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm). Data for each participant were initially realigned using the first brain volume acquired as a reference, and unwarped to correct for static inhomogeneity of the magnetic field and movement by inhomogeneity interactions. They were then co-registered with the subjects structural brain dataset, segmented/normalized to the standard Montreal Neurological Institute template (Ashburner and Friston 2005), resampled to 2x2x2 mm³ voxels, and spatially smoothed with a Gaussian kernel of 6-mm full-width at half-maximum. The time-series in each voxel

were high pass-filtered to 1/128 Hz. Images from one subject during the Fear paradigm were not available due to technical problems during data acquisition. The structural dataset was always co-registered with the functional images acquired during the same session.

A single-subject, first-level fixed effect model was constructed with emotion and neutral pictures as separate conditions in a block design, using the period of visual scale presentation and responses as baseline in the design matrix. Movement parameters from the realignment stage were entered as a covariate of no interest to further control for subject movement. Trials were modeled using the Canonical Haemodynamic Response Function (Friston 2007). The two conditions were then entered into the second-level analyses using the relevant t-contrast images (emotional pictures > baseline and neutral pictures > baseline).

A group analysis was conducted on the t-contrasts generated in the previous single-subject analyses using planned comparisons (paired t-test) to compare each condition (either emotional pictures or neutral pictures) at time 1 (medicated state) with the analogous condition in time 2 (unmedicated state). Paired t-testing has been used in previous neuroimaging studies investigating the effect of psychotropic medications on brain functioning (Hariri et al. 2002; Aizenstein et al. 2008).

Region of Interest (ROI) Analyses

A priori regions of interest were targeted using anatomical masks created with the Wake Forest University (WFU) Pick Atlas (Maldjian et al. 2003). To control for multiple statistical testing we maintained conservative threshold with a cluster-level false positive detection rate at $p < 0.05$ by using a voxel threshold of $p < 0.05$ with a cluster (k) extent empirically determined by Monte Carlo simulations implemented in AlphaSim, which accounted for spatial correlations between BOLD signal changes in neighboring voxels (Forman et al. 1995; Gianaros et al. 2008). We first accessed neural response in the amygdala. Sequentially, we explored regions involved in emotion processing as follows: ventrolateral prefrontal cortex (vlPFC - BA47), dorsolateral prefrontal cortex (DLPFC – BA9 and 46), ventromedial prefrontal cortex (vmPFC - BA11), dorsomedial prefrontal cortex (mPFC - medial region of BA10), anterior cingulate gyrus (ACG - BA24, 25 and 32), hippocampus, parahippocampal gyrus, insula, caudate, thalamus and putamen.

RESULTS

Behavioral Data – Subjective State Ratings

There was no significant difference in the mean scores for each scale between medicated and unmedicated states, with the exception of trends

toward greater arousal scores in the medicated state during the presentation of neutral pictures in the Happiness and Fear paradigms ($p=0.081$ and $p=0.095$ respectively), and greater anger scale scores in the medicated state during the presentation of anger-provoking pictures ($p=0.065$) (Table 1).

INSERT TABLE 1 HERE

Functional Neuroimaging Results

During emotion induction in the Happiness paradigm, ROI paired t-tests did not detect significant activity changes in the right or left amygdala. Exploratory analyses revealed significant reductions in brain activity in the right insula, right and left caudate body, right and left ACG (BA24 and 32), right vmPFC (BA11), left mPFC (BA10) and left putamen when subjects were medicated relative to not medicated (Table 2a; Figure 1). There were no statistical increases in the BOLD effect during the Happiness paradigm when we compared the medicated state (clomipramine) with the unmedicated state (washout) using ROI approach. There were no differences in brain activity (at $p<0.05$) between the medicated relative to not medicated state during presentation of the neutral pictures.

INSERT TABLE 2a HERE

Emotion induction in the Fear Paradigm, using paired t-test comparisons, revealed decreased activity in the left amygdala when subjects were

medicated. We also observed decreased activity in the right amygdala during visualization of neutral pictures when subjects were medicated. Exploratory analyses revealed significant reduction in brain activity in the right and left insula, right putamen, right parahippocampal gyrus, right thalamus, right and left DLPFC (BA9/46), left vIPFC (BA47), when subjects were medicated relative to not medicated. To neutral pictures, decreased activity was found in the left ACG (BA24)(Table 2b, Figure 1); however an increase in activity was found in the vmPFC (BA11) when subjects were medicated relative to not medicated.

INSERT TABLE 2b HERE

Finally, during emotion induction in the Anger paradigm, paired t-tests comparisons showed reduced activity in the right amygdala. Exploratory analyses revealed significant activity reduction when subjects were medicated relative to not medicated in the left and right insula, right and left thalamus, left and right caudate, right and left ACG (BA24/BA32), right and left vIPFC (BA47), right and left DLPFC (BA09/46), left hippocampus, right and left parahippocampal gyrus, right and left putamen (Table 2c, Figure 1). To neutral pictures, BOLD signal was reduced in the bilateral insula in the medicated relative to the unmedicated state (Table 2c).

INSERT TABLE 2c HERE

INSERT FIG. 1 HERE

DISCUSSION

This fMRI study evaluated the neural responses to visually presented emotional stimuli in healthy subjects during 4-week of repeated use of low doses of clomipramine (mean 37.5 Mg/day) and after a 4-week washout period. Healthy subjects had no personal or family history of psychiatric disorders, and showed ***no detectable subjective changes in mood or emotional reactivity to everyday stimuli under repeated use of clomipramine***. We were able to replicate previous findings of reduction of amygdala activity after antidepressant use in response to negative stimuli. However, our analysis did not find change in amygdala activity in response to positive stimuli. Although there were some degree of variability in the specific locations of emotion-related neural activity changes across the three emotion-provoking paradigms employed (happiness, fear and anger), we identified a consistent pattern of regionally decreased activity after repeated clomipramine use. The decreased activity occurred in neural regions implicated in the processing of emotional stimuli in healthy individuals, such as the parahippocampal gyrus, anterior cingulate gyrus, insula, subcortical nuclei (striatum and thalamus), and prefrontal cortex (Phillips et al. 2003; Phillips et al. 2008). The healthy subjects in the study showed no detectable subjective changes in mood or emotional reactivity to everyday stimuli under repeated use of clomipramine. Thus, the reduced BOLD signal during the

medicated state may reflect intrinsic pharmacological effects of clomipramine upon neural activity, rather than improvements in sub-clinical psychopathology or differences in emotional engagement of the subjects during the processing of visual emotion stimuli between two consecutive scanning sessions.

Our findings of decreased activity in amygdala after repeated clomipramine use during the Fear and Anger paradigm parallels previous studies in healthy volunteers. Studies of acute antidepressant use of citalopram revealed decrease amygdala response to aversive faces (Del-Ben et al. 2005). Moreover, decreased amygdala response was also demonstrated after acute fluvoxamine use in response to aversive faces (Takahashi et al. 2005). Finally, a reduction of amygdala activity after seven days use of citalopram and reboxetine was demonstrated after fearful faces (Harmer et al. 2006; Norbury et al. 2007). The consistent observation of reduction in the amygdala activity in acute, subacute and repeated antidepressant use is consistent with the idea of antidepressant effects in emotion appraisal rather than regulatory emotion processing mechanisms (Norbury et al. 2007). However, one study found increased activation in the amygdala after acute use of citalopram (Bigos et al. 2008). The contrasting findings are interesting and need replication. Moreover, studies in unipolar depression groups using sophisticated functional connectivity analysis methods, reported increased connectivity between amygdala and subgenual ACC, a regulatory area (Anand et al. 2007).

Interestingly, we did not find any significant change in the amygdala activity in response to positive stimuli. We might speculate a specific effect of antidepressant in the neural response only after negative stimuli. However, more studies using positive stimuli are necessary to replicate this finding.

Across the three emotion-provoking paradigms, the brain regions with the most significant activity differences between the medicated and the unmedicated state were the anterior cingulate gyrus, putamen and insula. These three regions have been implicated in the brain network critical for the mediation of emotional responses to emotional stimuli (Phillips et al. 2008; Critchley 2005). In particular, the anterior cingulate gyrus and insula areas are thought to be relevant to the cortical mapping of information pertaining to bodily responses that accompany emotional reactions (Drevets et al. 1997; Craig 2002; Critchley 2005), while the putamen is involved with reward behavior (Forbes et al. 2008). Furthermore, the anterior cingulate gyrus has been implicated in the generation of changes in autonomic arousal, and the insula is thought to play a key role in the central representation of internal visceral responses during emotional processing (Bechara et al. 1997). In addition, the putamen has been implicated in emotional appraisal and identification (Phillips et al. 2008). Contemporary theories propose that the central mapping of such emotion-based somatic markers is crucial to the guiding of decisions and behaviors in complex situations, consciously or unconsciously (Del-Ben et al. 2005; Harmer et al. 2006; Norbury et al. 2007).

Curiously, we found reductions in brain activity in response to negative stimuli (Fear and Anger paradigm) but not to positive stimuli in dorso- and ventro-lateral prefrontal cortical regions. These regions are known to be involved with regulation of behavior and emotion. The use of sophisticated analysis determining the function integration between these regions might help to elucidate the effect of antidepressants in the regulatory process and coupling between the subcortical regions and the prefrontal cortex.

To our knowledge, this is the first study reporting significant activity decrements in the insula and anterior cingulate gyrus in healthy subjects after repeated clomipramine use (4 weeks). Previous fMRI studies on healthy subjects during the presentation of emotion-inducing stimuli have examined the changes in neural activity following only acute (single dose) or subacute (seven days) administration of 5-HT/NA re-uptake inhibiting drugs (Del-Ben et al. 2005; Harmer et al. 2006; Norbury et al. 2007; Bigos et al. 2008; Takahashi et al. 2005). Thus, our findings suggest that a sustained 5-HT/NA re-uptake inhibition (4 weeks) may induce changes in regions involved in the central representation of emotion-related autonomic and visceral responses. Since the subjects in the study were selected with exclusion criteria of vulnerability to depressive, anxiety or other mental disorders (they had neither personal nor familiar history of any psychiatric disorders), our findings suggest an intrinsic capacity of clomipramine to

modify brain activity patterns involved in the normal processing of emotional responses, irrespectively of pathological mood features.

Although the duration of clomipramine treatment in this study is close to the latency for antidepressants effects of this drug, the low doses and the absence of anxiety or depressive psychopathology limit the extrapolation of the current findings to clinical states. Nevertheless, one could tentatively take our findings as suggestive that treatment-induced modifications in the processing of emotion-related bodily information are relevant to the mediation of the clinical efficacy of antidepressant drugs. This is consistent with the proposed role of the anterior cingulate gyrus as a *surrogate* biomarker of antidepressant treatment response, as indicated in previous neuroimaging studies of major depressed patients evaluated before and after antidepressant treatment (Fraguas et al. 2007). Moreover, there is evidence that the intensity of autonomic responses during the processing of emotion-provoking stimuli in unmedicated major depressed patients predicts depressive symptom improvement after chronic antidepressant treatment (Fu et al. 2004).

It is noteworthy that as other tricyclic antidepressants with SNRI properties, clomipramine displays high affinity to histaminergic H₁, α_1 -adrenergic, 5-HT_{2A} and muscarinic postsynaptic receptors (Marcourakis et al. 1993). Therefore, the differences observed in emotion-related neural activity between

medicated and non-medicated states may be due to the effect of clomipramine on one or more of those postsynaptic receptor sites.

The choice of clomipramine for this experiment was based on our group's previous experiments showing that it is clinically effective in doses lower than those usually recommended for major depression, and therefore is likely to decrease unwanted side-effects that could mask the more subtle effects on normal mood regulation (Lotufo-Neto et al. 2001). Indeed, clomipramine is highly efficacious in relatively low doses in panic disorder (Wijkstra et al. 2006) Also, its antidepressant efficacy may be higher than that of non-tricyclic antidepressants in severe depression (Gillman 2007). Moreover, low doses of clomipramine, such as 10Mg, has been demonstrated to occupy 80% of 5-HT transporter, similar with the occupation pattern of more selective inhibitors in clinical doses, (20-40Mg of fluoxetine occupy 80% of the 5-HT transporter)(Wong et al. 2008). Finally, pharmacological studies using animal tissue or human cloned receptors have shown that clomipramine displays strong, dual action both as 5-HT and NA reuptake inhibitor, fulfilling the criteria of a serotonin/noradrenaline reuptake inhibiting (SNRI) antidepressant even in greater conformity than the more recently marketed agents venlafaxine and duloxetine (Gillman 2007).

As we emphasized the detection of any patterns of changes in subjective mood under clomipramine use (and the exclusion from the present report of responders to this drug), we chose to use a fixed scanning order with the

first session under the medicated state. Therefore, it is possible that the findings were influenced by non-specific practice effects from the first, chronically medicated, to the second, not medicated, fMRI session. However, such practice effects are likely to have been minimized since all subjects underwent a simulated scan session one week prior to the medicated assessment. Moreover, previous studies have shown decreased activity in neural regions involved in emotional processing after repeated exposure to emotion-provoking stimuli, rather than the increase in neural activity seen in the post-treatment scan in our subjects. Therefore, the differences in activity in regions implicated in the representation of autonomic states may be related to the direct action of clomipramine, decreasing activity in those neural regions, rather than resulting from practice effects.

Our sample was not balanced in gender distribution and we did not control for possible influence of menstrual cycle phase in our female subsample. Other studies should replicate our finding assessing the menstrual cycle and/or study a larger sample with only females.

In conclusion, the findings of this study indicate that clomipramine, possibly by sustained 5-HT/NA re-uptake inhibition, reduces the central representation of somatic states in response to positive and negative emotional stimuli in healthy subjects. Our finding will inform future research on patients with major depression or panic/agoraphobia in order to clarify the

therapeutic effect of antidepressants on neural activity changes in regions involved in the processing of the somatic markers that accompany the generation of emotional states.

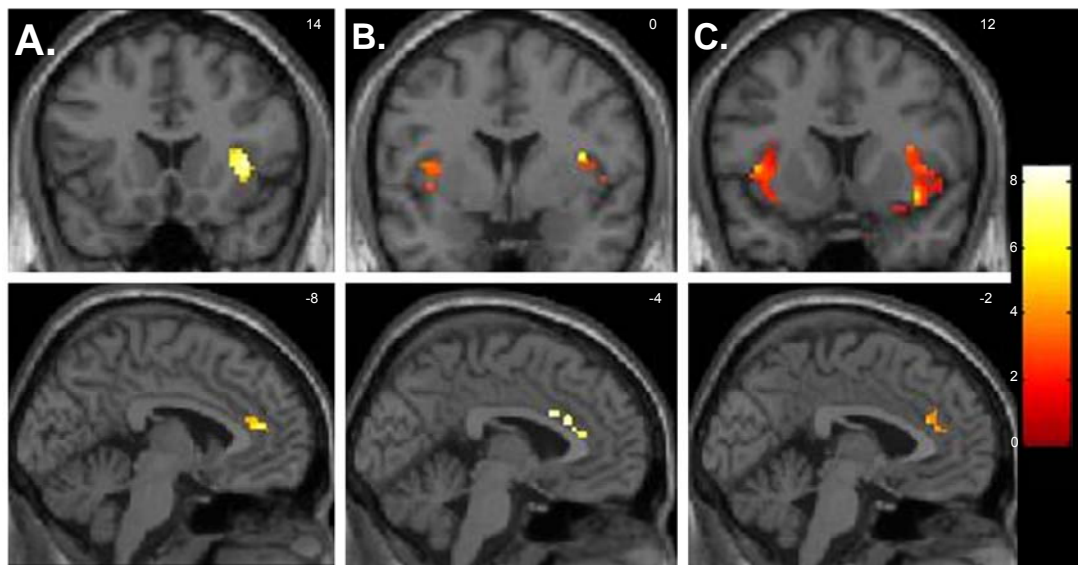


Fig.1 Selected regions of interest where there were foci of significantly decreased neural activity when healthy volunteers ($n=12$) were medicated versus unmedicated while viewing emotion-provoking paradigm (paired t -tests, $p<0.05$ corrected for multiple comparisons). Foci of significance were overlaid on coronal and sagittal brain slices spatially normalized into the Montreal Neurologic Institute coordinates system. A. Happiness paradigm; B. Fear paradigm and C. Anger paradigm. Significant differences were detected across the three emotion-provoking paradigms in the insula (shown on the sections on the superior side of the illustration), and in the anterior cingulate gyrus (shown on the inferior slices). Brain slices correspond to coronal view (superior panel) and sagittal view (inferior panel). Left side of the brain corresponds to the left side of the picture. The numbers at the right upper corner at each frame represent standard coordinates in the y (coronal view) and x (sagittal view) axis.

Table 1 – Subjective Self-rating Scores after Presentation of Emotional and Neutral Blocks of Pictures from the International Affective Picture System

Scales	Medicated status		Unmedicated status		Planned comparison			
	emotion (SD)	neutral (SD)	emotion (SD)	neutral (SD)	t	p	t	p
Happiness Paradigm								
Anger	1.05 (0.12)	1.03 (0.09)	1.07 (0.18)	1.11 (0.36)	-	0.79	-0.90	0.39
Arousal	2.83 (0.82)	1.97 (0.85)	2.77 (0.73)	1.64 (0.95)	0.37	0.72	1.91	0.08
Fear	1.82 (0.49)	1.03 (0.09)	1.82 (0.7)	1.05 (0.13)	0.05	0.96	-1.00	0.34
Happiness	2.72 (0.86)	1.75 (0.79)	2.87 (0.87)	1.75 (0.96)	1.06	0.31	<0.01	1.00
Fear Paradigm								
Anger	2.08 (0.58)	1.05 (0.13)	1.97 (0.65)	1.17 (0.3)	0.54	0.60	-1.48	0.17
Arousal	3.12 (0.78)	1.86 (0.96)	3.17 (0.82)	1.58 (0.83)	0.37	0.72	1.82	0.10
Fear	3.05 (0.8)	1.03 (0.09)	3.08 (0.75)	1.03 (0.09)	0.30	0.77	<0.01	1.00
Happiness	1.13 (0.27)	1.44 (0.64)	1.15 (0.23)	1.47 (0.72)	0.17	0.87	-0.13	0.90
Anger Paradigm								
Anger	2.72 (0.48)	1.36 (0.39)	2.68 (0.76)	1.08 (0.21)	0.16	0.87	2.06	0.06
Arousal	3.23 (0.73)	2.11 (0.88)	3.23 (0.85)	1.92 (0.88)	0.03	0.98	0.69	0.51
Fear	2.66 (0.83)	1.28 (0.4)	2.61 (0.74)	1.22 (0.29)	0.44	0.67	1.00	0.34
Happiness	1.02 (0.06)	1.53 (0.48)	1.08 (0.2)	1.64 (0.63)	1.08	0.30	-0.57	0.58

Values are means scores; SD = standard deviation;

Table2a: Anatomical Locations of the Planned Comparisons during Happiness Paradigm

Region	Side	MNI coordinates			K	T	z	p
		X	Y	Z				
Happy pictures								
Clomipramine < Washout								
vmPFC (BA11)	R	28	42	-8	26	3.38	2.74	0.003
Insula	R	40	14	8	77	3.43	2.77	0.003
	R	32	-26	10	67	2.76	2.35	0.009
Anterior Cingulate (BA24)	R	4	28	22	29	3.05	2.54	0.005
Anterior Cingulate (BA32)	L	-8	42	14	80	3.85	3	0.001
Caudate body	L	-16	-14	26	157	4.11	3.13	0.001
	R	16	-14	24	132	5.5	3.74	<0.001
medial PFC (BA10)	L	-16	42	14	32	3.19	2.63	0.004
Putamen	L	-14	2	10	66	2.34	2.07	0.019

vmPFC: ventromedial prefrontal cortex; R, right; L, left; BA, Brodmann area; Coordinates correspond to the stereotaxic array of Montreal Neurologic Institute; K: cluster size; PFC, prefrontal cortex

Table2b: Anatomical Locations of the Planned Comparisons during Fear Paradigm

Region	Side	MNI coordinates			K	T	z	p
		X	Y	Z				
Fear pictures								
Clomipramine < Washout								
vLPFC (BA47)	L	-32	16	-2	24	3.22	2.61	0.005
DLPFC (BA46)	L	-46	36	16	30	3.25	2.62	0.004
Amygdala	L	-28	-8	-12	12	2.83	2.37	0.009
Insula	L	-44	-16	18	97	5.06	3.49	<0.001
	R	38	0	14	186	6.46	3.97	<0.001
Parahippocampal Gyrus	R	20	-34	-14	184	6.2	3.89	<0.001
DLPFC (BA9)	R	42	22	36	47	2.69	2.28	0.011
	L	-52	2	36	24	3.62	2.83	0.002
Thalamus	R	20	-14	6	253	4.31	3.17	<0.001
Putamen	R	28	-16	-4	114	4.65	3.32	<0.001
Neutral pictures								
Clomipramine > Washout								
vmPFC (BA11)	L	-24	44	-6	8	2.22	1.96	0.025
Clomipramine < Washout								
Anterior Cingulate (BA24)	L	-4	22	22	24	2.55	2.19	0.014
Amygdala	R	28	-8	-14	65	3.58	2.81	0.002

vLPFC: ventrolateral prefrontal cortex DLPFC: dorsolateral prefrontal cortex; R, right; L, left; BA, Brodmann area; Coordinates correspond to the stereotaxic array of Montreal Neurologic Institute; K: cluster size; vmPFC, ventromedial prefrontal cortex

Table2c: Anatomical Locations of the Planned Comparisons during Anger Paradigm

Region	Side	MNI coordinates			K	T	z	p
		X	Y	Z				
Anger pictures								
Clomipramine < Washout								
vLPFC (BA47)	R	36	30	-2	22	3.49	2.8	0.003
	R	26	16	-12	42	3.29	2.7	0.004
	R	44	18	2	47	3.03	2.5	0.006
	L	-32	16	-12	72	8.49	4.6	<0.001
DLPFC (BA46)	R	42	36	16	53	4.15	3.2	0.001
Amygdala	R	28	-4	-16	61	3.02	2.5	0.006
Insula	L	-32	16	-10	529	6.62	4.1	<0.001
	L	-50	-38	20	66	2.73	2.3	0.01
	R	38	12	-10	82	4.78	3.4	<0.001
	R	32	14	12	524	4.34	3.3	<0.001
	R	42	-40	18	86	3.82	3	0.001
Anterior Cingulate (BA24)	R	4	30	24	35	3.61	2.9	0.002
	L	-2	32	18	41	2.82	2.4	0.008
Anterior Cingulate (BA32)	R	6	32	26	35	4.37	3.3	0.001
	L	-2	32	22	35	2.44	2.1	0.016
Parahippocampal Gyrus	R	16	-48	2	143	3.09	2.6	0.005
	L	-20	-34	-8	270	3	2.5	0.006
Hippocampus	L	-26	-36	-4	9	2.73	2.3	0.01
DLPFC (BA9)	R	4	46	28	37	3.45	2.8	0.003
	R	34	20	34	129	3.31	2.7	0.003
Thalamus	R	8	-22	-2	621	5.02	3.5	<0.001
	L	-18	-22	0	282	6.72	4.1	<0.001
Caudate body	R	8	12	8	173	6.02	3.9	<0.001
Caudate head	R	8	18	6	169	6.31	4.0	<0.001
	L	-8	6	0	64	2.65	2.3	0.011
Putamen	R	22	-2	0	552	5.4	3.7	<0.001
	L	-18	4	-8	256	4.33	3.2	0.001
Neutral pictures								
Clomipramine < Washout								
Insula	L	-40	-12	6	122	4.72	3.4	<0.001
	R	40	-20	6	72	4.56	3.3	<0.001

vLPFC: ventrolateral prefrontal cortex DLPFC: dorsolateral prefrontal cortex; Coordinates correspond to the stereotaxic array of Montreal Neurologic Institute; BA, Brodmann area; R, right; L, left; K: cluster size

Acknowledgments

We thank Antonio Cesário Cruz for technical assistance on the preparation of the devices for stimuli presentation and scale response recording, as well as for his continuing support during neuroimaging data acquisition.

References

- Aizenstein, H. J., M. A. Butters, M. Wu, L. M. Mazurkewicz, V. A. Stenger, P. J. Gianaros, J. T. Becker, C. F. Reynolds, 3rd and C. S. Carter (2008). Altered Functioning of the Executive Control Circuit in Late-Life Depression: Episodic and Persistent Phenomena. *Am J Geriatr Psychiatry*.
- Anand, A., Y. Li, Y. Wang, K. Gardner and M. J. Lowe (2007). Reciprocal effects of antidepressant treatment on activity and connectivity of the mood regulating circuit: an FMRI study. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* **19**:(3): 274-82.
- Ashburner, J. and K. J. Friston (2005). Unified segmentation. *Neuroimage* **26**:(3): 839-51.
- Bechara, A., H. Damasio, D. Tranel and A. R. Damasio (1997). Deciding advantageously before knowing the advantageous strategy. *Science* **275**:(5304): 1293-5.
- Bigos, K. L., B. G. Pollock, H. J. Aizenstein, P. M. Fisher, R. R. Bies and A. R. Hariri (2008). Acute 5-HT Reuptake Blockade Potentiates Human Amygdala Reactivity. *Neuropsychopharmacology* **33**:(13): 3221.
- Canli, T., R. E. Cooney, P. Goldin, M. Shah, H. Sivers, M. E. Thomason, S. Whitfield-Gabrieli, J. D. Gabrieli and I. H. Gotlib (2005). Amygdala reactivity to emotional faces predicts improvement in major depression. *Neuroreport* **16**:(12): 1267-70.
- Craig, A. D. (2002). How do you feel? Interoception: the sense of the physiological condition of the body. *Nat Rev Neurosci* **3**:(8): 655-66.
- Critchley, H. D. (2005). Neural mechanisms of autonomic, affective, and cognitive integration. *J Comp Neurol* **493**:(1): 154-66.
- Del-Ben, C. M., J. F. Deakin, S. McKie, N. A. Delvai, S. R. Williams, R. Elliott, M. Dolan and I. M. Anderson (2005). The effect of citalopram pretreatment on neuronal responses to neuropsychological tasks in normal volunteers: an FMRI study. *Neuropsychopharmacology* **30**:(9): 1724-34.
- Drevets, W. C., J. L. Price, J. R. Simpson, Jr., R. D. Todd, T. Reich, M. Vannier and M. E. Raichle (1997). Subgenual prefrontal cortex abnormalities in mood disorders. *Nature* **386**:(6627): 824-7.
- First, M. B., R. L. Spitzer, M. Gibbon and J. B. W. Williams (1995): Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders _ (SCID-, version 2.0). New York, Biometric research Department, New York State Psychiatric Institute.
- Forbes, E. E., A. R. Hariri, S. L. Martin, J. S. Silk, D. L. Moyles, P. M. Fisher, S. M. Brown, N. D. Ryan, B. Birmaher, D. A. Axelson and R. E. Dahl (2008). Altered Striatal Activation Predicting Real-World Positive Affect in Adolescent Major Depressive Disorder. *Am J Psychiatry*.
- Forman, S. D., J. D. Cohen, M. Fitzgerald, W. F. Eddy, M. A. Mintun and D. C. Noll (1995). Improved assessment of significant activation in functional magnetic resonance imaging (fMRI): use of a cluster-size threshold. *Magn Reson Med* **33**:(5): 636-47.

- Fraguas, R., Jr., C. Marci, M. Fava, D. V. Iosifescu, B. Bankier, R. Loh and D. D. Dougherty (2007). Autonomic reactivity to induced emotion as potential predictor of response to antidepressant treatment. *Psychiatry Res* **151**:(1-2): 169-72.
- Friston, K. J. (2007): Statistical parametric mapping: the analysis of functional brain images. Amsterdam; Boston, Elsevier/Academic Press.
- Fu, C. H. Y., S. C. R. Williams, A. J. Cleare, M. J. Brammer, N. D. Walsh, J. Kim, C. M. Andrew, E. M. Pich, P. M. Williams, L. J. Reed, M. T. Mitterschiffthaler, J. Suckling and E. T. Bullmore (2004). Attenuation of the Neural Response to Sad Faces in Major Depression by Antidepressant Treatment: A Prospective, Event-Related Functional Magnetic Resonance Imaging Study. *Arch Gen Psychiatry* **61**:(9): 877-889.
- Gentil, V., M. L. Zilberman, D. Lobo, E. Henna, R. A. Moreno and C. Gorenstein (2007). Clomipramine-induced mood and perceived performance changes in selected healthy individuals. *J Clin Psychopharmacol* **27**:(3): 314-5.
- Gianaros, P. J., L. K. Sheu, K. A. Matthews, J. R. Jennings, S. B. Manuck and A. R. Hariri (2008). Individual differences in stressor-evoked blood pressure reactivity vary with activation, volume, and functional connectivity of the amygdala. *J Neurosci* **28**:(4): 990-9.
- Gillman, P. K. (2007). Tricyclic antidepressant pharmacology and therapeutic drug interactions updated. *Br J Pharmacol* **151**:(6): 737-48.
- Hariri, A. R., V. S. Mattay, A. Tessitore, F. Fera, W. G. Smith and D. R. Weinberger (2002). Dextroamphetamine modulates the response of the human amygdala. *Neuropsychopharmacology* **27**:(6): 1036-40.
- Harmer, C. J., Z. Bhagwagar, D. I. Perrett, B. A. Vollm, P. J. Cowen and G. M. Goodwin (2002). Acute SSRI Administration Affects the Processing of Social Cues in Healthy Volunteers. *Neuropsychopharmacology* **28**:(1): 148.
- Harmer, C. J., N. C. Shelley, P. J. Cowen and G. M. Goodwin (2004). Increased positive versus negative affective perception and memory in healthy volunteers following selective serotonin and norepinephrine reuptake inhibition. *Am J Psychiatry* **161**:(7): 1256-63.
- Harmer, C. J., C. E. Mackay, C. B. Reid, P. J. Cowen and G. M. Goodwin (2006). Antidepressant drug treatment modifies the neural processing of nonconscious threat cues. *Biol Psychiatry* **59**:(9): 816-20.
- Keedwell, P. A., C. Andrew, S. C. Williams, M. J. Brammer and M. L. Phillips (2005). A double dissociation of ventromedial prefrontal cortical responses to sad and happy stimuli in depressed and healthy individuals. *Biol Psychiatry* **58**:(6): 495-503.
- Keedwell, P. A., C. Andrew, S. C. Williams, M. J. Brammer and M. L. Phillips (2005). The neural correlates of anhedonia in major depressive disorder. *Biol Psychiatry* **58**:(11): 843-53.
- Kemp, A. H., M. A. Gray, R. B. Silberstein, S. M. Armstrong and P. J. Nathan (2004). Augmentation of serotonin enhances pleasant and suppresses unpleasant cortical electrophysiological responses to visual emotional stimuli in humans. *Neuroimage* **22**:(3): 1084-1096.

- Kennedy, S. H., K. R. Evans, S. Kruger, H. S. Mayberg, J. H. Meyer, S. McCann, A. I. Arifuzzman, S. Houle and F. J. Vaccarino (2001). Changes in Regional Brain Glucose Metabolism Measured With Positron Emission Tomography After Paroxetine Treatment of Major Depression. *Am J Psychiatry* **158**(6): 899-905.
- Lang, P. J., M. M. Bradley and B. N. Cuthbert (1997): International Affective Picture System (IAPS): Technical Manual and Affective Ratings. Gainesville, FL, University of Florida, Center for Research in Psychophysiology.
- Lotufo-Neto, F., M. A. Bernik, R. T. Ramos, L. Andrade, C. Gorenstein, T. Cordas, M. Melo and V. Gentil (2001). A dose-finding and discontinuation study of clomipramine in panic disorder. *J Psychopharmacol* **15**(1): 13-17.
- Maldjian, J. A., P. J. Laurienti, R. A. Kraft and J. H. Burdette (2003). An automated method for neuroanatomic and cytoarchitectonic atlas-based interrogation of fMRI data sets. *Neuroimage* **19**(3): 1233-9.
- Marcourakis, T., C. Gorenstein and V. Gentil (1993). Clomipramine, a better reference drug for panic/agoraphobia. II. Psychomotor and cognitive effects. *J Psychopharmacol* **7**(4): 325-330.
- Mayberg, H. S., S. K. Brannan, J. L. Tekell, J. A. Silva, R. K. Mahurin, S. McGinnis and P. A. Jerabek (2000). Regional metabolic effects of fluoxetine in major depression: serial changes and relationship to clinical response. *Biol Psychiatry* **48**(8): 830-43.
- McKie, S., C. Del-Ben, R. Elliott, S. Williams, N. del Vai, I. Anderson and J. F. Deakin (2005). Neuronal effects of acute citalopram detected by pharmacofMRI. *Psychopharmacology (Berl)* **180**(4): 680-6.
- Norbury, R., C. E. Mackay, P. J. Cowen, G. M. Goodwin and C. J. Harmer (2007). Short-term antidepressant treatment and facial processing. Functional magnetic resonance imaging study. *Br J Psychiatry* **190**: 531-2.
- Norbury, R., C. E. Mackay, P. J. Cowen, G. M. Goodwin and C. J. Harmer (2007). The effects of reboxetine on emotional processing in healthy volunteers: an fMRI study. *Mol Psychiatry*.
- Phillips, M. L., W. C. Drevets, S. L. Rauch and R. Lane (2003). Neurobiology of emotion perception I: The neural basis of normal emotion perception. *Biol Psychiatry* **54**(5): 504-14.
- Phillips, M. L., C. D. Ladouceur and W. C. Drevets (2008). The Neural Basis of Voluntary and Automatic Emotion Regulation: Implications for Understanding the Neurodevelopment of Bipolar Disorder. *Mol Psychiatry* **in press**.
- Schaefer, H. S., K. M. Putnam, R. M. Benca and R. J. Davidson (2006). Event-related functional magnetic resonance imaging measures of neural activity to positive social stimuli in pre- and post-treatment depression. *Biol Psychiatry* **60**(9): 974-86.
- Sheline, Y. I., D. M. Barch, J. M. Donnelly, J. M. Ollinger, A. Z. Snyder and M. A. Mintun (2001). Increased amygdala response to masked emotional faces in depressed subjects resolves with antidepressant treatment: an fMRI study. *Biol Psychiatry* **50**(9): 651-8.

- Siegle, G. J. (1999). A neural network model of attention biases in depression. *Prog Brain Res* **121**: 407-32.
- Siegle, G. J., C. S. Carter and M. E. Thase (2006). Use of fMRI to predict recovery from unipolar depression with cognitive behavior therapy. *Am J Psychiatry* **163**:(4): 735-8.
- Surguladze, S., M. J. Brammer, P. Keedwell, V. Giampietro, A. W. Young, M. J. Travis, S. C. Williams and M. L. Phillips (2005). A differential pattern of neural response toward sad versus happy facial expressions in major depressive disorder. *Biol Psychiatry* **57**:(3): 201-9.
- Takahashi, H., N. Yahata, M. Koeda, A. Takano, K. Asai, T. Suhara and Y. Okubo (2005). Effects of dopaminergic and serotonergic manipulation on emotional processing: a pharmacological fMRI study. *Neuroimage* **27**:(4): 991-1001.
- Weissman, M. M., P. Wickramaratne, P. Adams, S. Wolk, H. Verdeli and M. Olfson (2000). Brief screening for family psychiatric history: the family history screen. *Arch Gen Psychiatry* **57**:(7): 675-82.
- Wijkstra, J., J. Lijmer, F. J. Balk, J. R. Geddes and W. A. Nolen (2006). Pharmacological treatment for unipolar psychotic depression: Systematic review and meta-analysis. *Br J Psychiatry* **188**: 410-5.
- Wong, D. F., J. Tauscher and G. Grunder (2008). The Role of Imaging in Proof of Concept for CNS Drug Discovery and Development. *Neuropsychopharmacology* **34**:(1): 187.