

# **EFEITO DA MODULAÇÃO DA ANSIEDADE PRODUZIDA PELA INJEÇÃO DE PENTILENOTETRAZOL E MIDAZOLAM NA RESPOSTA DE FUGA INDUZIDA PELA MICROINJEÇÃO DE NMDA NA MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL DORSAL**

**Aluno: Bruno Costa Larrubia**  
**Orientador: J. Landeira Fernandez**

## **Introdução**

Medo e ansiedade formam a primeira linha de defesa para situações de perigo, sendo ambas parte de um mecanismo evolutivo de sobrevivência. O sistema tem as suas origens no mecanismo primordial de luta ou fuga localizado nas regiões mais primitivas do cérebro dos animais [1]. Dado o caráter evolutivo do comportamento emocional, a compreensão deste fenômeno no homem depende, em grande parte, do estudo do comportamento de outros animais. Os animais, assim como os seres humanos, expressam o significado de suas emoções frente a situações de perigo através do comportamento que exibem. [2]

Baseado na sua observação clínica, Freud [3] foi capaz de distinguir estados de ansiedade crônica e pânico. Segundo ele, a ansiedade é definida como “algo sentido”, um estado afetivo, com combinações de alguns sentimentos de prazer-desprazer. A ansiedade é provavelmente a função emocional que quando desregulada, mais aflige a qualidade de vida humana. Em torno de 2 a 12% da população brasileira apresenta durante a vida pelo menos um episódio relacionado com transtornos específicos de ansiedade. [4]

Dentre a constelação de sintomas que compõe estes transtornos, destaca-se o fato de que a ansiedade pode provocar confusões ou distorções da percepção, alterando o significado de acontecimentos registrados por uma pessoa. Suas principais características são: estado de tensão diante de uma situação considerada de perigo, causando a sensação de confusão generalizada, uma sensação de apreensão, tensão, e inquietude provocada pela antecipação de perigo. Transtornos de ansiedade podem também interferir com processos de atenção causando assim prejuízos de aprendizado e memória. Os sintomas característicos do transtorno de ansiedade podem ocorrer em três níveis: conscientes, comportamentais e fisiológicos. Dentre os sintomas conscientes destacam-se o sentimento de ansiedade propriamente dito, sensações de apreensão, hipervigilância, insônia e perda de concentração. Dentre os sintomas comportamentais estão também os tremores musculares e a reação de forma assustada a estímulos insignificante (resposta de sobressalto), assim como a inquietação, caracterizada pela movimentação das mãos, pés ou qualquer outra parte do corpo bem como andar de um lado para outro, são características comportamentais da ansiedade. Finalmente, os sintomas fisiológicos podem-se apresentar através de intensa sudorese, palpitações, náuseas e sensação de vazio no estômago [5]. Deve-se reconhecer, no entanto, que determinados graus de ansiedade podem ser considerados benéficos ao sujeito, preparando-o de forma adequada para uma infinidade de tarefas diárias. Essa idéia foi descrita no início do século XX através da lei de Yerkes-Dodson [6]. De acordo com esse princípio, existe um ponto ótimo de ansiedade necessário para a melhor execução de uma determinada tarefa. Quando delineada graficamente, a relação entre ansiedade e desempenho toma a forma de uma curva em “U” invertido; ou seja, até um determinado ponto, o aumento da ansiedade tem a capacidade de aumentar o desempenho. No entanto, o aumento da ansiedade além de um determinado grau leva à queda de desempenho. Dessa forma, a ansiedade é, em determinados níveis, um fenômeno adaptativo uma vez que ela tem a capacidade de otimizar ou potencializar recursos do sujeito frente a exigências ambientais.

Seguindo essa mesma linha de pensamento podemos definir a ansiedade como uma emoção capaz de organizar comportamentos eficientes para atender às exigências dinâmicas

do ambiente. No nível fisiológico, a ansiedade prepara o sujeito, criando um meio ótimo para uma resposta efetiva e condizente com a demanda ambiental. Essa preparação envolve a organização da expressão facial, tonalidade da voz, tônus muscular, bem como um conjunto de outras respostas mediadas pelo sistema nervoso autônomo e sistema endócrino. No nível comportamental as emoções produzem comportamentos expressivos veiculando informações às outras pessoas e também impulsionam comportamentos instrumentais. No nível consciente, essa emoção altera o foco da atenção para estímulos mais importantes do meio ambiente e evoca informações armazenadas no sistema de memória de longo prazo.

Muitos estudos tem tentado correlacionar estados de ansiedade com os estados de pânico, que podem ser definidos pela ocorrência súbita e inesperada de ataques de pânico (AP). Os APs são definidos pela DSM-IV<sup>TR</sup> [7] como um período de intenso medo ou mal-estar acompanhado de, pelo menos, quatro sintomas somáticos ou cognitivos, como taquicardia, palpitações, tremores, dispnéia, sudorese, sensação de estar sufocando, medo de morrer ou de perder o controle, entre outros. Os APs podem ter frequência de vários ataques em um mesmo dia até poucos ataques ao longo de um ano, sendo classificados transtorno de pânico(AP) através dos critérios do DSM-IV<sup>TR</sup> [7].

Apesar de a ansiedade constituir-se em um fenômeno bastante presente na vida humana, seja por causa da dinâmica social de pressão e competitividade, pelas complexas relações sociais na qual cada individuo esta envolvido, é possível encontrar correlações entre essa emoção e respostas de defesa que os animais exibem frente a estímulos ou situações de perigo. Teorias que tentam relacionar reações de ansiedade em seres humanos com o comportamento de defesa em diferentes espécies animais tiveram origem com Darwin [2]. De acordo com a teoria da evolução, a ansiedade é produto de um sistema motivacional responsável pela organização de respostas específicas com objetivo de lidar de forma adequada às ameaças do meio externo. A partir dessa perspectiva, vários estudos têm definido a ansiedade – inclusive a ansiedade patológica – como componente essencial de um sistema neural que teve origem com os mamíferos e desde então vem se mantendo ao longo da evolução das espécies.

Esse sistema é responsável pela detecção de estímulos de perigo no meio ambiente, bem como reagir de forma adequada a esses estímulos que ameaçam a integridade do organismo [8]. Nesse sentido, a utilização de modelos animais permite investigar os diferentes tipos de transtornos de ansiedade através do emprego de uma metodologia experimental privilegiando o controle de variáveis e conseqüentemente aumentando à validade interna desse tipo de investigação. Experimentos dessa natureza buscam compreender como a circuitária neural subjacente a esses transtornos está organizada e suas conseqüências nas reações de defesa em determinados modelos animais.

A conjunção da literatura específica que usa o modelo experimental comparado para a investigação de natureza mais aplicada com seres humanos, exige a definição de uma série de termos bem como a sua contextualização teórica. Dentre esses conceitos, destaca-se o de ansiedade, que pode ser definida como uma emoção gerada pela antecipação de um perigo difuso em oposição à noção de medo, cuja fonte de perigo é capaz de ser identificada pelo sujeito [9]. Buscamos também diferenciar ansiedade e medo pelos critérios eto-experimentais desenvolvidos por Blanchard e Blanchard [10] De acordo com esta visão a ansiedade é a emoção relacionada com a avaliação de risco que é evocada em situações em que o perigo é incerto (ameaça potencial). Ao contrário disso, o medo esta relacionada à estratégia defensiva que ocorrem em resposta a estímulos reais que estão a certa distancia da vítima. Gray e McNaughton [11] enfatizam que para que ocorra a ansiedade, é necessário um impulso para se aproximar do estímulo de perigo, gerando conflito. O medo existiria então quando não há tendência para a aproximação e apenas motivação para evitar ou fugir.

Profissionais da área clínica geralmente sustentam essa diferenciação em seus modelos teóricos atribuindo às reações de medo um processo agudo envolvido na mediação de uma resposta de fuga ou esquiva a um determinado estímulo aversivo. Por outro lado, a reação de ansiedade é considerada como um estado de desconforto de longa duração em consequência da incapacidade da detecção do estímulo aversivo [12]. No entanto, pode-se assumir que a ansiedade, bem como os seus diferentes tipos patológicos, advém de um único sistema motivacional relacionado com comportamentos de defesa capazes de assegurar a integridade do indivíduo. [13, 14]

De acordo com esse modelo, a diferença entre medo e ansiedade é de natureza quantitativa; ou seja, medo e ansiedade não fazem parte de sistemas diferentes, mas apenas variações no grau de atividade de um único sistema. Este modelo, que é compartilhado por pesquisadores da área básica [15], e propõe que estímulos ambientais de perigo ativam esse sistema motivacional de defesa, que por sua vez tem a capacidade de produzir respostas com alto valor adaptativo, tanto a nível comportamental para lidar de forma apropriada com o estímulo de perigo, como no nível das reações fisiológicas que dão suporte a essas reações comportamentais de defesa. No caso de seres humanos, além da ativação dessas duas classes de respostas, existe também um componente cognitivo, de natureza consciente, responsável pela experiência subjetiva de desconforto. [16]

Duas classes de estímulos podem ativar o sistema motivacional de defesa: estímulos naturalmente ameaçadores, que são reconhecidos de maneira inata por todos os indivíduos de uma determinada espécie, graças a um processo de evolução filogenético, e estímulos de perigo condicionados, adquiridos através de processos de aprendizagem ao longo do desenvolvimento ontogenético de cada organismo. Por exemplo, embora não tenham qualquer tipo de experiência, ratos criados em laboratório mostram reações de defesa a predadores do seu nicho ecológico, como por exemplo, a presença de um gato [17], ou por estímulos que tenham um valor biológico natural para o animal, como por exemplo, o cheiro deixado por um outro rato submetido a formas severas de estresse [18] ou estimulação tátil de humanos na cabeça ou nas costas do animal [19].

Além dessas situações naturais de perigo, existem outros estímulos que são inicialmente neutros, mas adquirem a capacidade de eliciar reações de defesa através de aprendizagem associativa. Neste caso, estímulos neutros podem ficar associados com estímulos nocivos ou dolorosos, como por um exemplo choques elétricos, e adquirem a capacidade de ativar o sistema motivacional de defesa. Este tipo de aprendizagem é extremamente rápida, simples e duradoura [20].

A ativação do sistema motivacional de defesa produz uma redução do repertório comportamental do animal a um pequeno número de respostas que tem como características lidar de forma apropriada com os estímulos de perigo [21]. Dessa forma, é possível utilizar esse padrão comportamental como indicador da atividade do sistema motivacional de defesa. O teste do labirinto em cruz elevado é um destes modelos experimentais, frequentemente utilizado para a avaliação do sistema motivacional de defesa [22].

Neste modelo o rato é colocado na encruzilhada de quatro braços dispostos perpendicularmente uns os outros e elevado do chão em 50 cm. Dois braços opostos são abertos, permitindo que o animal perceba, ao mesmo tempo, o precipício e o espaço aberto. Os outros dois braços são envolvidos por paredes laterais. Conseqüentemente, quando ratos são colocados nessa situação experimental, tendem a evitar os braços abertos permanecendo assim mais tempo nos braços fechados. Uma análise etofarmacológica do comportamento do rato nesse modelo experimental demonstrou que certas categorias comportamentais têm uma maior sensibilidade para a quantificação de comportamentos de defesa [23]. Em uma variação desse modelo, denominado de labirinto em T elevado, elimina-se um dos braços fechados, de forma,

que o animal, em algumas tentativas, é colocado em um dos braços abertos e a latência para fugir desse local para o braço fechado é registrada (respostas de fuga).

Por outro lado, quando se exige do animal que ele aprenda uma resposta que envolva uma atividade motora, como, por exemplo, a resposta de vai e vem em procedimento de esquiva ativa, pode-se encontrar uma interação entre essa resposta e a postura de congelamento. Por exemplo, alguns experimentos mostraram que ratos tinham dificuldade em aprender uma resposta de esquiva de vai e vem, quando essa resposta tinha que ser emitida em um contexto previamente associado com choques elétricos. Como os autores também mediram a taxa de movimento dos animais, foi possível observar que os animais submetidos ao condicionamento contextual aversivo antes do treino de esquiva, apresentaram uma alta taxa de congelamento, o que explica seu baixo desempenho na aquisição da resposta de esquiva [24].

Num procedimento de condicionamento contextual aversivo, onde o animal recebe um choque não sinalizado em um determinado contexto, a resposta de congelamento aparece tanto após o término do choque como também 24 horas após, quando o animal é recolocado na mesma caixa experimental onde o choque foi apresentando no dia anterior. Essa resposta de congelamento é proporcional à quantidade ou a intensidade do choque elétrico [25]. Mais ainda, essa resposta de congelamento é completamente controlada pelos estímulos contextuais que ficaram associados ao choque. Isto porque, no teste de mudança de contexto, onde o animal é transferido para uma outra caixa experimental após a apresentação do choque, não se observa a ocorrência da resposta de congelamento [26].

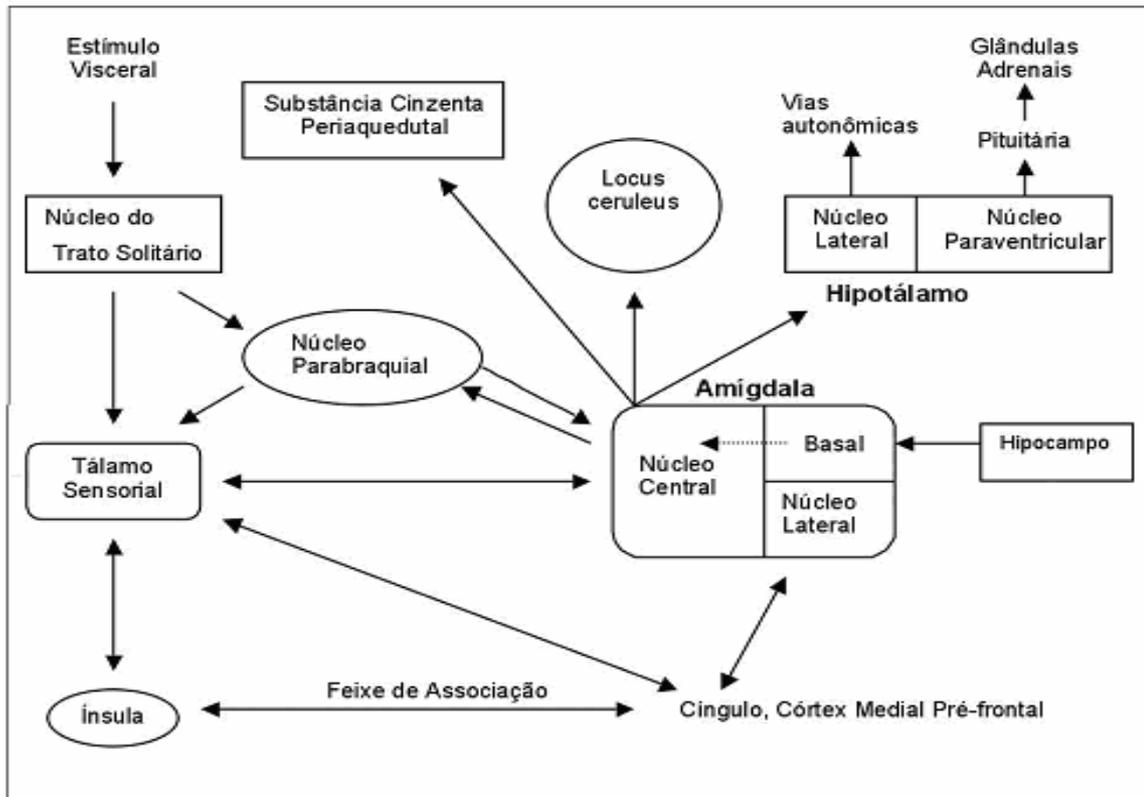
O procedimento de choque imediato é uma outra maneira bastante interessante de mostrar que a resposta de congelamento é exclusivamente ativada por estímulos contextuais associados a um estímulo naturalmente aversivo [27]. Neste procedimento, o animal recebe um choque tão logo ele é colocado na caixa experimental. O que se observa é que o animal apresenta uma série de respostas incondicionadas ao choque, como por exemplo, respostas de pular, girar e vocaliza. No entanto, após o choque, nenhuma resposta de congelamento é observada. Isto porque os estímulos contextuais não estavam presentes antes da apresentação do choque. Dessa forma, parece que a resposta incondicionada ao choque é um aumento da atividade, enquanto que a postura de congelamento, ironicamente o oposto da resposta incondicionada, é resposta condicionada.

Panksepp [28] propôs a circuitária do medo cujo mecanismo evolutivo mais provável seria a redução da dor, auto-preservação e sobrevivência. Esse sistema é responsável pela detecção de estímulos de perigo no meio ambiente, bem como reagir de forma adequada a esses estímulos que ameaçam a integridade do organismo [29]. Bolles [30] através da sua teoria Species-Specific Defense Reaction (SSDR) demonstra que o rato de forma inata determina comportamentos de defesa, como a resposta de congelamento ou luta, por exemplo. Quando o mesmo é confrontado com uma ameaça ambiental natural (um predador) ou uma ameaça ambiental artificial (choque nas patas) os seus comportamentos acabam por se delimitar somente aos SSDRs. Nestas situações é quase impossível o rato manifestar comportamentos que não se adequam aos esquemas da SSDRs, contudo, o próprio animal teria uma flexibilidade de escolha comportamental dentro da SSDRs. Parte-se do princípio que o animal através de uma abordagem adaptativa irá selecionar, dentro de um seletivo repertório de ações, a melhor reação comportamental que confronte de forma adequada à ameaça em questão, e que tenha maior chance de sobrevivência. Este sistema de defesa tem regras específicas que governam as reações comportamentais, essas regras autorizam mudanças de comportamentos de forma abrupta ou crescente, a partir do momento que ocorram mudanças relevantes nas condições ambientais.

Fanselow [31] depois de observações laboratoriais, que o nível de medo teria uma importância maior na determinação de dado comportamento do que o próprio ambiente envolvido, os mesmos sugeriram a existência de uma série de respostas comportamentais

dados pela presa diante de um perigo. Blanchard, Blanchard & Rodgers [32] por sua vez fizeram um estudo etológico do comportamento do rato diante de situações com diferentes níveis de ameaça. De acordo com os estudos destes autores, sugeriu-se que as principais variáveis relevantes na magnitude da resposta comportamental de defesa seria a distância da presa com relação ao predador, alternativas de fuga-esquiva e a discriminação da fonte de perigo. A compreensão da circuitária neural envolvidas nestes processos é de suma importância para os avanços dos estudos e tratamentos clínicos destes transtornos.

Desde as primeiras considerações de Darwin sobre o caráter evolutivo do comportamento emocional, passando pelas contribuições de Cannon, Brad e Papez [33] no início do séc. XX podemos notar a importância da circuitária neural do medo e da dor possui no cotidiano dos animais [34]



Informações viscerossensoriais são conduzidas para a amígdala por duas vias: uma "abaixo" do núcleo do trato solitário, através do núcleo parabraquial ou do tálamo sensorial; outra "acima" do córtex viscerossensorial primário, via transmissão córtico-talâmica, permitindo processamento cognitivo e modulação das informações viscerossensoriais. Informações contextuais armazenadas na memória, no hipocampo, são transmitidas diretamente para a amígdala. As principais projeções eferentes da amígdala, relacionadas com a ansiedade, são para: *locus ceruleus* (aumenta liberação de noradrenalina, que contribui para ativação fisiológica e comportamental), substância cinzenta periaquedutal (promove comportamentos defensivos e paralisia postural), núcleo paraventricular do hipotálamo (ativa o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal levando à liberação de adrenocorticóides), núcleo hipotalâmico lateral (ativa o sistema nervoso simpático) e o núcleo parabraquial (influencia frequência e amplitude respiratória).

Recentes estudos [35] têm sugerido de forma contundente que a matéria cinzenta periaquedutal (MCP), que se localiza ao longo do mesencéfalo, tem se mostrado como uma área relevante no controle dos comportamentos de defesa. Graeff [36] inclusive fez a relação do comportamento de luta-fuga com as emoções humanas de pânico e raiva pelo fato de estimulações elétricas desta estrutura em humanos provocarem comportamento de

agressividade, relatos de total desconforto, hipertensão, medo, alterações endócrinas típicas de estresse e taquicardia [37]

Podemos mencionado a estimulação da MCP produz reações de defesa em humanos, tendo se observado que a estimulação da matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPD) produz comportamento aversivo em animais, enquanto em humanos produziu especificamente medo e ansiedade [38]. Isto indica que esta região cerebral faz uma importante conexão com a circuitária cerebral envolvida no processo de ansiedade e medo. Projeções sistemáticas da amígdala para a MCP sugere que um estímulo relacionado ao perigo ativa um circuito específico na amígdala que se projeta para a MCP, ativando assim mecanismos da MCP que lidam com reações de defesa, analgesia e respostas autonômicas [39].

De acordo com este modelo, avisos de perigo (presa avista o predador) ativam regiões da amígdala que se projetam para a matéria cinzenta periaquedutal ventral (MCPV) responsável pela resposta de congelamento (uma espécie de paralisia por precaução onde apenas se respira e observa o ambiente em busca de possíveis estímulos aversivos) situações nas quais os neurônios intrínsecos as porções caudais da MCPV são cruciais para o congelamento, a destruição química destas áreas atenua o congelamento, provando-se crucial também para a analgesia opiácea [40]

Contudo, quando o animal encontra o perigo (predador pega a presa) uma circuitária na amígdala que se projeta para a MCP é ativada. A ativação desta rede produz respostas de fuga associadas com vocalizações e respostas autonômicas [41]. De acordo com este modelo existe uma interação inibitória entre MCPV. Os resultados sugeriram então que a estimulação da MCPD produziu fuga e respostas de defesa e a estimulação da MCP ventral produziu respostas de congelamento.

Deakin e Graeff [42] propuseram um modelo que formula a teoria do papel dual da serotonina (5-HT), postulando a existência de dois sistemas serotoninérgicos independentes que modulariam respostas comportamentais a estímulos aversivos agudos condicionados e incondicionados. Neste modelo, a amígdala, encarregada da avaliação do grau de perigo representado por estímulos e situações externas, seria responsável pela investigação cautelosa [43]. O resultado desta interpretação seria, então, transmitido a MCPD, que, por sua vez, se encarregaria de programar e selecionar diferentes padrões comportamentais de defesa. A inervação serotoninérgica chegaria até a amígdala e MCPD através de duas vias distintas provenientes do núcleo dorsal da rafe (NDR), respectivamente o trato prosencefálico medial e o trato periventricular.

Na MCPD, a 5-HT parece desempenhar uma função inibitória, impedindo a manifestação de padrões fixos de defesa ativa a estímulos aversivos inatos (luta e fuga), em situações onde o perigo é apenas potencial ou distal. Neste caso, a movimentação brusca do animal é indesejável, fazendo com que este fosse mais facilmente percebido pelo predador. Paralelamente, a 5-HT promove estratégias de defesa elaboradas, tais como a investigação cautelosa e o congelamento, mais adequadas a tais situações. Apenas quando o perigo se torna iminente, a estimulação da MCPD sobrepuja a inibição serotoninérgica, liberando comportamentos de fuga, já mais apropriados [44]

Para Deakin e Graeff estando o trato NDR-Amígdala relacionado à ansiedade condicionada e o NDR-MCPD a incondicionada, disfunções nestes dois sistemas resultariam naqueles quadros psicopatológicos já apresentados anteriormente: transtorno de ansiedade generalizada e transtorno do pânico. Este mecanismo explicaria, pelo menos em parte, evidências obtida com a 5-HT no século passado. Contudo, a circuitária neural que governa todas as funções da MCP não é de todo ainda entendida e apenas um modelo baseado no entendimento já adquirido desta estrutura pode ser esboçado [45]. De acordo com este modelo existem cinco componentes que se interagem dentro da MCP que seriam: ansiedade-medo, vocalização, analgesia-dor, regulações autonômicas e comportamento sexual. Um

componente de importância maior dentro deste modelo seria o de ansiedade-medo com uma influência na modulação da atividade dos demais componentes e tendo sua atividade modulada por sua vez pela circuitária de analgesia-dor. A circuitária de dor [46] teria também uma importância na modulação de alguns componentes como: ansiedade-medo, regulação autonômica e vocalização que receberiam aferências de outros componentes. O mais importante dentro deste processo é que a interação entre os sistemas da MPC não funciona de forma rígida, pois dependendo de uma circunstância, um episódio de dor poderia ou não causar vocalização, medo ou ansiedade. Mais estudos deve ser feitos para elucidar ainda mais a circuitária deste sistema, principalmente por seu papel relevante nos Transtornos de pânico e Transtornos de ansiedade.

### **Objetivo**

O presente trabalho pretende dar continuidade à investigação sobre a circuitária neural envolvida na resposta de pânico e suas possíveis relações com estados de ansiedade. Este estudo ganha ainda maior relevância uma vez que transtornos de pânico e de ansiedade se encontram presentes na vida de muitos indivíduos, causando extremo sofrimento físico e mental, além disso, as investigações de caráter pré-clínico tem contribuído de maneira significativa para o aprimoramento das praticas clinicas, que resultam em ultima instancia na melhoria da qualidade vida da população. Para construirmos os aspectos básicos de nossa investigação tomamos como base estudos previamente realizados e suas contribuições. Um relevante estudo demonstrou que a estimulação elétrica da MCPD produz uma resposta de congelamento independente da participação da MCPV [47]. Este resultado é importante, uma vez que a MCPV parece funcionar como uma espécie de saída motora comum à resposta de defesa associada a uma imobilização congelamento [48]. Estes resultados indicam que a reação de defesa produzida pela estimulação da MCPD independe da integridade da MCPV.

Estudos anatômicos do complexo amígdaloide têm mostrado que o núcleo basolateral da amígdala recebe grande parte das aferências sensoriais enquanto que o núcleo central da amígdala envia eferências para as mais diversas estruturas do sistema nervoso central, inclusive para a MCP [49]. Recentes estudos mostraram que neurônios localizados na MCPD respondiam a estimulações elétricas produzidas no núcleo basolateral da amígdala e lesões no núcleo central bloqueavam essa influência. Estes resultados sugerem que o núcleo central da amígdala está relacionado com a saída anatômica do complexo amígdaloide para a MCP [50]. É possível que essa conexão seja bilateral, de forma que a MCPD pode manter contato com o complexo amígdaloide através de projeções para o núcleo central da amígdala [51]. Buscamos entoa contribuir para o esclarecimento da relação entre ansiedade e pânico, assim como as estruturas neuroanatomicas e mecanismos neurofisiológicos envolvidos em tais processos. Alguns estudos têm apontado para a ansiedade como facilitadora de ataques de pânico, enquanto outros têm apontado para o caráter inibitório da ansiedade nos ataques de pânico. Para tentar esclarecer esta questão, utilizamos um modelo de ataques de pânico que consistiu na microinjeção de NMDA na MCPD [52] sendo confrontado pela modelação da ansiedade pela injeção intraperitoneais de Pentilenotetrazol (PTZ) e Midazolam (MDZ), respectivamente um ansiogênico e ansiolítico [53]. Dessa forma, o presente estudo investigou o efeito da modulação de estados de ansiedade sobre a ocorrência de ataques de pânico em ratos albinos.

### **Metodologia**

#### **Animais**

Ratos albinos machos, experimentalmente ingênuos em torno de 3 a 4 meses de idade pesando 250-300 gramas foram utilizados como sujeitos experimentais. Uma semana antes do início do experimento, todos os animais foram manuseados uma vez por dia. A temperatura ambiente do biotério foi mantida em torno de 22° C. As luzes do biotério foram mantidas num

intervalo de 12 horas iluminado por 12 horas de escuro. Os testes ocorreram durante o período iluminado do ciclo. Os experimentos foram todos conduzidos segundo as normas da SBNeC (Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento[54].

### **Equipamento**

Foi utilizado o campo aberto com a função de quantificar as respostas de saltos e corridas emitidas pelo animal através da ação do NMDA na MCPD, utilizou-se também uma grade de choque randomizada localizada no próprio campo aberto para induzir choques nas patas, para elevação da ansiedade do animal e para o condicionamento de medo ao contexto. O comportamento dos animais foi observado através de um sistema de câmera interna, suas imagens passadas e gravadas diretamente no computador. Para microinjeção foi utilizada uma seringa Hamilton de 5.0 ul, tubo de polietileno (PE10) para condução do NMDA e uma agulha gengival (13.5mm) para ser introduzida na cânula guia.

### **Drogas**

Midazolam (Roche, São Paulo, Brasil), Pentilenotetrazol (Sigma, Milwaukee, WI, USA) que foram diluídos em salina estéril (0,9% NaCl) e injetados intraperitonealmente (i.p) em um volume de 1.0ml/kg. O NMDA (Sigma, St. Louis, USA) foi preparado de acordo com os princípios de Nakai e Maeda. [51]

### **Cirurgia**

Cada animal foi anestesiado com tribromoetanol intraperitonealmente na concentração de 25 mg/kg, recebendo uma associação antibiótica de largo espectro (Pentabiotico, Foutoura-Wyeth-Brasil), 0.2ml intramuscular, a fim de prevenir possíveis infecções. Após a anestesia os animais foram afixados em um aparelho exteriorotático [55]. Uma assepsia local com álcool iodado, seguido de anestesia subcutânea local (lidocaina) foi ministrada, o calvário exposto e o perióstio removido com auxílio de tesoura e pinça. Uma solução de água oxigenada seguida de aquecimento por um secador de cabelo comum facilitou a visualização de lambda. Com o crânio fixo na horizontal, usando o ponto interaural como referência, a cânula guia era inserida na MCPD (AP = +2.3 mm; DV = -4.5 mm e ML = -1.7 mm). Uma cânula guia com o comprimento de 12,5 mm foi afixada ao crânio com acrílico dental. Para a microinjeção foi utilizada uma agulha gengival cujo comprimento foi 1 mm maior daquele da cânula guia.

### **Experimento**

Os ratos já submetidos à cirurgia para o implante da cânula, depois de cinco dias de recuperação cirúrgica foram divididos em três subgrupos (Salina – NMDA; PTZ – NMDA, MDZ-NMDA). Os animais antes do início do experimento foram colocados em gaiolas habitat individuais para inoculação da droga citada acima, estas drogas eram injetadas com 5 minutos de antecedência para o PTZ e 30 minutos de antecedência para o MDZ, somente depois deste tempo os mesmos foram colocados no LCE, onde permaneciam por 5 minutos, sendo analisado seu número de entradas nos braços abertos e fechado, assim como o tempo de permanência em cada um deles, logo após o rato era retirado do LCE e posto no campo aberto e recebendo então a microinjeção de NMDA na MCPD e permanecendo por 30 min no mesmo, onde seus comportamentos de corridas e saltos analisados.

Os ratos foram distribuídos em três grupos aleatórios:

- 1) O primeiro grupo recebeu uma microinjeção de NMDA e uma injeção intraperitoneal de PTZ.
- 2) O segundo grupo recebeu uma microinjeção de NMDA e uma injeção intraperitoneal de MDZ.
- 3) O terceiro grupo recebeu uma microinjeção de NMDA e uma injeção intraperitoneal de Salina.

Os grupos que receberem injeção intraperitoneal de PTZ e MDZ são exatamente os que tiveram a modelação da ansiedade. Enquanto a microinjeção de NMDA corresponde ao modelo de pânico e a microinjeção de salina ao grupo controle usando o veículo da droga.

Ao final dos experimentos, os animais receberam uma overdose de Thiopenal Sódico, foram perfundidos intracardíacamente utilizando solução salina (0,9%) seguida de formalina (4%). Antes da remoção dos cérebros, o local da microinjeção foi marcado com a aplicação local da azul de metileno. Depois da remoção foram fixados em formalina 10% por três dias e cortados em seções coronais de 40  $\mu$ m utilizando um criostato. Os cortes foram preparados em lâminas de microscopia e colorados com cresyl violeta. A localização do local preciso da injeção foi avaliada com o auxílio de uma lupa. A análise histológica indicou que as cânulas estavam localizadas dentro ou nas bordas da MCPD. Os ratos que apresentaram cânulas em outras localizações foram descartados do experimento.

### **Resultados**

#### Análise dos comportamentos no Campo aberto

##### -Número de corridas

A ANOVA mostrou diferenças significativas no número de corridas no grupo salina (tratamento:  $F_{[2,32]} = 9,041$ ;  $P = 0,001$ ). Uma análise post hoc utilizando o teste de Student Newman Keuls mostrou que o grupo salina apresentou uma diferença significativa em relação ao PTZ e MDZ ( $P=0,002$  e  $P=0,003$  respectivamente), contudo não foi encontrada diferença significativa entre os grupos PTZ e MDZ ( $P=0,802$ ).

##### -Tempo de corridas

A ANOVA mostrou diferenças significativas no número de pulos no grupo salina (tratamento:  $F_{[2,32]} = 6,071$ ;  $P = 0,004$ ). Uma análise post hoc utilizando o teste de Student Newman Keuls mostrou que o grupo salina apresentou uma diferença significativa em relação ao PTZ e MDZ ( $P=0,007$ ), contudo não foi encontrada diferença significativa entre os grupos PTZ e MDZ ( $P=0,911$ ).

##### -Número de pulos

A ANOVA mostrou diferenças significativas no número de pulos no grupo salina (tratamento:  $F_{[2,32]} = 6,071$ ;  $P = 0,004$ ). Uma análise post hoc utilizando o teste de Student Newman Keuls mostrou que o grupo salina apresentou uma diferença significativa em relação ao PTZ e MDZ ( $P=0,007$  para ambos), contudo não foi encontrada diferença significativa entre os grupos PTZ e MDZ ( $P=0,911$ ).

#### Análise dos comportamentos no LCE

##### - % de entradas no braço aberto

A ANOVA não mostrou diferenças significativas na porcentagem de entradas no braço aberto no grupo salina (tratamento:  $F_{[2,29]} = 404,4$ ;  $P = 0,671$ )

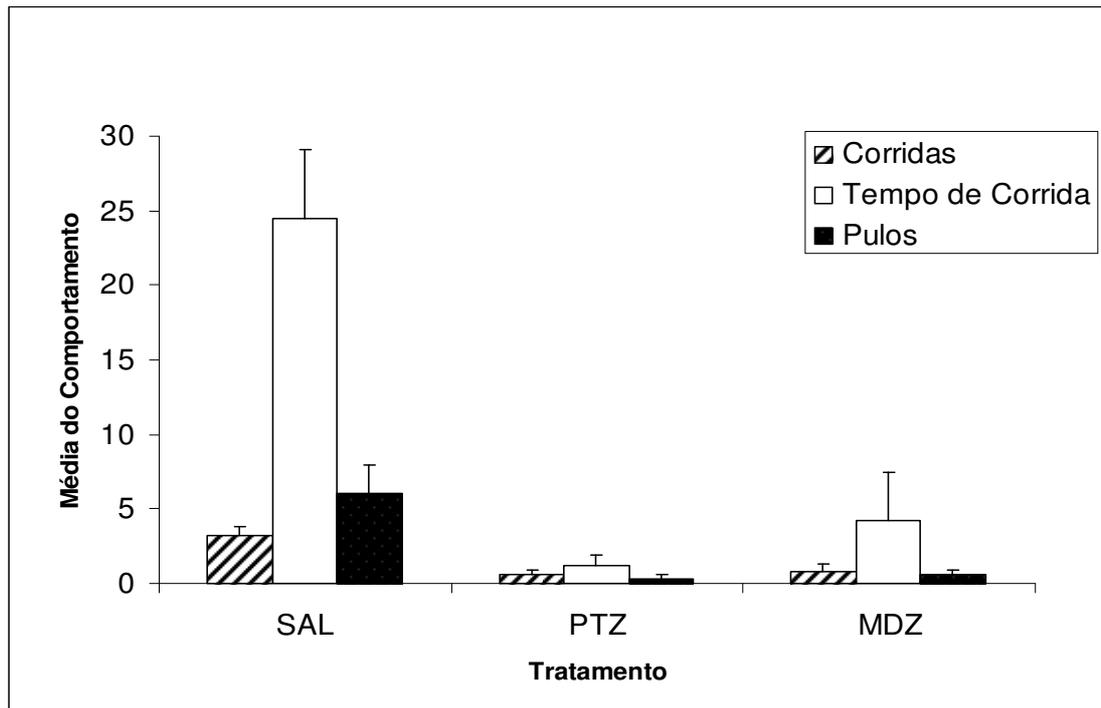
##### - Tempo de permanência no braço aberto

A ANOVA mostrou diferenças significativas no tempo de permanência no braço no grupo salina (tratamento:  $F_{[2,29]} = 0,786$ ;  $P = 0,465$ ).

##### - Entradas no braço fechado

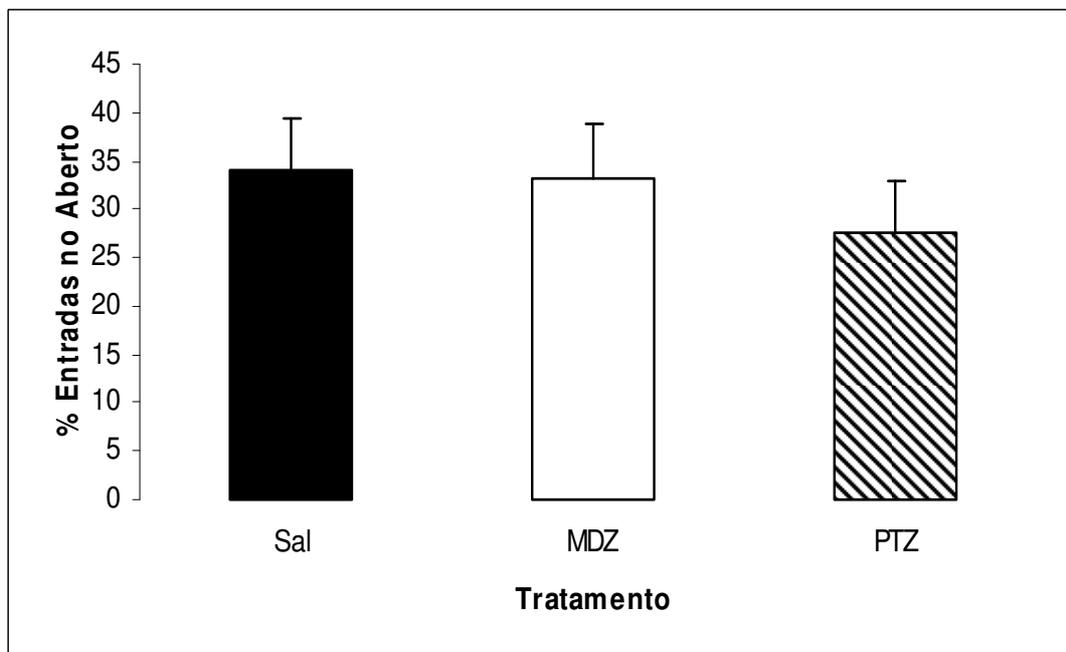
A ANOVA mostrou diferenças significativas no número de corridas no grupo salina (tratamento:  $F_{[2,29]} = 1,178$ ;  $P = 0,322$ )

Gráfico 1



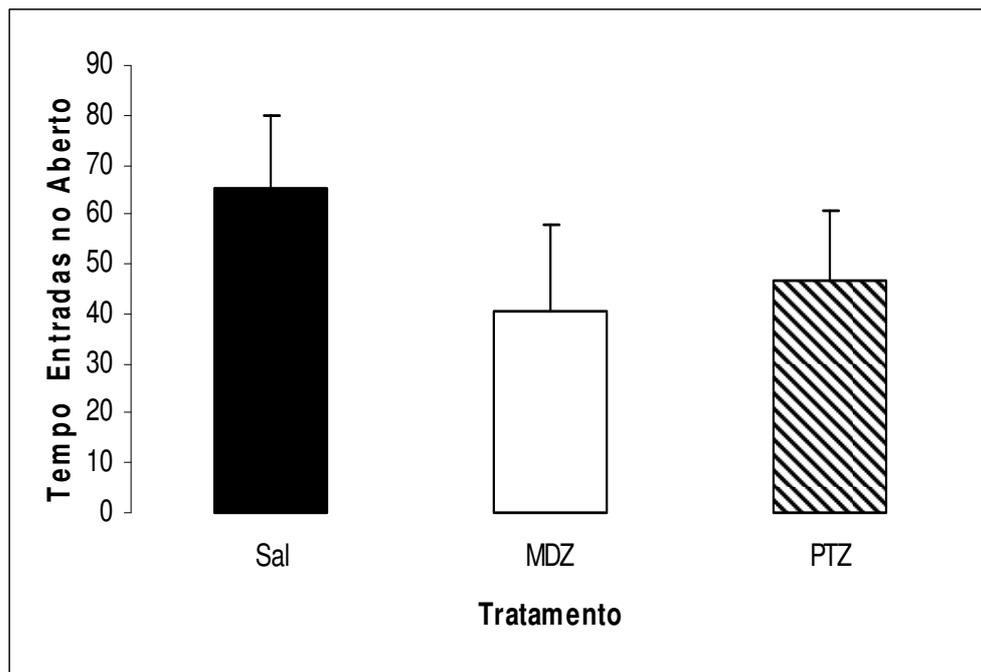
O gráfico mostra o efeito do NMDA nos três grupos na resposta de corridas e pulos sob o efeito do PTZ e MDZ sobre essas mesmas repostas.

Gráfico 2



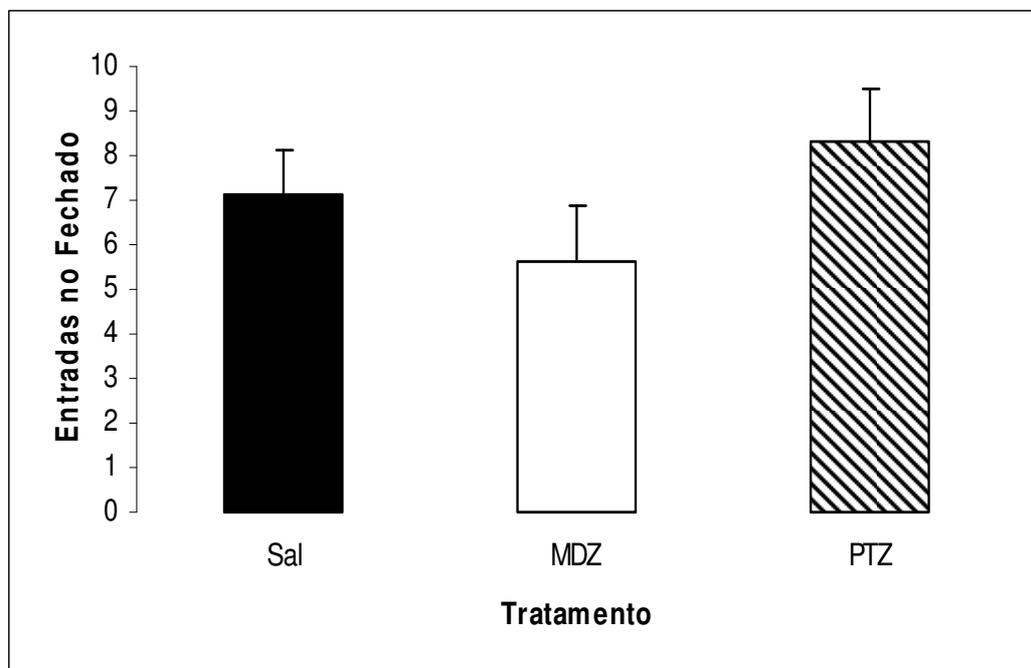
O gráfico mostra o efeito da injeção de Salina, MDZ e PTZ na porcentagem de entradas no braço aberto do LCE.

Gráfico 3



O gráfico mostra o efeito da injeção de Salina, MDZ e PTZ no tempo de permanência no braço aberto do LCE.

Gráfico 4



O gráfico mostra o efeito da injeção de Salina, MDZ e PTZ no número de entradas no braço fechado.



A resposta de defesa tem sido amplamente utilizada como modelo animal de pânico. Por outro lado, o condicionamento contextual de medo pode ser utilizado como modelo animal de ansiedade. Dessa forma, a relação entre ansiedade e transtorno de pânico pode ser investigada em uma condição experimental altamente controlada através de animais de laboratório [58].

Visto que os resultados indicaram que o comportamento de congelamento, induzido pela injeção de PTZ, foi capaz de inibir reações ativas de fuga induzida pela microinjeção de NMDA na MCPD, pode-se concluir que ativação de mecanismos cerebrais que permeiam a ansiedade produz um efeito inibitório nos ataques de pânico. Assim, como sugerido na teoria do papel dual da serotonina por Deakin e Graeff, os dados estão de acordo com a proposição que o sistema serotoninérgico ascendente aumentaria o medo (ou ansiedade) por estimular o substrato de defesa da amígdala e, simultaneamente, impediria a expressão de pânico por inibir os neurônios que comandam a fuga na MCPD. Já os resultados da injeção de MDZ resultaram na diminuição das respostas de saltos, corridas e pulo, se assemelhando em partes com os resultados obtidos pela injeção de PTZ. Apesar destes resultados não serem esperados, podemos tentar compreendê-los a partir da lei de Yerkes-Dodson, onde os baixos níveis de ansiedade (MDZ) assim como os altos níveis de ansiedade (PTZ) formaram o “U” invertido, onde o grupo controle seria o ponto ideal de ansiedade para um bom desempenho. Ainda podemos considerar que a injeção de MDZ, um benzodiazepíco, possa ter desempenhado um papel de ativação das vias gabaérgicas (inibitórias do sistema nervoso central) impedindo assim a maior expressão do efeito da microinjeção de NMDA na MCPD, que esta relacionada com a ativação das vias glutamatergicas (excitatórias) [59]. A relação dos receptores GABA/benzodiazepínicos com a redução de resposta de fuga induzida (pânico) tem sido relatada em alguns artigos, principalmente em estudos com a amígdala e hipotálamo. [60] ]Nesse sentido, os estímulos aversivos condicionados teriam a função de guiar o organismo fora de situações de perigo. Tais estímulos produziram medo ou ansiedade antecipatória e a ativação disfuncional desse mecanismo de defesa produziria ansiedade generalizada. [43]

O fato do aumento da ansiedade causado pela injeção de PTZ ter sido capaz de inibir reações ativas de fuga pela microinjeção de NMDA na MCPD está em conformidade com a teoria de Fanselow que diz serem as respostas defensivas animal organizado hierarquicamente. Segundo esta teoria [61] o congelamento é a principal resposta a um estímulo aversivo, inato ou aprendido e pode inibir formas ativas de comportamento nociceptivos a uma variedade de situações ameaçadoras. Por exemplo, o condicionamento de medo contextual pode disparar uma reação analgésica que pode inibir o reflexo de retirada de um estímulo doloroso [62]. Além disso, tem sido mostrado que o condicionamento do medo contextual pode inibir vigorosas respostas de corrida e saltos disparados pela microinjeção de NMDA na MCPD [63]. A farmacologia da ansiedade, medo e pânico dentro da circuitária da MCP têm mostrado a importância do envolvimento da serotonina [64] na modulação dos níveis de ansiedade no organismo. A MCP também é rica rede gabaérgica com receptores tanto de BDZ quanto de GABA, o bloqueio dos receptores de GABA, em particular os receptores GABA-A, por parte de drogas antagonistas acabam por ocasionar respostas aversivas, autonômicas e de fato um aumento da ansiedade nos animais [65] Apesar de termos trabalhado com apenas uma droga que atua via neurotransmissão mediada pelo GABA, temos que salientar as diversas evidências que sustentam outros neurotransmissores e neuromoduladores na ansiedade que incluem aminas biogênicas como a noradrenalina, dopamina e alguns peptídeos. O fato da injeção intraperitoneal de PTZ ter sido capaz de inibir reações de fuga pela microinjeção de NMDA na MCPD mostra a importância do papel do GABA na modulação dos níveis de ansiedade [66].

O efeito do PTZ sugere que a ação deste antagonista na neurotransmissão do GABA pode influenciar na reação de fuga dentro de um contexto experimental. Mais uma vez

evidencia-se que o efeito de uma ansiedade antecipatória, replicada experimentalmente pela ação do PTZ nos animais, pode inibir uma resposta de fuga induzida pela microinjeção de NMDA na MCPD.

Por sua vez a hipótese que a ansiedade antecipatória reduz a resposta de fuga foi experimentalmente testada a pouco tempo [67]. Como esperado, os resultados demonstraram que ratos expostos a um determinado contexto previamente associado com choque nas patas demonstraram menor resposta de fuga eliciada pela estimulação elétrica da MCPD.

Outros estudos demonstraram resultados farmacológicos similares sugerindo que o aumento da ansiedade inibe a ocorrência de ataques de pânico. Pacientes com Transtorno de Pânicos tratados com drogas que bloqueavam a recaptção de 5-HT mostraram uma diminuição nos ataques de pânico [68] Portanto, parece que a ativação da circuitária neural envolvida na ansiedade pode de fato inibir a incidência de pânico.

Finalmente, nossos resultados têm uma consequência imediata na compreensão à cerca da relação entre ansiedade e pânico em humanos. Experimentos bem controlados indicam que há duas, mas diferentes circuitárias neurais responsáveis pela ocorrência de vias opostas dos comportamentos defensivos animal [69]. Um sistema, relacionado a uma postura de congelamento defensivo, envolve a ativação do complexo amigdalóide e da MCPV. O mau funcionamento deste sistema defensivo como falado antes parece estar relacionado aos Transtornos de Ansiedade Generalizada [70]

O outro sistema é responsável pela via completamente oposta do comportamento defensivo. Ele envolve formas extremamente vigorosas de comportamento ativo, como as reações tipo fuga-luta. A MCPD está claramente associada com estas respostas defensivas ativas estereotipadas e sua hiperativação parece esta relacionada ao Transtorno do Pânico [50]. A injeção intraperitoneal de PTZ, tendo o papel de eliciar o que seria uma ansiedade antecipatória por meio farmacológico no animal, acabou por inibir uma resposta de fuga corroborando com a hipótese proposta deste trabalho [71]

Estudos em humanos demonstraram também que pacientes que sofrem de transtorno de pânico preferem se manter ocupados deixando os seus níveis de ansiedade altos do que relaxarem. [72]

Leva-se em conta que a frequência de ataques de pânico é maior no início da agorafobia, quando há pouca ansiedade antecipatória, se comparada com a última fase, quando a ansiedade esta totalmente desenvolvida [73]. Existem evidências que mostram que a sensação de medo extremo experienciada por pacientes que sofrem de transtorno de pânico não está relacionada à atividade cortical, entretanto a mesma é produzida por atividades neurais hipotalâmicas e representações da MCP [74]. Por outro lado a ansiedade antecipatória está relacionada à atividade do córtex cingulado anterior. [27]

Estas evidências mostram que tanto a ansiedade antecipatória quanto o pânico são ativadas por diferentes partes dentro da circuitária cerebral. Com isso podemos afirmar que a mesma circuitária neural que comanda as reações de defesa inata eliciadas pela injeção de drogas ansiogênicas também têm envolvimento nos ataques de pânico.

## **Referências**

- 1- KIM, J; GORMAN, J. Psychobiology of anxiety. *Clinical Neuroscience Research*; V 4, p. 335-47, 2005
- 2- DARWIN, C. A Origem das Espécies e a Seleção Natural. HEMUS
- 3- FREUD, S. Inhibition, symptoms and anxiety. In: Strachey J. Editor The Standart edition of complet works of Sigmund Freud vol. 20.London: The Hogarth Press 1959.

- 4- ALMEIDA - FILHO, N; MARI, J. J., COUTINHO, E., FRANÇA, J. F., FERNANDES, J., ANDREOLI, S. B. & BUSNELLO, E. D. (1997). Brazilian multicentric study of psychiatric morbidity. *British Journal of Psychiatry*, 171, 524-529.
- 5- CLASSIFICAÇÃO DE TRANSTORNOS MENTAIS E DE COMPORTAMENTOS DA CID-10: Descrições clínicas e Diretrizes Diagnósticas. Coord. OMS, trad. Dorgival Caetano. Porto Alegre: Artes Médicas,1993.
- 6- DRACU, L. LADER, M. Ansiedade: conceito, classificação e biologia. Uma interpretação contemporânea da literatura. *Jornais Brasileiros de Psiquiatria*, 1993; 42(1): 19-32.
- 7- DSM IV<sup>TR</sup>: Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais. Porto Alegre: Artes Médicas, 1995.
- 8- BLANCHARD, R.J., BLANCHARD, D.C. & HORI, K. An ethoexperimental approach to the study of defense. Em R.J. Blanchard, P. F. Brain, D. C. Blanchard, & S. Parmigiani (Eds), *Ethoexperimental approaches to the study of behavior*. Boston: Kluwer Academic Publishers NATO ASI Series D, V 48, p 114-36, 1989
- 9- KAPLAN, H., SADOCK, B. J. & GREBB, J. A. (1997). *Compêndio de Psiquiatria: Ciência do Comportamento e Psiquiatria Clínica*. Porto Alegre: Artes Médica.
- 10- BLANCHARD R.J, BLANCHARD D.C. In: McNaughton N, Andrews G, editors. *An ethoexperimental analysis of defense, fear and anxiety*.Anxiety, Dunedin: Otago University Press; 1990. p. 124–33
- 11- GRAY, J.A, MCNAUGHTON, N. *The neuropsychology of anxiety:an enquiry into the functions of the septo-hipocampal system*. 2<sup>nd</sup> ed. Oxford: oxford University Press; 2000.
- 12- LANG, P., DAVIS, M; & OHMAN, A. (2000). Fear and anxiety: Animal models and human cognitive psychophysiology. *Journal of Affective Disorders*, 61,137–159.
- 13- FANSELOW M.S., LESTER L. S. A functional behavioristic approach to aversively motivated behaviour: predatory imminence as a determinant of the topograph of defensive behaviour. Em Bolles RC, Beecher MD, editors. *Evolution and Learning* New York: Hillsdale, p 185, 1988
- 14- FANSELOW, M. S. The midbrain periaqueductal gray as a coordinator of action in response to fear and anxiety. Em A. Depaulis & R. Bandler (Eds) *The midbrain periaqueductal gray matter: Functional, Anatomical and immunohistochemical organization*. New York: Plenum NATO ASI Series A, V 213, p 151-73, 1991.
- 15- FANSELOW, M.S. Associative vs topographical accounts of the immediate shock freezing deficit in rats: Implications for the response selection rules governing species specific defensive reactions. *Learning and Motivation*. V 17, p 16-39, 1986<sup>a</sup>
- 16- MCNAUGHTON, N, CORR, P.J, A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 28 (2004) 285–305.

- 17- CRUZ, A.P.M. e LANDEIRA-FERNANDEZ, J. (2001). A Ciência do Medo e da Dor. *Ciência Hoje*, 174, 16-23.
- 18- MAISONNETTE, S., VILLELA, C. e LANDEIRA-FERNANDEZ, J. (2000). Microinfusion of Nefazodone into the Basolateral Nucleus of the Amygdala Enhances Defensive Behavior Induced by NMDA Stimulation of the Inferior Colliculus. *Physiology and Behavior*, 70, 243-247
- 19- LANDEIRA-FERNANDEZ, J., FANSELOW, M. S., DECOLA, J. P. e KIM, J. J. (1995). Effects of Handling and Context Preexposure on the Immediate Shock Deficit. *Animal Learning and Behavior*, 23, 335-338.
- 20- LANDEIRA-FERNANDEZ, J.(1996). Context and Pavlovian Conditioning. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 29, 149-173
- 21- LANDEIRA-FERNANDEZ, J., CRUZ, A.P.M e BRANDÃO, M.L. (2006). Padrões de respostas defensivas de congelamento associados a diferentes transtornos de ansiedade. *Psicologia USP*, 17, 175-192
- 22- CRUZ, A.P.M.C., ZANGROSSI, H., GRAEFF, F.G. e LANDEIRA-FERNANDEZ, J. (1997). Modelos Etofarmacológicos e suas Implicações Para a Seleção de Drogas Ansiolíticas. *Psicologia: Teoria e Pesquisa*. 13, 269-278
- 23- PELLOW, S., CHOPIN, P., FILE, S. E., & BRILEY, M. (1985). Validation of open/closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 14, 149-167.]
- 24- LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; FANSELOW, M. S.; DEOCA, B. Opposite roles of ventral dorsolateral periaqueductal gray in conditioned fear-related defensive behavior. Em: *Soc. Neuroscience Abstract*. 1992, Anaheim, 1992
- 25- FANSELOW, M. S., LANDEIRA-FERNANDEZ, J., DECOLA, J. P. e KIM, J. J. (1994). The Immediate Shock Deficit and Post Shock Analgesia: Implications for the Relationship Between the Analgesia CR and UR. *Animal Learning and Behavior*, 22, 72-76.
- 26- GRAY, J. A. *The Neuropsychology of Anxiety*. New York, Oxford University Press, 1982
- 27- GRAEFF, G. F. Neurotransmitters in the dorsal periaqueductal gray and animal models of panic anxiety. Em Briley M., File S.E. editors. *New concepts in anxiety*. London: Macmillan Press, p 288-312, 1991
- 28- PANKSEPP, J. Toward a general psychobiological theory of emotions. *Behav. Brain Sci.* V 5, p 407-67, 1982
- 29- BLANCHARD D.C., BLANCHARD R.J., RODGERS R.J. Pharmacological and neural control of anti predator defense in the rat. *Aggr Behav* V 16, p 165-75, 1990.
- 30- BOLLES, R.C. Species-specific defensive reactions and avoidance learning. *Psychological Review*. V 71, p 32-48, 1970
- 31- FANSELOW, M.S. Neural organization of the defensive behaviour system responsible for fear. *Psychol Bull Rev*. V 1, p 429-438, 1994

- 32- BLANCHARD D.C., BLANCHARD R.J., RODGERS R.J, WEISS SM. The characterization and modelling of antipredator defensive behavior. *Neurosci Biobehav Rev* 1990; 14:463-72.].
- 33- CANNON, W.B. (2007). In *Encyclopædia Britannica*. Retrieved August 14, 2007, from Britannica Concise Encyclopedia: <http://concise.britannica.com/ebc/article-9359680/Walter-B.-Cannon>
- 34- OLIVEIRA, L.C., NOBRE. M.J., BRANDÃO, M.L. e LANDEIRA-FERNANDEZ, J. (2004). Role of amygdala in conditioned and unconditioned fear generated in the periaqueductal gray. *Neuroreport*. 15, 2281-2285.
- 35- GRAEFF, F.G.; ZANGROSSI, H. Jr. Animal models of anxiety disorders. In: D'haenen, H.; den Boer, J.A and Willner, P. (eds) *Biological Psychiatry*. John Wiley & Son Ltd, New York. 2002
- 36- GRAEFF, G. F. Serotonina, matéria cinzenta periaqueductal e transtorno do pânico. *Rev Bras Psiquiatr* 2003; 25(Supl II): 42-5
- 37- LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Amnesias. Em Brandão, M.L. e Graeff, F.G- Orgs-(2006). *Neurobiology of Mental Disorders*, 157-187. Nova Publishers, Nova York.
- 38- ALMEIDA, L.P, Ramos, P.L., PANDOSSIO, J.E., LANDEIRA-FERNANDEZ, J., ZANGROSSI, H. Jr, e NOGUEIRA RL. (2006). Prior electrical stimulation of dorsal periaqueductal grey matter or deep layers of the superior colliculus sensitizes rats to anxiety-like behaviors in the elevated T-maze test. *Behavioural Brain Research*, 170, 175-181
- 39- CANTERAS NS, GOTO M.Fos-like immunoreactivity in the periaqueductal gray of rats exposed to a natural predator. *NeuroReport* 1999;10:413-8.
- 40- FANSELOW, M. S., KIM, J. J., YOUNG, S. L., CALCAGNETTI, J. J., DECOLA, J. P., HELMSTETTER, J. F. e LANDEIRA-FERNANDEZ, J.(1991). Differential Effects of Selected Opioid Receptor Antagonists on the Acquisition of Pavlovian Conditioning. *Peptides*, 12, 1033-1037.
- 41- BEHBEHANI, M. M. 1995. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. *Prog. Neurobiol* 46:575-605.
- 42- DEAKIN, J.W.F.; GRAEFF, F. G. 5-HT and mechanisms of defense. *Journal of Psychopharmacology*, 1991; 5:305-315
- 43- FANSELOW, M. S.; KIM, J. J. ; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Anatomically selective blockade of Pavlov fear conditioning by application of NMDA antagonist to the amygdala and periaqueductal gray. In: *SOC. Neuroscience Abstract*, 1991. Nova Orleans, 1991.
- 44- SWANSON, LW, PETROVICH GD. What is the amygdala? *Trends Neurosci* 1998; 21:323-31
- 45- CRUZ, A.P.M., PINHEIRO, G., ALVES, S.H., FERREIRA, G., MENDES, M., FARIA, L., MACEDO, C.E., MOTTA, V. e LANDEIRA-FERNANDEZ, J. (2005). Behavioral effects of systemically administered MK-212 are prevented by ritanserin

microinfusion into the basolateral amygdala of rats exposed to the elevated plus-maze. *Psychopharmacology* 182(3):345-354..

46- VIANNA, D.M.L., LANDEIRA-FERNANDEZ, J. e BRANDÃO, M.L. (2001). Dorsolateral and Ventral Regions of the Periaqueductal Gray Matter are Involved in Distinct Type of Fear. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 25, 711-719

47- MAGIEREK, V, RAMOS, P.L, SILVEIRA-FILHO, N. G. da, NOGUEIRA, R.L and LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Context fear conditioning inhibits panic-like behavior elicited by electrical stimulation of dorsal periaqueductal gray

48- RIZVI, T. A., ENNIS, M., BEHBEHANI, M.M, & SHIPLEY, M., T. (1991). Connections between the central nucleus of the amygdala and the midbrain periaqueductal gray: Topography and reciprocity. *Journal of Comparative Neurology*, 303, 121-131.

49- VIANNA, D.M.L., GRAEFF, F.G., LANDEIRA-FERNANDEZ, J. e BRANDÃO, M.L. (2001). Lesion of the Ventral Periaqueductal Gray Reduces Conditioned Fear but does not Change Freezing Induced by Stimulation of the Dorsal Periaqueductal Gray. *Learning & Memory*, 8, 164-169.

50- VIANNA, D.M.L., GRAEFF, F.G., BRANDÃO, M.L. e LANDEIRA-FERNANDEZ, J. (2001). Defensive Freezing evoked by Electrical Stimulation of the Periaqueductal Gray: Comparison Between Dorsolateral and Ventrolateral Regions, *NeuroReport*, 18, 4109-4112

51- SILVA, R.C.B., CRUZ, A.P.M., LANDEIRA-FERNANDEZ, J, AVANZI, V. & BRANDÃO, M.L. (2002). Distinct Contributions of Median Raphe Nucleus to Contextual Fear Conditioning and Fear Potentiated Startle. *Neuroplasticity*, 9, 233-247

52- NAKAI, M; MAEDA M. 1994. Systemic and regional haemodynamic response elicited by microinjection of N-methyl-D-aspartate into the lateral periaqueductal gray matter in anaesthetized rats. *Neuroscience* 58:777-783

53- ABREU-RODRIGUES, J.; HANNA, E. S.; CRUZ, A. P.M; Matos, R.; DELABRIDA, Z. Differential effects of midazolam and pentylentetrazole on behavioral repetition and variation. *Behavioural Pharmacology*. 15(8):535-543, December 2004.

54- Disponível em [www.ib.usp.br/sbneec](http://www.ib.usp.br/sbneec)

55- PAXINOS, G.; WATSON, C. The brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, New York, 1986.

56- BLANCHARD RJ, GRIEBEL G, HENRIE JA, BLANCHARD DC. Differentiation of anxiolytic and panicolytic drugs by effects on rat and mouse defense test batteries. *Neurosci Biobehav Rev* 1997;21:783-9.

57- LANDEIRA-FERNANDEZ J, DECOLA, J.P., KIM, J.J.e FANSELOW, M.S.(2006). Immediate shock deficit in fear conditioning: effects of shock manipulations. *Behavioral Neuroscience*, 120, 873-879

- 58- LANDEIRA-FERNANDEZ, J; DECOLA, J. P; KIM, J. J.; FANSELOW, M. S. Immediate Shock Deficit in Fear Conditioning: Effects of Shock Manipulations. *Behavioral Neuroscience*, v. 120, p. 873-879, 2006.
- 59- MALIZIA, A.L, COUPLAND, N.L, NUTT, D.J, in: G. Biggio, E. Sanna, M. Serra, E. Costa (Eds.), *GABAA Receptors and Anxiety: From Neurobiology to Treatment*, Raven Press, New York, 1995, pp. 115–133
- 60- BUENOÀ, C.H, ZANGROSSI, H. Jr., VIANA, M.L. GABA/benzodiazepine receptors in the ventromedial hypothalamic nucleus regulate both anxiety and panic-related defensive responses in the elevated T-maze. *Brain Research Bulletin* 74 (2007) 134–141
- 61- FANSELOW, M. S. Conditional and unconditional components of post-shock freezing. *Pavlovian Journal of Biological Science*, 1980; 15:177-182
- 62- FANSELOW, M. S.; SIGMUND, R. A .Specie specific dangers signals, endogenous opioid analgesia, and defensive behavior, *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Process*, 1986.12:301-309.
- 63- XVI CONGRESSO ANUAL DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE NEUROCIÊNCIA COMPORTAMENTAL, IBNS. Rio de Janeiro, 2007
- 64- BRANDÃO, M.L; AGUIAR, J.C; GRAEFF, F. G. GABA mediation of the antiaversive action of the minor tranquilizers. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 1982; 16: 397-402.
- 65- DELUCA, M.C.Z., BRANDÃO, M.L., MOTTA, V.A. e LANDEIRA-FERNANDEZ, J. (2003). Antinociception induced by stimulation of ventrolateral periaqueductal gray at the freezing threshold is regulated by opioid and 5-HT<sub>2A</sub> receptors as assessed by the tail-flick and formalin tests. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 75, 459-466
- 66- BRANDÃO ML, ANSELONI VZ, PANDÓSSIO JE, DE ARAÚJO, JE, CASTILHO, VM. Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. *Neurosci Biobehav Rev* 1999; 23:863-75.
- 67- BITTENCOURT, A.S., CAROBREZ, A. P., ZAMPROGNO, L. P., TUFIK, S., SCHENBERG, L.C. Organization of single components of defensive behaviors within distinct columns of periaqueductal gray matter of the rat: Role of N-methyl d-aspartic acid glutamate receptors. *Neuroscience*. V 125, p 71-89, 2004
- 68- BANDLER, R; SHIPLEY, M.T. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? *Trends Neurosci* 1994; 17:379–89.
- 69- FANSELOW, M. S. Analgesia as a response to aversive Pavlovian conditional stimuli: Cognitive and emotional mediators. In Denny, Maurice Ray (Ed). *Fear, avoidance, and phobias: A fundamental analysis*. Hillsdale, NJ, England: Lawrence Erlbaum Associates, Inc. 1991b; 61-86.
- 70- BRANDÃO, M.L, VIANNA, D.M, MASSON, S e SANTOS, J. Organização neural de diferentes tipos de medo e suas implicações na ansiedade. *Rev Bras Psiquiatr* 2003; 25(Supl II): 36-41.

- 71- GRAEFF, F.G. Ansiedade, pânico e o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 2007; 29(supl I):S3-6
- 72- COGHILL, R.C, TALBOT J.D, EVANS, A.C, MEYER, E, GJEDDE, A, BUSHNELL, M.C, DUNCAN, G.H. Distributed processing of pain and vibration by the human brain. *J Neurosci* 1994; 14:4095–108.
- 73- CASTRO, C.A. A Herança de Franz Joseph Gall. O cérebro ao serviço do comportamento humano. McGraw-Hill. 1999
- 74- GRAEFF, F.G. Brain defense systems and anxiety. In: Burrows GD, Roth M, Noyers Jr, eds. *Handbook of anxiety*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers; 1990. p. 307-54.