



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

EFEITOS COMPORTAMENTAIS DA ESTIMULAÇÃO DOS NÚCLEOS CENTRAL E MEDIAL DA AMÍGDALA

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas

Catarine Conti

Orientador:

Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg

Vitória, ES

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências
Fisiológicas do Centro Biomédico
da Universidade Federal do Espírito
Santo, para obtenção do título de
Mestre em Ciências Fisiológicas.**

Conti, Catarine Lima

Título: EFEITOS COMPORTAMENTAIS
DA ESTIMULAÇÃO DOS NÚCLEOS CENTRAL E
MEDIAL DA AMÍGDALA.

Catarine Lima Conti. – Vitória, 2005.

Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-
Graduação em Ciências Fisiológicas, Centro
Biomédico, Universidade Federal do Espírito
Santo.

Orientador: Prof. Dr. Luiz C. Schenberg

1. Amígdala Central, 2. Amígdala Medial, 3.
Comportamento de Defesa, 4. Estimulação
Elétrica, 5. Rato.

**EFEITOS COMPORTAMENTAIS DA ESTIMULAÇÃO DOS NÚCLEOS
CENTRAL E MEDIAL DA AMÍGDALA.**

CATARINE CONTI

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro Biomédico da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Aprovado por:

Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg - Orientador

Departamento de Ciências Fisiológicas – UFES

Prof. Dr. Athelson Stefanon Bittencourt – Co-orientador

Departamento de Ciências Fisiológicas – UFES

Prof. Dr. Newton Sabino Canteras - Departamento de

Fisiologia e Biofísica - USP

Prof^a. Dr^a. Leila César Vargas

Universidade de Vila Velha

Vitória, 24 de junho de 2005

Dedico esta Dissertação de Mestrado àquelas pessoas que simplesmente desejaram que este dia chegasse...

AGRADECIMENTOS

Ao autor da vida e de toda ciência: Jesus.

Ao orientador professor Schenberg por ter me acolhido e investido preciosos tempos me ensinando um pouco do UNIVERSO de informações contidas naquele cérebro.

Aos pais por todo suporte necessário para que eu vencesse esta etapa.

Aos irmãos pelo enooooorme incentivo.

Aos avós pelos conselhos e intensas orações.

Aos familiares pelo envolvimento e apoio.

Aos mestres Washington e Wanize por nos fazerem sonhar e lutar por uma vida mais 'recheada' de conhecimento.

Aos da família da fé (que nem entendem direito o que eu fiz no mestrado mas acham 'super chic') por estarem juntos nos momentos de *stress*, me tolerando, sempre se preocupando.

Aos colegas do laboratório, por estarem juntos em todos os momentos.

Aos demais professores, colegas e funcionários do departamento de ciências fisiológicas pela amizade e momentos de apoio.

A todos que de alguma forma contribuíram para a chegada deste ilustre momento em minha vida.

Viva intensamente cada dia. Ao acordar pergunte a Deus porquê você acordou. Dê uma boa espreguiçada antes de levantar. Levante devagar para não ficar tonto. Se a cama te atrai, durma mais 5 minutinhos. Tente lembrar o que sonhou. Algumas vezes os sonhos vêm de Deus. Muitas vezes vêm do cérebro mesmo. Cante um louvor. Ore. Agradeça. Se você acordou muito cedo, não pense que foi só você. Tire logo seu pijama. Se vista bem para você mesmo. Olhe pela janela, observe o tempo, veja que perfeito. Agora sim, pode olhar para sua agenda. Se programe. Tenha calma, Deus está no controle de tudo. Tome café direito. Coloque alguma comida na bolsa, pra você ou pra alguém. Se possível, dê uma chegada na varanda. Fale com quem você esbarrar no corredor da sua casa. Lembre que nada é seu. Tudo é do Senhor, tudo vem Dele. Seja responsável. Não seja inimigo do porteiro, isso é péssimo. Não seja inimigo de ninguém. Pense se não é melhor estacionar o carro de ré. Confie em Deus, mas feche bem seu carro. Se o Espírito Santo mandar, fale. Se o Espírito santo mandar, faça. Pense coisas boas. Pense bem dos outros. Não julgue. Não fofoque. Não fale sobre pessoas. Fale sobre idéias. Não erre. Se errar, se arrependa. Não repita o mesmo erro. Obedeça. Case-se com alguém que você gosta de conversar. Quando envelhecer, a habilidade de conversar será mais importante que qualquer outra coisa. Mas lembre que o silêncio às vezes é a melhor resposta. Leia mais a bíblia, assista menos TV, leia menos porcarias, profira mais palavras de bênção, não misture Deus com o pecado, não desobedeça, respeite, se humilhe, ajude, contribua sem esperar algo em troca, não concorde com o errado, não ache graça na desgraça. Não perca a esperança. Deus é Fiel. Estude muito. Trabalhe muito. Dê o seu máximo. Se importe em se superar a cada dia. Se for o caso, largue tudo e vai pra onde Deus mandar. Mas, na dúvida, não vá. Cuidado! Deus não é responsável pelas suas loucuras! Viva no centro da vontade de Deus. Adore ao Senhor quando a vontade Dele for feita. Viva adorando ao Senhor. Se tem alguém doente, vai melhorar ou vai morrer. Adore ao Senhor por qualquer fim. Os céus são mais altos do que a terra. Os planos do Senhor são mais altos do que os nossos. Se não der pra entender hoje, espere que amanhã você vai entender. Tenho certeza. O tempo de Deus está acima do sol. O nosso está abaixo do sol. Creia no sobrenatural. Não despreze o natural. Admire a ciência. Todas as coisas na mais perfeita ordem. Ignore o acaso. O acaso não traz ordem. Deus é o Criador. Faça visitas. Se envolva com missões. Ofereça carona. Console o desconsolado. Tenha paciência. Dê atenção a quem precisa. Seja bom. Mas, não seja bobo! Quando não estiver de acordo, fale, lentamente, e na hora. Pode ficar com raiva, mas não descarregue sua ira em alguém... Não perca o costume de dizer "obrigado", nem de dizer "desculpa". Na dúvida, pense em "o que Jesus faria?". Pra terminar: ame a Deus acima de todas as coisas, e torne-se conhecido pelo amor que você tem pelas pessoas... vivendo intensamente cada dia.

(Catarine Conti)

Durante a realização do presente trabalho, a autora foi beneficiária de bolsa concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 A AMÍGDALA	2
1.1.1 Conexões do Núcleo Central	2
1.1.2 Conexões do Núcleo Medial	3
1.1.3 A Amígdala Ampliada (Extended Amygdala)	4
1.1.4 A Dupla Natureza da Amígdala	5
1.2 FUNÇÕES COMPORTAMENTAIS DA AMÍGDALA	6
1.2.1 Estudos Pioneiros	6
1.2.2 Comportamentos de Defesa e Emoções Associadas	8
1.2.3 Amígdala e Memória Aversiva	12
1.3 FUNÇÕES ESPECÍFICAS DOS NÚCLEOS CENTRAL E MEDIAL DA AMÍGDALA	14
1.4 ANÁLISE LOGÍSTICA DOS LIMIARES	15
2 OBJETIVOS	17
3 MATERIAL E MÉTODO	19
3.1 ANIMAIS	20
3.2 ELETRODO	21
3.3 CIRURGIA	21
3.4 ESTIMULAÇÃO INTRACRANIANA	22
3.5 REGISTROS COMPORTAMENTAIS	24
3.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA	26
3.7 ESTATÍSTICA	27
3.8 ESTIMULAÇÃO COM ALTAS INTENSIDADES	29
4 RESULTADOS	30

4.1 SÍTIOS ESTIMULADOS	31
4.2 REGISTROS COMPORTAMENTAIS	31
<i>4.2.1 Comparação das Curvas de Resposta do Grupo Controle aos Grupos da ACe e AMe Estimulados com Pulsos Senoidais</i>	32
<i>4.2.2 Comparação das Curvas de Resposta do Grupo Controle aos Grupos da ACe e AMe Estimulados com Pulsos Quadrados.....</i>	34
5 DISCUSSÃO	40
6 CONCLUSÕES	51
7 RESUMO	53
8 ABSTRACT	55
9 REFERÊNCIAS	57
10 ANEXOS	108

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 - Conexões diretas entre o núcleo central da amígdala e uma variedade de áreas hipotalâmicas e do tronco cerebral que podem estar envolvidas em diferentes respostas.	29
Figura 2 - Gaiola de manutenção dos ratos.	33
Figura 3 – Eletrodo para a implantação.	34
Figura 4 – Cabeça do animal fixada ao estereotáxico com exposição da calota craniana e dos parafusos de ancoragem da prótese.	36
Figura 5 – Montagem experimental com experimentadora registrando os comportamentos numa planilha.	37
Figura 6 – Corte coronal do cérebro do rato corado com vermelho neutro mostrando o trato do eletrodo implantado no núcleo medial da amígdala.	40
Figura 7 - Cortes coronais do complexo amigdalár do rato mostrando a posição do eletrodo (seta) na amígdala central (<i>esquerda</i>) e medial (<i>direita</i>).	45
Figura 8 - Localização dos eletrodos implantados na amígdala dos animais que foram utilizados na análise estatística.	46
Figura 9 - Curvas intensidade-resposta dos comportamentos espontâneos (controle) e produzidos pela estimulação senoidal (0-60 μ A) dos núcleos amigdalares central e medial.	48
Figura 10 - Gráfico das intensidades medianas (\pm 1,96 EP) das respostas comportamentais obtidas por estimulação senoidal nos grupos controle, amígdala central e amígdala medial.	49
Figura 11 Curvas intensidade-resposta dos comportamentos espontâneos (controle) e produzidos pela estimulação por frequência (0-130 Hz) dos núcleos amigdalares central e medial.	51
Figura 12 - Gráfico das intensidades medianas (\pm 1,96 EP) das respostas	52

comportamentais obtidas por estimulação de onda quadrada nos grupos controle, amígdala central e amígdala medial.	
Tabela 1 – Etograma de um rato isolado numa arena de 60 cm de diâmetro e altura utilizado para o registro dos comportamentos dos grupos experimental e fictício.	38
Tabela 2 - Protocolo experimental dos grupos estimulados com pulsos senoidais (SEN) ou quadrados (FRQ) e dos controles com estimulação fictícia (FIC).	42
Tabela 3 - Frequência das respostas comportamentais observadas (porcentagem \pm EP) durante a estimulação dos núcleos amigdalares com estímulo fictício (FIC), pulsos senoidal (SEN) e quadrado (FRQ).	45
Tabela 4 – Intensidades (I_{50}) e frequências (F_{50}) medianas ($\pm 1,96$ EP) das respostas comportamentais dos grupos controle, ACe e AMe.	50

ABREVIATURAS

μ A	Microampère
μ m	Micrômetro
ACe	Amígdala Central
AMe	Amígdala Medial
AP	Antero-posterior
BLA	Amígdala basolateral
cm	Centímetro
CnF	Núcleo cuneiforme
EIC	Estimulação intracraniana
FRQ	Frequência
g	Grama
GABA	Ácido gama-amino-butírico
h	Hora
Hz	Hertz
Kg	Quilograma
L	Lateral
LA	Amígdala lateral
LC	Locus Coeruleus
LH	Área hipotalâmica lateral
m	Metro
MCPA	Matéria cinzenta periaquedutal
mg	Miligrama
ml	Mililitro
NIET	Núcleo intersticial da estria terminal
SCD	Sistema cerebral de defesa
SEN	Senoidal
SLSI	Substância inominada sublenticular
V	Ventral

1 INTRODUÇÃO

1.1. A AMÍGDALA

A secção do lobo temporal dos hemisférios cerebrais de humanos revela uma massa de substância cinzenta, em forma de amêndoa, que Burdach denominou núcleo amigdalár, no início do século XIX (Swanson, 1998). Sabe-se que a amígdala de Burdach corresponde ao hoje denominado complexo basolateral da amígdala. Cerca de 50 anos mais tarde, a investigação microscópica de cortes histológicos revelou diferenciações das estruturas do lobo temporal que compreendem a amígdala. Dentre as regiões da amígdala, os núcleos central (ACe) e medial (AMe) têm sido alvos de intensa investigação relacionada aos comportamentos de defesa em mamíferos. O presente estudo re-examinou o papel destes núcleos no comportamento incondicionado de defesa por meio da análise logística dos limiares (Schenberg *et al.*, 1990, 2001; Bittencourt *et al.*, 2004, 2005).

1.1.1 Conexões do Núcleo Central

O núcleo central está inserido no grupo central de núcleos amigdalares, o qual é também constituído pela substância inominada sublenticular (SLSI) e a divisão lateral do núcleo intersticial da estria terminal (NIET, *bed nucleus of stria terminalis*). Outras estruturas também parecem estar relacionadas com o grupo amigdalár central, incluindo a área amigdaloestrial e as massas celulares intercaladas (De Olmos *et al.*, 1985).

O núcleo é uma massa ovóide de células que possui quatro subdivisões: capsular, lateral, intermediária, e medial (Jolkkonen & Pitkänen, 1998). Localizado na parte central dorsal do complexo amigdalár, ele limita-se dorsolateralmente pelo estriado e dorsomedialmente pela extensão caudal da substância inominada,

separando a amígdala do globo pálido (De Olmos *et al.*, 1985).

O grupo amigdalár central recebe aferências de várias áreas do hipotálamo, tanto lateral quanto medial, de núcleos talâmicos (paraventricular e corpo geniculado medial) e estruturas do tronco cerebral como locus coeruleus (LC), núcleo dorsal da rafe e matéria cinzenta periaquedutal (MCPA). Os alvos mais característicos das projeções do grupo amigdalár central são a MCPA, núcleo tegmentar pedunculopontino, área parabraquial e bulbo caudal (núcleos do trato solitário e dorsal motor do vago) (De Olmos *et al.*, 1985).

A ACe tem projeções densas ao NIET, o qual projeta-se para núcleos hipotalâmicos. Tanto a ACe quanto o NIET têm projeções densas a grupos ascendentes de neurônios monoaminérgicos e colinérgicos. Isto inclui o LC (noradrenalina), a substância negra e área tegmentar ventral (dopamina), núcleos da rafe (serotonina) e substância inominada (acetilcolina) (Davis *et al.*, 2001; Price *et al.*, 1987). As projeções da ACe como um todo parecem ser inibitórias (Pitkänen, 1994). Por outro lado, a ACe recebe terminais de áreas hipocámpais e dos córtices entorrinal, perirrinal, pré-límbico e insular. É a principal via de saída das informações amigdalares, recebendo projeções de todos os núcleos da amígdala. Estas projeções dirigem-se principalmente às subdivisões medial e capsular (Jolkkonen & Pitkänen, 1998). Notadamente, a subdivisão lateral recebe aferências extra-amigdalares de origens tanto cortical como subcortical, sugerindo ser o local privilegiado de processamento destas informações (Pitkänen, 2000).

1.1.2. Conexões do Núcleo Medial

O núcleo medial é uma estrutura proeminente que situa-se na região rostromedial, lateralmente ao trato óptico. Está subdividido em quatro partes:

anteroventral, anterodorsal, posteroventral e posterodorsal. Em níveis intermediários, a AMe está separada da ACe, que localiza-se dorsolateralmente à primeira, por uma zona de células denominada distrito intra-amigdalár do NIET. Está inserida no grupo amigdalár medial composto também pelo núcleo intersticial do trato olfatório acessório, núcleo amigdalár cortical posteromedial, área de transição amigdaló-hipocampal e divisões medial e intermediária do NIET. O grupo amigdalár também é composto pela ‘amígdala vomeronasal’ que corresponde à porção da amígdala que está ligada ao sistema olfatório acessório, possuindo intensas comunicações com áreas do hipotálamo medial (De Olmos *et al.*, 1985).

A AMe gera projeções centrífugas para várias partes das vias sensoriais olfatórias principal e acessória, partes do circuito intra-hipocampal, estriado ventral, pálido ventral, NIET na base do telencéfalo, várias regiões do hipotálamo e tálamo, MCPA, área tegmentar ventral e rafe mesencefálica (Canteras *et al.*, 1995). Por outro lado, as principais aferências corticais da AMe provêm do bulbo olfatório, enquanto que as aferências subcorticais originam-se de várias estruturas, especialmente, dos núcleos olfatório anterior, endopiriforme, paraventricular hipotalâmico, geniculado medial, suprageniculado e locus coeruleus. (De Olmos *et al.*, 1985).

1.1.3 A Amígdala Ampliada (*Extended Amygdala*)

Com base nas conexões da amígdala, Alheid e Heimer (1988) propuseram que a amígdala centromedial deveria ser ampliada rostral e medialmente, devido às suas íntimas conexões com as regiões vizinhas, bem como pelo fato destas regiões compartilharem com a amígdala padrões similares de suas projeções descendentes, concluindo que parte do NIET e da substância inominada seriam componentes do complexo amigdalár, sendo este grupo denominado “amígdala

ampliada” (Alheid e Heimer, 1988; Alheid *et al.*, 1995). Na verdade, o conceito de amígdala ampliada deve ser melhor avaliado. As três partes distintas da amígdala ampliada (amígdala, substância inominada, NIET) estão sem dúvida interconectadas, mas está claro que essas vias são parte de um circuito muito maior envolvendo outras partes do cérebro. A mesma lógica sugeriria a existência de um hipocampo ampliado (com a região septal formando um núcleo intersticial do fórnice), ou mesmo um córtex cerebral ampliado (com os gânglios basais formando um núcleo do leito para a cápsula interna) (Canteras *et al.*, 1995).

1.1.4. A Dupla Natureza da Amígdala

Swanson (1998) sugeriu que a amígdala tem uma dupla natureza onde alguns núcleos parecem ser partes diferenciadas do córtex e outros do estriado (caudado putâmen). As projeções descendentes do estriado usam o GABA como neurotransmissor ao passo que neurônios de projeção cortical usam o glutamato. Estudos de neurotransmissores com imunohistoquímica revelam uma densa quantidade de neurônios gabaérgicos que se estendem ventralmente em direção ao caudado putâmen, ACe e AMe. Em contraste, outras partes da amígdala contêm predominantemente neurônios glutamatérgicos. Desta forma, esta seria uma evidência de que parte da amígdala seria estriatal (ACe e AMe) e o resto cortical. A idéia de que a ACe e a AMe formam diferenciações caudoventrais do estriado também possui evidências histoquímicas como: 1) maior parte da expressão de neuropeptídeos amigdalares é encontrada nestes núcleos; 2) muitos dos mesmos peptídeos também são encontrados em outras regiões estriatais, incluindo o caudoputâmen (estriado dorsal), núcleo acumbens e tubérculo olfatório (estriado ventral), e septo lateral (estriado medial); e 3) há uma pequena quantidade de

peptídeos no complexo basolateral que está restrita preferencialmente a interneurônios inibitórios ao invés de neurônios de projeção. Além disso, a AMe desenvolve-se caudalmente ao tubérculo olfatório, o qual é considerado por Swanson & Petrovich (1998) como parte do estriado ventral. Por outro lado, o claustrum, que situa-se entre o estriado e o córtex insular, parece resultar do desenvolvimento da 7ª camada do córtex, que é praticamente vestigial em outras áreas. Evidências embriológicas sugerem que o claustrum se estenda ventromedialmente para regiões dos lobos frontal e temporal, dando origem aos núcleos lateral (LA) e basolateral (BLA). O complexo basolateral, formado por estes núcleos, seria então parte do córtex, juntamente com o núcleo endopiriforme. Por fim, análises morfológicas e neuroquímicas indicam que neurônios do complexo basolateral compartilham muitas características com neurônios corticais (Swanson & Petrovich, 1998).

1.2 FUNÇÕES COMPORTAMENTAIS DA AMÍGDALA

1.2.1. Estudos Pioneiros

Desde a década de 40, inúmeras investigações foram conduzidas com o intuito de se obter informações sobre as funções da região basal do lobo temporal. Freqüentemente, o alvo destas investigações foi o complexo amigdalador, sendo este um complexo nuclear altamente diferenciado na parte medial do pólo frontal do lobo temporal. Como o lobo temporal apenas diferencia-se nos primatas, o complexo amigdalador dos roedores localiza-se no córtex temporal. A descrição fundamental da estrutura amigdalador foi realizada nas primeiras décadas do século XX, dividindo-a em um grupo primitivo de núcleos associados ao sistema olfatório (central, medial, cortical e núcleo do trato olfatório lateral) e um grupo filogeneticamente mais recente (lateral e

basal) (Jonhston, 1923).

O interesse pelas funções comportamentais da amígdala foi despertado pelos estudos de Klüver e Bucy (1939) em macacos. Estes autores descreveram uma síndrome complexa subsequente à excisão bilateral dos lobos temporais, que passou a ser chamada pelos seus nomes. Notavelmente, relataram que a ablação dos lobos temporais produzia uma ‘cegueira psíquica’ (*psychic blindness*), em que os macacos perdiam a capacidade de reconhecimento dos objetos, levando à boca um fósforo aceso, fezes ou até mesmo uma serpente viva. Adicionalmente, tornavam-se hipersexuais, tentando montar outro macho, cães, gatos e até galinhas. Embora dramáticos, estes efeitos eram demasiadamente variados para a caracterização das funções comportamentais inerentes à amígdala.

Contudo, Spiegel *et al.* (1940) relataram que lesões discretas da amígdala em animais intactos produziram respostas de raiva e um aumento geral na reatividade emocional. Estes efeitos eram opostos aos observados em animais intactos após lesões extensas da amígdala. Bard e Mountcastle (1948) relataram um aumento similar da reatividade emocional de gatos após remoção bilateral do lobo piriforme e da amígdala. Seis a oito semanas após a cirurgia, estes animais desenvolveram uma reatividade aumentada, apresentando respostas de raiva a estímulos previamente neutros. Sugeriu-se que o comportamento destes animais seria idêntico à ‘falsa ira’ descrita por Bard (1928) em animais decorticados e que estaria relacionado à liberação de mecanismos hipotalâmicos a partir de influências inibitórias que se originam no giro cingulado, hipocampo e amígdala. Rosvold *et al.* (1954) observaram que macacos amigdalectomizados tornavam-se mais agressivos quando isolados dos outros animais.

Contrariamente, Smith (1950) relatou que lesões envolvendo o complexo amigdalár e formação hipocampal amansavam macacos sem a eliciação dos outros

comportamentos da síndrome de Klüver-Bucy. Investigações subseqüentes da região amigdaló-hipocámpal confirmaram estas observações. Lesões bilaterais destas estruturas em macacos produziram a redução da reatividade emocional por 5-6 meses. Embora os animais tenham mantido a capacidade de responder apropriadamente a uma ameaça, a intensidade do estímulo precisava ser significativamente maior. Estes animais também apresentaram uma leve diminuição na atividade sexual, contrastando com as observações usuais da lesão extensa da amígdala. (Thompson e Walker, 1951; Walker *et al.*, 1953)

Houve um interesse considerável no papel destes núcleos no comportamento sexual. Klüver e Bucy (1939) haviam ressaltado o desenvolvimento de hipersexualidade após a ablação dos lobos temporais. No entanto, enquanto as lesões da amígdala e córtex piriforme não alteraram o comportamento sexual, lesões pequenas no córtex piriforme imediatamente abaixo do núcleo basolateral produziram hipersexualidade (Schreiner e Kling, 1953, 1954, 1956).

1.2.2 Comportamento de Defesa e Emoções Associadas

As áreas do sistema nervoso central cuja estimulação, elétrica ou química, resulta em alterações fisiológicas e comportamentais sugestivas de medo têm sido estudadas do ponto de vista anatômico, fisiológico e farmacológico.

O medo e estados similares estão associados a uma série de comportamentos gerados por indícios ou presença explícita de ameaças físicas (fogo, choque, etc) ou de predadores. Os comportamentos defensivos do rato dependem tanto da distância entre presa e predador (distância defensiva) quanto do contexto em que ocorre o confronto. As distâncias críticas para a eliciação destes comportamentos à aproximação do predador foram examinadas em ratos selvagens (Blanchard *et al.*,

1990). Na ausência de via de escape, tal como ocorre nas situações em que a presa é encurralada, a aproximação do experimentador elicia a reação de congelamento à distância de 2,5 m, e ameaças e ataques defensivos em distâncias menores. Quando existe uma via de escape, os ratos não apresentam a reação de congelamento. Ao contrário, eles fogem quando o experimentador se encontra a 2,5 m de distância, e apresentam ameaças e ataques defensivos na iminência de sua captura. A substituição da fuga pela reação de congelamento na presença de um obstáculo envolve o processamento cognitivo das características ambientais.

O substrato neural destes padrões hierárquicos ainda não está elucidado. Os estudos de Fernandez de Molina e Hunsperger (1962) sugeriram uma organização longitudinal e hierárquica do sistema de defesa. Contudo, esta organização não se referia ao repertório de defesa, mas à importância relativa das estruturas do sistema de defesa na eliciação destas respostas. Assim, mostraram que a lesão da MCPA abolia todos os comportamentos de defesa eliciados pela estimulação das estruturas mais rostrais (amígdala e hipotálamo), não acontecendo o inverso. Hunsperger (1956) definiu a MCPA como um 'sistema autosuficiente' (*selfreliant acting system*) na eliciação dos comportamentos de defesa. Conseqüentemente, estes estudos propuseram uma função aparentemente moduladora das estruturas mais rostrais do sistema de defesa. No entanto, sugeriu-se mais recentemente que a amígdala, o hipotálamo e a MCPA seriam, eles mesmos, o substrato da hierarquia do repertório defensivo do rato (Graeff e Guimarães, 1999; McNaughton *et al.*, 2004). Segundo estes autores, a reação de congelamento seria mediada pela amígdala, a fuga 'dirigida' pelo hipotálamo e a 'fuga não-dirigida' pela MCPA. Como este modelo foi baseado no comportamento de ratos Wistar, ele não contemplou os comportamentos agressivos observados em ratos selvagens (Blanchard *et al.*, 1990).

Contudo, estudos de nosso laboratório mostraram que a hierarquia natural das respostas de defesa dos ratos selvagens pode ser reproduzida pela estimulação com intensidades crescentes da MCPA de ratos Wistar (Bittencourt *et al.*, 2004, 2005; Schenberg *et al.*, 1990; Vargas *et al.*, 2000, 2001). Assim, além das respostas autonômicas (exoftalmia, defecação e micção), os ratos apresentam imobilidade tensa, trote, galope e saltos, seqüencialmente, numa faixa estreita de intensidades (entre 20 e 50 μ A). Como os ataques com salto (*jump attacks*) não foram observados pela estimulação da MCPA de ratos Wistar, o salto de fuga pode ser o componente modificado deste comportamento agressivo na espécie domesticada.

Existem diversos tipos de imobilidade. Além da imobilidade usualmente associada ao medo, chamada reação de congelamento (*freezing reaction*), estados de atenção aumentada também são acompanhados de intensa imobilidade. Por outro lado, a reação condicionada de congelamento (*conditioned freezing*) a um som ou ambiente previamente associados a um choque parece estar associada às eferências da amígdala para a MCPA ventrolateral, uma vez que é atenuada ou abolida por lesões destas áreas (Ledoux *et al.*, 1988; De Oca *et al.*, 1998). Por fim, a imobilidade gerada nas situações de conflito, como é o caso da supressão condicionada do comportamento alimentar produzida pela apresentação de um som previamente associado a um choque, parece envolver outras estruturas, denominadas 'sistema de inibição comportamental' (Gray, 1976). Assim, Amorapanth *et al.* (1999) demonstraram que lesões da MCPA que atenuaram a reação condicionada de congelamento foram ineficazes na supressão condicionada.

Os comportamentos de defesa eliciados pela estimulação elétrica do complexo amigdalár foram analisados nos estudos pioneiros de Kaada *et al.* (1954). Estes autores relataram que a estimulação elétrica da amígdala do gato produzia a cessação da atividade em execução e o aparente aumento da atenção e vigilância. O

animal abaixava a cabeça, elevava as orelhas e realizava movimentos de exploração para o lado contralateral ao estímulo. Relataram ainda que a exploração carecia de alvo, aparentando uma experiência psíquica ou imaginária do ambiente (talvez esquadramento do ambiente ou movimentos de seguimento de um alvo). Shealy *et al.* (1956) também relataram que a estimulação elétrica da amígdala de gatos produzia o aumento da atenção. Adicionalmente, registraram a ocorrência de respostas autonômicas (dilatação da pupila), hipoventilação e comportamentos de fuga (medo), agressão (raiva) e sexuais.

Estudos mais detalhados foram conduzidos por Ursin *et al.* (1960). Estes autores observaram que a estimulação de diversas áreas do complexo amigdalár de gatos eliciou diferentes padrões de comportamento emocional. Respostas de fuga estavam localizadas na zona que vai do núcleo lateral, passando pelo núcleo central, até a cápsula interna. Por outro lado, respostas de agressão defensiva resultaram da estimulação da parte posterior do núcleo lateral e parte lateral do núcleo basal. Desta forma, demonstraram uma topografia distinta da fuga e agressão defensiva no complexo amigdalár. Posteriormente, Ursin (1965) relatou que lesões bilaterais restritas da amígdala de gatos bravios produziam a atenuação ou abolição da resposta de fuga, ou da agressão defensiva, ou ambos. Notadamente, os efeitos diferiam de acordo com a área lesada, corroborando seus achados prévios com estimulação. Por fim, ressaltam que nenhum dos gatos lesados apresentou o aumento do comportamento agressivo.

Além das observações em animais, a estimulação elétrica das áreas do sistema de defesa de humanos fornece evidências diretas do processamento emocional destas estruturas. Particularmente, a estimulação da MCPA dorsal causa estados de medo, terror e pânico (Nashold *et al.*, 1969) que têm sido associados aos ataques de pânico da classificação dos transtornos ansiosos (Gentil, 1988; Deakin e

Graeff, 1991; Schenberg *et al.*, 2001; Vargas e Schenberg, 2001). A estimulação da amígdala produz efeitos mais diversificados, emocionais ou cognitivos (*dejà vu*), que podem ser aversivos ou agradáveis e, às vezes, ocorrer na forma de lembranças (Ervin *et al.*, 1969). Experimentos realizados com a estimulação elétrica da amígdala de 5 pacientes portadores de epilepsia, registrou sensações de medo e ansiedade, alterações no comportamento motor, aumento da frequência cardíaca e pressão arterial (Chapman *et al.*, 1954). Estes resultados corroboraram o envolvimento do complexo amigdalár na expressão das respostas somáticas e viscerais associadas às nossas emoções.

1.2.3 Amígdala e Memória Aversiva

Há duas visões em relação ao papel da amígdala na formação da memória emocional. Por um lado, a amígdala modularia processos mnemônicos de outras regiões cerebrais, como o hipocampo. Por outro, ela processaria aspectos específicos da memória emocional aversiva. Levin (2004) sugere que as duas visões podem ser reconciliadas, sem descartar a possibilidade da participação de outros circuitos na formação da memória emocional. O processamento da emoção na amígdala e hipocampo pode referir-se a aspectos diferentes de uma determinada experiência, ou seja, experiências emocionais podem levar a uma ativação paralela dos sistemas emocional (amígdala) e não-emocional (hipocampo) da memória (LeDoux, 2000). A modulação pela amígdala dos processos mnemônicos de outras regiões do cérebro resultaria num armazenamento de informações diferente do que ocorreria sob condições emocionalmente neutras. LeDoux (2000) sugere que os estímulos emocionais induzem alterações plásticas duradouras em sinapses da amígdala (*long-term potentiation*) que alterariam o funcionamento de outras regiões

cerebrais. A forma como a amígdala vai afetar os processos relacionados com a memória no hipocampo vai depender em grande parte da história pregressa do indivíduo (Levin, 2004).

O condicionamento clássico aversivo é um paradigma de memória emocional que tem sido bastante estudado. Neste, um estímulo neutro (CS – *conditioned stimulus*), como um som, é pareado a um estímulo aversivo, freqüentemente, um choque elétrico (US – *unconditioned stimulus*). Após alguns pareamentos, o estímulo neutro adquire a capacidade de eliciar novas respostas somáticas (congelamento – *'freezing'*), autonômicas (alteração na pressão arterial e freqüência cardíaca) e neuroendócrinas (liberação de hormônios da hipófise e adrenal). Aparentemente, a amígdala participa das respostas autonômicas e neuroendócrinas do condicionamento aversivo através de suas projeções ao hipotálamo, e respostas somáticas através de suas projeções à MCPA (Walker e Davis, 1997; LeDoux *et al.*, 1988; Iwata *et al.*, 1986).

Evidências sugerem que a amígdala armazena informações específicas sobre eventos que produzem medo (Fanselow e LeDoux 1999; LeDoux 2000; Maren 2001). Ela seria, então, a rota pela qual as ameaças inatas distais e os estímulos aversivos condicionados ativariam o sistema cerebral de defesa - SCD (Ledoux, 2000; Deakin e Graeff, 1991). Além de receber aferências sensoriais de estruturas do tronco cerebral e do tálamo, capacitando uma resposta rápida a um estímulo potencialmente ameaçador, a amígdala também troca importantes conexões com o tálamo sensorial, córtex pré-frontal, insula e córtex somestésico primário. Estas projeções estão envolvidas no processamento e avaliação sensorial de todas as modalidades, mas, particularmente, dos telorreceptores: olfação, visão e audição (Deakin e Graeff, 1991, Ledoux, 2000; Gorman *et al.*, 2000). Contudo, embora a amígdala tenha sido implicada nas respostas condicionadas a um estímulo aversivo, evidências sugerem

que a aversão condicionada ao contexto é abolida por lesão hipocampal, mas não da amígdala. Isto sugere que informações sobre o contexto, e talvez localização, sejam codificadas no hipocampo e possam ativar níveis mais caudais do SCD através de projeções hipocampais para o hipotálamo (Selden *et al.*, 1991; Deakin e Graeff, 1991). A amígdala exerceria um papel modulador neste sistema, sintetizando os vários estímulos ambientais e sinalizando o hipotálamo e a MCPA sobre o grau da ameaça (Fanselow, 1991; LeDoux *et al.*, 1988; LeDoux, 2000).

1.3 FUNÇÕES ESPECÍFICAS DOS NÚCLEOS CENTRAL E MEDIAL DA AMÍGDALA

LeDoux *et al.* (1988) estudaram a função de 2 áreas de projeção da ACe, quais sejam, área hipotalâmica lateral (LH) e MCPA, no condicionamento clássico envolvendo o pareamento de um som e um choque. Demonstraram que neurônios na LH estão envolvidos na resposta condicionada autonômica, mas não comportamental, enquanto neurônios na MCPA caudal estão envolvidos na resposta comportamental, mas não na autonômica. Desta forma, diferentes projeções da amígdala central parecem mediar respostas autonômicas e comportamentais do medo condicionado.

Lesões na ACe antes (aquisição) ou após (expressão) o treinamento bloqueiam uma série de respostas indicativas do estado de medo (Goosens, 2001). Todavia, Gallagher & Holland (1994) sugerem que diferentemente do núcleo lateral, a ACe não é um local de aprendizagem e memória, mas uma estrutura envolvida na atenção e vigília durante o medo. No entanto, como a ACe é uma via de saída das informações processadas na amígdala, sua participação como estrutura atencional seria posterior à detecção da ameaça, tornando o animal mais atento aos estímulos relevantes do ambiente. O substrato neural deste mecanismo poderia envolver as

projeções da ACe lateral ao locus cerúleo (LC). Contudo, são projeções relativamente escassas (Van Bockstaele et al., 1999). Lesões neurotóxicas da ACe reduzem o congelamento imediatamente após o condicionamento clássico, mas não em resposta ao odor do predador. Isto sugere que a ACe esteja especificamente relacionada ao medo condicionado, mas não incondicionado (Rosen, 2004).

Ao passo que a estimulação elétrica da ACe produz uma série de reações autonômicas, lesões neste núcleo bloqueiam estas alterações (Kandel, 2003). A figura 1 mostra as conexões diretas entre a ACe e as áreas hipotalâmicas e do tronco encefálico que podem estar envolvidas no desencadeamento destas alterações.

A AMe, através de suas projeções hipotalâmicas, está envolvida na regulação neuroendócrina e na mediação dos comportamentos defensivo e reprodutivo (Canteras *et al.*, 1995). Lesões da amígdala corticomedia, preferencialmente da AMe, produzem um déficit significativo na esquiva condicionada a um oponente dominante. Devido ao fato da lesão ter sido feita após o condicionamento, pode-se afirmar que a AMe está de alguma forma envolvida nos processos de retenção e expressão da informação necessária para evitar o oponente dominante (Luiten *et al.*, 1985).

1.4 A ABORDAGEM DOS COMPORTAMENTOS DE DEFESA POR MEIO DA ANÁLISE LOGÍSTICA DOS LIMIARES.

O desenvolvimento da análise logística dos limiares veio possibilitar a quantificação dos padrões de resposta obtidos pela estimulação intracraniana, visto que desde os estudos iniciais de Hess e Brügger (1943) os comportamentos observados têm sido descritos das formas mais variadas, não fundamentados

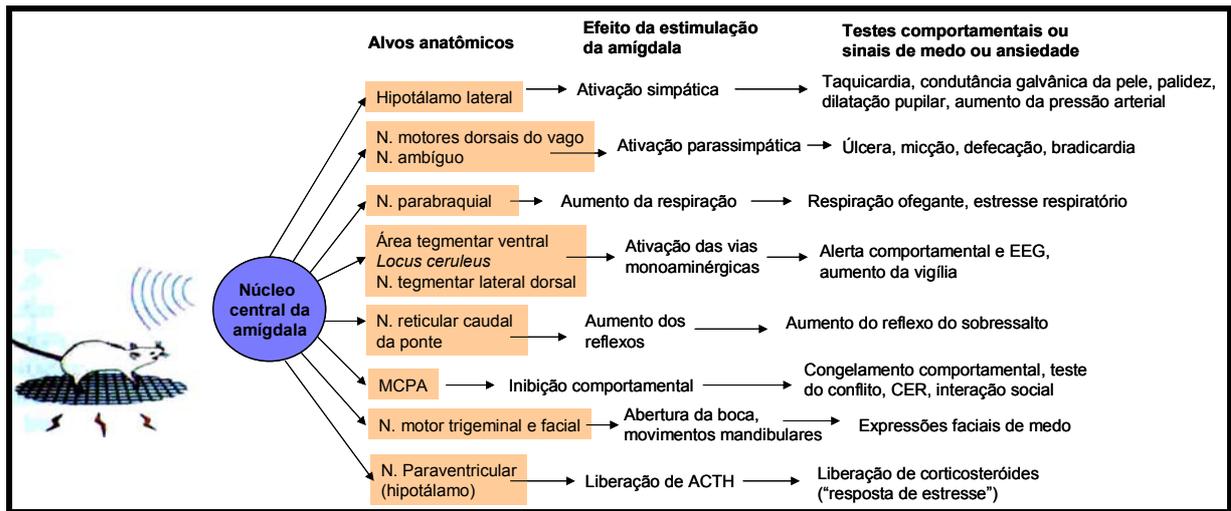


Figura 1 – Conexões diretas entre o núcleo central da amígdala e uma variedade de áreas hipotalâmicas e do tronco cerebral que podem estar envolvidas em diferentes respostas. ACTH - hormônio adrenocorticotrófico; CER - resposta emocional condicionada; EEG - eletroencefalográfico; N - núcleo. (Kandel, 2003).

etologicamente, tornando difícil a caracterização e até mesmo a comparação entre os resultados. O método de análise logística dos limiares tem sido utilizado em nosso laboratório no mapeamento das estruturas envolvidas no sistema de defesa, quais sejam, MCPA, colículo, núcleo cuneiforme, hipotálamo e amígdala. Os dados obtidos são registrados de forma binária, ou seja, é feito um registro da ocorrência ou não de determinada resposta durante o estímulo. Contudo, não oferecem informações quanto à característica do comportamento (duração, repetição, força, amplitude, etc). Para a análise, apenas os limiares de cada resposta são utilizados na análise. Estes dados são informações numéricas que podem ser analisadas estatisticamente, permitindo que os resultados sejam comparados entre si, e com qualquer área estudada. Desta forma a análise logística dos limiares tem dado sua contribuição no mapeamento do substrato neural envolvido nos comportamentos de defesa.

2 OBJETIVOS

Análise logística dos limiares das respostas produzidas por estimulação de baixa resolução espacial com pulsos senoidais de frequência constante (60 Hz) e corrente variável (0-70 μ A).

Análise logística dos limiares das respostas produzidas por estimulação de alta resolução espacial com pulsos quadrados de intensidade fixa e frequência variável (0-130 Hz).

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos albinos adultos (N=160), da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), pesando 250-300 g, fornecidos pelo biotério de pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, da Universidade Federal do Espírito Santo. Os animais eram mantidos em gaiolas individuais com paredes de vidro (25 x 15 x 30 cm) e assoalho coberto com jornal e serragem. Os ratos tinham livre acesso à água e ração e eram mantidos em ambiente com ciclo controlado de iluminação de 12 h (luzes acesas às 6 h) e temperatura (20 – 25 °C). Destes animais, 40 foram empregados para o grupo com estimulação fictícia, 15 para a estimulação da ACe e 17 da AMe, totalizando 72 animais.



Figura 2 – Gaiola de manutenção dos ratos.

Os outros ratos tiveram eletrodos localizados nos núcleos lateral, basolateral, basomedial, cortical, estria terminal, trato óptico e regiões internucleares.

3.2 ELETRODO

Os eletrodos eram confeccionados com um fio de aço inoxidável (Califórnia Fine Wire Company, Grover City) de 250 μm de diâmetro externo e isolado em toda extensão, exceto na secção transversal de sua extremidade. Um outro fio de aço inoxidável, não isolado, servia como eletrodo indiferente. Este e o eletrodo eram soldados a um soquete de circuito integrado (Celis, BCPT, SP, Brasil).

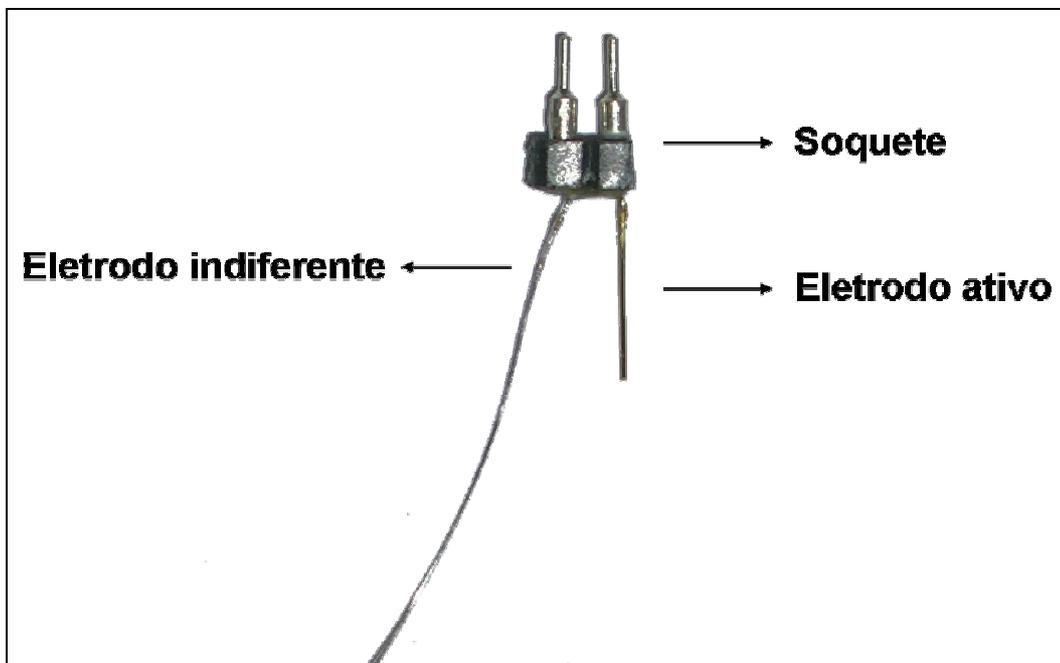


Figura 3 – Eletrodo para a implantação.

3.3 CIRURGIA

Os animais eram anestesiados com hidrato de cloral (400 mg / Kg) e fixados ao aparelho estereotáxico (David Koff, Tujunga, EUA). Em seguida realizava-se a tricotomia da parte superior da cabeça, seguida da remoção de uma pequena área circular de pele e tecido subcutâneo, expondo a calota craniana próximo ao bregma, com este exposto. Após a limpeza e secagem desta área, quatro orifícios

eram feitos com o auxílio de uma broca odontológica para a fixação de pequenos parafusos de aço inoxidável que serviam de âncora para a prótese cirúrgica (Fig. 4) .

Em seguida, com o auxílio de uma broca odontológica adiamantada (KG Sorensen 1016, SP, Brasil), realizava-se a trepanação de uma pequena área no lado direito do osso parietal para a implantação do eletrodo. Este era implantado na amígdala direita utilizando-se o bregma como referência ântero-posterior (AP); a linha mediana do cérebro como referência lateral (L), e a superfície da calota craniana na linha mediana como referência vertical (V). As medidas para implantação na ACe foram : AP = -2,6 mm; L = -4,2 mm; V = -8,0 mm e na AMe: AP= -2,4 mm; L = -3,6 mm; V = -8,6 mm. Antes da introdução do eletrodo, era feita uma pequena incisão na dura-máter, com o auxílio de uma agulha, para facilitar sua penetração, evitando a compressão do tecido cerebral. Após a implantação do eletrodo, era soldado o fio terra em um dos parafusos. Preenchia-se o campo cirúrgico com resina acrílica autopolimerizável (JET, São Paulo, BR), colando o eletrodo e os parafusos a uma prótese sólida. Um tubo plástico de cerca de 1 cm de altura e diâmetro era fixado sobre a prótese para proteção do eletrodo.

Ao término da cirurgia, os animais eram alojados em gaiolas individuais aquecidas por placa de madeira até se recuperarem da anestesia e eram então transferidos ao biotério.

3.4 ESTIMULAÇÃO INTRACRANIANA

Após 5 dias de recuperação da cirurgia os animais eram colocados numa arena cilíndrica de acrílico transparente, com 60 cm de diâmetro e altura, para serem estimulados. Os animais eram submetidos a 2 sessões de estimulação em dias consecutivos: 1) estimulação elétrica variando-se a intensidade de um pulso senoidal

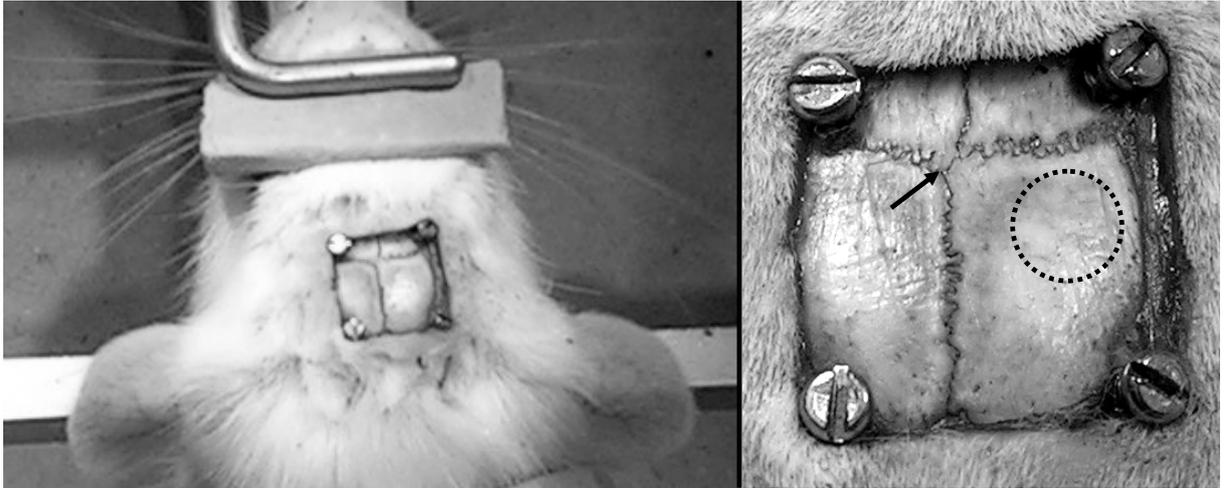


Figura 4 – Cabeça do animal fixada ao estereotáxico com exposição da calota craniana e dos parafusos de ancoragem da prótese. Na figura ampliada à direita, a seta indica o bregma e a área pontilhada o local da trepanação para a implantação do eletrodo na amígdala.

(SEN) de frequência fixa (60 Hz); e 2) estimulação elétrica variando-se a frequência de um pulso quadrado (FRQ) de intensidade fixa.

A estimulação elétrica era realizada por meio de um cabo elétrico leve e flexível acoplado a um conector giratório de mercúrio. Os pulsos eram monitorados por meio de um osciloscópio (V-121 Hitachi-Denshi, Malásia). Para as sessões de estimulação com onda senoidal, os ratos foram estimulados com intensidades crescentes (0-70 μ A), em passos de 5 μ A. Na estimulação por frequência, foram aplicados pulsos quadrados monofásicos, catódicos, com 1 ms de duração e intensidade média de 30 μ A. Esta estimulação era realizada com frequências crescentes (0-130 Hz) em passos de 10 Hz. A estimulação com ambos tipos de onda utilizou trens de 20 segundos e intervalos entre-estímulos de 3 minutos.

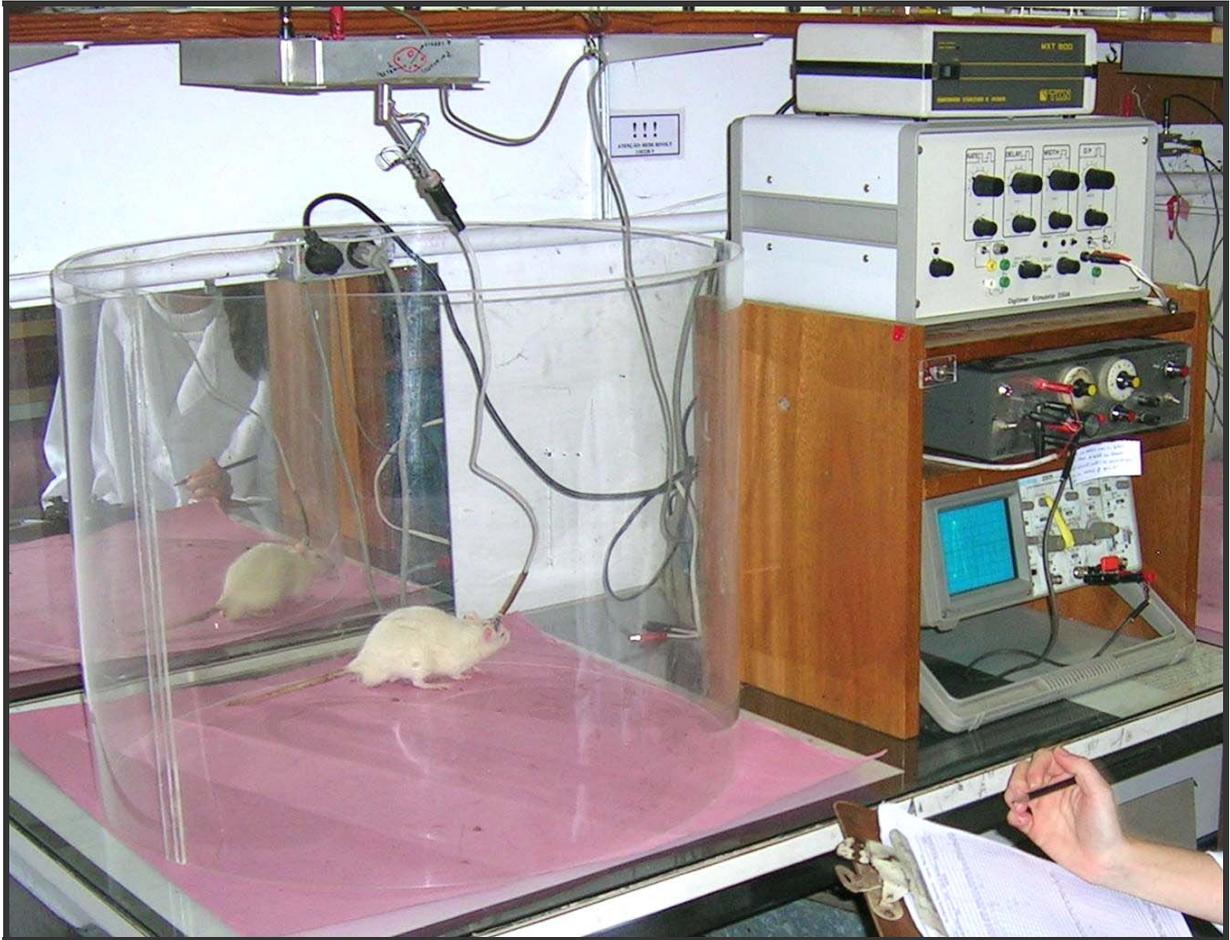


Figura 5 – Montagem experimental com experimentadora registrando os comportamentos numa planilha.

3.5 REGISTROS COMPORTAMENTAIS

Após serem acoplados ao sistema de estimulação, os ratos eram colocados na arena, aguardando-se 10 minutos para o início da estimulação, de forma que o animal se habituassem ao novo ambiente. Durante a estimulação, os comportamentos eram registrados de forma binária, ou seja, se o animal emitia ou não a resposta, independentemente de sua frequência ou duração durante os 20 segundos de estimulação. O registro dos comportamentos era realizado por meio de uma planilha (Anexo 1) com os itens do etograma abaixo (Tab. 1):

Tabela 1. Etograma de um rato isolado numa arena de 60 cm de diâmetro e altura utilizado para o registro dos comportamentos dos grupos experimental e fictício.

<i>Dormir</i>	Postura horizontal com olhos fechados e sem atividade olfativa, com relaxamento muscular indicado pelo rebaixamento do tronco, cabeça e pescoço, e pela flexão dos membros.
<i>Repouso</i>	Postura horizontal com olhos abertos ou semi-abertos, atividade olfativa reduzida e relaxamento muscular indicado pelo rebaixamento do tronco e pela flexão dos membros, e/ou rebaixamento da cabeça e pescoço.
<i>Olfacção</i>	Jorros de atividade olfativa indicada pelo movimento do focinho e vibrissas.
<i>Esquadrinhar</i>	Exploração visuo-motora do ambiente caracterizada por movimentos laterais da cabeça, geralmente acompanhados de olfacção.
<i>Autolimpeza</i>	Postura ereta sobre as patas posteriores flexionadas (“rato sentado”), acompanhada da manipulação repetitiva e seqüencial dos pêlos da cabeça, tronco e genitálias, usando as patas dianteiras ou a boca.
<i>Levantar</i>	Postura ereta com extensão das patas posteriores.
<i>Marcha</i>	Locomoção lenta do animal com movimentos de apoio e balanço em oposição de fase das patas contralaterais.
<i>Quiescência</i>	Interrupção transiente do comportamento em curso, sem exoftalmia.
<i>Exoftalmia</i>	Abertura máxima dos olhos que assumem a forma esférica e cor brilhante, presumivelmente devido uma maior entrada de luz, favorecendo um aumento do campo visual.
<i>Defecação</i>	Eliminação de fezes.
<i>Micção</i>	Eliminação de urina.
<i>Imobilidade</i>	Cessar brusco de todos os movimentos, exceto da respiração, frequentemente acompanhada de extensão dos membros, elevação do tronco, orelhas e pescoço e, às vezes, da cauda, indicando o aumento do tônus muscular.
<i>Trote</i>	Locomoção rápida do animal ao longo do perímetro da arena (peritaxia) mantendo o padrão da marcha.
<i>Galope</i>	Locomoção muito rápida ao longo do perímetro da arena, alternando movimentos de apoio e projeção dos membros anteriores e posteriores.
<i>Saltos</i>	Impulso vertical ou oblíquo em direção à borda da arena.

3.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Ao término dos experimentos, os animais eram anestesiados e sacrificados para preparação dos cortes histológicos. Após a exposição do coração e a ligadura da aorta descendente, uma agulha era introduzida no ventrículo esquerdo e fazia-se um pequeno corte no átrio direito para saída do perfusato. Os ratos eram perfundidos por método gravimétrico, conectando-se a agulha aos frascos de salina (NaCl 0,9 %) e formaldeído (10 %) localizados 1,5 m acima do animal. Em seguida, realizava-se a perfusão seqüencial com 100 ml de salina e formaldeído. Os ratos eram, então, decapitados e suas cabeças mantidas em formaldeído por, pelo menos, 5 dias para moldagem do trato do eletrodo. Por fim, os cérebros eram removidos e colocados em solução de formaldeído por mais 5 dias.

No momento da microtomia, os cérebros eram preparados em blocos da região implantada. Os blocos eram posicionados em um micrótomo de congelamento (Ernst Leitz, Wetzlar, Alemanha) e seccionados em cortes de 60 μm de espessura, que eram montados em lâminas previamente gelatinizadas (anexo 2), e submetidos à secagem em estufa de baixa temperatura (38 °C). Após 24 h, os cortes eram corados com vermelho neutro (Sigma, EUA) e as lâminas montadas com DPX (Aldrich Chemical Company, EUA) (anexo 3). Os sítios estimulados eram identificados com o auxílio de uma câmara lúcida de projeção e registrados em diagramas coronais do Atlas do cérebro de rato de Paxinos e Watson (1998).

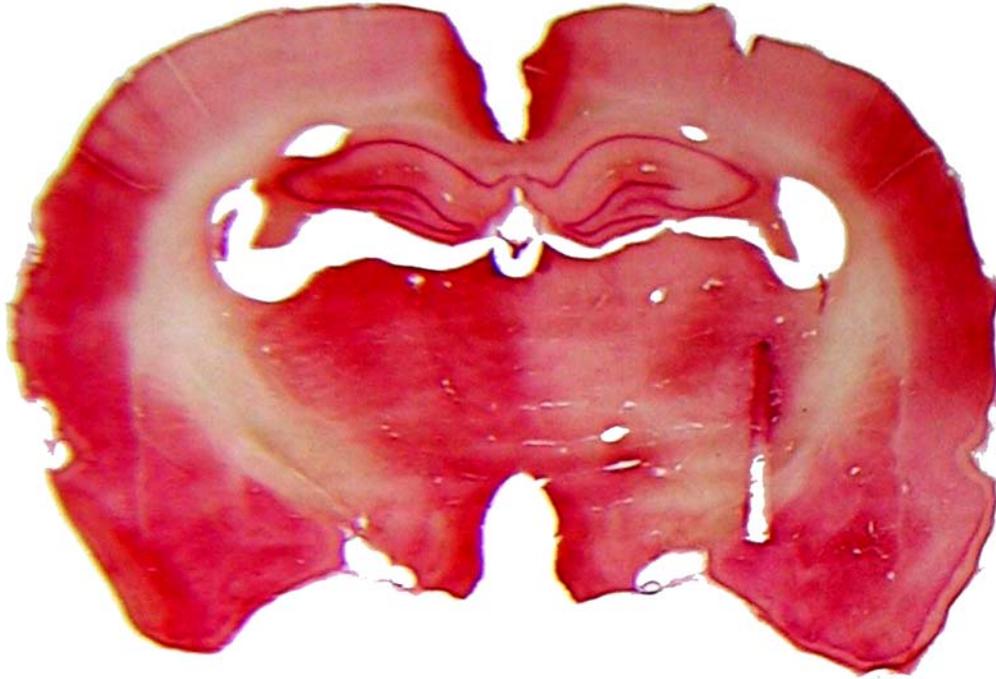


Figura 6 – Corte coronal do cérebro do rato corado com vermelho neutro mostrando o trato do eletrodo implantado no núcleo medial da amígdala.

3.7 ESTATÍSTICA

Os resultados dos ratos cujos eletrodos localizaram-se na ACe e AMe, bem como do grupo controle, foram submetidos à análise estatística. As curvas de probabilidade de resposta foram obtidas por meio de ajuste logístico das freqüências acumuladas de resposta (anexo 4) em função do logaritmo das intensidades de corrente ou freqüência, ou pesos equivalentes, de acordo com o modelo,

$$P(y_{ij}|x_{ij}) = [1 + \exp(-(\alpha_j + \beta_j x_{ij}))]^{-1}$$

onde P é a probabilidade esperada da resposta y_{ij} para um dado estímulo x_{ij} , α_j é o intercepto e β_j a inclinação da *jésima* curva intensidade-resposta (ACe, AMe ou controles fictícios, para os dois tipos de estímulo).

Ajustes logísticos significantes foram avaliados pelo chi-quadrado de Wald ($\chi^2 = [\beta_j/EP]^2$), onde EP é o erro padrão do parâmetro de curvatura β_j . O ajuste

por máxima verossimilhança foi realizado pelo procedimento “Logistic” do programa SAS (SAS[®], Cary, EUA) (anexos 5-7). As intensidades medianas (I_{50}) assim como seu erro padrão (EP) (anexo 8) e o respectivo intervalo de confiança (I.C. 95%) foram computados pelas fórmulas que se seguem,

$$\text{Log}(I_{50}) = -\alpha/\beta$$

$$I_{50} = 10^{-\alpha/\beta}$$

$$\text{EP}\{\text{Log}(I_{50})\} = \{[\text{Var}(\alpha) - 2(\alpha/\beta)\text{Cov}(\alpha, \beta) + (\alpha/\beta)^2\text{Var}(\beta)] / \beta^2\}^{1/2}$$

$$\text{EP}(I_{50}) = I_{50} \{\text{EP}[\text{Log}(I_{50})]\}$$

$$\text{IC95\%}(I_{50}) = \pm 1,96 \{\text{EP}(I_{50})\}$$

onde as variâncias (Var) e covariâncias (Cov) dos parâmetros foram obtidas pela matriz estimada de covariância do procedimento Logistic. As freqüências medianas (F_{50}), assim como seu EP e I.C.95%, foram calculadas de forma análoga. A descrição detalhada destes métodos pode ser encontrada em Collett (1992).

A inclinação máxima da curva logística (β_{50}) qual seja, a inclinação da curva em I_{50} , bem como seu erro padrão ($\text{EP}_{\beta_{50}}$), foram calculados por:

$$\beta_{50} = \beta/4$$

$$\text{EP}_{\beta_{50}} = \text{EP}_{\beta}/4$$

Diferentemente das respostas de imobilidade tensa, trote, galope ou salto, que são estritamente dependentes da estimulação das áreas de defesa, as respostas observadas durante a estimulação elétrica da amígdala foram similares aos comportamentos espontâneos do rato, quais sejam, locomoção, olfação, autolimpeza, etc. Assim, ainda que espontâneas, estas respostas também foram ajustadas em função da intensidade ou freqüência do estímulo. Portanto, tornou-se necessário o desenvolvimento de um controle adequado para discriminar a produção espontânea destas respostas daquela induzida pela estimulação intracraniana. Para isto, realizou-se um grupo com estimulação fictícia (FIC), ou seja, registrou-se os comportamentos

do rato segundo o mesmo protocolo experimental, porém sem aplicação do estímulo intracraniano. Para fins de comparação, a mesma escala foi utilizada para a estimulação real e fictícia, ajustando-se os comportamentos espontâneos do grupo controle com pesos equivalentes aos estímulos intracranianos do grupo experimental. Portanto, o grupo controle consistiu em 15 estimulações fictícias de 20 s, aplicadas em intervalos de 3 min, compatíveis com as sessões de estimulação com intensidade e frequência máximas de 70 μA e 130 Hz, respectivamente (Tab. 2).

Tabela 2. Protocolo experimental dos grupos estimulados com pulsos senoidais (SEN) ou quadrados (FRQ) e dos controles com estimulação fictícia (FIC). Como as regressões foram ajustadas em função do logaritmo do estímulo, substituiu-se os valores zero por 1 (μA ou Hz).

	Estimulações							
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a	...	15 ^a
SEN (μA)	1	5	10	15	20	25	...	70
FRQ (Hz)	1	6	10	20	30	40	...	130
FIC (pesos)	1	5	10	15	20	25	...	70
	1	6	10	20	30	40	...	130

3.8 ESTIMULAÇÃO COM ALTAS INTENSIDADES

Ao final da pesquisa, quatro ratos foram estimulados eletricamente com intensidades superiores a 70 μA . Três apresentaram comportamentos que variaram entre trote, galope, salto, imobilidade tensa, exoftalmia, micção e defecação com intensidades variando entre 100 e 150 μA . O outro apresentou crises convulsivas com intensidade próxima a 130 μA .

4 RESULTADOS

4.1. SÍTIOS ESTIMULADOS

Dos 17 ratos implantados na AMe, 10 (59%) tiveram eletrodos localizados nos distritos anteriores deste núcleo (9 no ântero-dorsal e 1 no ântero-ventral) e 7 (41%) nos distritos posteriores (5 no pósterodorsal e 2 no póstero-ventral). De acordo com suas conexões, a AMe também pode ser dividida numa 'região ventral', englobando os distritos ântero-dorsal, ântero-ventral e póstero-ventral, e numa 'região dorsal', compreendendo o distrito pósterodorsal (Canteras et al., 1995). Segundo este critério, 12 ratos (71%) foram implantados na 'região ventral' e 5 (29%) na 'região dorsal'. Por outro lado, dos 15 ratos implantados na ACe, 8 (54%) tiveram eletrodos localizados no distrito medial, 2 (13%) tiveram no distrito lateral e 5 (33%) no distrito capsular (Figs. 7 e 8).

4.2 REGISTROS COMPORTAMENTAIS

Os comportamentos observados nos controles foram: dormir, repouso, olfação, esquadrinhar, autolimpeza, levantar e locomoção. Além destes, os ratos estimulados eletricamente apresentaram quiescência, micção e defecação. Contudo, as últimas respostas não foram incluídas na análise devido à frequência extremamente baixa das mesmas (na ACe 1 rato apresentou defecação e outros 2 apresentaram micção; na AMe 3 ratos apresentaram defecação e outros 2 micção). Exceto pela quiescência, que não ocorreu no grupo controle, os demais comportamentos foram observados nos três grupos experimentais (Tab. 3).

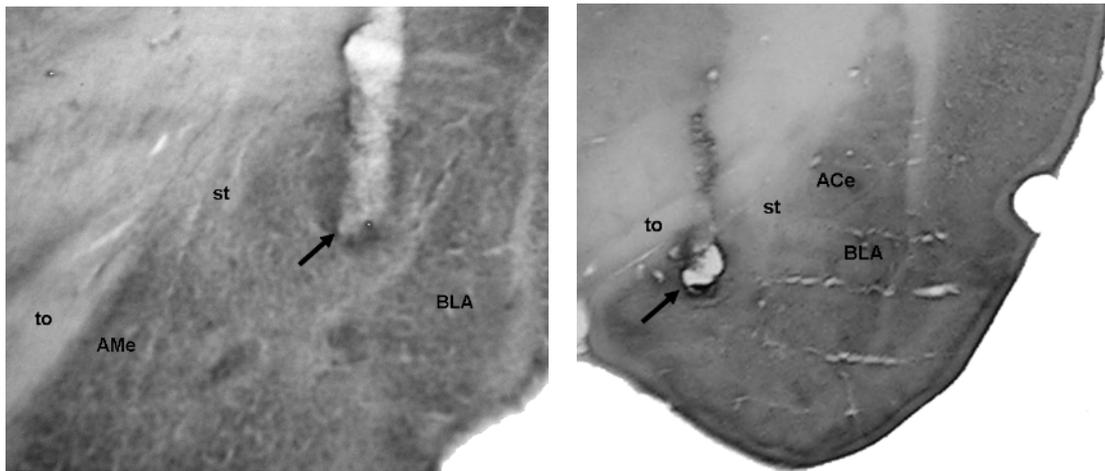


Figura 7 - Cortes coronais do complexo amigdalar do rato mostrando a posição do eletrodo (seta) na amígdala central (*esquerda*) e medial (*direita*). BLA - amígdala basolateral; ACe - amígdala central; AMe - amígdala medial; st - estria terminalis; to - trato óptico.

Tabela 3 – Frequência das respostas comportamentais observadas (porcentagem \pm EP) durante a estimulação dos núcleos amigdalares com estímulo fictício (FIC), pulsos senoidal (SEN) e quadrado (FRQ).

	Controle (%)	ACe (%)		AMe (%)	
	FIC	SEN	FRQ	SEN	FRQ
Autolimpeza	73 \pm 7	53 \pm 13	47 \pm 13	53 \pm 12	53 \pm 12
Esquadrinhar	33 \pm 7	33 \pm 12	53 \pm 13	59 \pm 12	41 \pm 12
Quiescência	---	53 \pm 13	47 \pm 13	71 \pm 11	71 \pm 11
Locomoção	53 \pm 8	80 \pm 10	67 \pm 12	88 \pm 8	59 \pm 12
Olfacção	95 \pm 3	100	100	100	94 \pm 6
Levantar	53 \pm 8	33 \pm 12	60 \pm 13	76 \pm 10	41 \pm 12

4.2.1 Comparação das Curvas de Resposta do Grupo Controle aos Grupos da ACe e AMe Estimulados com Pulsos Senoidais.

As curvas de resposta que apresentaram ajuste estatisticamente significativa estão representadas na figura 9. Comparado ao grupo estimulado ficticiamente, houve uma atenuação da resposta de autolimpeza e o respectivo aumento dos limiares medianos após a estimulação da ACe ($\Delta I_{50} = 183\%$; $\chi^2 = 29,48$; 1 g.l.; $P < 0,0001$) e da AMe ($\Delta I_{50} = 133\%$; $\chi^2 = 20,46$; 1 g.l.; $P < 0,0001$). Por sua vez,

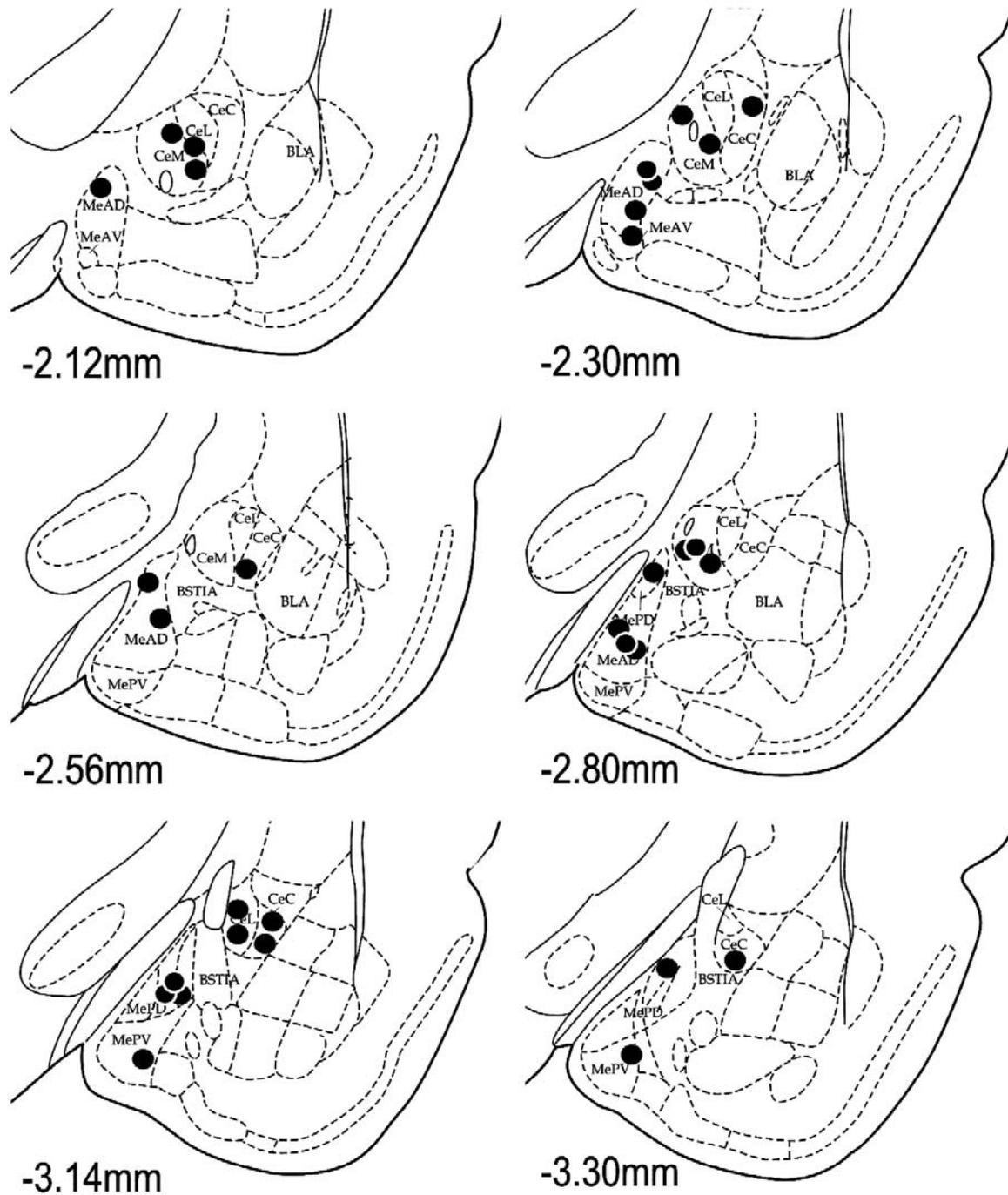


Figura 8 - Localização dos eletrodos implantados na amígdala dos ratos que foram utilizados na análise estatística. Os números indicam as coordenadas ântero-posteriores em relação ao bregma (mm). Abreviaturas: BLA – amígdala basolateral; BSTIA – núcleo intersticial da estria terminal; CeC - amígdala central capsular; CeL – amígdala central lateral; CeM – amígdala central medial ; MeAD – amígdala medial anterodorsal; MeAV – amígdala medial anteroventral; MePD - amígdala medial posterodorsal; MePV – amígdala medial posteroventral. (diagramas e abreviaturas do atlas do cérebro do rato de Paxinos e Watson, 1986).

os limiares de quiescência da AMe foram 45% inferiores àqueles da ACe ($\chi^2 = 15,84$; 1 g.l.; $P < 0,0001$). Comparado ao grupo controle, a estimulação da AMe facilitou o comportamento de locomoção, reduzindo seu limiar mediano em 49% ($\chi^2 = 12,97$; 1 g.l.; $p < 0,005$). Similarmente, os limiares de locomoção da AMe foram 50% inferiores àqueles da ACe ($\chi^2 = 17,09$; 1 g.l.; $p < 0,0001$). As curvas de locomoção da AMe também foram mais inclinadas que aquelas do grupo controle tanto para os ratos estimulados na ACe ($\Delta\beta_{50} = 107\%$; $\chi^2 = 7,44$; 1 g.l.; $p < 0,01$) quanto na AMe ($\Delta\beta_{50} = 116\%$; $\chi^2 = 8,35$; 1 g.l.; $p < 0,005$).

A estimulação da ACe atenuou a resposta de levantar, cujos limiares foram 303% maiores que aqueles do grupo controle ($\chi^2 = 14,13$; 1 g.l.; $p < 0,005$). Os limiares de levantar da ACe também foram muito superiores àqueles da AMe ($\Delta I_{50} = 536\%$; $\chi^2 = 13,74$; 1 g.l.; $p < 0,005$). Por fim, a inclinação da curva estímulo-resposta de levantar foi maior na AMe ($\Delta\beta_{50} = 173\%$; $\chi^2 = 8,76$; 1 g.l.; $p < 0,005$) (Tab. 4, Figs. 9 e 10).

Não foram observadas diferenças significantes entre os grupos controle, ACe e AMe para os comportamentos de esquadrinhar e olfação.

4.2.2 Comparação das Curvas de Resposta do Grupo Controle aos Grupos da ACe e AMe Estimulados com Pulsos Quadrados.

Na estimulação com pulsos quadrados não foram obtidos ajustes significantes para a resposta de autolimpeza na estimulação da AMe, da quiescência na estimulação da ACe e da olfação nos ratos estimulados ficticiamente. As curvas de resposta cujo ajuste foi estatisticamente significante estão representadas na figura 11.

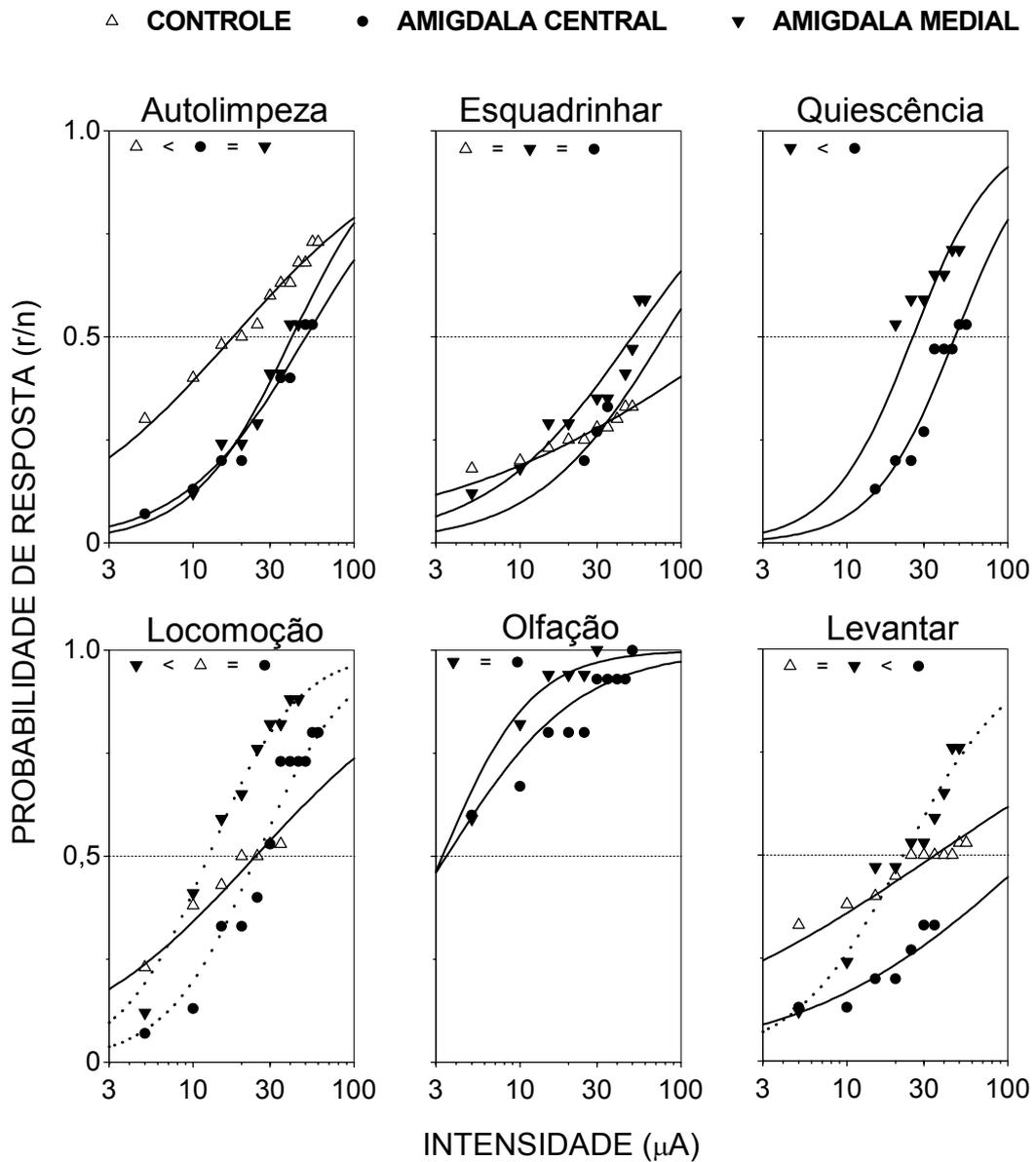


Figura 9 - Curvas intensidade-resposta dos comportamentos espontâneos (controle) e produzidos pela estimulação senoidal (0-60 μA) dos núcleos amigdalares central e medial. As curvas representam os melhores ajustes da função logística. As desigualdades representam diferenças significativas na locação das curvas. As curvas pontilhadas indicam diferenças significativas de paralelismo em relação ao grupo controle (teste do χ^2 da razão de verossimilhanças, critério de Bonferroni para $P < 0,05$). r = número de ratos que apresentaram a resposta, n = número de ratos estimulados.

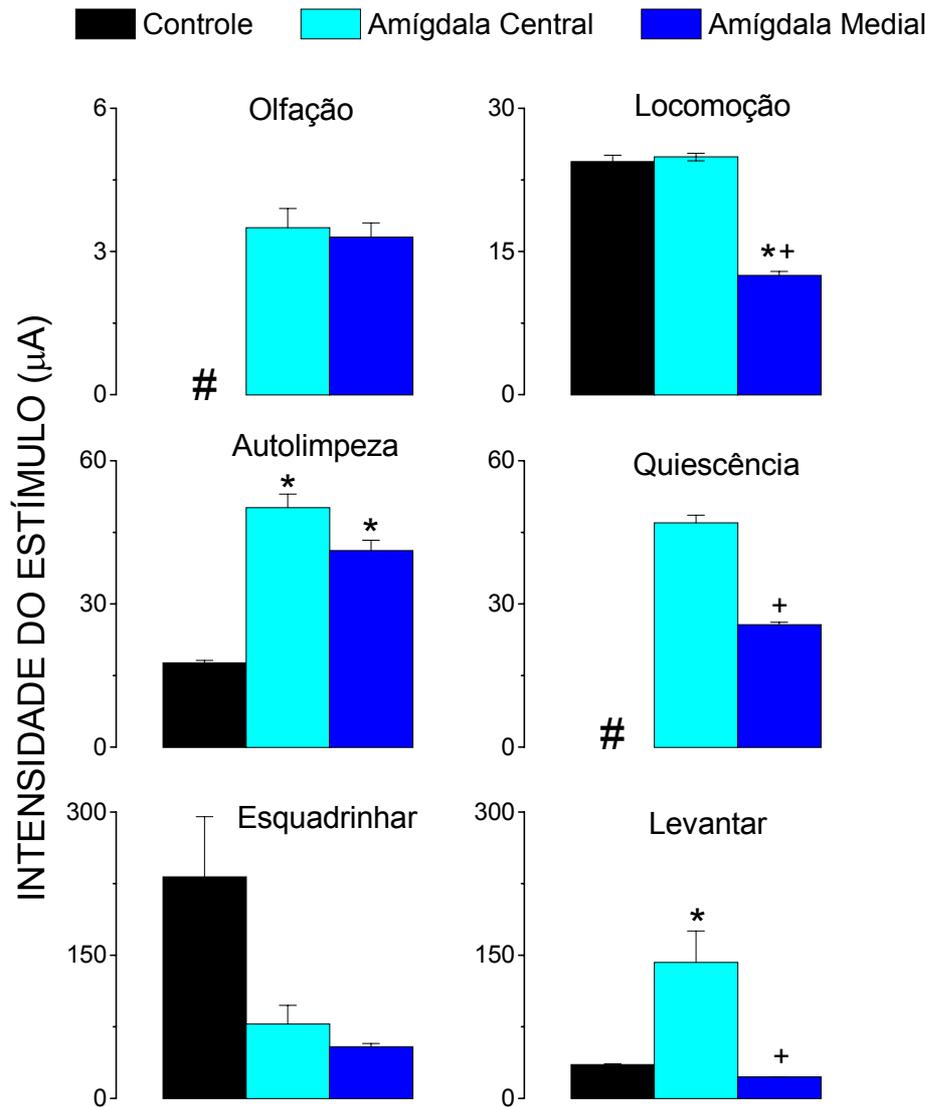


Figura 10 - Gráfico das intensidades medianas ($\pm 1,96$ EP) das respostas comportamentais obtidas por estimulação senoidal nos grupos controle, amígdala central e amígdala medial. * $p < 0,001$ diferenças significantes em relação ao grupo controle; + $p < 0,001$ diferenças significantes em relação ao grupo central (teste do χ^2 da razão de verossimilhanças para locação da curva estímulo-resposta); # - medianas não estimáveis devido à ausência de ajuste logístico da curva de resposta.

Comparada ao grupo controle, a estimulação da ACe causou um aumento acentuado do limiar mediano de autolimpeza ($\Delta I_{50} = 453\%$; $\chi^2 = 31,18$; 1 g.l.; $p < 0,0001$). O limiar da resposta de levantar também foi significativamente aumentado pela estimulação da AMe ($\Delta I_{50} = 98\%$; $\chi^2 = 9,98$; 1 g.l.; $p < 0,005$). Adicionalmente, a curva estímulo-resposta de levantar apresentou maior inclinação nos ratos estimulados na ACe ($\Delta \beta_{50} = 154\%$; $\chi^2 = 8,23$; 1 g.l.; $p < 0,005$). Por fim, comparada ao grupo controle, a curva de locomoção apresentou inclinação marginalmente superior na AMe ($\Delta \beta_{50} = 98\%$; $\chi^2 = 6,45$; 1 g.l.; $p < 0,05$) (Tab. 4, Figs. 11 e 12).

Não foram observadas diferenças significantes entre os grupos controle, central e medial para os comportamentos de esquadrinhar, olfação e quiescência.

Tabela 4 – Intensidades (I_{50}) e freqüências (F_{50}) medianas ($\pm 1,96$ EP) das respostas comportamentais dos grupos controle, ACe e AMe. * $p < 0,001$ diferenças significantes em relação ao grupo controle; + $p < 0,001$ diferenças significantes em relação ao grupo central (teste do χ^2 da razão de verossimilhanças para locação da curva estímulo-resposta); # - mediana não estimável devido ausência de ajuste logístico.

		CTR	ACe	AMe
Autolimpeza	SEN (μ A)	17.7 \pm 0.5	50.2 \pm 2.8 *	41.2 \pm 2.1 *
	FRQ (Hz)	25.5 \pm 0.9	141 \pm 24.3 *	#
Esquadrinhar	SEN (μ A)	231.9 \pm 63	77.8 \pm 19.9	54.2 \pm 3.4
	FRQ (Hz)	581.2 \pm 190.3	99.6 \pm 5.9	102.9 \pm 16.5
Quiescência	SEN (μ A)	#	47 \pm 1.6	25.7 \pm 0.5 +
	FRQ (Hz)	#	#	66.6 \pm 0.2
Locomoção	SEN (μ A)	24.4 \pm 0.7	24.9 \pm 0.4	12.5 \pm 0.4 + *
	FRQ (Hz)	37.7 \pm 1.2	45.2 \pm 0.2	53.1 \pm 1.5
Olfação	SEN (μ A)	#	3.5 \pm 0.4	3.3 \pm 0.3
	FRQ (Hz)	#	4.5 \pm 0.2	3.1 \pm 0.3
Levantar	SEN (μ A)	35.3 \pm 1.1	142.5 \pm 32.8 *	22.4 \pm 0.3 +
	FRQ (Hz)	58.9 \pm 2.2	68.4 \pm 1.9	116.8 \pm 20.1 *

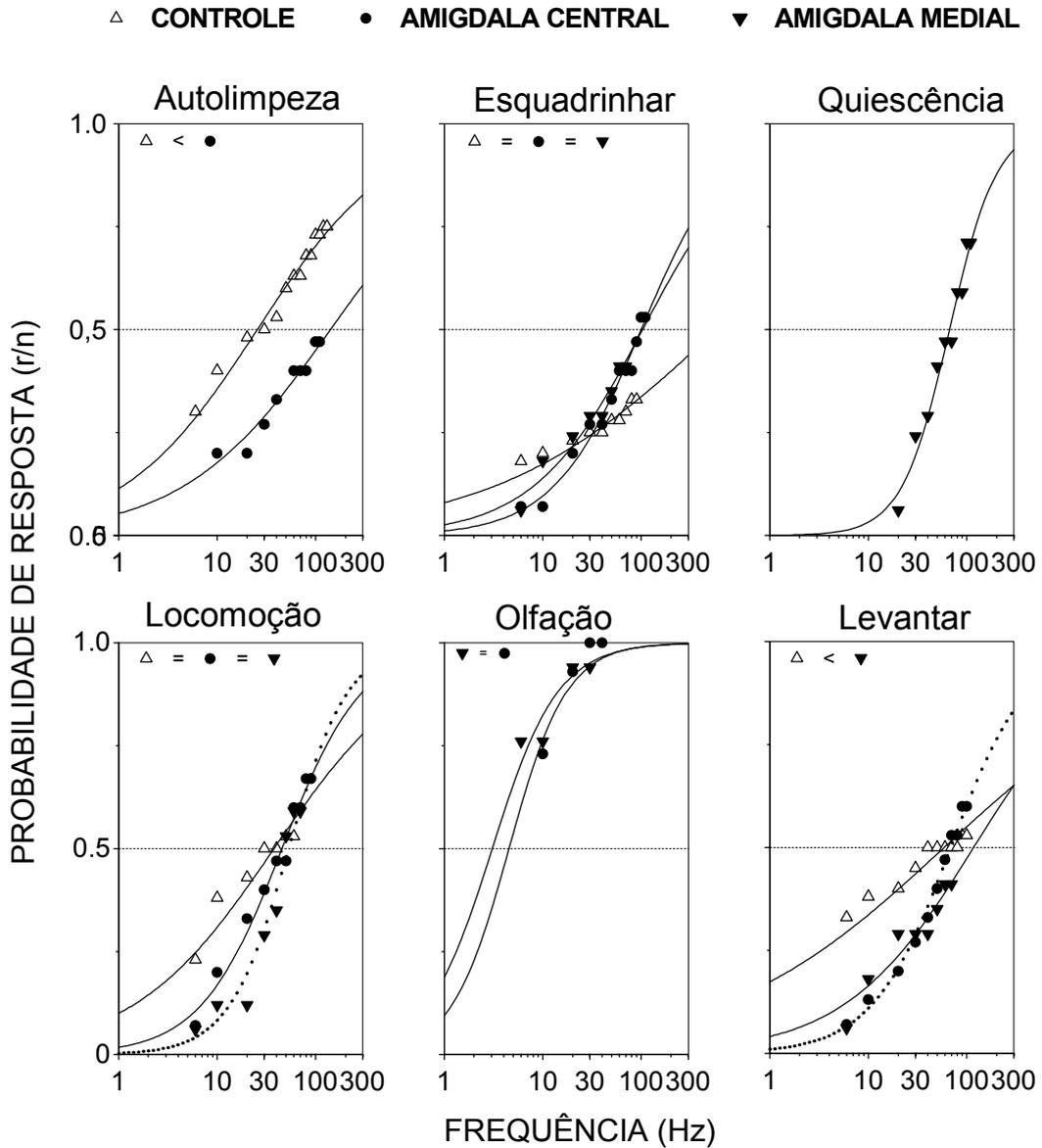


Figura 11 - Curvas intensidade-resposta dos comportamentos espontâneos (controle) e produzidos pela estimulação por frequência (0-130 Hz) dos núcleos amigdalares central e medial. As curvas representam os melhores ajustes da função logística. As desigualdades representam diferenças significativas na locação das curvas. As curvas pontilhadas representam diferenças significativas de paralelismo em relação ao grupo controle (teste do χ^2 da razão de verossimilhanças, critério de Bonferroni para $P < 0,05$). r = número de ratos que apresentaram a resposta, n = número de ratos estimulados.

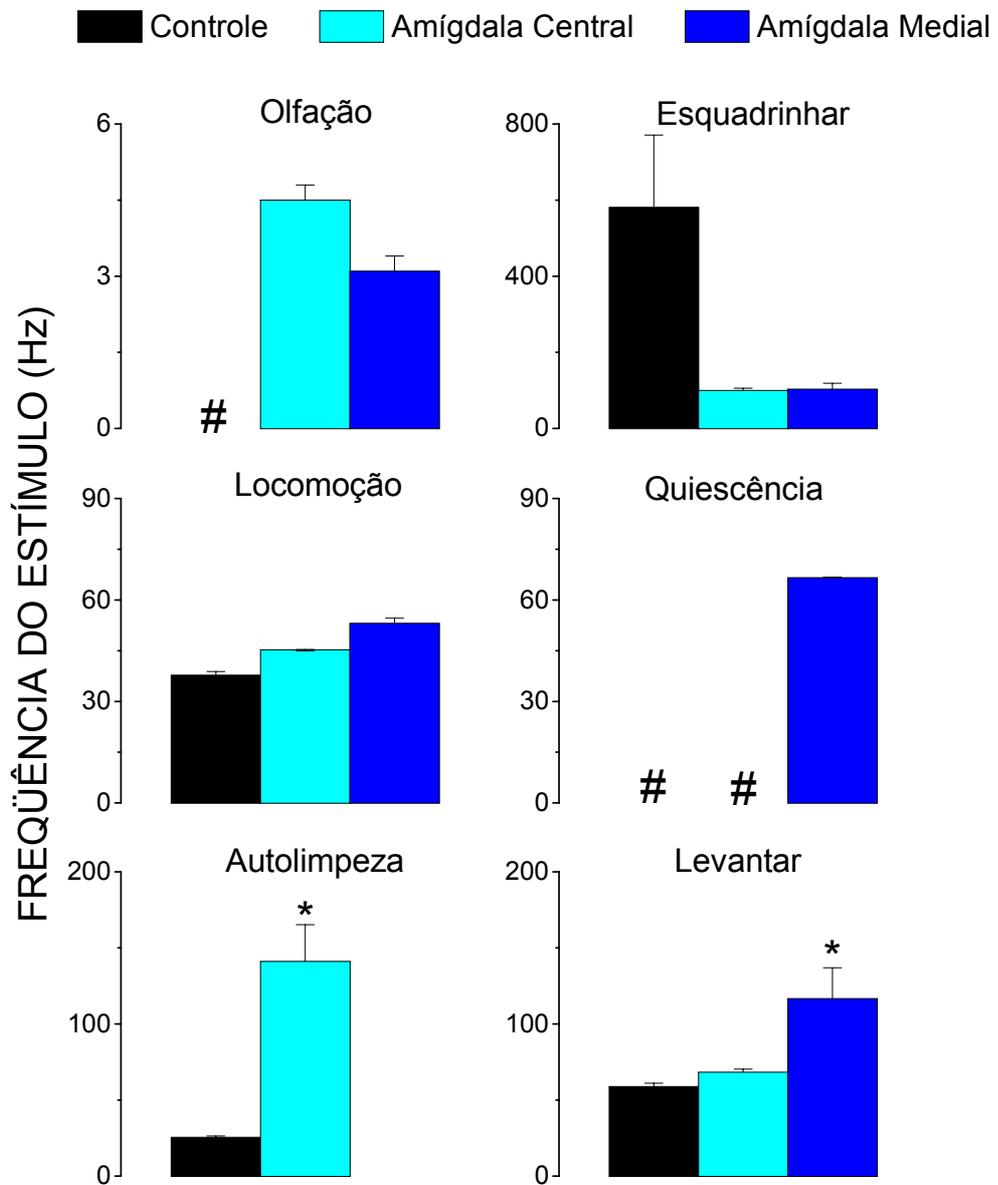


Figura 12 - Gráfico das intensidades medianas ($\pm 1,96$ EP) das respostas comportamentais obtidas por estimulação de onda quadrada nos grupos controle, amígdala central e amígdala medial. * $p < 0,001$ diferenças significantes em relação ao grupo controle (teste do χ^2 da razão de verossimilhanças para locação da curva estímulo-resposta); # - medianas não estimáveis devido à ausência de ajuste logístico da curva de resposta.

5 DISCUSSÃO

Embora a amígdala tenha sido freqüentemente incluída como uma das áreas fundamentais do sistema de defesa, as respostas de defesa não foram produzidas pela estimulação dos núcleos amigdalares central e medial com intensidades e freqüências que foram eficazes na eliciação destas respostas em áreas mais caudais do tronco cerebral (núcleo pré-mamilar dorsal, MCPA, CS e CnF). Contrariamente, a estimulação deste núcleo gerou um repertório comportamental bastante restrito de comportamentos que também são emitidos espontaneamente. Contudo, experimentos preliminares mostraram que a estimulação da amígdala de 3 ratos com intensidades superiores a 90 μ A produziu todas as respostas de defesa observadas pela estimulação da MCPA do rato. Aparentemente, estes resultados sugerem que os limiares das respostas de defesa diminuem em direção às estruturas mais caudais, supostamente envolvidas na execução final destes comportamentos. Alternativamente, os núcleos amigdalares poderiam ter limiares efetivamente maiores que estas estruturas. Não obstante, estudos recentes de nosso laboratório mostraram que a estimulação do núcleo dorsomedial do hipotálamo, que situa-se no mesmo plano coronal dos núcleos amigdalares, produz o repertório integral de defesa do rato com intensidades e freqüências compatíveis àquelas que são eficazes na MCPA.

Por outro lado, no presente estudo somente foram submetidos à análise estatística os dados dos ratos cujos eletrodos situaram-se na ACe ou AMe e que foram estimulados com intensidades e freqüências inferiores a 70 μ A ou 130 Hz, respectivamente. Estudos anteriores mostraram que a estimulação senoidal do teto do mesencéfalo com intensidades de cerca de 50 μ A apresenta uma resolução espacial de aproximadamente 2 mm de diâmetro (Bittencourt *et al.*, 2004, 2005). Portanto, em intensidades próximas a 70 μ A, um eletrodo no lobo temporal ao nível da estria terminal estimularia ambos os núcleos amigdalares. A estimulação por variação da freqüência tem maior resolução espacial, despolarizando um volume fixo de tecido

(Patterson e Kesner, 1981; Yeomans, 1990). De fato, os estudos de mapeamento das respostas de defesa do teto do mesencéfalo (Bittencourt et al., 2004, 2005) sugerem que este tipo de estimulação apresente uma resolução espacial de 0,5 mm, ou menos, tornando-a mais apropriada para o mapeamento dos núcleos amigdalares. Este aspecto pode explicar o repertório ainda mais restrito da estimulação por frequência, que não produziu as respostas de autolimpeza na AMe e quiescência na ACe.

Com exceção da quiescência, a estimulação dos núcleos amigdalares produziu apenas respostas que já são observadas no repertório espontâneo do rato. De fato, Applegate et al. (1983) já haviam relatado que a estimulação de baixa intensidade do núcleo central da amígdala de coelhos não anestesiados produziu apenas a interrupção dos comportamentos em curso (*arrest of ongoing behavior*) e movimentos mastigatórios da boca e língua que também observados no presente estudo. Não obstante, a ocorrência de comportamentos espontâneos na vigência da estimulação intracraniana colocou um problema metodológico adicional à análise logística dos limiares. Em realidade, este problema já existia para a defecação e micção que também fazem parte do repertório espontâneo dos ratos. Contudo, considerou-se em experimentos anteriores que estas respostas foram emitidas espontaneamente nos 10 min de habituação à arena anteriores à estimulação intracraniana. Realmente, após este período, a defecação e micção somente reaparecem em intensidades superiores a 30 ou 40 μA , sugerindo sua dependência da estimulação intracraniana. Por outro lado, diferentemente das respostas de imobilidade tensa, exoftalmia, trote, galope e saltos que somente ocorrem na vigência do estímulo, não temos critérios para diferenciar as respostas de autolimpeza, esquadrinhar, olfação, levantar e locomoção, induzidas pelo estímulo, daquelas que fazem parte do repertório espontâneo do animal.

Surgiu, assim, a necessidade do desenvolvimento de um controle

apropriado dos comportamentos espontâneos observados durante a estimulação da amígdala. Para isto realizamos um grupo com estimulação fictícia. Dois cuidados foram tomados. Primeiro, similarmente aos grupos experimentais, nos quais registramos apenas as respostas limiáres, somente a primeira resposta apresentada pelos ratos controle foi registrada nas sessões de estimulação fictícia. Segundo, embora este grupo não tenha sido efetivamente estimulado, a frequência acumulada das respostas espontâneas foi ajustada para pesos equivalentes às intensidades e frequências dos grupos experimentais. Este procedimento equiparou as escalas para fins de comparação. Assim, a única diferença de procedimento entre os grupos controle e experimental foi a ausência ou presença do estímulo intracraniano. O desenvolvimento do controle das respostas espontâneas generalizou o método de análise logística dos limiáres.

Embora o registro da resposta de olfação não seja tão conspícuo quanto o registro das demais respostas do rato, a resposta de olfação apresentou os menores limiáres, tanto nos controles quanto nos ratos estimulados. As projeções da AMe para várias partes das vias sensoriais olfatórias principal e acessória estão bem estabelecidas (De Olmos *et al.*, 1985). Contudo, enquanto a frequência da resposta de olfação seguiu uma função logística para ambos os tipos de estimulação intracraniana, a olfação espontânea foi uma função linear do estímulo fictício (não representada graficamente). As funções distintas da resposta de olfação nos grupos controle e experimental sugerem a existência de mecanismos distintos de produção desta resposta. No entanto, este fato impediu a comparação quantitativa entre grupos, bem como afirmações conclusivas acerca da resposta de olfação.

A estimulação elétrica senoidal de ambos os núcleos aumentou a frequência de locomoção, principalmente na AMe. Não obstante, a estimulação por frequência não teve efeitos significativos sobre a locomoção, descartando um papel

importante da amígdala neste comportamento. Assim, é possível que a resposta de locomoção induzida por estimulação senoidal tenha sido produzida pela excitação do núcleo entopeduncular, que é equivalente ao globo pálido e situa-se imediatamente acima à AMe, para o hipotálamo ou outras estruturas.

Os limiares medianos da locomoção foram menores que os limiares de quiescência, sugerindo uma inibição da primeira resposta com os estímulos mais intensos. Esta 'cessação da atividade em execução' já havia sido observada por Kaada *et al.* (1954) durante a estimulação elétrica do complexo amigdalár do gato. Estes autores relacionaram esta resposta a um aumento da atenção do animal. Conforme mencionamos, Applegate *et al.* (1983) também haviam relatado a 'interrupção dos comportamentos em curso' pela estimulação com baixas intensidades da amígdala de coelhos. O presente estudo estendeu estas observações para o rato. As projeções da amígdala centromedial são principalmente gabaérgicas (Pitkänen, 1994; Swanson *et al.*, 1998). No entanto, cerca de 50% das projeções da ACe à MCPA são excitatórias, provavelmente, peptidérgicas (Rizvi *et al.*, 1991). Estudos com marcadores retrógrados realizados por Paredes *et al.* (2000) evidenciaram projeções diretas da ACe para a MCPAvl e indiretas, via hipotálamo, para a MCPAdl. Não foram encontradas projeções diretas do ACe para a MCPAdl. Estes achados provêm evidências de substratos neuroanatômicos diferentes para a eliciação e controle de padrões distintos de respostas de defesa, sejam elas autonômicas ou comportamentais. Por outro lado, Ledoux *et al.* (1988) sugerem que a resposta de congelamento a um estímulo aversivo condicionado seja expressa pela MCPAvl sob ordens da ACe. Embora estes autores não apresentem uma descrição da resposta de congelamento, ela tem sido descrita em nossos estudos como a imobilidade tensa acompanhada de exoftalmia (Schenberg *et al.*, 1990; Sudré *et al.*, 1993, Bittencourt *et al.*, 2004, 2005). Contrariamente, Carrive e colaboradores (Carrive, 1991; Morgan e

Carrive, 2001) relataram que a estimulação da MCPAvI produz apenas quiescência, ou seja, um estado de imobilidade relaxada sem exoftalmia. Estes autores relacionaram este estado aos comportamentos recuperativos pós-estresse associados aos mecanismos analgésicos da MCPAvI. De fato, as respostas defensivas de ratos estimulados na MCPAvI, utilizando o mesmo procedimento do presente estudo, apresentaram freqüências medianas superiores a 100 Hz. A única exceção foi a exoftalmia, cujo limiar foi de 68 Hz. Mesmo assim, este limiar foi o maior dentre todas as estruturas do teto do mesencéfalo (Bittencourt *et al.*, 2004). Os dados dos últimos autores sugerem que as poucas respostas de defesa observadas por estimulação da MCPAvI (exoftalmia, imobilidade e trote) foram, em realidade, produzidas por difusão de corrente para as regiões mais dorsais da MCPA definitivamente envolvidas na expressão dos comportamentos de defesa (Blanchard *et al.*, 1981). Não obstante, De Oca *et al.* (1998) apresentaram evidências de que a lesão da MCPAvI, mas não da MCPAdI, abole o comportamento de congelamento incondicionado à visão de um gato. Adicionalmente, mostraram que a resposta condicionada de congelamento a um contexto aversivo somente é atenuada pela lesão da MCPAvI. Vianna *et al.* (2001) também observaram efeitos diferenciados das lesões da MCPAdI e MCPAvI sobre o comportamento de congelamento ao contexto aversivo, corroborando os dados dos últimos autores. No entanto, a maioria, senão todos os estudos de lesão da MCPAvI foram realizados com lesões eletrolíticas que podem ter danificado o feixe noradrenérgico dorsal composto pelas eferências ascendentes do LC e que margeia a MCPAvI. De fato, existem evidências do envolvimento do LC nos componentes atencionais da resposta de congelamento induzida por estimulação da MCPAdI (Schenberg *et al.*, 2001; Levine *et al.*, 1990). Adicionalmente, enquanto as projeções da ACe à MCPAdI originam-se no distrito medial deste núcleo, existem evidências de projeções excitatórias do distrito lateral ao LC, presumivelmente, mediadas por CRF

(Van Bockstaele, 1999). Assim, o LC poderia ser ativado tanto pelas aferências da MCPAdl quanto da Ace lateral. Não obstante, é importante salientar que a quiescência induzida por estimulação por frequência somente foi produzida na AMe, a qual não envia projeções à MCPA. No entanto, ela envia aferências ao hipotálamo ventromedial dorsal que, por sua vez, projeta-se à MCPA. Também deve ser salientado que embora este comportamento tenha sido observado em cerca de 75 % dos ratos que estavam ativos antes do início do estímulo, a quiescência foi transitória, freqüentemente desaparecendo antes do término do estímulo. Caso contrário, quando o rato estava em repouso, ele permanecia inativo até a aplicação dos estímulos máximos de 70 μ A ou 130 Hz. Assim, considerando-se que a estimulação por frequência tem maior resolução espacial, os únicos efeitos observados pela estimulação da ACe foram a nítida atenuação da autolimpeza e um efeito menor, porém estatisticamente significativo, de inibição da resposta de levantar.

Comparados ao grupo controle, os animais estimulados apresentaram uma redução da resposta de autolimpeza tanto na estimulação com pulso senoidal quanto com pulso quadrado. Em etologia, a limpeza em grupo (*social grooming*) tem sido interpretada como um comportamento de apaziguamento, promovendo a coesão social em várias espécies (Eibl-Eibesfeldt, 1975). Similarmente, o aumento do 'contato social' num ambiente estranho, compreendendo encostar-se, cheirar, seguir, e limpar o outro animal (*allogrooming* ou heterolimpeza), tem sido interpretado como índice de ansiólise promovida por drogas psicoativas (File, 1980, 1992). Por outro lado, embora a autolimpeza pareça ter uma função adaptativa importante na remoção de parasitas e detritos, seu significado emocional não está tão estabelecido quanto aquele da limpeza em grupo ou do contato social, tendo sido interpretada tanto como um índice de ansiedade na exploração da arena (Lund *et al.*, 2004), quanto de ansiólise num contexto presa-predador (McGregor *et al.*, 2004), ou como um ritual similar ao

observado na compulsão de limpeza do transtorno obsessivo-compulsivo em humanos (Rapoport, 1991). No entanto, estudos recentes de nosso laboratório mostraram que a autolimpeza responde aos ansiolíticos de forma similar ao número de entradas nos braços fechados do labirinto-em-cruz elevado. Desta forma, embora ela seja menos freqüente nos braços abertos, a redução da autolimpeza parece ser um índice de sedação (Tannure, 2005). Em todo caso, como a autolimpeza é um comportamento 'autodirigido', sua inibição num contexto ameaçador faz sentido na medida que o animal tem de redirecionar sua atenção ao meio externo. Assim, a redução da autolimpeza nos animais estimulados pode ser associada ao aumento da atenção ao ambiente (Gallagher e Holland, 1994). Em particular, Cain et al. (2002) mostraram que o padrão tônico de disparos do núcleo geniculado lateral dorsal durante o medo condicionado, um padrão relacionado aos estados de alerta, é atenuado pela administração de um agonista gabaérgico (muscimol) na ACE.

A amígdala tem sido considerada como uma estrutura inerente ao sistema de defesa (LeDoux *et al.*, 1988; Ledoux, 2000; Deakin e Graeff, 1991; Fanselow, 1991). Estudos em humanos também demonstraram alterações cognitivas e emocionais sugestivas de medo (Chapman *et al.*, 1954) ou outras emoções (Ervin *et al.*, 1969) após a estimulação da amígdala. A amígdala também tem sido associada às respostas autonômicas a um estímulo estressor ou às ameaças (Shealy *et al.*, 1956; LeDoux *et al.*, 1988; Pitkänen, 1994; Walker e Davis, 1997). Em particular, Graeff e Guimarães (1999) sugeriram que a amígdala, o hipotálamo e a MCPA seriam, eles mesmos, o substrato da hierarquia do repertório defensivo do rato, mediando as respostas de congelamento, fuga dirigida e fuga não-dirigida, respectivamente. Não obstante, os comportamentos incondicionados de defesa associados ao repertório defensivo da MCPA, quais sejam, exoftalmia, imobilidade tensa, micção, defecação, trote, galope e salto (Bittencourt *et al.*, 2004, 2005) não foram observados pela

estimulação elétrica da ACe e AMe com estímulos de baixa magnitude. Portanto, nossos resultados sugerem que a amígdala não seja uma estrutura crítica na produção das respostas incondicionadas de defesa.

Embora os estudos preliminares de Bard e Mountcastle (1948), em gatos decorticados, tenham sugerido que a amígdala seria um 'funil' para as influências corticais inibitórias do comportamento agressivo, Blanchard e colaboradores mostraram que as lesões da amígdala atenuam os comportamentos defensivos, tanto de ratos com lesão na área septal quanto em ratos selvagens (Blanchard et al., 1979, Kemble et al., 1984, 1990). Mais importante, estes autores mostraram que a fuga dos ratos selvagens é fortemente inibida após a lesão dos principais núcleos amigdalares (Kemble et al., 1990). Em contraste, a agressão defensiva foi primariamente inibida pela lesão do núcleo cortical e, provavelmente, núcleo central. Os autores concluíram que os efeitos difusos sobre a fuga resultaram das lesões das aferências corticais de múltiplas modalidades sensoriais. Adicionalmente sugeriram que a 'representação' mais restrita da agressão defensiva foi devida à menor responsividade dos ratos à estimulação das vibrissas, que seria mediada pela AMe. De fato, Kemble et al. (1984) já haviam demonstrado que a lesão da AMe exerce uma forte atenuação da agressão defensiva, mas não tem efeitos sobre o comportamento de fuga. No entanto, a observação de que a lesão de uma determinada estrutura atenua ou bloqueia um dado comportamento não significa que o mesmo seja organizado naquela estrutura. A estrutura pode exercer funções sensoriais (relé), afetivas (motivação, emoção), cognitivas (atenção, memória) ou executivas (motoras). Somente no último caso os efeitos da lesão corresponderiam a uma 'representação' real do comportamento. Neste caso o comportamento pode ser produzido por estimulação de baixa magnitude da estrutura em questão. Nos outros casos as funções poderiam ser genericamente descritas como 'moduladoras'. Como a lesão dos núcleos amigdalares atenuou os

comportamentos de defesa, enquanto sua estimulação com baixas intensidades não teve efeitos, estes núcleos parecem exercer funções apenas moduladoras.

Nossos resultados não corroboraram os estudos pioneiros de estimulação elétrica da amígdala em gatos (Kaada *et al.*, 1954; Shealy *et al.*, 1956; Ursin *et al.*, 1960; Ursin, 1965). As diferenças entre os estudos podem ser devidas às particularidades do SNC de presas e predadores. É possível, por outro lado, que os estudos realizados anteriormente tenham provocado algumas respostas comportamentais com intensidades demasiadamente elevadas. De fato, no presente estudo 3 dos animais estimulados com intensidades maiores que 70 μA apresentaram comportamentos de trote, galope, salto, imobilidade (contudo, somente após a apresentação da resposta de galope), exoftalmia, micção e defecação com intensidades variando entre 100 e 150 μA . O outro rato apresentou crises convulsivas com intensidade próxima a 130 μA , sugerindo que as intensidades exigidas para a eliciação das respostas defensivas estariam próximas dos limiares de convulsão. Por outro lado, os comportamentos de defesa destes animais foram estereotipados e não seguiram um padrão hierárquico definido, tal como observa-se na estimulação da MCPA (Bittencourt *et al.*, 2004). De fato, um destes animais colidiu várias vezes com a parede da arena, mesmo após o término da estimulação, sugerindo a ocorrência de pós-descargas típicas dos fenômenos convulsivos. A associação de respostas de fuga a convulsões não é uma observação inédita. Convulsões caracterizadas por galopes podem ser facilmente eliciadas pela exposição de ratos e, principalmente, camundongos, a um ruído branco de alta intensidade (Fendt *et al.*, 1994). Os últimos autores mostraram que estas convulsões são mediadas pelas projeções do núcleo externo do colículo inferior às camadas profundas do colículo superior e, provavelmente, MCPAdl. Desta forma, o padrão anômalo das respostas de defesa observado pelo presente estudo, e, as altas intensidades de corrente utilizadas, que

foram cerca de 3 vezes maiores que as correntes eficazes nas regiões caudais do sistema de defesa (Bittencourt *et al.*, 2004, 2005; Cezário, 2001; Rosalém, 2005), podem ser explicados por: 1) diferenças substanciais nas propriedades funcionais dos neurônios da amígdala; 2) difusão de corrente para regiões vizinhas ou mesmo hipotalâmicas; 3) produção de respostas artefatuais em limiares convulsivos. Até mesmo a resposta de quiescência pode ser um indício de crise de ausência.

Portanto, embora a estimulação com alta intensidade confirme os relatos da literatura sobre a produção de respostas defensivas por estimulação da amígdala, sugerimos maior cautela em afirmar que a amígdala seja um substrato para a geração destas respostas. De fato, embora a primeira hipótese também possa ser verdadeira, experimentos em curso em nosso laboratório mostraram que as respostas defensivas podem ser obtidas por estimulação elétrica e química de baixa magnitude do hipotálamo dorsomedial, conferindo veracidade à possibilidade de difusão de corrente. Por outro lado, a amígdala também é conhecida como uma das áreas cerebrais de menor limiar convulsivo, substanciando a hipótese de produção artefactual de respostas de defesa. Além da complementação deste estudo com um grupo que compare os limiares das 'respostas de defesa' da amígdala com os limiares convulsivos, seria importante analisar a modulação exercida pela amígdala sobre os comportamentos defensivos eliciados por estimulação da MCPAdl.

Por fim, nossos resultados corroboram a concepção de Swanson e Petrovitch (1998) acerca da organização neuroanatômica e funcional da amígdala.

6 CONCLUSÕES

A estimulação elétrica da amígdala central e medial apenas produziu um estado de quiescência, diminuiu a resposta de levantar e atenuou fortemente a resposta de autolimpeza.

Não foi observado nenhum comportamento característico do repertório defensivo do rato com estimulações de baixa intensidade nos núcleos central e medial da amígdala. Isto sugere que a amígdala tenha um papel preferencialmente modulador em vez de participar diretamente na produção do comportamento de defesa do rato.

A estimulação elétrica evidenciou um comportamento de quiescência que pode representar um fenômeno convulsivo caracterizado pela crise de ausência, uma vez que a amígdala é uma região de menor latência para crises convulsivas (Kalynchuk *et al.*, 1997, 1998).

Altas intensidades produziram respostas de caráter defensivo. Contudo, estas respostas podem estar sendo produzidas dentro de uma faixa de intensidades capazes de gerar descargas elétricas suficientes para desencadear convulsões generalizadas, sugerindo que as respostas observadas na arena são artefatuais e não corroboram a realidade do rato em situações não laboratoriais.

A amígdala (AMI) é tida como uma das estruturas críticas do sistema de defesa. Dados recentes também a relacionam ao medo condicionado. Porém, a ausência de estudos paramétricos dificulta a plena caracterização de suas funções nas respostas incondicionadas de defesa. Assim, utilizamos a análise logística dos limiares para examinar as respostas eliciadas pela estimulação dos núcleos central (ACe) e medial (AMe) da AMI. Para isto, ratos *Wistar* com eletrodos na ACe (n=15) ou AMe (n=17) foram estimulados pela variação da intensidade de pulsos senoidais (0-70 μ A) ou da frequência de pulsos quadrados (0-130Hz). Os controles (CTRL, n=40) foram estimulados ficticiamente. As curvas estímulo-resposta foram comparadas por razão de verossimilhanças (*P<0,05; Bonferroni). Regressões significantes foram observadas para autolimpeza, esquadrinhar, locomoção, olfação, levantar e quiescência. Comparado ao grupo CTRL, a estimulação elétrica da amígdala central e medial apenas produziu um estado de quiescência caracterizado pela breve interrupção das atividades, porém, sem a exoftalmia típica do congelamento, diminuiu a resposta de levantar e atenuou fortemente a resposta de autolimpeza. Adicionalmente, quatro ratos foram estimulados com correntes senoidais acima de 70 μ A. Em um rato, intensidades próximas a 130 μ A causaram convulsão e, em outros 3 ratos geraram exoftalmia, imobilidade tensa, trote, galope e saltos com características estereotipadas. Os dados do presente estudo demonstram que as altas intensidades necessárias para a eliciação das respostas de defesa do rato podem estar gerando convulsões e, tornam improvável a participação direta da AMI na produção das mesmas. Ao contrário, sugerem que a ACe e AMe sejam estruturas apenas moduladoras das respostas de defesa do rato.

The amygdaloid complex is considered one of the critical structures of the defensive system. Recent reports have also related it to the conditioned fear. The lack of parametric studies turns difficult the full characterization of its functions within unconditioned responses of defense. Thus, we examined the behaviors elicited by central (CeA) and medial (MeA) nucleus of amygdala by using logistic analysis of threshold. For this, Wistar rats with implanted electrodes in CeA (n=15) or MeA (n=17) were stimulated with variation of sine-wave pulse (0-60 μ A) or variation of a low-intensity square-wave pulse (0-130Hz; 1ms). The control group (CTRL, n=40) was stimulated fictitiously. Stimulus-response curves were fitted according to the logistic model and compared through the likelihood-ratio χ^2 test ($p < 0,05$, Bonferroni's criterion). Significant regressions were observed for self-grooming, searching movements, locomotion, olfaction, stand up and quiescence. Comparing with control group, the electrical stimulation of central and medial amygdala just elicited a quiescence state characterized by brief interruption of activities lacking of typical exophthalmus of freezing, decreased stand up response and strongly attenuated selfgrooming response. Additionally, four rats were stimulated with square-wave pulse over than 70 μ A. In one rat, currents about 130 μ A generated convulsions and, in the other 3 rats generated exophthalmus, tense immobility, trotting, galloping and jumping with stereotyped characteristics. The data of present study demonstrate that high intensities necessary for eliciting the defensive responses of rat may generate convulsions and turn implausible the direct action of the amygdala in the production of these responses. In contrast, these results suggest that the CeA and MeA are just modulatory structures of these responses.

9 REFERÊNCIAS

1. Alheid GF, Heimer L (1988). New perspectives in basal forebrain organization of special relevance for neuropsychiatric disorders: the striatopallidal, amygdaloid and corticopetal components of substantia innominata. *Neuroscience* 27: 1-39.
2. Alheid GF, Olmos J, Beltramino CA (1995). Amygdala and extended amygdala. In: *The Rat Nervous System*, edited by Paxinos G Orlando, FL: Academic, p. 495-578.
3. Amorapanth P, Nader K, Ledoux JE (1999) Lesions of periaqueductal gray dissociate-conditioned freezing from conditioned suppression behavior in rats. *Learn Mem* 6:491-499
4. Applegate CD, Kapp BS, Underwood MD, McNall CL (1983) Autonomic and somatomotor effects of amygdala central N. stimulation in awake rabbits. *Physiol Behav* 31: 353-60
5. Bard, P. (1928). A diencephalic mechanism for the expression of rage with special reference to the sympathetic nervous system. *Am J Physiol*, 84: 490-513.
6. Bard P, Mountcastle VB (1948). Some forebrain mechanisms involved in expression of rage with special reference to suppression of angry behavior. *Res Publ, Ass Res nerv ment Dis* 27: 362-404.
7. Bittencourt AS, Carobrez AP, Zamprogno LP, Tufik S, Schenberg LC (2004). Organization of Single Components of Defensive Behaviors Within Distinct Columns of Periaqueductal Gray Matter of The Rat: Role of N-Metil-D-Aspartic Acid Glutamate Receptors. *Neuroscience* 125: 71-89.
8. Bittencourt AS, Nakamura-Palacios E, Mauad H, Tufik S, Schenberg LC (2005). Organization of electrically- and chemically-evoked defensive behaviors within the deeper collicular layers as compared to the periaqueductal gray matter of the rat. *Neuroscience* (no prelo).

9. Blanchard DC, Blanchard RJ, Lee EM, Nakamura S (1979). Defensive behaviors in rats following septal and septal-amygdala lesions. *J Comp Physiol Psychol* 93: 378-90.
10. Blanchard DC, Williams G, Lee MC, Blanchard RJ (1981). Taming of wild *Rattus norvegicus* by lesions of the mesencephalic central gray. *Physiologic Psychol* 9: 157-163
11. Blanchard DC, Blanchard RJ, Rodgers J, Weiss SM (1990). The characterization and modelling of antipredator defensive behavior. *Neurosci Biobehav Rev* 14: 463-472.
12. Cain ME, Kapp BS, Puryear CB (2002). The contribution of the amygdala to conditioned thalamic arousal. *J Neurosci* 22: 11026-34.
13. Canteras NS, Simerly RB, Swanson LW (1995). Organization of Projections From the Medial Nucleus of the Amygdala: A PHAL Study in the Rat. *The Journal of Comparative Neurology* 360:213-245.
14. Carrive P (1991). Functional organization of PAG neurons controlling regional vascular beds. Em: *The midbrain periaqueductal gray matter: functional, anatomical and neurochemical organization* (Depaulis A, Bandler R, editores), New York, Plenum Press, págs. 67-100
15. Cezário, AF (2001). Caracterização das funções comportamentais do núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo, Tese de Mestrado, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, E.S., Brasil.
16. Chapman WP, Schroeder HR, Geyer G, Brazier MAB, Fager C, Poppen JL, Solomon HC, Yakovlev PI (1954). Physiological evidence concerning importance of the amygdaloid nuclear region in the integration of circulatory function and emotion in man. *Science* 120: 949-950.
17. Collett D (1991). *Modelling Binary Data*, Chapman & Hall, London.

18. Davis M, Whalen PJ (2001). The amygdala: vigilance and emotion. *Mol Psychiatry* 6:13-34.
19. De Oca BM, DeCola JP, Maren S, Fanselow MS (1998). Distinct Regions of the Periaqueductal Gray Are Involved in the Acquisition and Expression of Defensive Responses. *J Neurosci* 18: 3426–3432.
20. De Olmos JS, Alheid GF, Beltramino CA (1985). Amygdala In G. Paxinos (ed): *The Rat Nervous System, Vol.1, Forebrain and Midbrain*. New York: Academic Press, pp. 223-334.
21. Deakin JFW, Graeff FG (1991). 5-HT and mechanisms of defence. *J Psychopharmacol* 5: 305-315.
22. Eibl-Eibesfeldt I (1975). Em: *Ethology, the Biology of Behavior* (2ª edição), traduzido por: Erich Klinghammer, Copyright©.
23. Ervin FR, Mark VH (1969). Behavioral and affective responses to brain stimulation in man. *Neurobiological Aspects of Psychopathology* 159-166.
24. Fanselow MS (1991). The midbrain periaqueductal gray as a coordinator of action in response to fear and anxiety. Em: *The midbrain periaqueductalgray matter: Functional, neuroanatomical and immunohistochemical organization* (Depaulis A, Bandler R, editores), New York, Plenum Publishing Corporation, págs. 151-173.
25. Fanselow MS, LeDoux JE (1999). Why we think plasticity underlying Pavlovian fear conditioning occurs in the basolateral amygdala. *Neuron* 23: 229-32.
26. Fendt M, Koch M, Schnitzler HU (1994). Sensorimotor gating deficit after lesions of the superior colliculus. *Neuroreport* 5: 1725-8.
27. Fernandez de Molina A, Hunsperger RW (1962). Organization of the subcortical system governing defence and flight reactions in the cat. *J Physiol (Lond)*, 160: 200-213.

28. File SE (1980). The use of social interaction as a method for detecting anxiolytic activity of chlordiazepoxide-like drugs. *J Neurosci Methods* 2: 219-238.
29. File SE (1992). Behavioral Detection of Anxiolytic Action. Em: *Experimental Approaches to Anxiety and Depression* (J.M.Elliott, D.J.Heal and C.A.Marsden, editores), Copyright© by John Wiley & Sons Ltd.
30. Gallagher M, Holland PC (1994). The amygdale complex: Multiple roles in associative learning and attention. *Proc Natl Acad Sci* 91: 11771-11776.
31. Gentil V (1988). The aversive system, 5-HT and panic attacks. Em: *Animal Models of Psychiatric Disorders* (Simon P, Soubrié P, Wildlocher D, editores). Basel, Karger, vol. 1, págs. 142-145.
32. Goosens KA, Maren S (2001). Contextual and auditory fear conditioning are mediated by the lateral, basal and central amygdaloid nuclei in rats. *Learn Mem* 8: 148-155.
33. Gorman JM, Kent JM, Sulliva GM, Coplan JD (2000). Neuroanatomical Hypothesis of Panic Disorder. *Am J Psychiatry* 157: 493-505.
34. Graeff FG (1999). Medicamentos Ansiolíticos. Em: *Fundamentos de psicofarmacologia* (Graeff FG, Guimarães FS, editores) São Paulo: Editora Atheneu, págs. 123-160.
35. Gray JA (1976). The behavioural inhibition system: a possible substrate for anxiety. Em: *Theoretical and Experimental Bases of Behaviour Therapies* (Feldman MP e Broadhurst AM, editores), NY, John Wiley & Sons, págs. 3-41.
36. Hunsperger RW (1956). Affektreaktionen auf elektrische Reizung im Hirnstamm der Katze. *Helv Physiol Acta* 14: 70-92.
37. Iwata J, LeDoux JE, Reis DJ (1986). Destruction of intrinsic neurons in the lateral hypothalamus disrupts the classical conditioning of autonomic but not

- behavioral emotional responses in the rat. *Brain Res* 368: 161-166.
38. Johnston J B (1923). *J Comp Neurol* 35: 337- 482.
 39. Jolkkonen E, Pitkänen A (1998). Intrinsic connections of the rat amygdaloid complex: projections originating in the central nucleus. *J Comp Neurol* 395:53-72.
 40. Kaada BR, Andersen P, Jansen JJ (1954). Stimulation of the amygdaloid nuclear complex in unanesthetized cats. *Neurology* 4:48-64.
 41. Kalynchuk LE, Pinel JPJ, Treit D, Kippin TE (1997). Changes in emotional behavior produced by long-term amygdala kindling in rats. *Biol Psychiatry* 41: 438-451.
 42. Kalynchuk LE, Pinel JPJ, Treit D (1998). Long-term kindling and interictal emotionality in rats: effect of stimulation site. *Brain Res* 779: 149-157.
 43. Kandel E (2003) Em: *Princípios da Neurociência*. Ed Manole. São Paulo, Brasil.
 44. Kemble ED, Blanchard DC, Blanchard RJ, Takushi R (1984). Taming in wild rats following medial amygdaloid lesions. *Physiol Behav* 32: 131-4.
 45. Kemble ED, Blanchard DC, Blanchard RJ (1990). Effects of regional amygdaloid lesions on flight and defensive behaviors of wild black rats (*Rattus rattus*). *Physiol Behav* 48: 1-5.
 46. Klüver H, Bucy PC (1939). Preliminary analysis of functions of the temporal lobes in monkeys. *Arch Neurol Psychiat (Chicago)* 42:979-1000.
 47. LeDoux JE, Iwata J, Cicchetti P, Reis DJ (1988). Different Projections of the Central Amigdaloid Nucleus Mediate Autonomic and Behavioral Correlates of Conditioned Fear. *J Neurosci* 8: 2517-2529.
 48. LeDoux JE (2000). Emotion Circuits in the Brain. *Annu Rev Neurosci* 23:155–184.
 49. Levin GR (2004). The amygdala, the hippocampus, and emotional modulation of memory. *Neuroscientist* 10: 31-39.

50. Levine ES, Litto WJ, Jacobs BL (1990). Activity of cat locus coeruleus noradrenergic neurons during the defense reaction. *Brain Res* 29: 189-95.
51. Luiten PGM, Koolhaas JM, Boer S, Koopmans J (1985). The cortico-medial amygdale in the central nervous system organization of agonistic behavior. *Brain Research* 332: 283-297.
52. Lund TD, Rovis T, Chung WC, Handa RJ (2004). Novel Actions of Estrogen Receptor Beta on Anxiety-Related Behaviors. *Endocrinology* (doi:10.1210/en.2004-1158).
53. Maren S (2001). Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. *Annu Rev Neurosci* 24: 897-931.
54. McGregor IS, Hargreaves GA, Apfelbach R, Hunt GE (2004). Neural correlates of cat odor-induced anxiety in rats: region-specific effects of the benzodiazepine midazolam. *J Neurosci* 24: 4134-4144.
55. McNaughton N, Corr PJ (2004). A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 28:285–305.
56. Morgan MM, Carrive P (2001). Activation of the ventrolateral periaqueductal gray reduces locomotion but not mean arterial pressure in awake, freely moving rats. *Neuroscience* 102: 905-10.
57. Nashold BS, Wilson WP, Slaughter G (1969). Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. *J Neurosurg* 30: 14-24.
58. Paredes J, Winters RW, Schneiderman N, McCabe PM (2000). Afferents to central nucleus of the amygdale and functional subdivisions of the periaqueductal gray: neuroanatomical substrates for affective behavior. *Brain Research* 887: 157-173.
59. Patterson MM, Kesner RP (1981). *Electrical Stimulation Research Techniques*,

Academic Press, New York (*apud* Jenck *et al.*, 1995).

60. Paxinos G, Watson C (1998). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 2nd ed., San Diego, Academic Press.
61. Pitkänen A (2000). Connectivity of the rat amygdaloid complex. In: *The Amygdala: A Functional analysis*, edited by Aggleton JP. Oxford, UK: Oxford Univ. Press, p.31-115.
62. Pitkänen A, Amaral DG (1994). The distribution of GABAergic cells, fibers, and terminals in the monkey amygdaloid complex: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *J Neurosci* 14:2200-2224.
63. Price JL, Russchen FT, Amaral DG (1987). The Limbic Region. II: the Amygdaloid Complex. *New York: Elsevier Science*.
64. Rizvi TA, Ennis M, Behbehani MM, Shipley MT (1991). Connections between the central nucleus of the amygdala and the midbrain periaqueductal gray: topography and reciprocity. *J Comp Neurol* 303: 121-31
65. Rosalém, GF (2005). Caracterização das funções comportamentais do núcleo cuneiforme, Tese de Mestrado, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, E.S., Brasil.
66. Rosen JB (2004). The neurobiology of conditioned and unconditioned fear: A neurobehavioral system analysis of the amygdala. *Behavioral and Cognitive Neuroscience Reviews* 3: 23-41.
67. Rosvold HE, Mirski AF, Pribram KH (1954). Influence of amygdectomy on social behavior in monkeys. *J Comp Physiol Psychol* 47:173-178.
68. Schenberg LC, Costa MB, Borges PCL, Castro MFS (1990). Logistic analysis of the defense reaction induced by electrical stimulation of the rat mesencephalic tectum. *Neurosci Biobehav Rev* 14: 473-479.
69. Schenberg LC, Bittencourt AS, Sudré ECM, Vargas LC (2001). Modeling panic

- attacks. *Neurosci Biobehav Rev* 25: 647-659.
70. Schreiner LH, Kling A (1953). Behavioral changes following rhinencephalic injury in cat. *J Neurophysiol* 16:643-659.
71. Schreiner LH, Kling A (1954). Effects of castration on hypersexual behavior induced by rhinencephalic injury in cat. *Arch Neurol Psychiat (Chicago)* 72:180-186.
72. Schreiner LH, Kling A (1956). A Rhinencephalon and behavior. *Amer J Physiol* 184:486-490.
73. Selden NRW, Everitt BJ, Jarrard LE, Robbins T (1991). Complementary roles of the amygdala and hippocampus in aversive conditioning to explicit and contextual cues. *Neuroscience* 10: 531-539.
74. Shealy CN, Peele TL (1956). Studies on Amygdaloid Nucleus of Cat.
75. Smith WK (1950). Non-olfactory functions of the pyriform-amygdaloid-hippocampal complex *Fed Proc* 9:118.
76. Spiegel EA, Miller HR, Oppenheimer, MJ (1940). Forebrain and rage reaction. *J Neurophysiol* 3:538-548.
77. Sudré ECM, Barros MR, Sudré GN, Schenberg LC (1993). Thresholds of electrically induced defence reaction of the rat: short- and long-term adaptation mechanisms. *Behav Brain Res* 58: 141-154.
78. Swanson LW, Petrovich GD (1998). What is the amygdala? *TINS* vol.21, No.8.
79. Tannure RM (2005). Efeitos do abrasamento (*kindling*) da amígdala sobre os limiares da reação de defesa induzida por estimulação da matéria cinzenta periaquedutal de ratos, Tese de Mestrado, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, E.S., Brasil.
80. Thompson AF, Walker AE (1951). Behavioral alterations following lesions of the medial surface of the temporal lobe. *Arc Neurol Psychiat (Chicago)* 65:251-

252.

81. Ursin H (1965). The Effect of Amygdaloid Lesions on Flight and Defense Behavior in Cats. *Experimental Neurology* 11, 61-79.
82. Ursin H, Kaada BR (1960). Subcortical structures mediating the attention response induced by amygdala stimulation. *Expl Neurol* 2:109-122.
83. Van Bockstaele EJ, Peoples J, Valentino RJ (1999). Anatomic basis for differential regulation of the rostralateral peri-locus coeruleus region by limbic afferents. *Biol Psychiatry* 46: 1352-63.
84. Vargas LC, Marques TA, Schenberg LC (2000). Micturition and defensive behaviors are controlled by distinct neural networks within the dorsal periaqueductal gray and deep gray layer of the superior colliculus of the rat. *Neurosci Lett* 280(1): 45-8
85. Vargas LC, Schenberg LC (2001). Long-term effects of clomipramine and fluoxetine on dorsal periaqueductal gray-evoked innate defensive behaviours of the rat. *Psychopharmacology* 155: 260-268.
86. Vianna DM, Graeff FG, Brandao ML, Landeira-Fernandez J (2001). Defensive freezing evoked by electrical stimulation of the periaqueductal gray: comparison between dorsolateral and ventrolateral regions. *Neuroreport* 21: 4109-12.
87. Walker AE, Thompson AF, McQueen JD (1953). Behavior and the temporal rhinencephalon in the monkey. *Bull Johns Hopk Hosp* 93:65-93.
88. Walker DL, Davis M (1997). Double Dissociation between the Involvement of the Bed Nucleus of the Stria Terminalis and the Central Nucleus of the Amygdala in Startle Increases Produced by Conditioned versus Unconditioned Fear. *The Journal of Neuroscience*, 17:9375–9383.
89. Yeomans JS (1990). *Principles of Brain Stimulation*, Oxford University Press, NY.

10 ANEXOS

ANEXO 1: PLANILHAS DE REGISTRO DOS ITENS COMPORTAMENTAIS OBSERVADOS DURANTE AS SESSÕES DE ESTIMULAÇÃO COM VARIAÇÃO DA INTENSIDADE DE UM PULSO SENOIDAL OU DA FREQUÊNCIA DE UM PULSO QUADRADO.

PLANILHA DE ESTIMULAÇÃO

Rato: _____. Responsável: **Catarine**. Peso (g): _____. Implantação: ___/___/200__.

Perfusão: ___/___/200__ . Localização do Eletrodo: _____.

Coordenadas	Zero	Variação	Ponto de Implante
Lateral			
Vertical			
Antero-Posterior			

Est.: Onda senoidal ,freq. 60 Hz e int. variável, Sessão N° 01, Estimulador N° ____

Data: ___/___/200__.

Comportamento	Intensidade (µA)														
	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70
Dormir	X	X													
Repouso		X	X							X	X		X	X	
Olfação		X	X	X	X	X	X	X	X			X			X
Esquadrinhar				X	X		X								
Autolimpeza					X										
Levantar					X										
Marcha			X	X											
Quiescência						X	X	X							
Exoftalmia															
Imobilidade															
Defecação															
Micção															
Trote															
Arrancadas															
Galope															
Saltos															

Obs.: _____

PLANILHA DE ESTIMULAÇÃO

Rato: _____. Responsável: **Catarine**. Peso (g): _____. Implantação: ____/____/200____.
 Perfusão: ____/____/200____. Localização do Eletrodo: _____.

Coordenadas	Zero	Variação	Ponto de Implante
Lateral			
Vertical			
Antero-Posterior			

Est.: Onda quad., freq. variável (Hz), dur. 1 ms e intens. fixa de ____ μ A, Sessão N° 02, Data: ____/____/200____.

Comportamento	Frequências														
	0	6	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
Dormir	X	X													
Repouso		X	X							X	X		X	X	
Olfacção		X	X	X	X	X	X	X	X			X			X
Esquadrinhar				X	X		X								
Autolimpeza					X										
Levantar					X										
Marcha			X	X											
Quiescência						X	X	X							
Exoftalmia															
Imobilidade															
Defecação															
Micção															
Trote															
Arrancadas															
Galope															
Saltos															

Obs.: _____

ANEXO 2: GELATINIZAÇÃO DE LÂMINAS PARA A HISTOLOGIA

GELATINIZAÇÃO DE LÂMINAS PARA A HISTOLOGIA

As lâminas foram previamente gelatinizadas para a montagem dos cortes permanentes da área cerebral estudada, seguindo a técnica descrita a seguir:

Procedimentos:

1. As lâminas foram colocadas em “racks” e submersas em água quente (100°C) e detergente por ½ hora.
2. A seguir, estas foram lavadas diversas vezes com água quente (100°C) até a remoção completa do detergente.
3. As lâminas foram lavadas várias vezes com água fria ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) durante ½ hora.
4. Finalmente, as lâminas foram lavadas com água destilada durante 15 minutos.
5. No final da lavagem as lâminas foram mantidas na água destilada até o momento de gelatinizar.
6. A solução de gelatinização consistia de 5g de gelatina dissolvidos em 500 ml de água destilada, acrescidos de 0,5g de sulfato de crômio e potássio. A mistura foi aquecida até 50 °C sendo rapidamente filtrada à vácuo.
7. Escorridos os “racks” com as lâminas lavadas, estes foram colocados na solução de gelatinização, numa temperatura de 50 °C, por 2 minutos.
8. Decorrido este tempo, as lâminas foram mantidas em estufa à 45 °C por um período mínimo de 24 horas para secagem.

ANEXO 3: COLORAÇÃO DOS CORTES DO CÉREBRO

SEQÜÊNCIA DE EVENTOS PARA A COLORAÇÃO DOS CORTES DO CÉREBRO

1. Vermelho neutro 1% - 12min.
2. H₂O destilada - 10seg.
3. Álcool 70° - 10seg.
4. Álcool 95° - 10seg.
5. Álcool 100° - 10seg.
6. Álcool 100° - 10seg.
7. Álcool / Xilol 1:1 - 10seg.
8. Xilol 100% - 10seg.
9. Colocação de DPX sobre os cortes.
10. Colocação da lamínula.
11. Secagem e estufa a 36 °C – 24 - 48 hs

ANEXO 4: FICHA DE REGISTRO DAS FREQUÊNCIAS RELATIVAS (TOTAL) E ACUMULADAS (TOTAL AC.) DE UM ITEM COMPORTAMENTAL (AUTOLIMPEZA)

FICHA DE REGISTRO DAS FREQUÊNCIAS RELATIVAS (TOTAL) E ACUMULADAS
(TOTAL AC.).

Grupo experimental: Onda senoidal

Resposta: autolimpeza

Sessão: 1

Procedimento: Variação de intensidade

Responsável: Catarine conti

RATO	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70
KT01												1			
KT02								1							
KT03					1										
KT04									1						
KT05										1					
KT06														1	
KT07													1		
KT08						1									
KT09									1						
KT10								1							
KT11								1							
KT12										1					
KT13								1							
KT14													1		
KT15															
KT16								1							
KT17															
Total	0	0	0	0	1	1	0	5	2	2	0	1	2	1	0
T. AC.	0	0	0	0	1	2	2	7	9	11	11	12	14	15	15

ANEXO 5: PLANILHA DE ENTRADA DE DADOS (INPUT)

Esta planilha só está mostrando a entrada de dados de duas respostas (autolimpeza e esquadrinhar) com apenas um estímulo (variação de frequência – FRQ).

EST	RSP	N	CTR	CEN	MED	LE1	LE2	LE3	INT	FA
FRQ	AUT	40	1	0	0	1.0000000	0	0	10	.
FRQ	AUT	40	1	0	0	1.3010300	0	0	20	1
FRQ	AUT	40	1	0	0	1.4771213	0	0	30	5
FRQ	AUT	40	1	0	0	1.6020600	0	0	40	12
FRQ	AUT	40	1	0	0	1.6989700	0	0	50	16
FRQ	AUT	40	1	0	0	1.7781513	0	0	60	18
FRQ	AUT	40	1	0	0	1.8450980	0	0	70	19
FRQ	AUT	40	1	0	0	1.9030900	0	0	80	19
FRQ	AUT	40	1	0	0	1.9542425	0	0	90	19
FRQ	AUT	40	1	0	0	2.0000000	0	0	100	19
FRQ	AUT	40	1	0	0	2.0413927	0	0	110	20
FRQ	AUT	40	1	0	0	2.0791812	0	0	120	20
FRQ	AUT	40	1	0	0	2.1139434	0	0	130	.
FRQ	AUT	15	0	1	0	0	1.0000000	0	10	.
FRQ	AUT	15	0	1	0	0	1.3010300	0	20	.
FRQ	AUT	15	0	1	0	0	1.4771213	0	30	2
FRQ	AUT	15	0	1	0	0	1.6020600	0	40	3
FRQ	AUT	15	0	1	0	0	1.6989700	0	50	3
FRQ	AUT	15	0	1	0	0	1.7781513	0	60	8
FRQ	AUT	15	0	1	0	0	1.8450980	0	70	.
FRQ	AUT	15	0	1	0	0	1.9030900	0	80	.
FRQ	AUT	15	0	1	0	0	1.9542425	0	90	.
FRQ	AUT	15	0	1	0	0	2.0000000	0	100	.
FRQ	AUT	15	0	1	0	0	2.0413927	0	110	.
FRQ	AUT	15	0	1	0	0	2.0791812	0	120	.
FRQ	AUT	15	0	1	0	0	2.1139434	0	130	.
FRQ	AUT	17	0	0	1	0	0	1.0000000	10	.
FRQ	AUT	17	0	0	1	0	0	1.3010300	20	1
FRQ	AUT	17	0	0	1	0	0	1.4771213	30	2
FRQ	AUT	17	0	0	1	0	0	1.6020600	40	3
FRQ	AUT	17	0	0	1	0	0	1.6989700	50	4
FRQ	AUT	17	0	0	1	0	0	1.7781513	60	4
FRQ	AUT	17	0	0	1	0	0	1.8450980	70	4
FRQ	AUT	17	0	0	1	0	0	1.9030900	80	5
FRQ	AUT	17	0	0	1	0	0	1.9542425	90	5
FRQ	AUT	17	0	0	1	0	0	2.0000000	100	.
FRQ	AUT	17	0	0	1	0	0	2.0413927	110	.
FRQ	AUT	17	0	0	1	0	0	2.0791812	120	.
FRQ	AUT	17	0	0	1	0	0	2.1139434	130	.
FRQ	ESQ	40	1	0	0	1.0000000	0	0	10	1
FRQ	ESQ	40	1	0	0	1.3010300	0	0	20	7
FRQ	ESQ	40	1	0	0	1.4771213	0	0	30	16
FRQ	ESQ	40	1	0	0	1.6020600	0	0	40	21
FRQ	ESQ	40	1	0	0	1.6989700	0	0	50	24
FRQ	ESQ	40	1	0	0	1.7781513	0	0	60	26
FRQ	ESQ	40	1	0	0	1.8450980	0	0	70	26
FRQ	ESQ	40	1	0	0	1.9030900	0	0	80	26
FRQ	ESQ	40	1	0	0	1.9542425	0	0	90	26
FRQ	ESQ	40	1	0	0	2.0000000	0	0	100	26
FRQ	ESQ	40	1	0	0	2.0413927	0	0	110	26
FRQ	ESQ	40	1	0	0	2.0791812	0	0	120	27
FRQ	ESQ	40	1	0	0	2.1139434	0	0	130	27
FRQ	ESQ	15	0	1	0	0	1.0000000	0	10	.
FRQ	ESQ	15	0	1	0	0	1.3010300	0	20	2
FRQ	ESQ	15	0	1	0	0	1.4771213	0	30	2
FRQ	ESQ	15	0	1	0	0	1.6020600	0	40	4
FRQ	ESQ	15	0	1	0	0	1.6989700	0	50	4
FRQ	ESQ	15	0	1	0	0	1.7781513	0	60	7
FRQ	ESQ	15	0	1	0	0	1.8450980	0	70	7
FRQ	ESQ	15	0	1	0	0	1.9030900	0	80	10
FRQ	ESQ	15	0	1	0	0	1.9542425	0	90	.
FRQ	ESQ	15	0	1	0	0	2.0000000	0	100	.
FRQ	ESQ	15	0	1	0	0	2.0413927	0	110	.
FRQ	ESQ	15	0	1	0	0	2.0791812	0	120	.
FRQ	ESQ	15	0	1	0	0	2.1139434	0	130	.
FRQ	ESQ	17	0	0	1	0	0	1.0000000	10	.
FRQ	ESQ	17	0	0	1	0	0	1.3010300	20	2
FRQ	ESQ	17	0	0	1	0	0	1.4771213	30	3
FRQ	ESQ	17	0	0	1	0	0	1.6020600	40	4
FRQ	ESQ	17	0	0	1	0	0	1.6989700	50	5
FRQ	ESQ	17	0	0	1	0	0	1.7781513	60	5
FRQ	ESQ	17	0	0	1	0	0	1.8450980	70	5
FRQ	ESQ	17	0	0	1	0	0	1.9030900	80	6
FRQ	ESQ	17	0	0	1	0	0	1.9542425	90	6
FRQ	ESQ	17	0	0	1	0	0	2.0000000	100	6
FRQ	ESQ	17	0	0	1	0	0	2.0413927	110	6
FRQ	ESQ	17	0	0	1	0	0	2.0791812	120	7
FRQ	ESQ	17	0	0	1	0	0	2.1139434	130	7

ANEXO 6: PROGRAMA UTILIZADO PARA A ANÁLISE LOGÍSTICA.

O PROCEDIMENTO “LOGISTIC” DO PROGRAMA SAS®

O programa a seguir foi utilizado para a análise da resposta de locomoção nas 3 sessões de estimulação senoidal. Um programa similar foi utilizado para as demais respostas e para compará-las em um único tratamento. O programa fornece os desvios de verossimilhança (-2 Log L, ver anexo seguinte) para a realização dos **Testes de Coincidência** dos 3 grupos, assim como para a comparação pareada destes grupos. Os desvios de verossimilhança para os **Testes de Paralelismo** são fornecidos nas linhas 56 e 79 (as linhas foram numeradas para facilitar a compreensão do programa).

ABREVIATURAS E COMANDOS DO PROGRAMA:

- linha de comentário.

OPTIONS NODATE PAGESIZE=100 - comando para não colocar a data em cada cabeçalho e para fixar o tamanho da página em 80 linhas.

DATA - procedimento de entrada dos dados (SEN)

TITLEn - comando para inserir os títulos (entre as aspas).

INFILE - comando para importar arquivo-texto com os dados (entre as aspas).

INPUT - descrição das variáveis das colunas do arquivo-texto.

\$ - variável não numérica ou classificatória.

N - número de animais estimulados.

FA – frequência acumulada de resposta.

PRB = FA/N – probabilidade de resposta.

PROC SORT - comando para classificação das variáveis.

PROC PRINT - comando para impressão das variáveis listadas.

BY - comando condicional ('por' resposta: corrida, imobilidade, etc.).

RUN - comando de execução do bloco anterior do programa.

PROC LOGISTIC – procedimento logístico (*procedure logistic*).

NOSIMPLE - comando opcional para excluir as estatísticas simples.

MODEL – modelo .

NOINT - comando opcional para não ajustar um intercepto comum (*no intercept*).

COVB - comando opcional que solicita a matriz de covariação (*covariance matrix*).

VAR - variáveis

A1, A2, A3 - variáveis indicadoras dos 3 grupos experimentais para as diferentes respostas e tipos de estímulos.

LE1,LE2,LE3 - logaritmo das intensidades das respectivas sessões.

B1, B2, B3 – inclinação das curvas logísticas.

O PROGRAMA

```

1 OPTIONS NODATE PAGESIZE=100;
2 DATA AREAS;
3 TITLE1 'REGRESSAO LOGISTICA DOS EFEITOS DA INTENSIDADE';
4 TITLE2 'COMPARACAO DOS COMPORTAMENTOS ELICIADOS PELOS GRUPOS CONTROLE, CENTRAL E
MEDIAL DA AMÍGDALA';
5 INFILE 'C:\CATARINE\MESTRADO\KTPRN\AMISCCM.PRN';
6 INPUT EST $ RESP $ N A1 A2 A3 LE1 LE2 LE3 INT FA;
7 A00=A1+A2+A3;
8 A12=A1+A2;
9 A13=A1+A3;
10 A23=A2+3;
11 LE00=LE1+LE2+LE3;
12 LE12=LE1+LE2;
13 LE13=LE1+LE3;
14 LE23=LE2+LE3;
15 PCT1=FA/N;
16 PCT=round(PCT1,0.001);
17 LABEL A1='DLT'
18 A2='LAT'
19 A3='VLT';
20 RUN;
21 PROC SORT;
22 BY EST RESP;
23 RUN;
24 PROC PRINT;
25 VAR EST RESP N A1 A2 A3 LE1 LE2 LE3 INT FA PCT;
26 RUN;
27 PROC LOGISTIC NOSIMPLE;
28 TITLE3 'TESTE DE COINCIDENCIA: MODELO COMPLETO: 6 PARAMETROS';
29 MODEL FA/N = A1-A3 LE1-LE2 LE3/NOINT COVB;
30 BY EST RESP;
31 RUN;
32 PROC LOGISTIC NOSIMPLE;
33 TITLE3 'TESTE DE COINCIDENCIA: MODELO REDUZIDO: 2 PARAMETROS ';
34 TITLE4 'H0: A1=A2=A3';
35 MODEL FA/N = A00 LE00/NOINT;
36 BY EST RESP;
37 RUN;
38 PROC LOGISTIC NOSIMPLE;
39 TITLE3 'TESTE DE COINCIDENCIA: MODELO REDUZIDO: 4 PARAMETROS ';
40 TITLE4 'H0: A1=A2';
41 MODEL FA/N = A12 A3 LE12 LE3/NOINT;
42 BY EST RESP;
43 RUN;
44 PROC LOGISTIC NOSIMPLE;
45 TITLE3 'TESTE DE COINCIDENCIA: MODELO REDUZIDO: 4 PARAMETROS ';
46 TITLE4 'H0: A1=A3';
47 MODEL FA/N = A13 A2 LE13 LE2/NOINT;
48 BY EST RESP;
49 RUN;
50 PROC LOGISTIC NOSIMPLE;
51 TITLE3 'TESTE DE COINCIDENCIA: MODELO REDUZIDO: 4 PARAMETROS ';
52 TITLE4 'H0: A2=A3';
53 MODEL FA/N = A23 A1 LE23 LE1/NOINT;
54 BY EST RESP;
55 RUN;
56 PROC LOGISTIC NOSIMPLE;
57 TITLE3 'TESTE DE PARALELISMO: MODELO REDUZIDO: 4 PARAMETROS';
58 TITLE4 'H0: LE1=LE2=LE3';
59 MODEL FA/N = A1-A3 LE00/NOINT;
60 BY EST RESP;
61 RUN;
62 PROC LOGISTIC NOSIMPLE;
63 TITLE3 'TESTE DE PARALELISMO: MODELO REDUZIDO: 5 PARAMETROS';
64 TITLE4 'H0: LE1=LE2';
65 MODEL FA/N = A1-A3 LE12 LE3/NOINT;
66 BY EST RESP;

```

```
67 RUN;
68 PROC LOGISTIC NOSIMPLE;
69 TITLE3 'TESTE DE PARALELISMO: MODELO REDUZIDO: 5 PARAMETROS';
70 TITLE4 'H0: LE1=LE3';
71 MODEL FA/N = A1-A3 LE13 LE2/NOINT;
72 BY EST RESP;
73 RUN;
74 PROC LOGISTIC NOSIMPLE;
75 TITLE3 'TESTE DE PARALELISMO: MODELO REDUZIDO: 5 PARAMETROS';
76 TITLE4 'H0: LE2=LE3';
77 MODEL FA/N = A1-A3 LE23 LE1/NOINT;
78 BY EST RESP;
79 RUN;
```

ANEXO 7: PRINTOUT DO PROGRAMA

A1, A2 e A3, correspondem às variáveis indicadoras dos 3 grupos comparados (respectivamente CTR, CEN e MED) e LE1, LE2, LE3 o logaritmo da intensidade de estimulação utilizada nas sessões respectivas. Só foi mostrado neste anexo o printout referente a um tipo de estímulo (pulso senoidal variando a intensidade) e uma resposta (autolimpeza).

COMPARACAO DAS REGRESSÕES DOS GRUPOS CTR, CEN E MED.

OBS	EST	RESP	N	A1	A2	A3	LE1	LE2	LE3	INT	FA	PCT
1105	SEN	AUT	40	1	0	0	1.00000	0.00000	0.00000	10	.	.
1106	SEN	AUT	40	1	0	0	1.17609	0.00000	0.00000	15	.	.
1107	SEN	AUT	40	1	0	0	1.30103	0.00000	0.00000	20	4	0.114
1108	SEN	AUT	40	1	0	0	1.39794	0.00000	0.00000	25	7	0.200
1109	SEN	AUT	40	1	0	0	1.47712	0.00000	0.00000	30	15	0.429
1110	SEN	AUT	40	1	0	0	1.54407	0.00000	0.00000	35	20	0.571
1111	SEN	AUT	40	1	0	0	1.60206	0.00000	0.00000	40	22	0.629
1112	SEN	AUT	40	1	0	0	1.65321	0.00000	0.00000	45	27	0.771
1113	SEN	AUT	40	1	0	0	1.69897	0.00000	0.00000	50	30	0.857
1114	SEN	AUT	40	1	0	0	1.74036	0.00000	0.00000	55	32	0.914
1115	SEN	AUT	40	1	0	0	1.77815	0.00000	0.00000	60	32	0.914
1116	SEN	AUT	40	1	0	0	1.81291	0.00000	0.00000	65	32	0.914
1117	SEN	AUT	40	1	0	0	1.84510	0.00000	0.00000	70	33	0.943
1127	SEN	AUT	15	0	1	0	0.00000	1.00000	0.00000	10	.	.
1128	SEN	AUT	15	0	1	0	0.00000	1.17609	0.00000	15	.	.
1129	SEN	AUT	15	0	1	0	0.00000	1.30103	0.00000	20	5	0.147
1130	SEN	AUT	15	0	1	0	0.00000	1.39794	0.00000	25	8	0.235
1131	SEN	AUT	15	0	1	0	0.00000	1.47712	0.00000	30	9	0.265
1132	SEN	AUT	15	0	1	0	0.00000	1.54407	0.00000	35	14	0.412
1133	SEN	AUT	15	0	1	0	0.00000	1.60206	0.00000	40	21	0.618
1134	SEN	AUT	15	0	1	0	0.00000	1.65321	0.00000	45	27	0.794
1135	SEN	AUT	15	0	1	0	0.00000	1.69897	0.00000	50	31	0.912
1136	SEN	AUT	15	0	1	0	0.00000	1.74036	0.00000	55	31	0.912
1137	SEN	AUT	15	0	1	0	0.00000	1.77815	0.00000	60	31	0.912
1138	SEN	AUT	15	0	1	0	0.00000	1.81291	0.00000	65	33	0.971
1139	SEN	AUT	15	0	1	0	0.00000	1.84510	0.00000	70	33	0.971
1149	SEN	AUT	17	0	0	1	0.00000	0.00000	1.00000	10	.	.
1150	SEN	AUT	17	0	0	1	0.00000	0.00000	1.17609	15	.	.
1151	SEN	AUT	17	0	0	1	0.00000	0.00000	1.30103	20	.	.
1152	SEN	AUT	17	0	0	1	0.00000	0.00000	1.39794	25	3	0.176
1153	SEN	AUT	17	0	0	1	0.00000	0.00000	1.47712	30	4	0.235
1154	SEN	AUT	17	0	0	1	0.00000	0.00000	1.54407	35	4	0.235
1155	SEN	AUT	17	0	0	1	0.00000	0.00000	1.60206	40	7	0.412
1156	SEN	AUT	17	0	0	1	0.00000	0.00000	1.65321	45	8	0.471
1157	SEN	AUT	17	0	0	1	0.00000	0.00000	1.69897	50	8	0.471
1158	SEN	AUT	17	0	0	1	0.00000	0.00000	1.74036	55	8	0.471
1159	SEN	AUT	17	0	0	1	0.00000	0.00000	1.77815	60	9	0.529
1160	SEN	AUT	17	0	0	1	0.00000	0.00000	1.81291	65	9	0.529
1161	SEN	AUT	17	0	0	1	0.00000	0.00000	1.84510	70	.	.

COMPARACAO DAS REGRESSÕES DOS GRUPOS CONTROLE, CENTRAL E MEDIAL
 TESTE DE COINCIDENCIA: MODELO COMPLETO: 6 PARAMETROS

----- EST=SEN RESP=AUT -----

The LOGISTIC Procedure

Data Set: WORK.AREAS
 Response Variable (Events): FA
 Response Variable (Trials): N
 Number of Observations: 31
 Link Function: Logit

Response Profile

Ordered Value	Binary Outcome	Count
1	EVENT	557
2	NO EVENT	355

Criteria for Assessing Model Fit

Criterion	Without Covariates	With Covariates	Chi-Square for Covariates
AIC	1264.300	870.111	.
SC	1264.300	899.005	.
-2 LOG L	1264.300	858.111	406.189 with 6 DF (p=0.0001)
Score	.	.	346.326 with 6 DF (p=0.0001)

Analysis of Maximum Likelihood Estimates

Variable	Parameter Estimate	Standard Error	Wald Chi-Square	Pr > Chi-Square	Standardized Estimate	Variable Label
A1	-14.2065	1.5062	88.9591	0.0001	-3.870582	CTR
A2	-16.1585	1.6712	93.4905	0.0001	-4.384114	CEN
A3	-7.3632	2.2729	10.4946	0.0012	-1.517704	MED
LE1	9.3239	0.9503	96.2658	0.0001	4.160702	
LE2	10.5136	1.0526	99.7667	0.0001	4.671222	
LE3	4.2156	1.3719	9.4422	0.0021	1.425317	

Association of Predicted Probabilities and Observed Responses

Concordant = 83.7% Somers' D = 0.696
 Discordant = 14.1% Gamma = 0.711
 Tied = 2.1% Tau-a = 0.331
 (197735 pairs) c = 0.848

Estimated Covariance Matrix

Variable	A1	A2	A3	LE1	LE2	LE3
A1	2.2687279	0	0	-1.42567	0	0
A2	0	2.7927644	0	0	-1.752754	0
A3	0	0	5.1661378	0	0	-3.109383
LE1	-1.42567	0	0	0.9030684	0	0
LE2	0	-1.752754	0	0	1.1079362	0
LE3	0	0	-3.109383	0	0	1.8821535

COMPARACAO DAS REGRESSÕES DOS GRUPOS CONTROLE, CENTRAL E MEDIAL
 COINCIDENCIA: MODELO REDUZIDO: 2 PARAMETROS
 H0: A1=A2=A3

TESTE DE

----- EST=SEN RESP=AUT -----

The LOGISTIC Procedure

Data Set: WORK.AREAS
 Response Variable (Events): FA
 Response Variable (Trials): N
 Number of Observations: 31
 Link Function: Logit

Response Profile

Ordered Value	Binary Outcome	Count
1	EVENT	557
2	NO EVENT	355

Criteria for Assessing Model Fit

Criterion	Without Covariates	With Covariates	Chi-Square for Covariates
AIC	1264.300	931.800	.
SC	1264.300	941.431	.
-2 LOG L	1264.300	927.800	336.501 with 2 DF (p=0.0001)
Score	.	.	299.852 with 2 DF (p=0.0001)

Analysis of Maximum Likelihood Estimates

Variable	Parameter Estimate	Standard Error	Wald Chi-Square	Pr > Chi-Square	Standardized Estimate
A00	-12.9465	0.9321	192.9111	0.0001	0
LE00	8.3177	0.5787	206.5973	0.0001	0.748108

Association of Predicted Probabilities and Observed Responses

Concordant = 78.1%	Somers' D = 0.627
Discordant = 15.4%	Gamma = 0.670
Tied = 6.5%	Tau-a = 0.298
(197735 pairs)	c = 0.813

COMPARACAO DAS REGRESSÕES DOS GRUPOS CONTROLE, CENTRAL E MEDIAL
 COINCIDENCIA: MODELO REDUZIDO: 4 PARAMETROS
 H0: A1=A2

TESTE DE

----- EST=SEN RESP=AUT -----

The LOGISTIC Procedure

Data Set: WORK.AREAS
 Response Variable (Events): FA
 Response Variable (Trials): N
 Number of Observations: 31
 Link Function: Logit

Response Profile

Ordered Value	Binary Outcome	Count
1	EVENT	557
2	NO EVENT	355

Criteria for Assessing Model Fit

Criterion	Without Covariates	With Covariates	Chi-Square for Covariates
AIC	1264.300	866.955	.
SC	1264.300	886.217	.
-2 LOG L	1264.300	858.955	405.346 with 4 DF (p=0.0001)
Score	.	.	345.910 with 4 DF (p=0.0001)

Analysis of Maximum Likelihood Estimates

Variable	Parameter Estimate	Standard Error	Wald Chi-Square	Pr > Chi-Square	Standardized Variable Estimate	Variable Label
A12	-15.1236	1.1183	182.8844	0.0001	-3.117282	
A3	-7.3632	2.2729	10.4946	0.0012	-1.517704	MED
LE12	9.8825	0.7050	196.4927	0.0001	3.410163	
LE3	4.2156	1.3719	9.4422	0.0021	1.425317	

Association of Predicted Probabilities and Observed Responses

Concordant = 82.5%	Somers' D = 0.692
Discordant = 13.3%	Gamma = 0.723
Tied = 4.3%	Tau-a = 0.329
(197735 pairs)	c = 0.846

COMPARAÇÃO DAS REGRESSÕES DOS GRUPOS CONTROLE, CENTRAL E MEDIAL
 COINCIDÊNCIA: MODELO REDUZIDO: 4 PARÂMETROS
 H0: A1=A3

TESTE DE

----- EST=SEN RESP=AUT -----

The LOGISTIC Procedure

Data Set: WORK.AREAS
 Response Variable (Events): FA
 Response Variable (Trials): N
 Number of Observations: 31
 Link Function: Logit

Response Profile

Ordered Value	Binary Outcome	Count
1	EVENT	557
2	NO EVENT	355

Criteria for Assessing Model Fit

Criterion	Without Covariates	With Covariates	Chi-Square for Covariates
AIC	1264.300	921.565	.
SC	1264.300	940.828	.
-2 LOG L	1264.300	913.565	350.735 with 4 DF (p=0.0001)
Score	.	.	306.391 with 4 DF (p=0.0001)

Analysis of Maximum Likelihood Estimates

Variable	Parameter Estimate	Standard Error	Wald Chi-Square	Pr > Chi-Square	Standardized Variable Estimate	Variable Label
A13	-11.2986	1.1489	96.7094	0.0001	-3.065532	
A2	-16.1585	1.6712	93.4905	0.0001	-4.384114	CEN
LE13	7.1912	0.7083	103.0859	0.0001	3.209289	
LE2	10.5136	1.0526	99.7667	0.0001	4.671222	

Association of Predicted Probabilities and Observed Responses

Concordant = 80.5%	Somers' D = 0.644
Discordant = 16.1%	Gamma = 0.666
Tied = 3.4%	Tau-a = 0.306
(197735 pairs)	c = 0.822

COMPARAÇÃO DAS REGRESSÕES DOS GRUPOS CONTROLE, CENTRAL E MEDIAL
 COINCIDÊNCIA: MODELO REDUZIDO: 4 PARÂMETROS
 H0: A2=A3

TESTE DE

----- EST=SEN RESP=AUT -----

The LOGISTIC Procedure

Data Set: WORK.AREAS
 Response Variable (Events): FA
 Response Variable (Trials): N
 Number of Observations: 31
 Link Function: Logit

Response Profile

Ordered Value	Binary Outcome	Count
1	EVENT	557
2	NO EVENT	355

Criteria for Assessing Model Fit

Criterion	Without Covariates	With Covariates	Chi-Square for Covariates
AIC	1264.300	1056.275	.
SC	1264.300	1075.538	.
-2 LOG L	1264.300	1048.275	216.025 with 4 DF (p=0.0001)
Score	.	.	188.516 with 4 DF (p=0.0001)

Analysis of Maximum Likelihood Estimates

Variable	Parameter Estimate	Standard Error	Wald Chi-Square	Pr > Chi-Square	Standardized Variable Estimate	Variable Label
A23	-0.4278	0.1540	7.7187	0.0055	-0.116083	
A1	-12.9229	1.5755	67.2810	0.0001	-3.520881	CTR
LE23	1.2171	0.3551	11.7519	0.0006	0.545282	
LE1	9.3239	0.9503	96.2658	0.0001	4.160702	

Association of Predicted Probabilities and Observed Responses

Concordant = 72.4%	Somers' D = 0.470
Discordant = 25.4%	Gamma = 0.481
Tied = 2.3%	Tau-a = 0.224
(197735 pairs)	c = 0.735

COMPARACAO DAS REGRESSÕES DOS GRUPOS CONTROLE, CENTRAL E MEDIAL
 PARALELISMO: MODELO REDUZIDO: 4 PARAMETROS
 H0: LE1=LE2=LE3

TESTE DE

----- EST=SEN RESP=AUT -----

The LOGISTIC Procedure

Data Set: WORK.AREAS
 Response Variable (Events): FA
 Response Variable (Trials): N
 Number of Observations: 31
 Link Function: Logit

Response Profile

Ordered Value	Binary Outcome	Count
1	EVENT	557
2	NO EVENT	355

Criteria for Assessing Model Fit

Criterion	Without Covariates	With Covariates	Chi-Square for Covariates
AIC	1264.300	879.087	.
SC	1264.300	898.349	.
-2 LOG L	1264.300	871.087	393.214 with 4 DF (p=0.0001)
Score	.	.	340.051 with 4 DF (p=0.0001)

Analysis of Maximum Likelihood Estimates

Variable	Parameter Estimate	Standard Error	Wald Chi-Square	Pr > Chi-Square	Standardized Variable Estimate	Variable Label
A1	-13.6006	0.9786	193.1584	0.0001	-3.705514	CTR
A2	-13.6678	0.9816	193.8721	0.0001	-3.708338	CEN
A3	-15.2168	1.0433	212.7501	0.0001	-3.136491	MED
LE00	8.9402	0.6139	212.0774	0.0001	0.804098	

Association of Predicted Probabilities and Observed Responses

Concordant = 83.4%	Somers' D = 0.689
Discordant = 14.5%	Gamma = 0.704
Tied = 2.1%	Tau-a = 0.328
(197735 pairs)	c = 0.845

COMPARACAO DAS REGRESSÕES DOS GRUPOS CONTROLE, CENTRAL E MEDIAL
 PARALELISMO: MODELO REDUZIDO: 5 PARAMETROS
 H0: LE1=LE2

TESTE DE

----- EST=SEN RESP=AUT -----

The LOGISTIC Procedure

Data Set: WORK.AREAS
 Response Variable (Events): FA
 Response Variable (Trials): N
 Number of Observations: 31
 Link Function: Logit

Response Profile

Ordered Value	Binary Outcome	Count
1	EVENT	557
2	NO EVENT	355

Criteria for Assessing Model Fit

Criterion	Without Covariates	With Covariates	Chi-Square for Covariates
AIC	1264.300	868.819	.
SC	1264.300	892.897	.
-2 LOG L	1264.300	858.819	405.482 with 5 DF (p=0.0001)
Score	.	.	345.986 with 5 DF (p=0.0001)

Analysis of Maximum Likelihood Estimates

Variable	Parameter Estimate	Standard Error	Wald Chi-Square	Pr > Chi-Square	Standardized Variable Estimate	Variable Label
A1	-15.0919	1.1210	181.2463	0.0001	-4.111808	CTR
A2	-15.1637	1.1247	181.7873	0.0001	-4.114195	CEN
A3	-7.3632	2.2729	10.4946	0.0012	-1.517704	MED
LE12	9.8849	0.7052	196.4886	0.0001	3.410982	
LE3	4.2156	1.3719	9.4422	0.0021	1.425317	

Association of Predicted Probabilities and Observed Responses

Concordant = 83.6%	Somers' D = 0.693
Discordant = 14.3%	Gamma = 0.708
Tied = 2.1%	Tau-a = 0.330
(197735 pairs)	c = 0.847

COMPARACAO DAS REGRESSÕES DOS GRUPOS CONTROLE, CENTRAL E MEDIAL
 PARALELISMO: MODELO REDUZIDO: 5 PARAMETROS
 H0: LE1=LE3

TESTE DE

----- EST=SEN RESP=AUT -----

The LOGISTIC Procedure

Data Set: WORK.AREAS
 Response Variable (Events): FA
 Response Variable (Trials): N
 Number of Observations: 31
 Link Function: Logit

Response Profile

Ordered Value	Binary Outcome	Count
1	EVENT	557
2	NO EVENT	355

Criteria for Assessing Model Fit

Criterion	Without Covariates	With Covariates	Chi-Square for Covariates
AIC	1264.300	877.033	.
SC	1264.300	901.112	.
-2 LOG L	1264.300	867.033	397.267 with 5 DF (p=0.0001)
Score	.	.	341.777 with 5 DF (p=0.0001)

Analysis of Maximum Likelihood Estimates

Variable	Parameter Estimate	Standard Error	Wald Chi-Square	Pr > Chi-Square	Standardized Variable Estimate	Variable Label
A1	-12.0321	1.2095	98.9598	0.0001	-3.278161	CTR
A2	-16.1585	1.6712	93.4905	0.0001	-4.384114	CEN
A3	-13.5593	1.2819	111.8914	0.0001	-2.794852	MED
LE13	7.9476	0.7606	109.1959	0.0001	3.546857	
LE2	10.5136	1.0526	99.7667	0.0001	4.671222	

Association of Predicted Probabilities and Observed Responses

Concordant = 83.5%	Somers' D = 0.692
Discordant = 14.3%	Gamma = 0.707
Tied = 2.1%	Tau-a = 0.329
(197735 pairs)	c = 0.846

COMPARACAO DAS REGRESSÕES DOS GRUPOS CONTROLE, CENTRAL E MEDIAL
 PARALELISMO: MODELO REDUZIDO: 5 PARAMETROS
 H0: LE2=LE3

TESTE DE

----- EST=SEN RESP=AUT -----

The LOGISTIC Procedure

Data Set: WORK.AREAS
 Response Variable (Events): FA
 Response Variable (Trials): N
 Number of Observations: 31
 Link Function: Logit

Response Profile

Ordered Value	Binary Outcome	Count
1	EVENT	557
2	NO EVENT	355

WARNING: 35 observation(s) were deleted due to missing values for the response or explanatory variables.

Criteria for Assessing Model Fit

Criterion	Without Covariates	With Covariates	Chi-Square for Covariates
AIC	1264.300	880.793	.
SC	1264.300	904.871	.
-2 LOG L	1264.300	870.793	393.507 with 5 DF (p=0.0001)
Score	.	.	340.103 with 5 DF (p=0.0001)

Analysis of Maximum Likelihood Estimates

Variable	Parameter Estimate	Standard Error	Wald Chi-Square	Pr > Chi-Square	Standardized Estimate	Variable Label
A1	-14.2065	1.5062	88.9591	0.0001	-3.870582	CTR
A2	-13.2093	1.2830	106.0085	0.0001	-3.583945	CEN
A3	-14.7332	1.3583	117.6470	0.0001	-3.036805	MED
LE23	8.6508	0.8054	115.3829	0.0001	3.875549	
LE1	9.3239	0.9503	96.2658	0.0001	4.160702	

Association of Predicted Probabilities and Observed Responses

Concordant = 83.0%	Somers' D = 0.689
Discordant = 14.1%	Gamma = 0.710
Tied = 2.9%	Tau-a = 0.328
(197735 pairs)	c = 0.845

ANEXO 8: CÁLCULO DO ERRO PADRÃO DA MEDIANA (COLLETT, 1991)

CÁLCULO DO ERRO PADRÃO DA MEDIANA (Collett, 1991)

Considerando que a I_{50} é uma função de dois parâmetros, isto é, $I_{50}(\alpha, \beta)$, o método usual que fornece a variância aproximada desta função e o erro padrão do estimador da I_{50} define que a variância de $I_{50}(\alpha, \beta)$ é, aproximadamente

$$(\partial I_{50} / \partial \alpha)^2 \text{Var}(\alpha) + (\partial I_{50} / \partial \beta)^2 \text{Var}(\beta) + 2[(\partial I_{50} / \partial \alpha) (\partial I_{50} / \partial \beta)] \text{Cov}(\alpha, \beta)$$

De acordo com o modelo logístico o estimador da $I_{50}(\alpha, \beta)$ é $-\alpha/\beta$. Se $\rho = \alpha/\beta$, $v_{00} = \text{Var}(\alpha)$, $v_{11} = \text{Var}(\beta)$ e $v_{01} = \text{Cov}(\alpha, \beta)$, temos:

$$\text{Var}(I_{50}) \approx (v_{00} - 2\rho v_{01} + \rho^2 v_{11}) / \beta^2$$

e o erro padrão da I_{50} será dado por

$$\text{s.e.}(I_{50}) \approx [(v_{00} - 2\rho v_{01} + \rho^2 v_{11}) / \beta^2]^{1/2} \quad (1)$$

Como a nossa variável explanatória é expressa em logaritmo da intensidade, o erro padrão da I_{50} , propriamente dita, é dado por

$$\text{s.e.}(I_{50}) \approx I_{50} \{\text{s.e.}[\text{Log}(I_{50})]\} \quad (2)$$

As variâncias e covariâncias dos parâmetros são fornecidas na matriz de covariância (ver anexo anterior - printout), como:

$$\begin{bmatrix} v_{00} & v_{01} \\ v_{01} & v_{11} \end{bmatrix}$$

As expressões (1) e (2) foram calculadas a partir dos dados da matriz de covariância e com o auxílio de planilha eletrônica

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)